

培養併用蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いた 食中毒細菌の高精度定量検出に関する研究

学位論文内容の要旨

食品の微生物検査は、安全な製品を製造・販売する上で欠かせない過程である。現在、この検査は培養法が主流であるが、これは多大な労力を要する過程である。また最終結果を得るまでに長い時間を要するため、食品が摂食された後に結果が判明することも少なくない。したがって、消費者への食品危害リスクを低減するためには、迅速かつ高精度な食品微生物検査法が必須である。そこで本研究では、公定法に採用されている培養法と特異検出に優れた Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法を組み合わせた培養併用 FISH (FISHFC) 法を用いた食中毒細菌の迅速定量検出法の確立を試みた。

第1章では、損傷した *C. perfringens* を高感度検出するための培地、回復剤および培養条件を検討した。加熱処理 (54°C) した *C. perfringens* の検出菌数を種々の培地を用いて調べた結果、TSC 培地で検出菌数が多く、加熱損傷菌を含めた検出のできる培地であることが確認できた。次に加熱損傷 *C. perfringens* のさらなる回復を目的に、回復効果のある物質を探索したところ、他の細菌と同様にピルビン酸ナトリウム (Pyr) の添加によって最も回復効果が認められ、その最適添加濃度は 0.3% であった。さらに回復に適した培養条件が、発育至適温度の 43-46°C より低い 37°C および pH7-8 であることも明らかとなった。

第2章では、第1節で *C. perfringens* での FISHFC 法の最適反応条件の検討、第2節では汚染食品モデルにおける FISHFC 法による *C. perfringens* の定量検査法を確立した。まず、*C. perfringens* での FISHFC 最適反応条件を検討した結果、固定は 100% エタノールに一時的に曝し (0min)、ハイブリダイゼーションは 46°C、30 分間が適当であった。供試菌 58 菌株に対する *C. perfringens* 検出プローブ CLP-180 の特異性を評価したところ、*C. perfringens* のみに陽性シグナルが検出され、CLP-180 プローブが極めて特異性の高いプローブであることが明らかとなった。0.3%Pyr-TSC 培地を用いて

加熱損傷 *C. perfringens* を培養し、最適なマイクロコロニー形成時間を調べ、7時間培養が適当と判断した。2種類の食品へ加熱損傷 *C. perfringens* を人為的に接種し、FISHFC法と従来法（培養法）および損傷回復培養法での生菌数測定値を比較したところ、これらの間には有意差が認められなかったことから、本章で開発したFISHFC法が培養法と同等以上の検出精度で生菌数を測定できる方法であることが証明された。

第3章では、第1節で *Salmonella* 検出のためのFISHFC反応条件の検討、第2節で汚染食品モデルを用いて検出精度評価を行った。まず、*Salmonella* 検出プローブとして23S rRNA塩基配列を標的としたSAL343を新たに設計し、その反応条件と性能を評価した。その結果、*Salmonella* のFISHFC法の最適条件は検出陽性率および蛍光染色されたコロニーと背景とのS/N比から固定30分間、ハイブリダイゼーション46°C、30分間が最適と判断した。また、供試菌34菌株に対するSAL343プローブは、*Salmonella* のみに反応するプローブであった。次に加熱や凍結ストレスを受けた*Salmonella* を検出するためのFISHFC法に適した培地を検討し、MLCB培地が回復効率に優れ、FISHFC法に適していることが明らかとなった。また、*Salmonella* のマイクロコロニー形成時間は、7時間培養が最適であった。河川水および食品7種に*Salmonella* 3株（*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*）の混合菌液を接種し、FISHFC法の検出精度を調べたところ、一般的に*Salmonella* 検出に用いる平板法との間に有意な差はなく、同等の検出結果が得られることが明らかとなった。

第4章では、食品の汚染指標菌として最も一般的に検査される *E. coli* のFISHFC法による定量検出法を確立した。まず *E. coli* 検出プローブとして16S rRNA塩基配列内からECO636プローブを新規に設計し、その反応条件と特異性を評価した。その結果、固定30分間、ハイブリダイゼーション46°C、60分間が最適なFISHFC反応条件であり、供試34菌株に対する検出特異性評価から、ECO636プローブが *E. coli* を特異的に検出できるプローブであることが明らかとなった。しかし、ECO636プローブは、*E. coli* と極めて近縁である赤痢菌（*Shigella* 属）も検出するプローブであった。次にFISHFC法に用いる培地を検討したところ、SEL培地に胆汁酸塩を0.056%添加して選択性を持たせて培養するのが良いことを見出し、コロニー形成時間は、7時間が適切であった。牛挽肉に *E. coli* を接種し、FISHFC法の検出精度を調べたところ、公定法に準拠した平板法と同等の結果の得られる方法であることが証明された。

第5章では、*Salmonella* および *E. coli* の検出を同時に行うため、前章までのFISHFC法を各々最適化し、Multiplex-FISHFC法の確立を試みた。まず、両菌の同時検出を可能とするために、*E. coli* 用に設計した0.056%胆汁酸塩加SEL培地における *Salmonella* のコロニー形成能について調べた。

