

2010 JJ009A

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

清涼飲料水中の汚染原因物質に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 工藤 由起子

国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部

平成23(2011)年3月

目 次

総括研究報告書

清涼飲料水中の汚染原因物質に関する研究	1
---------------------------	---

工藤 由起子

分担研究報告書

清涼飲料水の腐敗原因微生物の特定のための微生物同定方法の確立

工藤 由起子

協力研究報告書

真菌同定のための遺伝子指標に関する研究	13
---------------------------	----

協力研究報告書

市販国産果実における真菌叢の解析	27
------------------------	----

細菌の清涼飲料水の汚染と防御方法に関する研究	53
------------------------------	----

大西 貴弘

真菌の清涼飲料水の汚染と防御方法に関する研究	99
------------------------------	----

小沼 博隆

清涼飲料水の殺菌・除菌方法の妥当性	121
-------------------------	-----

後藤 慶一

総括研究報告書

清涼飲料水中の汚染原因物質に関する研究

工藤 由起子

平成 22 年度 厚生労働科学研究費補助金(食の安心・安全確保推進研究事業)
清涼飲料水中の汚染原因物質に関する研究

総括研究報告書

研究代表者 工藤 由起子 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)
研究分担者 小沼 博隆 (東海大学海洋学部)
大西 貴弘 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)
後藤 慶一 (三井農林株式会社 食品総合研究所)
研究協力者 杉山 寛治、神田 隆 (静岡県環境衛生化学研究所)
富田 敦子 (静岡市環境保健研究所)
大塚 佳代子 (埼玉県衛生研究所)
小沼 ルミ (東京都立産業技術研究センター)
荒木 恵美子、堤 史行 (東海大学海洋学部)
小澤 一弘 (株式会社 中部衛生検査センター)
土屋 禎、斎藤 明美 (財団法人 日本食品分析センター 微生物部)
岩田 修二、徳田 一、池本 尚人 (NPO 法人 ILSI Japan 食品微生物部会)
金子 清久 (NPO 法人 ILSI Japan 国際協力委員会)
鎌田 洋一、渡辺 麻衣子、毎田 恵実 (国立医薬品食品衛生研究所)

研究要旨

現代では多様な種類の清涼飲料水が製造販売されており、それらの原料や製品の製造・保管方法、消費のされ方も多様である。このため、清涼飲料水に関する諸問題を整理し、安全な製品が消費者に提供・消費されるために研究を行った。

(1)清涼飲料水の腐敗原因微生物の特定のための微生物同定方法の確立

① *Fusarium* 属菌についてマイクロプレートでの DNA-DNA ハイブリダイゼーションを行った結果、全ゲノムの相同率は β -*tub* 塩基配列の相同率とよく相関することが明らかとなった。

② 果汁飲料の原料となる複数の国産果実について真菌叢を定性的・定量的に把握し、汚染真菌の優占菌種を明らかにした。

(2)細菌の清涼飲料水の汚染と防御方法、および(3)真菌の清涼飲料水の汚染と防御方法

細菌および酵母を清涼飲料水に接種し 25 および 35°C で培養したところ、pH、Brix (%)あるいは炭酸ガスまたは栄養源の有無など、製品の特性によって微生物動態が異なった。特に茶系飲料、野菜ジュースおよびミルク入りコーヒー飲料では著しく生育する菌株が認められた。また、毒素産生性細菌は条件によって毒素が産生されることが明らかになった。真菌を清涼飲料水に接種し 25 および 10°C で培養したところ、10°C でも短期間のうちに多くのカビの発育が認められた。これらのことから、冷蔵庫を過信せず開封・飲用後の飲料は速やかに消費する必要性が明らかになった。

(4)清涼飲料水の殺菌・除菌方法の妥当性

製造基準の 85°C・30 分加熱の適切な指標菌が必要であること、欧米と日本では消費する清涼飲料水の種類が異なり日本に適切な殺菌条件基準が必要であると考えられた。

A. 研究目的

現代の生活にはペットボトルや紙容器などの多様な形態で、かつミネラルウォーター、炭酸飲料、果汁飲料など多様な清涼飲料水が製造販売されており、それらの原料や製品の製造・保管方法、加えて消費のされ方も多様である。このため、清涼飲料水に関する諸問題を整理し、安全な製品が消費者に提供・消費されるための要点について検討し、情報を提示する事を目的とする。

平成 20 年度に地方自治体ならびに製造業者から苦情や事故に関する情報の収集を行い、その多くは開封後の事例であることが明らかになり、平成 21 年度には開封および口飲みによる清涼飲料水の微生物汚染、その後の室温での長期間の保管時の微生物の増殖、汚染および増殖する微生物の種類や清涼飲料水の組み合わせなどについて解析したところ、開封試験では約 2 割の検体で主にカビ、口飲み試験では約 5 割で主に細菌が汚染し増殖することが明らかになった。これらの研究で得られた細菌および真菌を中心に、清涼飲料水への接種を行い消費者の消費方法をふまえて、菌の増殖および食中毒菌の毒素産生を測定し、消費にともなう危害の発生について検討を行う必要があると考えられる。

また、清涼飲料水の汚染微生物の迅速な同定によって危害の重篤性が判断でき適切な危害対応を可能にするために必要である。真菌の同定方法は、従来は形態学的観察に頼った方法が主流であった。しかし形態学的特徴を見出すのに特別な熟練技術が求められることに加え、培養が必要で時間がかかる。また対象菌株が死滅している場合は培養が不可能である。このため近年、分子生物学的手法の持つ簡便性・迅速性・客観性が注目され、分子生物学的手

法が取り入れられつつある。以前から、DNA-DNA ハイブリダイゼーションを用いて測定されたゲノム全体の相同率は、細菌や酵母において形態学的性状や生化学的性状といった絶対的な菌種の定義とよく相関していることが報告されていることから、真菌での実験系を確立することが求められている。

さらに、清涼飲料水、特に果実入り飲料水では、風味が損なわれることを防ぐために、強い殺菌は施されておらず、微生物学的な汚染が発生しやすい。また、真菌は多くの耐酸性菌種を含む微生物群であり、果実は低い pH を持つことから真菌に汚染されやすい。このため、清涼飲料水の原料となる種類の複数の国産果実について真菌叢を定性的・定量的に把握し、汚染真菌の優占菌種を明らかにする必要がある。

清涼飲料水の製造基準では 85℃で 30 分加熱またはこれと同等の殺菌・除菌することが示されているが、その根拠となる科学的な情報が明確ではない。このため、指標菌となる細菌の検討が必要である。また、海外での製造基準で設定されている殺菌・除菌条件の情報を収集し、日本との違いについて明確にする必要があると考えられる。

