

## 安全・安心な食品製造工程の管理技術の確立

### —食中毒菌の迅速検出技術の開発—

富永達矢\*<sup>1</sup> 常見崇史\*<sup>1</sup> 関根正裕\*<sup>2</sup>

## Establishment of management techniques of a safe and secure food manufacturing process

### —Development of rapid detection method of food-borne pathogen—

TOMINAGA Tatsuya\*<sup>1</sup>, TSUNEMI Takashi\*<sup>1</sup>, SEKINE Masahiro\*<sup>2</sup>

#### 抄録

食中毒菌の迅速検出を目的にイムノクロマト法の高機能化を目指した。試作品で定量性を調べたところ、O157の菌数が $5 \times 10^2 \sim 4 \times 10^3$  cfuの範囲であるとき、定量性がみられた。エルシニア菌・黄色ブドウ球菌・リステリア菌も可能となり、1枚の試験紙でこれらとO157、併せて4種類の細菌を同時に検出することに成功した。遠心濃縮法を前処理に用いることで、感度が向上し、野菜および肉の懸濁液に $10^2$  cfu/mLとなるように添加したO157を検出できた。

キーワード：食品衛生，食中毒菌，迅速検出，イムノクロマト法，抗体

## 1 はじめに

2012年に北海道で起きた腸管出血性大腸菌O157:H7(以下O157)による食中毒では、原因食品が札幌市を中心とする広い地域へ流通していたため、広範囲にわたり患者が発生した<sup>1)</sup>。こうした食中毒は、O157に限らず、黄色ブドウ球菌やエルシニア菌、サルモネラ菌など多くの種類の食中毒菌により引き起こされ、昨年だけで360件近くの細菌性食中毒の発生事例が報告されている<sup>2)</sup>。

食品製造者は、このような食中毒の発生を未然に防止するため、製品に食中毒菌が混在していないか検査する必要がある。食中毒菌の検出法として、培養法やPCR法が知られる<sup>3)</sup>。しかし、前者は培養に長時間を要し、出荷前に結果を得られないこともある。後者は専用装置を要するため、製造現場への導入が困難である。

近年、普及が進んでいる技術にイムノクロマト法がある<sup>4)</sup>。抗体は特定の細菌とのみ結合することを利用し、食品懸濁液中に対象菌が存在した場合、試験紙上の抗体を塗布した位置にラインが現れる仕組みになっている。検出までに要する時間は10～30分程度であり、特殊な装置を必要としない。しかし、検出感度が低く、被検液の前培養を必要とするため、イムノクロマトの高感度化による前培養時間の短縮が望まれていた。

昨年の研究で、従来の100倍以上のO157の検出感度を達成した<sup>5)</sup>。本年度は、本手法による定量性およびO157以外の細菌の検出を試験した。また、遠心濃縮によるさらなる高感度化を図り、実際の食品懸濁液でO157の検出を試みた。

## 2 実験方法

### 2.1 材料

被検菌として、*Escherichia coli* O157:H7(O157)、*Yersinia enterocolitica*、

\*<sup>1</sup> 北部研究所 食品・バイオ技術担当

\*<sup>2</sup> 技術支援室 戦略プロジェクト推進担当

*Staphylococcus aureus*、*Listeria monocytogenes* の加熱殺菌菌体を使用した。O157 の検出にはポリクローナル抗体(ヤギ)、モノクローナル抗体(マウス)を用い、それ以外の細菌についてはポリクローナル抗体(ヤギまたはウサギ)を使用した(フナコシ社)。溶液滴下部、クロマト展開部、溶液吸収部に使用したグラスファイバー、セルロースファイバーは前年同様のものである<sup>5)</sup>。

## 2.2 試作および評価

イムノクロマト試験紙の作製は前年同様に行った<sup>5)</sup>。抗体の標識にパラジウムを使用した。試験終了後、クロマト展開部の画像をスキャナー(キヤノン社 MX893)にて 600 dpi の解像度で取得し、ピーク面積から菌体検出の有無を評価した。

