

細菌構成相解析によるアドバンスドサニタリーシステムの開発 (3)

富永達矢*¹ 関根正裕*²

Development of the Bacterial Flora Based Advanced Sanitary System(3)

TOMINAGA Tatsuya*¹, SEKINE Masahiro*²

抄録

食品から乳酸菌が検出された際に、迅速簡便に汚染源を特定するため、4枚1組の乳酸菌フローラ解析用培地セットを開発し、分譲菌株と工場分離株を用いて有効性を検証した。7属16種21株の乳酸菌分譲菌株を対象にフローラ解析用培地上の生育パターンを調べたところ、21株は3グループに分画されることが分かった。3種類の惣菜、8種類の原材料、9種類の工場設備の乳酸菌フローラについて、当該培地を用いて調べたところ、各惣菜、原料、設備間のフローラ構成の違いを検出することができた。さらにフローラ間の類似性を数値評価することにより、各惣菜に対する乳酸菌の汚染源が推定された。

キーワード：食品衛生，乳酸菌，フローラ解析，汚染源探索

1 はじめに

調理済み加工食品の需要は、ライフスタイルの変化から年々増加している。これらの食品の製造工程では、種々の細菌が食品に混入し、品質劣化させる恐れがある。なかでも乳酸菌は防腐剤や次亜塩素酸ナトリウムなどの殺菌剤に対しても抵抗性があり、低温でも生育するため、チルド流通向け加工食品等でしばしば問題となる。乳酸菌が食品に混入すると、炭水化物を資化し、乳酸などの有機酸やデキストリン、炭酸ガスを生じる。これにより、食品の酸敗、異臭、粘質物生成、軟化、着色、包装容器の膨張等が引き起こされる¹⁾。このような場合、製造業者は工場内のあらゆる場所を清掃し、汚染源の駆除に努めるが、乳酸菌は工場内の様々な場所で繁殖しており、解決までに多大な労力と時間を要する。

乳酸菌とは、消費したブドウ糖に対して50%以上の乳酸を生成するカタラーゼ陰性のグラム陽性細菌と定義される12菌属からなる細菌の総称である²⁾。我々は、種特異的PCR法を用いた乳酸菌フローラの比較照合により乳酸菌の汚染源探索が可能であることを示した³⁾。しかし、この手法ではPCR装置をはじめとする高価な装置や専門的な知識や技術が必要なため、中小の食品工場への導入は難しかった。そこで、乳酸菌フローラ解析用の培地セットを開発し、食品工場の現場で簡便に汚染源探索を実施可能となる衛生管理システムの構築を試みた。

2 実験方法

2.1 菌株と培養条件

実験に使用した乳酸菌の分譲菌株を表1に示す。分譲菌株を前培養した後、滅菌済生理食塩水で適宜希釈した懸濁液 50 μl を MRS 培地(Difco)またはコージンバイオ(株)と共同開発したフローラ解析用培地セットに塗布し、アネロパック(三菱

*¹ 北部研究所 生物工学担当

*² 試験研究室 生産技術担当

ガス化学(株)を用いて 30℃にて 48 時間、嫌気培養を行った。

2.2 サンプリング

食品工場で採取した食材 10 g に対し、滅菌済生理食塩水 90 ml を加え、ストマッカーにて 30 秒間の懸濁処理を行い、その上清 50 μl を寒天培地表面に塗布した。工場内の食品製造設備や工場床表面の 10 cm × 10 cm に相当する面積を滅菌済綿棒(ふきふきチェック II : 栄研化学(株))にて拭き取り、10 ml の滅菌済生理食塩水に懸濁し、上清 50 μl を寒天培地上に塗布した。

2.3 フローラ解析法

乳酸菌フローラ解析用培地に生育した菌数を計数し、文献記載の方法に基づいて 4 グループの構成比(フローラ)を算出した⁴⁾。フローラ間の類似性は、クラスター分析によって評価した(EXCEL 多変量解析 Ver.5.0: (株)エスミ)。サンプル間の原データの距離はユークリッド距離を計算し、合併後の距離はWard法により計算した。