今年度は、[1] 清涼飲料水の腐敗原因微生物の特定のための微生物同定方法の確立、① 真菌同定のための遺伝子指標に関する研究、② 果実における真菌叢の解析、[2] 細菌および [3] 真菌について清涼飲料水の汚染と防御方法に関する研究、[4] 清涼飲料水の殺菌・除菌方法の妥当性の検討を行った。

B. 研究方法

1. 清涼飲料水の腐敗原因微生物の特定のための微生物同定方法の確立

① 真菌同定のための遺伝子指標に関する研究

昨年度までと同様にカビの一種である *Fusarium* 属菌を対象とした。*Fusarium* 属菌で塩化セシウム密度勾配法による DNA の精製および DNA-DNA ハイブリダイゼーションを行い、供試菌間の全ゲノムレベルの相同率を測定した。供試菌株としては、従来の複数遺伝子塩基配列を用いた解析では系統関係を明確に示すことができなかった *Gibberella fujikuroi* species complex に属する菌種の中から *F. proliferatum* を、本 species complex には含まれないが最も近縁であることが確実菌種として *F. oxysporum* を選択した。菌株は、*F. verticillioides* および *F. oxysporum* を用いた。

平成 20 年度に検討された DNA 抽出効率比較検討の結果において幅広い種類の真菌で最も効率よく質の良い DNA が得られることが示された cetyltrimethyl-ammonium bromide 法とビーズ破碎の併用法を用いて DNA 抽出を行った。菌体より抽出した粗 DNA 溶液は、塩化セシウム密度勾配法により精製した。

ターゲット DNA をマイクロプレートへ固着した。得られたターゲット DNA 固着マイクロプレートとプローブ DNA を用いて、DNA-DNA ハイブリダイゼーションを行った。その後、DIG ラベルされたハイブリッド DNA の検出を、DIG Luminescent Detection Kit を用いて行った。アルカリフォスファターゼ標識抗 DIG 抗体溶液にて発光させ、発光強度の測定を行った。

②果実における真菌叢の解析

国内産果実 9 種類を供試し、真菌の汚染が果実表面であることから各果実の表皮を検体とした。Chloramphenicol 添加 Potato dextrose broth を加えて検体乳剤を作製し 10^{-6} まで希釈検体を作製した。検体乳剤および希釈検体を Chloramphenicol 添加 potato dextrose agar に 0.1 ml ずつ塗抹した。25℃で 10 日間培養し、

寒天平板培地上に形成されたコロニー数を計測した。発育した真菌を網羅的に同定するため、コロニーを目視による性状ごとに分類し、この分類群を網羅するように単離した。まずプレパラートを作成して検鏡し、カビまたは酵母によって分類した。カビでは、*Aspergillus* 属、*Cladosporium* 属、*Fusarium* 属、*Penicillium* 属および未同定株に分類し、それぞれに適した形態学的指標および分子生物学的指標によって総合的に判断し、同定を行った。酵母であった場合、最初に生化学的指標によって同定を行い、これで同定できなかった場合に、酵母に適した形態学的指標および分子生物学的指標によって総合的に判断し、同定を行った。*Fusarium* 属以外とみなされた分離株については、18S リボソーム RNA 遺伝子 (rDNA)、Internal Transcribed Spacer region 1 (ITS1)、5.8S rDNA、ITS2 および 28S rDNA を含む rDNA 関連遺伝子群の遺伝子塩基配列を用いた。*Fusarium* 属とみなされた分離株については、 β -tubulin 遺伝子 (β -*tub*) の遺伝子塩基配列を用いて同定した。

2. 細菌の清涼飲料水の汚染と防御方法に関する研究

昨年度の開封試験および口飲み試験の結果を参考に、茶系飲料、果汁飲料、野菜ジュース、炭酸飲料(果汁入りサイダー)、スポーツドリンク(果汁入り)、ミルク入りコーヒー飲料、ニアウォーター、ミネラルウォーターの 8 種類を用いた。飲料はすべて PET ボトル入りの物を使用した。供試菌株には、昨年度の研究で得られた環境および人の口飲みから飲料水への自然汚染した菌株を主に使用した。細菌として、*Lactobacillus fermentum*、*Streptococcus salivarius*、*Micrococcus luteus*、*Enterobacter cancerogenus*、*Enterococcus faecalis*、*Klebsiella pneumoniae* の 5 株、酵母として、*Candida albi-*

cans、*Rhodotorula mucilaginosa*、*Saccharomyces cerevisiae* の3株、毒素食中毒細菌として、*Staphylococcus aureus*(A型毒素産生株)、*Bacillus cereus*(エンテロトキシン産生株)、*Salmonella* Typhimurium および *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 (VT2産生株) の4株とした。

3. 真菌の清涼飲料水の汚染と防御方法に関する研究

試験には細菌の試験と同じく茶系飲料、果汁飲料、野菜ジュース、炭酸飲料(果汁入りサイダー)、スポーツドリンク(果汁入り)、ミルク入りコーヒー飲料、ニアウォーター、ミネラルウォーターの8種類を用いた。供試カビ株には、*Aspergillus sydowii*、*Aureobasidium pullulans*、*Cladosporium cladosporioides*、*Exophiala xenobiotica*、*Penicillium expansum* の5菌種を使用した。飲料のPETボトルを開封し、中身を半分捨てた。PDA寒天培地で10日間前培養したコロニーから孢子懸濁液を作成し、100 cfuに相当する菌液を飲料に接種した。特に発育の良い菌種に関しては10 cfuに接種菌数を落した実験もあわせて行った。接種したペットボトルは消費者が冷蔵庫に飲料を保存する場合を想定した10℃、もしくは室温保存を想定した25℃で28日間培養した。カビは菌塊を形成するため菌数計算ができない場合が多いので肉眼的に観察し、カビの発育を確認できた場合を陽性とし、飲料3サンプル中の陽性サンプル数を計数した。

4. 清涼飲料水の殺菌・除菌方法の妥当性

85℃・30分の殺菌効果の確認のために、非芽胞形成菌として、大腸菌(*Escherichia coli*)、サルモネラ(*S. Abony* および *S. Typhimurium*)、腸球菌(*Enterococcus faecalis*) および黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)、芽胞形成菌と

して枯草菌(*Bacillus subtilis*) およびセレウス菌(*Bacillus cereus*)を供試した。菌液または芽胞液(約 10^7 cfu/ml)を滅菌済みバイアルに入れ、85℃のオイルバスに完全に浸漬し、30分間加熱後、流水で急冷した。これを適宜希釈し、標準寒天培地に原液および希釈液を接種し、培養後コロニー数を確認して菌数を測定した。

海外の清涼飲料水の微生物関連規格基準の情報収集については、International Life Sciences Institute of Japan (ILSI Japan: NPO 法人 国際生命科学研究機構)の国際協力委員会や国内の研究協力者からアメリカ、イギリス、ドイツの基準や情報を入手した。得られた情報を取り纏め、日本の清涼飲料水の殺菌基準(製造基準)との対比を行い、殺菌の妥当性に関する考察を行った。

