

学 位 論 文 題 名

蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法を応用した
環境および食品試料からの腸内細菌の
迅速計数法の開発に関する研究

学位論文内容の要旨

食品や飲用水の衛生指標として、汚染指標細菌および糞便汚染指標細菌の計数がなされる。大腸菌群は最も一般的な汚染指標細菌であるが、乳糖発酵性の無芽胞グラム陰性細菌を意味する公衆衛生上の用語であり、分類学的に十分に定義されたものではない。また、*Salmonella* や *Shigella* のような腸管由来病原菌に代表される乳糖非発酵性の腸内細菌科に属する細菌（腸内細菌）は大腸菌群として検出されず、衛生検査上の問題点として指摘されている。従って、分類学上明確に位置付けられ、かつ乳糖非発酵性腸内細菌を検出できる点で、腸内細菌が大腸菌群よりも汚染指標細菌として有用であることが指摘されており、さらに、これらの衛生指標細菌の迅速な検査法が求められている。

そこで本研究では、食品や環境水試料中の腸内細菌の検査結果が一日の勤務時間内で判定できる測定法の開発を目的に、16S rRNA を標的とする蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション（FISH）技術を応用し、生きている腸内細菌の検出・定量法について検討した。

第一章では、腸内細菌に特異的なプローブを作製した。初めに、GenBank / EMBL / DDBJ データベースより入手した関連細菌の 16S rDNA 塩基配列の多重アライメント結果から、腸内細菌検出用プローブとしてプローブ B とプローブ D を設計した。次に、各腸内細菌検出用プローブを用い、腸内細菌のみを検出するための FISH の温度条件を検討した。その結果、プローブ B は高い特異性を示

す温度条件が見出せず腸内細菌検出用プローブとして適さなかったが、プローブ D では 60℃ の反応温度で高い特異性が認められた。よって腸内細菌検出用プローブとしてプローブ D を採択した。

次に、プローブ D を用いた FISH による腸内細菌の検出精度について検討した。腸内細菌科 77 株、腸内細菌科に属さない細菌 34 株の計 111 の供試菌株に対してプローブ D を用いた FISH を実施し、検出スペクトルを調べた。その結果、腸内細菌の検出率は 97% であり、プローブ D を用いる FISH は腸内細菌をほぼ正確に検出できることが明らかとなった。

第二章では、プローブ D を用いる FISH 技術を用い食品や環境中における生きている腸内細菌の迅速な検出・定量法について検討した。開発目標値として、検出限界は、食品においては 100CFU/g、環境水試料においては 1CFU/ml とし、検出時間は一日での勤務時間内（8 時間）とした。

初めに、濾過によりメンブランフィルター（直径 13 mm、ポアサイズ 0.4 μm ）上に捕捉した食品試料懸濁液中の細菌を培養せずに直接 FISH により検出すること（直接的 FISH）を試みた。しかし、生イカ外套膜を試料に用いたところ、固定化处理した試料懸濁液の最大濾過量は試料 0.0025 g 相当量であり、また、蛍光顕微鏡観察において、FISH シグナルを有する細菌細胞と蛍光ノイズとを充分に区別するために、倍率は 1000 倍とする必要が生じた。この条件で一標本につき 30 の顕微鏡視野を観察した場合、フィルター面積、試料濾過量ならびに顕微鏡視野面積の関係で検出限界は 3.6×10^4 cells/g となり、この値は目標の検出限界より 360 倍低いものであった。従って、直接的 FISH による腸内細菌の検出方法を、実際の食品試料の細菌検査へ応用することは難しいと判断された。

目的とする検出感度を得るためには食品や環境試料の FISH 標本を倍率 100 倍下で蛍光顕微鏡観察する必要が示唆されたため、培養併用 FISH (FISHFC) を検討した。はじめに、FISH 工程の短縮化を試み、エタノール固定処理およびハイブリダイゼーション反応の最小時間を検討し、それぞれ 5 分に短縮することができた。このことにより、FISH 工程を 1 時間以内とすることができた。

次に、供試食品試料（イクラ、生イカ外套膜、すり身、鳥ひき肉）の 10 倍希

积液の最大濾過量は、いずれも食品 0.01 g 相当量であったため、食品試料 0.01 g を濾過したメンブランフィルター について FISHFC による腸内細菌の定量性について検討した。*E.coli* を添加したイクラの 10 倍希釈懸濁液を試料に用い、培養法で計数した *E.coli* 数と比較した。FISHFC による測定は、0–200 cells / 試料 0.01 g の範囲において *E.coli* の培養計数結果と高い相関が認められた($y=0.9014x$, $r=0.9724$)。

さらに、FISHFC 法が環境水や食品中に存在する腸内細菌の測定に適用可能であるか否かを検討した。まず、環境水試料（河川水試料：3 検体、海水試料：1 検体）1 ml に対して各種細菌数測定($n=5$)を実施した結果、河川試料において大腸菌群数と腸内細菌数(gross)は有意差がなく($p>0.05$)、また FISHFC 計数値と腸内細菌数(net)には有意差が認められなかった($p>0.05$)。一方、海水試料では、FISHFC 計数値は、腸内細菌数(net)より高かったが($p<0.05$)、大腸菌群数とは有意差が認められなかった($p>0.05$)。次に、食品試料として鳥ひき肉 0.01g を用い、「殺菌前」と「殺菌後」の FISHFC 計数値と各種培地を用いた培養計数値を測定したところ、殺菌前では FISHFC 計数値と腸内細菌数(net)には有意差が認められず($p>0.05$)、また殺菌後においても FISHFC 計数値は、培養計数値と同様、腸内細菌は検出されなかった。以上のことから、河川および海水中の多くの腸内細菌は B-ガラクトシダーゼ陽性の可能性があったこと、海水中の多くの腸内細菌が VRBG 寒天培地（腸内細菌用寒天培地）上での生育が CC 寒天培地（大腸菌群用寒天培地）での生育よりも困難な生理状態にあったことが推察された。