2.4 簡易同定

ゲノムDNAは核酸抽出キット(ISOPLANT kit: (株)ニッポンジーン)を用いて乳酸菌培養液から抽出した。16S rRNA遺伝子の部分配列(約 350 bp)の増幅は、過去の文献に準じて行った^{5), 6)}。プライマーM27F(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')・350R(5'-CTA CTG CTG CCT CCC GTA G-3')を遺伝子増幅に用いた。ゲノムDNA ~500 ng、プライマーM27F・350Rを各々 25 pmol、dNTPs 0.2 mM、ExTaq DNAポリメラーゼ(タカラバイオ(株) 2.5 ユニットを混合した。PCR反応は、94℃(3分)の後、94℃(30秒)・60℃(30秒)・72℃(30秒)を 30 サイクル、最後に 72℃(5分)の伸長反応を行った(Takara PCR Thermal Cycler Dice[®] Gradient: タカラバイオ(株))。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。PCR反応産物は精製した後、シーケンス反応に供した。解読された塩基配列について、GenBank/EMBL/DDBJ国際塩基配列データベースに対する相同性検索(BLAST)⁷⁾を行い、相同性値

(100%)を示した菌株名を分析株の種名と推定した。

3 結果及び考察

3.1 乳酸菌フローラ解析用培地の開発

これまで報告された文献によれば、農産加工製品の変敗品からは、*Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus fructivorans*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus acidilactici*等が検出されている¹⁾。また、発酵食品の変敗品からは、上記のほかにも*Pediococcus damnosus*等が検出されている¹⁾。畜水産加工食品の変敗品からは、*Enterococcus faecium*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sakei*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Weissella viridescens*等も検出されている¹⁾。このような情報を参考に、食品から分離された事例のある種を中心とした乳酸菌 7 属 16 種 21 株を選定した。

培地は、培地 I に全ての乳酸菌株が生育するように設計し、培地 II~IVの生育パターンから乳酸菌株を分画できるような組成を検討した。培地 I~IVにおける乳酸菌分譲菌株の生育パターンを表 1 に示す。調べた乳酸菌は全て、培地 I において生育した。また、大腸菌群などの乳酸菌以外の細菌の生育は抑制された。*Lactococcus* 属の 3 株、*Leuconostoc* 属の 4 株は培地 I のみで生育した(グループ 1)。*Carnobacterium* 属の 2 株、*Enterococcus* 属の 2 株は

表 1 分譲菌株の生育パターン

	培地			
	I	II	III	IV
<i>Carnobacterium divergens</i> NBRC 15683 ¹	○	○	○	×
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> NBRC 15684	○	○	○	×
<i>Enterococcus faecalis</i> NBRC 10048 ³	○	○	○	×
<i>Enterococcus faecium</i> NBRC 3555	○	○	○	○
<i>Lactobacillus brevis</i> IAM 1082	○	○	○	○
<i>Lactobacillus curvatus</i> NBRC 15884 ¹	○	○	○	○
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> IAM 1120	○	○	○	○
<i>Lactobacillus fructivorans</i> NBRC 13954 ¹	○	○	○	○
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> NBRC 3074	○	○	○	○
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> NBRC 15893 ¹	○	○	○	○
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NBRC 10093 ¹	○	×	×	×
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>hordniae</i> NBRC 100931 ¹	○	×	×	×
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NBRC 12007	○	×	×	×
<i>Leuconostoc citreum</i> JCM 9698 ¹	○	×	×	×
<i>Leuconostoc citreum</i> YK1	○	×	×	×
<i>Leuconostoc lactis</i> JCM 11052	○	×	×	×
<i>Leuconostoc lactis</i> YK2	○	×	×	×
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> NBRC 3832	○	○	○	○
<i>Pediococcus damnosus</i> NBRC 12220	○	○	○	○
<i>Weissella confusa</i> NBRC 3955	○	○	○	○
<i>Weissella confusa</i> YK13	○	×	×	×

各寒天培地上で生育がみられたものを○とし、生育が確認されなかったものを×とした。IAM: Institute of Applied Microbiology; JCM: Japan Collection of Microorganisms; NBRC: NITE Biological Resource Center; YK: 工場分離株。

培地 I ~ III で生育した(グループ 3)。 *Lactobacillus* 属の 6 株、 *Pediococcus* 属の 1 株は培地 I ~ IV、全ての培地で生育した(グループ 4)。 *Leuconostoc* 属でも *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* NBRC 3832 株だけは培地 I ~ IV に生育した(グループ 4)。 *Weissella confusa* は YK13 株が培地 I のみで生育したのに対し(グループ 1)、 NBRC3955 株は培地 I ~ IV に生育し(グループ 4)、株間で生育パターンがわかれた。培地 II で生育するが培地 III では生育しない株(グループ 2)は 1 株もなかったため、4 種類の培地を使用しているのにもかかわらず、乳酸菌は 3 グループにししか分類できなかった。

