

平成24年度戦略的基盤技術高度化支援事業

「発酵食品製造における微生物汚染防止のための品質管理システムの開発」

研究開発成果等報告書

平成25年3月

委託者 関東経済産業局

委託先 財団法人埼玉県産業振興公社

目次

第1章 研究開発の概要

1-1	研究開発の背景・研究目的及び目標	
1-1-1	研究開発の背景	1
1-1-2	微生物汚染源探索システム	2
1-1-3	新たな指標を用いた汚染源探索システム	2
1-1-4	微生物汚染源探索システムの迅速化、高度化、自動化技術	3
1-1-5	研究の目標	3
1-2	研究体制	
1-2-1	研究組織及び管理体制	4
1-2-2	管理員及び研究員	5
1-2-3	経理担当者及び業務管理者の所属、氏名	6
1-2-4	他からの指導・協力者	7
1-3	研究成果概要	
1-3-1	研究開発概要	8
1-4	当該プロジェクトの連絡窓口	9
第2章	研究内容	
2-1	乳酸菌群マイクロフロー解析キットの開発	
2-1-1	はじめに	10
2-1-2	MALキットの開発	11
2-1-3	MALキットの実用化	13
2-2	耐熱性菌群マイクロフロー解析キットの開発	
2-2-1	はじめに	14
2-2-2	試験方法	14
2-2-3	MABキットの性能評価	15
2-3	汚染源検索データベースの構築	
2-3-1	はじめに	17
2-3-2	ローカルデータベースソフトウェア	17
2-4	自動測定用マイクロフロー解析液体培地キットの開発	
2-4-1	はじめに	19
2-4-2	液体培地とヘッドスペースガス圧法による菌数計測	19
2-4-3	電気化学計測方法及び装置	20
2-4-4	電気化学計測の手順	21

2-4-5	大腸菌群の電気化学計測	2 2
2-5	マイクロフローラ解析 DNA プローブの開発	
2-5-1	はじめに	2 3
2-5-2	プライマー設計の対象領域	2 3
2-5-3	大腸菌群分別用プライマーの開発	2 4
2-5-4	PCR 法による大腸菌群計測方法	2 5
2-5-5	融点を利用した大腸菌群の検証	2 6
2-5-6	フィールドテスト	2 6
第3章	全体総括	2 7

第1章 研究開発の概要

1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

1-1-1 研究開発の背景

我が国には酒、味噌、醤油、漬け物、納豆、かつお節など数多くの伝統的発酵食品が育まれた。これらは元来、環境中から分離された微生物の自然発酵により創り出された食品であったが、現在は品質、嗜好性、機能性などの面で洗練され、繊細な製造管理を求められる食品となっている。発酵食品の場合、雑菌がわずかに混入しても発酵工程で増殖し、製品に致命的なダメージを与える可能性があるため、工場内の衛生管理には細心の注意を必要とするが、図1-1に示した通り、人、モノ、水、空気などの動きに伴う外部からの微生物の持ち込みや工場内での拡散を完全に防ぐのは不可能である。そのため、発酵食品工場では、環境検査や製品の抜き取り試験により製造工程や製品の一般生菌数や大腸菌群数を調べ、微生物汚染が起きた際の影響を最小限に抑える努力を常に欠かせない。しかし、製品への微生物汚染を発見しても、汚染源や製品への混入経路がわからなければ、現状では製品から雑菌が検出されなくなるまで清掃浄化を繰り返すしか手立てはなく、衛生状態を回復させるまでには長い時間と多大な労力・経費を要し、生産活動の中断、信用・信頼の失墜も含め損害は莫大となる。

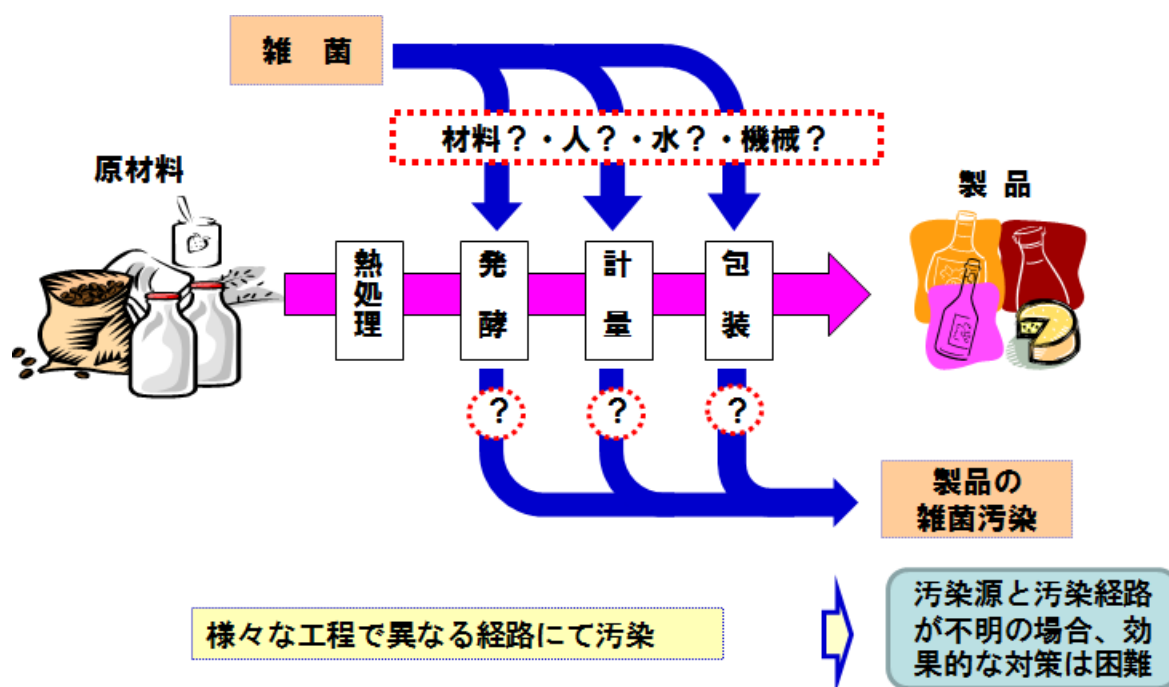


図1-1 様々な汚染源、経路を経由した食品の微生物汚染

1-1-2 微生物汚染源探索システム

我々はこれまでに大腸菌群用マイクロフロー分析キット「MACキット」(コージンバイオ(株))を開発し、さらにこれを用いた衛生管理システム「Rapicom」を実用化した。この技術は加熱食品が製造工程で再汚染した場合、最も有効な対処手段である。図1-2に示したとおり、製造工程中の熱処理により原材料が持っていた大腸菌群が一度死滅する加熱食品の場合、食品から検出される大腸菌群は製造工程のいずれかで再汚染したものである。一方、大腸菌群とは、乳糖発酵するグラム陰性無芽胞桿菌の総称であり、その種類は100にも及ぶ。これらの大腸菌群の生育環境適性は同一ではないため、工場内の各所に常在化している大腸菌群の種類や量比は各箇所の環境条件によって異なる。従って、製品から採取された大腸菌群の種類や量比を調べることで汚染源が判明することになる。さらに工場内、工程間の相同性を調べることで微生物汚染の経路を知ることも可能になる。これを利用したのが、Rapicomであり、大腸菌群の種類や量比、即ちマイクロフローを簡単に調べる手段がMACキットである。

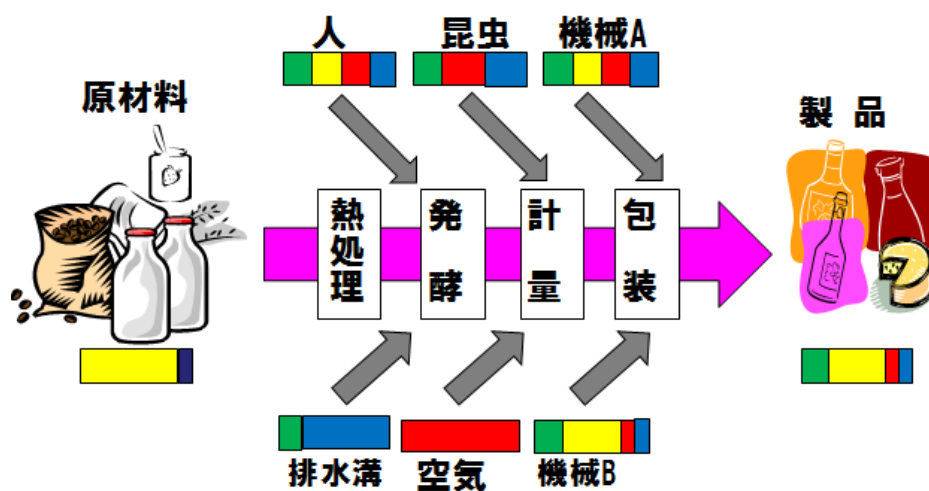


図1-2 食品から検出された大腸菌群マイクロフローと汚染源各所との関係

1-1-3 新たな指標を用いた汚染源探索システム

工程中に加熱殺菌のない非加熱食品の場合、大腸菌群マイクロフローを指標とする汚染源探索システムでは、原材料や外部からの大腸菌群持込みの影響が大き過ぎ、汚染源や汚染経路を明瞭に示すのが難しかった。そのため、大腸菌群以外の指標を見出す必要があった。そこで、植物材料や畜肉材料で特徴的な乳酸菌や土壌からの持込が問題となる耐熱性菌群を指標とする新たな汚染源探索システムを検討した。これらの菌群はいずれの食材にも含まれる可能性があり、特に発酵食品で混入すれば、発酵工程で大增殖し、製品に致命的な影響を与える危険がある。また、比較的熱にも強く流通時において包装食品の腐敗事故の直接原因となるケースも多い。そこで、今回の事業では、新たに乳酸菌群マイクロフロー解析キット及び耐熱性菌群マイクロフロー解析キットの開発を行った。

1-1-4 微生物汚染源探索システムの迅速化、高度化、自動化技術

微生物汚染原因の解析に際して、過去の自社内のデータや自社以外のデータを検索し、同様の事例と比較することで迅速な汚染源や経路の推定が可能となる。また、工場内の汚染箇所を関連付けることで汚染経路の推測にもつながる。このように実測データが不足していても、迅速に汚染源を探索するためのツールとなる汚染源検索データベースを構築する。また、大規模な工場の衛生環境調査や汚染事故の際など、短時間で多数の検体のマイクロフローラを分析しなければならない場合には、自動マイクロフローラ分析が必要となる。自動測定には寒天平板培地よりも液体培地の方が適しており、マイクロフローラ分析のためには、液体中の菌数を自動測定する技術が必要となる。そこで、本事業ではマイクロフローラ分析用液体培地と液体培地中の菌数測定技術についても検討した。さらに、測定の迅速化、精度向上、高スループット化を目指して、DNAプライマーを用いたマイクロフローラ分析技術についても検討した。

