

第1節

微生物検査法のバリデーションの概略

1. 微生物検査の目的と検査法の分類

1.1 生菌検出と特定菌検出

微生物検査法の目的は、生菌検出と特定菌検出に分かれる。例えば、殺菌処理の確認のためには非特異的な生菌検出が必要となる。代表的な菌種を指標として、その生菌を選択的に測定する方法でも実用的に間に合う場合もあるが、基本は、どんな菌種でも殺菌されなかった菌はすべて検出されるという方法が理想である。一方、微生物汚染によって疾病が発生した場合の原因究明では、特定菌の同定が不可欠である。また、発酵食品や乳製品など生菌を含む食品の管理においても、食中毒菌のみを選択的に検出することが必要である。

1.2 培養法と非培養法

微生物検査の化学検査と異なる点は、検査対象の量が検査中に変化することである。それどころか、検査対象を培養して増やすことが検査法の基本になっている。培養の理由は2つある。生菌検出の場合は、増殖することが「生きている」ことを示す最も信頼できる指標だからである。特定菌検出の場合は、十分量の菌が単離された状態で得られれば、直接、菌種特異的なプローブ(遺伝子や抗原を認識して、これに選択的に結合する性質を持った化学物質)で確認できるので培養の必要はない。しかし、通常は雑多な成分の中に極微量の菌がいるだけであるから、選択培地でその菌のみを選択的に増殖させる「前処理」が必要である。この前処理なしでは、「非特異的なノイズ」*の影響が無視できないことが多いので、やはり培養法が基本となる。

これらの「培養法」に対して、直接細胞を検出する「非培養法」が種々開発され、迅速法として利用されてきた(表-1, 表-2)。共存物質が少ない場合や対象菌が十分量ある場合は、有効な検査法として信頼性も高く、学術研究に利用された例は多い。しかし、食品検査の場合のように妨害物質やノイズの原因となる雑多なものが共存している場合は、信頼性の確保が難しい。少なくとも、現時点では、国の内外を問わず公定法あるいは公認法の妥当性確認の基準となっているのは「培養法」である。

ところで、顕微鏡によって1個の細胞が分裂して2個になることが確認できれば、短時間で生菌検出ができることになる。また細胞の成長に伴う形状の変化を顕微鏡観測できれば、それによって細胞が生きていることを迅速に検知できる。また、菌の種類によっては、ある程度増殖してマイクロコロニーを形成し、その段階で増殖が停止してしまうような場合もある。これらの場合は培養法のカテゴリーであるから、その妥当性確認が得られやすく、しかも迅速に結果が得られる利点がある。しかし、例えば顕微鏡と画像処理装置を組み合わせた高価な装置が必要であったり、あるいは同時に処理でき

*：光学的なノイズの意味で、例えばDNAと結合して蛍光を発する試薬で染めたのに、DNA以外の混合物が同様に染まって蛍光を発する場合があります。これが非特異的な光のシグナルとなる。これをノイズと言う。

表-1 生菌検出法

迅速性	培養・非培養の別	原理・指標	検出・計測法	文献
通常培養法	培養法	固体培地上に生成したコロニー(肉眼で検知できる大きさ)を計数	寒天培地コロニー計数法 フィルム, 不織布などのシート状培地でのコロニー計数法	1)~3)
		液体培地中で増殖した菌体量を測定, あるいは重量で計測	液体培地培養法	
迅速法	マイクロコロニー法(培養法)	固体培地上で生成した, 通常よりはるかに小さなコロニーを計数	蛍光染色後, 顕微計数	4)
	細胞成長顕微解析法(培養法)	真菌の場合で, 細胞成長に伴う形状変化を直接顕微解析	菌糸伸長速度計測法	5), 6)
			酵母出芽形状解析法	7)
	非培養法	色素分子に対する細胞膜透過性の有無によって生死判別。生細胞では透過性なし。色素分子の受動的取込み	蛍光染色法 (PI, DAPI, など)	8), 9)
			レドックス色素を利用した電気化学測定法	
		細胞内エステラーゼ活性。生細胞で活性	エステル型蛍光色素 (FDA, CFDA など) を細胞内導入	10), 11)
		栄養基質取込み活性。生細胞は能動的取込み	蛍光基質法 (2NBDG, NBD-Gly など)	12), 13)
		生細胞が持つ還元力を直接, あるいは適当なメディエーターを介して計測	蛍光色素法	
			NAD法(テトラゾリウム塩の利用など) 電気化学的方法	
		呼吸活性。分子状酸素を電子受容体とした還元力	酸素電極法, 走査型電気化学顕微鏡	14)
生細胞では高エネルギー分子の生成		ATP法(ルシフェリン・ルシフェラーゼ系)	15)	
生細胞では生体高分子(DNA, RNA, 蛋白など)合成	蛋白質定量法			
生細胞では遺伝子発現	GFPなどのレポーター遺伝子を利用して遺伝子発現を可視化			

表-2 特定菌検出法

培養・非培養の別	原理	検出・測定法
培養法	代謝基質の種類に基づく同定法	特異基質培地 特異酵素基質培地 特異代謝産物検出用培地 (pH, CO ₂ , H ₂ など)
非培養法	免疫反応を利用する方法	免疫磁気ビーズ法 イムノクロマト法 蛍光免疫法 ラテックス凝集法
	遺伝子解析に基づく方法	PCR法 ハイブリダイゼーション法

る検体数が少なかったりするために, 食品分析分野に広く普及するには至っていない。

表-1及び表-2の中で, どの検査法が妥当性確認されているのか, という総論的な議論は意味がない。検査対象となる食品マトリックスの種類, その食品中の微生物の種類, そして検出の定性的あるいは定量的目標などの組合せが決まってはじめて, その個別の検査法の妥当性確認の議論が始まるからである。

1.3 生菌分離技術の重要性

非培養法の利点は、単に培養法で得られるはずの結果を迅速に得られるというだけに留まらない。自然界には、①増殖しにくい種類、②化学的増殖阻害要因(貧栄養環境、過剰栄養環境)、③物理的増殖阻害要因(常温常圧から乖離した環境、異常光照射環境、異常電磁場)、④傷害菌、⑤生物的要因(共生菌の影響、拮抗菌の影響)などの理由によって、培養法では検出が困難な菌が少なからず存在するからである。これらを確実に検出できるのは非培養法である。したがって、非培養法は、食品分野に留まらず、医療、環境、日用品などの広い分野で要請されている。

非培養法の原理は光学的計測(蛍光、発光、発色)が中心である。しかし、試料中には不特定の着色物質、蛍光物質が混在している場合が多い。細胞に対する特異性の高いプローブの開発も有効ではあるが、共存妨害物質の除去の方が実用的にはより効果的と考えられ重要である。仮に、有効な特異的プローブが利用できる場合でも、あらかじめ共存妨害物質が除去されていれば、測定感度の向上が期待できる。したがって、菌体をこれらの妨害物質から高効率に分離できれば、その後の非培養検査の信頼性は格段に向上するはずである。また、この分離に際しては「生菌」のまま分離することが肝要である。非培養検査の後、必要に応じて培養によって増殖させ、遺伝子や蛋白質レベルの解析に供することができるようになるからである。

生菌を他の微粒子と分離する原理としては、細胞の電気的性質、細胞半径・密度、細胞表面の認識分子などの違いの利用が考えられる。その原理に基づく具体的な方法としては、図-1に示した膜分離¹⁶⁾、誘電電気泳動¹⁷⁾、密度勾配遠心分離¹⁸⁾のほか、抗体固定化磁気微粒子による磁気分離、あるいは超音波分離などが報告されている。しかし、対象となる微生物細胞のみを生菌の状態に効率良く分離することは、それほど簡単ではない。そして、微生物検査における前処理技術としての体系的な取

