

(7) 食品の微生物危害迅速評価技術の実用化検討

(平成29年度～31年度)

1. 研究のねらい

食品関連企業に向けた迅速細菌検査法として、これまでにマルチ蛍光スペクトル分析 FISHFC システムを試作した。本システムは、大腸菌、腸内細菌科菌群、サルモネラ、リステリア、黄色ブドウ球菌、腸炎ビブリオをそれぞれ特異的に迅速で正確に測定できた。しかし、本システムは、食品産業製造現場での適用性等の現場ニーズを満たしているか不明である。また、真菌の迅速検査法のニーズはあり、真菌のうちカビの定量法は確立したが、酵母の定量が困難のため真菌の迅速検査法が十分に確立されていない等の問題があった。これらの問題により開発システムは商品化段階に至っていない。本研究開発は、商品化に向けこれらの問題を解決するため、食品製造企業に開発システムを持ち込み、現場での適用性やニーズを調査する。また、本システムによる迅速な酵母定量法を開発し迅速正確な真菌定量法を構築する。

2. 研究の方法

(1) マルチ蛍光スペクトル分析 FISHFC システムによるサルモネラ計数

小シャーレ下皿に直径 50mm 濾紙 5 枚を置き、その上にフィルターデバイス (直径 47 mm アクリルリングにメンブレンフィルター (ポアサイズ 0.40 μ m) を貼り試作した) を置き小シャーレ上蓋を被せて検査キットを構成した。次に、食品試料 10 倍希釈懸濁液 0.1ml と 1 \times SEL (胆汁酸塩含有) 培地 2 ml を混合して検査キットのフィルターデバイスに添加した。小シャーレ上蓋を被せ 2 分置いた。その後、上蓋を外して溶解 0.6%寒天 2ml をフィルターデバイスに注ぎ蓋を被せ 35°C16h 培養した。培養後、デバイスに 100%エタノール 2ml 添加し 20 分固定した。フィルターデバイスを乾燥後、ハイブリダイゼーション操作を行った。すなわち、ハイブリダイゼーションバッファ (30%ホルムアミド、0.01%ドデシル硫酸ナトリウム[SDS]、0.9M 塩化ナトリウム、20mM Tris-HCl [pH 7.4]) 1.5ml に 10 μ M TAMRA 標識 SAL343 (GCTCACAGCACATGCGCTTTTG) 5 μ l および 10 μ M ヘルパープローブ (SalH260-280ATTCAGGCTGTGGGCTCCTCC、SalH301-320TCGCGCGCCTTTCCAGACGC、Sal H281-300TTCCACTAACACACATGCTG、Sal H321-342TG TACGGGGCTGT CACCCTGTA、SalH365-383GTCCCGCCCTACTCATCGA) 各 5 μ l をフィルターデバイスに添加し 46°C60 分反応させた。ハイブリダイゼーションバッファを排出し 46°Cにて洗浄液 5ml を加え 46°C15 分置いた後、洗浄液を排出し蒸留水で洗浄して乾燥した。フィルターデバイスをこれまでに試作したマルチ蛍光スペクトル分析 FISHFC 装置に供し蛍光画像をカラー撮影し、蛍光プローブ固有の色調を有すマイクロコロニーをモニター画面から目視確認して計測した。

(2) サルモネラ測定対照法 (4 日間)

食品衛生検査指針を参考にクロモアガーサルモネラ寒天を用いて行った。

(3) 一般細菌数

食品衛生検査指針を参考に標準寒天を用いて行った。

(4) 供試真菌株

酵母は *Pichia anomala* IFO10213T、*Wickerhamomyces anomala* NBRC10213 を、カビは *Cladosporium cladosporioides* TSY375 を、それぞれ用い、各菌株の培養液の希釈懸濁液 ($2 \times 10^1 \sim 1 \times 10^2$ CFU/ml) を調製し試料とした。

(5) マルチ蛍光スペクトル分析 FISHFC システムによる真菌測定 (42 時間)

試料懸濁液 0.1ml を 2ml の PYD (クロラムフェニコール含有) 培地に懸濁し、検査キットのフィルターデバイスに添加した。小シャーレ上蓋を被せ 2 分置いた。0.6% アガロース溶解液を 2ml 添加した。25°C、40h 培養した後、エタノール 2ml 添加し 30 分静した。フィルターデバイスを乾燥後、ハイダイゼーションバッファ (35%ホルムアミド、0.02%ドデシル硫酸ナトリウム[SDS]、0.9M 塩化ナトリウム、20mM Tris-HCl [pH 7.4]、蛍光プローブ (TAMRA 標識 EUK516 (ACCAGACTTGCCCTCC)) を用いてハイブリダイゼーション (46°C、1 h) し、後の操作は前記と同様に行った。

(6) 真菌測定従来法 (7 日間)

食品衛生検査指針を参考に PDA 寒天平板を用いて行った。

3. 研究成果の概要

(1) マルチ蛍光スペクトル分析 FISHFC システムの現場適用性の検討

研究協力頂いた食品製造会社 M 社 (道南地域) に本システムを持ち込み、現場の品質管理担当者に対照法と本システムによる試験を実施の上、本システムの現場適用性を検討頂いた。今回、評価対象をサルモネラ検査とした。試料を紅サケ切り身とし、サルモネラ (*Salmonella Enteritidis* ATCC 13076) を添加(最終菌数 $2 \sim 4 \times 10^2$ CFU/g)あるいは無添加の紅サケ切り身をそれぞれ調製し用いた。その結果、紅サケ切り身 (無添加) と紅サケ切り身 (サルモネラ添加) の本システムによるサルモネラ計数値は、検査翌日に得られ、いずれも対照法と同等で一般細菌数より低かったことから特異的かつ正確と推定した。対照法は陽性確定に至るまで 4 日間を要すが、マルチ蛍光スペクトル分析 FISHFC システムは現場品質管理担当者でも迅速、正確な判定結果が得られ、現場適用の可能性があった。

(2) マルチ蛍光スペクトル分析 FISHFC システムによる真菌の迅速測定法の開発

昨年度に開発した酵母コロニー脱落防止手法を真菌計数システムに取り入れ同システムの真菌計数の妥当性を検討した。その結果、同システム (42 時間) は供試真菌株試料に対し、真菌測定従来法 (7 日間) と同等の計数値となり、開発システムは、迅速で正確な真菌計数ができ、現場での応用可能性が示唆された。

担当者 大坪雅史