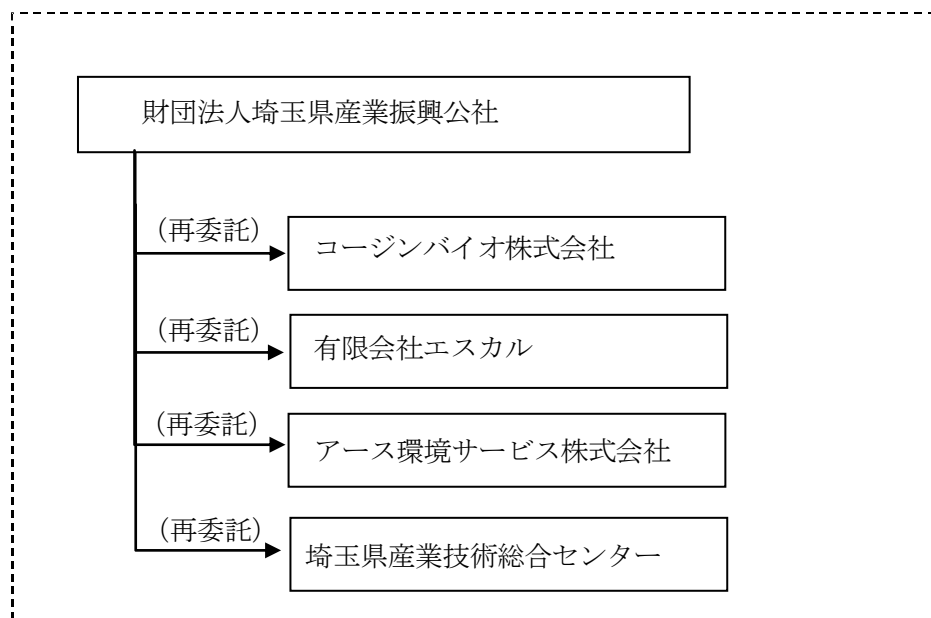
1-1-5 研究の目標

食品の品質劣化の直接的要因となる乳酸菌群と耐熱性菌群に関して、小規模な発酵食品製造業に利用しやすい平面培地を用いたマイクロフローラ解析キットを開発し、これに基づく衛生管理システムを確立する。また、緊急時の対応や大規模工場の管理にも利用できる多数試料の迅速測定が可能なマイクロフローラ解析技術を開発する。

1-2 研究体制

1-2-1 研究組織及び管理体制

1) 研究組織（全体）

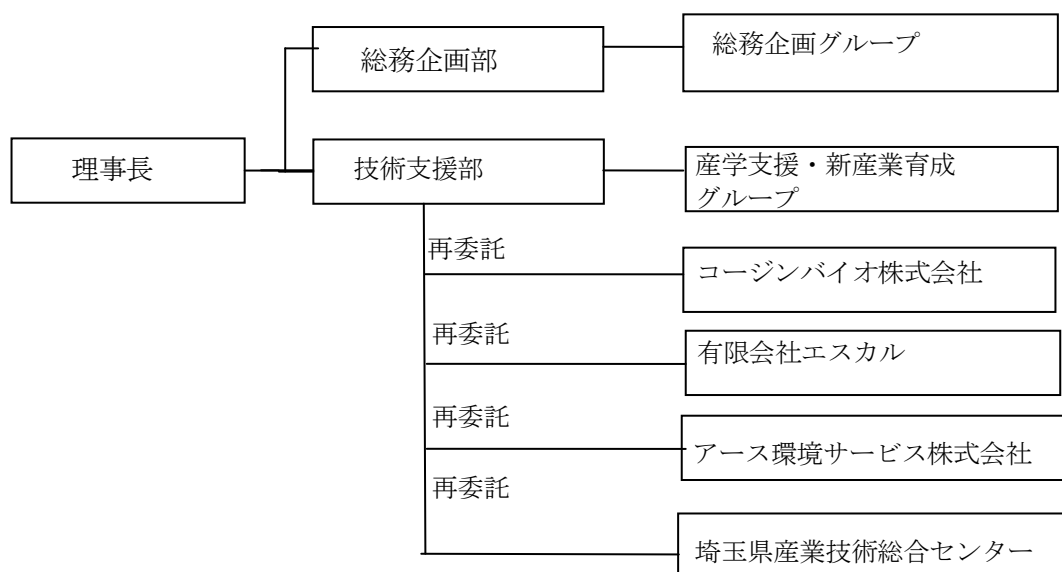


統括研究代表者（P L） コージンバイオ株式会社 微生物研究部 部長 井上耕博	副統括研究代表者（S L） アース環境サービス株式会社 総合分析センター センター長 猪野 毅
-----------------------------------------------	-------------------------------------------------------

2) 管理体制

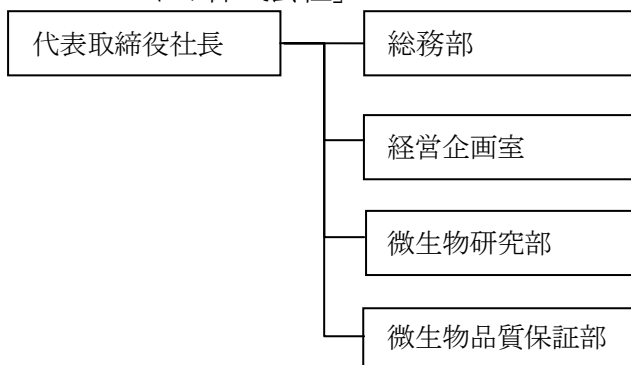
①事業管理機関

[財団法人埼玉県産業振興公社]

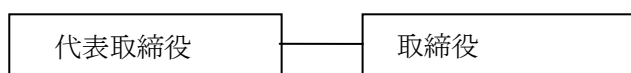


② 再委託先

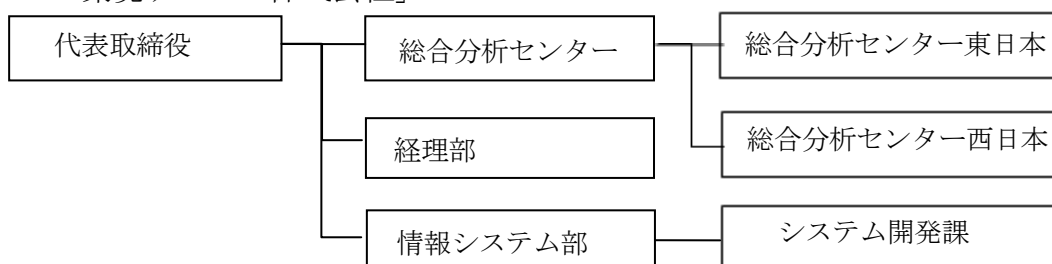
[コージンバイオ株式会社]



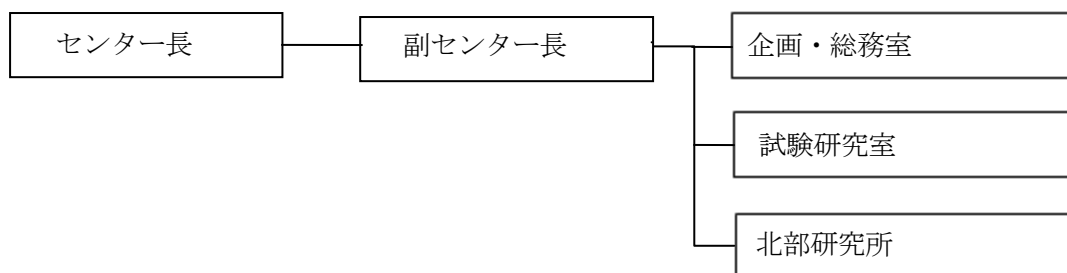
[有限会社エスカル]



[アース環境サービス株式会社]



[埼玉県産業技術総合センター]



1-2-2 管理員及び研究員

【事業管理者】 財団法人埼玉県産業振興公社

氏名	所属・役職	実施内容 (番号)
井原 孝一	技術支援部 産学支援・新産業育成グループ 主任調査役	⑥
五十嵐 久夫	総務企画部 総務企画グループ 主査	⑥

【再委託先】（研究員）

コージンバイオ株式会社

氏名	所属・役職	実施内容（番号）
井上 耕博	微生物研究部 部長	①、②、③、④、⑤
庭野 清司	微生物品質保証部 部長	①、②、④
板橋 由美子	微生物研究部 係長	①、②、④

有限会社エスカル

氏名	所属・役職	実施内容（番号）
吉田 忠	代表取締役	③、④

アース環境サービス株式会社

氏名	所属・役職	実施内容（番号）
猪野 毅	総合分析センター センター長	①、②、③
矢野 圭介	総合分析センター西日本 課長代理	①、②、③
竹中 達晴	総合分析センター東日本 課長代理	①、②
長尾 寛行	情報システム部 システム開発課	③
松瀬 佳子	総合分析センター東日本 主任	①、②
龜尾 直子	総合分析センター西日本 主任	①、②

埼玉県産業技術総合センター

氏名	所属・役職	実施内容（番号）
関根 正裕	試験研究室 担当部長	①、②、③、④、⑤
富永 達矢	北部研究所 主任	①、②、④、⑤

1-2-3 経理担当者及び業務管理者の所属、氏名

（事業管理者）

財団法人埼玉県産業振興公社

（経理担当者）総務企画部 総務企画グループ 主査

五十嵐 久夫

（業務管理者）技術支援部 部長

中島 規之

（再委託先）

コージンバイオ株式会社

（経理担当者） 総務部 主任

松村 希一

（業務管理者） 取締役 経営企画室 室長

中村 雄一

有限会社エスカル

(経理担当者) 代表取締役 吉田 忠
 (業務管理者) 取締役 吉田 睦奥子

アース環境サービス株式会社

(経理担当者) 経理部 部長代理 沼田 兼佳
 (業務管理者) 総合分析センター西日本 課長代理 西村 功

埼玉県産業技術総合センター

(経理担当者) 企画・総務室 総務経理担当 担当部長 山岸 善行
 北部研究所 総務担当 担当部長 村田 恵美子
 (業務管理者) 技術支援室 副室長 戸枝 保
 北部研究所 所長 新井 尚機

1 - 2 - 4 他からの指導・協力者

研究開発推進委員会 委員

氏名	所属・役職	備考
井上 耕博	コージンバイオ株式会社 微生物研究部 部長	委 PL
猪野 毅	アース環境サービス株式会社 総合分析センター センター長	委 SL
庭野 清司	コージンバイオ株式会社 微生物品質保証部 部長	委
板橋 由美子	コージンバイオ株式会社微生物研究部 係長	委
吉田 忠	有限会社エスカル代表取締役	委
矢野 圭介	アース環境サービス株式会社 総合分析センター西日本課長代理	委
関根 正裕	埼玉県産業技術総合センター 技術支援室 担当部長	
富永 達矢	埼玉県産業技術総合センター 北部研究所 主任	
小柳津 広志	国立大学法人東京大学 生物生産工学研究センター 植物機能工学研究室 教授	アドバイザー
植村 浩	独立行政法人産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門 主任研究員	アドバイザー
徳元 俊弘	大塚食品株式会社 常務取締役	アドバイザー
小笠原 均郎	財団法人埼玉県産業振興公社 産学連携コーディネータ	
井原 孝一	財団法人埼玉県産業振興公社 技術支援部 主査	

1-3 研究成果概要

1-3-1 研究開発概要

- ①乳酸菌群マイクロフローラ解析キットの開発（実施者：コージンバイオ株式会社、アース環境サービス株式会社、埼玉県産業技術総合センター）
＜目的＞乳酸菌群を指標として汚染源及び汚染経路を解析する。
＜内容＞乳酸菌群に含まれる属種を数グループに分別計数できる平面培地を組み合わせた乳酸菌群マイクロフローラ解析キットを開発する。

- ②耐熱性菌群マイクロフローラ解析キットの開発（実施者：コージンバイオ株式会社、アース環境サービス株式会社、埼玉県産業技術総合センター）
＜目的＞耐熱性菌群を指標として汚染源及び汚染経路を解析する。
＜内容＞耐熱性菌群に含まれる属種を数グループに分別計数できる平面培地を組み合わせた耐熱性菌群マイクロフローラ解析キットを開発する。