C. 研究結果

1. 清涼飲料水の腐敗原因微生物の特定のための微生物同定方法の確立

①真菌同定のための遺伝子指標に関する研究

1菌株対1菌株のDNA-DNAハイブリダイゼーション実験を行うために必要な合計DNA量である約13 μgのDNAを回収するためには、最低でも650 μgの精製前DNA用意する必要があると考えられた。決定したハイブリダイゼーションの条件は、至適温度が42℃、ハイブリダイゼーションに要する反応時間が10時間であった。マイクロプレートに固着させるDNA量は1wellあたり1 μg、およびハイブリダイゼーションバッファーに含まれるプローブDNAの濃度がバッファー1mlあたり0.5 μgが適当であった。*F. oxysporum* DNAをプローブに用いた場合、3回の繰り返し実験の発光強度の平均値±標準偏差は、子牛胸腺DNAでは 4920.3 ± 471.8 、*B. fluva*では 43216.7 ± 974.1 、*F. verticillioides*で

は 52728.0 ± 1507.1 、ポジティブコントロールである *F. oxysporum* では 53721.7 ± 2429.5 を示した。この数値を用いて全ゲノムレベルでの塩基配列相同率を推定した。その結果、DNA-DNA ハイブリダイゼーションから得られた相同率は、 β -*tub* 塩基配列相同率とよく相関することが示された。

②果実における真菌叢の解析

合計 190 の真菌株を分離し、これらの同定を行った。平均真菌総生菌数について、最も高い値が検出された果物はマスクメロンで $6.5 \log \text{cfu/g}$ で、最も低い値が検出された果物はレモンで $3.1 \log \text{cfu/g}$ であった。総真菌生菌数に占める酵母とカビの占有率を比較したところ、酵母のほうが高かった果実はイチゴ、ナシおよびリンゴであり 58.5 から 67.0% であった。残りの6種の果実では酵母はカビよりも低い占有率を示し、9.8 から 48.3% であった。各果実における特定の真菌種の陽性検体数については、最も頻度高く検出された真菌の属は *Cladosporium* 属で全ての果物種から検出され、次いで頻度が高かったのは *Penicillium* 属で8つの果物種から検出された。また、マイコトキシンを産生する可能性のある真菌種が市販国産果実に生菌数は低いことが示された。

2. 細菌の清涼飲料水の汚染と防御方法に関する研究

茶系飲料では、*E. cancerogenus*、*K. pneumoniae*、*C. albicans* および *R. mucilaginosa* は 25°C および 35°C で顕著な増殖を認めた。保存時間に伴う濁りの発生は、24 時間後では *L. fermentum* および *E. cancerogenus* に、48 時間後では *E. cancerogenus*、*C. albicans* および *R. mucilaginosa* (25°C のみ) で認められた。果汁飲料では、*C. albicans*、*R. mucilaginosa* および *S. cerevisiae* は著しく増殖した。濁りのほか浮遊

物および気泡の発生が認められた。野菜ジュースでは、*L. fermentum*、*E. cancerogenus*、*C. albicans*、*R. mucilaginosa* および *S. cerevisiae* では著しい増殖が認められた。炭酸飲料およびニアウォーターではすべての菌で生育は認められなかった。ミルク入りコーヒー飲料では、*L. fermentum*、*S. salivarius*、*E. faecalis*、*E. cancerogenus* および *K. pneumoniae* は顕著な増殖が認められた。

毒素産生性細菌の接種試験実験では、茶系飲料で *S. Typhimurium* および EHEC O157:H7 は 25°C 、 35°C ともに比較的良好に生育したが、静置条件に比べ振盪条件では生育が抑制された。野菜ジュースでは *S. Typhimurium* が 35°C で比較的良好に生育した。ミルク入りコーヒー飲料では 25°C では静置条件、振盪条件ともに *S. Typhimurium*、EHEC O157:H7 が比較的良好に増殖した。毒素産生性は、茶系飲料およびミルク入りコーヒー飲料において EHEC O157:H7 の増殖にともない毒素が産生されることが確認された。茶系飲料は 25°C の静置条件で凝集価 1:2 倍、 35°C で凝集価 1:8 倍の毒素が検出された。ミルク入りコーヒー飲料は、 25°C の静置条件で凝集価 1:8 倍、振盪条件で凝集価 1:32 倍、 35°C の静置条件で凝集価 1:64 倍の毒素が検出された。また、ミルク入りコーヒー飲料では *S. aureus* の増殖がみられたが毒素は検出されなかった。*B. cereus* は、いずれの条件でも菌の生育はみられなかった。

3. 真菌の清涼飲料水の汚染と防御方法に関する研究

Aureobasidium pullulans は非常に発育がよく、 25°C 培養では茶系飲料、果汁飲料、野菜ジュース、スポーツドリンクで培養 2 日目から発育を確認できた。*Cladosporium cladosporioides* も非常に発育がよく、 25°C 培養では茶系飲料、果汁

飲料、野菜ジュース、スポーツドリンク、ニアウォーターで培養2から3日目の間に発育が見られた。10℃培養でも発育がよく、茶系飲料で培養4日目、果汁飲料、野菜ジュースで7日目に発育が認められた。*Penicillium olsonii*の発育は比較的良好、25℃培養では茶系飲料、果汁飲料、野菜ジュースで培養2日目に、スポーツドリンクは3日目に発育が見られた。茶系飲料、果汁飲料、野菜ジュースでは、10℃培養でも7日後には菌の発育が認められた。*Exophiala xenobiotica*の発育は他の菌種に比べて若干弱い、25℃培養で茶系飲料、果汁飲料、野菜ジュースにおいて7日目に発育が認められた。他のカビと異なり、ミネラルウォーター中でも発育速度は比較的良好であった。

飲料種ごとにみると、25℃培養で最もカビの発育が良い飲料種は茶系飲料、果汁飲料、野菜ジュース、スポーツドリンク、ニアウォーターであり、培養2日目からカビの発育が認められた。ミネラルウォーターでは培養7日目からカビの発育が見られた。ミルク入りコーヒー飲料は14日目から発育が見られた。一方、10℃培養では20℃培養に比べて全体的に発育速度が遅くなるが、培養4日目に茶系飲料で発育が認められ、7日目から果汁飲料や野菜ジュース中での発育が見られるようになった。スポーツドリンク、ミルク入りコーヒー飲料、ニアウォーター、ミネラルウォーター中ではやや遅れて、培養10から14日目にかけて発育が見られるようになった。これらの飲料の中で、茶系飲料、果汁飲料、野菜ジュース、スポーツドリンクは培養温度に係らず良好な発育が認められた。

