遺伝子検出による迅速微生物解析技術の開発 —地域食品工場における実現可能性の検討—

富永達矢^{1*}, 増田こずえ¹, 関根正裕²

¹ 埼玉県産業技術総合センター北部研究所

² 埼玉県産業技術総合センター

Development of a Rapid Microorganism Analysis System Based on Gene Detection : A Regional Food Factory Feasibility Study

Tatsuya Tominaga^{1*}, Kozue Masuda¹ and Masahiro Sekine²

¹ Saitama Industrial Technology Center North Institute, 2-133, Suehiro, Kumagaya, Saitama 360-0031

² Saitama Industrial Technology Center, 3-12-18, Kamiaoki, Kawaguchi, Saitama 333-0844

A coliform flora analysis method using real-time polymerase chain reaction (PCR) was developed. The amplified region targeted was *lacZ*, encoding β -galactosidase. Forty-two species belonging to 16 genera of coliform bacteria were successfully detected. Specific primers were designed to detect the genus *Klebsiella*/*Enterobacter* and the genus *Citrobacter*, allowing for the discrimination of coliform bacteria into 3 groups. Quantification of bacterial numbers ranged from 10^3 to 10^6 cfu per PCR reaction vessel. Differences in flora between vegetables and meat, and among various factory locations, were able to be detected. Finally, sources of contamination were investigated in a real food factory. Coliform bacteria were detected in 23 out of a total of 32 samples. As a result of cluster analysis, 4 potential sources of contamination during the manufacturing process were proposed for the 2 products. Analysis of the flora was completed in approximately 5 hours; thus, a rapid contamination source search system has been developed. (Accepted May 20, 2014)

Keywords : coliform bacteria, real-time PCR, β -galactosidase, analysis of flora, contamination source tracking

キーワード : 大腸菌群, リアルタイム PCR, 乳糖分解酵素, フローラ解析, 汚染源探索

1. はじめに

加工食品の製造において、最も危惧されることのひとつが食中毒菌の混入である。万が一食中毒事件が発生した場合、社会的な影響の大きさは計り知れない。食中毒菌による汚染を未然に防ぐため、食品製造者は大腸菌群などの衛生指標菌を用い、日常的な衛生管理に努めている。ここで、食品から規定量以上の大腸菌群が検出された場合、汚染源を探索して早急に除去する必要に迫られる。しかし、大腸菌群は工場内の常在菌であり、拭き取り試験を行えば至るところから検出され、製造ライン全体を大掛かりに清掃・洗浄をせざるを得なかった。

大腸菌群は、乳糖を分解して酸とガスを産生するグラム陰性の無芽胞桿菌と定義され、腸内細菌科の多くの細菌が属する¹⁾。至適温度や pH などの生育条件は株により様々

であり²⁾³⁾、工場から検出される大腸菌群も場所により異なると考えられた。そこで、食品と工場内拭き取りサンプルのフローラ解析を行ってその類似性を調べれば、製品汚染と因果関係のある場所を推定できると思われた。

これまでに我々は、大腸菌群のフローラを解析するための寒天培地セット (MAC キット: コージンバイオ(株)) および大腸菌群汚染源探索サービス (Rapicom: アース環境サービス(株)) を開発し、実用化した⁴⁾⁵⁾。これにより、優先順位をつけた工場内の清掃・洗浄が可能となり、労力や時間、コストの削減につながった。しかし、本技術の普及が進むにつれ、新たな課題が生じた。MAC キットでは培養工程を要するため、フローラが判明するまで 24 時間以上かかる。汚染が発生した際には、一刻も早い汚染源の特定と除去が必要となるため、フローラ解析時間の短縮を強く要望された。

¹ 〒360-0031 埼玉県熊谷市末広 2-133, ² 〒333-0844 埼玉県川口市上青木 3-12-18

*連絡先 (Corresponding author), tatsuyatominaga@gmail.com

近年、細菌の定量法として、リアルタイム PCR 法が普及してきた^{6)~10)}。長大なゲノム DNA (数百万 bp) の中から特定の DNA 断片 (数百 bp) だけを選択的に増幅できる技術で、増幅に要する時間は数時間である。増幅の過程を蛍光物質によりモニタリングし、あらかじめ量が分かっているサンプルの希釈系列で検量線を作製しておけば、未知サンプルの定量が可能になる。そこで本研究では、大腸菌群のフローラ解析にリアルタイム PCR 法を適用し、迅速な汚染源解明技術の確立を目指した。