図 1 に 12 属の乳酸菌の各々の属の基準種と今回の試験で用いた乳酸菌種の 16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統樹を示す。培地 I ~ IV における生育パターンでグループ 4 に帰属された *Lactobacillus* 属、 *Pediococcus* 属がクラスターとしてまとまっている。また、グループ 3 に帰属された *Carnobacterium* 属と *Enterococcus* 属が 1 つのクラスターとしてまとまっている。試験に供した乳酸菌種が少ないため、一概には結論付けることができないが、今回の培地における乳酸菌株のグループ分けは、系統学的な分類にある程度対応しているものと考えられた。

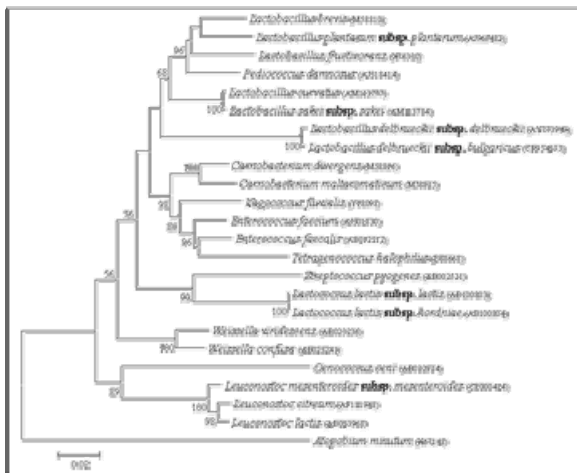


図 1 16S rDNA 遺伝子配列に基づく系統樹

Kimura の 2 変数距離⁸⁾をもとに、NJ 法⁹⁾を用いて作成した。()内は塩基配列の登録番号を示しており、図中の数値は 1000 回の再サンプリングに基づくブートストラップ値を表す。50%以上の数値を示したのもののみ表示した。

3.2 乳酸菌フロー解析用培地を用いたフィールド試験

コージンバイオ㈱と共同開発した乳酸菌フローラ解析用培地セットが実効的なものであるか検証するため、惣菜工場にてフィールド試験を行った。本工場では、様々な農畜産原料から複数の惣菜(惣菜 A・惣菜 B・惣菜 C)を製造している。工場施設の概略を図 2 に示す。製造工程上流に加熱工程があり、原料の加熱殺菌が充分になされるため、惣菜から乳酸菌が検出されるということは、加熱処理後のいずれかの場所から製品が汚染されたことを示す。そこで、前記乳酸菌フローラ解析用培地を用いて惣菜 A・惣菜 B・惣菜 C のフローラを調べ、原材料及び製造工程各所のフローラと比較した(表 2)。

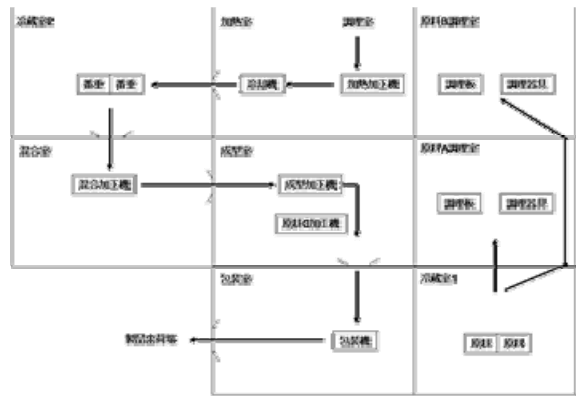


図 2 工場施設の概略

表 2 惣菜・原材料・製造設備のフローラ

サンプリング場所	サンプルの分類	各グループの構成比(%)			
		1	2	3	4
原料 A-1	原料	61	2	29	8
原料 A-2	原料	91	0	7	2
原料 A-3	原料	89	4	3	4
原料 B	原料	95	5	0	0
原料 C-1	原料	97	0	2	0
原料 C-2	原料	99	0	1	1
加工済原料 A-1	原料	68	6	0	26
加工済原料 A-1-2	原料	82	0	0	18
冷蔵庫1床	製造工程	64	0	17	19
原料 B 調理板	製造工程	96	0	2	1
冷却機	製造工程	99	0	0	0
加熱室1床	製造工程	99	0	1	0
原料 A 調理板	製造工程	100	0	0	0
冷蔵庫2床	製造工程	86	0	12	2
原料 A 成型機	製造工程	96	0	0	4
原料 C 加工機1	製造工程	100	0	0	0
原料 C 加工機2	製造工程	100	0	0	0
惣菜 A	製品	98	0	2	1
惣菜 B	製品	30	0	24	45
惣菜 C	製品	86	0	14	0