- ③汚染源検索データベースの作成（実施：コージンバイオ株式会社、有限会社エスカル、アース環境サービス株式会社、埼玉県産業技術総合センター）
＜目的＞微生物事故発生時の迅速対応や総合的なコンサルティングに利用する。
＜内容＞特定工場内各所のマイクロフローラを登録して汚染源解析を支援するローカルデータベースを開発する。ユーザーによるインターネットアクセスが可能な基本データベースについては自社開発にて推進する。

- ④自動測定用マイクロフローラ解析液体培地キットの開発（実施：コージンバイオ株式会社、有限会社エスカル、埼玉県産業技術総合センター）
＜目的＞大規模な発酵食品製造業等で必要な自動分析、多検体分析に対応する。
＜内容＞自動化と装置化により多検体分析が可能なマイクロフローラ解析技術とこれに用いる液体培地キットを開発する。

- ⑤マイクロフローラ解析 DNA プローブの開発（実施：コージンバイオ株式会社、埼玉県産業技術総合センター）
＜目的＞食中毒などの緊急対応や大規模工場における多検体処理への対応、少量試料しか得られないときの対応のため、少量試料で迅速多検体分析を可能とする。
＜内容＞大腸菌群マイクロフローラ解析における各グループの特徴的な DNA を検出して定量する DNA プローブキットを開発する。

1-4 当該プロジェクトの連絡窓口

本プロジェクトの連絡窓口

(管理法人)

財団法人埼玉県産業振興公社 産学支援・新産業育成グループ

主任調査役 井原孝一

〒330-8669 埼玉県さいたま市大宮区桜木町1丁目7番地5

TEL 048-857-3901

FAX 048-857-3921

Eメール ihara@saitama-j.or.jp

(統括研究代表者)

コージンバイオ株式会社 微生物研究部 部長 井上耕博

〒350-0214 埼玉県坂戸市千代田5-1-3

TEL 049-284-3781

FAX 049-284-4784

Eメール k.inoue@kohjin-bio.co.jp

第2章 研究内容

2-1 乳酸菌群マイクロフローラ解析キットの開発

2-1-1 はじめに

微生物による発酵生産物を利用する味噌、醤油、漬物、発酵乳製品などの製造では、本来利用しない微生物が混入すると製品の品質に深刻な影響を与えるが、特に乳酸菌など同種の混入菌を区別して検出するのは難しかった。乳酸菌群は人類にとって最も古くからなじみの深い微生物であるが、学術的な分類は明確でなく、グラム陽性、カタラーゼ陰性、内生孢子非形成であって、代謝によりグルコースから50%以上の乳酸を生成する細菌類の総称とされる。さらに形状から桿菌と球菌、生成物から乳酸のみを生成するホモ乳酸菌、酢酸やアルコールも同時に生産するヘテロ乳酸菌などに分類される場合もある。ヨーグルトを作るときに使うラクトバチルス属がよく知られているが、動物の消化器や皮膚などの体表面、また、植物の表面などにも多数付着しているため、食品加工においては、食材などに由来する乳酸菌群の混入を常に危惧しなければならない。乳酸菌群は、16S rRNA 遺伝子の配列に基づいて図2-1に示した分類系統樹のとおり分類される。これらの乳酸菌群を4種に区分して生育させることのできる寒天平板培地セットを開発した。

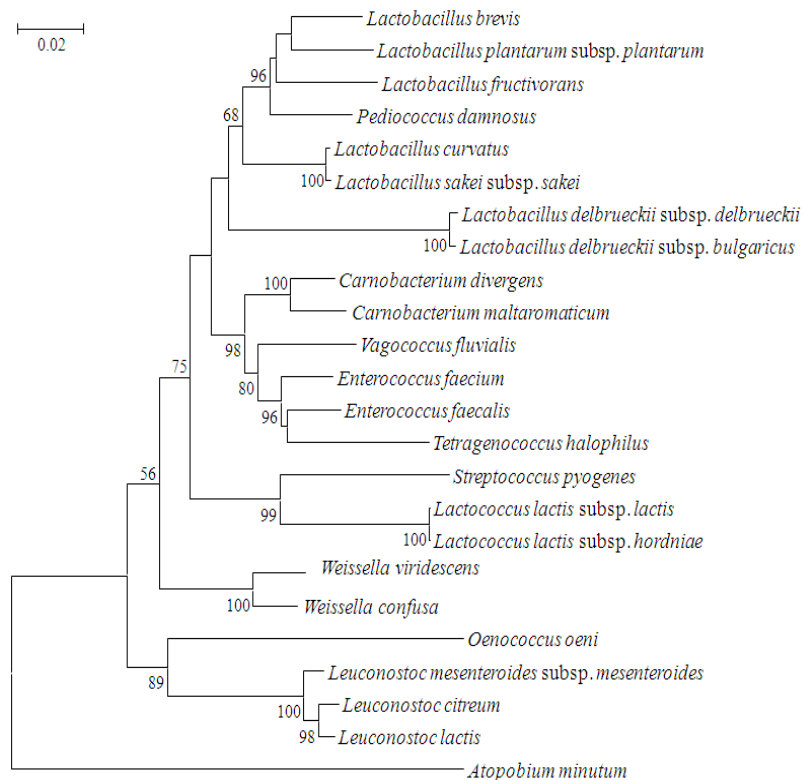


図2-1 16S rRNA 遺伝子に基づく乳酸菌群の分類系統樹

2-1-2 MALキットの開発

図2-2に示した通り、乳酸菌群の生育に必要な栄養成分を含むMRS培地の成分に加え、数種の抗生物質を配合することによって徐々に乳酸菌群の生育を制限した4種の培地セットを開発した。環境中で広く検出される乳酸菌群の標準菌株の各培地における生育状況を表1-2に示した。

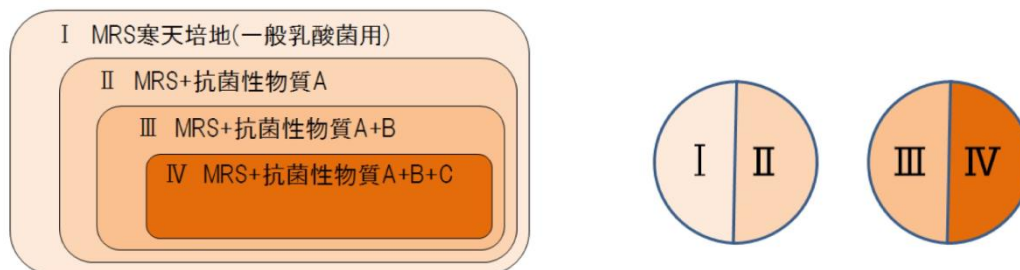


図2-2 MALキットのイメージ

表1-2 MALキットにおける乳酸菌群標準菌株の生育

試験菌株		培地 I	培地 II	培地 III	培地 IV
<i>Enterococcus faecalis</i>	NBRC 100483	+	+	+	+
<i>Lactobacillus plantarum subsp. plantarum</i>	NBRC 15891	+	+	+	+
<i>Enterococcus faecium</i>	NBRC 3535	+	+	+	-
<i>Lactobacillus curvatus</i>	NBRC 15884	+	+	+	-
<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	NBRC 100676	+	+	+	-
<i>Leuconostoc lactis</i>	JCM 11052	+	+	-	-
<i>Weissella hellenica</i>	NBRC 15553	+	+	-	-
<i>Lactococcus lactis subsp. hordniae</i>	NBRC 100931	+	-	-	-

食品工場で採取される試料では乳酸菌群は単独ではなく、他の乳酸菌群、細菌、酵母などと混在すると考えられるため、先ず、複数の乳酸菌群菌株を混合した試料を調製し、MALキットの各培地に摂取し、生育したコロニーの菌種を確認した結果を表1-3に示した。各菌株は本来の培地生育パターンを示し、混在の影響は認められなかった。

表1-3 乳酸菌混在時のMALキット培地生育パターン

接種菌株	(パターン)	各培地における検出の有無				
		MAL-I	MAL-II	MAL-III	MAL-IV	対照
<i>Streptococcus vestibularis</i>	(○○××)	○	○	×	×	○
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	(○○○×)	○	○	○	×	○
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	(○○○×)	○	○	○	×	○
<i>Lactococcus lactis</i>	(○○○○)	○	○	○	○	○
<i>Lactobacillus plantarum</i>	(○○○○)	○	○	○	○	○
コロニー数		84	76	60	32	120

乳酸菌群 5 種に、*Staphylococcus epidermidis* (表皮ブドウ球菌), *Escherichia coli* (大腸菌), *Candida* sp. (酵母) の非乳酸菌 3 種を加えた混合試料を調製し、MALキットの各培地に摂取し、生育したコロニーの菌種を確認した結果を表 1-4 に示した。その結果、各乳酸菌は本来の培地生育パターンを示し、混在の影響は認められなかった。また乳酸菌群以外については生育を抑制できた

表 1-4 非乳酸菌混在時のMALキット培地生育パターン

接種菌株	(パターン)	各培地における検出の有無				
		MAL-I	MAL-II	MAL-III	MAL-IV	対照
<i>Streptococcus vestibularis</i>	(○○××)	○	○	×	×	○
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	(○○○×)	○	○	○	×	○
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	(○○○×)	○	○	○	×	○
<i>Lactococcus lactis</i>	(○○○○)	○	○	○	○	○
<i>Lactobacillus plantarum</i>	(○○○○)	○	○	○	○	○
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	(××××)	×	×	×	×	○
<i>Escherichia coli</i>	(××××)	×	×	×	×	○
<i>Candida</i> sp.	(××××)	×	×	×	×	○
コロニー数		70	67	57	31	191

菌濃度の低い試料を取り扱う場合も多いと考えられたため、マイクロフローラ分析に対する増菌培養の影響を調べた。その結果、所定の培養液を用いた試験では、増菌培養時間がマイクロフローラに影響しないことが確認された。これらの結果は増菌培養によって検査性能を向上させることが可能なことを示すと同時に、遠隔地で採取した試料を検査場所に輸送した後に測定しても検査結果に影響しないことを示し、実用的な検査手順を確立することができた。

表 1-5 マイクロフローラに対する増菌培養の影響

培養時間 (30℃)	検出コロニー数 (個)				マイクロフローラ (%)				類似度		
	MAL I	MAL II	MAL III	MAL IV	1	2	3	4	36 時間後	48 時間後	70 時間後
36 時間	232	209	158	61	10	22	42	26	---	---	---
48 時間	84	76	60	32	10	19	33	38	0.96	---	---
70 時間	852	829	647	280	3	21	43	33	0.99	0.97	---

2-1-3 MALキットの実用化

本サービスを開始するにあたり、データの信頼性を確保するため、検査手順をマニュアル化し（図2-3）、アース環境サービス(株)社内でサンプリング実施者、検査実施者に対する教育訓練を実施した。