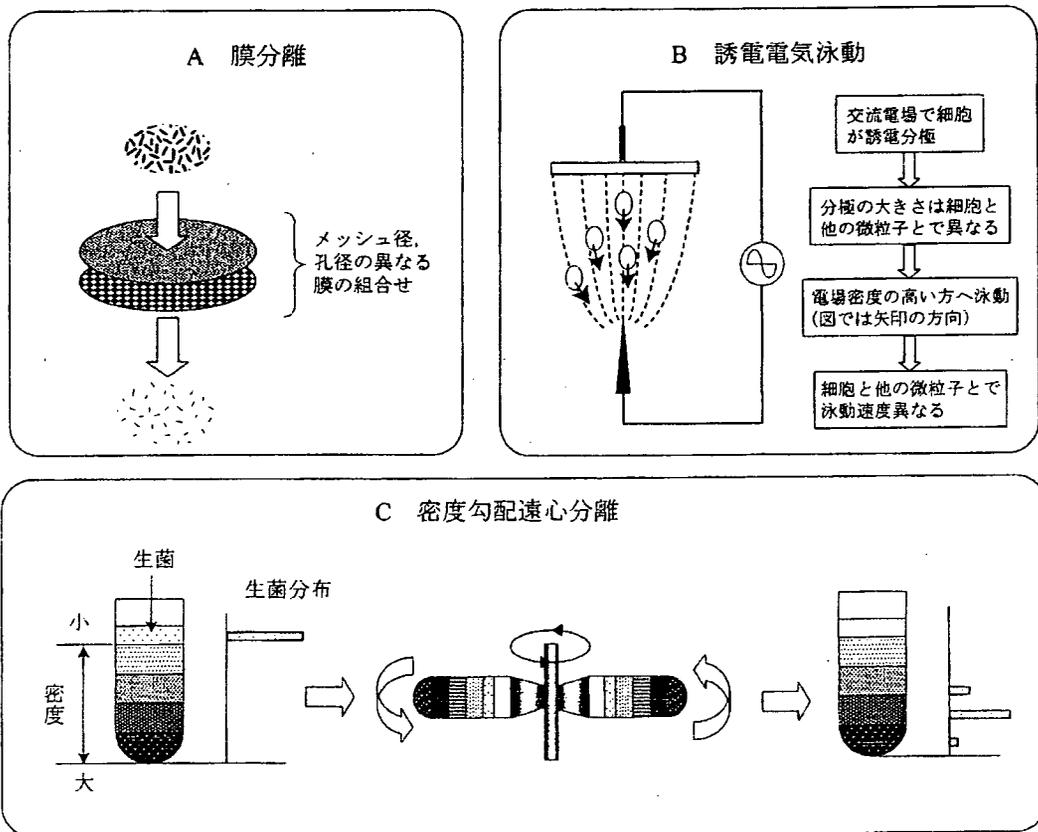


図-1 生菌分離法

組みも、これまでけっして十分なされてきたとは言えない。この問題は、今後の微生物検査技術において戦略的にも重要な研究開発課題であると考えられる。

2. 新しい検査法開発の動機

新しい検査法開発の動機は2つある。1つは行政的要請であり、もう1つは検査技術ビジネス展開の要請である。いずれの場合も、その基になっている社会的要請には共通部分が多いであろうし、また行政的要請の軽重がビジネスの大小にも直結する傾向があるので、その違いを区別することは、一見、無意味かもしれない。しかし、検査法の妥当性確認を考えるうえでは、この動機の違いが非常に重要になってくる。それは、妥当性確認には予想以上に多くのコストと時間がかかるからである。

2.1 行政的要請

行政的要請によって新しい検査法の開発が必要になった場合は、通常、専門分野の研究機関や企業に依頼する。費用は公的資金を基本とするが、企業の開発資金が加わることもあろう。緊急を要する場合が多いので、何とか検査できることが優先し、時間と手間のかかる妥当性確認を入念に行っている余裕がないかもしれない。その任にあたった研究者・技術者にとっては、確実に検査できることが優先するので、自分の経験やノウハウに基づく方法を優先することは自然である。しかし、行政的要請によって実施されることを考えると、誰にでも共通に実施できる方法であることが望ましい。最終的に提示される検査法のプロトコールとしては、随所に幅のある条件が記されたものになる可能性が高い。実際、告示法や通知法として示されてきたわが国の公定法ないし公認法はおおむねこのような記述になっている^{19)・20)}。もともと、専門的知識も経験もある人が見て、適切に判断しながら確実な結果を出すような場合を想定して作成されたのであろう。あるいは、流儀の違う多くの専門家の誰からもクレームがこないようにとの配慮があったのかもしれない。しかし、経験の浅い人がこれを見て実際に検査をしようとする、まったく当惑することになる。実験者の経験や技量の問題は別途考えるべきことではあるが、条件の幅によっては、たとえ知識や経験があっても、検査結果に大きな違いが出る可能性があることは否定できない。そして、そのことが、「誰が実施しても同じ結果が得られること」を基本とする国際的公認法の要件に合致しない大きな理由になっていると考えられるのである。

2.2 検査技術ビジネス展開の要請

企業が自主的に開発に取り組む場合は、当然、資金は自社の開発経費であろう。現行の検査法よりも簡便・迅速・安価で、信頼性の高い検査結果を出せる新しい方法であれば、必ず多くのユーザーが採用するはずだ、との見通しに基づいて開発に踏み切ることになる。想定されるユーザーは、食品の製造・流通・販売を行う企業、及びその衛生状態を監督する立場の公的機関、さらに消費者団体などである。しかし、これらのユーザー側からすれば、その検査法が公定法ないし公認法となっているかどうかは採否の重要な判断基準になる。海外のユーザーの場合は、当然のことながら、国際的公認法になっていることが必須になってくる。したがって、開発費に勝るとも劣らない費用を自ら投入してでも国際的に通用するような妥当性確認を行う必要が出てくる。

ビジネス展開の視点では、もう一つ別のニュアンスの動機がある。食品製造・流通・販売企業が、自社だけでしか行っていない“先端的な”検査法で製品の安全性をしっかりとチェックしていることを、宣伝のために採用したいというものである。他社との差別化には格好の材料かもしれないが、科学技術者としては戸惑いを禁じ得ない。そもそも食品の安全性は、いくら頑張ってみたところで科学的に100%保証できるものではないが、それだからといって、最初からイメージ戦略の一つくらいにしか考えない姿勢は、技術開発者に対する冒瀆に近い。

3. 検査法開発から妥当性確認までの流れ

新しい微生物検査法の開発に取り組んでから、それが公認法になるまでの流れは、おおむね図-2のようになる。重要なのは、最終的に公認法として登録することを目標にするにしても、これを国内の公認法に留めておくのか、国際的な公認法にまでするのか、さらに、国際的と言っても具体的にどの国での利用を想定するのか、ということを考えておくことである。化学分析の場合の流れも基本的には同じであるが、微生物試験の場合、例えば図-2の①の段階で、「従来法との相関を確認する」という箇所があって、それが極めて高いハードルになっている。微生物検査法における従来法は「培養法」である。したがって、どの培地を使用するかが規定されなければならない。しかし、培地には通常、多くの未知成分が含まれているため、メーカーが異なれば成分も異なると考えるのが自然であろう。そのため、仮に同図の①～③の段階で一貫して日本のメーカーの培地を用いていたが、④の段階で対照にすべき国際基準の従来法が、海外の培地を使用するように規定されていた場合どうなるか。おそらく、そこに規定されている培地と日本製の培地との等価性が示されない限り、①～③までの作業を、海外の培地で最初からやり直さなければならないということになってしまうのではないかと。

また、①～③の国内段階では、実験条件がある程度幅のある条件で良しとしていたものが、④の国際段階でプロトコルの不備と指摘されることがあり得る。その結果、やはり①～③のやり直しを迫られることがあるだろう。通常、学会発表や学術雑誌に投稿する際には、開発者自身のノウハウによってはじめて実施可能な検査法は、むしろ独創性の高い方法として高く評価されるはずである。そうした考えに慣れてきた者にとっては、逆に「誰にでも同じように実施できなければならない」ことが重要との発想には馴染めないかもしれない。

しかし、とにかく、国際的な公認法として登録されれば、この検査法に関しては高い信頼性を確保したことになり、検査技術ビジネスも有利に進められることになる。

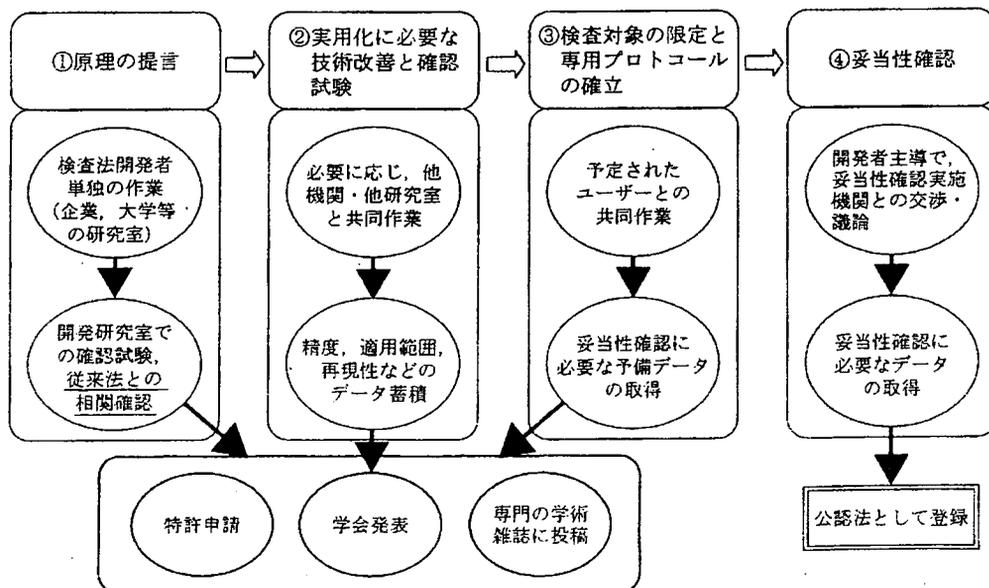


図-2 新しい検査法の開発から公認法としての登録までの流れ

4. 微生物検査法に関する基準や規格の作成に関与している機関

4.1 AOAC, Codex 及び ISO における微生物検査法の議論

国際的な基準や規格の作成に関わっている組織の例を図-3に示す。米国に本拠を置く AOAC INTERNATIONAL (以下、AOAC) は、その発祥は古く、米国の国内機関として 1884 年にスタートした。当初は肥料成分の化学分析法が対象であったが、その後、分析対象が食品関連物質に広がり、1965 年に微生物試験も対象とするようになり、1991 年に国際組織となった。一方、1950 年代半ばにオーストリアで食品の地域基準の作成が盛んになり、やがて European Codex Alimentarius として組織化された。これが基になり、FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/ World Health Organization) 連合委員会の要請に基づき、Codex Alimentarius Commission が設置され、1963 年、食品の国際基準 (Food Standard) 作成を開始した。ISO (International Organization for Standardization) は、各種産業に必要なあらゆる物品の国際基準を決めるために、1946 年に設立された機関である。分析科学よりさらに広い分野を包含する。現在 229 の Technical Committee (TC) がある²¹⁾。微生物検査に関しては、食品、ヘルスケア製品、化粧品などの対象によってそれぞれ異なる TC で扱われている。食品関係では TC34 Food products の委員会で議論されており、TC34 の中の Sub-committee (SC) 9 が食品関係の微生物検査を扱っている委員会である。