2. 大腸菌群検出プライマーの設計

まず始めに全ての大腸菌群を増幅可能なプライマーの設計を試みた。一般に菌種の同定や区別には 16S rDNA が用いられるが、大腸菌群の 16S rDNA の配列は大腸菌群に属さない近縁種とも類似しており、大腸菌群のみ増幅するようなプライマーの設計するのは困難に思われた。そこで、16S rDNA よりも進化速度の速い遺伝子領域でプライマーの設計を試みた。大腸菌群はその定義から乳糖を分解できるため、分解酵素 (β -ガラクトシダーゼ) を有する。 β -ガラクトシダーゼは *lacZ* 遺伝子にコードされている。*lacZ* 遺伝子のうち保存性が高い領域を選び、プライマーを設計することにした。大腸菌群に属する細菌でゲノム配列がインターネット上で公開されているものの中から、*Citrobacter koseri*, *Cronobacter sakazakii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* について、各々の *lacZ* 遺伝子配列を取得した。その配列 (*C. koseri* : 3078 bp, *E. coli* : 3075 bp, *E. cloacae* : 3087 bp, *E. sakazakii* : 3132 bp, *K. pneumoniae* : 3108 bp) について相同性を調べ、5 種の細菌間で保存性の高い領域に対し PCR プライマー 1F1R (5'-CTG GAA GAY CAG GAY ATG TGG CGS ATG AGC GG-3', 5'-CAG CGC ACG GCG TTR AAR YTG TKC TGC TTC AT-3') を設計した。PCR 反応は総量を 50 μ L とし、5 μ L の 10 $\times$ amplification buffer, 0.2 mM dNTP mixture, 2.5 U ExTaq DNA polymerase (タカラバイオ社), 0.5 μ M の各プライマー, 0.5 μ L の鋳型 DNA を含む反応液で行った。増幅反応は Master gradient (エッペンドルフ社) にて行った。反応液は鋳型 DNA の二本鎖解離のため 94 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱した後、94 $^{\circ}$ C で 1 分間、55 $^{\circ}$ C で 1 分 30 秒間、72 $^{\circ}$ C で 1 分間の反応を 1 サイクルとしてこれを 30 サイクル繰り返し、72 $^{\circ}$ C で 5 分間反応させ PCR 反応を行った。過去の文献にて *lacZ* 遺伝子の PCR による増幅が報告されたプライマーを合成し対照とした¹¹⁾¹²⁾。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動にて分離し、臭化エチジウムにて染色後、紫外線下で目的の大きさのバンドの有無で確認した。

1F1R による PCR では、大腸菌群 26 株すべてで PCR 産物が得られたが、対照プライマーによる PCR では 3 株で PCR 産物が得られたのみであった。過去の文献でも、試験した菌株のうち約 70% の菌株でしか PCR 反応で増幅が確

表 1 PCR にて検出された大腸菌群

<i>Buttiauxella agrestis</i>	<i>Escherichia vulneris</i>
<i>Cedecea davisae</i>	<i>Hafnia alvei</i>
<i>Cedecea neteri</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Citrobacter braakii</i>	<i>Kluyvera ascorbata</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Kluyvera cryocrescens</i>
<i>Citrobacter koseri</i>	<i>Kluyvera intermedia</i>
<i>Citrobacter rodentium</i>	<i>Leclercia adecarboxylata</i>
<i>Citrobacter sedlakii</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>
<i>Citrobacter werkmanii</i>	<i>Pectobacterium carotovorum</i>
<i>Cronobacter sakazakii</i>	<i>Raoultella ornithinolytica</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Raoultella planticola</i>
<i>Enterobacter amnigenus</i>	<i>Raoultella terrigena</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Serratia ficaria</i>
<i>Enterobacter hormaechei</i>	<i>Serratia fonticola</i>
<i>Erwinia aphidicola</i>	<i>Serratia grimesii</i>
<i>Erwinia persicina</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>
<i>Escherichia albertii</i>	<i>Serratia odorifera</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Serratia plymuthica</i>
<i>Escherichia fergusonii</i>	<i>Yersinia bercovieri</i>
<i>Escherichia hermannii</i>	<i>Yersinia rohdei</i>