原料は素材により、大きく原料 A・原料 B・原料 C に分類される。原料 A および原料 C はさらに細分化され、原料 A-1~A-3、原料 C-1~C-2 と分類される。加工済原料 A-1~A-1-2 とは、原料 A-1 を加工したものである。

惣菜 A・惣菜 B・惣菜 C のうち、惣菜 A と惣菜 C では、グループ 1 に属する細菌が主要フローラを構成していたのに対し、惣菜 B では、グループ 4 に属する細菌が主要フローラを構成していた。このことから、惣菜 B の汚染源は他の惣菜と異なることが示唆された。原料 A-1・原料 A-2・原料 A-3 で比較すると、原料 A-1 のみ、グループ 3 に帰属される細菌が多かった。このように、各原料間・各製品間・各工場設備間のフローラ構成の相違を、乳酸菌フローラ解析用培地を用いて捉えることができた。なお、分譲菌株を用いた試験結果(表 1)と同様に、培地 II で生育するが培地 III では生育しない株(グループ 2)はほとんど確認されなかった。一方で、多くのサンプリング場所において、グループ 1 が分離株のうちの 90%以上を占めていた。各サンプリング場所間のフローラの違いをより顕著に把握するためには、グループ 1 とグループ 2~4 に帰属される細菌の構成バランスが極端にならないように培地成分を微調整する必要があると考えられた。しかし、今回の培地セットを用いた乳酸菌フローラ解析法においても、工場分離株は少なくとも 3 つのグループに帰属され、サンプリング場所や原料、製品間でのフローラの相違を確認することができた。

次に、フローラ間の類似性を評価し、各々の惣菜の汚染源を推測するためにクラスター分析を行った(図 3)。製品・原料・工場内設備のフローラから、大きく 4 つのクラスターが形成されることが分かった。惣菜 A・惣菜 B・惣菜 C はいずれも異なるクラスターに帰属した。

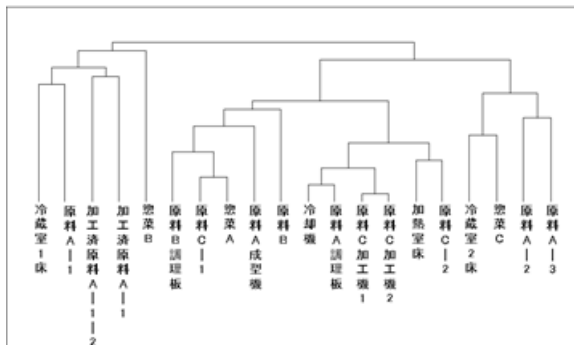


図3 クラスター分析

各サンプリング場所は表 2 に対応する。縦軸は各々のサンプリング場所間のフローラ類似性を表す。

表 3 工場分離株の簡易同定

分離源	培地	簡易同定された属種名	株数
惣菜B	I	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2
惣菜B	I	<i>Lactobacillus casei</i>	1
惣菜B	II	<i>Lactobacillus plantarum</i>	3
惣菜B	II	<i>Lactobacillus brevis</i>	1
惣菜B	II	<i>Enterococcus malodoratus</i>	1
惣菜B	III	<i>Lactobacillus plantarum</i>	4
惣菜B	III	<i>Lactobacillus sakei</i>	1
惣菜B	IV	<i>Lactobacillus plantarum</i>	5
原料B	I	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	3
原料B	I	<i>Weissella soli</i>	2

BLAST で最も高い類似度を示した種を属種名として表す。

惣菜 A と同一のクラスターを形成したサンプリング場所は原料 C-1 であった。両者の間の縦軸の目盛りは小さく、フローラは非常に類似していると考えられる。惣菜 B と同一のクラスターを形成したサンプリング場所は冷蔵室 1 床・原料 A-1・加工済原料 A-1・加工済原料 A-1-2 であった。このクラスターには原料 A-1 に関わるサンプリング場所が全て帰属しており、惣菜 B の汚染源は豚肉関連の場所であることが強く示唆される。しかし、惣菜 B と各サンプリング場所とで縦軸の目盛りは大きく、原料 A-1 処理工程の関連でサンプリングすべきほかの場所が存在していたことが考えられる。惣菜 C と同一のクラスターを形成したサンプリング場所は冷蔵室 2 床であった。このクラスターには原料 A-2 や原料 A-3 などが帰属しており、惣菜 C の汚染源がこれらの原料に関連していることが示唆される。

