

氏名(本籍・生年月日) 寺村 哉 (埼玉県 昭和49年5月31日)
学位の種類 博士(農学)
学位記番号 乙 第 12 号
学位授与の日付 平成25年9月30日
学位授与の要件 信州大学学位規程 第5条第2項該当
学位論文題目 発色酵素基質を利用した微生物の新規検出培地の開発
論文審査委員 主査 教授 後藤 哲久
教授 廣田 満
准教授 山田 明義
教授 福田 正樹
教授 松岡 英明 (東京農工大学)

論文内容の要旨

食品の安全性の確保には食品の微生物検査が必要であり、食品衛生において用いられている標準的な微生物検査法は培養法である。しかし、この検査に従来から用いられている培地では、標的菌が明瞭な集落外観を示さず、菌種の判定が困難な場合が多くある。この状況を改善するために、発色酵素基質を培地へ添加し、標的菌集落を明瞭な発色集落として検出する方法を検討した。培地の開発には、日本における食中毒の原因菌として比較的多い、黄色ブドウ球菌、セレウス菌、腸炎ビブリオ、腸管出血性大腸菌の4種の菌群を選択した。

黄色ブドウ球菌の検出においては、黄色ブドウ球菌のマンニトール分解に伴う酸産生と、産生する酸性フォスファターゼにより検出することを考え、マンニトールと発色酵素基質である5-bromo-4-chloro-3-indoxyl phosphateを培地に加えた。その結果、従来法の半分である24時間の培養で、黄色ブドウ球菌を青色の発色集落として検出できた。この検出原理と黄色ブドウ球菌以外の菌の発育を抑制する物質を組み合わせ、さらに乾燥簡易培地の作製技術を利用し、黄色ブドウ球菌を明瞭な青色集落として特異的に検出できる培地、コンパクトドライX-SAを開発した。培地性能は、ISO16140およびAOACによる国際的な妥当性確認法に従った。その結果、本培地は標的菌に対する包含性、排他性、食品での従来法との検出能力の比較、ロット間差、頑健性の全てにおいて要求性能を満たした。また、本培地は、世界初めての試みとしてのAOAC Research Institute(米国)とMicroVal(欧州)の共同での妥当性確認を行い、その共同妥当性確認プログラムで初の認証を受けた。

次に、黄色ブドウ球菌で開発した発色酵素基質の他の微生物培地への展開として、以下3種の微生物に対する発色酵素基質培地を開発した。

セレウス菌の検出のため、セレウス菌が利用する麦芽糖と同じ α -グルコシダーゼ基質となるX- α -グルコシドを利用し、セレウス菌以外の菌の

発育を抑制する物質を組み合わせる検討を行った。その結果、セレウス菌を明瞭な青色集落として検出できる培地、コンパクトドライX-BCを開発した。

腸炎ビブリオの検出のため、 β -グルコシダーゼ基質であるX- β -グルコシドを利用し、ビブリオ属菌以外の菌の発育を抑制する物質を組み合わせる検討を行った。その結果、腸炎ビブリオを明瞭な青色集落として検出できる培地、X-VP寒天培地を開発した。さらに、X-VP寒天培地には、 β -ガラクトシダーゼ基質のMagenta-GALを添加し、腸炎ビブリオ以外の病原性ビブリオで重篤な臨床症状を示す*Vibrio cholerae*、*V. mimicus*、*V. vulnificus*を本培地上で赤紫色集落として、腸炎ビブリオと同時に検出することができた。

腸管出血性大腸菌の検出のため、 β -ガラクトシダーゼ基質であるX-GAL、本酵素の誘導のための低濃度の乳糖、腸管出血性大腸菌以外の菌が優先的に利用するセロビオース、および腸管出血性大腸菌以外の菌の発育を抑制する物質を組み合わせる検討を行った。その結果、広範な血清型の腸管出血性大腸菌を青色の集落として同時に検出できる培地、EHEC-クロムを開発した。

これら3種の培地の性能の妥当性確認を行った結果、いずれも標的菌に対する良好な包含性と排他性を有した。また、食品での従来法との検出能力の比較では、いずれも従来法培地と標的菌の検出性能に有意差が無く、検出性能の妥当性を確認した。

今回、食品衛生に重要な危害菌に対する4種の新規発色酵素基質培地を開発し、それらの性能の妥当性を評価した。これらは全て、標的菌が明瞭な発色集落として誰にでも確実に検出できるだけでなく、検出時間の短縮や広範な微生物の検出など、従来培地に対して優位性を持つものであった。この成果は、発色酵素基質と標的菌以外の菌の発育を抑制する物質を組み合わせ、標的微生物を明瞭な発色集落として特異的に検出できることを示しており、衛生検査の効率化と食品の安全性向上に大きく寄与するものである。