文書分類コード	MALキット検体採取(拭き取り)マニュアル	ページ識別	1 / 1
		発効年月日	2012年4月1日
当該部署名 全支店	目的：技術営業・SA等が現場での拭き取り手順を十分に理解し、正確かつ迅速に行うことにより、データの信頼性を確保する。	失効年月日	
I. 適用範囲	全支店の拭き取り検査に携わる技術営業	文書分類コード	MALキット検査マニュアル
II. 責任者	全支店長および総合分析センター長	ページ識別	1 / 1
III. 記述内容		発効年月日	2012年4月1日
		失効年月日	
		作成者氏名	矢野 圭介
		承認者氏名	猪野 毅
I. 準備するもの	 <p>①滅菌ガーゼ ②滅菌ピンセット ③増菌用液体培地(50mL速沈管) ④滅菌生理食塩水 ⑤情報収集シート</p> <p>《注意》検査計画を担当学術と相談の上、予め総合分析センターに提出すること。その計画に基づき総合分析センターに器材等を準備する。</p>	I. 適用範囲	総合分析センターの全検査員(補助も含む)
1. 拭き取り検査手順		II. 責任者	総合分析センター長
		III. 記述内容	
			参照文書
		1. 準備するもの(○はラボに事前に浮付しておくもの)	増菌用培地(フルセラプロ7)の調製法
		①増菌培養用液体培地(50mL速沈管)、滅菌ガーゼ、滅菌ピンセット	
		②増菌培養用液体培地(製品検査用)	
		③MALキット	
		④コンマーン機	
		⑤マイクロピペット及びチップ(50μL用、100μL用)	
		⑥10倍段階希釈用の滅菌希釈水(9mL)	
		⑦嫌気培養用ジャー(角形ジャー7L 三菱がま化学 A-112)	
		⑧アノロバックケムキ(三菱がま化学 A-C3)	
		⑨ドライ嫌気インジケーター(BEL 27-051)	
		2. 検査手順	
		(1) デボからの検査依頼に合わせ、増菌用液体培地(50mL速沈管)、滅菌ガーゼ、滅菌ピンセットを調製し、デボに送付しておく。	
		(2) デボから送られてくる情報収集シート又は類似度分析シートの	

図2-3 検体拭き取りマニュアルと検査マニュアル

実際の工場において、製造工程各所、原材料、製品等の乳酸菌群マイクロフローラを調べ、解析した結果を図2-4に示した。相関分析、クラスター分析により製品中の乳酸菌群の経路由来を推測でき、これに応じて適切な衛生管理を実施でき、その効果が確認された。

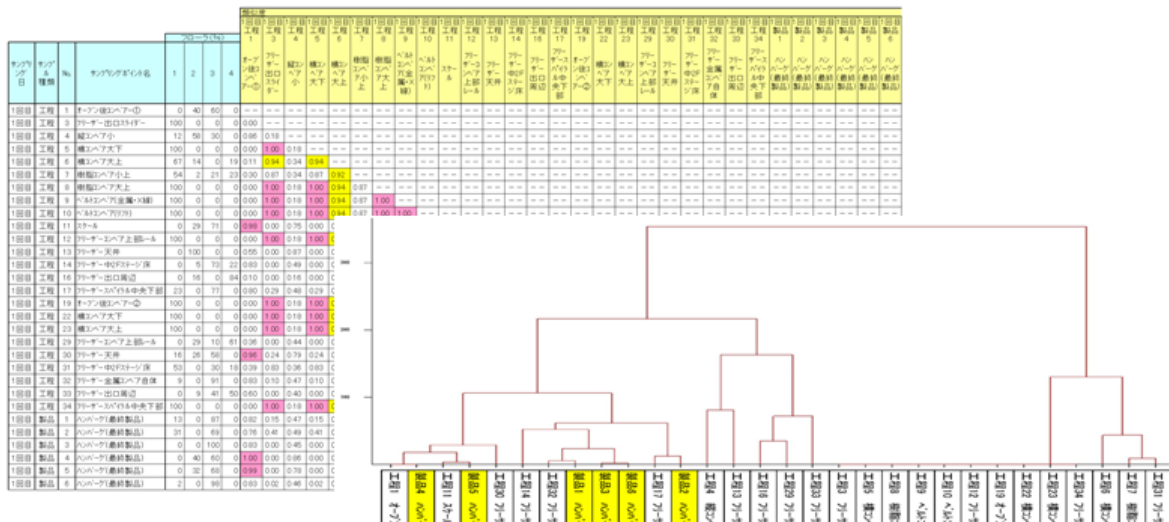


図2-4 食品工場における Rapicom システムの解析結果

2-2 耐熱性菌群マイクロフロー解析キットの開発

2-2-1 はじめに

耐熱性菌群（ここでは便宜上、芽胞形成能を有するバチルス属及びその関連属細菌をいう）はあらゆる環境に存在する微生物であり、食品への混入被害が最も多発する微生物のひとつである。バチルス属を中心とする芽胞形成菌は 100℃の殺菌加熱でも完全には殺菌できず、特に加熱包装食品において問題となる。我々はこれらの耐熱性菌群に対しても、数グループに分別定量するマイクロフロー解析キットを開発し、耐熱性菌群を指標とした衛生管理システムを構築する。

2-2-2 試験方法

バチルス属菌種は高温性および中温性と発育温度域が広いので、環境中に多く存在する 9 菌種を用いて、表 1 の基礎培地に接種し 37℃と 42℃で培養試験を行った。いずれの温度でもコロニーは発現したが、*B.coagulans*, *B.licheniformis*, *B.megaterium*, *B.amyloliquefaciens*, *B.brevis* などは、37℃の培養ではコロニーが小さく検出しにくかったため、培養温度は 42℃に設定した。

バチルス属菌種のコロニー形成に明瞭な差がでるように、基礎培地に適量の生育抑制剤を加えた 4 種の培地を作成した。これらの培地における 9 種のバチルス属標準菌株の生育を調べた結果を表 2-2 に示した。試験菌株を基礎培地で 42℃、24 時間培養し、マックファーランド 0.5 に調整した菌液を 10 倍希釈して接種菌液とした。これを 0.02 ml ずつ B1~B4 の培地に接種し 42℃、24 時間培養して発育の認められたものを+と判定した。これらの培地の組み合わせを MAB キットとした。

表 2-1 基礎培地の配合

基礎培地	g / L
ペプトン	8
酵母エキス	5
食塩	5
フェノールレッド	0.025
寒天	15

表 2-2 MAB キットにおける標準菌株の生育

試験菌	培地			
	B 1	B 2	B 3	B 4
Group 1 <i>Bacillus licheniformis</i> NBRC 12200	+	+	+	+
<i>Bacillus pumilus</i> NBRC 12092	+	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i> NBRC 13494	+	+	+	+
Group 2 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> NBRC 15535	+	+	+	-
Group 3 <i>Bacillus megaterium</i> NBRC 15308	+	+	-	-
Group 4 <i>Bacillus coagulans</i> NBRC 12583	+	-	-	-
<i>Brevibacillus brevis</i> NBRC 15304	+	-	-	-
<i>Paenibacillus polymyxa</i> NBRC 15309	+	-	-	-

2-2-3 MABキットの性能評価

耐熱性菌群24菌株と、他2菌株を用いてMABキットの性能確認を行った結果を表2-3に示した。耐熱性菌群は4種に区分されたが、培地Ⅱ及び培地Ⅲにて区分される菌種がやや少なかった。しかし、*Bacillus megaterium*、などは環境中で多く検出される菌種であり、マイクロフローラ分析で4分類する際には問題とならない。

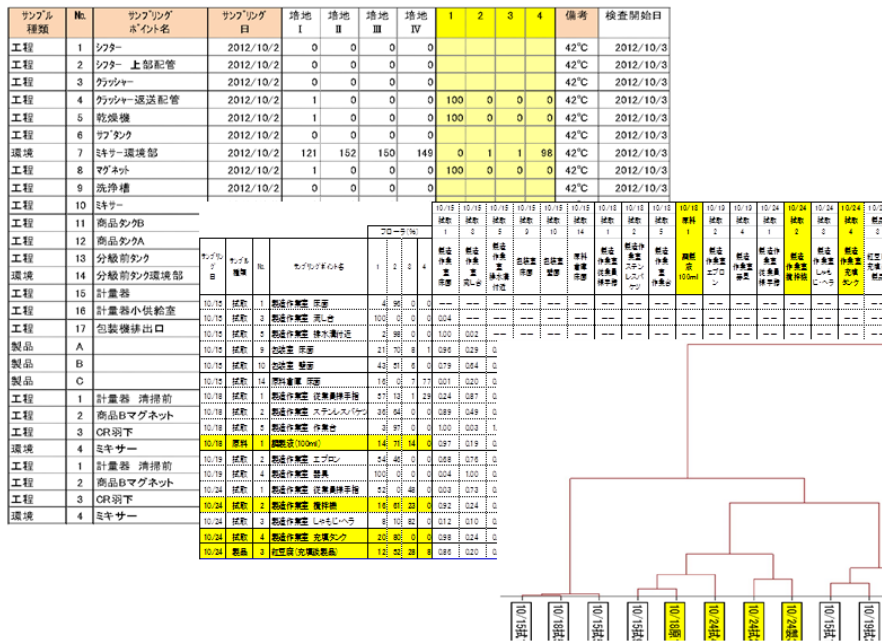
表2-3 MABキットの耐熱性菌群区分検出性能（菌株単独接種の場合）

試験菌	培地Ⅰ	培地Ⅱ	培地Ⅲ	培地Ⅳ
<i>Bacillus atrophaeus</i>	○	○	○	○
<i>Bacillus cereus/thuringiensis</i>	○	○	○	○
<i>Bacillus licheniformis</i>	○	○	○	○
<i>Bacillus licheniformis</i>	○	○	○	○
<i>Bacillus pumilus</i>	○	○	○	○
<i>Bacillus pumilus</i>	○	○	○	○
<i>Bacillus subtilis</i>	○	○	○	○
<i>Bacillus subtilis</i>	○	○	○	○
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	○	○	○	×
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	○	○	○	×
<i>Bacillus megaterium</i>	○	○	×	×
<i>Bacillus megaterium</i>	○	○	△	×
<i>Bacillus alvei</i>	○	×	×	×
<i>Bacillus cereus/thuringiensis</i>	○	×	×	×
<i>Bacillus cereus</i>	○	△	△	×
<i>Bacillus thuringiensis</i>	○	△	×	×
<i>Bacillus coagulans</i>	○	×	×	×
<i>Bacillus coagulans</i>	○	×	×	×
<i>Bacillus mycoides</i>	○	×	×	×
<i>Brevibacillus brevis</i>	○	×	×	×
<i>Brevibacillus brevis</i>	○	×	×	×
<i>Brevibacillus brevis</i>	○	×	×	×
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	○	×	×	×
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	○	×	×	×
<i>Escherichia coli</i> （大腸菌）	○	○	○	○
<i>Staphylococcus aureus</i> （黄色ブドウ球菌）	○	○	△	△

