

リボプリンタ[®]を用いた細菌汚染源の究明

はじめに

微生物による食品汚染の原因究明とその防護対策は食品製造業者にとっての永遠の命題であり、私どももこれまで数多くの事例を経験しているところです。微生物汚染の原因究明においては原因微生物の特定はもとより、数多くの原材料、製造ラインあるいは製造に携わる従業員などの何れからその微生物が混入したかの汚染経路を解明することが急務となります。汚染経路を解明することにより製造工程中の不備などを明らかにして早急な是正措置を講ずることができれば、製造の早期再開が可能となり、また衛生管理上の重要監視点（CPP）も明らかになってくると思われま

す。ここでは微生物、特に細菌の汚染原因の究明に私どもの所有するリボプリンターが如何に活用できるかについて紹介します。

リボプリンターとは？

リボタイピング法とは、細菌 DNA を制限酵素で切断後に電気泳動を行い、分離された断片の中からリボゾーム RNA をコードする遺伝子を含む断片を検出してそのパターン(リボタイプ)を調べる方法で、疫学研究の分野でも応用されています。

身近な例にたとえますと、リボタイプは「その菌株の指紋である」と言い換えることもできます。ヒトでは指紋は個々人すべて異なるものと言われます。そこで犯罪捜査では、発生した事件の被疑者の指紋を取って過去に登録してある指紋と照合することにより、いち早く犯人を特定できるわけです。細菌のリボタイプはまさにその指紋に相当するものなので、犯罪捜査と全く同じように犯人探し、というよりは“汚染源探し”が可能となるのです。

私どもでは、この“汚染源探し”の一連の操作をわずか 8 時間で自動的に行える装置(リボプリンター)を使い、菌株のリボタイピングによるデータを提供しております。

それではリボプリンターで得られる「菌株の指紋」とはいったいどのようなものなのでしょう？ 図-1 は食品から分離された大腸菌群のリボパターンです。右に表示されているのが DNA 断片の電気泳動パターンで、左には各菌株について得られた情報などが表示されます。

左側に表示される情報で最も重要なのはリボグループ名で、一番上の菌株で RIB01 245-66-S-1 と記されている部分です。これはこの菌株に与えられた DNA パターン

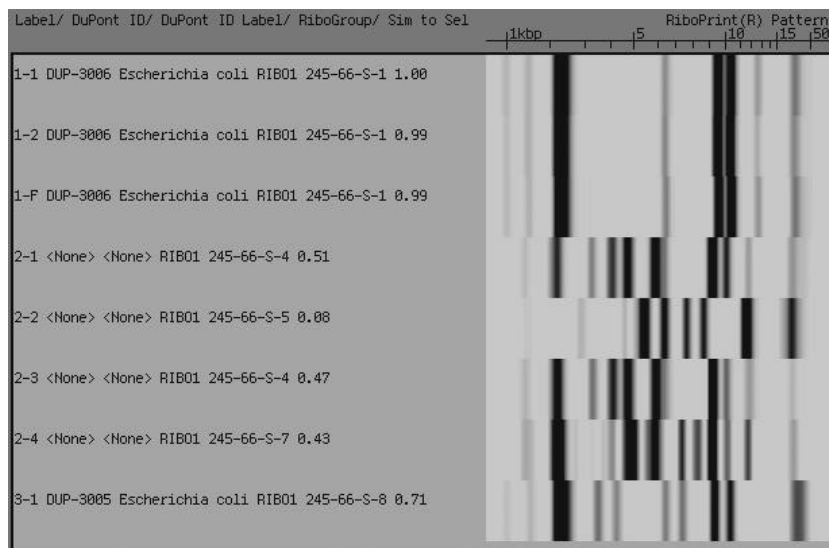


図-1 リボパターンの一例

(指紋)名で、この菌株と同じパターンを持つ菌株が現れた場合、同じリボグループ名が与えられることとなります。良く見ると図の上から 2, 3 番目の菌株についても同じ RIB01 245-66-S-1 と表示されています。すなわち、上の 3 つの菌株は同じ指紋を持っており、菌株レベルで同一である可能性が高いことが示唆されているのです。この様に、菌株レベルでの同一性を調べることができなのがリボプリンターの最大の特徴です。