## 2.3 食品への添加試験

野菜、肉、乳製品を 10 g 秤量し、90 mL の滅菌済生理食塩水を加えた。その溶液に O157 菌体を  $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$  cfu/mL となるように添加し、30 秒間ストマッカー装置にて均質化した。 $10^4$ 、 $10^3$  cfu/mL 添加サンプルについては、上記懸濁液を試験紙に展開した。 $10^2$  cfu/mL 添加サンプルについては、10 mL を遠心処理(1 mL ずつ 10 回、各回 13,000 rpm、1 分)により濃縮し、濃縮後の溶液を試験紙に展開した。

## 3 結果及び考察

### 3.1 定量性試験

これまでは、検出ラインの有無からサンプル溶液中のO157の有無を判断する定性的な試験を行ってきた。この際、滴下する菌数を減らすにつれ、検出ラインの濃度が薄くなり、ピークが小さくなる現象が見られた。このことから、イムノクロマト法でも定量的な試験が可能であると考えられた。どの程度の菌数範囲で定量性があるか調べるため、 $5 \times 10^2 \sim 1 \times 10^4$  cfuのO157の菌体量を展開したクロマト試験紙でピーク面積を算出した(図1)。菌数が $1 \times 10^4$  cfuになると、シグナルの飽和が示唆された。しかし、 $5 \times 10^2 \sim 4 \times 10^3$  cfuの範囲では、菌数とピーク面積との間で高い相関性(相関係数

= 0.9763)がみられた。イムノクロマト法でも、検出対象が一定の濃度範囲であれば定量性があることを確認できた。

イムノクロマト法は、一般的に、対象の有無を確認する定性的な試験である。これに対し、生育した菌数を数える培養法やDNA量を増幅しながら検出するリアルタイムPCR法は定量的な試験が可能である。培養法ではシャーレあたり 30 ~ 300 cfuの菌数が得られたときに計数するとされる。このときの定量範囲の上限/下限は  $10(=300/30)$  となる。本試験で、イムノクロマト法も一定の菌数範囲で定量が可能であることが分かった。このとき、定量範囲の上限/下限は  $8(=4000/500)$  であり、培養法とほぼ同等であった。一方、リアルタイムPCR法では、非常に広い希釈範囲で定量性があるとされる。大腸菌群の事例であるが、原液~ $10^4$ 倍希釈で定量性があり、定量範囲の上限/下限値は10,000と算出された<sup>6)</sup>。定量範囲の広さについては、リアルタイムPCR法が3つの手法の中では最も優れていると考えられる。イムノクロマト法において、定量範囲を広げるには、検出対象が高濃度に存在するときにシグナルを飽和させずに検出する必要がある。検出に用いるスキャナーの種類を変更したり、あるいは光学的手法以外の方法を検討したりすることが考えられる。

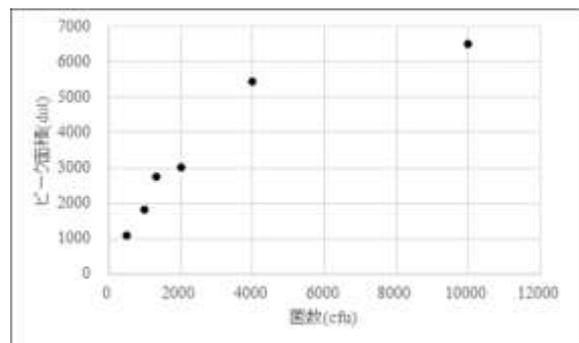


図1 定量性試験

菌数とピーク面積との関係。

### 3.2 検出対象菌の拡大

食材により、混入が懸念される細菌の種類は異なるものの、その種類は通常複数ある。たとえば、食肉から検出されうる食中毒菌としては、O157などの病原性大腸菌、サルモネラ菌、カンピロバクター菌、黄色ブドウ球菌、リステリア菌、エルシニア菌、ウェルシュ菌などが挙げられる<sup>7)-10)</sup>。したがって、品質検査においては、O157のみならず、上記各細菌の混入の有無も確認する必要がある。これまで開発してきた手法でO157以外の菌にも適用可能か調べたところ、*Y. enterocolitica*、*S. aureus*、*L. monocytogenes*をそれぞれ検出できた。そこで、1枚の試験紙上にO157、*Y. enterocolitica*、*S. aureus*、*L. monocytogenes*の抗体を固定化し、4種を同時に検出できるか試みた。図2(A)に示すとおり、4種の同時検出に成功した。ただし、ピーク面積は各々単独に試験したときと比較して、34～89%に減少した(図2(B))。