検査手順をマニュアル化し（図2-7）、サンプリング実施者、検査実施者に対する教育訓練を実施した。

文書分類コード	MABキット検体採取(抜き取り)マニュアル	ページ数	1/1	文書分類コード	MABキット検査マニュアル	ページ数	1/1
作成者	矢野 圭介	作成日	2012年09月27日	作成者	矢野 圭介	作成日	2012年09月26日
承認者	矢野 圭介	承認日	2012年09月27日	承認者	矢野 圭介	承認日	2012年09月26日
目的	目的: 検査結果・SMA等の現場での抜き取り手順を十分に理解し、正確かつ安全に行うことにより、データの信頼性を確保する。	対象	検査実施者	目的	目的: 検査者が検査の手順を十分に理解し、正確かつ安全に行うことにより、データの信頼性を確保する。	対象	検査実施者
適用範囲	全工場の抜き取り検査に適用する。SMA等も同様。	適用範囲	全工場の抜き取り検査に適用する。SMA等も同様。	適用範囲	全工場の抜き取り検査に適用する。SMA等も同様。	適用範囲	全工場の抜き取り検査に適用する。SMA等も同様。
責任者	全工場の抜き取り検査に適用する。	責任者	全工場の抜き取り検査に適用する。	責任者	全工場の抜き取り検査に適用する。	責任者	全工場の抜き取り検査に適用する。
1. 記述内容	<p>1. 準備するもの</p> <ul style="list-style-type: none"> ① 滅菌ガーゼ ② 滅菌ビンセット ③ 滅菌コップ ④ 滅菌容器 ⑤ 滅菌用シール <p>①～⑤はすべて滅菌状態で準備する。</p> <p>⑥ 抜き取り検査手順</p> <ol style="list-style-type: none"> (1) 抜き取り検査の目的、対象の抜き取り箇所を決定しておく。 (2) 抜き取り箇所を確認し、滅菌ガーゼを十分に拭き取り、滅菌用シールで密封する。 (3) 抜き取り箇所を確認し、抜き取り器具を準備しておく。 (4) 抜き取り器具を確認し、抜き取り器具の先端部分を滅菌しておく。 (5) 抜き取り器具の先端部分を抜き取り箇所に入れ、抜き取りを行う。 (6) 抜き取り器具を確認し、抜き取り器具の先端部分を滅菌しておく。 <p>(以下省略)</p>	<p>1. 準備するもの</p> <ul style="list-style-type: none"> ① 滅菌ガーゼ ② 滅菌ビンセット ③ 滅菌コップ ④ 滅菌容器 ⑤ 滅菌用シール <p>①～⑤はすべて滅菌状態で準備する。</p> <p>⑥ 抜き取り検査手順</p> <ol style="list-style-type: none"> (1) 抜き取り検査の目的、対象の抜き取り箇所を決定しておく。 (2) 抜き取り箇所を確認し、滅菌ガーゼを十分に拭き取り、滅菌用シールで密封する。 (3) 抜き取り箇所を確認し、抜き取り器具を準備しておく。 (4) 抜き取り器具を確認し、抜き取り器具の先端部分を滅菌しておく。 (5) 抜き取り器具の先端部分を抜き取り箇所に入れ、抜き取りを行う。 (6) 抜き取り器具を確認し、抜き取り器具の先端部分を滅菌しておく。 <p>(以下省略)</p>					

図2-7 MABキット検査マニュアル



2-8 耐熱性菌群マイクロフローを用いた解析結果

2-3 汚染源検索データベースの構築

2-3-1 はじめに

本研究課題では、食品工場における日常的な品質管理により食品への微生物混入が検出された際、先ず迅速で確実な対応をとるために必要な汚染源データベースの構築を目指した。日常的に工場内各所のマイクロフローラが調査され、微生物汚染事故に対し、いつでも汚染源や汚染経路を探索できる体制となっていたとしても、事故は予想外の原因による場合もある。このようなとき、様々な製造環境中のマイクロフローラに関するデータベースが重要な役割を果たす。自社内データだけでなく、他社や他業種の情報も広く含むデータベースとすることで、緊急時の対応を確実なものとし、損害を最小限に食い止めるのに役立つため、その利用価値は非常に高い。

当初、本事業では、ユーザー毎の検索可能データを限定し、ローカル化した「ローカルデータベース」と、それを集積し、自社DBと連携させてwebを介した検索を可能とする「基本データベース」の開発を計画していた。しかし、本事業においては自社DBとの連携が不可能であったことから、ローカルデータベースのみを本事業内で製作するよう、計画を変更した。

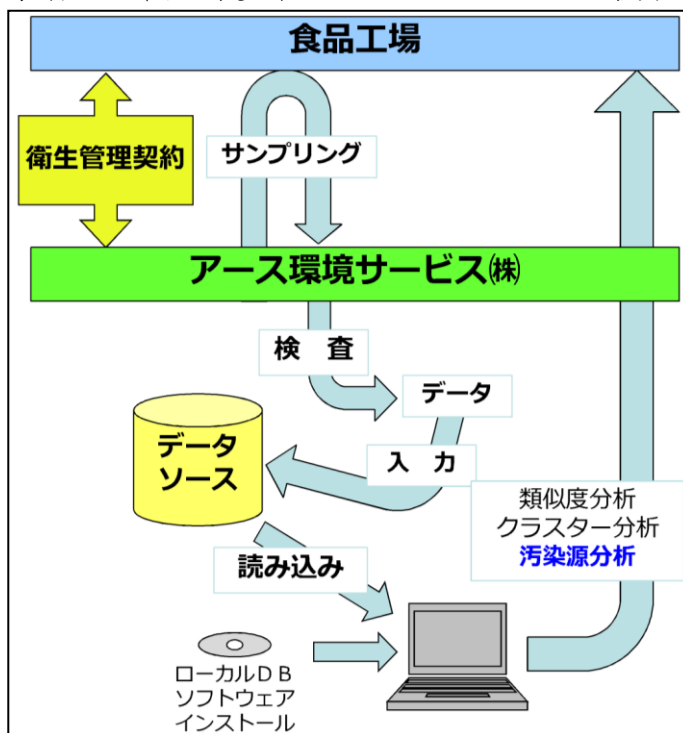


図3-1 ローカルデータベースの運用

2-3-2 ローカルデータベースソフトウェア

以下のコンセプトでローカルデータベースソフトウェアを開発した。

A. 前提条件

- ・ソフトウェアはスタンドアロンで稼働し、他ソフトウェアに依存しない。
- ・データソース及び出力データは他のソフトウェアで開ける形式のファイルとする。

B. 機能

汚染源検索

データソースの中から、検索範囲とするデータを条件（業種、製造品目、サンプル採取日）で絞り込み、特定の1つのデータと類似しているデータを検索する。

クラスター分析、類似度分析

データソースの中から、分析範囲とするデータを条件（業種、製造品目、サンプル採取日）で絞り込み、絞り込んだデータを対象にクラスター分析、類似度分析を行うことができる。

- ・汚染源検索アルゴリズム：類似度分析の数値で実施。

・クラスター分析のアルゴリズム：平方ユークリッド距離、ワード法。

C. ソフトウェアの操作手順

- ソフトウェア起動 → データ読込 → 検索・分析対象データの絞込
- 処理の選択 (汚染源検索、クラスター分析、類似度分析)
- 汚染源探索データ設定 → 検索・分析結果表示 → 結果ファイル出力
- ソフトウェア終了 (データ破棄)

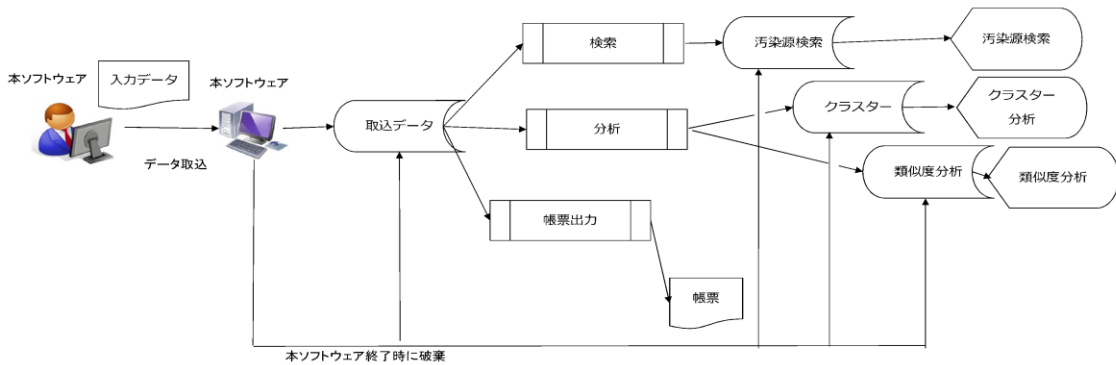


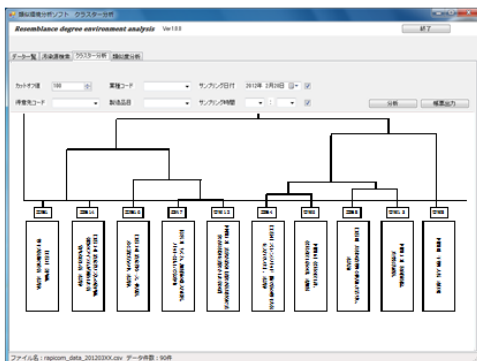
図 3-2 ソフトウェア処理概要

開発したソフトウェアのインターフェイスを図 3-3 に示した。各画面で実行される処理により、製造工程における微生物汚染源及び汚染経路の推定を補助できる。

データ一覧

汚染源検索

クラスター分析



類似度分析

図 3-3 汚染源検索データベースの操作画面

2-4 自動測定用マイクロフロー解析液体培地キットの開発

～液体培地開発・ガス圧法による菌数計測・電気化学計測試験～

2-4-1 はじめに

食品工場で生じた微生物汚染を迅速、確実に解決するためにはマイクロフロー分析の自動化および装置化が必要となる。マイクロフロー解析における各グループの微生物数を自動計測できれば、マイクロフロー解析の処理時間短縮と手間の軽減が可能となる。微生物の自動計測には液体培地が適しており、グループ別できる液体培地とその菌数を自動計測するシステムがあれば、マイクロフローの自動測定が可能になる。本課題では、マイクロフロー解析液体培地キットの開発とヘッドスペースガス圧測定と電気化学計測を応用した液体菌数計測技術の開発を目的とした。

2-4-2 液体培地とヘッドスペースガス圧法による菌数計測

バーサトレック 5 2 8 (Thermo Fisher) は、血液、髄液等の培養に使用する医療用機器であり、検体を接種した専用の培地ボトルを装置にセットし、微生物のガス発生、酸素消費などによるヘッドスペースガス圧変化を自動モニタリングして細菌等の存在を検知するシステムである。大腸菌群用マイクロフロー分析キット「MAC キット」の培地組成から其々寒天を除いた配合を基本に調製した液体培地を充填した 4 種一組のガス圧試験用ボトルに、MAC キットにより区分される 4 グループ計 16 種の大腸菌群菌株を摂取し、バーサトレック 5 2 8 にセットして 37°C で培養試験を行った結果を表 4-1 に示した。4 種の液体培地における生育状況は、MAC キット寒天平板培地上の生育とはやや異なり、液体培地の方が生育しにくい傾向がみられた。16 菌株中 12 菌株が I に分類され、II、III、IV がそれぞれ 0, 2, 2 菌株とやや偏った結果となった。マイクロフロー分析では菌株が 4 培地に平均して分類されるのが望ましく、栄養成分の工夫により今後も改善する可能性がある。

