

作業項目 (大分類)	作業項目 (小分類)	変動の要因、変動の 実績	変動を少なくするために推奨される方法		
			プロトコルの改良 (Method)	試験者の技量向上 (Proficiency)	装置や設備の改善 (Laboratory)
菌の状態		傷害菌が多いと予想される場合	前培養増菌で傷害菌を十分回復させる。サルモネラ菌の場合、緩衝ペプトン水での前培養増菌で、この効果が認められている*6		
		ろ過集菌後の処理	メンブレンフィルター上に大腸菌検体を播き、これを一旦、非選択寒天培地上に置き、培養後、このメンブレンフィルターを選択培地に移す*7		
		標的菌の数<<競合菌の数	選択増菌培地でも、競合菌が数において標的菌を凌ぐ場合がある	寒天培地上では、コロニーの色や形状の違いがあれば、それを見分ける眼が重要	選択的な蛍光プローブがあれば選択的コロニー計数装置、また菌懸濁液ではセルソーターが利用できる可能性がある
寒天プレート培養		寒天プレートに塗抹した菌が均一に展開されているか	直径9cmの寒天プレートの場合、通常0.1mL/プレート、多くて0.2mL/プレート。これ以上では均一な展開が難しい	塗抹後の展開は基本技術。熟練度に影響される	
		インキュベーター内に積層したプレートの温度分布の不均一性	2時間以内にプレート内を規定温度にするためには、3段以下とし、開口したプラスチックバッグに入れ、庫内はエアークリアが推奨される**		庫内攪拌機能付き及び、できれば庫内温度モニター(複数台)設置*7
コロニー計数		目視による計数値の違い	同じプレートを5人が計数したら±18%、また同じプレート(複数枚)を同一試験者が繰り返し計数したら±7%*9。1人の試験者が複数のプレートを繰り返し計数した結果、計数値が±5%以内であったものは、73%のプレートのみであった*10	寒天培地上では、コロニーの色や形状の違いがあれば、それを見分ける眼が重要	自動計数装置の使用によって改善されたが、現在でも十分とは言えない

* 1 : Thoroughly agitate 1:10 dilution to ensure complete solution or distribution of egg material in diluent by shaking each container rapidly 25 times, each shake being up-and-down movement of ca 30 cm, in time interval not exceeding 7s. Let bubbles escape. ... Pour all plates and inoculate other media within 15 min after preparation of first dilution to avoid growth or death of microorganisms. (AOAC Official Method 940.37, First Action 1940, 17.103)

* 2 : ±2%の変動が生じると指摘(ISO 6887-1(1999))

* 3 : ±5%の変動が生じると指摘(ISO 6887-1(1999))

* 4 : Nordic Committee for Microbiological Standardisation; NMKL (1994), 十分攪拌されたことを確認する方法の規定はない。

* 5 : NMKL (1994)

* 6 : 標準法委員会で確定したサルモネラ定性試験法でも、この前培養増菌操作が規定されている。

(<http://www.nihs.go.jp/flim/kensa/sal/Salmonells%20ST4-091014F.pdf>)

* 7 : ISO 16649-2(2001)

* 8 : Peterz, M. E. G., Temperature in agar plates and its influence on the results of quantitative microbiological food analyses. *Int. J. Food Microbiol.*, 14, 59-66(1991)

* 9 : Fowler, J. L., et al., Analyst variation in doing the standard plate count as described in Standard Methods for Examination of Dairy Products. *J. Food Prot.*, 41, 4-7(1978)

* 10 : Peeler, J. T., et al., Replicate counting errors by analysts and bacterial colony counters. *J. Food Prot.*, 45, 238-240(1982)

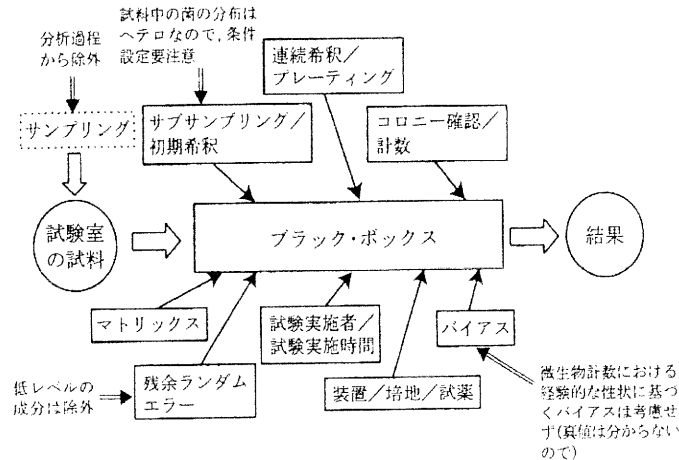


図-1 不確かさの主要因チャート

て詳細な調査研究結果を発表したり。要因分析とともに、変動を少なくするための具体的指針も述べられている。その内容に、さらに筆者のコメントを加味して表-1に示す。

4. ISO の考え方

現在 ISO TC34(食品)/SC9(微生物)の議長である Lombard によって、ISO の考え方 (ISO/TS 19036) が解説されている⁷⁾。微生物試験の定量試験における不確かさの要因は図-1のようにまとめられる。サンプリング条件やバイアスなどは、さらに不確かさの推定が難しいので、最初から考慮しないとしている。したがって、不確かさの原因を分析し、これをできるだけ小さくすることを努力目標とはするが、いわゆるボトムアップ方式での推定は行わないとの考えである。すなわち、トップダウン方式の考え方であり、具体的には次のような指針が示されている。

