

知の拠点 重点研究プロジェクト

「食の安心・安全技術開発プロジェクトP2公開セミナー2013」

平成25年5月13日(月)13:00 - 16:30

- 食品に混入した微生物検査装置の開発 -

微生物微小コロニー検査装置:

自動化、短時間、菌同定可能化で出荷前検査が可能になる

培地上に生育した微生物コロニーの 高感度検査装置

- 蛍光試薬を利用した高感度検出装置の開発 -

豊橋技術科学大学 研究員 海谷慎一

豊橋技術科学大学 教授 中内茂樹

所属グループ: 3

「食品等の微生物を検出できる高度な計測デバイスの開発」

グループリーダー: 田村廣人

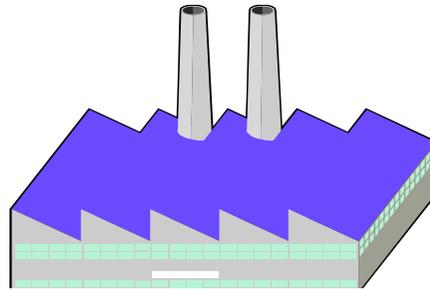
所属サブテーマ: 1

「微生物検出のための高感度センサデバイスの開発」

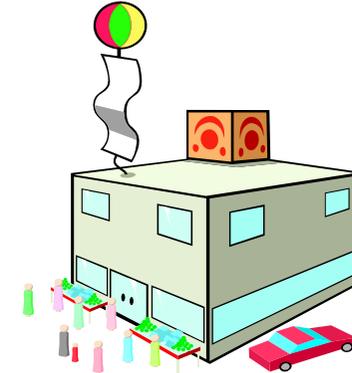
サブテーマリーダー: 中内茂樹

食品に混入した微生物の検査

食品工場から販売店までの流れ

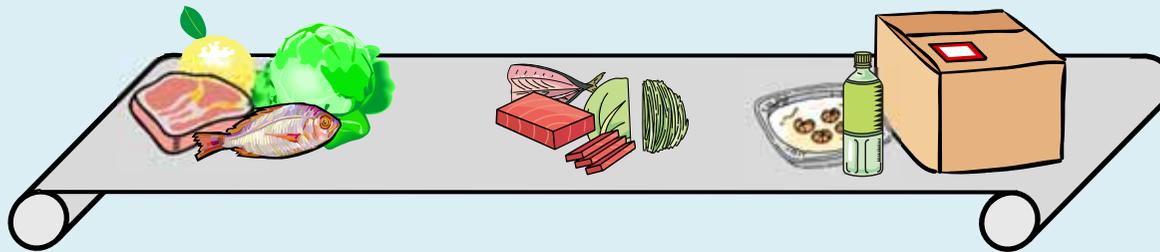


異物検査と異なり、微生物検査は結果が出るまでに時間がかかる。



店頭に並ぶまでに検査結果を出す必要がある。

工場内での食品製造過程



食品検査: 製造過程からの抜き取り検査により微生物の有無や、量を調べる。

その他検査

- ・異物(金属、不純物)
- ・有害化学物質
- ・放射性物質



食品加工後の全品検査
(精度が最も重要になる)

食品検査は精度の確保に加えて、短時間化が重要なポイントとなる

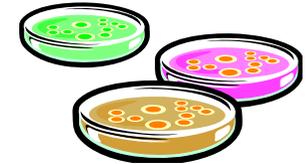
食品検査に関する決まり

・食品衛生検査指針(微生物編 厚生労働省監修)

- ・ 公定法(食品衛生法および各都道府県条例に基づく手法)
『対象の食品』、『検査対象となる微生物規格』、『検査手法』の規定
- ・ 国際標準法、海外公定法(海外公的試験法 ISO法、AOAC法など)
日本で微生物規格が定まっていない食品を対象とし、輸出入などで使用
- ・ 自主検査法(新技術、特定特許をもとにした検査法)
コスト削減、簡易化、迅速化などを目的

寒天平板培養試験

食品内に混入する微生物数の規格基準が決まっている場合に用いられる微生物試験



液体培地培養試験

食品の少なくとも一定基準量内に、特定の微生物がいないことを確かめる場合に用いられる微生物試験



その他

食中毒菌毒素検出、フローセルカウント、PCR法、ATP法、抗原抗体イムノクロマト、MALDI-TOFMSなど公定法の代替法として用いられる微生物試験



食品検査に関する決まり

一般的に公定法の規格基準が出荷の条件となる。

| 例) | 細菌総数 | 大腸菌 | 大腸菌群 | 特定細菌 |
|-------------------|-----------|-----------|-----------|-------------------------------------|
| ミネラルウォーター類(殺菌・除菌) | - | - | 陰性/11.1mL | - |
| 加熱食肉製品(包装後加熱殺菌) | - | - | 陰性/1g* | クロストリジウム属菌 1000 /g以下 |
| 加熱食肉製品(加熱殺菌後包装) | - | 陰性/0.1g* | - | 黄色ブドウ球菌 1000 /g以下 サルモネラ属菌 陰性/25g |
| 冷凍食品(凍結直前加熱) | 10万 /g以下 | - | 陰性/0.01g* | - |
| 冷凍食品(凍結直前加熱以外) | 300万 /g以下 | 陰性/0.01g* | - | - |