表 2 PCR にて検出されなかった細菌

<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Lactobacillus sakei</i>
<i>Enterococcus malodoratus</i>	<i>Leuconostoc gasicomitatum</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Weissella soli</i>

認されず、新たなプライマーの設計の必要性が述べられていた¹¹⁾。1F1R では、このプライマーよりも PCR で増幅される菌株数が大幅に増加し、表 1 に示した食品から検出された報告例のある大腸菌群^{13)~15)} や食品から分離した大腸菌群 16 属 42 種で PCR 反応が確認された。なお、食品製造現場で大腸菌群とともに検出されることの多い乳酸菌 (8 種) や芽胞菌 (2 種) では PCR 産物は見られず (表 2)、設計したプライマーの特異性を確認できた。

3. 大腸菌群内グループ分けプライマーの設計

大腸菌群のフローラ解析に利用するため、特定の大腸菌群株では PCR 産物を得られるが、それ以外の株では PCR 産物を得られない 2 組の特異的プライマーセット A および B を (1F1R の内部に) 設計した。プライマーセット A (5'-A TCC AGG ATA TGT GGC GGA TGA GC-3', 5'-CCG CGT TCA TCA ATA ATC TCA CTG C-3') では *Citrobacter* 属の細菌で PCR 増幅が確認できたが、これらの細菌に対してプライマーセット B (5'-AAC GGC AAA CCG CTG CTG ATC CGC GGC GT-3', 5'-CAG CGC ACG GCG TTA AAG TTG TTC TGC TTC AT-3') では PCR 産物が確認されなかった。逆に、プライマーセット B では

図1 大腸菌群グループ分けのイメージ

Klebsiella 属, *Enterobacter* 属および近縁の *Raoultella* 属の細菌で PCR 増幅が確認できたが, これらに対してプライマーセット A では PCR 産物が確認されなかった. 図1に示した通り, プライマーセット A で検出される大腸菌群を C グループ, プライマーセット B で検出される大腸菌群を KE グループ, いずれのプライマーでも検出されない大腸菌群を CKE 外グループとすると, 大腸菌群を3グループに区分できる. 3種類のプライマーを用いた PCR により, 大腸菌群の識別が可能になる.

4. リアルタイム PCR による定量検討

リアルタイム PCR は, PCR 反応で増幅中の DNA を随時定量する手法である. DNA 量が既知のサンプルで検量線をあらかじめ作製しておけば, 未知サンプルの DNA 量を評価できる. 1F1R, A, B 各々のプライマーセットを用いたリアルタイム PCR で定量性を調べた. PCR の反応液は溶液総量を 50 μ L とし, iQ SYBR Green Supermix (バイオラッド社) を 25 μ L, 0.5 μ M のプライマー混合液に細菌培養液を添加した. ゲノム抽出工程は省略した. 増幅反応は iCycler (バイオラッド社) を用いて行った.

Enterobacter amnigenus を被検菌としてプライマーに 1F1R を用いた PCR では, PCR 反応容器あたり $10^3 \sim 10^6$ cfu の菌数が存在したときの log (菌数) と Ct 値の相関係数が 0.99 であった. 同様に, *Citrobacter freundii* にプライマーセット A を用いた PCR では $10^3 \sim 10^6$ cfu の菌数で相関係数 0.99, *Enterobacter cloacae* にプライマーセット B を用いた PCR では $10^2 \sim 10^6$ cfu の菌数で相関係数は 0.99 であった. 以上の結果から, ゲノム抽出工程を省略しても, 一定の菌濃度において定量可能であることが示唆された. 市販キットを使用した場合, ゲノム抽出工程に数十分から数時間要するため, この工程の省略はフロー解析の迅速化において重要である.