表4-1 液体培地キットにおける大腸菌群の生育

グループ1					グループ2						
	培地	検出時間	検出時間	検出時間		培地	検出時間	検出時間	検出時間		
		10 ⁶	10 ³	10			10 ⁶	10 ³	10		
<i>E. amnigenus</i> 105700	I 培地	10.6h	NG	25.9h	○	<i>C. freundii</i> 12681	I 培地	7.9h	11.0h	14.2h	△ → I
	II 培地	NG	NG	NG			II 培地	34.5h	60.4h	66.8h	
	III 培地	NG	NG	NG			III 培地	NG	115.8h	NG	
	IV 培地	NG	NG	NG			IV 培地	NG	NG	NG	
<i>E. fargusonii</i> 102419	I 培地	6.3h	8.7h	10.8h	△ → IV	<i>C. freundii</i> 16624	I 培地	6.6h	9.3h	12.1h	△ → I
	II 培地	13.5h	19.0h	25.2h			II 培地	69.8h	60.3h	87.3h	
	III 培地	13.5h	20.2h	25.4h			III 培地	NG	NG	NG	
	IV 培地	14.7h	19.2h	25.4h			IV 培地	NG	NG	NG	
<i>E. vulneris</i> 102420	I 培地	8.0h	12.2h	14.8h	○	<i>C. freundii</i> 13539	I 培地	6.5h	8.9h	11.6h	△ → I
	II 培地	NG	NG	NG			II 培地	30.7h	43.3h	60.6h	
	III 培地	NG	NG	NG			III 培地	NG	NG	NG	
	IV 培地	NG	NG	NG			IV 培地	NG	NG	NG	
<i>H. alvei</i> 105685	I 培地	11.4h	15.3h	21.3h	○	<i>C. freundii</i> 13546	I 培地	6.8h	9.6h	12.6h	△ → I
	II 培地	NG	NG	NG			II 培地	25.8h	42.6h	51.8h	
	III 培地	NG	NG	NG			III 培地	NG	NG	NG	
	IV 培地	NG	NG	NG			IV 培地	NG	NG	NG	
グループ3					グループ4						
	培地	検出時間	検出時間	検出時間		培地	検出時間	検出時間	検出時間		
		10 ⁶	10 ³	10			10 ⁶	10 ³	10		
<i>K. aerobata</i> 102466	I 培地	7.4h	10.4h	13.6h	△ → I	<i>C. sakazakii</i> 102416	I 培地	6.8h	9.8h	13.0h	△ → I
	II 培地	NG	NG	NG			II 培地	39.4h	58.0h	77.4h	
	III 培地	49.0h	NG	NG			III 培地	53.2h	51.0h	NG	
	IV 培地	49.0h	63.8h	104.4h			IV 培地	NG	NG	66.8h	
<i>L. adcarboxylata</i> 102595	I 培地	8.0h	11.3h	15.3h	○	<i>E. aerogenes</i> 13534	I 培地	6.2h	9.0h	11.5h	○
	II 培地	15.8h	22.7h	30.1h			II 培地	11.0h	17.1h	20.7h	
	III 培地	17.6h	24.3h	30.1h			III 培地	12.0h	16.5h	21.1h	
	IV 培地	21.9h	34.1h	44.1h			IV 培地	13.2h	19.3h	25.5h	
<i>R. ornithinolytica</i> 105727	I 培地	7.7h	10.9h	14.0h	○	<i>E. cloacae</i> 13535	I 培地	7.1h	9.7h	13.1h	△ → I
	II 培地	16.5h	22.5h	30.4h			II 培地	48.0h	61.7h	95.1h	
	III 培地	14.9h	20.3h	28.8h			III 培地	52.7h	48.0h	53.5h	
	IV 培地	22.5h	31.3h	45.8h			IV 培地	NG	66.7h	95.0h	
<i>Reaultella terrigena</i> 14941	I 培地	8.8h	12.2h	16.6h	△ → I	<i>E. coli</i> 102203	I 培地	6.4h	9.0h	11.4h	△ → I
	II 培地	89.0h	105.4h	NG			II 培地	21.4h	29.8h	37.6h	
	III 培地	33.4h	67.2h	98.0h			III 培地	NG	NG	NG	
	IV 培地	34.0h	42.4h	55.4h			IV 培地	NG	NG	52.4h	

2-4-3 電気化学計測方法及び装置

自動測定用マイクロフロー解析液体培地キットの開発の一環として、電気化学センサを用いて液体培地中の大腸菌群を定量する技術を検討した。

微生物自体を、直接電気化学的に計測するのは困難であるが、大腸菌群が特異的に代謝する物質である Xgal や IPTG の増減に基づいて間接的に計測するのは原理的に可能である。そこで、これらの微量成分を計測するため、電気化学計測の中

でも高感度で定量性の高い DPV (微分パルスボルタンメトリー) 計測を基本とした計測技術を検討した。

計測器には BDTminiSTAT100 (バイオデバイステクノロジー) 及び同 400 (同) を使用した (図 4-2)。本計測器はパーソナルコンピュータとシリアル接続して用いる。本計測器に接続した電極センサを試料液と接触させて計測を実施し、測定データはパーソナルコンピュータに出力され、ハードディスクに CSV ファイルとして保存される。パーソナルコンピュータに蓄積したファイルを解析するソフトは開発用言語 Ruby を用いて開発した。図 4-3 に示した解析ソフトは、データの平滑化、ベースライン補正、自動ピーク検出、ピーク面積計算、解析結果表示が可能である。

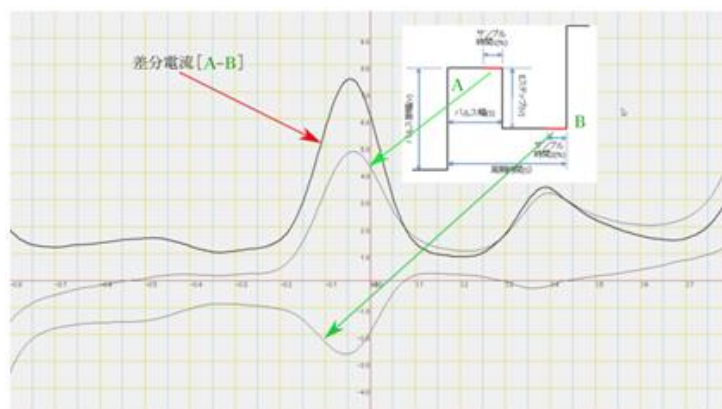


図 4-1 微分パルスボルタンメトリー計測の例



図 4-2 電気化学計測器

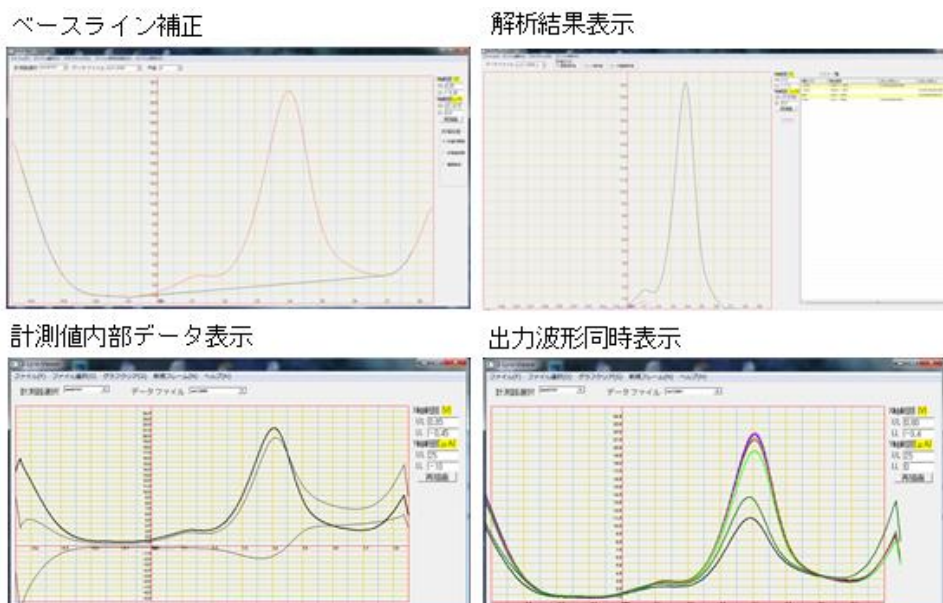


図 4-3 電気化学計測結果解析プログラムの機能

電極センサは、図 4-4 に示した通り、高感度化、安定化、長寿命化を目指して順次改良した。

第一世代：市販品カーボン電極と同一形状である。全長が短く、コネクタ部に処理液が漏れ短絡を起こす場合があった。

第二世代：参照極の挙動を調べるため 4 極型とし、電流集中状態の調べるため矩形電極とした。電流集中による消耗が顕著であった。対極面積がやや狭小であった。

第三世代：第二世代の不足点を改良し、作用極は電流を考慮し丸型とし対極面積を大きくした。第四極面積も大きくし、対極として使用した

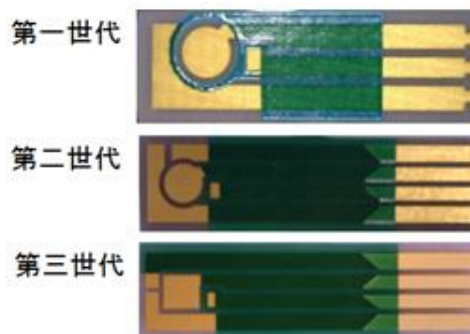


図 4 - 4 電極構造の進化

2-4-4 電気化学計測の手順

電気化学計測は図 4-5 に示した手順で行った。まず、電極表面を活性化させるための電極初期処理に続き、測定安定化のための酸性電解処理、アルカリ電解処理等の前処理行なった後、検体の測定を行う。検体は、予め塩化鉄(II)溶液を加え、加熱処理する。この方法で計測することで安定して微量成分の高感度計測が可能になる。

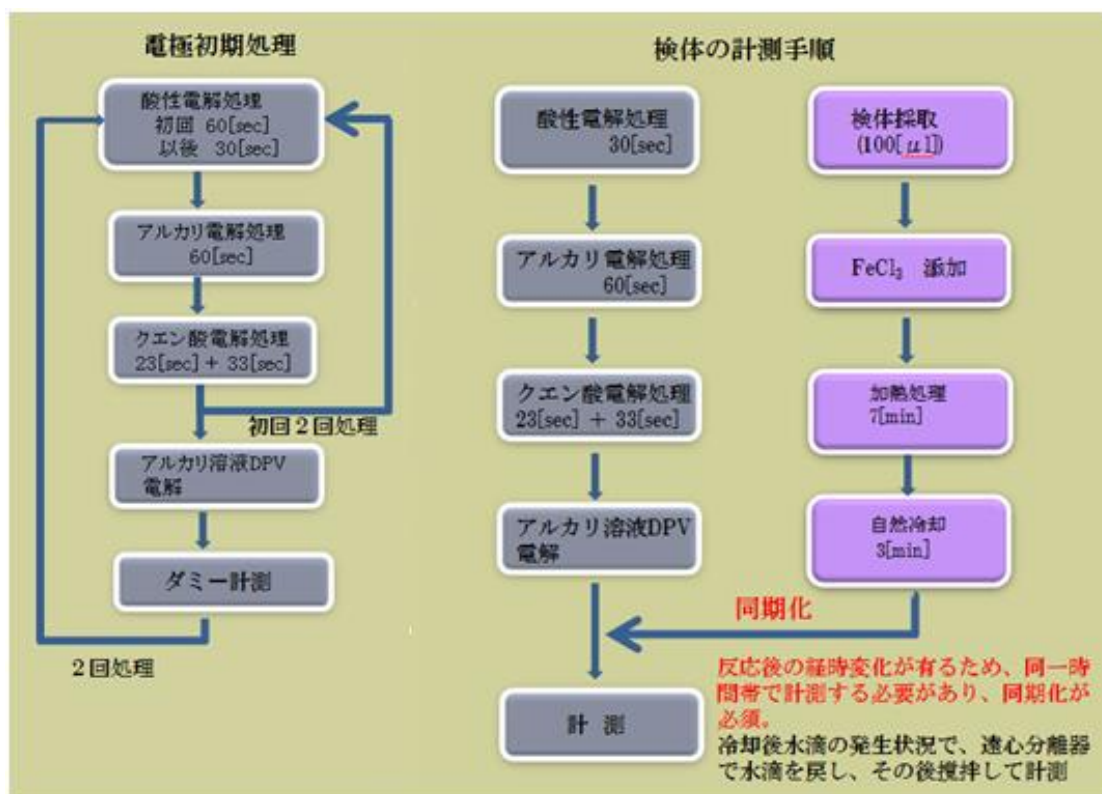


図 4 - 5 電気化学計測の手順

2-4-5 大腸菌群の電気化学計測

水中に存在する Xgal の電気化学計測を行った結果を図 4-6 に示した。Xgal と鉄(II) の相互作用とみられるいくつかのピークが観察され、何れも Xgal の定量に利用可能であった。