*: 2-5 回の繰り返し試験が必要

| | 推定試験 | 確定試験 | 完全試験 |
|-------------------|----------|----------|--------------------------|
| 大腸菌試験 (合計96時間) | EC発酵管 | EMB培地 | 乳糖ブイヨン発酵管および 普通寒天斜面培地 |
| | 24 ± 2時間 | 24 ± 2時間 | 48時間 → |

| | 前培養 | 増菌培養 | 分離培養 | 同定試験 |
|-----------------------|---------------|-----------------------|--------------|-------------------|
| サルモネラ属菌試験 (合計86時間) | EEMブイヨン 培地 | セレナイトブリリアント グリーン培地 | MLCB 寒天培地 | TSI寒天培地、 LIM培地 |
| | 18 ± 2時間 | 20 ± 2時間 | 24 ± 2時間 | 24 ± 2時間 → |

本プロジェクトの目標

迅速かつ公定法と同等の検出精度を持った手法・検査デバイスの開発

公定法における一般的な固形食品の寒天平板培養試験過程



寒天平板培養試験は、一般的に平板状に固めた栄養素を含む寒天培地上に、食品サンプルを破碎し懸濁した検査試料を塗布して数日間培養し、増殖した微生物の増殖体(微生物コロニー)を目視下で数えることで行う。

迅速化には微生物コロニーの高感度検出が必要

コロニーの高感度検出デバイスの開発

1. 検査対象の微生物に対し、100コロニー/gが検出できる
2. 検査対象の微生物に対し、数時間レベルの迅速検出ができる
(出荷前検出)
3. 検査の結果、存在を確認した微生物の同定ができる
(食中毒細菌の検査)

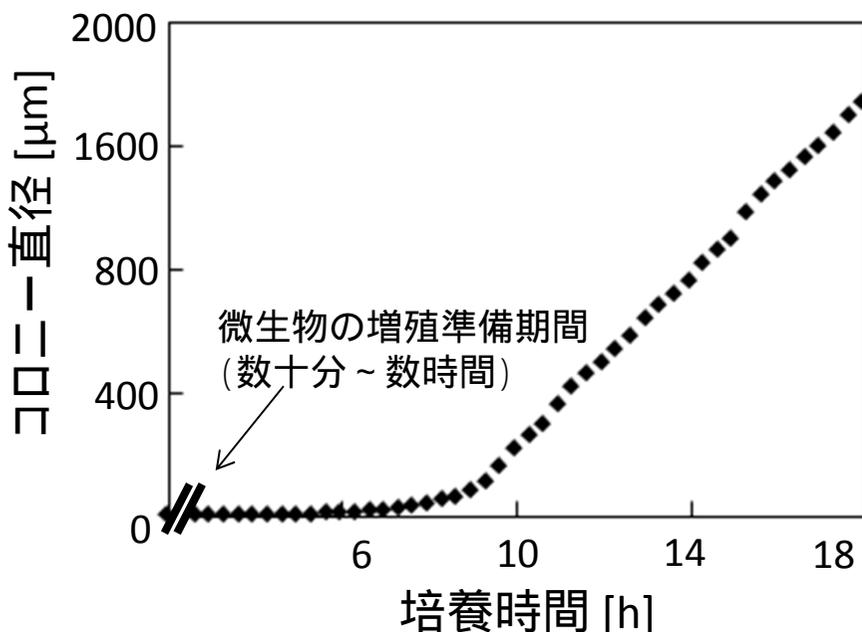
検査デバイス開発のアプローチ

高感度観察へのアプローチ

公定法に主として用いられる寒天平板培養試験を対象

開発に当たり、競合他社製品に対する優位性、必要なデバイスの性能、迅速検査のアプローチ方法を定める。

標準寒天培地上での大腸菌コロニー直径の推移



微生物コロニーが数mmの大きさになるのには20時間近く必要

検査開始から数時間のコロニーの直径は数 ~ 数十マイクロレベル (大腸菌は $0.5 \times 3 \mu\text{m}$ 程度)