5. 濃縮法の検討

食品の生菌数検査は以下のように実施される¹⁾. 食品 25 g に 225 mL の滅菌希釈水を加え, 粉碎・均質化して試料原液とする. 試料原液およびその段階希釈液を 1 mL, 培地に添加して 20~48 時間培養する. PCR を行う際, PCR 溶液に添加できる試料原液は 10 μ L が上限である. 検出するのに 10^4 cfu/mL 以上の大腸菌群濃度が必要となり, 試料原液 225 mL 中に 10^6 cfu 以上の大腸菌群が混入していなければ検出できないことになる. 食品 1 g あたりに換算すると 10^5 cfu 以上の大腸菌群に相当する. このような高濃度の大腸菌群に汚染された食品は稀であり, さらに検出感度を向上させる必要がある. ここで, 試料原液 225 mL 全量を PCR 溶液に供することが可能ならば, PCR チューブあたり 10^2 cfu 以上の大腸菌群が存在すれば, PCR 反応によりシグナルを検出できる. この濃度は, 食品 1 g あたりの大腸菌群混入数で 10 cfu 以上に相当し, 実際に起こる食品汚染のレベルに即した試験が可能になる. そこで, 試料原液を濾過してフィルター上に大腸菌群を捕捉し, 菌体をフィルターから洗い出して PCR 溶液に添加し, 大腸菌群を濃縮することとした. フィルターにはセルロースやプラスチックなどを素材とするものが知られている. これらのうちの素材が適するか調べるために, 滅菌水に *Citrobacter freundii* を懸濁した溶液を調製し, 各々のフィルター (0.4 μ m 孔径) で濾過した. 菌体を滅菌水で洗い出して PCR 反応を行い, Ct の値から回収率を計算した (表3, 方法1). 回収率は高くても 16% 程度であった. そこで, 菌体の洗い出しに界面活性剤を用いて溶媒を調製し, これを用いて再度試験した. 回収率は全般に改善し, 高いものでは 68% を記録した (表3, 方法2). 濃縮工程がない場合よりも 10000 倍以上感度が向上した. これは, 10^2 cfu/g 以上の食品汚染を検知可能であることを意味する. 実際の食品の汚染度に近い水準のサンプルを検査可能になった.

表 3 大腸菌群懸濁液の濃縮

	回収率 (%)	
	方法 1	方法 2
プラスチック系フィルター A	0	68
プラスチック系フィルター B	10	54
プラスチック系フィルター C	16	37
セルロース系フィルター A	3	32
セルロース系フィルター B	2	14
プラスチック系フィルター D	5	4

表 4 食品の大腸菌群フローラ解析

	フローラ (%)		
	CKE 外グループ	C グループ	KE グループ
食肉	0	91	9
野菜	98	0	2

6. 市販食品の分析

本技術を用いて実際の食品の大腸菌群フローラを解析し、実現可能性を検証した。食肉、野菜の試料原液を調製して菌体をフィルターで濃縮した後、PCR を用いてフローラ解析を行った。Ct 値と検量線から推定される菌数を示した (表 4)。食肉では C グループが 91%, KE グループが 9% と構成比が判明した。一方、野菜では C グループは検出されず、KE グループが 2%, それ以外の大腸菌群が 98% を占めた。以上の結果から、食肉と野菜の大腸菌群フローラの差異を捉えることができた。食品の処理からフローラ解析結果が得られるまでに要した時間は 5 時間程度であった。

7. 工場内拭取り試験

大腸菌群は株ごとに温度、pH、塩濃度など至適生育条件は異なり、生育環境が異なれば、フローラも異なると推測されることから、実際の加工食品工場内各所で拭取り検査を行い前述の PCR 法によりフローラを調べた。拭取り検査にはスワブを用いて、製造場所、製造機械、洗浄場の表面を一定面積 (10cm×10cm) 拭取り 10mL リン酸緩衝液に懸濁した。懸濁液について、食品と同様の処理を行い、場所間のフローラの相違を調べた (表 5)。調べた 7ヶ所のうち、ほとんどの場所で C グループは検出されず、KE グループが優占していた。しかし、洗浄場では、C グループが 49%, KE グループが 51% を占めており、ほかの場所とは明らかに異なるフローラ構成であった。PCR 法を用いて場所間のフローラの相違を検知できることが確認された。

8. 食品工場におけるフィールド試験

PCR 法を用いたフローラ解析によって、食品間ないし製造場内各所間のフローラの相違を検出できた。そこで、本

表 5 拭取りサンプルの大腸菌群フローラ解析

	フローラ (%)		
	CKE 外グループ	C グループ	KE グループ
製造場所 1	0	0	100
製造場所 2	0	0	100
製造場所 3	0	0	100
製造場所 4	0	0	100
製造機械 1	0	0	100
製造機械 2	0	0	100
洗浄場	0	49	51

