

## (7) 食品の微生物制御に関する研究開発

(平成26年度～平成28年度)

### 1. 研究のねらい

食品関連企業からは迅速な食品微生物検査が求められている。我々は、これまでに、培養併用蛍光インサイチューハイブリダイゼーション (FISHFC) を応用した迅速細菌検査法の研究開発を行ってきた。FISHFC は、迅速性、検出細菌の特異性、検出感度に優れており、この技術を応用した迅速細菌検査システムの商品化を目指してきた。しかし、FISHFC システムを適用できる食品試料は、水産物と畜産物に限定され、蛍光ノイズを有する緑黄色野菜や惣菜には適用できなかつた。緑黄色野菜や惣菜にも適用可能とするため、マルチ蛍光スペクトル分析を導入した計測装置を開発し、様々な食品への適用化を検討している。このシステムの実用化にあたっては、工程の簡易化が必要で、とりわけ吸引ろ過工程を省略化する必要がある。また、開発装置の光源、感度の校正法の確立が必要である。そこで、吸引ろ過工程を省略化できるキットを開発するとともに、マルチ蛍光スペクトル計測装置の光源強度、検出感度の調整に用いる校正用試料の量産化方法を開発する。

### 2. 研究の方法

#### (1) 寒天平板計数

測定対象を腸内細菌科とした。試料をリン酸緩衝液で希釈した乳剤を調製した。これを滅菌シャーレに 1ml 添加し、次に、加熱滅菌後 50℃ に保温した VRBG 寒天培地を注ぎ静置した。培地の固化後 VRBG 寒天培地で重層した。35℃ で 1 日間培養し、典型的コロニーを目視計数した。

#### (2) FISHFC 計数

測定対象を腸内細菌科とした。試料のリン酸緩衝液希釈乳剤を、試作したフィルターデバイス (アクリルリング (高さ 10mm、φ47mm) とディスクメンブレンフィルター (ポアサイズ 0.4 μm) を貼り合わせ) に考案した簡易手法 (以下に記述) により供した。フィルターデバイス上にマイクロコロニーを形成させるためにフィルターデバイスを 35℃、6 時間保温した。次に、エタノールをフィルターデバイスに加え細菌を固定した。その後、フィルターデバイスを乾燥し、フィルターデバイスにハイブリダイゼーションバッファー (ホルムアミド 20%、塩化ナトリウム 0.9M、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 0.01%、Tris-HCl (pH7.4) 0.02M) 1.5ml と 10 μM 腸内細菌科検出用蛍光標識 (Cy5) DNA プローブ (tgctctcgcgaggtcgcttctctt) 5 μl を添加し、46℃ で 45 分ハイブリダイゼーション反応をさせた。次にフィルターデバイスに洗浄液を添加し 46℃、15 分間浸して洗浄した。その後、蒸留水ですすぎ、乾燥させた。次にメンブレンフィルターデバイス中の蛍光マイクロコロニーを FISHFC 蛍光自動計測装置 (試作機) にて計数し腸内細菌科数を求めた。

### 3. 研究成果の概要

平成 26 年度に考案した簡易化システムは、小シャーレ、フィルターデバイス、フィルター抑えと重しから構成され、試料懸濁液を吸収して濾過工程を省略できフィルターのたわみを防止すると共に、マイクロコロニー形成培養を同時に行うことが可能なものだった。フィルター抑えは市販プラスチックチューブのスクリーキャップを、重しは金属製ナットをそれぞれ代用した。平成 27 年度は、前記簡易化システムのフィルター抑えと重しについて改良を図り、これらに代わるプラスチック製 FISHFC キャップを試作した。FISHFC キャップは、フィルターデバイスと脱着が容易で、操作性が改善された。次に、FISHFC キャップを用いたシステムの性能評価を行った。FISHFC キャップを用いた簡易化システムキット、大腸菌懸濁液試料と腸内細菌科計測プローブを用いて簡易化 FISHFC 計数を行い、また、腸内細菌科寒天平板計数を行った。両計測をそれぞれ 4 回繰り返し行い、両者の値を比較した。その結果、腸内細菌科寒天平板培養計数は  $4500 \pm 1500$  CFU/ml、FISHFC キャップを用いた腸内細菌科簡易化 FISHFC 計数は  $2900 \pm 700$  CFU/ml で、両者は同等であったので、開発システムは妥当と評価し、今後、これを用いることとした。

担当者 大坪雅史、鳥海滋、村田政隆