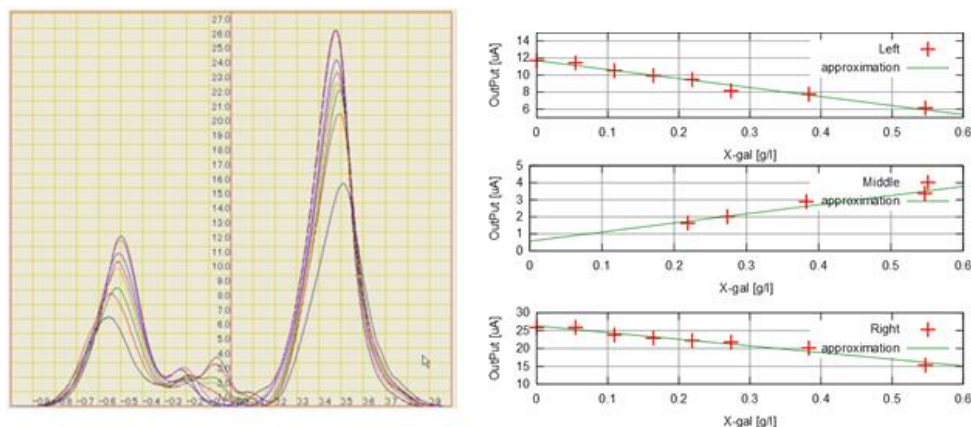


図 4-6 水中 Xgal の電気化学計測

大腸菌群を含む試験液に Xgal を添加し一定時間資化させた後、電気化学計測を行ったときの正電位側ピーク値を図 4-7 に示した。ピーク値と大腸菌群菌数の間には線形関係がみられ、 $10^3 \sim 10^8$ cfu/mL の範囲で定量可能なことが示された。

また、Xgal と同様に大腸菌群に取り込まれる IPTG を用いて同様の試験を行った結果を図 4-8 に示したが、この場合もピーク値と大腸菌群菌数の間に線形関係がみられ、同様の範囲で定量可能なことがわかった。

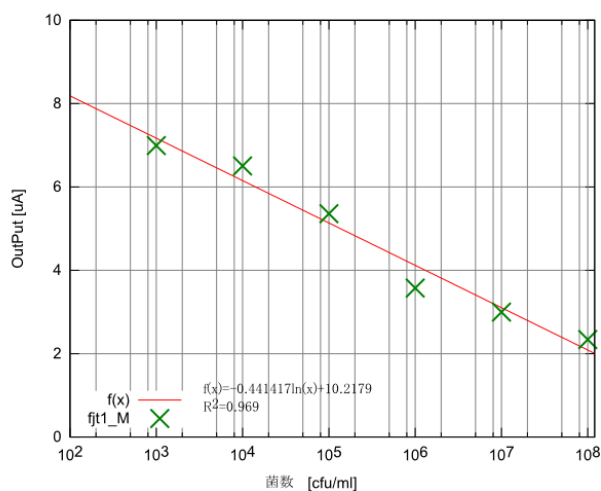


図4-7 Xgal を指標とした菌数計測

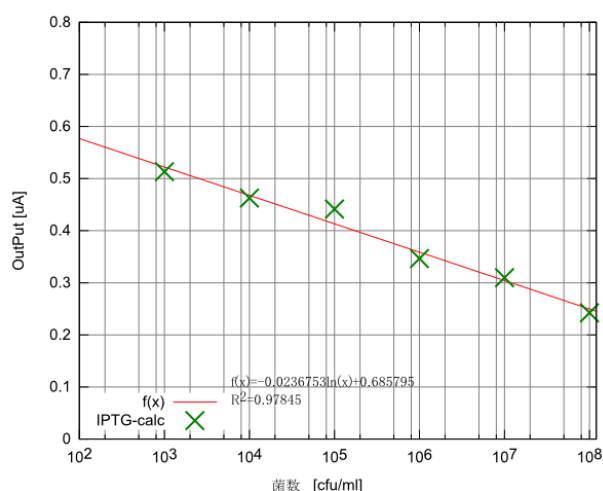


図4-8 IPTG を指標とした菌数計測

2-5 マイクロフローラ解析 DNA プローブの開発

2-5-1 はじめに

これまでに我々が開発した寒天平板培地を用いた大腸菌群マイクロフローラ分析用キットでは、食品や環境から採取したサンプル液を4種の寒天平板培地上に塗布し20~24時間培養した後、各培地に生育したコロニーを数え、大腸菌群を4分割したマイクロフローラを求める。この方法は特殊な設備や専門的な知識を必要とせず、中小規模の食品工場でも導入可能な至便な分析手法である。しかし、分析におよそ一日の時間を要するため、もし、製造工程の何処かで微生物汚染事故が起きれば、その間の被害拡大を赦してしまうことになる。この点は発酵工程のある食品では特に問題となり、これを改善する抜本的な手段が望まれていた。

現在、細菌株間のDNA配列の相違に基づく微生物定量技術が実用化されており、衛生管理の手段としても利用できる比較的安価な設備も開発されている。この技術は対象とする微生物に特異的なプライマー(核酸断片)をPCR法(polymerase chain reaction)により増幅して検出・定量するもので、現在は特定の有害微生物やウイルスの検査に利用される。この検査に要する時間はサンプル調整を含め4~6時間程度であり、培養に必要な平板培地法に比較して格段に短い。本研究ではこのDNAを用いた微生物定量技術を大腸菌群マイクロフローラ分析に応用するためのプライマーの開発を試み、さらに分析手法の迅速化、簡便化についても検討した。

2-5-2 プライマー設計の対象領域

平板培地法における分別は、大腸菌群の菌株間における栄養資化性の相違を利用して、遺伝子配列の違いに基づく分別とは同一にはならないが、平板培地法に比較的近い分別となるように適切なプライマーを設計する必要がある。

細菌属種の決定には、変異が起きにくく保存性の高い16S rRNA遺伝子の配列を用いることが多く、大腸菌群、乳酸菌、バチルス属細菌の塩基配列には明らかな相違があり、大腸菌群を他の細菌と識別するプライマーの設計は可能である。しかし、表5-1に示したように、大腸菌群菌株間における相違はわずかなため、16S rRNA遺伝子配列を用いた大腸菌群の分別は難しいものと判断された。

そこで、大腸菌群に特徴的なLacZ遺伝子領域を用いたプライマーを検討した。大腸菌群は乳糖を分解して酸とガスを産生するグラム陰性、無芽胞桿菌の総称とされ、乳糖はパーミアアーゼにより大腸菌群の細菌内に取込まれた後、β-ガラクトシダーゼによりグルコースとガラクトースに分解されるため、定義上、大腸菌群に属する細菌はこの酵素を有することになる。

この酵素をコードする遺伝子”lacZ”は、16S rRNA遺伝子よりも保存性が低く、変化に富むことが知られ、大腸菌群の菌株間で区別に利用可能と考えられた。

表5-1 大腸菌群別株間における16S rRNA遺伝子配列の相違

	<i>Raoultella planticola</i> との配列相違数(bp)	<i>Raoultella planticola</i> との配列相違割合(%)
<i>Raoultella planticola</i>	-	-
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	5	0.33
<i>Enterobacter aerogenes</i>	10	0.67
<i>Raoultella terrigena</i>	14	0.93
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	19	1.27
<i>Enterobacter amnigenus</i>	20	1.33

16S(1500bp)中

2-5-3 大腸菌群分別用プライマーの開発

大腸菌群の分別に先だって、先ず、大腸菌群を他の微生物群と区別するプライマーが必要である。ゲノムプロジェクトの進展により、現在、多数の大腸菌群ゲノムが報告されている。これらのうち、一般環境中に存在する5株(*Citrobacter koseri*, *Escherichia coli*, *Cronobacter sakazakii*, *Klebsiella pneumonia*, *Enterobacter cloacae*)の*lacZ*遺伝子配列を図5-1に示した。大腸菌群株間で配列はバラエティーに富むが、局所的には同一配列がみられることから(図5-1中の*印)、これらの領域に数種のプライマーセットを設計した。各株に共通する1F-1Rでは、51株中48株の大腸菌群(94%)でPCR増幅が確認され、これまでに報告された大腸菌群の*lacZ*遺伝子増幅用プライマー(LZ91)の51株中14株に比較して確実に大腸菌群を検出できた。また、この領域周辺に区分用として用いるプライマーセット2種(Cit, KE)を設計した。Citは*Citrobacter*属に特異的な配列から設計し、KEは*Klebsiella*属及び*Enterobacter*属の両方に特異的な配列を利用した。

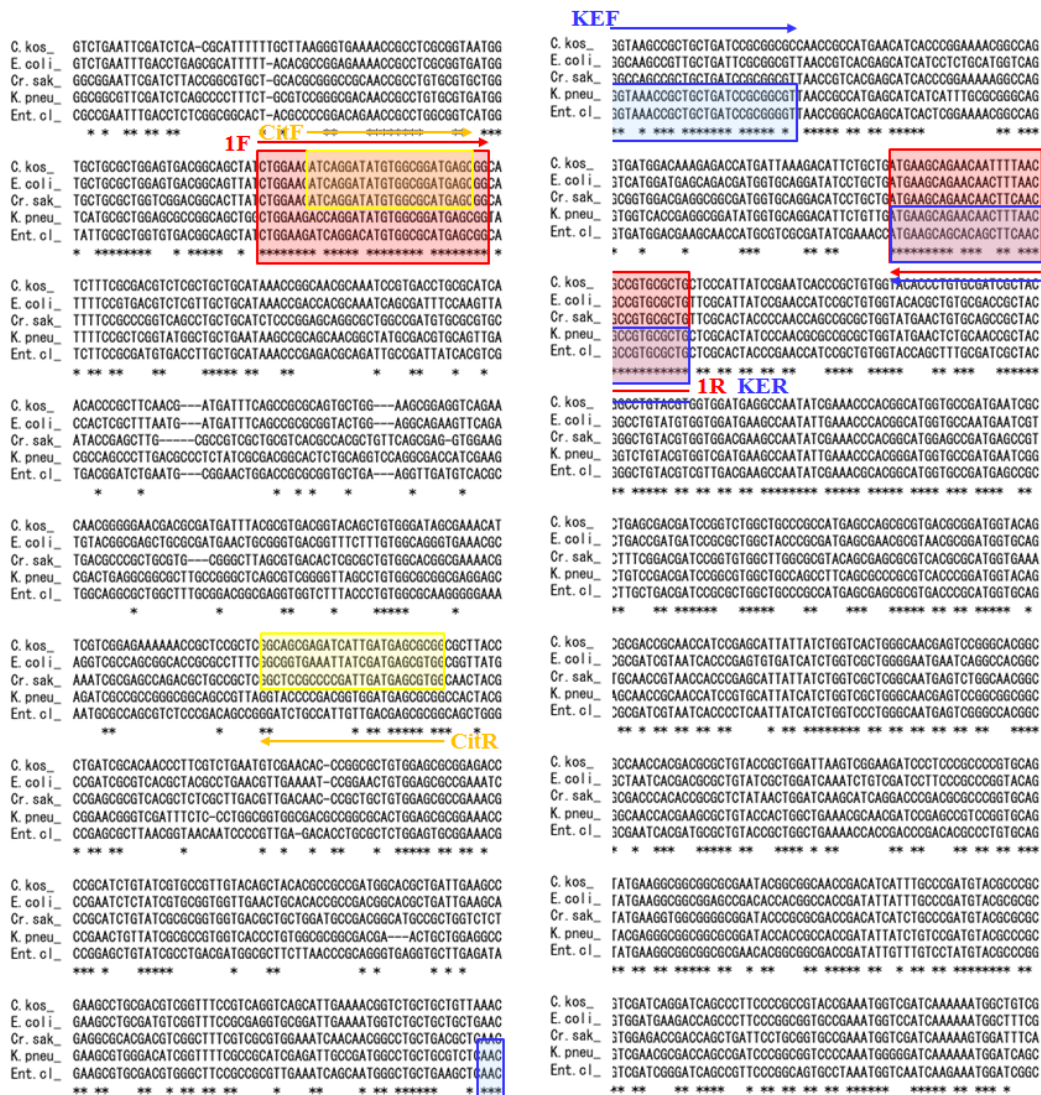


図5-1 *lacZ*遺伝子配列内のプライマーセット設計

各種大腸菌群菌株に対し、設計したプライマーセットの PCR 反応の有無を調べた結果を表 5-2 に示した。1F-1R により、選別された大腸菌群と Cit と KE によりさらに狭い区分に選別されたグループにより 3 グループに分別することが可能であった。