表 6 食品工場における大腸菌群汚染源探索

		フローラ (%)		
		CKE 外グループ	C グループ	KE グループ
拭取り	2	0	13	87
拭取り	3	0	0	100
拭取り	7	0	0	100
拭取り	8	0	98	2
拭取り	9	96	0	4
拭取り	10	67	0	33
拭取り	11	0	0	100
拭取り	13	67	22	11
拭取り	14	0	10	90
拭取り	15	0	100	0
拭取り	16	0	99	1
拭取り	17	0	0	100
拭取り	18	0	98	2
拭取り	20	0	52	48
洗浄槽	W2	71	21	8
洗浄槽	W3	0	95	5
食品	A	47	34	19
食品	B	0	17	83
食品	C	0	1	99
食品	D	0	6	94
食品	E	0	0	100
食品	F	0	27	73

技術を食品の汚染源探索に適用可能であるか検証するため、食品とその製造工程における拭取り試験を実施した。本工場では 6 ラインで具材を加工し、最終ラインで具材を適宜混合し、複数の製品を出荷している。製造機械表面の拭取り 13ヶ所 (No.1~No.13)、工場床表面の拭取り 7ヶ所 (No.14~No.20)、洗浄槽の溶液 6 種類 (W1~W6)、製品 6 種類 (A~F) について試験した。総計 32 サンプルのうち、9 サンプルで 1F1R プライマーによる増幅が確認できなかった。これらのサンプルは、併せて行った全ての大腸菌群が検出可能な ECC 寒天培地による試験においても、生菌が確認されなかった。よって、大腸菌群の検出の有無について、PCR 法と培地を用いた培養法による試験結果が一致した。大腸菌群が検出されたサンプルについてフローラ解析を行った (表 6)。23 サンプル中、7 サンプルでは C グループが 49%, KE グループが 51% を占めており、ほかの場所とは明らかに異なるフローラ構成であった。PCR 法を用いて場所間のフローラの相違を検知できることが確認された。

図 2 クラスター分析

ループを確認できなかった。逆に 23 サンプル中、7 サンプルでは KE グループの存在比が 5% 以下であった。サンプルによってフローラ構成は多様であり、本解析法によって食品間、場所間のフローラの相違を捉えることができた。食品と最も類似したフローラを示す場所を特定するため、クラスター分析を行った (図 2)。原データの距離計算はユークリッド距離を用い、合併後の距離計算はウォード法を適用した。製品 C、E と同一クラスターを形成した場所は 3、7、11、17 であり、汚染源候補として推定された。これらの場所はすべて同一製造ライン上であった。共通の汚染源があるものと考えられた。

9. 培養法と PCR 法の比較

本研究では、リアルタイム PCR 法を用いた大腸菌群フローラ解析法を開発した。通常の PCR 法において検出に必要な菌数は食品 1g あたり 10^2 cfu 以上であり、従来の平板培地を用いた手法 (培養法) と比較すると 10 倍以上感度が低い。また、PCR 法は培養法より検出誤差が大きくなるため、フローラを構成するグループ間における構成数の差が 10 倍以上ある場合にはその相違を検出できるが、それより差が小さい場合には構成比の精度が低下し、フローラ構成の特徴を大雑把にしか把握できない。さらに、製品が殺菌されていても DNA が残存している場合、培養法では菌の生育はみられないが、PCR 法では検出されることになる。このような問題点は残るものの、培養法では試験結果を得るまでに 20 時間以上を要するため、製造したその日のうちにフローラを解析するのは難しい。この点、PCR 法では食品の処理からフローラ解析までに数時間要するのみである。培養法による試験結果が明らかになる前にクラスター分析を終えることができる。その結果、当該サンプルが単一菌に汚染されていたか複数の菌に汚染されていたか分かり、日配食品の出荷前に検査結果を得られる。PCR 法により汚染源候補を推定し、培養法によりその候補をしぼりこめば、迅速かつ精度の高い大腸菌群汚染源の特定が可能になる。