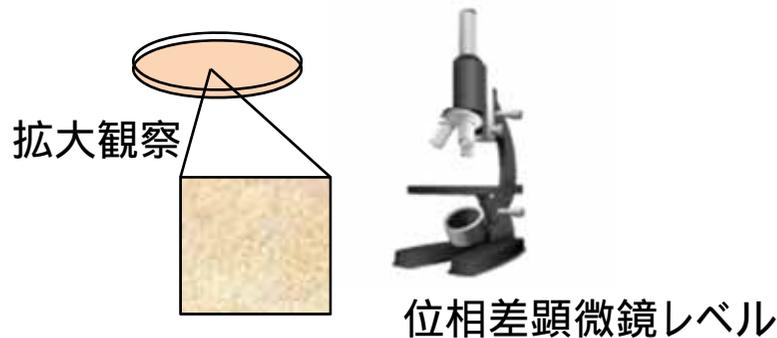
先の条件のもと、平板培養法における培養過程の数マイクロメートルのコロニーを検出する安価な検査装置は、現在市販されていない。

開発コンセプト

高感度観察へのアプローチ

数～数十マイクロメートルの微生物コロニーを検出する高感度センサデバイスを開発する。

1. 顕微鏡による観察



顕微鏡を用いた観察では、平板培地全体の数千分の1～数万分の1しか観察できなくなるため、目標とする測定微生物数が維持できない。

2. 高感度カメラによる観察



プレート全体の観察の場合1800万画素のカメラを用いても、測定範囲の下限が25 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ になる。

高感度カメラによる検出に、蛍光を利用することを想定

蛍光試薬を用いて観察が可能かを確かめるための試作機を作成

試作機の開発

- ・理論実証用試作機を開発し、蛍光観察による高感度検出の有効性を確かめる。



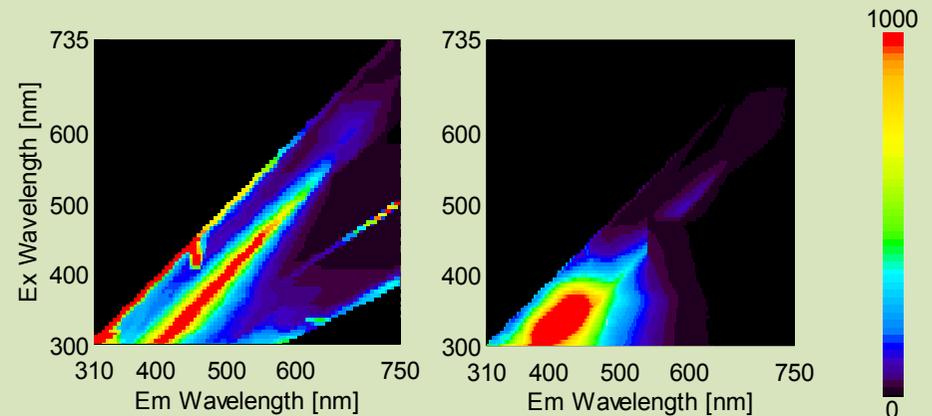
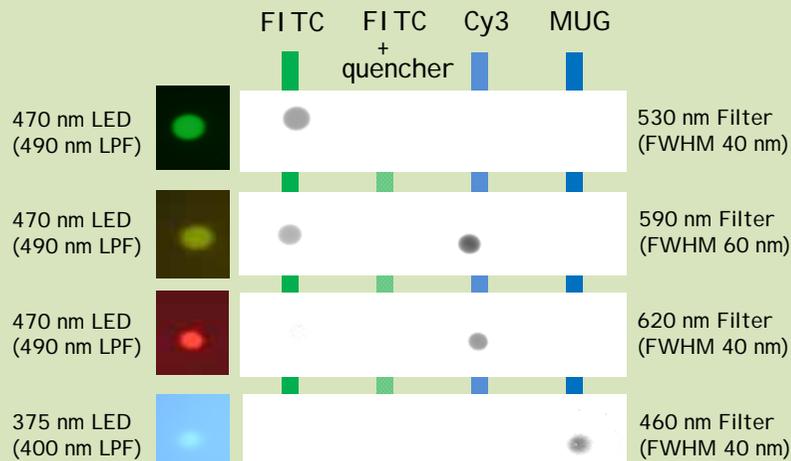
光源 : LEDライト 370 ~ 650 nm
 カメラ : デジタルカメラ、モノクロサイエンスカメラ
 光学フィルタ : 420 ~ 620 nm
 * 光源、カメラ、光学フィルタの交換により、検出感度及び標的蛍光試薬の変更を行う。