4. 清涼飲料水の殺菌・除菌方法の妥当性

大腸菌、サルモネラ、腸球菌および黄色ブドウ球菌はいずれの菌株でも85℃・30分の加熱条件で生菌数が7~8桁程度減少した。一方、

85℃・30分の条件では、枯草菌芽胞の減少はほとんど見られなかった($D_{85^{\circ}\text{C}}=114.9$ 分および357.2分)。セレウス菌に関して一株はほとんど減少しない($D_{85^{\circ}\text{C}}=142.9$ 分)のに対し、別の一株は2~3桁程度減少した($D_{85^{\circ}\text{C}}=8.74$ 分)。

米国 Food and Drug Administration (FDA)の規定では殺菌条件は規定しておらず、メーカー側で責任を持って適切な殺菌条件とプロセスを設定し、HACCPに準拠した運用を実施することとなっていた。また、EUでも清涼飲料水に対する殺菌条件は規定されておらず、EUの一般衛生指針で規定されているのは各メーカーが製品を製造する際の食品安全・衛生に関する責任、流通における安全確保についての要求であり、結果的にはHACCPの遵守とトレーサビリティの確立が求められているのみであった。

D. 考察

1. 清涼飲料水の腐敗原因微生物の特定のための微生物同定方法の確立

①真菌同定のための遺伝子指標に関する研究

従来のメンブレンに固着させる方法よりも簡便な、カビのDNAをマイクロプレートに固着させたDNA-DNAハイブリダイゼーションを行い、ハイブリッドDNAを感度の高いDIG-AP-CSPD反応系を用いて定量的に検出できる実験系の構築に成功した。これによって、カビの全ゲノムレベルでの塩基配列相同率が推定できることが示された。本研究において得られた全ゲノムレベルでの塩基配列相同率は、過去の研究で系統解析によく用いられ解像度の高い結果が得られることが知られる β -tubの塩基配列の相同率とよく相関していることが明らかとなった。よって、DNA-DNAハイブリダイゼーションから得られた全ゲノムレベルでの相同率を*Fusarium*属菌の系統解析に適用すれば、従来の系統樹よ

りも解像度の高い系統樹の構築できる可能性
があることが示唆された。今後、複数遺伝子の
塩基配列の系統解析では明らかにすることがで
きなかつた *Fusarium* 属菌をはじめとする真菌の
系統推定のツールとして、マイクロプレートを用
いた DNA-DNA ハイブリダイゼーションを活用
が期待される。

②果実における真菌叢の解析

Cladosporium 属菌が最も頻度高く検出され
たが、*Cladosporium* 属菌は、果実仕分け場およ
び市場など多様な場で幅広く分布する普遍的
な真菌であることが知られており、本研究の結
果はこれを反映したものであると考えられた。本
研究の結果では、*Penicillium* 属菌の総生菌数
に占める占有率は、2種類のかんきつ類を除き、
比較的低かったが、*Penicillium* 属菌の胞子は
果実表面に付着する頻度は高いものの、果実
が傷ついていない健全な状態にあった場合に
は活着・増殖はしないということを示唆してい
る。よって、市場病害として頻繁に検出され
ることが知られる菌種は、果物が健全な状態
での真菌叢においては優占的な役割を果たし
てはいないが、菌数が低くある程度の頻度で
存在するので、果実の腐敗や完熟などで感
染のファクターが高まった場合に一気に増殖
するのであろうと推測された。よって、果実
が過熟や流通過程において傷ついた場合に
は、汚染が広がり、重要な汚染真菌となり
うるので注意が必要である。清涼飲料水の
原料となる果実については、清涼飲料水の
腐敗を防止して食品の健全性を守ることに
留意し、真菌叢の優占菌種となっている非
病原真菌に注目した管理を行うことが重要
である。

2. 細菌の清涼飲料水の汚染と防御方法に関する研究

茶系飲料のカテキン含有量は 57 mg/100 ml

(酒石酸鉄法によるタンニン量として)であり、茶
系飲料としては一般的なものである。カテキン
はグラム陽性菌に対する抗菌性があるといわ
れているが、腸内細菌や酵母が増殖する可能
性があり、消費者への情報提供が必要である
と考えられる。野菜ジュースでは *L. fermentum*、*E.*
cancerogenus および *K. pneumoniae* の増殖が
認められた。*L. fermentum* では濁りの発生が
観察されたが、これはペットボトルのレベル
を剥がして観察したものであり、消費者が
日常的に飲用する場合には気づかないと思
われる。接種した酵母 3 菌株は茶飲料、果
汁飲料、野菜ジュースおよびスポーツドリ
ンクで増殖が認められた。これは酵母の栄
養要求性によるものと考えられる。一方、
ミルク入りコーヒー飲料ではほとんどの細
菌の増殖が顕著であったが、*M. luteus* お
よび酵母の増殖は認められなかった。これ
は本試験に供した製品中の添加物など配
合成分の影響によることが考えられる。腐
敗レベルに達すれば消費者は味に異常を感
じそれ以上飲用しないと思われるが、市
場では多様なミルク入りコーヒー飲料が
流通していることから、さらなる検討が
必要である。食中毒菌の増殖および毒素
産生性が認められたことから、健康被害
の可能性が明らかになった。消費者およ
び製造者の認識と啓発が必要と考えら
れる。

3. 真菌の清涼飲料水の汚染と防御方法に関する研究

飲料種別のカビの発育状況を見てみると、茶
系飲料、果汁飲料、野菜ジュース、スポ
ーツドリンクで発育が強く見られた。ミ
ルク入りコーヒー飲料での発育は他の飲
料と比べて遅れる傾向にあったが、こ
れは飲料に透明性がないためカビの発
育が肉眼で観察しにくいことがひとつ
の原因と考えられた。これに対して、野
菜ジュースも飲料自体に透明性がな
いが、カビが非常に

強く発育するため、肉眼的に発育を検出するのは容易であった。*A. sydowii* や *E. xenobiotica* は他のカビに比べて全体的に飲料中での発育は強くはなかったが、この 2 菌種はミネラルウォーター中では他のカビより強く発育した。このようにカビは菌種によって発育に適した飲料は異なるが、炭酸飲料を除くすべての飲料に対して発育に適したカビが存在することが明らかになった。以上のことから、開封後の清涼飲料水の保管においてカビの存在は大きな脅威となることが確認された。

