

## (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～令和元年度)

### 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マルチ蛍光スペクトル分析 FISHFC システムを開発した。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、腸炎ビブリオを迅速で正確に測定できた。しかし、開発システムは現場ニーズを満たしているか不明のため、商品化段階に進むことができない。現場ニーズとして、環境ストレス（乾燥、凍結、加熱等）にさらされた微生物を測定できることが求められる。そこで、本開発システムによる環境ストレス微生物の計測を検討した。

### 2. 研究の方法

#### (1) 大腸菌平板計数法（対照法）

食品衛生検査指針を参考に XMG 寒天または VRBG 寒天を用いた。

#### (2) 一般細菌平板計数法（対照法）

食品衛生検査指針を参考に標準寒天を用いた。

#### (3) マルチ蛍光スペクトル分析 FISHFC システムによる大腸菌計数

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 0.4  $\mu$ 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 1ml と 1×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 0.6%溶解寒天 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  $\mu$ M TAMRA 標識 Ent D (TGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTT) 5  $\mu$ l をフィルターデバイスに添加し 46°C60 分反応させた。その後ハイブリダイゼーションバッファを排出し 46°Cの環境下で洗浄液 5ml を加え 15 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数した。

#### (4) サイバーG 染色による一般細菌数測定

食品 10 倍希釈懸濁液または希釈液 1ml とマイクロコロニー形成培地 2ml (2×SEL) を混同し検査キットのフィルターデバイス (0.4  $\mu$ m) に添加した。次いで 0.6%アガロース 2ml を添加し 35°Cで 24 時間培養後、エタノール 2ml を添加し 10 分固定後乾燥した。サイバーグリーン溶液(1000 倍 希釈液 20mM Tris-HCl pH7.4) 3ml 添加し 30 分後、サイバーグリー

ン溶液を排出し乾燥し、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、蛍光信号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計数した。

#### (5) FISHFC 顕微鏡目視による大腸菌計数

マイクロコロニー形成培地を損傷回復培地としてトリプトソーヤ寒天培地を用い、上述の FISHFC 操作を行った。蛍光信号観察は、倍率 4 倍の対物レンズを用いた顕微鏡目視にて実施し信号を有するマイクロコロニーを計数した。

#### (6) 環境ストレス微生物試料

環境ストレス微生物のモデルとして次の試料を調製した。

- ①新鮮培養大腸菌を健常大腸菌とし、これを $-20^{\circ}\text{C}$ で保存後凍結ストレス大腸菌とした。健常あるいは凍結ストレス大腸菌をカット野菜に添加し食品試料とした。
- ②一般細菌にとって、松前漬け ( $A_w0.92$ 、酒精添加) は乾燥等ストレス環境であるとし一般細菌 (乾燥等ストレス) 含有食品とした。また、カット野菜は細菌増殖の好条件にあり一般細菌 (健常) 含有食品とした。
- ③ $55^{\circ}\text{C}$  2 分処理した大腸菌を加熱ストレス大腸菌とした。

### 3. 研究成果の概要

#### (1) 開発システムの食品中の環境ストレス微生物計数試験

- ①開発システムによる食品中の凍結ストレス微生物計数について試験した。大腸菌 (健常) を添加したカット野菜の大腸菌数計数では、開発システム計数値は XMG 平板計数 (対照法) と同等だったが、大腸菌 (凍結ストレス) を添加したカット野菜では、開発システムの計数値は対照法の  $1/10$  となった。
- ②開発システムによる食品中の乾燥等ストレス微生物の計数について試験した。一般細菌 (健常) 含有食品 (カット野菜) の一般細菌計数では、開発システム計数値は対照法と同等だったが、一般細菌 (乾燥等ストレス) 含有食品 (松前漬け) では、開発システムの計数値は対照法の  $1/10$  となった。
- ③以上より、大腸菌と一般細菌の測定において、開発システムは、マトリックスの影響なく健常微生物をほぼ正確に計数できたが、環境ストレス (凍結、乾燥等) 微生物では計数値は対照法の  $1/10$  であった。

#### (2) FISHFC 顕微鏡目視による加熱ストレス微生物の計数

健常な大腸菌の計数は、トリプトソーヤ寒天 (非選択培地) 平板、VRBG 寒天 (選択培地) 平板及び FISHFC 顕微鏡目視で、すべて同等だった。加熱ストレス大腸菌では、VRBG 寒天平板が最も低く、次いで、FISHFC 顕微鏡目視、トリプトソーヤ寒天平板だった。FISHFC 顕微鏡目視計数は、加熱ストレス微生物を VRBG 寒天平板より正確に測定できた。

#### (3) 開発システムの改良点

以上の結果より、マルチ蛍光スペクトル分析 FISHFC システムを次の通り変更することで、

環境ストレス微生物を正確に計測できる見通しを得た。

- ①マイクロコロニー形成培地をトリプトソーヤ寒天とする。
- ②蛍光検出部の現状構造は、試料に励起光を斜めから照射し、試料の真上から蛍光フィルターを通過した光を直接カメラで撮影する方式だが、今後、試料と蛍光フィルターの間に対物レンズを装着する。

担当者 大坪雅史