4.2 専門性の高い機関との連携

特定の対象に絞れば、それを専門とする他の国際機関がより木目の細かい議論をしている。例えば、乳製品の場合、1903 年に設立された専門機関 IDF (International Dairy Federation) がある。専門的な知識や経験、関連技術やノウハウなどを結集させて議論するためには、そうした専門機関との協力が不可欠であろう。実際、乳製品の場合には、1970 年以降、ISO の TC34、IDF、そして AOAC から成る三者委員会で議論されるようになってきている。ISO は規格等の編集、出版、運営に関する専門的ノウハウ、世界の他の規格制定機関との最大のチャンネルを持っている。IDF は乳製品に関して、日々、測定データを得る方法、その結果を製品管理に生かしていく方法などについて豊富な知識と経験を有している。そして、AOAC は具体的な検査法の妥当性確認の仕方について最高のグレードのプログラムを

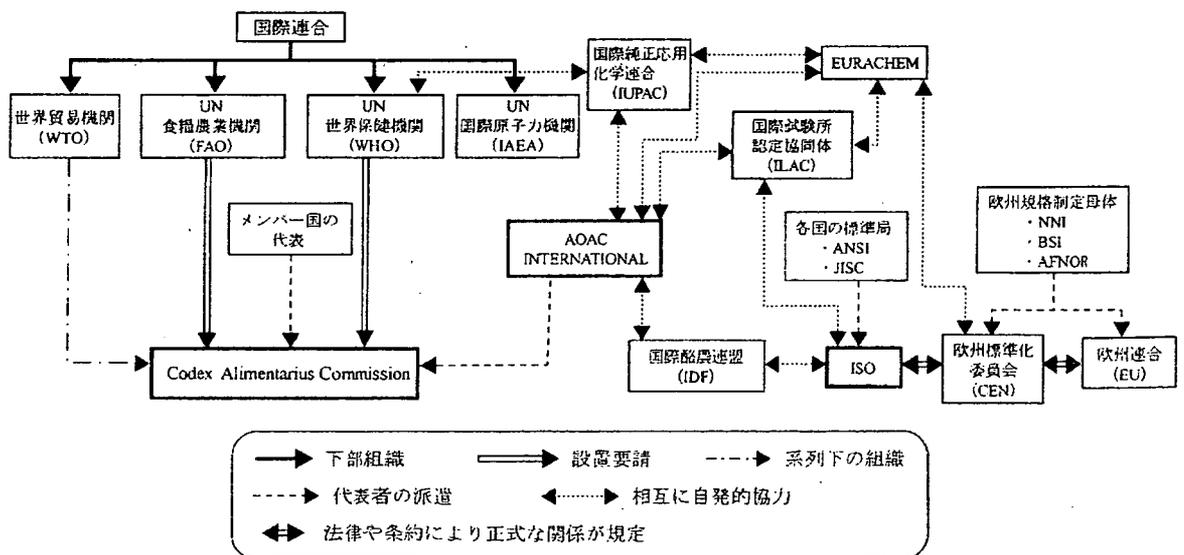


図-3 基準、規格の制定及び検査法妥当性確認を実施する機関の例

開発し、実績を蓄積している。そうした、各機関の得意なところを出し合って作業の効率化とハーモナイゼーションを図るとの趣旨である。

4.3 各国の国内機関の立場

各国にはそれぞれ国内機関があつて、食品の微生物検査に関しても、国内における公定法あるいは公認法に関わる作業を行っている。米国の ANSI(American National Standards Institute)、フランスの AFNOR(Association Française de Normalisation)、英国の BSI(British Standards Institution)、日本の JSA(Japanese Standards Association)などは ISO の国内版である。より専門性の高い組織としては、米国の FDA、カナダの Health Canada、スカンジナビアの NORDVAL(Nordic System of Validation of Alternative Microbiological Methods)、英国を中心とした EMMAS(European Microbiological Methods Assessment Scheme)などがある。日本では、厚生労働省あるいは農林水産省が窓口としての機能を果たしてきた。国内機関は、各国の事情を考慮しつつも、上記の国際機関とのハーモナイゼーションを図っている。

5. 妥当性確認済みの微生物検査法

5.1 AOAC の OMA に登録されている検査法

国内外の各機関が、公定法あるいは公認法を定めるためには、その妥当性確認の手続きが必要である。そのためのプログラムとしては、AOAC の Official Method Analysis が最も定評がある。それをまとめたものが冊子として出版され、そのタイトルも『Official Methods of Analysis(OMA)』となっている。「Book of Methods」の通称で呼ばれ、分析科学者によって広く利用されてきた。1920 年に第 1 版が出版されて以来、5 年ごとに改版を重ね、現在は 2005 年に出版された第 18 版に至っている。最新版では冊子版と Web 版となった。全体で 51 章、2,000 余ページから成るが、その中で第 17 章が「Microbiological Methods」で、最多の 224 ページを費やしている²²⁾。第 18 版となって新たに増えた 26 節中、*Salmonella* の内容が 9 節、*Staphylococcus*、*Listeria* が各々 4 節ずつ、そして新たに *Bacillus anthracis* の 3 節が加わった点などが特記される。1 章平均 39 ページからすると、この第 17 章は格段に分厚い章となっている。但しこのことは、単に微生物関係は章分けせずに全部一緒にしてしまったということかもしれない。もともと、化学分析が中心であった AOAC の歴史的背景を考えると、そう考えても不思議はない。

微生物検査法についての記述は他のいくつかの章にも散見する。例えば、第 5 章中の「5.3 飼料中の抗生物質を測定するための微生物試験」、第 7 章中の「7.3 化粧品中の殺真菌物質」、第 45 章中の「45.2 ビタミン及び栄養物測定のための微生物試験法」、第 50 章中の「50.1.18 ~ 50.1.22 乳児用人工乳及び食事療法食材の微生物試験法」などである。これらも含めると、微生物検査法は「微生物がいるかないか」に関するものと「微生物に効くか効かないか」に関するものに大別して考えることができる。「微生物に効くか効かないか」では菌の生死判別が要請されるだけであるが、「微生物がいるかないか」では菌の生死判別と菌種の同定が要請される。第 17 章に記載されているものはすべて後者である。

5.2 ISO に登録されている微生物検査法

ISO における微生物検査法の妥当性確認のプロセスは、AOAC の場合と様相を異にする。AOAC ではプロトコルの設計が厳密で、それに従って、定性試験ならば 10 カ所以上、定量試験ならば 8 カ所以上の試験研究所でコロバスタディーが実施される。ISO ではコロバスタディーの規定はない。もちろん、委員会に提出する具体的資料としては、自主的に実施したコロバスタディーの成績、あるいはそれに代わるデータが不可欠であるが、8 ないし 10 カ所でのコロバでなければならぬとの規定はな

・ AOAC で参照した培養法：965.25 ～ 965.68, 995.25, 2000.06 (Official Methods of Analysis の第 17 版及び増補に掲載)

・ ISO で参照した培養法：6579：2002 Horizontal Method for the Detection of *Salmonella* spp.

● コラボの数：欧米の連邦政府機関、私企業など 21 試験研究機関が参加

● 食品の種類：チーズ、卵を原料とする乾燥製品、鶏肉

● 菌の添加法：*Salmonella* 及びそれと競合する微生物フローラを人為的に添加

● 結果：コラボの結果は良好で、ISO 6579 は AOAC でも妥当性確認されたとの結論。

AOAC Official Method 2002.10 for the analysis of fresh cheese, dried egg, and raw, ground poultry として First Action に登録された。

図-4 食品中のサルモネラ検査法の ISO 対 AOAC の等価性確認のためのコラボスタディーの結果²⁴⁾

い。AOAC の OMA のためのコラボスタディーに要する何千万円という費用と 1～2 年の時間を考えると、これが必須ではない ISO での登録の方がはるかに敷居が低いように思われるであろう。妥当性確認プログラムの厳密さを重視して相応の費用と時間をかけて、高い信頼性を確保するか、あるいは、ある程度ショートカットのプログラムで済ませ、信頼性は低くなるかもしれないが、少なくとも国際的には「妥当性確認された検査法」として登録するか、なかなか悩ましい選択である。ちなみに、ISO の TC34/SC9 に登録された微生物検査は 33 件 (1991～2006 年) であるが²³⁾、このなかで AOAC の OMA の妥当性確認プログラムに従って再確認されたのは、今日に至るまで、ISO 6579:2002 Horizontal Method for the Detection of *Salmonella* spp. のみである (図-4)²⁴⁾。ハーモナイゼーションと言っても、等価であることを示すことがいかに大変かを如実に物語っている。

