

## (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、この技術を用い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°C 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°C 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°C、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°C 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°C、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