定量試験に対しては、

- ① 菌種、マトリックス、生理学的条件、試験法の種類の組合せに対して規定される1つの試験法ごとに s_R (Reproducibility standard deviation) を求める。
- ② s_R は、元来、室間共同試験(コラポスタディ)によって求める室間再現精度(Reproducibility)の標準偏差であるが、ISO/TS 19036 では、中間精度(同じ試験室内であるが、試験者も装置も試験日も、意識的に異なる条件にして行う試験で求めた標準偏差)を s_R の第一優先とする。
- ③ 標準偏差に包含係数(k : Coverage factor)を掛けた値 ks_R を、「拡張不確かさ(U)」と定義。
- ④ 正規分布を仮定すれば、観測値が 95 %、99 % の信頼性でとり得る値(信頼性区間: Confidence interval)は、各々、平均値 $\pm 2s_R$ 、平均値 $\pm 3s_R$ である。

一方、定性試験に関しては ISO は TC34/SC9 で検討中であり、AOAC の統計ワーキンググループも ISO TC34/SC9 への積極的な参加を提唱しているが、現時点では規定になっていない。

5. 不確かさ推定の実例

浄水中の汚染菌数の定量試験における不確かさを推定した例⁷⁾を紹介する。図-2に示すように n 個の試料をそれぞれ 2 分割し、希釈系列を作製し、寒天平板法でコロニーを計数した。結果を表-2に示す。試料の個数を i 、2 反復試料の計数値を y_{i1} 、 y_{i2} ($i = 1 \sim i$) とすれば、表-2 の場合は $i = 16$ であり、分散は

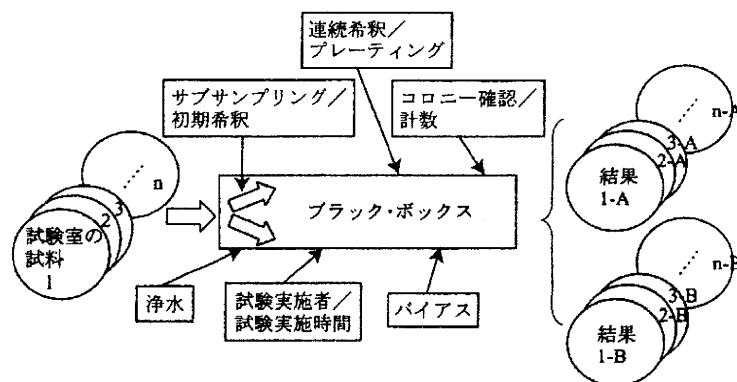


図-2 浄水中の汚染菌数の定量試験における不確かさの推定

表-2 浄水中の汚染菌数の定量試験における計数値

No.	計数値 1	計数値 2	Log R ₁	Log R ₂	LogR ₁ - LogR ₂	(LogR ₁ - LogR ₂) ²
1	112	127	2.0492	2.1038	0.0546	0.002981
2	37	39	1.5682	1.5911	0.0229	0.000524
3	26	23	1.4150	1.3617	0.0533	0.002841
4	35	37	1.5441	1.5682	0.0241	0.000581
5	75	59	1.8751	1.7709	0.1043	0.010878
6	21	23	1.3222	1.3617	0.0395	0.001560
7	229	220	2.3598	2.3424	0.0174	0.000303
8	161	147	2.2068	2.1673	0.0395	0.001560
9	102	89	2.0086	1.9494	0.0592	0.003505
10	98	107	1.9912	2.0294	0.0382	0.001459
11	53	49	1.7243	1.6902	0.0341	0.001163
12	217	223	2.3365	2.3483	0.0119	0.000142
13	72	48	1.8573	1.6812	0.1761	0.031011
14	30	27	1.4771	1.4314	0.0457	0.002088
15	217	199	2.3365	2.2989	0.0376	0.001414
16	130	210	2.1139	2.3222	0.2083	0.043389
Sum						0.105400

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^t (y_{i1} - y_{i2})^2}{2t}$$

となる。計数値を対数変換した値とすれば

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^t (\text{Log}R_1 - \text{Log}R_2)^2}{2t} = \frac{0.105400}{32}$$

となる。これから、標準偏差 $s = 0.0574$ となり、したがって拡張不確かさ $2s = 0.1148$ となる。これが、この試験法の固有の特性として定められる値である。したがって、この試験法で計数した場合はすべてこの「不確かさ」で議論されることになる。例えば表-2のNo.1の試料の試験結果のみに対しても、そのままこの不確かさの推定値が適用される。

No.1の試料では対数平均値(av)は

$$av = (2.0492 + 2.1038) / 2 = 2.0765$$

であるので、

95%の信頼性区間 = $av \pm 2s = 2.0765 \pm 0.1148 = 2.1913 \sim 1.9617$

となる。逆対数変換すると 92 ~ 155 cfu となる。

6. 微生物生菌の標準物質

微生物試験における不確かさの要因は、表-1からも理解されるように、内容も複雑であるが、除去することが難しいものが多い。したがって、不確かさを推定する方法はトップダウン方式にせざるを得ない。したがって、生菌標準物質が極めて重要である。

NISTは、ヒト血清、尿、食品マトリックス、動物組織、汚泥、植物マトリックス、大気中の微粒子など、自然のマトリックスに含まれる微量の無機及び有機成分の濃度検定のための標準物質を多数開発している。しかし、微生物を含む試料は扱っていない。国内でも、例えば、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構や独立行政法人産業技術総合研究所で認証標準物質の開発が進められているが、微生物生菌については行っていない。

