

令和元年5月17日現在

機関番号：82410

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21635

研究課題名(和文)大腸菌群フローラ解析による食品汚染源推定技術の開発

研究課題名(英文)Development of tracing technology of contamination source in food by coliform flora analysis

研究代表者

富永 達矢(Tominaga, Tatsuya)

埼玉県産業技術総合センター・食品・バイオ技術担当_北部・専門研究員

研究者番号：80580539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：紙上で迅速に大腸菌群を検出できるイムノクロマト試験紙を開発し、食肉を対象に実用性を検証した。1種類の試験紙では、食肉から分離された大腸菌群の検出率は38%～76%に過ぎなかったが、7種類の試験紙を組み合わせることで、検出率は100%に達した。菌の分離を行わず、直接食肉の大腸菌群を検出できるか調べたところ、15%の食肉で大腸菌群を検出できたが、当該食肉は10万/g以上の大腸菌群に汚染されていた。1枚の紙に4種類の抗体を固定し、食肉と洋菓子の大腸菌群フローラを調べたところ、両者の明確な相違が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食品製造者は食中毒菌の混入を未然に防止するため、大腸菌群数を指標に食品の衛生管理に努めている。大腸菌群数の検査は培地上に生育した菌数を計上するが、培養に一晚要するため、結果を得られるのは製造の翌日となっていた。また、培養には保温庫が必要であり、検査室を要していた。

今回、開発した試験紙は長さ2.5cm、幅0.5cm程度の大きさで、検査室のみならず、製造現場で試験できる。15分程度で結果を得られ、出荷前に製品の汚染度を判断できる。食の安全の確保に貢献するツールとなり得る。

研究成果の概要(英文)：An immunochromatographic strip that could quickly detect coliform bacteria was developed and its practicality was verified for meat. Using one type of strip, the detection rate of coliforms isolated from meats was only 38% to 76%, however, the detection rate reached 100% by combining seven kinds of strips. The signal turned out to be positive in 15% of meats, contaminated with 100,000 / g or more coliforms when the test was performed against meats without isolating bacteria. When four types of antibody were immobilized on a strip and the coliform flora of a meat and a pastry was examined, clear differences between the two were revealed.

研究分野：食品衛生

キーワード：大腸菌群 フローラ イムノクロマト 食品製造 汚染源探索 抗体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細菌による食中毒事件は後をたたない。2015年には431事件において、6,029名の患者が細菌性食中毒に罹患した。こうした事件の発生を未然に防ぐため、食品製造者は、大腸菌群などの衛生指標菌を対象に食品の検査を実施し、衛生管理に努めている。規定量以上の大腸菌群が検出された場合、早急に原因を突き止め、対策を講じる必要性に迫られる。

大腸菌群とは、グラム陰性の無芽胞桿菌で48時間以内に乳糖を分解して酸とガスを産生する好気性または通性嫌気性と定義される一群の細菌である。*Citrobacter* 属、*Enterobacter* 属、*Escherichia* 属、*Klebsiella* 属など多くの腸内細菌科の菌や *Aeromonas* 属菌がふくまれる。大腸菌群が食品等から検出された際、存在する菌の種類の割合(以下、大腸菌群フローラ)は食品の種類や工場内の環境ごとに異なる。このことを利用し、食品と工場内各所の大腸菌群フローラを比較照合して、食品の污染源候補を推定できることが示されている。

大腸菌群の検出・定量法として一般的な手法は培養法である。特殊な装置を必要としないが、結果が判明するまでに2~3日を要する。PCR法による迅速検出法も開発されている。数時間で結果を得られるが、専用装置を必要とする。食品製造現場で迅速に結果を得られる手法の開発が望まれていた。

2. 研究の目的

食肉(牛、豚、鶏)をモデルに、検出すべき対象となる大腸菌群属を特定する。当該大腸菌群を属ごとに、個々の試験紙上で、15分以内に検出するイムノクロマト技術を確認する。さらに、1枚の紙上で複数の大腸菌群属を検出可能な試験紙を開発し、食材の違いによる大腸菌群フローラの相違を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 大腸菌群属の特定

牛、豚、鶏の生肉を懸濁した溶液を XM-G 寒天培地に塗布した。培養後、出現したコロニーから DNA を抽出し、16S rDNA を PCR 増幅し、その産物の塩基配列を解析して細菌の属を特定した。

