



Title	蛍光染色法による飲食品の迅速な衛生微生物学的評価
Author(s)	北口, 晴子
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45672
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	北口暁子
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第19431号
学位授与年月日	平成17年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科生命情報環境科学専攻
学位論文名	蛍光染色法による飲食品の迅速な衛生微生物学的評価
論文審査委員	(主査) 教授 那須正夫 (副査) 教授 田中慶一 教授 西原力 教授 宮本和久

論文内容の要旨

現在、飲食品の細菌検査には一般的に培養法が用いられている。培養法は微生物学において基本的な手法であり、飲食品以外の分野においても微生物学的な安全性を評価する手段として広く利用されている。しかしながら、一般的な培養法では結果を得るまでに数日を要するため、消費期限の短い飲食品では検査前出荷をしなければならない場合もあり、迅速に細菌を検出できる検査法が求められている。また、培養法は飲食品に存在する細菌数を正確に把握できない場合がある。これは、培地や温度などの培養条件が細菌にとって適切でない場合には、細菌を検出できないためである。また、多くの細菌は何らかの刺激を受けた場合に、培養困難な状態に陥ることが報告されており、飲食品の製造過程においても加熱などの処理により、細菌の増殖能力が低下する場合がある。そのため、より正確に細菌を検出できる検査法が求められている。

食品の細菌検査においては、菌種や菌数を知るだけでなく、その細菌の生死を把握することが重要である。これは、飲食品に生きている細菌が存在した場合には、飲食品の品質の劣化や食中毒を引き起こす原因となる場合があるためである。そこで、本研究では飲食品中の対象とする特定細菌を迅速かつより正確に定量し、同時にその細菌の生死を判別することを目的として、2つの手法について検討した。特に、飲食品には様々な成分が含まれているため、これらの食品成分により細菌の検出が阻害されることも多く、細菌の定量は困難な場合がある。そこで本研究では、タンパク質や脂質などが比較的多く含まれる牛乳を試料として選択し、各操作過程の条件の最適化を図ることにより標的とする細菌を定量した。

まず、1つ目の手法として、対象とする細菌を特異的に検出できる蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (fluorescence *in situ* hybridization ; FISH) 法と細菌の呼吸活性の有無を評価できる 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC) 染色法に基づく CTC-FISH 法について検討し、牛乳の主な腐敗菌であるショードモナス属菌を迅速かつ正確に定量し、同時に個体単位でその呼吸活性の有無を判断することを試みた。各操作過程の条件を最適化することで、牛乳中の呼吸活性を有するショードモナス属菌を特異的に定量できた。そこで、本手法と一般的な培養法により試料中の細菌数を求め、計数値および検出に要する時間を比較した。牛乳には様々な状態の細胞が存在していると考えられるため、定常期および PBS 中、4°C の貧栄養環境に数日間曝すことにより生理活性を有するにもかかわらず通常の培養法では培養困難な状態に陥った *P. putida* を牛乳に添加して比較した。その結果、定常期の *P. putida* を牛乳に添加した場合には、その計数値は両方法で同等であったのに対し、貧栄養環境に曝した *P.*

putida を用いた場合には CTC-FISH 法のみで検出できた。また、CTC-FISH 法では 6 時間以内に検出できたが、培養法では 2 日を要した。以上のことから、本手法により、培養操作に依存することなく迅速かつ正確に、牛乳から呼吸活性を有する対象の細菌を定量することを可能にした。

次に、2 つ目の手法として、FISH 法と細菌の増殖活性の有無を評価できるマイクロコロニー法に基づく MC-FISH 法について検討した。牛乳からシードモナス属菌と飲食品の微生物汚染の指標となる腸内細菌科の細菌を同時に迅速に定量し、さらに、その増殖活性の有無を判断することを目的として各操作過程での条件の最適化を図った。その結果、牛乳中の増殖活性を有するシードモナス属菌および腸内細菌科の細菌を同時に定量できた。また、本手法と一般的な培養法において、計数値および検出に要する時間について比較したところ、対数増殖期および定常期の細菌を牛乳に添加した場合には、その計数値は両方法で同等であった。これに対し、貧栄養環境に曝した細菌を用いた場合には、MC-FISH 法による計数値は培養法による値を上回った。検出に要する時間は、MC-FISH 法では 5~8 時間であったのに対し、培養法では約 2 日を要した。以上のことから、本手法により、一般的な培養法より迅速かつ正確に増殖活性を有する対象の細菌を検出し、複数種の細菌を同時に定量することを可能にした。さらに、牛乳からタンパク質や脂質を除去することにより、牛乳の濃縮が可能となったため、定量限界を向上できた。

CTC-FISH 法および MC-FISH 法のいずれにおいても、細菌の検出に影響を与えるタンパク質や脂質を多く含む牛乳から対象とする細菌を定量でき、これらの手法は他の飲食品にも応用可能であると考えられる。また、本研究ではシードモナス属菌および腸内細菌科の細菌を対象としたが、他の細菌に特異的なプローブを用いることにより、多くの細菌に応用可能であり、プローブの標識色素を選択することにより、より多種の同時検出が可能であると考えられる。今後、CTC-FISH 法や MC-FISH 法の実用化にあたっては、労力の軽減や計数者による個人差の排除、迅速化のために、自動計数装置の併用が有効である。今回検討したこれらの手法を標準化することにより、飲食品の微生物学的な安全性を向上できると考えられる。

論文審査の結果の要旨

飲食品の微生物検査においては、存在する細菌の現存量や種類に加え、その生死を把握することが重要である。しかしながら、現在広く用いられている培養法では現存量を過小評価する、また、結果を得るまでに時間を要するという課題が明らかになってきている。そこで申請者は、飲食品中の生理活性を有する汚染細菌を迅速、より正確に定量することを目的とし、細菌の検出に影響を与えるタンパク質や脂質を比較的多く含む牛乳をモデル試料として、2 種の細菌検出法について検討した。生理活性の指標としては、呼吸活性および増殖能に着目した。

まず、細菌の 16S リボソーム RNA の塩基配列に基づいて標的の細菌を検出できる蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 法と、細菌の呼吸活性の有無を評価できる 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride 染色法を選択し検討した結果、牛乳から呼吸活性を有するシードモナス属菌を 6 時間以内に特異的に定量することを可能にした。次に、FISH 法と細菌の増殖能の有無を評価できるマイクロコロニー法に着目し、複数種の細菌を標的とした。その結果、増殖能を有する腸内細菌科の細菌とシードモナス属菌の同時定量を可能にした。両手法を最適化することにより、生理活性を有する標的の細菌を、一般的な培養法より短時間かつ高い感度で検出できた。

これらの手法は、検出対象とする細菌の迅速かつ高感度な定量を可能にしたものであり、飲食品に応じた前処理を行うことにより、モデル試料とした牛乳以外の飲食品にも応用可能であると考えられる。また、各々の細菌に特異的なプローブを併用することにより、多くの細菌の同時検出が可能である。以上の知見は、飲食品の衛生微生物学的な安全性の向上に寄与するものであり、博士（薬学）の学位を授与するにふさわしいと考える。