4. 清涼飲料水の殺菌・除菌方法の妥当性

85°C・30 分の加熱は、非芽胞形成細菌に対しては既知の情報にあるように十分であると考えられた。芽胞形成細菌であっても、これまでの知見から、芽胞が形成されていない栄養細胞の状態であれば 85°C・30 分の加熱で同様の殺菌効果が得られると考えられる。これらのことから、細菌の栄養細胞を対象とした場合、85°C・30 分の加熱で少なくとも 7 桁程度の菌数の減少が期待できると推察される。芽胞に対しては、枯草菌で十分な芽胞数の減少が見られなかったことは妥当な結果であると考えられた。セレウス菌では、100°Cでの D 値は 3 分前後であることが一般的に知られているが、血清型によって耐熱性が異なることが知られている。また、芽胞の耐熱性はデンプン分解性と相関があることが知られており、デンプンを分解する菌株は $D_{95^{\circ}\text{C}}=4.1\sim 7.0$ 分、デンプン非分解性の菌株は $D_{95^{\circ}\text{C}}=6.3\sim 25$ 分と報告されており、本研究で用いたデンプンを分解する株の方が遙かに耐熱性が弱く、既知の情報と同じ傾向であった。本研究での供試株は、加熱試験の妥当な指標菌と考えられものに該当するものはなかったため、さらに検討が必要と考えられた。

海外での基準については、欧米諸国におい

て、日本のように綿密な微生物の殺菌基準が清涼飲料水では決められていないことが今回の調査で明らかとなった。欧米での主要品目別消費・生産量は炭酸飲料とボトルドウォーターが主であり、炭酸飲料は炭酸による静菌作用で微生物による腐敗・変敗が起こりにくく、ボトルドウォーターも栄養がほとんどないことから、顕著な微生物による食中毒リスクは低いことから殺菌基準の設定がさほど必要とされていないものと考えられる。しかし、日本では pH が中性に近い茶系飲料が非常に大きなシェアを占め、微生物がよく増殖することが明らかになっている。そのため、少なくとも食中毒リスクを排除するため、pH と水分活性で区分した清涼飲料水ごとに指標菌の設定など具体的な試験方法が示されることが必要と考えられる。

E. 結論

1. 清涼飲料水の腐敗原因微生物の特定のための微生物同定方法の確立

①真菌同定のための遺伝子指標に関する研究

Fusarium 属菌を同定する際に、種間の系統関係が明らかにされていないことが要因となって、従来の遺伝子指標を用いても同定が不可能である菌種が複数見られる。この問題を解決するためには、解析に参加する情報量を多くしより解像度の高い確からしい系統樹を得て、同種と異種の境界を明瞭にする必要がある。そこで本研究では、DNA-DNA ハイブリダイゼーションの手法を用いてゲノム全体での塩基配列相同性を検証し、これに基づいた系統樹による体系的な分類方法の確立を最終的な目的として、①カビ DNA を用いたマイクロプレートでの DNA-DNA ハイブリダイゼーションの実験系の

確立、および②この実験系を用いた *Fusarium* 属菌種間での全ゲノムレベルの塩基配列相同率の推定を行った。同一の菌株から取得した β チューブリン遺伝子 (β -*tub*) 塩基配列の相同率と比較したところ、全ゲノムレベルでの相同率は β -*tub* 塩基配列の相同率とよく相関することが明らかとなった。よって、DNA-DNA ハイブリダイゼーションから得られた全ゲノムレベルでの相同率を *Fusarium* 属菌の系統解析に適用すれば、従来の系統樹よりも解像度の高い系統樹の構築が可能となることが示唆された。

②果実における真菌叢の解析

清涼飲料水の原料となる種類の国産果実の真菌叢は、植物の自然の真菌叢および栽培環境から店頭で販売されるに至る間の環境の真菌叢を反映したものであることが明らかとなった。また、市場病害菌およびマイコトキシン産生菌の総生菌数に占める占有率は低いことも示され、健全な状態の果実を原料とする場合、これらの真菌による清涼飲料水の腐敗およびヒトへの直接の健康危害のリスクは低いことが示された。しかし、強い殺菌を施すことができない清涼飲料水などの最小限の加工食品で、果実の自然の真菌叢や環境分布真菌など非病原真菌が原料に付着して混入し、貯蔵が適切でない場合は増殖して食品の健全性を失わせる原因となることが考えられる。このことから、食品衛生的な観点において、清涼飲料水の原料となる果実については、清涼飲料水の腐敗を防止して食品の健全性を守ることに留意し、真菌叢の優占菌種となっている非病原真菌に注目した管理を行うことが重要である。

2. 細菌の清涼飲料水の汚染と防御方法に関する研究

清涼飲料水のpH、Brix(%)あるいは炭酸ガスまたは栄養源の有無など、製品の特性によって

微生物動態が異なった。とくに茶系飲料、野菜ジュースおよびミルク入りコーヒー飲料では著しく生育する菌株が認められた。また、これら3種類の清涼飲料水に毒素産生性細菌を接種し静置および振盪条件で保存したところ、静置条件で毒素の産生が認められたものの振盪条件では産生が認められない菌株があり、飲料の種類によっては振盪により菌の増殖性に影響を与える可能性があることが分かった。口飲み・開封時に混入する微生物の発育性は、製品の特性によって異なることから、製品開封後の飲用に関する表示は、十分配慮する必要があることが示唆された。

3. 真菌の清涼飲料水の汚染と防御方法に関する研究

清涼飲料水の飲用時に起こるカビによる腐敗を解析するために各種清涼飲料水への接種試験を行った。飲料種と菌種の組み合わせにより菌の発育に差は見られたが、全体的に茶系飲料、果汁飲料、野菜飲料、スポーツドリンクで菌の発育が特に良好であった。菌種では *A. pullulans*、*C. cladosporioides*、*P. olsonii* が顕著な発育を示した。25℃の発育環境では培養2日後に菌の発育が多く認められた。10℃の発育環境でも4日目には菌の発育が認められる例があった。多くの菌では10℃で培養すると、25℃で培養した場合と比較して発育速度は低下したが、発育そのものを阻止することはできなかった。以上の結果から、開封・飲用後の室温放置は避けること、また10℃でも短期間のうちに多くのカビの発育が認められたことから、冷蔵庫を過信せず開封・飲用後の飲料は速やかに消費するように消費者に啓蒙していく必要性を確認できた。

4. 清涼飲料水の殺菌・除菌方法の妥当性

85℃・30分の加熱殺菌は大腸菌などの栄養

細胞を殺滅するに十分な条件であると考えられた。しかしながら、菌種や菌株による違いはあるものの、芽胞に対してこの条件はほとんど効果がないことも検証された。適切な指標菌の設定が必要であると考えられる。また、欧米には日本の食品衛生法で定められているような pH や水分活性で区分した清涼飲料水の製造基準はなく、製造業者に対する指針が概説されているのみであった。日本では微生物増殖のしやすい茶系飲料が消費の主流であるため、殺菌・除菌の指標となる具体的な試験法が必要と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Watanabe, M., Tsutsumi, F., Konuma, R., Lee, K., Kawarada, K., Sugita-Konishi, Y., Kumagai, S., Takatori, K., Konuma, H. and Hara-Kudo, Y. Quantitative analysis of mycoflora on commercial domestic fruits in Japan. *Journal of Food Protection*. In press.

