

食品製造工程における微生物検出技術の開発

富永達矢*¹ 本多春樹*² 関根正裕*¹

Simple Detection System for the Source of Saprophytic Pollution in Food Processes

TOMINAGA Tatsuya*¹, HONDA Haruki*², SEKINE Masahiro*¹

抄録

加工食品から大腸菌群が検出された際に、汚染源を除き衛生状態を復元するための汚染源推定システムの迅速化・簡便化を試みた。糖(アラビトール)の資化性により、10属17種の大腸菌群の標準菌株を識別できることが示された。そこで、アラビトールを用いた培地を用い、2種類の食品とその各々の製造工場より分離された大腸菌群の構成相を調べたところ、その類似度から汚染源を特定することができた食品と推定にとどまった食品とに結果が分かれた。後者については、さらに、DNA解析を試みることで、汚染源を特定することができた。2種類の培地を用いる大腸菌群構成相の解析で、簡便に汚染源を特定できる可能性が示された。

キーワード：食品衛生，大腸菌群，培地セット，汚染源探索

1 はじめに

食品製造企業では、食の安全・安心を確保する目的で、自然界に多数存在する大腸菌群を汚染状態の指標として衛生管理を行い、食品中に大腸菌群が検出されると、清掃強化などの対処により衛生状態の保全に努める¹⁾。しかし、大腸菌群は食品工場内の各所に常在するため、汚染源が除去され、食品中の大腸菌群が検出されなくなるまでに多大な労力と時間を費やす。大腸菌群を構成する多種類の菌株の生育至適条件は必ずしも同一ではなく^{2),3)}、環境条件によって構成相も変化することを利用して、食品中で検出された大腸菌群の構成相から迅速に細菌汚染経路や原因を推定する技術の開発を目指した結果、本技術の実現可能性が確認された⁴⁾。そこで、その手法の実用化とさら

なる迅速化・簡便化を目指して、(i)多様な標準菌株を被検菌として用いた際に大腸菌群株の識別を糖の資化性を指標に調べることができるか検証し、(ii)その糖を用いた培地で大腸菌群構成相を調べた際に、汚染源が特定できるか検討し、(iii)培地による構成相分析から特定された汚染源が妥当であったか、DNA解析により確認した。

2 実験方法

2.1 菌株・培地

実験に用いた微生物株は以下の株である。*Citrobacter freundii* IAM 12471, *Enterobacter aerogenes* IAM 12348, *Enterobacter amnigenus* JCM 1237, *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* IAM12349, *Enterobacter sakazakii* JCM 1233, *Escherichia vulneris* JCM 1688, *Hafnia alvei* JCM 1666, *Kluyvera cryocrescens* JCM 7580, *Leclercia adecarboxylata* JCM 1667, *Moellerella wisconsensis* JCM 5895,

*¹ 北部研究所 生物工学部*² 電子情報技術部

Raoultella ornithinolytica JCM 6096, *Raoultella planticola* JCM 7251, *Raoultella terrigena* JCM 1687, *Serratia fonticola* JCM 1242, *Serratia liquefaciens* JCM 1245, *Serratia rubidaea* JCM 1240, *Yersinia ruckeri* JCM 2429. 細菌株は XM-G 培地にて培養した。

2.2 糖資化性試験

微生物株は、パープルブロスベース(以下 PBB)1.5%に寒天を 2.5%加え、さらに D-アラビトール(DARL)を 1.0%加えた培地にて、37℃、一晚培養した。DARL を資化して、酸を産生する株は、培地中の pH 指示薬の反応により生育コロニー周辺が紫色から黄色に変色した。変色がみられた株を DARL 資化性(+)とした。

2.3 DNA 解析試験

微生物株から DNA を ISOPLANT キット(ニッポンジーン)を用いて抽出した。DNA ~500 ng、プライマー(5'- CCG CAG CCA A -3') 50 pmol、dNTPs 0.2 mM、ExTaq DNA ポリメラーゼ(タカラバイオ) 2.5 ユニットを混合し、PCR 反応は 94℃(5分)・37℃(5分)・72℃(5分)を 4 サイクル行ったのち、94℃(1分)・37℃(1分)・72℃(2分)を 4 サイクル、最後に 72℃(10分)の条件で行った。反応産物は 1.2%アガロースゲルにて電気泳動を行い、エチジウムブロマイドにて染色したのち、UV ランプにてバンドの確認を行った。

3 結果及び考察

3.1 大腸菌群標準菌株の識別

既報⁴⁾にて、被検菌として用いた標準菌株の種類は、食品から分離されうる大腸菌群の一部にすぎなかった。肉製品・魚製品・ミルクなどの食品から、頻繁に分離される大腸菌群株をこれまでの報告から調べたところ、より多岐な種類にわたる大腸菌群株が分離されることが分かった^{5)~7)}。そこで、標準菌株の種類を 10 属 17 種に増やしたうえで、それらが昨年度に選抜した糖(DARL)の資化性の差異により識別できるか否かについて調べた(表 1)。その結果、*Raoultella*属や*Serratia*属の菌株では資化性(+)であったのに対

