

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							
			1-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 ^a		○	-	○	×	×	×	×	×
	<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> IPO12732		○	-	×	×	○	×	○	

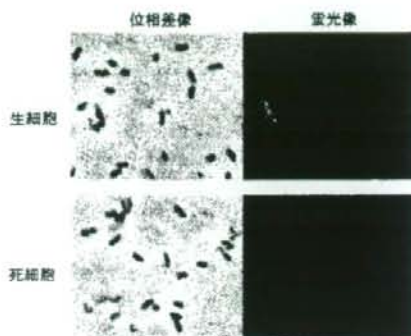


図5. NBD-Ileを用いて生きている大腸菌を検出

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

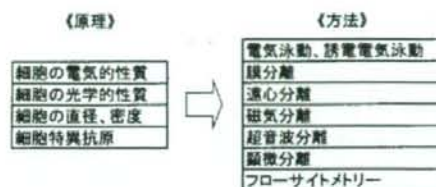


図6. 生菌分離の原理と方法

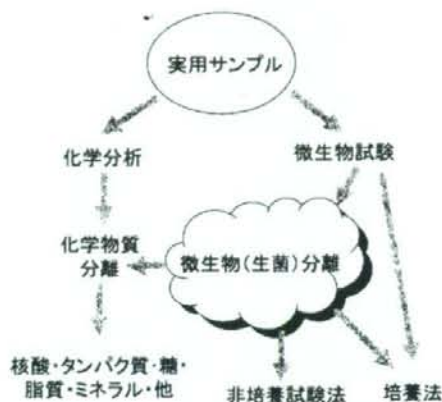


図7. 生菌分離の目的

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¹¹⁾、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持たない。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) バイオセルトレーザ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, 齊藤美佳子, 松岡英明 (1999) バイオセルトレーザーを用いた生葉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.

- 13) 高橋寿洋, 中北保一, 奈良泰信, 上原昭弘, 門司佳夫, 渡 淳二, 篠塚 健 (1999) 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. 日本防菌防黴学会誌, 27, 759-764.
- 14) Shimakita, T., Tashiro, Y., Katsuya, A., Saito, M., Matsuoka, H., (2006) 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.
- 15) Nayak, B. B., Kamiya, E., Nishino T, (2006) Separation of active and inactive fractions from starved culture of *Vibrio parahaemolyticus* by density dependent cell sorting. *FEMS Microbiol. Eco.*, 51, 179-186.
- 16) Nilsson, A., Petersson, F., Joensson, H., Laurell, T., (2004) Acoustic control of suspended particles in micro fluidic chips. *Lab Chip.*, 4, 131-135.
- 17) Fujioka, K., Geis, P., Saito, M., Matsuoka, H., (2007) Visualization of yeast single-cells on fabric surface with a fluorescent glucose and their isolation for culture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 34, 685-688.