Watanabe, M., Lee, K., Goto, K., Kumagai, S., Sugita-Konishi, Y. and Hara-Kudo, Y. Rapid and effective DNA extraction method with bead grinding for a large amount of fungal DNA. *Journal of Food Protection*. 73, 1077-1084, 2010.

Watanabe, M., Yonezawa, T., Lee, K., Kumagai, S., Sugita-Konishi, Y., Goto, K. and Hara-Kudo, Y. Evaluation of genetic markers for identifying isolates to of the species of the genus *Fusarium*. *Journal of the Science and Agriculture*. In revision.

Watanabe, M., Masaki, H., Mori, T., Tsuchiya, T., Konuma, H., Hara-Kudo, Y., Sugita-Konishi, Y. and Takatori, K. Inacti-

vation effects of UV irradiation and ozone treatment on the yeast and mold in mineral water. *Journal of Food Protection*. 73, 1537-42. 2010.

Watanabe, M., Tsutsumi, F., Lee, K., Sugita-Konishi, Y., Kumagai, S., Takatori, K., Hara-Kudo, Y. and Konuma, H. Enumeration of Fungi in Fruits by the Most Probable Number Method. *Journal of Food Science*. 75, M564-M567. 2010.

Lee, K., Watanabe, M., Sugita-Konishi, Y., Hara-Kudo, Y. and Kumagai, S. *Penicillium camemberti* and *Penicillium roqueforti*, the Starter Molds of Mold-Ripened Cheese, Enhance the Growth and Survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 under Mild Acidic Conditions. *Journal of Food Science*. Submitted.

Watanabe, M., Yonezawa, t., Lee, K., Kumagai, S., Sugita-Konishi, Y., Goto, K. and Hara-Kudo, Y. Molecular phylogeny of the higher and lower taxonomy of the *Fusarium* genus and differences in the evolutionary histories of multiple genes. *BMC Evolutionary Biology*. Submitted.

小沼 ルミ, 瓦田 研介, 井上 雅史, 宮崎 巖, 飯田 孝彦, 浜野 智子, 渡辺麻衣子, 工藤由起子. 桐たんすの変色部に生育した糸状菌の分離および同定. 防菌防黴, 印刷中.

Moe, K., Mimura, J., Ohnishi, T., Wake, T., Yamazaki, W., Nakai, M. and Misawa, N. The mode of biofilm formation on Smooth surfaces by *Campylobacter jejuni*. *J. Vet. Med. Sci.* 74: 411-416, 2010

大西 貴弘. 国産ミネラルウォーターのエンドトキシン濃度測定による水源およびその製造

- 所における細菌汚染検出の試み. 日本食品微生物学雑誌. 27:141-145, 2010.
- 後藤 慶一. DNA 塩基配列に基づくカビ・酵母の同定法-食品の汚染・変敗にかかわる分類群への適用を中心に-. 日本食品微生物学会雑誌, 27(2), 56-62, 2010.
- 後藤 慶一、大西 貴弘、渡辺 麻衣子、神田 隆、金澤 裕司、小澤 一弘、餅田 薫、田中 裕子、藤田 理英子、吉田 義博、松本 幸平、大谷 俊次、杉山 寛治、小沼 博隆、高鳥 浩介、工藤 由起子. 清涼飲料水の開封・口飲み保管により検出される微生物. 日本清涼飲料研究会編、「第 20 回研究発表会」講演集、33-38、2010.
- Hara-Kudo, Y. and Takatori, K. Contamination level of food borne pathogens in food associated with the infections. *Epidemiology and Infection*. In press.
- 田中 廣行、土屋 禎、大島 赴夫、鈴木 達也、工藤 由起子. 技能試験データに基づく細菌数の不確かさの推定. 日本食品微生物学会雑誌. 27: 158-162, 2010.
- 森 哲也、田中 廣行、和田 真太郎、伊藤 武、宇田川 藤江、工藤 由起子. 市販の生食用カット野菜、カット果実およびスプラウトの微生物汚染調査. 日本食品微生物学会雑誌. 27: 163-170, 2010.
- Ohtsuka, K., Tanaka, M., Ohtsuka, M., Takatori, K. and Hara-Kudo, Y. Comparison of detection methods for *Escherichia coli* O157 in beef livers and carcasses. *Foodborne Pathogen and Disease*. 7:1563-1567. 2010.
2. 学会発表
- 渡辺 麻衣子、米澤 隆弘、李 謙一、熊谷 進、小西 良子、後藤 慶一、工藤 由起子. *Fusarium* 属菌の同定に適する遺伝子指標の評価. 第 30 回日本食品微生物学会学術総会, 大津, 2010. 09.
- 小沼 ルミ、渡辺 麻衣子、工藤 由起子、小西 良子、高鳥 浩介、一戸 正勝、瓦田 研介. 炭素源資化性分析を用いた糸状菌同定の検討. 第 37 回日本防菌防黴学会年次大会, 東京, 2010. 09.
- Watanabe, M., Hara-Kudo, Y., Tsutsumi, F., Lee, K., Kumagai, S., Sugita-Konishi, Y., Takatori, K. and Konuma, H. Rapid enumeration methods for fungi in fruit by the most probable number method. IAFP 2010, Anaheim, California, 2010.8.
- 渡辺 麻衣子、堤 史行、小沼 ルミ、李 謙一、瓦田 研介、小西 良子、熊谷 進、高鳥 浩介、小沼 博隆、工藤 由起子. 市販国産果実における真菌叢の解析. 日本食品衛生学会第 100 回, 熊本, 2010. 9.
- 小沼 ルミ、渡辺 麻衣子、工藤 由起子、小西 良子、高鳥 浩介、一戸 正勝、瓦田 研介. 炭素源資化性分析を用いた糸状菌同定の検討. 第 37 回日本防菌防黴学会年次大会, 東京, 2010. 9.
- 神田 隆、金澤 裕司、小澤 一弘、後藤 慶一、小沼 博隆、杉山 寛治、工藤 由起子. 清涼飲料水の開封・口のみでの汚染物質の挙動解析. 第 100 回日本食品衛生学会. 平成 22 年 9 月
- 大西 貴弘、後藤 慶一、金澤 裕司、小澤 一弘、神田 隆、杉山 寛治、渡辺 麻衣子、小沼 博隆、工藤 由起子. 清涼飲料水の開封・口のみによって生じる微生物汚染での原因菌の解析. 第 31 回日本食品微生物学会. 平成 22 年 11 月.

