

## [成果情報名] 定量 PCR 法を活用した食中毒菌の増殖特性評価

[要約] 定量 PCR 法の活用により培養法と同等の食中毒菌増殖データを取得できる。食品のように共存微生物を含む系では培養法でのデータ取得は難しいが、本法では高い特異性により食中毒菌のみの増殖挙動を一括取得でき、その特性を効果的に解析できる。

[キーワード] 定量 PCR 法、食中毒菌、増殖挙動、予測微生物学的解析

[担当] 食品安全信頼・フードチェーン安全

[代表連絡先] 電話 029-838-7991

[研究所名] 食品総合研究所・食品安全研究領域

[分類] 研究成果情報

## [背景・ねらい]

食品産業において、食品中での食中毒菌の挙動に関する情報が求められている。現在、多数の文献から得た増殖データをもとに解析可能な予測データベースが活用される一方、新規食品開発時での微生物評価試験は未だ省略できない。なぜなら上記文献データが必ずしも新規食品中で再現されるとは限らないためである。従って、最終的には食中毒菌の接種試験および増殖能の評価が行われることになる。しかし、食品のように共存微生物が存在する場合、従来の培養法では最確数法や典型集落の確認試験など多大な労力が必要となり、増殖データの取得は極めて困難である（図 1）。これを解決するため、牛乳・生乳を食品モデルとして、定量 PCR 技術を用いた食中毒菌挙動一括解析手法を検討する。

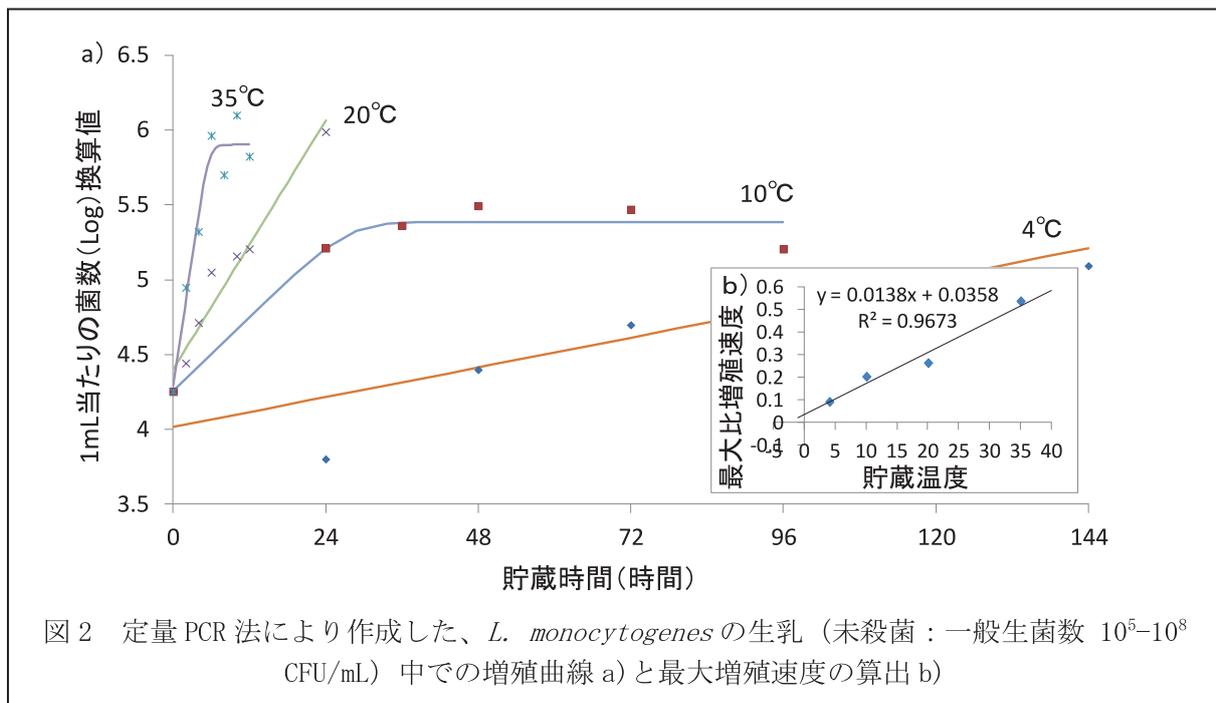
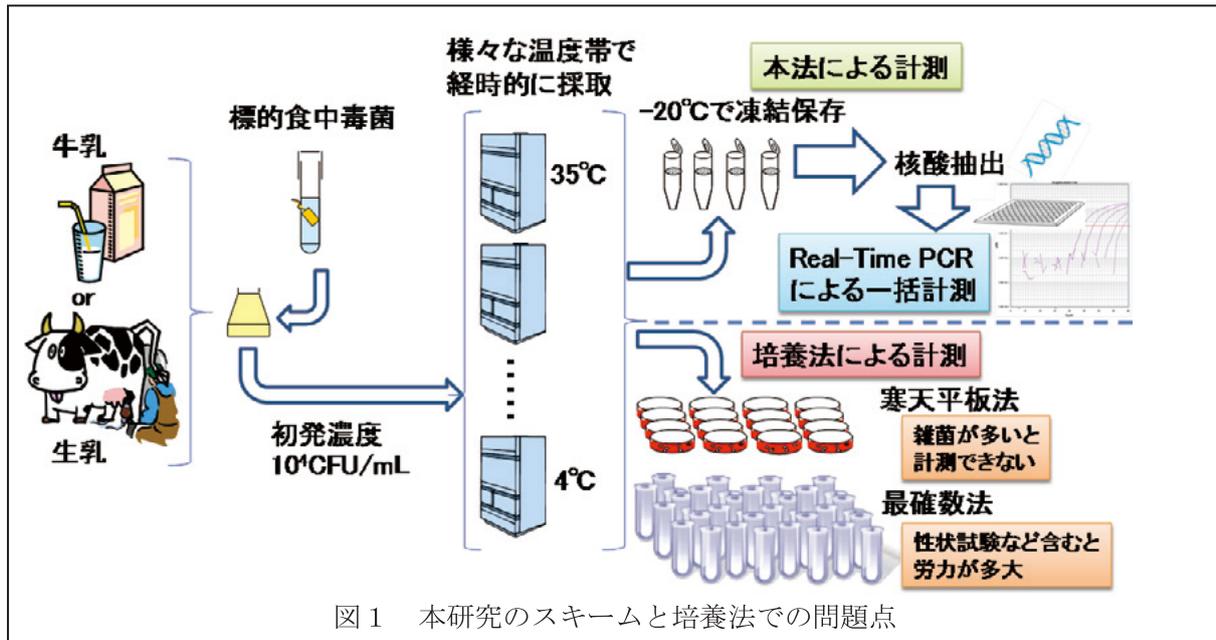
## [成果の内容・特徴]