今回、野菜工場における実証試験を行った。今後は惣菜や食肉など様々な食品工場において同様の実証試験を行う予定である。また、大腸菌群以外にも、食品工場では乳酸菌、芽胞菌などによる汚染が問題となる。これらの細菌フローラをリアルタイム PCR 法により検出する技術を開発する予定である^{16)~18)}。そして、新しい衛生管理手法として本技術を実用化し、地域における食の安心・安全の実現に向けて貢献していきたいと考えている。

文 献

- 1) 食品衛生検査指針 微生物編 (2004).
- 2) Anderson, K.L., Whitlock, J.E. and Harwood, V.J., Persistence and differential survival of fecal indicator bacteria in subtropical waters and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 3041-3048 (2005).
- 3) Gordon, D.M., Geographical structure and host specificity in bacteria and the implications for tracing the source of coliform contamination. *Microbiology*, **147**, 1079-1085 (2001).
- 4) 富永達矢, 本多春樹, 関根正裕, 食品製造工程における微生物検出技術の開発に関する研究, 埼玉県産業技術総合センター研究報告, **4**, 72-75 (2006).
- 5) 富永達矢, 本多春樹, 関根正裕, 食品製造工程における微生物検出技術の開発, 埼玉県産業技術総合センター研究報告, **5**, 66-70 (2007).
- 6) Hein, I., Lehner, A., Rieck, P., Klein, K., Brandl, E. and Wagner, M., Comparison of different approaches to quantify *Staphylococcus aureus* cells by real-time quantitative PCR and application of this technique for examination of cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 3122-3126 (2001).
- 7) Martinez-Blanch, J.F., Sánchez, G., Garay, E. and Aznar, R., Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of enterotoxigenic members of *Bacillus cereus* group in food samples. *Int. J. Food Microbiol.*, **135**, 15-21 (2009).
- 8) Nam, H.M., Srinivasan, V., Gillespie, B.E., Murinda, S.E. and Oliver, S.P., Application of SYBR green real-time PCR assay for specific detection of *Salmonella* spp. in dairy farm environmental samples. *Int. J. Food Microbiol.*, **102**, 161-171 (2005).
- 9) Omiccioli, E., Amagliani, G., Brandi, G. and Magnani, M., A new platform for real-time PCR detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157 in

- milk. *Food Microbiol.*, **26**, 615-622 (2009).
- 10) Sails, A. D., Fox, A. J., Bolton, F. J., Wareing, D. R. and Greenway, D. L., A real-time PCR assay for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods after enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 1383-1390 (2003).
- 11) Fricker, E. J. and Fricker, C. R., Application of the polymerase chain reaction to the identification of *Escherichia coli* and coliforms in water. *Lett. Appl. Microbiol.*, **19**, 44-46 (1994).
- 12) Bej, A. K., McCarty, S. C. and Atlas, R. M., Detection of coliform bacteria and *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction : comparison with defined substrate and plating methods for water quality monitoring. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 2429-2432 (1991).
- 13) Olsson, C., Ahrné, S., Pettersson, B. and Molin, G., DNA based classification of food associated *Enterobacteriaceae* previously identified by Biolog GN Microplates. *Syst. Appl. Microbiol.*, **27**, 219-228 (2004).
- 14) Lindberg, A. M., Ljungh, Å., Ahrné, S., Löfdahl, S. and Molin, G., *Enterobacteriaceae* found in high numbers in fish, minced meat and pasteurised milk or cream and the presence of toxin encoding genes. *Int. J. Food Microbiol.*, **39**, 11-17 (1998).
- 15) Stiles, M. E. and Ng, L. K., Biochemical characteristics and identification of *Enterobacteriaceae* isolated from meats. *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 639-645 (1981).
- 16) 富永達矢, 関根正裕, 細菌構成相解析によるアドバンスドサニタリーシステムの開発, 埼玉県産業技術総合センター研究報告, **6**, 74-77 (2008).
- 17) 富永達矢, 関根正裕, 細菌構成相解析によるアドバンスドサニタリーシステムの開発 (3), 埼玉県産業技術総合センター研究報告, **8**, 29-34 (2010).
- 18) 富永達矢, 関根正裕, 細菌構成相解析によるアドバンスドサニタリーシステムの開発 (2), 埼玉県産業技術総合センター研究報告, **7**, 36-40 (2009).

(平成 26 年 5 月 20 日受理)