

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：32670

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K05939

研究課題名（和文）メタゲノム解析による食品衛生指標菌の選抜と汚染源推定技術への応用

研究課題名（英文）Selection of food hygiene indicator bacteria by metagenomic analysis and application to contamination source investigation technology

研究代表者

富永 達矢（TOMINAGA, Tatsuya）

日本女子大学・家政学部・准教授

研究者番号：80580539

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：腐敗した食品のメタゲノム解析から衛生指標となり得る菌を選抜し、イムノクロマト試験紙を用いた簡易検出法の開発を試みた。腐敗洋菓子の細菌構成叢を調べた結果、*Pantoea*属、*Bacillus*属、大腸菌群、乳酸菌などの存在が確認された。これらの細菌に対する抗体を作製し、大腸菌群や乳酸菌を検出するための試験紙を各々構築した。食品を一定温度で培養し、試験紙で陽性反応を得られるまでに要する時間から、食品の腐敗度を可視化した。洋菓子を対象に、大腸菌群による汚染の程度を予測した正答率は87%を示した。また、惣菜を対象にした試験では、乳酸菌による腐敗の検出率は82%に達した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、食品工場において、殺菌力の高い洗浄法が普及してきている。この結果、食品製造環境の常在細菌叢が変化し、食品の腐敗状態を示す指標菌が従来のものと変化してきた。本研究では、*Pantoea*属細菌や乳酸菌などが新しい腐敗指標となり得ることを示した。また、イムノクロマト試験紙を用いたそれら新規指標菌の簡易検出法の開発にも成功した。消費期限/賞味期限の適切な設定が可能になり、フードロス削減にもつながることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Through metagenomic analysis of spoiled food, bacteria that could serve as hygiene indicators were selected and a simple detection method using immunochromatographic test strip was attempted to be developed. As a result of examining the bacterial flora of spoiled sponge cakes, the presence of *Pantoea* spp., *Bacillus* spp., coliforms, and lactic acid bacteria was confirmed. Antibodies against these bacteria were produced, and test strips for detecting coliforms and lactic acid bacteria were constructed respectively. The degree of spoilage of food was visualized based on the time required to incubate food until a positive signal with the test strip was observed. The accuracy rate for predicting the degree of contamination by coliforms for sponge cakes was 87%. In addition, in tests on prepared foods, the detection rate of spoilage caused by lactic acid bacteria reached 82%.

研究分野：食品微生物学

キーワード：腐敗食品 衛生指標 微生物 細菌 メタゲノム解析 イムノクロマト 試験紙 細菌構成叢

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

食品を介した細菌性食中毒の発生は後を絶たない。2019年には、1,000件以上の事件、13,000人以上の患者が発生した。このような食中毒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の数を最終製品で確認している。そして、規定数以上の指標菌が検出された場合、原因の探索や清掃の強化などの手段を講じている。しかし、近年、殺菌力の高い洗浄法の普及によって、食品製造環境の構成細菌が変化し、食品中の衛生指標菌数が規定数以下でも、腐敗に至る事例が頻発しており、実情に適合した衛生指標が製造現場より強く望まれていた。

### 2. 研究の目的

次世代シーケンサで腐敗食品の細菌構成叢を解析し、衛生指標となり得る細菌を選抜する。選ばれた指標菌の検出を紙上で解析可能なイムノクロマト試験紙を開発する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細菌構成叢の解析

4個の洋生菓子を各々異なる店舗から購入し、2Lのプラスチック容器に入れ、37℃で24時間保温し、腐敗させた。各々から10g採取し、90mLの滅菌済み生理食塩水と混合してからストマッカー処理し、その溶液からDNAを抽出した。16S rDNAの部分配列(約430bp)をPCR増幅し、次世代シーケンサを用いたアンプリコン解析を実施した。

#### (2) イムノクロマト試験紙の構築と試験

*Pantoea* 属を抗原とした抗体、*Serratia* 属を抗原とした大腸菌群を汎用的に認識する抗体、*Lactiplantibacillus* 属を抗原とした抗体を用意した。抗体は試験紙上に固定し、また、金属コロイド粒子で標識した。以降、各々の抗体を用いて実施したイムノクロマト試験(Lateral flow immunochromatographic assay: LFIA)をそれぞれ、P-LFIA、C-LFIA、L-LFIAと称した。菌体を試験紙へ展開し、紙上に形成されたスポットをスキャナーでデジタル化した後、その濃淡を-、+、++、+++、++++で評価した。

#### (3) 食品試験

ストマッカー処理した食品懸濁液を遠心処理し、沈殿を加熱処理した後、試験紙へ展開した。

### 4. 研究成果

#### (1) 洋菓子の細菌構成叢

4個の腐敗洋菓子の細菌構成叢を調べた(表1)。*Pantoea* 属、*Bacillus* 属、大腸菌群、乳酸菌などの存在が確認され、これらの菌が腐敗指標となることが示唆された。