1. *Listeria monocytogenes* の特異的遺伝子 *hlyA* を用いて定量 PCR 法による遺伝子定量系を作成し遺伝子数と細胞数との相関を調べたところ、 $10^4 \sim 10^9$  細胞/mL の範囲で相関があり、細胞数として換算・定量できる。
2. 殺菌乳に *L. monocytogenes* を  $10^4$  CFU/mL となるよう調整した後  $4 \sim 35^\circ\text{C}$  で保存して経時的に回収、これら各々を遺伝子抽出の後 1. の定量 PCR に供して標的遺伝子数を求めることで、*L. monocytogenes* の増殖をプロットできる。これは、従来の培養法でも同時に *L. monocytogenes* の菌数を求めた結果とほぼ一致する。
3. プロットされた値から、増殖モデル式により増殖曲線をフィッティングできる。得られたパラメーターから最大比増殖速度と保存温度との関係式が求められる。
4. 3. で得られた増殖曲線ならびに最大比増殖速度は、培養法での結果と同等の結果が得られる。このことから本法は、培養法で求めた結果を再現でき、得られたデータを予測微生物学的解析手法に活用できると考えられる。
5. 共存微生物が存在する場合を想定して、生乳（未殺菌乳：一般生菌数  $10^5$  CFU/mL を含む）を用いて 2. と同様の実験を実施したところ、平板培養法では *L. monocytogenes* の菌数を求めることができなかったが、本法では図 2 a) のように増殖挙動を捉えることが可能である。また解析結果から最大比増殖速度と保存温度との関係（図 2 b)）を求めることができる。本法による特異的微生物定量法と微生物増殖モデル式による解析手法の活用により、微生物叢と食材の影響を含んだ増殖特性を迅速に提供できる可能性がある。

## [成果の活用面・留意点]

1. 本法は *L. monocytogenes* だけでなく、*Salmonella* Enteritidis についても試験がなされ、同様の結果を得ている。
2. 今回は食品のモデルケースとして、牛乳・生乳を用いた。その他の食品でも本法の活用が期待できるが、食品毎での検出条件至適化が必要と考えられる。
3. 本法では食中毒菌の遺伝子数を指標として菌数に換算するため、厳密には生菌死菌を含めた数値と考えられる。しかし、増殖特性を検討する範囲であれば、死菌数は解析に大きな影響を与えないと考えられる。

[具体的データ]



(川崎晋)

[その他]

中課題名：フードチェーンにおける危害要因の迅速・高精度評価技術及び衛生管理技術の開発

中課題番号：180c0

予算区分：交付金、委託プロ（食安動衛）

研究期間：：2013～2014年度

研究担当者：川崎晋、清水茂雅（北海道総研）、小関成樹（北大農）、稲津康弘

発表論文等：川崎ら(2014)日食微誌、31(1):28-35