3.3 工場分離株の簡易同定

工場分離株が乳酸菌であるか、乳酸菌であるならどのような種であるか確認するために、惣菜 B 分離株のうち培地 I ~IV に生育した株を各培地から数株、原料 B 分離株のうち、培地 I に生育した株を数株、培養後 DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子の部分配列から簡易同定を行った(表 3)。いずれの分離株も乳酸菌であった。惣菜 B の分離株は *Lactobacillus* 属 4 種、*Enterococcus* 属 1 種に帰属された。培地 I から IV に至るまで順次、乳酸菌の生育制限が厳しくなるように培地セットは設計されている。培地 I から順に順次 *Lactobacillus plantarum* の構成比が上昇していったのは、このことを反映しているのかもしれない。原

料 B の分離株は *Leuconostoc* 属と *Weissella* 属であった。惣菜 B と原料 B とでは乳酸菌分離株の属種が全く異なっていた。クラスター分析の結果では、惣菜 B は原料 A-1 処理工程の関連から汚染されていたことが示唆されたが、同定試験の結果はこのことと一致する。本工場の汚染は、原料 A から持ち込まれた乳酸菌が工場内に拡散していったものと、原料 B あるいは原料 C から持ち込まれた乳酸菌が工場内に拡散していったものと、大きく 3 つにわかれ、工場内施設図面がゾーン分けできると推測される。ゾーン分けができれば、優先順位をつけた清掃が可能となり、労力を大幅に削減する効果が得られる。

惣菜から乳酸菌が検出された場合、その惣菜が Hazard Analysis (and) Critical Control Point (HACCP) の考え方に基づいて製造されているならば、CCP のモニタリングの記録から、加熱処理が適切に行われていたか否かについては検証できる¹⁰⁾。しかし、加熱処理後の工程で乳酸菌が混入した場合には、それがどこから混入したのかを検証する手段がなかった。これまでに我々は、種特異的 PCR 法による乳酸菌フローラに基づく汚染源探索手法を開発したが、高価な PCR 装置等を要し、食品工場の現場では使用できなかった³⁾。

開発した乳酸菌フローラ解析用培地は、特殊な装置や技術を必要せずに、優先的に駆除すべき汚染箇所について手がかりを得ることができる。さらにフィールド試験を重ね、性能改善した上で、本培地及び汚染源探索手法を普及させていきたい。

4 まとめ

- (1) 7 属 16 種 21 株の乳酸菌分離株を対象に乳酸菌フローラ解析用培地を設計したところ、分離株は 3 グループに分画されることが分かった。
- (2) 3 種類の惣菜、8 種類の原材料、9 種類の工場設備の乳酸菌フローラについて、本培地を用いて調べたところ、各惣菜、原材料、設備間のフローラの相違を捉えることができた。
- (3) クラスター分析の結果、各惣菜で異なる汚染源が存在することが示唆された。

- (4) 分離株の簡易同定から、原材料や惣菜には *Enterococcus* 属・*Lactobacillus* 属・*Leuconostoc* 属・*Weissella* 属と多様な乳酸菌が存在することが分かった。

謝 辞

サンプリングを行わせていただいた企業の皆様に深謝致します。また、本研究を進めるにあたり、客員研究員として御指導いただきました東京大学大学院小柳津広志教授に感謝の意を表します。

参考文献

- 1) 内藤茂三: 乳酸菌による食品の変敗現象とその防止対策, 醤研, **33**(2007)257.
- 2) (社)日本食品衛生協会: 食品衛生検査指針微生物編, (2004).
- 3) 富永達矢、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, **6**(2008)74.
- 4) 関根正裕: マイクロフローラ解析によるアドバンスドサニタリーシステムの開発, *New Food Industry*, **52**(2010)1.
- 5) Klijn, N., Weerkamp, A. H., and de Vos, W. M.: Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16S rRNA and specific DNA probes., *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**(1991)3390.
- 6) Mori, K., Yamazaki, K., Ishiyama, T., Katsumata, M., Kobayashi, K., Kawai, Y., Inoue, N., and Shinano, H.: Comparative sequence analyses of the genes coding for 16S rRNA of *Lactobacillus casei*-related taxa., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **47**(1997)54.
- 7) Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J., Basic local alignment search tool., *J. Mol. Biol.*, **215**(1990)403.
- 8) Kimura, M.: A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through

- comparative studies of nucleotide sequences., J. Mol. Evol., **16**(1980)111.
- 9) Saitou, N., and Nei, M.: The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees., Mol. Biol. Evol., **4** (1987)406.
- 10) 新宮和裕: HACCP 入門, (財)日本規格協会 (2004).