

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

富永達矢*

Development of Tracing Technology of Contamination Source in Food by Coliform Flora Analysis

TOMINAGA Tatsuya*

抄録

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により、検出率は100%に達した。菌の分離工程を省略し、直接食肉の大腸菌群を検出できるか調べたところ、10万/g以上の大腸菌群に汚染されていた食肉で検出できた。1枚の紙に4種類の抗体を固定し、食肉と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。

キーワード：大腸菌群，試験紙，食品汚染

1 はじめに

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¹⁾。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。

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²⁾。 *Citrobacter* 属、 *Enterobacter* 属など多くの腸内細菌科の菌を中心に構成される。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。これは、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が、専用装置を必要とするうえ結果を得るまでに数時間を要していた。

そのため、食品製造現場では、さらに迅速に結果を得られる手法の開発が望まれていた。

そこで、本研究では、15分で大腸菌群を検出可能なイムノクロマト試験紙の開発を目指した。

2 実験方法

2.1 試験に用いた菌株

食肉、菓子、惣菜等の食品から分離された大腸菌群を55株用いた。これらの株はLB培地を用いて37℃にて好氣的に一晩、培養した。

2.2 試験紙の構築

食肉から検出されることの多い *Aeromonas* 属、 *Citrobacter* 属、 *Enterobacter* 属、 *Hafnia* 属、 *Klebsiella* 属、 *Raoultella* 属、 *Pantoea* 属、 *Serratia* 属を対象に7種類の試験紙を構築した。以降、 *Aeromonas* 属を検出する試験紙による分析をA-LFAと略し、この略記法を本属以外にも適用する。

*北部研究所 食品・バイオ技術担当

2.3 食品試験

20種類の食肉(牛、豚、鶏)を購入し、37°Cにて8時間保温した。これらの食肉ならびに保温していない食肉 10g に 90mL の生理食塩水を加えてストマッカーで 30 秒間懸濁し、遠心処理を行った後、菌体を加熱処理し、試験紙へ展開した。菌数の測定は、XM-G 寒天培地(日水製薬㈱)を用いて行った。

3 結果及び考察

3.1 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、標的とした属を検出することができた。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)。

3.2 感度試験

各々の LFA の感度を調べた。A-LFA では 10^6 cfu 以上、S-LFA では 10^4 cfu 以上、それ以外の LFA では 10^5 cfu 以上の大腸菌群が試験紙に滴下した溶液中に存在するとき、陽性と判断された。

3.3 食品試験

実際の食品から大腸菌群を分離することなく検出することが可能か、20種類の食肉を用いて調べた。食肉を保温せずに 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 $8.2 \times 10^4 \sim 4.3 \times 10^6$ (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： $1.0 \times 10^2 \sim 1.9 \times 10^4$ [cfu/g])。8時間保温後は、すべての食肉で LFA 陽性を示した(大腸菌群数： $2.4 \times 10^5 \sim 2.4 \times 10^7$ [cfu/g])。 10^5 cfu/g 以上の大腸菌群で食肉が汚染されていた場合、試験紙で検出できることが分かった。

3.4 フローラ解析

大腸菌群フローラとは、大腸菌群を構成する各

表 1 食品分離株の検出率

陽性率 (%)	-LFA							総合 ^a
	A	C	E	H	KR	P	S	
55 株すべてについて 7 種類の LFA を行い、LFA の種類ごとに陽性率を計算した。	53	58	76	71	67	38	69	100

^a: 7種類の LFA のうちいずれかで陽性となった場合、陽性とした。

属の細菌の存在割合のことである。1枚の紙上で4種類(C-, E-, H-, S-LFA)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4種類すべての属に対し、陽性シグナルが得られたが、菓子では2種類(E-, S-LFA)のみで陽性であった。豚肉と菓子のフローラの違いを捉えることができた。

大腸菌群フローラは、食品の種類や製造工場内の環境ごとに異なることが知られる。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、食品の汚染源候補を推定できることが示唆されている³⁾。今後、今回、開発した試験紙を用いて、汚染源探索が可能であるか実際の工場にて検証する必要がある。

4 まとめ

(1) 食品分離株の検出

7種類の試験紙を組み合わせることにより、55株すべての大腸菌群を検出できた。

(2) 感度試験

$10^4 \sim 10^6$ cfu 以上の大腸菌群を試験紙に展開したとき、対象を検出可能であった。

(3) 食品試験

10^5 cfu/g 以上の大腸菌群で食肉が汚染されていた場合、試験紙で検出できた。

(4) フローラ解析

1枚の紙上で豚肉と菓子の大腸菌群フローラを解析し、両者の違いを捉えることができた。

謝辞

本研究を進めるに当たり、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農学生命科学研究科の石井正治教授に感謝の意を表します。なお、本研究は JSPS 科研費 JP16K21635 の助成を受

けて実施したものです。

参考文献

- 1) 厚生労働省, 食中毒統計資料, (2015)
- 2) (社)日本食品衛生協会: 食品衛生検査指針 微生物編, (2015)
- 3) 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.