大腸菌群以外にも乳糖を資化する細菌は存在することから、乳糖を資化し得る乳酸菌及びバチルスについてプライマーセット 1F-1R を用いた PCR 反応を調べた結果を表 5-3 に示した。いずれも PCR 反応の増幅産物は認められず、1F-1R が大腸菌群に特異的であることが示された。

2-5-4 PCR 法による大腸菌群計測方法

市販キットを用いたゲノム抽出法では、先ず酵素や界面活性剤を用いて菌体を溶菌し、さらにタンパク質を変性させて遠心分離により除いた後、エタノール沈殿により DNA を回収して PCR 反応へ供する。ゲノム抽出に 3 時間程度、定量 PCR に 3.5 時間を要するため、全測定時間として 6.5 時間を要する。当初、界面活性剤を用いて DNA 抽出を簡略化させることによりゲノム抽出を 0.2 時間にまで短縮したが、さらに、大腸菌のクローニングに用いられるコロニーダイレクト PCR と呼ばれる技術を応用し、細菌をそのまま PCR 反応液に懸濁し PCR 反応を行ったところ、菌数計測が可能なが分かった。ゲノム抽出操作を完全に省くことができた。さらに、PCR に用いる酵素を検討した結果、 10^4 cfu/mL 以上で計測可能となり、検出感度を 10 倍にすることができた。

表5-2 プライマーセットの大腸菌群に対するPCR結果

大腸菌群供試菌株	機関番号	プライマー		
		1FIR	Cit	KE
<i>Citrobacter freundii</i>	IAM 12471 ^T	○	○	×
<i>Citrobacter freundii</i>	E1	○	○	×
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	JCM 1661 ^T	○	○	×
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	NBRC 13547	○	○	×
<i>Citrobacter braakii</i>	ATCC 43162	○	○	×
<i>Citrobacter koseri</i>	NBRC 105690	○	○	×
<i>Cronobacter sakazakii</i>	JCM 1233 ^T	○	×	○
<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>	IAM 12349 ^T	○	×	○
<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>	E2	○	×	○
<i>Enterobacter amnigenus</i>	JCM 1237 ^T	○	×	○
<i>Escherichia vulneris</i>	JCM 1688 ^T	○	×	○
<i>Escherichia coli</i>	NBRC 3302	○	×	○
<i>Klebsiella oxytoca</i>	E3	○	×	○
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IAM 1063	○	×	○
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	E4	○	×	○
<i>Klebsiella oxytoca</i>	ATCC 8724	○	×	○
<i>Pantoea agglomerans</i>	NBRC102470 ^T	○	×	○
<i>Pantoea agglomerans</i>	E5	○	×	○
<i>Raoultella planticola</i>	JCM 7251 ^T	○	×	○
<i>Raoultella terrigena</i>	JCM 1687 ^T	○	×	○
<i>Hafnia alvei</i>	JCM 1666 ^T	○	×	×
<i>Yersinia bercovieri</i>	NBRC 105717 ^T	○	×	×
<i>Yersinia rohdei</i>	NBRC 105715 ^T	○	×	×

表5-3 プライマーセット1F-1Rによる大腸菌群以外の細菌に対するPCR

	PCR産物の有無
<i>Enterococcus malodoratus</i>	×
<i>Lactobacillus brevis</i>	×
<i>Lactobacillus casei</i>	×
<i>Lactobacillus plantarum</i>	×
<i>Lactobacillus sakei</i>	×
<i>Leuconostoc gasicomitatum</i>	×
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	×
<i>Weissella soli</i>	×
<i>Bacillus licheniformis</i>	×
<i>Bacillus subtilis</i>	×

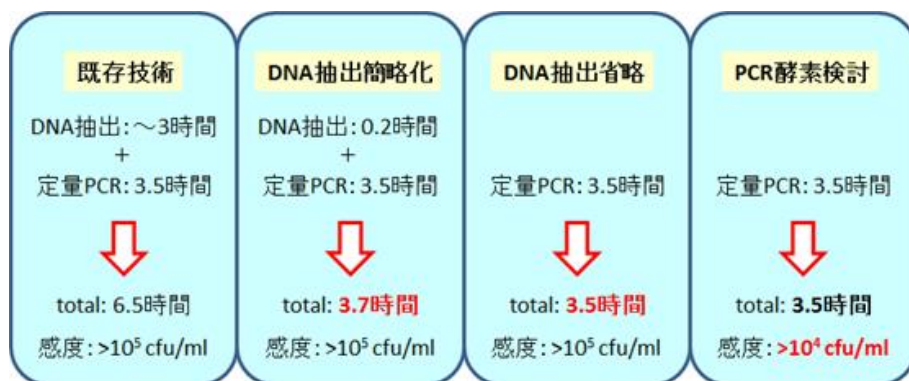


図5-2 ゲノム抽出方法の改良

以上の改良により、 10^4 cfu/ml 以上で計測可能となったが、食品衛生検査指針に記載の方法で固形食品から試料液を調製した場合、固形食品に 10^5 cfu/g 以上の菌数がなければ検出できず、実用的ではない。そこで、さらに感度を向上させるために、メンブランフィルターを用いた試料液の試験前濃縮を試みた。試料液を濾過して各種フィルター上に大腸菌群を捕捉した後、菌体をフィルターから洗い出したときの回収率を PCR 法により調べた結果を表 5-4 に示した。滅菌水にてフィルターから洗い出す旧法では、回収率は最大で 16% しかなかったが、界面活性剤を含む滅菌水で洗い出すことで回収率は 68% に達した。フィルター濃縮が可能になれば、菌濃度の低い試料液であっても自在に濃縮し、菌数計測が可能になり、定量 PCR 法を用いたマイクロフローラ計測が可能となることが示された。

表5-4 フィルターからの菌体回収

	回収率(%)	
	旧法	新法
ポリエステル	0	68
ポリカーボネート(A社)	10	54
ポリカーボネート(B社)	16	37
セルロースアセテート	3	32
混合セルロース	2	14
PTFE	5	4

(*Citrobacter freundii*)

2-5-5 融点を利用した大腸菌群の検証

プライマーセット 1F-1R で増幅される領域は約 510bp である。プライマーは共通する配列に設計しても、プライマー間の領域の配列は非常にバラエティーに富み、PCR 産物の GC 率も異なったものになる。DNA はグアニン(G)、シトシン(C)、アデニン(A)、チミン(T)と4種類の塩基により構成されるが、GC 間の水素結合は3ヶ所であるのに対し、AT 間の水素結合は2ヶ所であるため、DNA 断片中の GC 量が増えるほど、DNA の二重らせん構造は強くなり、融解温度 T_m が上昇する。従って、同じように増幅しても GC 率が異なれば、 T_m から菌株の相違を判断可能である。

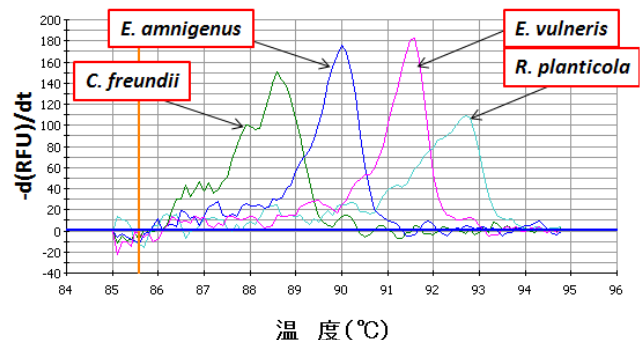


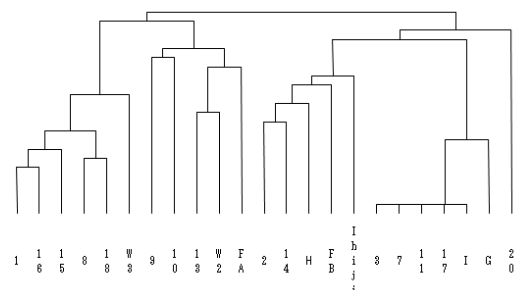
図5-3 大腸菌群株の融解温度 T_m

2-5-6 フィールドテスト

実際の食品工場において上記プライマーセットによりマイクロフローラ分析を試みた結果を図 5-4 に示した。

実際の製品原材料・工場内汚染箇所等の分析結果から汚染源及び汚染経路を推定でき、実用化の可能性が示された。

略称	差引	Cit	KE
1	0	99	1
2	0	13	87
3	0	0	100
7	0	0	100
8	0	98	2
9	96	0	4
10	67	0	33
11	0	0	100
13	67	22	11
14	0	10	90
15	0	100	0
16	0	99	1
17	0	0	100
18	0	98	2
20	0	52	48
W2	71	21	8
W3	0	95	5
FA	47	34	19
FB	0	17	83
G	0	1	99
H	0	6	94
I	0	0	100
Ihiji	0	27	73



英数字は、製品、原材料、工場内汚染箇所等

図5-4 プライマーセットを用いた食品工場の汚染源探索

第3章 全体総括

我々は平成22年～24年の3年間に亘り、戦略的基盤技術高度化事業「発酵食品製造における微生物汚染防止のための品質管理システムの開発」を実施した。その成果として、乳酸菌群マイクロフロー解析キット「MALキット」及び耐熱性菌群マイクロフロー解析キット「MABキット」を製品化し、汚染源探索データベースについても、**Rapicom**（大腸菌群）において運用を開始することができた。大腸菌群を指標とするこれまでの衛生管理システム「**Rapicom**」は加熱食品を中心に展開してきたが、乳酸菌群及び耐熱性菌群を指標とすることにより、味噌、醤油などの発酵食品、非加熱食品などに広く対応することが可能になった。また、データベースを利用した迅速な汚染源及び汚染経路の解析は迅速な解決が求められる食品衛生において、有効な手段となることが期待され、今後、乳酸菌群、耐熱性菌群にも対応させていく予定である。一方、今後求められるマイクロフロー分析技術の自動化、高度化、迅速化に対応するための研究開発においても、一定の成果を得ることができた。大腸菌群マイクロフロー解析液体培地キット、菌濃度の電気化学計測技術は多数の試料を迅速に分析するのに必要な技術であり、今回の成果だけでは実用化には至らなかったが、実用化の目途は付けることができたため、今後も研究を継続し、比較的近い将来には実用化させる所存である。また、マイクロフロー解析 DNA プローブに関しても、実用的なプライマーが得られ、関連技術の急速な進歩により装置やプライマーの低コスト化が進み、この分野での需要に対応可能となった。今回の事業では、参画した各社が自社で保有する専門技術を結集することでこれらの成果につながったと考えられる。

我々は、今後も実施例を増やししながら、さらに技術改良を重ね、より確実に実用性の高い衛生管理システムとして進化を続けるよう努める所存である。

リサイクル適性 (A)

この印刷物は、印刷用の紙へ
リサイクルできます。