分 担 研 究 報 告 書

清涼飲料水の腐敗原因微生物の特定のための
微生物同定方法の確立

工藤 由起子

分 担 研 究 報 告 書

清涼飲料水の腐敗原因微生物の特定のための
微生物同定方法の確立

協力研究報告書

真菌同定のための遺伝子指標に関する研究

工藤 由起子

平成 22 年度 厚生労働科学研究費補助金(食の安心・安全確保推進研究事業)

清涼飲料水中の汚染原因物質に関する研究

研究代表者 工藤 由起子 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)

分担研究報告書

清涼飲料水の腐敗原因微生物の特定のための微生物同定方法の確立

研究分担者 工藤 由起子 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)

協力研究報告書

真菌同定のための遺伝子指標に関する研究

研究要旨

Fusarium 属菌は、植物の病原体や土壌微生物として広く分布する真菌である。分離された *Fusarium* 属菌を同定する際に、種間の系統関係が明らかにされていないことが要因となって、従来の遺伝子指標を用いても同定が不可能である菌種が複数見られる。この問題を解決するためには、解析に参加する情報量を多くしより解像度の高い確からしい系統樹を得て、同種と異種の境界を明瞭にする必要がある。そこで本研究では、DNA-DNA ハイブリダイゼーションの手法を用いてゲノム全体での塩基配列相同性を検証し、これに基づいた系統樹による体系的な分類方法の確立を最終的な目的として、①カビ DNA を用いたマイクロプレートでの DNA-DNA ハイブリダイゼーションの実験系の確立、および②この実験系を用いた *Fusarium* 属菌種間での全ゲノムレベルの塩基配列相同率の推定を行った。最初に、*Byssoschlamys fulva* から DNA 抽出を行い、塩化セシウム密度勾配法による DNA の精製およびマイクロプレート DNA-DNA ハイブリダイゼーションの条件検討を行った。次に、この実験条件を用いて、*Fusarium* 属菌2菌種の DNA-DNA ハイブリダイゼーションを行い、供試菌株間の全ゲノムレベルの相同率を測定した。この結果を同一の菌株から取得した β チューブリン遺伝子 (β -*tub*) 塩基配列の相同率と比較したところ、全ゲノムレベルでの相同率は β -*tub* 塩基配列の相同率とよく相関することが明らかとなった。よって、DNA-DNA ハイブリダイゼーションから得られた全ゲノムレベルでの相同率を *Fusarium* 属菌の系統解析に適用すれば、従来の系統樹よりも解像度の高い系統樹の構築が可能となることが示唆された。

研究協力者

渡辺 麻衣子、鎌田 洋一 (国立医薬品食品衛生研究所)

後藤 慶一 (三井農林株式会社 食品総合研究所)

A. 研究目的

微生物の食品汚染を制御するためには、汚染微生物を正確に同定してそれらの生態を把握すること、また疫学的に汚染経路を明らかにすることが必要である。真菌の同定方法は、従来は形態学的観察に頼った方法が主流であった。しかし形態学的手法による同定は、特徴を見出すのに特別な熟練技術が求められることに加え、培養が必要で時間がかかる。そこで近年、真菌同定について、分子生物学的手法の持つ簡便性・迅速性・客観性が注目され、分子生物学的手法が取り入れられてきた。形態学的指標のみでは同定が困難であった分離菌株の同定が可能となった例も多数報告され(4)、強力な同定ツールとなっている。このような真菌の同定の場合おける流れに対応して、本研究課題では初年度の平成 20 年度にカビおよび酵母を含む幅広い菌種の真菌を対象として、分子生物学的研究に不可欠な真菌細胞からの効率の良い DNA 抽出の方法を検討し、報告した(17)。同定のためのマーカーとなる遺伝子としては、菌種間の系統関係とよく相関するという報告がある *rRNA* 遺伝子 (*rDNA*) 塩基配列(10)、 β チューブリン 遺伝子 (β -*tub*)(12) および elongation factor 1 α 遺伝子 (*EF-1 α*)(9)などが用いられている。

Fusarium 属菌は、植物の病原体や土壌微生物(7)として広く分布する真菌である。清涼飲料水からの本属菌の分離例も複数報告されている(1)。清涼飲料水の原料を含めた多くの青果物からしばしば検出されることが知られ、本研究課題の平成 22 年度の成果からも清涼飲料水の原料となりうる国産青果物から頻度高く検出されることが報告された。よって市販の清涼飲料水に微生物汚染による腐敗・変敗事故が発生した場合には、*Fusarium* 属菌がその原因となる可能性も高い。また、*Fusarium* 属菌は

マイコトキシンの産生菌としても知られ、過去、日本を含む世界各地で、trichothecene 系化合物や zearalenone に代表される *Fusarium* 属菌産生マイコトキシンの汚染された食品または飼料を摂取したことによるヒトおよび家畜の中毒事故が報告されている(6)。本属菌に汚染された飲料を摂取した場合の病害との因果関係は不明であるものの、飲料に対する *Fusarium* 属菌の汚染についても注意が必要である。以上の観点から、*Fusarium* 属菌は衛生学上大変重要な真菌である。

Fusarium 属菌の同定についても、前述のように胞子の形態、胞子形成様式、寒天培地上の集落の性状など主に形態学的指標を用いた方法を用いて行われてきたが、これら形態学的手法による同定が特に困難であることが知られている。その理由として、*Fusarium* 属菌は別種とされている菌種を比較した場合にも菌種特異的な形態的差異が乏しい分類群が多数存在すること、それにもかかわらず他属菌と比較して菌種内の多様性が著しく大きく、同種と異種の境界が明瞭でない場合が多いことなどが挙げられる。近年は *Fusarium* 属菌の分類・同定においても、遺伝子塩基配列の解析をはじめとした分子生物学的手法が盛んに行われ、 β -*tub* や *EF-1 α* 遺伝子の塩基配列を解析することによってある一定の成果をあげている(9)。しかし、これらの遺伝子塩基配列の解析による同定は、ある特定の分類群においては種レベルまでの同定が可能であることが示されているものの、別の分類群に適用した場合は、データベース上で利用可能な塩基配列登録数が十分でなく比較が不可能、また塩基配列の差異が近縁種を識別するための情報を有していないなどの問題が残されており、*Fusarium* 属菌同定のための新たな遺伝子マーカーの開発が必要である。

また、DNA-DNA ハイブリダイゼーションを用いて測定されたゲノム全体の相同率は、細菌や酵母において形態学的性状や生化学的性状といった絶対的な菌種の定義とよく相関していることが報告されており(11)、リファレンスとの相同率が80%以上であれば同種、40から80%であれば同種内のバリエーション、40%以下であれば異種であるとみなすことができるとの報告がある(14)。DNA-DNA ハイブリダイゼーションによる全ゲノムレベルの相同性の検証は細菌や酵母の分類・同定方法として広く行われる手法であるが、カビでは実施された例がそれほど多くない(15, 16)。また、カビではメンブレンフィルターにDNAをドットする方法を用いるよりも簡便なマイクロプレートにDNAを固着させる方法による例がなく、まずカビでこの方法を確立する必要がある。