Feraが1990年に開発した生菌添加標準試料は、FEPASという技能試験プログラムで利用されている。

2003年にオーストラリア・BTF社のMorganらによって開発されたBioBall[®]は、保存可能な生菌標準物質として極めて有用なものであり、現在までに8株(*Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Clostridium sporogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella abony*, *Staphylococcus aureus* 各1株)が商品化されている。しかし、試験法のバリデーションのためには、多種類の菌株の標準物質が必要である。BioBallは、フリーズドライ法で乾燥菌としているが、多くの細菌はこの処理に耐えられないのかもしれない。また、たとえ耐えられて生菌の状態を保持できたとしても、ストレスを受けた細菌になっているのかもしれない。

ヨーロッパにはBioBall類似品がある。IRMMという組織が標準物質を提供している。凍結乾燥させた細菌をゼラチンカプセルに入れた状態で供給されている。6菌種だけであるが、生菌数の認証値と95%信頼限界が示されている。

生菌の凍結保存は可能であるが、解凍した場合に、1個の単位で確実な菌数を得ることは今のところ技術的に大きな壁がありそうである。それならば、多少煩雑でも、その場で確実に所定の数の生菌試料を調製できるシステムを開発することが現実的な解かもしれない。

おわりに

微生物試験法のバリデーションでは、プロトコールが決まっているとは言っても、「経験者の判断」が必要となる場面が幾度となく現れる(本書第2章第1節I「妥当性確認の要求事項」参照)。したがって、規格を読むだけでは完全には「ハウツー」が決まらない。そのことは「不確かさの推定」に際しても同様である。「なぜ?」という立場での理解が必須となる。そのためには、例えばAOACやISO TC34/SC9などのキーメンバーと直接議論することが近道かもしれない。

不確かさに関しては、厚生労働科学研究：食品の安心・安全確保推進研究事業「食品の規格基準に係る測定値に伴う不確かさに関する研究」(H20-22)で構成した専門調査委員会で、後藤哲久(信州大学)、布藤聡(ファスマック)、小高秀正(日水製薬)、田中廣行(日本食品分析センター)、杉本敏明(日本食品分析センター)、椿広計(統計数理研究所)、藤田利治(統計数理研究所)、逸見昌之(統計数理研究所)の各氏に、委員あるいはアドバイザーとしてご協力頂いている。本稿で解説した内容も、各委員・アドバイザーから提供された情報やご助言に負うところが大きい。この場を借りて感謝の意を表す。

〔松岡英明〕

文献

- 1) ISO 16140:2003, Microbiology of food and animal feeding stuffs — Protocol for the validation of alternative methods (2003).
- 2) AOAC INTERNATIONAL, Appendix D: Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. In "Official Methods of Analysis", 18th edition (2005).
- 3) ISO, Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM) (1993).
- 4) Corry, J. E. L., et al., A critical review of measurement uncertainty in the enumeration of food micro-organisms. *Food Microb.*, **24**, 230-253 (2007).
- 5) Lombard, B., Estimation of measurement of uncertainty on food microbiology: The ISO approach. *Accred. Qual. Assur.*, **17**, 94-100 (2006).
- 6) ISO/TS 19036:2006, Microbiology of food and animal feeding stuffs — Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations (2006).
- 7) Forster, L. I., Measurement uncertainty in microbiology. *J. AOAC Int.*, **86**, 1089-1094 (2003).
- 8) Morgan, C. A., et al., Production of precise microbiology standards using flow cytometry and freeze drying. *Cytometry*, **62**, 162-168 (2004).

解 説

微生物の迅速検出法

齊藤美佳子・松岡 英明

ISSN 0385-5201

防 菌 防 黴 誌

Bokin Bobai

Shinkousan Bldg., 13-38, Nishi-Hon-machi 1-chome, Nishi-ku, Osaka, 550-0005, JAPAN.

THE SOCIETY FOR ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL AGENTS, JAPAN.

	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。この点も気になることである。実用的には、コロニー形成まで1日以上以上の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で, 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 酵母出芽形状解析法	[2, 3] [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)* レドックス色素を利用した電気化学測定法	[5, 6]
		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	[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	

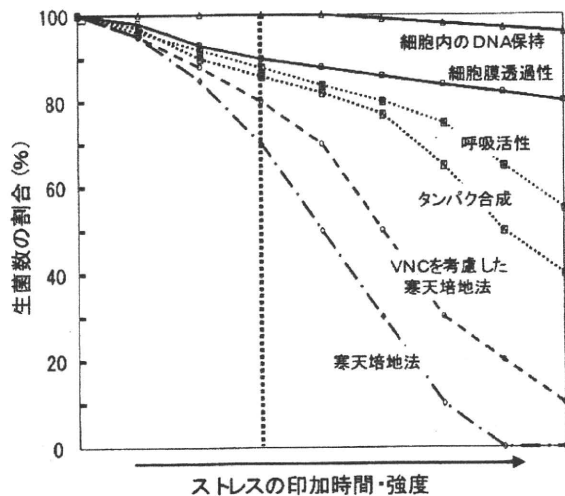


図 1. 生死菌判別の指標の違いによる生菌率の相違

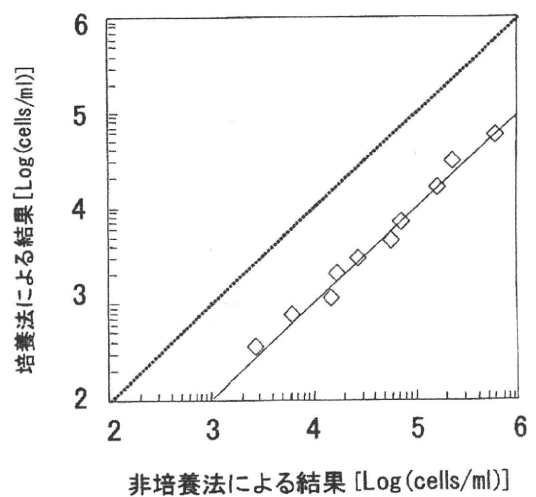


図 2. 培養法と同一の結果を出力する非培養法

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。

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ら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