試作機展示・講演 3F-308 本日15:45 ~

試作機を用いた高感度検出を行うための基礎データの収集

標準寒天培地上で各蛍光試薬の測定

微生物、平板培地の3次元蛍光パターン



大腸菌

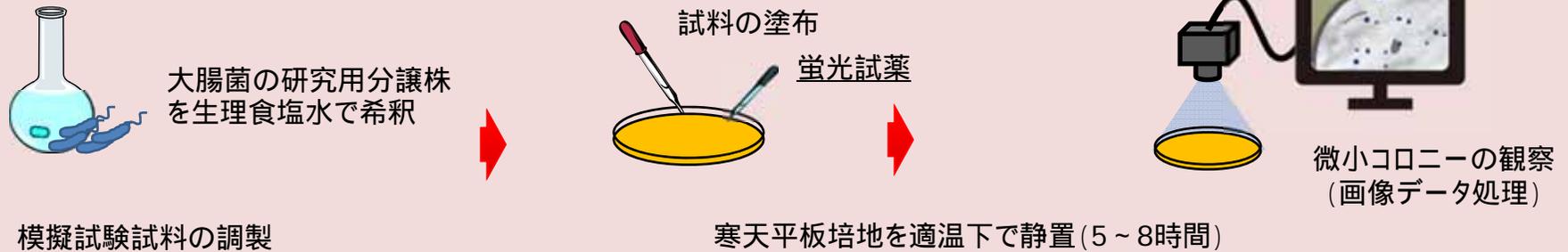
標準寒天平板培地

試作機の性能調査

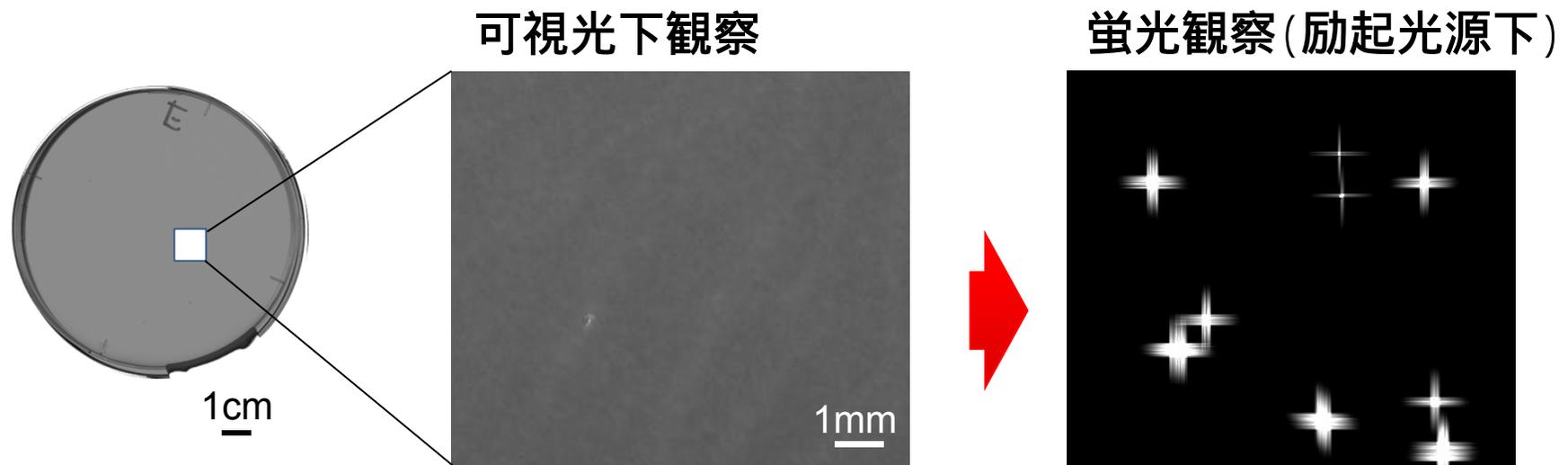
試作機の性能の実証

目視レベル以下の微小コロニーの観察を実際に行う。

蛍光色素を用いた高感度検出実証試験過程



試作機を用いた蛍光観察結果 (20 ~ 100 μm 径コロニーの観察)



微生物微小コロニー検査装置

開発コンセプト

想定するユーザー層：

微生物検査に平板寒天培養法を用いているユーザーを対象

開発装置による利点：

迅速検出と検出精度の両立

製品化へのポイント

- ・高額機器を使わず、最終的な製品化において、安価な販売価格を想定(一台数百万円)
- ・これまでに類似製品のない、数十マイクロレベルのコロニー検出装置を想定
- ・培養をそのまま続けることで、検出後の菌の回収(同定)が可能なシステムを想定

現状と展望

本プロジェクトにそった製品化をめざし、蛍光試薬の選別、培養条件および検出条件の検討を行う。