6. 国際的ハーモナイゼーションへの取組み

6.1 AOAC 方式か ISO 方式か

3. 項で述べたように、「培地としてどれを使用するか」から始まって、検査法のプロトコールで規定すべき項目には、各国の歴史的背景や、同じ国の中でも対象となる分野 (例えば、食品と医薬) によって条件が異なる場合が多々ある。それらは、科学的議論のみでどれが最適であると結論できる内容ではない。AOAC では厳格なコラボスタディーによって、誰が、いつ、どこで実施しても同じ結果が得られるようにすることを究極の目標にし、専門のメソッド委員会で議論され、承認される。一方 ISO では TC/SC の参加国代表 (TC34/SC9 の場合、参加国 (Participating countries) は 28 カ国) が、それぞれの国の考え方も含めて議論し、それを各国 1 票ずつの投票により採否を決める考え方もある。しかし、AOAC 方式か ISO 方式か、あるいは他の方式か、と明確に分けられるものでもなく、ISO における議論の根拠に AOAC ですでに妥当性確認された検査法が出されたり、逆に、検査法のプロトコールだけではなく、それを実施する人の技能についても考慮すべきである、との ISO の考え方 (Proficiency Testing Program) が AOAC に導入されたりしている (OMA 等のプログラムと直接関係はしないが)。現在では、各機関の間で様々な形の連携、協力、情報交換によりハーモナイゼーションが行われている。上述の ISO-IDF-AOAC の三者委員会もその一例である。

6.2 わが国独自のスキームの構築

国際的ハーモナイゼーションの動向に対して、わが国としても組織的戦略的に関わっていくことが重要である。その第一歩は、微生物検査法の基本となっている培養法に関して、わが国としての考え方と具体的プロトコールを国際的に認知されるようにすることであろう。幸い、その具体的作業は現在、国立医薬品食品衛生研究所の主導で進められている²⁵⁾。おそらく、その際、培地の選定をめぐる

議論が大変重要になると予想される。AOAC が基準としてきた培地が、BAM(Bacteriological Analytical Manual)²⁶⁾ で指定されたものを中心としているので、AOAC の実績を考えればそれを十分考慮しなければならないであろう。しかし、わが国で用いられてきた培地でも、十分経験を積んだ専門家が実施することによって、等価な結果が出せるはずである。それを実証するデータを示すことによって、日本製培地を国際基準にしていくことが肝要である。

6.3 微生物検査法の専門家としての活動の重要性

必ずしも科学的判断だけでは決着がつかない内容に関して、国際的議論の場で自国の論理を展開し理解を得るようにするには大変なエネルギーが必要である。誰がその矢面に立つにしろ、国としての組織的なバックアップ体制が必要である。上述の培養法の標準化のための活動は、その観点から極めて意義が大きい。さらに、そのような議論の場に多くの人々が積極的に出かけて行って、専門家になって頂くことが重要である。専門家の要件とは、例えば、学術論文(国際誌)の発表実績を持つこと、国際会議に最低でも連続3年以上は出席し、研究報告をし続ける実績を持つことなどであるが、その結果、海外の専門家に名を知られるようになることである。自分が抱えている問題に関しては世界でも自分がよく知っているはずであり、それを科学的に表現できる人が専門家である。

さらに付言すれば、ここで言う専門家になるべき人とは、検査法に直接関わった技術系の人とは言ってもないが、行政の立場の人にも言えることである。AOAC や ISO に限らず、議論の中心は極めて科学的・技術的な内容になるものの、結局、科学的議論だけでは結論が出ない場合が多い。それでも、最終的にはハーモナイゼーションの折り合い点を見つけなければならない。その際、行政的判断も重要になるはずである。その担当者が、上記のような専門家であれば、わが国にとって極めて大きな力になるはずである。

[松岡英明]

文 献

- 1) Petrifilm* method(例えば 17.2.09, 17.3.02, 17.4.01C) : Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL (18th Edition, Horwitz, W. and Latimer Jr., G. W. eds.) (2005)
- 2) Kodaka, H., et al.: Comparison of the compact dry TC method with the standard pour plate method(AOAC Official Method 966.23) for determining aerobic colony counts in food samples, *J. AOAC Int.*, **88**, 1702-1713(2005)
- 3) Morita, H., et al. : Evaluation of the Sanita-kun coliforms, a dehydrated medium sheet for coliform detection, Performance-Tested Method 100402, *J. AOAC Int.*, **89**, 399-416(2006)
- 4) Ferrari, B. C., et al. : Microcolony cultivation on a soil substrate membrane system selects for previously uncultured soil bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 8714-8720(2005)
- 5) 呉 基鳳, 松岡英明 : バイオセルトレーサーによる細胞センシング, 信学技法, **CPM96-CPM32**(6), 25-30(1996)
- 6) 飯田泰広, 他 : バイオセルトレーサーを用いた生薬アセトン抽出物中の抗真菌活性物質の高感度スクリーニング, 薬学雑誌, **119**(12), 964-971(1999)
- 7) Oh, K.-B., et al. : Morphological Recognition of Fungal Spore Germination by a Computer-aided Image Analysis and Application to Antifungal Activity Evaluation, *J. Biotechnol.*, **45**, 71-79(1996)
- 8) Bank, H. L. : Rapid Assessment of Islet Viability with Acridine Orange and Propidium Iodide, *In Vitro Cell and Devel. Biol.*, **24**, 266-275(1988)
- 9) Frankfurt, O.S. : Assessment of Cell Viability by Flow Cytometric Analysis using DNase Exclusion, *Exp. Cell Res.*, **144**, 478-482(1983)
- 10) Ingham, E. R. and Klein, D. A. : Soil Fungi: Relationships between Hyphal Activity and Staining with Fluorescein Diacetate, *Soil Biol. Biochem.*, **16**, 273-278(1984)
- 11) Wierda, W. G., et al. : Comparison of Fluorochrom-labeled and 51 Cr-labeled Targets for Natural Killer Cytotoxicity Assay, *J. Immunol. Meth.*, **122**, 15-25(1989)
- 12) Oh, K.-B. and Matsuoka, H. : Rapid Viability Assessment of Yeast cells Using Vital Staining with 2-NBDG, a Fluorescent Derivative of Glucose, *Intern. J. Food Microbiol.*, **76**, 47-53(2002)
- 13) Matsuoka, H., et al. : Viable Cell Detection by the Combined Use of Fluorescent Glucose and Fluorescent Glycine, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 2459-2462(2003)
- 14) Yasukawa, T., et al. : Electroanalysis of Metabolic Flux from Single Cells in Picolitre-Volume Microsystems, *Anal. Chem.*,

- 74, 5001-5008 (2002)
- 15) 高橋寿洋, 他: 自動化 MicroStar-RMDS-SPS (ATP- バイオルミネッセンス法) のビール工場における製品検査への応用, 日本防菌防霉学会誌, 27(11), 759-764 (1999)
 - 16) Shimakita, T., et al. : Rapid separation and counting of viable microbial cells in food by nonculture method with bioplorer, a focusing-free microscopic apparatus with a novel cell separation unit, *J. Food Prot.*, 69, 170-176 (2006)
 - 17) Pohl, H. A. : Dielectrophoresis (Cambridge University Press, 1978)
 - 18) Nayak, B. B., et al. : Separation of active and inactive fractions from starved culture of *Vibrio parahaemolyticus* by density dependent cell sorting, *FEMS Microbiol. Eco.*, 51, 179-186 (2006)
 - 19) 食品衛生研究会編: 平成 14 年版食品衛生小六法 (新日本法規出版, 2001)
 - 20) 厚生労働省監修: 食品衛生検査指針 (微生物編) (日本食品衛生協会, 2004)
 - 21) <http://www.iso.org/iso/cn/stdsdevelopment/tc/tclist/TechnicalCommitteeList.TechnicalCommitteeList>
 - 22) Horwitz, W. and Latimer Jr., G. W. (eds.) : Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL (18th Edition) (2005)
 - 23) [http://www.iso.org/iso/cn/stdsdevelopment/tc/tclist/TechnicalCommitteeStandardsListPage.TechnicalCommitteeStandardList? COMMID=1368](http://www.iso.org/iso/cn/stdsdevelopment/tc/tclist/TechnicalCommitteeStandardsListPage.TechnicalCommitteeStandardList?COMMID=1368)
 - 24) Feldsein, P. T., et al. : Detection of *Salmonella* in fresh cheese, poultry, products, and dried egg products by ISO 6579 *Salmonella* culture procedure and the AOAC Official Method: collaborative study, *J. AOAC Int.*, 86, 275-295 (2003)
 - 25) <http://www.nihs.go.jp/fhm/kennsahou-index.html>
 - 26) Food and Drug Administration: Bacteriological Analytical Manual (8th Edition) (1995)