その結果、*Salmonella* においても7時間以上の培養でFISHFC法での検出可能なコロニーサイズとなったことから、*Salmonella* および *E. coli* での Multiplex-FISHFC 法における培養時間は7時間とした。また、この Multiplex-FISHFC 法の反応条件は第3章および第4章の結果から、固定30分間、ハイブリダイゼーション 46°C、60分間が最適と判断した。最後に *Salmonella* と *E. coli* の Multiplex-FISHFC 法での検出精度を確かめるために食品サンプルに両菌を接種し、Multiplex-FISHFC 法と培養法での生菌数測定値の比較を行った。その結果、SAL343 および ECO636 プローブによる FISHFC での計数値は、*Salmonella* または *E. coli* 検出用培地での生菌数と同等の検出結果が得られた。

実際の食品微生物検査で行われている培養法のみ依存した方法では、確かな最終結果を得るには、様々な確定試験を必要とするため、少なくとも2-3日間の時間を要する。しかし、本研究で開発した FISHFC 法によればいずれの菌種においても9時間以内で検出可能となった。したがって、本研究で確立した FISHFC 法は、培養法に準じた生菌のみをモニタリングできる迅速定量技術を提供し、自主衛生管理の場において食品の微生物汚染リスクを高精度に把握することで食品の安全性を確保することが可能となる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 合 祐 史
副 査 教 授 澤 辺 智 雄
副 査 准教授 山 崎 浩 司

学 位 論 文 題 名

培養併用蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いた 食中毒細菌の高精度定量検出に関する研究

食品の微生物検査は、安全な製品を製造、販売する上で不可欠であり、消費者への食品危害リスクを低減するために、より迅速かつ高精度な手法が要求されている。そこで本研究では、公定法に採用されている培養法と特異検出に優れた蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 法を組み合わせた培養併用 FISH (FISHFC) 法を用いて食中毒細菌の損傷菌をも高精度に検出可能な迅速定量検出法の確立を試みている。得られた成果は以下のように要約される。

1. ウェルシュ菌の高精度定量検出法の確立

ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) の特異検出プローブとして 16S rRNA 塩基配列を標的とした CLP-180 を設計し、FISHFC 条件を最適化するとともに、損傷回復検出培地として 0.3%ピルビン酸ナトリウム添加 TSC 培地を開発し、加熱損傷 *C. perfringens* を 7 時間培養でマイクロコロニーの検出が可能であった (全工程 9 時間以内)。また、このときの回復培養条件は、発育至適温度の 43-46°C より低い 37°C および pH 7-8 であることも明らかにした。

2 種類の食品へ加熱損傷 *C. perfringens* を人為的に接種し、FISHFC 法と従来法 (培養法) および損傷回復培養法での生菌数測定値を比較したところ、これらの間には有意差が認められなかったことから、本研究で開発した FISHFC 法が培養法と同等以上の検出精度で生菌数を測定できることを実証した。

2. サルモネラ属細菌の高精度定量検出

サルモネラ (*Salmonella*) 属細菌の特異検出プローブとして 23S rRNA 塩基配列を標的とした SAL343 を設計し、FISHFC 条件を最適化し、*Salmonella* の損傷菌回復検出用培地として MLCB 培地を用いて 7 時間培養により蛍光検出が可能となった。河川水および食品 7 種に *Salmonella* 3 株

(*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*) の混合菌液を接種し、FISHFC 法の検出精度を調べたところ、一般的に *Salmonella* 検出に用いる平板法との間に有意な差はなく、培養法と同等の検出精度で検出可能であることを明らかにした。

3. 大腸菌の高精度定量検出法の確立

食品の汚染指標菌として最も一般的に検査される大腸菌 (*Escherichia coli*) の検出プローブとして 16S rRNA 塩基配列内から ECO636 プローブを新規に設計し、FISHFC 条件を最適化し、0.056% 胆汁酸塩添加 SEL 培地で選択性を持たせて 7 時間培養することにより、マイクロコロニーの蛍光検出が可能となった。ECO636 プローブは、*E. coli* と極めて近縁である赤痢菌 (*Shigella* 属) も検出するプローブであったが、有害菌の誤検出は実用上容認できると判断した。牛挽肉に *E. coli* を接種し、FISHFC 法の検出精度を調べたところ、公定法に準拠した平板法と同等の検出精度が得られることを実証した。

4. サルモネラと大腸菌の同時高精度定量検出法の確立

E. coli 用に設計した 0.056%胆汁酸塩添加 SEL 培地において *Salmonella* と *E. coli* の Multiplex-FISHFC 法を最適化し、FISHFC による *Salmonella* と *E. coli* の同時検出法を構築した。食品試料に両菌を接種し、Multiplex-FISHFC 法と培養法での *Salmonella* と *E. coli* の生菌数測定値の比較を行ったところ、SAL343 および ECO636 プローブによる FISHFC での計数値は、*Salmonella* または *E. coli* 検出用培地での生菌数と同等の検出精度が得られることを確認した。

実際の食品微生物検査で行われている培養法のみ依存した方法では、確かな最終結果を得るには、各種確定試験を必要とするため、少なくとも 2-3 日間の時間を要する。しかし、本研究の FISHFC 法によればいずれの菌種においても 9 時間以内で、培養法に準じた生菌のみのモニタリング (迅速定量) が可能となる。本研究の成果は、自主衛生管理の場において食品の微生物汚染リスクを迅速かつ高精度に把握することを可能とする技術を提供し、水産食品も含めた食品安全性向上技術の発展に大きく寄与するものとして高く評価できる。よって審査員一同は申請者が博士(水産科学)の学位を授与される資格のあるものと判定した。