(2) イムノクロマト試験紙の構築と試験

一方の抗体をメンブレン上に固定し、もう一方の抗体を金属コロイド粒子で標識した。検出対象となる菌体は、加熱処理後、標識抗体と混合し、メンブレンへ展開した。展開後の試験紙をスキャナーでデジタル化し、紙上のスポットの濃淡を評価した。抗体は大腸菌群を認識する7種類のものを用いた。以降、*Aeromonas* 属を認識する抗体で構築した試験紙による測定を A-LFA と略し、本略法をほかの抗体にも適用する。

(3) 食品試験

20種類の食肉を購入し、37℃にて8時間または24時間保温した。10gの食肉と90mLの生理食塩水をストマッカーで30秒間懸濁し、遠心処理後の菌体を加熱処理し、試験紙へ展開した。

4. 研究成果

(1) 大腸菌群属の特定

食肉から検出された大腸菌群の属を調べたところ、*Aeromonas* 属、*Citrobacter* 属、*Enterobacter* 属、*Hafnia* 属、*Klebsiella* 属、*Pantoea* 属、*Raoultella* 属、*Serratia* 属が主に検出された。そこで、これらを検出する試験紙を7種類構築した。

(2) 食品分離株の検出

食肉、菓子、惣菜等の食品から分離された大腸菌群55株の検出を試みた。C-LFAは*Citrobacter* 属、E-LFAは*Enterobacter* 属と、7種類のLFAではすべて、当初標的とした属を検出することができた。また、C-LFAは*Enterobacter* 属、*Hafnia* 属、*Klebsiella* 属、*Pantoea* 属の株も交差反応により検出した。同様の交差反応はH3-LFA等ほかのLFAでもみられた。そのため、個々のLFAでは大腸菌群の検出率は38%から76%に留まったが、7種類のLFAを組み合わせることで、検出率は100%に達した(表1)。

(3) 感度試験

各々のLFAの感度を調べた。A5-LFAでは6.0 log₁₀ (cfu)以上、S9-LFAでは4.0 log₁₀ (cfu)以上、それ以外のLFAでは5.0 log₁₀ (cfu)の菌数がサンプル溶液中に存在するとき、陽性と判断された。

(4) 食品試験

分離工程を経ない実際の食品で大腸菌群を検出することが可能か、20種類の食肉を用いて調べた。培養することなくLFAを実施したところ、3種類の食肉で陽性を示したが、そのときの大腸菌群数は4.9~6.6 log₁₀ (cfu/g)であった。これら以外の食肉は陰性であった(大腸菌群数:2.0~4.3 log₁₀ [cfu/g])。8時間培養後、すべての食肉でLFA陽性を示した(大腸菌群数:5.4~7.4 log₁₀ [cfu/g])。24時間培養後も同様の結果であった(大腸菌群数:7.6~9.8 log₁₀

[cfu/g])。培養時間が長くなるほど、7種類のLFAのうち陽性を示す数が増加し(8時間:1.8、24時間:4.6)、シグナル強度も増加した(8時間:1,366、24時間:2,678)(図1)。

(5) フローラ解析

1枚の紙上で4種類の大腸菌群を検出し、フローラ解析が可能か検討した。豚肉ではすべての抗体で陽性シグナルを示したが、洋菓子では2種類のみで陽性であった(図2)。豚肉と洋菓子のフローラの違いを捉えることができた。

食品の大腸菌群を15分で検出可能な試験紙を開発した。さらに、複数の抗体を1枚の紙上に固定することにより、大腸菌群フローラの解明も可能な試験紙を開発した。これは、国際的にも初めての試みと思われる。今後、工場内各所のフローラ解析にも使用可能か検討を重ねたうえ、食品汚染源の推定に応用できるか、実際の食品工場で試験する予定である。