1 技能試験の必要性和標準化の動向

東京農工大学 大学院工学府 生命工学専攻

松岡英明

1 はじめに

食品中の微生物試験の目的は、微生物汚染のレベルが健康を害しない程度の低いレベルであることを保証することである。そのためには微生物試験結果が十分信頼できるものでなければならない。信頼性のある結果を得るためには、その微生物試験法の妥当性が確認されていなければならない。この妥当性確認をMethod Validation (MV)という。ごく最近までは、このMVのために、検査法のプロトコールについて専ら議論されてきた。それを実施するのは、「基本的な技量」を習得している人が、「基本的な設備」のあるところで実施することを前提としているので、敢えて議論する必要がなかった。ところが、1990年代の後半になると、これらの前提となる「基本的な技量・設備」についても確認する必要があると考えられるようになった。それが、試験をする人の技量の認定(Proficiency Certification; PC)と試験所の管理基準の認定(Laboratory Accreditation; LA)である。さらにそれらが総合的に機能しているかどうかをチェックするには、既知濃度の微生物試料が不可欠であるが、その要望に応えるものが標準物質(Standard Materials; SM)である。どれか一つ欠けても、信頼性のある結果は得られない。

最終的には、国際的に通用する内容でなければならないが、その目的とするところを考えれば、国際動向に合わせるというよりも、我が国から発信する基準を国際基準にしていく戦略の方がより重要ではないだろうか。そうした戦略の第一歩とも言うべき、我が国の「微生物標準法」策定作業が当に始まったばかりである。そして、その作業を強力に支援するものが、2003年に開発された生菌

標準物質、BioBallである。本稿では、こうした状況について概説する。

2 我が国における微生物標準法策定の動向

国内における微生物試験法は、厚生労働省(厚労省)からの通知文書と食品衛生検査指針(微生物編)(厚生労働省 監修、日本食品衛生協会、(2004))を参考に行われている。それらは、検査の現場では「公定法」あるいは「標準法」と理解され、利用されてきた。しかし、その中には、長期にわたって見直されることの無かった試験法も少なく、また、現場の条件に応じて、それらに修正が加えられた亜流の方法も行われてきた。そのため、国外の標準法のような規格化されたプロトコールに従った試験が国内では行われていない。そのことが、微生物試験法の国際的ハーモナイゼーションを進めるうえで障害になる可能性がある。実際、具体的な食品の輸出入に際して、その安全性を保証するはずの試験法が、我が国では通用しているが、相手国では通用していないために、相手国で通用する試験法でもう一度試験しなければならないことがある。したがって、一般論としては、国際的に通用する標準法を是非策定しなければならない、ということになる。

ところが、つい最近まで、我が国ではそうした「国際的に通用する我が国の標準法」を、戦略的組織的に策定することに、それ程積極的ではなかった。その理由は、例え、国際的な通商の場で問題が発生するとしても、極めて限られた特定の食品、特定の相手国であるから、必要なら相手国側が納得する試験法でもう一度試験すればよいではないか、

という考えが支配的であったからだと思われる。そういう状況に立たされた当事者してみれば、極めて不条理なことを強いられることになり、「国は何をしている!」という憤懣になる。しかし、国の立場で考えれば、特別のケースとして、限られた場合のみに対応すれば済むものを、組織的に対処せんがために、理屈では過去に構築されてきた膨大な試験法の全てを基本から見直さなければならぬ、ということにもなりかねない。とすれば、そのことの方が、コスト的にも時間的にも、はるかに厳しい話である。

国際的ハーモナイゼーションといっても、最終的には我が国の国益に叶うようなものでなければ

ば、全く意味がない。そのためには、国際的ハーモナイゼーションの中味を、我が国自身が先導していくことが重要である。「今度ISOでこうなったから、我が国でも、早速対応しなければ・・・」式の受動的対応は、労多くして益少なし、である。そうではなくて、試験法の哲学から始まって、試験法の科学、技術、さらに食品文化に至るまで、国際基準は斯くあるべし、と提言し続け、それによってイニシアチブを採っていくことが重要であると思われる。一見科学的な議論であっても、実は、科学的には決して結論を出せない部分が少なからずあるからである。

3 厚労省科学研究費補助金による「検査法バリデーションシステムの構築」を目指す第一歩

厚労省は、上記の観点での重要性に、漸く重い腰を上げ始めている。平成17年度より始まった、厚労省科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)「畜水産食品の微生物等の試験方法に関する研究」がそれである。平成19年度までの3年間のプロジェクトであり、実施計画を議論する過程で、具体的課題が

- (A)「食品からの微生物検査標準法検討委員会」運営
 - (B) サルモネラ検査法の検討
 - (C) 腸炎ビブリオ検査法の検討
 - (D) 黄色ブドウ球菌検査法の検討
- の4分担研究課題に絞り込まれた。(A)では図1に示す委員会を構成し、国立医薬品食品衛生研究所・

食品衛生管理部を事務局として、これまでに9回の委員会(H17年度4回、H18年度5回)を行ってきた(<http://www.nihs.go.jp/fhm/kennsahou-index.html>)。この委員会での議論内容は、上記Webで公開されているが、その目的は、サルモネラ、腸炎ビブリオ、黄色ブドウ球菌について、培養法を見直し、標準法としてのプロトコルを提案すること、およびそのプロトコルにしたがってバリデーションする仕組みを構築することである。標準法として提案するためには、これまでに実施されてきた検査法についての情報調査、および実験的検討が必要であり、菌種毎にそれを行うために設置された課題が(B)～(D)である。

委員長	山本 茂貴 (国衛研・食品衛生管理部)
副委員長	高島 浩介 (国衛研・衛生微生物部)
委員	浅尾 努 (大阪府立公衆衛生研究所・日本食品微生物学会)
	荒川 英二 (国立感染症研・細菌第一部)作業部会
	五十君 静信 (国衛研・食品衛生管理部)事務局、作業部会
	伊藤 武 (財団法人東京顕微鏡院)
	甲斐 明美 (東京都健康安全研究センター)作業部会
	春日 文子 (国衛研・食品衛生管理部)
	小久保 彌太郎 (社団法人日本食品衛生協会)
	小崎 俊司 (大阪府立大学 農学部)
	品川 邦汎 (岩手大学 農学部)
	清水 晃 (神戸大学・農学部)作業部会
	田中 廣行 (財団法人日本食品分析センター)
	塚本 定三 (大阪府立公衆衛生研究所)作業部会
	藤井 建夫 (東京海洋大学 海洋科学部)
	松岡 英明 (AOAC International Japan Section)
	丸山 務 (社団法人日本食品衛生協会)
	宮原 美知子 (国衛研・衛生微生物部)作業部会
	森 曜子 (財団法人日本冷凍食品検査協会)
	渡辺 治雄 (国立感染症研・副所長)
行政から	道野 英司 (厚労省・監視安全課)
	近藤 卓也 (厚労省・基準審査課)

図1. 食品からの微生物検査標準法検討委員会の構成

また、硫化水素の産生により判定する培地としては、MLCB、ESサルモネラ、DHL、XLD、Bismuth sulfate agar、XLT4などから1種、と表記されているが、この「など」としている点にご注目いただきたい。このことは硫化水素非産生であってもサルモネラと判定できる培地の場合も同様であり、培地の種類を限定していない。

35±1℃、22±2時間、培地選択上の自由度、などプロトコルには条件に幅がある。化学分析においてもプロトコルに幅のある条件が無いわけではないが、微生物検査の場合は、はるかにこの幅が大きい。硫化水素産生により判定する培地としてはMLCBが圧倒的に多いのだが*Citrobacter*との区別が難しい、という見解、あるいはまた、硫化水素非産生でもサルモネラと判定できる培地としてはクロモアガーが圧倒的に良いと思う、といった意見、などなど。こうした議論は、目の前に与えられた試料に対して、どの培地を選択したらよいか?についての判断は、結局は、試験者の「コロニーを観る目」に依存せざるを得ないことを物語っている。試験者の技量認定の目標は、本来、このようなところにおくべきと思うのだが……。付言すれば、我が国では、こうした経験に培われた判断力にプライドを持ち、またそれに対して十分に敬意を払ってきた文化があったと思うが、残念ながら、「国際的に通用」させるためには、そうした文化とは無縁な社会の水準に合わせなければならない。かくて、技術認定はすべからず定量的に表現できる指標に限られることとなっている。

5 生菌標準物質および生菌マニピュレーション技術

1990年より、英国のCentral Science Laboratory (CSL) は、食品マトリクス中の標準物質の開発および普及に努めてきた。特定の化学物質を特定の食品マトリクスに所定量を加えた缶詰などを製造し、これを複数の希望者に有料で頒布している。それを購入した試験研究所では分析結果をCSLに報告する。CSLはその結果を集積して実施者にフィードバックする。それによって分析技術の評価や確認が客観的にできることになる。化学試験についての、このような仕組みをFood Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS)、微生物試験についてはFood Examination Performance Assessment Scheme for Microbiological Proficiency Assessment (FEPAS)とよんでいる。

一方、米国においては、古くからNational Institute of Standards and Technology (NIST) (1901年設立)が種々の標準物質を開発してきた。その対象は食品に限らず人の血液や尿、動物組織、植物組織、環境試料(土壌、大気)などにおよぶ。しかし、微生物試験用の標準物質については未開発である。