微生物汚染源調査での利用法

製品から微生物が検出された場合、まず行うことは原因菌の特定すなわち同定です。微生物が食中毒菌や他の重篤な症状を引き起こす病原菌である場合は迅速なる対処が必要になるからです。また、同時に原因菌がどこから混入したかの調査、すなわち汚染経路の調査が始まります。原材料や中間製品の抜き取り検査、製造ラインや作業者のフキトリ検査など製品に係るあらゆるものについて微生物検査を行います。通常、実に多種の菌が検出されます。ここで大切なことは原因菌と同じ菌がどこから採取されるかということです。この「同じ」という意味のとらえ方が重要です。菌の名前が同じというだけでは汚染源は解明できません。菌株レベル(個体レベル)で同じかどうか重要なのです。

たとえば原因菌が大腸菌(*Escherichia coli*)だったとします。汚染源調査のために様々な検体について大腸菌を検査したところ、色々なところから大腸菌が検出されたとします。これまでの検査ではここでおしまいですが。これでは、製造に係る幾つかの工程から大腸菌は検出されたものの、どの工程から検出された大腸菌が最終製品まで残ってしまったのかが分かりません。

そこで、リボプリンターの登場です。生理・生化学的に同一で同種に分類される微生物でも、リボタイプの違いによって菌株レベルでの識別が可能となり、汚染源が特定できるのです。図-1で“1-1”(一番上)を製品由来の大腸菌とし、残り7株を汚染原因の調査で得られた大腸菌としますと、“1-2”と“1-F”(2, 3番目)のみが菌株レベルで“1-1”と同じ大腸菌であると特定できます。ここまでくれば汚染源の調査は大詰めです。“1-2”と“1-F”が製造工程中のどこから採取されたかを調べれば、そこが最終製品汚染の元凶であると推定できます。

この様に、リボプリンターは、提供される菌株が完全にピュアなものであれば(言うまでもなく、2種類以上の菌が混ざったままでの解析データは全く意味のないものです)、汚染源調査にうってつけの情報を8時間程度の解析で提供してくれる魅力的な装置です。

ちょっとマニアックな利用法

リボプリンターではちょっと面白いデータも提供されます。図-1の左側に表示される文字列の一番右側には“1.00”や“0.99”などの数字が並んでいます。これは“1-1”(一番上)に対するそれぞれの電気泳動パターンの類似度を意味しています。この類似度をもとに各菌株間の関係を図-2のような系統樹にして示すことができます(製品から検出された大腸菌は作業員3による汚染であったことが視覚的に理解できます)。系統樹の作成には遺伝子配列から遺伝系統樹を作成するのに用いられているN-J法やUPGMA法を適用することができます。

これでできる系統樹は進化を表す意味での遺伝系統樹ではありませんが、個々の菌株間の関係を視覚的に理解するのに役立つのではないかと考えています。

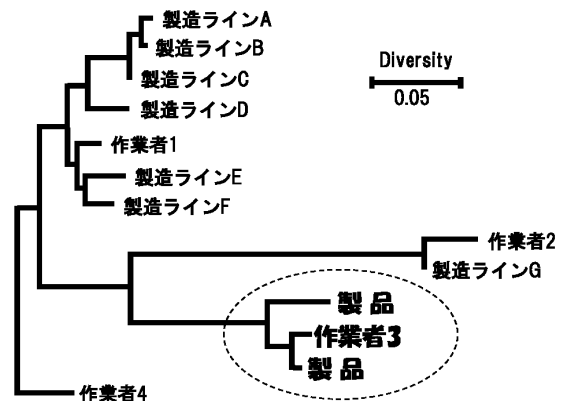


図-2 製品及び製造工程から得られた大腸菌の関係(N-J法)