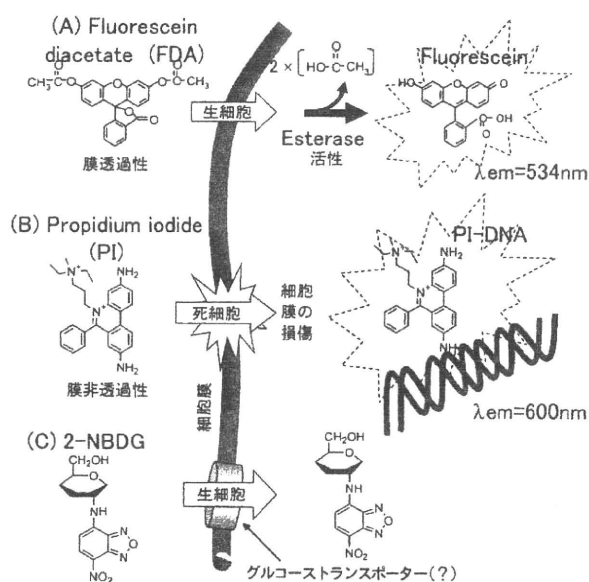


図3. 一般生菌数計測に利用される蛍光色素の例

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すようになる (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

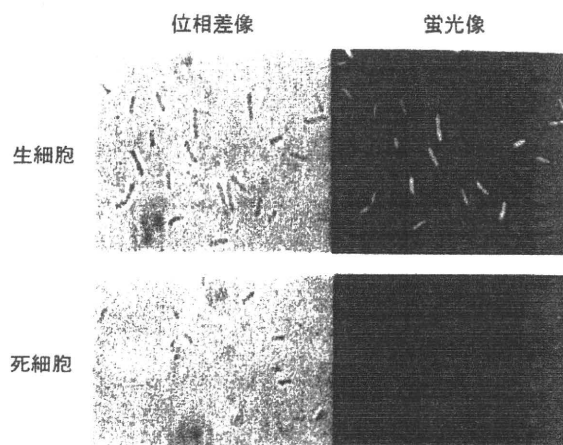


図4. 2-NBDG を用いて生きている大腸菌を検出

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 とその他 の微生物	<i>Salmonella enteritidis</i> PT4		○	—	—	—	—	—	—	—
		<i>Salmonella typhimurium</i> PT49		○	—	—	—	—	—	—	—
<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>Aeromonus 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		○	—	×	×	○	×	○	○		

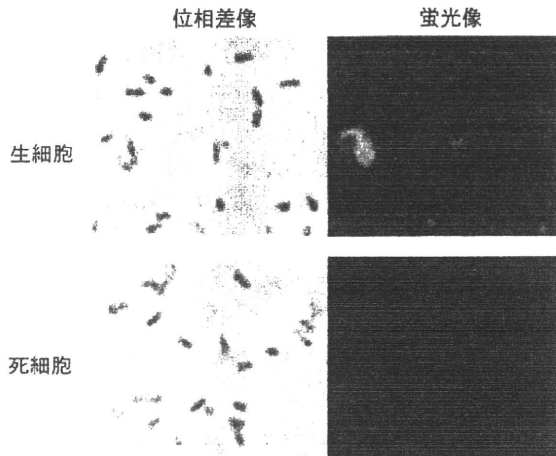


図5. NBD-Ileを用いて生きていた大腸菌を検出

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よし、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¹¹⁾。また、遠心

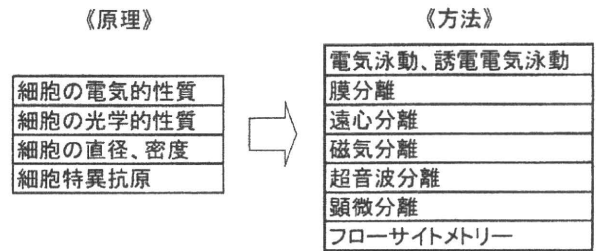


図6. 生菌分離の原理と方法

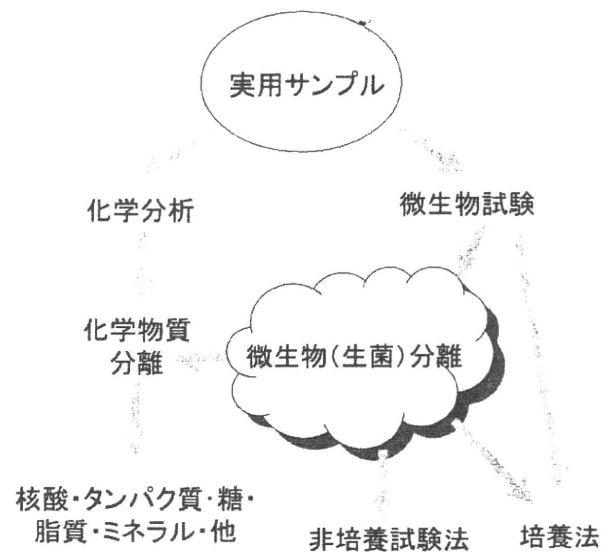


図7. 生菌分離の目的

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

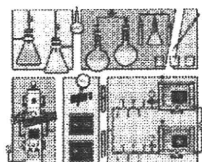
- 1) Kitaguchi, A., Yamaguchi, N., Nasu, M., (2006) Simultaneous enumeration of viable *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. Within three hours by multicolor fluorescence in situ hybridization with vital staining. *J. Microbiol. Methods*, **65**, 623-627.
- 2) 呉 基鳳, 松岡英明 (1996) バイオセルトレーサーによる細胞センシング. 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 51 Cr-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.

