

新規ヒスタミン生成菌及び缶詰変敗菌の
迅速検出・同定システムの開発
(課題番号 08556034)

平成 8 年度～平成 10 年度科学研究費補助金
(基盤研究 (A)(1))
研究成果報告書

平成 11 年 3 月

研究代表者 藤 井 建 夫
(東京水産大学水産学部教授)

目 次

はしがき	1
1. 研究組織	3
2. 研究経費	3
3. 研究発表	3
4. 研究成果	
4-1 海洋性ヒスタミン生成菌 <i>P.histaminum</i> の迅速同定・検出 システムの開発	
木村 凡、藤井建夫（東京水産大学水産学部）	7
4-1-1 海洋性ヒスタミン生成菌 <i>P.histaminum</i> のヒスチジン脱 炭酸酵素の精製及びN末端アミノ酸配列の決定	9
4-1-2 <i>P. histaminum</i> のヒスチジン脱炭酸酵素遺伝子 のクローニング	17
4-1-3 グラム陰性菌ヒスチジン脱炭酸酵素遺伝子 <i>hdc</i> 検出 プライマーの設計	23
4-1-4 海洋性ヒスタミン生成菌 <i>Photobacterium histaminum</i> の再分類及び中度好塩性ヒスタミン生成菌 <i>Tetragenococcus</i> <i>muriaticus</i> の発見	25
4-2 缶詰変敗菌の迅速検出・同定システムの開発	
信濃晴雄、猪上徳雄、山崎浩司（北海道大学水産学部）	35
4-2-1 酸性飲料缶詰変敗菌の迅速検出・同定システムの開発	35
4-2-2 偏性嫌気性芽胞形成菌 <i>Clostridium perfringens</i> の迅速 検出・同定システムの開発	62
4-3 蛍光プローブPCR法による迅速検出法開発	
木村 凡、藤井建夫（東京水産大学水産学部） 横本敬紀（パーキンエルマ・ジャパン）	80

はしがき

平成 7 年 5 月の食品衛生法改正に伴い、新しい自主衛生管理システムとして HACCP が導入されることとなった。この新システムにおいては品質管理の結果を迅速に（その日のうちに）得る必要があるため、培養に長時間を要する従来の微生物学的検査法はなじまないと考えられている。しかし、HACCP の中心目標は微生物制御であり、そのためには直接的に対象微生物を迅速に検出・同定するシステムの開発が強く望まれるところである。近年 PCR 法を始め種々の遺伝子手法の開発により、対象微生物を迅速に検出・同定することが理論的に可能となり、一部の菌種については実用化の試みもなされているが、この方法が可能となるためには、対象微生物毎に、特異遺伝子をクローニングし、特異プライマーおよびプローブを作成し、さらに検出感度に及ぼす食品成分の影響や検出限界、実用性などを各食品毎に明らかにしておく必要がある。

本研究では、近年新しい食品変敗菌として発見され、産業的にも重要と考えられる新種の海洋性ヒスタミン生成菌および低酸性缶詰変敗菌を対象微生物として選び、これらの有害菌に特異な遺伝子を特定し、PCR 法により増幅・検出する方法を確立することにより、食品中での検出感度や迅速・簡便性などに優れた培養法に代る遺伝子的手法の開発を目指した。

1. 研究組織

- 研究代表者：藤井建夫（東京水産大学水産学部教授）
研究分担者：木村 凡（東京水産大学水産学部助教授）
研究分担者：信濃晴雄（北海道大学水産学部教授）
研究分担者：猪上徳雄（北海道大学水産学部教授）
研究分担者：山崎浩司（北海道大学水産学部助教授）
研究分担者：横本敬紀（パーキンエルマ・ジャパン）

2. 研究経費

平成 8 年度	6,400 千円
平成 9 年度	10,100 千円
平成 10 年度	3,200 千円

3. 研究発表

(1) 学会誌等

- B. Kimura, S. Hokimoto, and T. Fujii: Molecular cloning and transcriptional analysis of *hdc* operon of *Photobacterium histaminum* (発表予定)
- B. Kimura, H. Takahashi, and T. Fujii: Development of a detection system for histidine decarboxylating Gram negative bacteria based on PCR assay (発表予定)
- M. Satomi, B. Kimura, M Mizoi, T. Sato, and T. Fujii: *Tetragenococcus muriaticus* sp. nov., a new moderately halophilic lactic acid bacterium isolated from fermented squid liver sauce, *Int.J.Syst.Bacteriol.*, 47, 832-836 (1997)
- B. Kimura, S. Hokimoto, H. Takahashi, and T. Fujii: Reclassification of *Photobacterium histaminum* as a member of the species *P. damsela* subsp. *damsela*.. (投稿中)
- B. Kimura, S. Kawasaki, T. Fujii, J. Kusunoki, T. Itoh, and S. J. A. Flood: evaluation of TaqMan™ PCR assay for detecting *Salmonella* in raw meat and shrimp. *J.Food Prot.*, 62(3), in press(1999)
- K. Yamazaki, H. Teduka, and H. Shinano: Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60, 543 - 545 (1996)