そこで本研究では、DNA-DNA ハイブリダイゼーションの手法を用いてゲノム全体での塩基配列相同性を検証し、これに基づいた系統樹を構築して、体系的な分類方法の確立することを最終的な目的として、①カビDNAを用いたマイクロプレートでのDNA-DNA ハイブリダイゼーションの実験系の確立、および②この実験系を用いた *Fusarium* 属菌種間での全ゲノムレベルの塩基配列相同率の推定を行った。

B. 材料と方法

1. 供試検体

最初に、カビDNAを用いて塩化セシウム密度勾配法によるDNAの精製およびマイクロプレートでのDNA-DNA ハイブリダイゼーションの実験系を確立するために、大量のDNA抽出が *Fusarium* 属菌よりも簡単に行える菌種を用いた条件検討を行った。供試菌株としては、本研究課題で平成20年度に検討されたDNA抽出効率比較検討の結果において、供試された13

菌種中最もDNA抽出効率の高かった *Byssoschlamys fulva* NBRC 31877を用いた。次に、確立した実験系を用いて、*Fusarium* 属菌で塩化セシウム密度勾配法によるDNAの精製およびDNA-DNA ハイブリダイゼーションを行い、供試菌間の全ゲノムレベルの相同率を測定した。供試菌株としては、従来の複数遺伝子塩基配列を用いた解析では系統関係を明確に示すことができなかった *Gibberella fujikuroi* species complex (図4)に属する菌種の中から *F. verticillioides* を、本 species complex には含まれないが最も近縁であることが確実な菌種として *F. oxysporum* を選択した。菌株は、CBS576.78 *F. verticillioides* および MAFF 240304 *F. oxysporum* を用いた。

全ての菌株は、PDA 斜面培地を用いて25°Cで7日間前培養した後、形成された菌糸体および胞子を複数本の1,000 ml 三角フラスコに入れた各々400 ml のポテトデキストロス液体培地(PDB, Difco Laboratories, Franklin Lake, アメリカ)に接種し、25°Cで65から70時間振盪培養した。得られた菌体をメンブレンフィルター上に採取して可能な限り水分を絞り取る処理を行った。採集した菌体を100 mg ずつに分割したものを検体とし、マイクロチューブに入れて使用するまで-80°Cで冷凍保存した。

2. DNA 抽出方法

本研究課題の平成20年度に検討されたDNA抽出効率比較検討の結果において幅広い種類の真菌で最も効率よく質の良いDNAが得られることが示された cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) 法とビーズ破砕の併用法(17)を用いてDNA抽出を行った。CTABは陽イオン界面活性剤である。100 mgの菌体が入った各マイクロチューブに800 µlのCTAB buffer (100 mM Tris-HCl pH

8.0, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2 % CTAB, 0.2 % 2-mercaptoethanol) を加え、ボルテックスミキサーを用いて十分に細胞を懸濁した。これを 65°C で 30 分間数回上下反転させながら反応させた。得られた細胞溶解液に等量のフェノール/クロロホルム(1:1)を加えて 20 分間上下反転させながら十分に攪拌し、15,682×g、室温で 10 分間遠心分離した後、水層を新たなマイクロチューブに移した。ここに 15 µl の RNase A (10 mg/ml, Novagen, Darmstadt, ドイツ)を加え、37°C で 3 時間反応させた。反応後、さらに等量のクロロホルムを加えて 20 分間上下反転させながら十分に攪拌し、15,682×g・室温で 10 分間遠心分離して、精製された DNA を含む水層を得た。これに得られた水層の 2 倍量の冷却したイソプロパノールおよび 5M NaCl を適量加えて DNA を沈殿させた後、沈殿物を 500 µl の 70 %エタノールでリンスし、真空乾燥機で乾燥させて DNA 塊を得た。これを 100 µl の Tris-EDTA buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) に溶解させ、使用するまで 4°C で保存した。

3. 塩化セシウム密度勾配法を用いた DNA の精製方法

菌体より抽出した粗 DNA 溶液は、塩化セシウム密度勾配法により精製した。本方法の手順を図 1 に示した。まず、1 ml の粗 DNA 溶液に 1 g の塩化セシウムを溶解した。ここにエチジウムブロマイド溶液 (10 mg/ml ; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, アメリカ) を 50 µl 加えよく攪拌し、塩化セシウム/エチジウムブロマイド/DNA 溶液とした。また、1 ml の TE buffer (pH 8.0) に 1 g の割合で塩化セシウムを加えた溶液 1 ml に対しエチジウムブロマイド溶液(10 mg/ml) を 80 µl 加え、塩化セシウム/エチジウムブロマイド溶液を作製した。次に、1 ml の塩化セシウム/エチジウムブロマイド/DNA 溶液に 2.5 ml

の 塩化セシウム/エチジウムブロマイド 溶液を加えよく攪拌し、室温で 3700 rpm・10 分間遠心分離して浮遊物を除去した。この後、この溶液を超遠心チューブ (OptiSeal Polyallomer 型番 361623; Beckman Coulter, Inc., Brea, アメリカ) に移し、その上から順に塩化セシウム/エチジウムブロマイド溶液、ミネラルオイルを適量ずつ加え、付属の栓でチューブを密閉した。これを、卓上型超遠心機 (Beckman TLA-110; Beckman Coulter, Inc., Brea, アメリカ)を用いて 25°C・75,000 rpm・24 時間遠心分離した。遠心分離後、取り出したチューブに 367 nm の UV を照射して DNA バンドを可視化させ、1 ml のディスプレイブル注射器と 21G の注射針をチューブ壁に刺して DNA バンドを吸い取った。回収した DNA バンドを含む溶液について、この溶液を DW で 2 倍に希釈し、DNA 溶液と等量のイソアミルアルコールによるエチジウムブロマイド抽出を 3 回繰り返す、DNA 溶液からエチジウムブロマイドを除去した。この後、得られた DNA 溶液を DW で 2 倍に希釈し、エタノール沈殿によって DNA 溶液から DNA を精製した。ここに TE バッファーを適量加え、1.0 mg/ml の精製 DNA 溶液に調整した。

4. マイクロプレート DNA-DNA ハイブリダイゼーション法による真菌の全ゲノム相同性推定

96 well マイクロプレートを用いた DNA-DNA ハイブリダイゼーション法による真菌の全ゲノム相同性推定の手順を図 2 に示した。

最初に、Tanabe ら(2)の方法を参照し、マイクロプレートへのターゲット DNA の固着を行った。マイクロプレートは発光強度の計測時にノイズをできるだけ抑えるために、白色 96 well マイクロプレート (Costar, Corning, New York, アメリカ)を用いた。DNA を 1 本鎖にするために、10 µl の精製 DNA 溶液を沸騰水浴中で 5 分間加熱した後、直ちに氷冷した。そこに、50 µl