特集

迅速微生物検査法

微生物迅速検査装置「バイオプローラ」



島北 寛仁／齊藤美佳子／松岡 英明

FEATURES

はじめに

食品への微生物汚染は、検体劣化を引き起こすだけでなく、健康被害に影響する可能性もあり、日々の生産管理はもちろんのこと、その検出が重要な要素となる。食中毒要因細菌種として、黄色ブドウ球菌、サルモネラ、病原性大腸菌O157などが挙げられる。これらは、ヒトの体温近辺で増殖しやすく^{1, 2)}、また、毒素を産生する³⁾ため、これらの細菌汚染を中心に検査することは消費者の健康被害防止のためには重要である。しかしながら、製品生産工程管理に視点を置くと、製品の劣化に関与する細菌は、これら毒素産生細菌に限られたことではないため、細菌全種を対象に計測することも検体によっては必要となる。

微生物検査には、培養法が広く利用されている。培養法は原理的に増殖能力のある微生物を検出することができるため、生きている微生物数を把握することができる。しかし、培養法は培養条件が一致していない微生物^{4, 5)}や、生きているが、損傷などの傷害により増殖活性が低下している微生物 (Viable but non-culturable; VBNC) は培養

法での検出が困難である^{6~8)}。また、死菌は培養法では原理的に検出することができない。食品によっては加熱殺菌処理をすることができるものがあるが、加熱処理によって細菌が死滅するものの、細菌由来の毒素⁹⁾が残存することがあり、必ずしも安全性を担保できるものではない。つまり、直接、毒素を、あるいは死菌を含めた検査をすることが、より高い安全性の維持に求められる。さらに培養法は、微生物の生理現象である増殖能を利用した検出方法であるため、微生物が増殖しコロニーを形成するのに時間が必要である。そのため、検体によっては、培養法では事後確認となる。

一方、培養操作を実施しない、非培養法は、迅速に微生物数を検出することができる技術である。非培養法は、微生物の増殖を指標としていないため、VBNCや死菌なども検出対象となる。非培養法の手段としては、細胞内のアデノシン3リン酸(ATP)¹⁰⁾を検出するものや、着色料で染色¹¹⁾し、光学顕微鏡を利用して目視計数する手段などがあるが、その一つに蛍光染色法がある。蛍光染色法は微生物の特性に合わせた蛍光染色試薬を用い、細胞を蛍光発光させることで高精度に検出することができる。しかしながら、蛍光染色法では、微生物ではない自家蛍光物質の混入などにより、擬陽性判断となることがあるため、対象検体が限定される。そこで、蛍光染色法では、これらを除去するための前処理法が必要となることが多い。

しまきた ともり 松下エコシステムズ(株) バイオセンシング事業プロジェクト
さいとう みかこ/まつおか ひであき 東京農工大学 大学院工学府生命工学専攻

本稿では、蛍光染色法を利用した微生物迅速検出装置「バイオプローラ」について紹介すると共に、これまでに開発した検体前処理方法について概説する。

1. 蛍光染色試薬とその指標

微生物を対象とした蛍光染色法は大きく二種に分類できる。一つ目は、微生物を特定することができる染色手段、二つ目は、微生物の種類を特定せずに、計数できる染色手段である。前者は、Fluorescent *in situ* hybridization 法 (FISH 法)¹²⁾ や蛍光抗体法¹³⁾ があり、微生物を特定するものであるが、本稿では記さない。後者は、微生物の各種生理現象を検出するものであり、その蛍光試薬は以下の4種に大別することができる(表1)。

1-1 細胞膜の頑健性を指標とする蛍光試薬

細胞膜の安定性を指標とする蛍光試薬として、インターカレート型の染色試薬が挙げられる。インターカレート型は、DNAの配列に挿入される形で入り込み、構造をシフトさせることで励起光に対し蛍光を発することができる試薬である。細胞膜透過性と細胞膜非透過性の二種類がある。細胞膜非透過性の試薬は、細胞表面の損傷部位から浸透することができる。すなわち、「細胞膜非透過性の試薬で染色される＝細胞膜が損傷している＝死菌」と仮定しているものである。「細胞膜透過性の試薬＝全菌数」、「細胞膜非透過性の試薬＝死菌数」として、組み合わせることで細胞の状態を把握することができる。前者の試薬として、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)^{14~16)}

やSYBR Gold¹⁷⁾、SYTO シリーズ¹⁸⁾、アクリジンオレンジ (AO) などが存在する。また、後者の試薬としては、Ethidium bromide¹⁹⁾ や Propidium iodide (PI)^{14~16, 20, 21)}、SYTOX シリーズ²²⁾ などが挙げられる。

1-2 細胞の呼吸活性を指標とする蛍光試薬

細胞の呼吸活性を指標とする蛍光試薬として、5-Cyano-2,3-ditolyl-2H-tetrazolium chloride (CTC) が挙げられる²³⁾。CTCは細胞に取り込まれた後、呼吸活性に伴う電子伝達系により、CTC formazan (CTF) に還元される。CTFは水に不溶性であるため、細胞内に蓄積し、緑色励起光に対し赤色蛍光を発する。CTCにより染色され、発光する微生物は、呼吸活性を有していると判断できる。