#### (2) イムノクロマト試験紙の評価

P-LFIAが洋菓子Bのみ陽性となったのに対し、C-LFIAはすべての腐敗洋菓子で陽性となった(表2)。また、L-LFIAでは、乳酸菌、*Bacillus* 属、*Staphylococcus* 属などのグラム陽性菌で陽性となった(表3)。糖液に細菌を懸濁し、一定時間におけるpHの低下の度合い(pH試験)から、乳酸菌とそれ以外のグラム陽性菌を判別できた。L-LFIAとpH試験を併用することで、乳酸菌のみを検出できる可能性が示唆された。

#### (3) 食品を対象とした試験

食品を所定時間培養し、LFIA陽性になるまでの時間から、食品中の対象細菌の存在量を推定することが可能か検証した。初発菌数が3.8, 2.8, 1.8, and 0.8 log<sub>10</sub> (cfu/ml)の細菌培養液では、C-LFIA陽性になるまでに要する培養時間は各々0, 3, 6, and 9時間であることが分かった。>5.0, 3.0-5.0, 2.0-3.0 log<sub>10</sub> (cfu/g)に区分される大腸菌群が混入した洋生菓子では、C-LFIA陽性になるまでに要する培養時間は各々3, 6, and 9時間であった。洋菓子における大腸菌群区分の予測正答率は87%を示した。

新鮮な食品(サラダ、野菜、洋菓子、和菓子、ハム、食肉)とそれを腐敗した食品を0, 12, 24時間培養し、L-LFIA陽性かつpH試験陽性になるまでの培養時間を調べた。51個の食品のうち、42個の食品で腐敗食品が新鮮食品よりも早い培養時間で陽性となった(腐敗検出率82%)。腐敗が検出された食品の細菌叢解析では、*Leuconostoc citreum* や *Leuconostoc gelidum* などの乳酸菌が確かに検出された。

以上の研究から、腐敗食品の細菌叢解析により、衛生指標菌として *Pantoea* 属、*Bacillus* 属、大腸菌群、乳酸菌が選抜された。これらの系統学的に幅広い細菌を一度に解析可能なイムノクロマト試験紙を構築した。LFIA陽性になるまでに要する培養時間から、食品の腐敗度を可視化する手法を開発した。今後、食品製造工場における環境から拭き取ったサンプル等についても、本

手法を適用できるか試していく予定である。

表1 腐敗洋菓子の細菌構成叢

(A) 洋菓子A			(B) 洋菓子B		
属	Taxon数	検出率 (%)	属	Taxon数	検出率 (%)
<i>Bacillus</i>	12132	46	<i>Bacillus</i>	22372	87
<i>Pantoea</i>	10621	41	<i>Pantoea</i>	3246	13
<i>Leuconostoc</i>	1592	6	合計	25618	100
<i>Staphylococcus</i>	1270	5			
<i>Klebsiella</i>	306	1			
<i>Lactobacillus</i>	177	1			
合計	26098	100			

  

(C) 洋菓子C			(D) 洋菓子D		
属	Taxon数	検出率 (%)	属	Taxon数	検出率 (%)
<i>Bacillus</i>	23926	83	<i>Pantoea</i>	18665	95
<i>Leuconostoc</i>	2680	9	<i>Bacillus</i>	320	2
<i>Gluconobacter</i>	1077	4	<i>Staphylococcus</i>	315	2
<i>Pantoea</i>	952	3	<i>Erwinia</i>	192	1
<i>Kocuria</i>	249	1	<i>Pseudomonas</i>	116	1
合計	28884	100	合計	19608	100