2003年のAOAC INTERNATIONAL Annual Meeting (Atlanta, Sept. 15-18, 2003)で、微生物標準試料についての興味ある成果がオーストラリア、BTF社によって発表された。大腸菌などの微生物生菌を、フローサイトメトリーとフリーズドライ技術を利用して、少数の生菌を計り取り、ボール状の凍結乾燥品にして小さなバイアルに入れたものであり、これをBioBallと称していた。標準品は30±2個という極めて少ない数の生菌を正確に含んでいることを保証している。2004年には、大腸菌の他、サルモネラ、リステリア、スタフィロコッカス、バチラスなどの菌種のBioBallも開発されている。BioBallは今日では「Easy QA Ball」という商品名で我が国に導入されている。

微生物を含む標準試料開発は益々重要になってくると思われるが、そのためにはさらに次のような要素技術が必要であろう。

(1) 単一細胞のマニピュレーション技術:①単一生菌の選定と把取、②生菌を損傷しないように固体マトリクス上へ静置、あるいは液体マトリクス中へ懸濁、③個々の単一生菌の状態が変動しないように①-②の操作を迅速に、④マトリクス中の菌の分布の制御と検証、特に粉体、ペースト、固体の試料の場合が技術的にもチャレンジング。

(2) 生菌含有試料の保存技術:①保存中の増殖を防ぐために冷蔵保存、あるいは冷凍保存、②冷凍保存の場合は、凍結、解凍による菌の損傷の影響評価が重要、③病原性微生物の場合は移送に対する法的規制の問題を回避する必要。

6 将来展望

冒頭にも述べたように、微生物試験の信頼性確保のためには4点セット、すなわちMV、PC、LA、SMが不可欠であるが、それらは国際的に通用する内容でなければならない。しかも、それは追従型ではなく、あくまで先導型でなければならない。それを実現するためには、次のような段階を踏んでいく必要があるだろう。

(1) 微生物標準法(培養法)の策定。

(2) コラボスタディーによるバリデーションスキームの策定、コラボスタディーの規模、評価委員会の構成、評価基準の策定など、の活動の中で、AOAC方式を参考に、具体的なコラボスタディーの設計も一部実施。

(3) 微生物標準法(培養法)のコラボスタディーによるバリデーション。

(4) 微生物標準法(培養法)に対する変法、あるいは代替法のコラボスタディーによるバリデーションスキームの設計。

前述の、「食品からの微生物検査標準法検討委員会」は、(1)～(3)の実施を目標にしている。その実現に向けた不断の努力が要請される。

解 説

微生物の迅速検出法

齊藤美佳子・松岡 英明

1. はじめに

微生物検出法の基本は培養法であるが、培養時間が長く、その時間の調整も難しい。特に測定対象が食品の場合、食品を微生物汚染から守り、食品の安全性を確保するためには、微生物の迅速検出法が重要である、との認識が高まってきている。

微生物菌数を迅速に測定するために種々の蛍光色素が利用されている。これらの蛍光色素によって蛍光を発するようになった細胞は、顕微計測やフローサイトメトリーで細胞単位での計数が可能である。また、細胞懸濁液の蛍光計測によって細胞集団の蛍光強度測定も容易にできる。蛍光計測の成否はいかにしてバックグラウンドを低く抑えるか、にかかっている。環境から採取した試料や食品試料中には、種々の固形物、色素、タンパク質、脂質などが含まれており、これらが共存した状態で染色操作すると、菌体以外のもので蛍光色素に染まるものが多々見られる。これがバックグラウンドとなる。例えば、生菌染色用の色素で染まる物質が含まれていれば、仮に菌体がいなかったとしても、「菌がいる」という結果になってしまう。こうした問題を防ぐ方法は、試料の精製に尽きる。そこで本稿では、迅速な生菌検出法である蛍光計測について、その原理、測定例について、さらに非培養法の鍵になるであろう、前処理技術について紹介する。

2. 微生物生死菌判別技術の動向

微生物検出は、生死菌判別と特定菌の同定に分けて考えられる。殺菌処理の適不適を判断するためには生死菌判別による。菌の種類を問わず確実に殺菌されていることを保障することが必要であるから、非特異的な検出原理でなければならない。一般細菌用寒天培地でコロニー形成を調べる方法が依然として最も信頼できる方法とされている。確かに、分裂増殖してくる細胞が生細胞である、ということは誰もが認めることである。しかし、環境中には増殖しにくい菌が多数いるので、コロニーができなかったからといって、生菌がないとは言いきれない。それが「偽陰性」である。また、一般細菌用培地と言っても、メーカーによって成分が同じとは限らない。この点も気になる点である。実用的には、コロニー形成まで1日以上時間を要する点が問題であり、これに代わる迅速法の要請は極めて大きい。迅速法には、非培養法、細胞成長顕微解析法、マイクロコロニー法、などがある(表1)¹⁻¹³⁾。培養法と非培養法では、同一試料でも、生菌数が一致するとは限らない。その原理から予想されるように、培養法の方が少なめになる傾向がある。その傾向を概念的に示したものが図1(神戸大学、大澤 朗教授より供与いただいた図を改変)である。ストレスを印加し続けると、細胞が弱っていくが、その結果、増殖能が失われても細胞として死んでしまったわけではない。生きてはいるが増殖できない菌ということで、Viable but non-culturable cellsと呼んでいる。図2は、同一試料中の大腸菌を、培養法と非培養法で実測した例である。この例でも、

表 1. 生菌検出法

迅速性	培養・非培養の別	原理・指標	検出・計測法	文献
通常培養法	培養法	細胞分裂, 増殖を繰り返して肉眼で検知できる大きさのコロニー形成を待ち, これを計数。	寒天培地コロニー計数法 フィルム, 不織布などのシート状培地でのコロニー計数法	
		細胞分裂, 増殖した菌体量を濁度, あるいは重量で計測。	液体培地培養法	
迅速法	マイクロコロニー法 (培養法)	細胞分裂, 増殖を繰り返すが, 通常のコロニーよりはるかに小さなコロニーの状態, これを計数。	蛍光染色法, 顕微計数	[1]
	細胞成長顕微解析法 (培養法)	細胞成長に伴う形状変化を直接顕微解析。	菌糸伸長速度計測法	[2, 3]
			酵母出芽形状解析法	[4]
	非培養法	色素分子に対する細胞膜透過性の有無によって生死判別。生細胞では透過性無。色素分子の受動的取込。	蛍光染色法 (PI, DAPI など)	[5, 6]
			レドックス色素を利用した電気化学測定法	
		細胞内エステラーゼ活性。生細胞で活性。	エステル型蛍光色素 (FDA, CFDA など) を細胞内導入	[7, 8]
		栄養基質取込活性。生細胞は能動的取込。	蛍光基質法 (2NBDG, NBD-Gly など)	[9, 10]
		生細胞が持つ還元力を直接, あるいは適当なメディエーターを介して計測。	蛍光色素法	
			NAD法 (テトラソリウム塩の利用など) 電気化学的方法	
		呼吸活性。分子状酸素を電子受容体とした還元力。	酸素電極法, 走査型電気化学顕微鏡	[11, 12]
生細胞では高エネルギー分子の生成。		ATP法 (ルシフェリン・ルシフェラーゼ系)	[13]	
生細胞では生体高分子 (DNA, RNA, タンパク, etc.) 合成。	タンパク質定量法			
生細胞では遺伝子発現。	GFP などのレポーター遺伝子を利用して遺伝子発現を可視化			

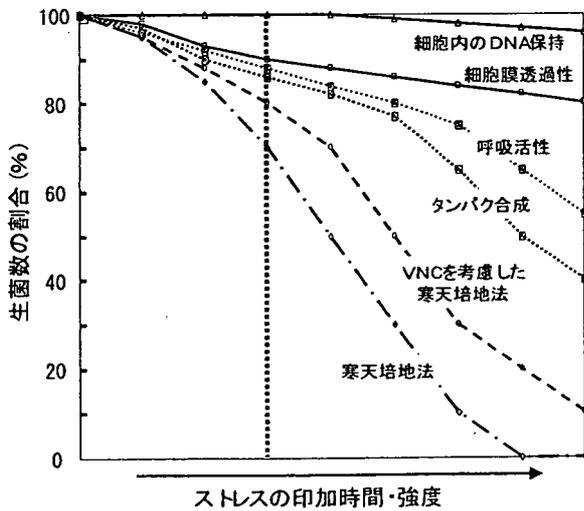


図 1. 生死菌判別の指標の違いによる生菌率の相違

確かに、培養法の方が生菌数が少なくなっている。上述のように、培養法と非培養法と同じ結果になるとは限らないが、迅速法の結果を補正して、両者の値が等しくなれば良しと考えられる。

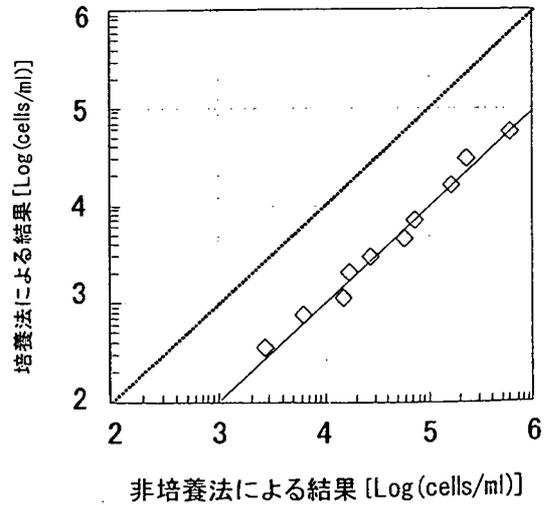


図 2. 培養法と同一の結果を出力する非培養法

3. 一般生菌数測定に利用される蛍光色素

3.1 細胞内酵素によって直接蛍光分子に変換される色素

フルオレッセインジアセテート (FDA), カルセイン AM などは蛍光を発しないが、疎水性の分子であるため細胞膜を透過する。細胞内で、エステラーゼによってエステル部分が切れフルオレッセインになると蛍光分子に変わる (図3(A))。しかし、死細胞では細胞内のエステラーゼが失活しているため FDA のままである。したがって、生細胞のみ蛍光を発する。この原理の色素で上市されているものは、ほとんどフルオレッセイン誘導体である。酵素活性が低かったり、細胞ごとに様でなかったりする場合の問題解決が実用化の鍵になる。