- K. Yamazaki, H. Teduka, N. Inoue, and H. Shinano: Specific primers for detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* by RT-PCR, *Lett. Appl. Microbiol.*, 23, 350 - 351 (1996)
- K. Yamazaki, T. Okubo, N. Inoue, and H. Shinano : Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for rapid identification of spoilage bacterium, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 1016 - 1018 (1997)
- 山崎浩司, 磯田千恵子, 手塚裕和, 川合祐史, 信濃晴雄 : 酸性飲料変敗菌 *Alicyclobacillus acidoterrestris* の耐熱性とその制御, *食科工誌*, 44, 905 - 911(1997)
- M. Murakami, H. Tedzuka, and K. Yamazaki : Thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in different buffers and pH, *Food Microbiol.*, 15, 577 - 582(1998)

(2) 口頭発表

- 草間義幸・木村凡・里見正隆・長島裕二・塩見一雄・藤井建夫：海洋中温性ヒスタミン生成菌のヒスチジン脱炭酸酵素の精製、平成8年度日本水産学会春季大会（1996年4月、東京）
- 草間義幸・木村凡・里見正隆・長島裕二・塩見一雄・藤井建夫：ヒスタミン生成菌のヒスチジン脱炭酸酵素のN末端アミノ酸配列、平成8年度日本水産学会秋季大会（1996年10月、福岡）
- 木村 凡・草間義幸・里見正隆・藤井建夫：海洋性ヒスタミン生成菌 *Photobacterium histaminum* のヒスチジン脱炭酸酵素遺伝子の塩基配列決定、平成9年度日本水産学会春季大会（1997年4月、東京）
- 保木本悟史・木村凡・藤井建夫（東水大）海洋性ヒスタミン生成菌 *Photobacterium histaminum* のヒスチジン脱炭酸酵素遺伝子のクローニング、平成10年度日本水産学会春季大会（1998年4月、東京）
- 富宇加珠未・木村凡・里見正隆・藤井建夫：新規好塩性乳酸菌 *Tetragenococcus muriaticus* ヒスチジン脱炭酸酵素遺伝子のクローニング、平成10年度

- 日本水産学会春季大会（1998年4月、東京）
- 高橋肇・木村凡・藤井建夫：グラム陰性ヒスタミン生成菌のヒスチジン脱炭酸酵素遺伝子検出プライマーの設計、平成11年度日本水産学会春季大会（1999年4月、東京）
- 里見正隆・溝井埋子・木村凡・藤井建夫：飛鳥魚醤油より分離された新規好塩乳酸菌、平成8年度日本水産学会秋季大会（1996年10月）
- 木村 凡、川崎 晋、藤井建夫、楠 淳、伊藤 武、Carl T. Yamashiro、Christine Paszka-Kolva：蛍光プローブPCR法によるサルモネラの検出について、日本食品衛生学会第71回学術講演会（1996年5月、東京）
- 木村 凡、川崎 晋、藤井建夫、楠 淳、伊藤 武、Carl T. Yamashiro、Christine Paszka-Kolva：蛍光プローブPCR法による食品からのサルモネラの検出、日本食品微生物学会第17回大会（1996年10月、札幌）
- 木村 凡、川崎 晋、楠 淳、伊藤 武、Carl T. Yamashiro、Christine Paszka-Kolva、藤井建夫：TaqMan PCR法による食品及び環境からの微生物の迅速検出、日本微生物生態学会第12回大会（1996年11月、東京）
- 木村凡、川崎晋、藤井建夫、楠淳、伊藤武、Susan. J. A. Flood, Robert L. Green, Christine Paszko - Kolva：TaqMan™サルモネラ検出キットによる食肉からのサルモネラ検出法の検討、日本食品微生物学会第18回大会（1997年12月、東京）
- 川崎晋・木村凡・藤井建夫、Christine Paszko - Kolva, Susan J.A. Flood：「TaqMan™サルモネラPCR検出キット」による食品からのサルモネラ迅速検出法の検討、平成9年度日本水産学会春季大会（1997年4月、東京）
- 山崎浩司, 手塚裕和, 高橋秀久, 信濃晴雄：16SrRNA塩基配列に基づく酸性飲料変敗原因菌の系統的分類とその迅速検出, 平成7年度日本農芸化学会大会（1995年8月、札幌）
- 山崎浩司, 手塚裕和 信濃晴雄：酸性飲料缶詰変敗菌 *Alicyclobacillus acidoterrestris* の芽胞耐熱性とその制御, 第18回日本食品微生物学

会学術総会 (1997 年 12 月、東京)

村上実和子, 山崎浩司, 川合祐史, 猪上徳雄 : 好酸性 *Alicyclobacillus acidoterrestris* の芽胞耐熱特性, 平成 10 年度日本水産学会春季大会 (1998 年 4 月、東京)

(3) 出版物

藤井建夫 : 水産食品の微生物危害因子とその評価, 食品保全研究会報, 4(1), 14-19(1998)

藤井建夫 : 水産食品の微生物管理, 日水誌, 320-321 (1998)

藤井建夫 : 水産食品に関するデータベース構築と今後の問題, 食品保全研究会報, 4(2), 6-9(1998)

木村 凡 : 蛍光プローブ PCR (TaqMan™ システム法) による食中毒迅速検出法, 月刊フードケミカル, 142,106-110 (1997)

木村 凡 : 食品危害分析・モニタリングシステム (渡邊悦生、森光圀、大熊廣一、後藤良三編)、遺伝子手法による汚染菌の検出・同定、pp.433-443, サイエンスフォーラム (1998)