複数種類の細菌について、培養法で検査を行う場合、それぞれの細菌種に対応した培地を用い、各々の細菌に適した条件で培養する必要がある。たとえば、O157については、CT-SMAC寒天培地等で35～37℃にて18～24時間培養する<sup>3)</sup>。リステリア菌については、Oxford寒天培地等で30～35℃にて24～48時間培養する<sup>3)</sup>。カンピロバクター菌はSkirrow培地等で42℃にて48～72時間微好気培養する<sup>3)</sup>。

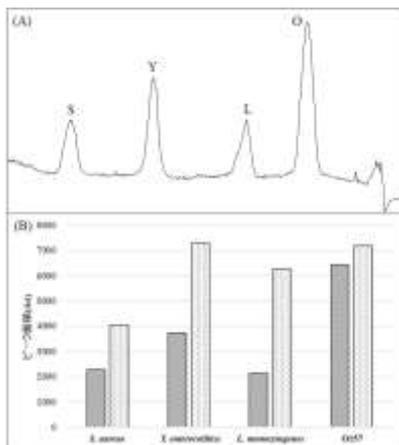


図2 4種類の細菌の同時検出

(A) 4種の同時検出, (B) 斜線:同時検出時,点:単独検出時。

同様に、複数種類の細菌について、PCR法で検査を行う場合、細菌の属種により用いるプライマーやPCRプロトコルが異なるため、細菌の種別ごとに別個に試験を行う。検出対象となる細菌の種類が増えるほど、培養法やPCR法では時間が増大する。今回、1枚の試験紙で4種類の細菌を同時に検出することに成功した。試験紙に塗布する抗体の種類はさらに増やせるため、1枚で10種の検出も可能性として考えられる。ただし、今回の試験のように、対象菌数が増えるほど、検出感度が低下する可能性も否めない。このような解決すべき課題は残るものの、大幅な検査時間短縮につながり、食品製造の現場に本手法を普及するためには適用菌の拡大が望まれる。

### 3.3 遠心濃縮

これまでの試験では、O157の検出下限は $10^3$  cfuであり、このとき展開した溶液量は0.2 mL(=  $5 \times 10^3$  cfu/mL)であった。前処理により、O157のサンプル溶液を濃縮し、その濃縮液をクロマト展開すれば、みかけの感度は向上できる。そこで、 $10^3$  cfu/mLの溶液1 mL分を遠心処理により濃縮し、濃縮液を全量、試験紙に展開した。その結果、約1600 dotのピーク面積が得られた(図3)。遠心の際、加速・減速をゆるやかにしたサンプルが、図中1 mL-2と記載されたものである。ピーク面積は約1600 dotであり、加速・減速の度合いによる集菌への影響はみられなかった。 $10^3$  cfu/mLの溶液2 mL分を濃縮した際のピーク面積は、約1200 dotであった。遠心チューブに付着し、濃縮液に回収できなかった菌体量が1 mL分を遠心処理した際よ

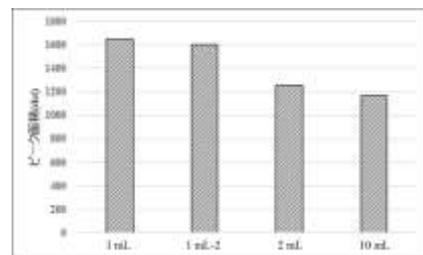


図3 遠心濃縮試料による分析結果

遠心前の溶液量を表記。1mL-2は遠心条件を変更した。

りも多かった。遠心処理に供する溶液量が増えるほど、遠心チューブのサイズも大きくなり、菌体量のロスも多くなると推測された。そこで、 $10^3$  cfu/mLの溶液10 mL分を遠心する際には、1 mLずつ10回に分けて処理することとした。その結果、約1200 dotのピーク面積を得ることができた。