表1 食品分離株のLFA

	LFAを構成する抗体名							総合 ^a
	A5	C4	E8	H3	KR8	P2	S9	
<i>Aeromonas</i> sp.	+	+	+	+	+	-	-	+
<i>Aeromonas</i> sp.	+	-	+	+	-	-	+	+
<i>Aeromonas</i> sp.	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Aeromonas</i> sp.	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Aeromonas</i> sp.	+	-	-	+	-	-	-	+
<i>Citrobacter</i> sp.	-	+	+	+	-	-	+	+
<i>Citrobacter</i> sp.	-	+	+	+	+	-	-	+
<i>Citrobacter</i> sp.	+	+	+	+	+	-	-	+
<i>Citrobacter</i> sp.	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>Citrobacter</i> sp.	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>Enterobacter</i> sp.	-	+	+	+	+	-	+	+
<i>Enterobacter</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterobacter</i> sp.	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Enterobacter</i> sp.	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterobacter</i> sp.	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterobacter</i> sp.	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterobacter</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterobacter</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterobacter</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterobacter</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterobacter</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterobacter</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterobacter</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterobacter</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterobacter</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterobacter</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterobacter</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterobacter</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterobacter</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterobacter</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterobacter</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterobacter</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterobacter</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Hafnia alvei</i>	-	-	-	+	-	-	+	+
<i>Hafnia alvei</i>	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Hafnia alvei</i>	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Klebsiella</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Klebsiella</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Klebsiella</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Klebsiella</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Klebsiella</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Klebsiella</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Klebsiella</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Klebsiella</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Klebsiella</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Klebsiella</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Klebsiella</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Klebsiella</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Raoultella</i> sp.	-	+	+	-	+	-	+	+
<i>Raoultella</i> sp.	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Raoultella</i> sp.	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Pantoea</i> sp.	-	+	+	-	-	+	+	+
<i>Pantoea</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Serratia</i> sp.	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Serratia</i> sp.	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Serratia</i> sp.	-	-	-	-	+	-	+	+
<i>Serratia</i> sp.	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Serratia</i> sp.	-	-	-	+	+	-	+	+
<i>Serratia</i> sp.	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Serratia</i> sp.	-	-	+	-	+	+	+	+
<i>Serratia</i> sp.	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Serratia</i> sp.	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Serratia</i> sp.	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Serratia</i> sp.	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Serratia</i> sp.	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Serratia</i> sp.	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Serratia</i> sp.	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Serratia</i> sp.	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Serratia</i> sp.	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Serratia</i> sp.	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Serratia</i> sp.	+	+	-	+	-	-	+	+
<i>Serratia</i> sp.	-	-	+	-	-	-	+	+
陽性率 ^b (%)	53	58	76	71	67	38	69	100

a: 7種類のLFAのいずれかで陽性となった場合、+とした。
 b: シグナルを検出した株の割合を算出した。

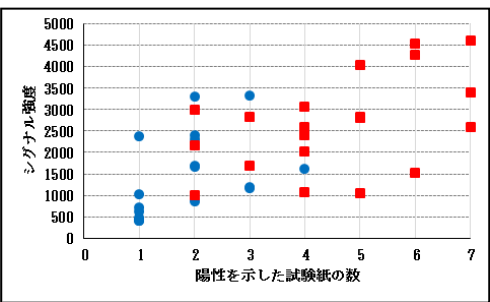


図1 培養時間とLFAシグナル
 : 8時間培養、 : 24時間培養

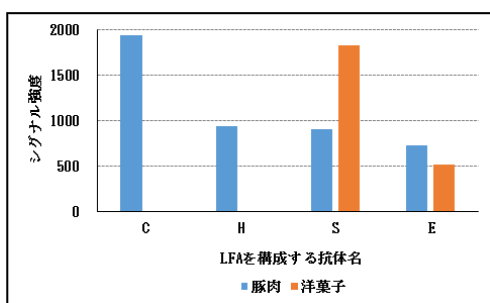


図2 大腸菌群フローラ解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Tominaga, T. Rapid detection of coliform bacteria using a lateral flow test strip assay. *J. Microbiol. Methods*, 2019, 160, 29-35. (査読有)

DOI:10.1016/j.mimet.2019.03.013

Tominaga, T. Rapid detection of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Raoultella ornithinolytica* and other related bacteria in food by lateral-flow test strip immunoassays. *J. Microbiol. Methods*, 2018, 147, 43-49. (査読有)

DOI:10.1016/j.mimet.2018.02.015

富永 達矢. 遺伝子検出による迅速微生物解析技術の開発～地域食品工場における実現可能性の検討～. *食品と容器*, 2018, 59 巻, 350-353. (査読なし)

Tominaga, T. Enhanced sensitivity of lateral-flow test strip immunoassays using colloidal palladium nanoparticles and horseradish peroxidase. *LWT-Food Sci. Technol.*, 2017, 86, 566-570. (査読有)

DOI:10.1016/j.lwt.2017.08.027

〔学会発表〕(計1件)

富永達矢, 平松明德, 原田洋志, 仲島日出男. 大豆粉懸濁液を発酵したヨーグルト様食品の開発. 日本食品科学工学会 第65回大会, 2018年8月24日, 東北大学(宮城県)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。