表 1 糖資化性試験

細菌名	DARL
<i>Citrobacter freundii</i>	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+
<i>Enterobacter amnigenus</i>	-
<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>	-
<i>Enterobacter sakazakii</i>	-
<i>Escherichia vulneris</i>	-
<i>Hafnia alvei</i>	-
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	-
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	+
<i>Moellerella wisconsensis</i>	+
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	+
<i>Raoultella planticola</i>	+
<i>Raoultella terrigena</i>	+
<i>Serratia fonticola</i>	+
<i>Serratia liquefaciens</i>	+
<i>Serratia rubidaea</i>	+
<i>Yersinia ruckeri</i>	-

+ : 資化, - : 非資化

して、*Enterobacter* 属の細菌では、一部例外があるものの、(-)であることが分かった。以上から、DARL の資化性の差異により、食品から分離されうるほとんどの大腸菌群を識別できるということが示された。

実際の食品工場に、本研究で開発されたシステムを導入するためには、検査に用いる培地の種類数を減らし、労力や時間を可能な限り軽減させる必要がある。標準菌株に対する DARL 資化性の試験の結果から、DARL の資化性のみを指標としても、大腸菌群を十分にグループ分けできる可能性が示された。

3.2 大腸菌群構成の簡易分析による汚染源の特定

2 種類の培地(DARL・XM-G)を用いることにより、大腸菌群を 2 種類にグループ分けした場合にも大腸菌群汚染源の特定が可能であるか調べた。食品やその製造ライン周辺の環境から、XM-G 培地にて分離された細菌株が、DARL 培地上で生育して酸を産生するか否か調べ、酸産生能がみられたものを I グループ、みられなかったものを

表2 食品から分離された大腸菌群の汚染源推定

	グループ		類似度 ^a	
	I	II	A ^b	B ^c
倉庫床(冷蔵)	25	75	0.77	0.95
倉庫床(常温)	100	0	0.85	0.00
成形加工機(乾)	50	50	0.97	0.71
成形加工機(湿)	19	81	0.70	0.97
作業場床(湿)	0	100	0.52	1.00
野菜洗浄場床	0	100	0.52	1.00
原料	22	78	0.73	0.96
空中浮遊菌	31	69	0.83	0.91
加工食品A	62	38	1.00	/
加工食品B	0	100	/	1.00

^a, 食品から分離された大腸菌群 I グループの割合を x_1 , II グループの割合を x_2 とし、製造環境から分離された大腸菌群 I グループの割合を y_1 , II グループの割合を y_2 とし、類似度は以下の式により計算した。

$$\text{類似度} = \frac{\sum x_i y_i}{\sqrt{\sum x_i^2 \sum y_i^2}}$$

^b, 加工食品Aに対する類似度を計算した結果。

^c, 加工食品Bに対する類似度を計算した結果。

II グループと定義した。様々な工場内環境から分離された大腸菌群の I グループと II グループの比率(大腸菌群構成相)を示したものが表 2 である。場所により、その構成相が大きく異なっていることが分かった。また、食品から分離された大腸菌群について、構成相を調べ、その構成相に対して、各々の工場内環境から分離された大腸菌群構成相がどの程度一致しているか、類似度により求めた(表 2)。その結果、加工食品 A については、成形加工機(乾)が最も高い類似度を示し、この機械が汚染源であるということが示唆された。また、加工食品 B については、作業場床(湿)・野菜洗浄場床から分離された大腸菌群構成相が、食品の構成相と完全に一致しており、2 つの場所のいずれかが、もしくは両方が汚染源であるということが示唆された。以上の結果から、2 種類の培地による汚染源探索法は、汚染源を特定できる場合もあるが、その候補地を複数示す場合もあることが分かった。

3.3 DNA 分析による汚染源の確認

2 種類の培地による加工食品Bの汚染源探索においては、野菜洗浄場の床に加えて、作業場床(湿)も汚染源の候補として挙げられた。そこで、汚染源を特定するために、これらの場所から分離された大腸菌株が、加工食品Bと一致するか否か、DNA 分析により調べた。分析手法には Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) 法を用いた。本手法は、非常に高い細菌株の識別力を有することが知られている^{8)~10)}。食品から分離された大腸菌群株のRAPDパターンと環境中から分離された大腸菌群株のRAPDパターンとを比較照合することにより、汚染源の確認を行った。その結果を図 1 に示す。食品から分離された菌株のRAPDパターンは、野菜洗浄場床から分離された菌株のパターンとは一致したが、作業場床(湿)より分離された菌株とは一致しなかった。以上の結果から、加工食品Bの汚染源は野菜洗浄場の床であったことが確認され、作業場床(湿)は汚染源ではなかったということが示唆された。なお、加工食品Aについては、汚染源が成形加工機(乾)であるということがDNA解析からも確認された。

本研究では、大腸菌群の構成相分析に用いる培地の種類を 2 種類にしたときに、汚染源が特定できるか否かについて調べた。大腸菌群の構成相の分析に用いる培地の種類が増加すればするほど、