遠心をすれば、処理1回につき数分の時間を要する。処理の回数が増えるほど、イムノクロマト法の長所である迅速性を損なう。しかし、今回、 $10^3$  cfu/mLの溶液10 mL分(= $10^2$  cfu/mL)の菌液を検出でき、みかけの感度が10倍向上したこととなる。遠心処理に要する時間は総計15 ~ 20分程度であるので、時間によるデメリットよりも感度によるメリットのほうが大きいと判断した。

### 3.4 食品試験

本研究により構築した手法が実際の食品検査に適用できるか調べるため、野菜・肉・乳製品にO157を添加し、懸濁液を試験紙上に展開した(図4)。O157を $10^4$  cfu/mLとなるように添加した野菜および肉サンプルでは、野菜で約7500 dot、肉で約5500 dotのピーク面積が得られ、十分に検出できた(図5)。 $10^3$  cfu/mLとなるようにO157を添加した際、野菜で約700 dot、肉で約1500 dotと、 $10^4$  cfu/mLのときよりもピーク面積は激減するものの

検出することができた。乳製品の懸濁液は試験紙上にほとんど展開されず、ピーク検出ができなかった。さらに、 $10^2$  cfu/mLの濃度でも検出できるか野菜および肉の懸濁液で調べた。懸濁液は10 mL分を遠心して濃縮した。試験紙上に展開したところ、懸濁液を全量展開することはできなかったが、微小なピークが検出され、野菜で約450 dot、肉で約550 dotのピーク面積を示した。

遠心処理は、菌液濃度が希薄なときは濃縮の手段として有効である。しかし、食品の懸濁液では、食品残渣も併せて濃縮されてしまう。このため、試験紙の目詰まり等が引き起こされ、懸濁液を全量展開できなかったと考えられる。食材により、遠心で処理できる溶液量には制限があるといえる。また、食品懸濁液は水溶液と比べて感度は下がる傾向があった。食品残渣を完全に除去できなかったことに起因すると推測される。多糖類やタンパク質により粘性が上がり、試験紙上に展開しにくくなった可能性がある。また、タンパク質が抗原抗体反応を妨害した可能性もある。今回、野菜と肉の懸濁液については、O157の検出に成功したが、乳製品の懸濁液では失敗した。上記要因によると思われる。食材ごとに前処理の手法を検討する必要がある。

今回、 $10^2$  cfu/mLの濃度以上O157が食品懸濁液中に存在すれば検出できるシステムを構築した。培養法では、菌液濃度が1 cfu/mLでも菌を検出でき、PCR法では、 $10 \sim 10^2$  cfu/mL程度の菌液濃度があれば、対象菌を検出できる。

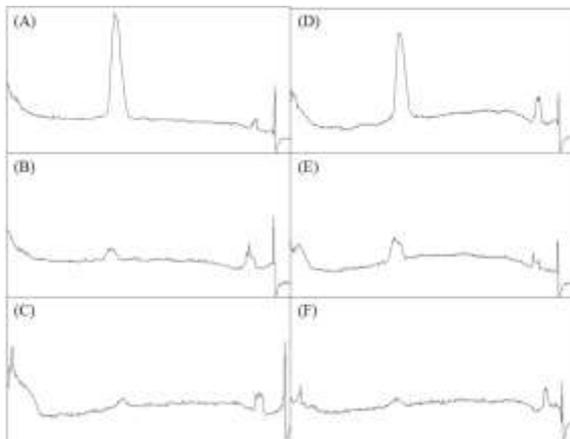


図4 食品への添加試験

(A) 野菜 O157  $10^4$  cfu/mL添加, (B) 野菜 O157  $10^3$  cfu/mL添加, (C) 野菜 O157  $10^2$  cfu/mL添加, (D) 肉 O157  $10^4$  cfu/mL添加, (E) 肉 O157  $10^3$  cfu/mL添加, (F) 肉 O157  $10^2$  cfu/mL添加。