検出率 1%以上の菌のみ表示

表2 P-LFIA および C-LFIA の性能評価

	洋菓子A	洋菓子B	洋菓子C	洋菓子D
P-LFIA	-	++	-	-
C-LFIA	+	+++	+	++

表3 L-LFIA の性能評価

			L-LFIA	
乳酸菌	<i>Carnobacterium divergens</i>	NBRC 15683 <sup>T</sup>	+	
	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	NBRC 15684	+	
	<i>Enterococcus faecalis</i>	NBRC 12964	-	
	<i>Enterococcus faecium</i>	NBRC 3535	+	
	<i>Lactococcus garvieae</i>	NBRC 100934 <sup>T</sup>	+	
	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	NBRC 12007	+	
	<i>Leuconostoc citreum</i>	JCM 9698 <sup>T</sup>	+++	
	<i>Leuconostoc lactis</i>	JCM 11052	++	
	<i>Leuconostoc suionicum</i>	NBRC 3426 <sup>T</sup>	++++	
	<i>Pediococcus acidilactici</i>	IAM 1233	++++	
	<i>Pediococcus damnosus</i>	NBRC 12220	++++	
	<i>Pediococcus parvulus</i>	NBRC 100673 <sup>T</sup>	++++	
	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	JCM 2023	++	
	<i>Streptococcus thermophilus</i>	NBRC 111149 <sup>T</sup>	++++	
	<i>Weissella confusa</i>	NBRC 3955	++++	
	<i>Weissella soli</i>	JCM 12536 <sup>T</sup>	++	
	<i>Weissella viridescens</i>	NBRC 3949	++++	
乳酸菌以外の グラム陽性細菌	<i>Bacillus cereus</i>	NBRC 15305 <sup>T</sup>	++	
	<i>Bacillus circulans</i>	NBRC 13626 <sup>T</sup>	-	
	<i>Bacillus coagulans</i>	NBRC 12583 <sup>T</sup>	++++	
	<i>Bacillus firmus</i>	NBRC 15306 <sup>T</sup>	++++	
	<i>Bacillus licheniformis</i>	NBRC 12200 <sup>T</sup>	++++	
	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	NBRC 3134	+++	
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	NBRC 101235 <sup>T</sup>	++++	
	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	NBRC 12167 <sup>T</sup>	+	
	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	NBRC 12732	++++	
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NBRC 100911 <sup>T</sup>	++	
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>	NBRC 102446 <sup>T</sup>	++++	
	グラム陰性細菌	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NBRC 109757 <sup>T</sup>	-
		<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	NBRC 3820	-
<i>Citrobacter freundii</i>		IAM 12471 <sup>T</sup>	-	
<i>Cronobacter sakazakii</i>		JCM 1233 <sup>T</sup>	-	
<i>Enterobacter aerogenes</i>		IAM 12348 <sup>T</sup>	-	
<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>		IAM 12349 <sup>T</sup>	-	
<i>Escherichia coli</i>		NBRC 102203 <sup>T</sup>	-	
<i>Escherichia vulneris</i>		JCM 1688 <sup>T</sup>	-	
<i>Hafnia alvei</i>		JCM 1666 <sup>T</sup>	-	
<i>Klebsiella oxytoca</i>		NBRC 102593 <sup>T</sup>	-	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>		NBRC 14940 <sup>T</sup>	-	
<i>Kluyvera ascorbata</i>		IAM 14203 <sup>T</sup>	++	
<i>Leclercia adecarboxylata</i>		JCM 1667 <sup>T</sup>	-	
<i>Pantoea agglomerans</i>		NBRC 12686	-	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		NBRC 12689 <sup>T</sup>	-	
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aureofaciens</i>		NBRC 3521 <sup>T</sup>	-	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		NBRC 15842	-	
<i>Pseudomonas fragi</i>		NBRC 3458 <sup>T</sup>	-	
<i>Raoultella ornithinolytica</i>		JCM 6096 <sup>T</sup>	-	
<i>Raoultella planticola</i>		JCM 7251 <sup>T</sup>	-	
<i>Raoultella terrigena</i>		JCM 1687 <sup>T</sup>	-	
<i>Serratia liquefaciens</i>		JCM 1245 <sup>T</sup>	-	
<i>Serratia grimesii</i>		NBRC 13537 <sup>T</sup>	-	
<i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i>		ATCC 23715	-	
<i>Yersinia bercovieri</i>		NBRC 105717 <sup>T</sup>	-	

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tominaga Tatsuya	4. 巻 209
2. 論文標題 Rapid detection of lactic acid bacteria by lateral flow immunochromatographic assay	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Microbiological Methods	6. 最初と最後の頁 106730 ~ 106730
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mimet.2023.106730	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tominaga Tatsuya	4. 巻 183
2. 論文標題 Rapid detection of total bacteria in foods using a poly-L-lysine-based lateral-flow assay	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Microbiological Methods	6. 最初と最後の頁 106175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mimet.2021.106175	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tominaga Tatsuya, Ishii Masaharu	4. 巻 47
2. 論文標題 Detection of microorganisms with lateral flow test strips	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods in Microbiology	6. 最初と最後の頁 351 ~ 394
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/bs.mim.2019.11.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tominaga Tatsuya	4. 巻 40
2. 論文標題 Rapid quantification of coliforms in ready to eat foods using lateral flow immunochromatographic assay	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Food Safety	6. 最初と最後の頁 e12835
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jfs.12835	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 富永達矢、石井正治
2. 発表標題 イムノクロマト試験紙によるサワードウモニタリング技術の開発
3. 学会等名 日本食品科学工学会 第68回大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------