1-3. 細胞内酵素活性を指標とする蛍光試薬

細胞内酵素活性を指標とする蛍光試薬として、6-Carboxyfluorescein diacetate (6-CFDA) および、Fluorescein 誘導体が挙げられる²⁴⁾。6-CFDAはそれ自体、励起光に対し、蛍光を発しないが、細胞に取り込まれた後、細胞内のエステラーゼにより分解され、Fluorescein が遊離し、青色励起光に対し、緑色蛍光を発する。6-CFDAにより染色され、発光する微生物は、細胞内のエステラーゼ活性を維持している状態にあると考えられる。

1-4. 細胞の取り込み活性を指標とする蛍光試薬

細胞の多くはその活性を維持するために炭素源としてグルコースを取り込み、代謝している。従属栄養細菌や酵母、糸状菌などの微生物も同様にグルコースを代謝し、ATPを産生する。そこで

表1 各種蛍光染色試薬の分類と指標

分類	試薬例	指標	原理
インターカレート型	膜浸透性	細胞膜透過性 および核酸	細胞膜透過性から細胞膜の状態を評価
	膜不浸透性		
呼吸活性型	CTC	呼吸活性の有無	呼吸活性に伴う電子伝達系により還元され発光
酵素活性型	6-CFDA 他	エステラーゼ活性の有無	酵素分解によりフルオレセインが発光
取り込み型	2-NBDG, 6-NBDG, NBD-Gly 他	炭素源取り込み活性	活性状態を炭素源の取り込みで評価

グルコースの基本骨格を蛍光ラベル化した蛍光グルコース (2NBDG) が松岡らによって開発された^{25, 26)}。これは、グルコサミンのアミノ基に 4-Chloro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-Cl) をラベル化したものである。微生物は蛍光グルコースを取り込み、青色励起光に対し緑色蛍光を発する。細胞が炭素源を取り込もうとする行為を生きていると仮定し、細胞活性染色手法として利用することができる。また、アミノ酸をラベル化した NBD-Gly も有効な手段として利用できる可能性がある²⁷⁾。なお、2NBDG の利用については微生物に止まらず、動物細胞でのグルコース代謝活性の測定にも利用されるようになっており²⁸⁾、今後、細胞の代謝異常や細胞代謝メカニズムなどの解析に利用されるものと期待される。蛍光グルコースは、近々、わが国で市販されるとのことである。

以上、さまざまな蛍光試薬が存在しているが、対象となる微生物や検体の種類、検出の方法などに対し、適した染色試薬を選択することでより正確な計数が可能となる。

2. バイオプローラ (計測装置本体、微生物回収ユニット) の特徴

バイオプローラは、計測装置本体と微生物回収

ユニットからなる。計測装置本体は励起光源を備えており、微生物回収ユニットに回収し、蛍光染色された微生物を蛍光発光させ、自動で計数することができる装置である^{14, 15)}。以下、これらの特徴について記す。

2-1 計測装置本体の構造

バイオプローラは蛍光発光させた微生物を自動で計数する装置であり、内部に **Light Emitting Diode (LED)** 励起光源、**受光側分光フィルタ**、**レンズ**、**Charge Coupled Device (CCD)**、**XY-可動ステージ**が設置されている (図1)。バイオプローラは顕微拡大する装置であるが、顕微鏡と異なる点として、励起光源に LED を使用しているため、小型かつ省電力設計となっている。また、後述する微生物回収ユニットのメンブレンフィルタを裏面から平面性を保ちながら押し上げるため、メンブレンフィルタ表面からたわみが消え、張りが生じ、メンブレンフィルタ表面からレンズまでの距離が一定に保たれる。その結果、フォーカスを調整する必要がない。励起光で励起されて発光した微生物は、目的の蛍光波長のみを分光フィルタで選択し、CCD で発光画像として取得する。