VRBG 寒天培地を用いる腸内細菌測定法は、結果判定に 4 日間を要す。また、海水試料には VRBG 培地で増殖が困難な状態の腸内細菌が含まれている可能性がある。これに対し、プローブ D を用いる FISHFC 法は、食品又は環境水試料中の培養可能な腸内細菌のみを 7 時間以内に検出し、その数を正確に定量できることが強く示された。故に、この手法は、1 日の勤務時間内での食品衛生や水質の評価に役立つものと判断された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 島 研 一
副 査 教 授 吉 水 守
副 査 教 授 猪 上 徳 雄
副 査 助 教 授 澤 辺 智 雄

学 位 論 文 題 名

蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法を応用した 環境および食品試料からの腸内細菌の 迅速計数法の開発に関する研究

近年、病原性腸内細菌による農産物および水産物の食中毒事故例が相次ぎ、迅速で精度の高い衛生指標細菌検査法が求められている。本論文は、16S rRNA を標的とする蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 技術を応用し、生きている腸内細菌を迅速かつ高い精度で検出および定量する手法の開発を行ったものである。特に評価される成果は以下の通りである。

1. GenBank / EMBL / DDBJ データベースより入手した関連細菌の 16S rDNA 塩基配列の多重アライメントを行い、2 種類の腸内細菌検出用プローブ (プローブ B (5'-GAAGCCACGCCTCAAGGGCACAA-3') およびプローブ D (5'-TGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTT-3')) を設計した。これらのプローブを用い、腸内細菌を検出するためのハイブリダイゼーションの温度条件を検討した。プローブ B では腸内細菌を特異検出する至適反応温度を見いだせなかったが、プローブ D では 60°C で反応させることにより、腸内細菌検出用プローブとして適切であることを明らかにした。
2. 供試細菌 111 株 (腸内細菌 74 種 77 株、腸内細菌科に属さない細菌 34 種 34 株) に対してプローブ D を用いた FISH を行い、検出スペクトルを検討した。75 株の腸内細菌に本プローブは反応し、その検出率は 97% であった。一方、腸内細菌科以外の供試細菌にはプローブ D は反応しなかった。従って、プローブ D を用いる FISH は腸内細菌をほぼ正確に検出できることを明らかにした。
3. 食品および環境試料では、自家蛍光を生じる粒状物が多く、これら試料に混在

している腸内細菌を直接 FISH で正確に検出することは困難であった。この場合、異物と細菌細胞を区別するためには 1000 倍の倍率で蛍光顕微鏡観察する必要があった。この観察条件下では腸内細菌の検出限界は低下し、直接的 FISH 法を細菌検査として適用できなかった。そこで、腸内細菌の短時間培養を行い、食品および環境試料に混入している生きている腸内細菌を迅速に検出し、高い検出限界を有する培養併用 FISH 法を開発した。本法は、試料懸濁液をメンブランフィルターにより濾過し、フィルター上に捕集された細菌を 6 時間培養し生じた微小集落を、プローブ D を用いた FISH により、観察倍率 100 倍下で特異検出することで、顕微鏡下での計数限界を高めた手法である。

4. 培養併用 FISH 法を衛生検査に利用するためには、FISH 反応時間の迅速化が必要となった。そこで、細菌細胞の固定時間とハイブリダイゼーション反応時間の短縮化を検討し、それぞれ 5 分間で充分であることを明らかにした。このことにより、FISH 反応時間を 1 時間に短縮化した。また、大腸菌を添加したイクラ試料を用いて培養併用 FISH の定量性を培養法と比較したところ、培養併用 FISH 法は培養法の計数値と高い相関 ($0.9014X$, $r=0.9724$) を示すことを明らかにした。従って、本法により、食品では 100 CFU/g、環境水試料では 1 CFU/ml までの生きている腸内細菌の混入を 7 時間で計数できることを明らかにした。
5. 培養併用 FISH 法が環境水や食品に存在する腸内細菌の測定に適用可能であるか否かを検討した。まず、河川水試料 3 検体 ($n=5$) 1 ml に対して VRBG 寒天培地を用いる腸内細菌の培養計数を行った結果、いずれの試料とも、培養併用 FISH 法と計数値に有意な差は認められなかった ($p>0.05$)。また、食品試料として鳥ひき肉 0.01g を供試し、殺菌前後の試料 ($n=5$) の腸内細菌数の変化を培養併用 FISH 法と VRBG 寒天培地を用いる培養計数法により測定したところ、殺菌前では培養併用 FISH 法と平板培養法による計数値に有意な差は認められなかった ($p>0.05$)。また、殺菌後の試料からは、両計数法によっても、腸内細菌は検出されなかった。

以上の成果は、プローブ D を用いる培養併用 FISH 法が 1 日の勤務時間内で、食品・水産物の衛生検査および河川水・海水浴場の水質検査に応用できることを示すものである。また、本手法は水産物あるいは沿岸環境からの種々のヒト病原性細菌の迅速計数にも応用が期待される。このことは水産科学に貢献するところ大であることから、審査員一同は本論文が博士（水産科学）の学位論文として十分な内容を有するものと判定した。