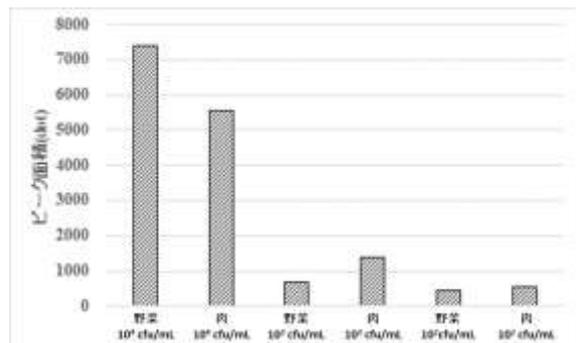


図5 食品への添加試験の定量解析

これらの手法と比べると、イムノクロマト法の感度はまだ低く、感度不足を補うための培養が必要になる。しかし、従来のイムノクロマト法では18～24時間の前培養を必要としたが、この時間を短縮できた。大腸菌の世代時間から推定すると、食品1gあたり1cfuしかO157が混入していないとしても、5時間程度の前培養で検出できることになる。遠心操作からクロマト試験紙上へ溶液を展開し、分析結果を得るまでに半日あれば可能となる。現状の食品検査技術では、製造したその場で出荷前には検査結果を得られない。そのため、商品が広く流通してしまい、食中毒による被害も甚大になってしまう。研究途上ではあるが、イムノクロマト法は「食品を製造したその場で、出荷前に」結果を得られる可能性が示された。

#### 4 まとめ

- (1) O157の菌数が $5 \times 10^2 \sim 4 \times 10^3$  cfuの範囲であるとき、定量性がみられた。
- (2) 1枚の試験紙で4種類の細菌(O157・*Y. enterocolitica*・*S. aureus*・*L. monocytogenes*)を同時に検出することに成功した。
- (3) 遠心処理でサンプル溶液を濃縮することにより、 $10^2$  cfu/mLのO157を検出できた。
- (4) 野菜および肉に $10^2$  cfu/mLとなるように添加したO157を検出できた。

#### 参考文献

- 1) 坂本裕美子, 廣地敬, 大西麻実, 伊藤はるみ, 高橋広夫, 宮北佳恵, 細海伸仁, 片岡郁夫, 久保亜希子, 池田徹也, 小川恵子, 長瀬敏之, 森本洋, 清水俊一, 伊豫田淳, 寺嶋淳: 白菜浅漬による腸管出血性大腸菌 O157 食中毒事例について—札幌市, *IASR*, **34**, (2013) 126
- 2) 厚生労働省, <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html>, 2014.3.14
- 3) (社)日本食品衛生協会: 食品衛生検査指針 微生物編, (2004)
- 4) Fratamico, P. M. and Bagi, L. K. : Comparison of

- an immunochromatographic method and the TaqMan<sup>®</sup> *E. coli* O157:H7 assay for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in alfalfa sprout spent irrigation water and in sprouts after blanching, *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.*, **27**, (2001) 129
- 5) 富永達矢, 常見崇史, 関根正裕: 安全・安心な食品製造工程の管理技術の確立, 埼玉県産業技術総合センター研究報告, **11**, (2013) 8
  - 6) 富永達矢, 関根正裕: 遺伝子検出による迅速微生物解析技術の開発, 埼玉県産業技術総合センター研究報告, **9**, (2011) 30
  - 7) Rangel, J. M., Sparling, P. H., Crowe, C., Griffin, P. M., and Swerdlow, D. L.: Epidemiology of *Escherichia coli* O157: H7 outbreaks, United States, 1982-2002, *Emerging infectious diseases*, **11**, (2005)
  - 8) Le Loir, Y., Baron, F., and Gautier, M.: *Staphylococcus aureus* and food poisoning, *Genet Mol Res*, **2**, (2003) 63
  - 9) Ryser, E. T., and Marth, E. H.: *Listeria*, listeriosis, and food safety, CRC Press, (2007)
  - 10) Rahman, A., Bonny, T. S., Stonsaovapak, S., and Ananchaipattana, C.: *Yersinia enterocolitica*: Epidemiological studies and outbreaks, *Journal of pathogens*, (2011)