3.2 DNA と反応して蛍光を発する色素の利用

プロピジウムイオダイド (PI) (図3(B)), エチジウムブロマイド (EB), DAPI, SYTO BC (Invitrogen) など多数知られている。これらのうち、PI や EB はイオン性分子のため細胞膜は透過できないが、死細胞では細胞膜が損傷され、色素が細胞内に拡散して核に達して DNA と結合して蛍光を発する。その結果、死細胞のみが蛍光を発する。一方、DAPI, SYTO BC は疎水的な

分子のため、生細胞の細胞膜も透過し、生細胞、死細胞共に蛍光を示す。従って、この2種の蛍光色素、例えば DAPI と PI で二重染色すれば、顕微画像上で、DAPI 染色像と PI 染色像の解析により、生細胞数が求められる。細胞以外の共存物質で蛍光を発するものを如何に減らすかに工夫が必要である。

3.3 蛍光修飾した栄養基質分子

グルコースは大抵の細胞が栄養源として取り込む基質である。このグルコースに蛍光標識した2-NBDG (2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-D-glucose) が微生物によって取り込まれ濃縮され、菌体が強い蛍光を示ようになる (図3(C))。能動的に取り込まれるので、取り込み速度は速い。2-NBDGは、細胞内に取り込まれてから蛍光分子に変わるFDAとは異なり、元々蛍光分子であるが、細胞内に濃縮されるので、細胞は外液に比べて相対的に強い蛍光を発するようになる (図4)。従って、そのままでも蛍光細胞を識別できるが、実用的には2-NBDG を取り込ませた後、細胞を濾過、または遠心分離によって分離した後、顕微計測する。最近、第二の蛍光基質である NBD-アミノ酸が合成され、2-NBDG と併用することで多くの食中毒菌等が蛍光計数できることが分かった (図5, 表2)。上記のエステラーゼの場合と同様、菌種の違い、同一菌種でも細胞ごとに取り込み活性が一樣ではないことが実用化にむけて解決すべき課題

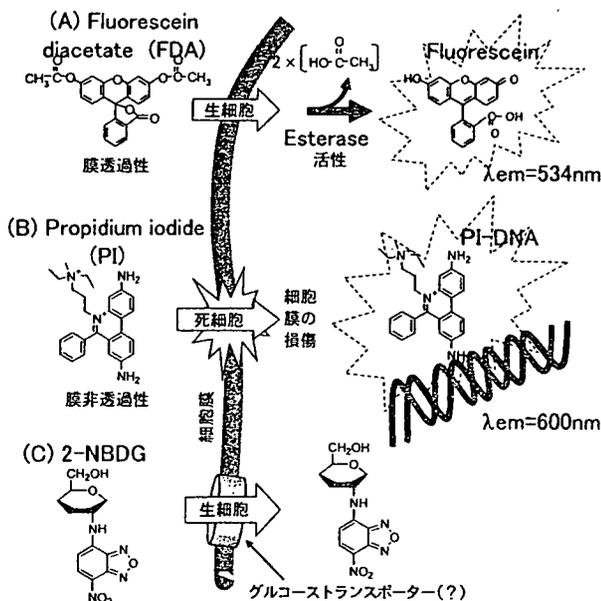


図3. 一般生菌数計測に利用される蛍光色素の例

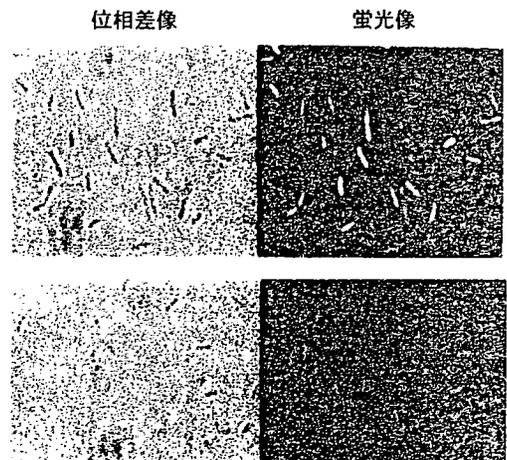


図4. 2-NBDG を用いて生きている大腸菌を検出

である。

3.4 その他の蛍光法あるいは発色法で用いる色素

基質を取り込むと細胞内に還元力が生成する。適当な酸化還元色素を加えると、その還元力を細胞外の色素に導くことができる。テトラゾリウム

(TZ) はその例である。例えばフェナジンメトサルフェート (PNS) を介して還元された TZ は発色し、その吸光度変化によって生細胞の存在を確認できる。

細胞が死ぬと細胞内酵素が溶出する。この酵素の一つ (指標酵素) を検出すれば死細胞の検出ができる。アルコールで殺菌処理することによって、

表2. 蛍光基質取込結果

分類	菌名	由来食品	蛍光基質							
			2-NBDG	NBD-Gly	NBD-Ala	NBD-Ile	NBD-Ser	NBD-Leu	NBD-Gln	NBD-Asn
大腸菌	<i>Escherichia coli</i> K-12		○	—	○	○	×	○	○	○
	<i>Escherichia coli</i> HB101		○	—	○	○	○	×	×	×
	<i>Escherichia coli</i> JM109		○	—	×	×	○	×	×	×
	<i>Escherichia coli</i> MCR5 α		○	—	○	×	×	×	×	×
	<i>Escherichia coli</i> BL21		○	—	○	○	○	○	×	○
	<i>Escherichia coli</i> AW539		×	○	×	○	○	○	○	×
	<i>Escherichia coli</i> O55		○	—	—	—	—	—	—	—
	<i>Escherichia coli</i> O91		○	—	—	—	—	—	—	—
	<i>Escherichia coli</i> O126		○	—	—	—	—	—	—	—
	<i>Escherichia coli</i> ATCC8739		×	×	×	○	○	○	○	○
	<i>Escherichia coli</i>	ポテトサラダ	○	—	—	—	—	—	—	—
	<i>Escherichia coli</i>	肉団子	○	—	—	—	—	—	—	—
	食品由来	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	中華サラダ	○	—	○	○	○	○	○
大腸菌群	<i>Enterobacter cloacae</i>	マカロニサラダ	○	—	—	—	—	—	—	
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	ポテトサラダ	○	—	×	○	×	×	×	
	<i>Citrobacter freundii</i>	シーフードサラダ	○	—	○	×	○	×	○	
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	ポテトサラダ	○	—	×	○	○	×	○	
	<i>Serratia liquefaciens</i>	マカロニサラダ	○	—	○	○	○	○	×	
	<i>Serratia marcescens</i>	ポテトサラダ	○	—	—	—	—	—	—	
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	玉子とうふ	○	—	—	—	—	—	—	
	<i>Citrobacter freundii</i>	シェーキ	○	—	—	—	—	—	—	
	<i>Hafnia alvei</i>	シェーキ	○	—	○	×	×	×	×	
	<i>Enterobacter cloacae</i>	シェーキ	○	—	—	—	—	—	—	
	<i>Serratia liquefaciens</i>	フレンチサラダ	○	—	—	—	—	—	—	
	食中毒菌	<i>Salmonella enteritidis</i> PT4		○	—	—	—	—	—	—
	とその他	<i>Salmonella typhimurium</i> PT49		○	—	—	—	—	—	—
の微生物	<i>Listeria monocytogenes</i> Y 7		○	—	—	—	—	—	—	
	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC MRSA SA111		○	—	—	—	—	—	—	
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> T6		○	—	—	—	—	—	—	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TU17		○	—	—	—	—	—	—	
	<i>Citrobacter</i> N1		○	—	—	—	—	—	—	
	<i>Morganella morganii</i> N5		○	—	—	—	—	—	—	
	<i>Yersinia enterocolitica</i> Te-20		○	—	—	—	—	—	—	
	<i>Aeromonas hydrophila</i>		×	○	—	—	—	—	—	
	<i>Vibrio mimicus</i>		×	○	—	—	—	—	—	
	<i>Plesiomonas shigelloides</i> NP321		×	○	—	—	—	—	—	
	<i>Bacillus cereus</i>		×	○	—	—	—	—	—	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> N19		○	—	—	—	—	—	—	
	<i>Streptococcus agalactiae</i> NCTC11360		○	—	—	—	—	—	—	
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC14508		○	—	—	—	—	—	—	
	<i>Bacillus</i> sp. B-2		○	—	×	○	×	○	○	
	<i>Micrococcus luteus</i> 12708		○	—	○	○	○	○	○	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC15442		○	—	×	×	×	×	×	
	<i>Staphylococcus aureus</i> IFO12732		○	—	×	×	○	×	○	