発光画像は、PC に予めインストールされたバイオプローラ計数用ソフトウェアにより、輝度、

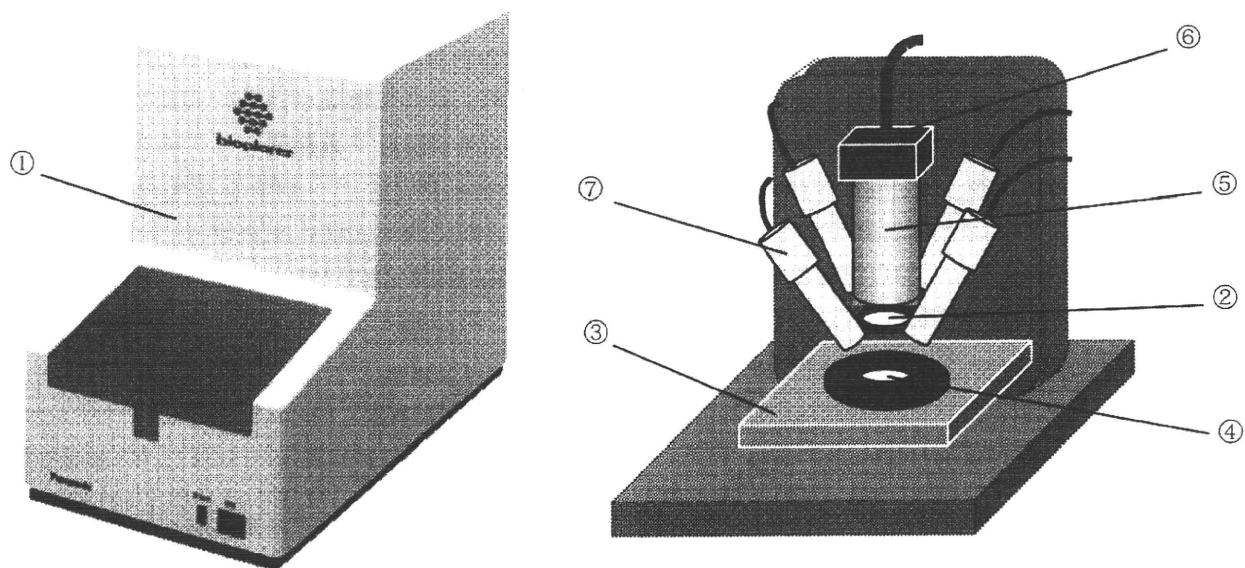


図1 バイオプローラ計測装置本体の外観および構造

①装置外観 ②受光側分光フィルタ ③XY-可動ステージ ④微生物回収ユニット ⑤レンズ ⑥LED励起光源 ⑦CCD

最小ピクセル数、最大ピクセル数が設定の範囲内に納まったものが、微生物と認識され、計数される。設定の範囲内に入った一つの発光点を一つの微生物として認識することから、回収した微生物の大きさや輝度に差がある場合でもそれぞれ一個として計数する。バイオプローラによる計数範囲は、 10^2 個/フィルタ～ 10^5 個/フィルタである¹⁴⁾。

2-2 微生物回収ユニットの構造

微生物回収ユニットは、検体を注入するファンネル、微生物を回収するフィルターユニット、マニホールドに刺し入れるベースの3部からなる。ファンネルは、検体を12mlまで注ぎ入れることができる。また、ファンネルの内側底部にプレフィルタを設置することができる構造としており、検体に応じたユニットを選択することができる。プレフィルタの設置により、異物除去のための前処理と微生物の分離・回収を一体化することがで

きる。フィルターユニットに設置したメンブレンフィルタには、孔径 $0.4\mu\text{m}$ のポリカーボネートフィルタを用い、その表面を金属蒸着膜処理している。これにより、励起光の反射を抑制し、画像のバックグラウンドを低減させることができる。また、ろ過による脱色防止などの効果がある。ベースには、中空の針がベース内側の中央部に設置されており、これをマニホールドのゴム栓に突き刺す。その後、マニホールドにつなげた吸引ポンプを利用し、吸引ろ過することで、検体や試薬のろ過を行なう(図2)。ろ過量は、 0.1ml ～ 50ml であるが、これは検体の種類や状態に依存する¹⁴⁾。