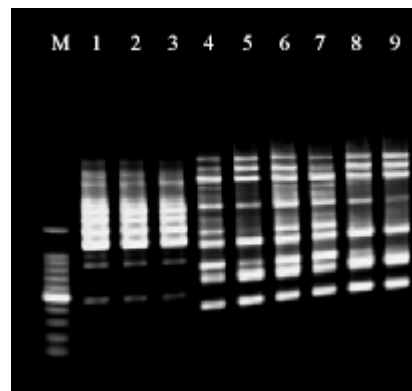


図1 RAPD 解析

M, マーカ-DNA 1-3, 作業場床(湿)・4-6, 野菜洗浄場床・7-9, 加工食品 B から分離された大腸菌群株の RAPD 電気泳動パターン(試料: 加工食品 B)。

大腸菌群グループの数も増加し、各々の食品や場所について、大腸菌群の構成相をより詳細に調べることが可能になる。これは、より確実な汚染源の特定につながることになる。しかしながら一方で、培地の種類の増加は解析時間増・コスト増・労力増を招き、本技術の実用化に際しては、望ましくない。2種類の培地による構成相分析でも、加工食品Aについては汚染源の特定ができた。加工食品Bについては、真の汚染源をふくむ複数の汚染源候補が示された。この場合も、DNAによる分析や培地の種類を増やした条件での分析⁴⁾をさらに行うことにより、その候補の中から、汚染源を特定できることが分かった。従って、2種類の培地による構成相分析を食品工場の日常の品質検査に導入することにより、食品から大腸菌群が検出された際、迅速かつ簡便に汚染源探索が遂行されるものと思われる。

大腸菌群は、食品や飲料水の汚染指標菌として、世界中で利用されている^{11),12)}。本技術が実用化されれば、それら様々な食品の汚染源追跡の手段として応用されることが期待される。

4 まとめ

(1) 大腸菌群標準菌株の識別

食品から頻繁に分離されると報告されている大腸菌群(10属 17種)について、DARLの資化性の相違を利用して、識別ができた。

(2) 簡便な大腸菌群構成相分析による汚染源の探索

2種類の培地による大腸菌群の2群化による構成相分析により、食品から分離された大腸菌群の汚染源の探索を行った。加工食品Aについては汚染源の特定に成功したが、加工食品Bについては、その候補の推定に成功した。

(3) DNA分析による汚染源の確認

食品から分離された大腸菌群株とその食品を製造した工場内各所から分離された大腸菌群株のRAPDパターンの比較から、培地により推定された大腸菌群の汚染原因箇所の妥当性が確認された。

謝辞

本研究を御指導いただきました東京大学大学院農学系研究科小柳津広志教授に深謝致します。

参考文献

- 1) Tortorello, M.L.: Indicator organisms for safety and quality-uses and methods for detection: minireview., *Microbiol. Methods*, **86**(2003)1208.
- 2) Gordon, D. M.: Geographical structure and host specificity in bacteria and the implications for tracing the source of coliform contamination., *Microbiology*, **147**(2001)1079.
- 3) Anderson, K. L, Whitlock, J.E., and Harwood, V. J.: Persistence and differential survival of fecal indicator bacteria in subtropical waters and sediments., *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**(2005)3041.
- 4) 富永達矢、本多春樹、関根正裕:食品製造工程における微生物検出技術の開発, 埼玉県産業技術総合センター研究報告, **4**(2006)72.
- 5) Stiles, M.E., and NG, L.-K.: Biochemical characteristics and identification of *Enterobacteriaceae* isolated from meats., *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**(1981)639.
- 6) Lindberg, A.-M., Ljungh, Å, Ahrné, S., Löfdahl, S., and Molin, G.: *Enterobacteriaceae* found in high numbers in fish, minced meat and pasteurized milk or cream and the presence of toxin encoding genes., *Int. J. Food Microbiol.*, **39**(1998)11.
- 7) Olsson, C., Ahrné, S., Pettersson, B., and Molin, G.: DNA based classification of food associated *Enterobacteriaceae* previously identified by Biolog GN Microplates., *System. Appl. Microbiol.*, **27**(2004)219.
- 8) Destro, M.T., Leitão, M.F.F., and Farber, J.M.: Use of molecular typing methods to trace the dissemination of *Listeria monocytogenes* in a shrimp processing plant., *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**(1996)705.

- 9) Giovannacci, I., Ragimbeau, C., Queguiner, S., Salvat, G., Vendevre, J.L., Carlier, V., and Ermel, G.: *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants: use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology., Int. J. Food Microbiol., **53**(1999)127.
- 10) Aslam, M., Greer, G., Nattress, F., Gill, C., and McMullen, L.: Genetic diversity of *Escherichia coli* recovered from the oral cavity of beef cattle and their relatedness to faecal *E. coli*., Lett. Appl. Microbiol., **39**(2004)523.
- 11) Burnes, B.S.: Antibiotic resistance analysis of fecal coliforms to determine fecal pollution sources in a mixed-use watershed., Environ. Monit. Assess., **85**(2003)87.
- 12) Garcia, L., Henderson, J., Fabri, M., and Oke, M.: Potential sources of microbial contamination in unpasteurized apple cider., J. Food Prot., **69**(2006)137.