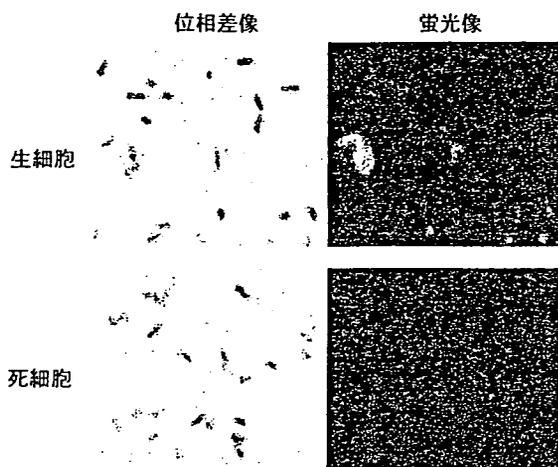


図5. NBD-Ileを用いて生きている大腸菌を検出

指標酵素が検出されれば、そこに生細胞がいたことがわかる。グルコース 6-リン酸脱水素酵素 (G6PDH) や乳酸脱水素酵素 (LDH) はそのような指標酵素の例である。脱水素酵素では NAD (H) を用いる測定法 (吸光度, あるいは蛍光測定) 一般的であるが, G6PDH ではレゾルフィンを利用する方法 (蛍光測定) もある。

4. 前処理技術として重要な生菌分離

非培養法の信頼性の鍵は前処理技術にある。食品試料中には多数の妨害物質が含まれていたとしても、これらを速やかに分離除去でき、菌だけを単離できるならば、その後の非培養迅速法の精度は格段に向上するはずである。化学分析では、例えばカラムクロマトグラフィーにかける前には、十分試料を精製することが常識である。ところが、微生物検出では、菌を分離しなくても、そのまま寒天培地に播けば良し、とすることがあったためか、従来は、試料の前処理条件に余り注意が払われてこなかったように思われる。菌がきれいに単離できれば、生菌検出の場合に止まらず、特定菌検出における遺伝子解析や免疫分析においても著しく精度が向上すると期待される。その結果、特定菌検出に際して要請されていた「前処理としての培養」も必要なくなるかもしれない。

生菌分離の原理と方法には図6に示したものが挙げられる。濾過法に関しては精度のよい簡便な分離機器が既に開発されている¹⁴⁾。また、遠心

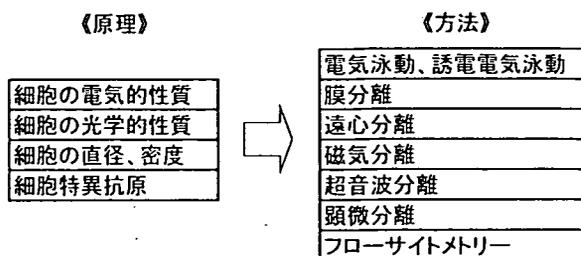


図6. 生菌分離の原理と方法

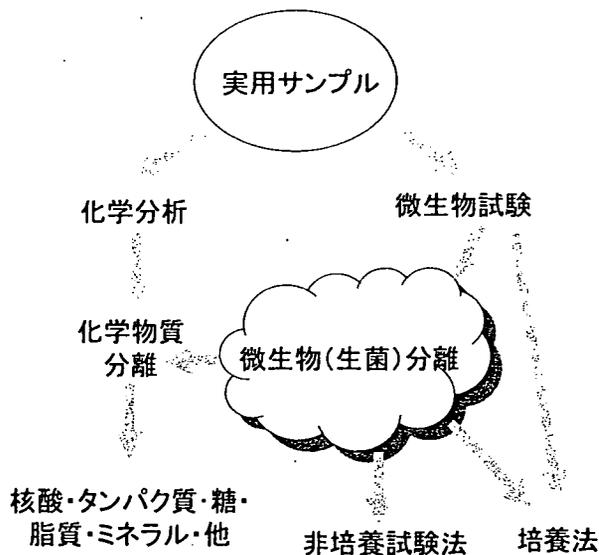


図7. 生菌分離の目的

分離法に関しても、密度勾配遠心分離後の簡便で精度のよい分取装置の開発が進められている¹⁵⁾。特定菌を選択回収するために、抗体固定化微粒子を用いた生菌分離方法を導入したキットも開発されている。密度の違いを利用した超音波分離法は、ルント大学の T. Laurell らによって展開され¹⁶⁾、既に血液中の血球と脂肪球の分離が試みられているが、さらに生菌分離への応用が検討されている。

生菌分離では、菌を「生かしたまま」分離することが重要である。非培養で迅速に検出した後、さらに菌種同定あるいは確認のために、その菌を増殖させて増やす必要が想定されるからである。信頼性の点では多少不安でも、とにかく迅速に結果を出すことが先決であり、その後、さらに念を押す必要があれば、始めに観察した、まさにその菌を増菌して、十分量の遺伝子や抗原を得て、詳細な解析を行うようにする¹⁷⁾、という趣旨であ

る(図7)。

5. おわりに

生菌数の簡便迅速計測法が実用的に重要であることは言うまでもないが、その鍵となるのは前処理技術である。現在、非培養法の開発と平行して、菌体を分離精製するための前処理技術開発が精力的に進められている。この場合、化学分析の場合と異なり、微生物細胞を生かしたまま分離する必要があるため、有機溶媒や強い界面活性剤は使用できない。基本は、上述のように濾過、遠心分離、密度勾配遠心分離、細胞電気泳動、誘電電気泳動、フローサイトメトリー、などである。試料の物性だけでなく、処理すべき容量も、分離技術開発上の重要な要件となる。

さらに、微生物の試験法の実用化を目指すためには、研究室レベルで、試験法の原理を開発する段階とは、明らかに異なる価値観で対処しなければならない点がある。例えば、新規の試験法開発の場合は、他の人が実施した試験法は、独創性の点で全く意味を待たない。しかし、バリデーションでは、他の人が実施した試験法を、全く同じ手順で実施して、同じ結果を出してこそ意味がある。また、試験法は誰が何のために使用するかが重要である。そこに、行政、国際通商、更に歴史的背景、文化、生活習慣などが密接に関わってくる。こうしたことを、総合的に理解したうえで試験法の国際的ハーモナイゼーションを進めることが重要であろう。

参 考 文 献

- 1) Kitaguchi, A., Yamaguchi, N., Nasu, M., (2006) Simultaneous enumeration of viable *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. Within three hours by multicolor fluorescence in situ hybridization with vital staining. *J. Microbiol. Methods*, **65**, 623-627.
- 2) 呉 基鳳, 松岡英明 (1996) バイオセルトレーサーによる細胞センシング. 信学技報, CPM96-32 (6), 25-30.
- 3) 飯田泰広, 米村博貴, 呉 基鳳, 斉藤美佳子, 松岡英明 (1999) バイオセルトレーサーを用いた生薬アセトン抽出物中の抗真菌活性物質の高感度スクリーニング. 薬学雑誌, **119**, 964-971.
- 4) Oh, K.-B., Chen, Y. S., Matsuoka, H., Yamamoto, A., Kurata, H., (1996) Morphological Recognition of Fungal Spore Germination by a Computer-aided Image Analysis and Application to Antifungal Activity Evaluation. *J. Biotechnol.*, **45**, 71-79.
- 5) Bank, H. L., (1988) Rapid Assessment of Islet Viability with Acridine Orange and Propidium Iodide. *In Vitro Cell and Devel. Biol.*, **24**, 266-275.
- 6) Frankfurt, O. S., (1983) Assessment of Cell Viability by Flow Cytometric Analysis using DNase Exclusion. *Exp. Cell Res.*, **144**, 478-482.
- 7) Ingham, E. R., Klein, D. A., (1984) Relationships between Hyphal Activity and Staining with Fluorescein Diacetate. *Soil Biol. Biochem.*, **16**, 273-278.
- 8) Wierda, W. G., Mehr, D. S., Kim, T. B., (1989) Comparison of Fluorochrom-labeled and ⁵¹Cr-labeled Targets for Natural Killer Cytotoxicity Assay. *J. Immunol. Meth.*, **122**, 15-25.
- 9) Oh, K.-B., Matsuoka, H., (2002) Rapid Viability Assessment of Yeast cells Using Vital Staining with 2-NBDG, a Fluorescent Derivative of Glucose. *Intern. J. Food Microbiol.*, **76**, 47-53.
- 10) Matsuoka, H., Oishi, K., Watanabe, M., Kozono, I., Saito, M., Igimi, S., (2003) Viable Cell Detection by the Combined Use of Fluorescent Glucose and Fluorescent Glycine. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 2459-2462.
- 11) Yasukawa, T., Glidle, A., Cooper, J. M., Matsue, T., (2002) Electroanalysis of Metabolic Flux from Single Cells in Picolitre-Volume Microsystems. *Anal. Chem.*, **74**, 5001-5008.
- 12) Kaya, T., Nishizawa, M., Yasukawa, T., Nishiguchi, M., Onouchi, T., Matsue, T., (2001) A Microbial-Chip Combined with Scanning Electrochemical Microscopy. *Biotech. Bioeng.*, **76**, 391-394.