3. 微生物検出性能評価

以下、バイオプローラを用い、各種検体中の微生物検出性能について評価を行なった結果の概要を紹介する。

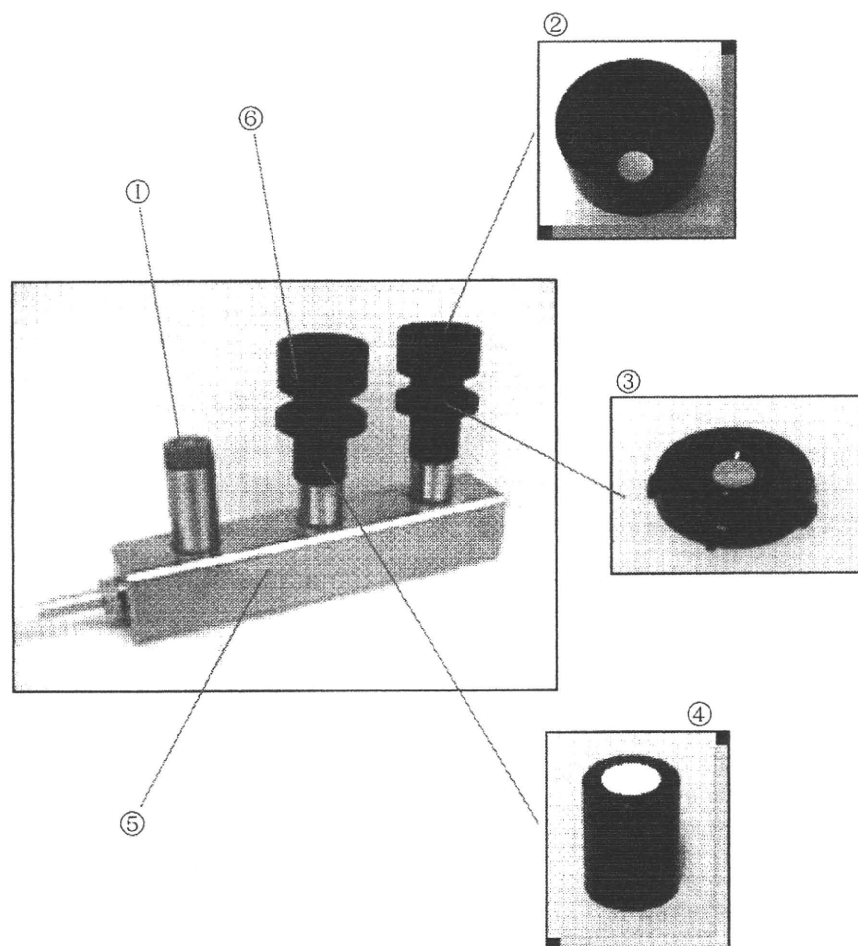


図2 バイオプローラ微生物回収ユニット

①ゴム栓 ②ファンネル ③フィルターユニット ④ベース ⑤マニホールド ⑥ユニット外観

3-1. 菌液検出性能評価

生理食塩水にスパイクした微生物について、バイオプローラ計数値と培養法の比較を行った。培養法は、標準寒天培地または Soybean Casein Digest 寒天培地 (SCD 寒天培地) を用い、36℃、24 時間の培養条件とした。供試菌として、*Escherichia coli* NBRC 3301、*Salmonella Enteritidis* IFO 3315、*Klebsiella pneumoniae* NBRC 14940、*Enterobacter intermedius* ATCC 33110、*Citrobacter freundii* ATCC 8090、*Pseudomonas aeruginosa* NBRC 13275、*Staphylococcus aureus* NBRC 12732、*Bacillus subtilis* NBRC 3023、*Candida albicans*

NBRC 1594、*Saccharomyces cerevisiae* NBRC 0555 を用いた。酵母二種は、SCD 寒天培地で、それ以外の細菌は標準寒天培地を用いて培養した。これらの細菌および酵母は、前培養したものを注射用生理食塩水に相当濃度懸濁し、評価を行った。微生物の回収には、ファンネルが無い状態の微生物回収ユニットを使用した。図3に *E.coli* NBRC 3301 および *S.aureus* NBRC 12732 のスパイク試験の結果を示す。この結果、培養法に対しそれぞれ、 $r=0.93$ 、 $r=0.99$ の相関係数であった。また、表2に各種微生物の培養法とバイオプローラの相関を示す。各種微生物において、培養法とバイオプローラの計測結果の間に $r=0.90$ 以上の相関係数が得

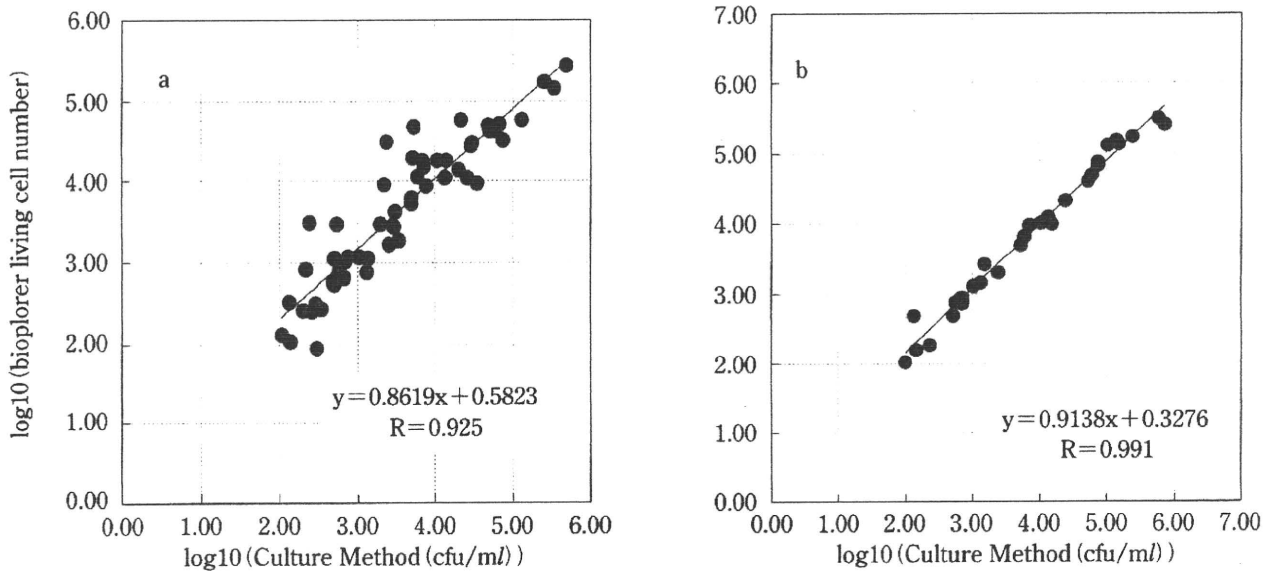


図3 バイオプローラと培養法における細菌懸濁液中の計数比較
 菌液は注射用生理食塩水にスパイクし、各手法で計測した。培養条件は36℃、24時間
 a : 大腸菌菌液 b : 黄色ブドウ球菌菌液

表2 バイオプローラと培養法における各種細菌懸濁液の相関性

Strains		Correlation Coefficients	
Gram Negative	<i>Escherichia coli</i>	$Y = 0.86X + 0.58$	$r = 0.925$
	<i>Salmonella Enteritidis</i>	$Y = 0.88X + 0.39$	$r = 0.941$
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	$Y = 0.97X + 0.25$	$r = 0.999$
	<i>Enterobacter intermedius</i>	$Y = 0.85X + 0.15$	$r = 0.994$
	<i>Citrobacter freundii</i>	$Y = 0.96X + 0.35$	$r = 0.989$
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$Y = 1.14X - 0.34$	$r = 0.967$
Gram Positive	<i>Staphylococcus aureus</i>	$Y = 0.91X + 0.33$	$r = 0.991$
	<i>Bacillus subtilis</i>	$Y = 0.98X$	$r = 0.994$
Yeast	<i>Candida albicans</i>	$Y = 0.90X + 0.01$	$r = 0.996$
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$Y = 1.60X$	$r = 0.950$

られた¹⁴⁾。従って、微生物のみの懸濁液では、実用的にバイオプローラ法を培養法に対する代替法としても差し支えないと判断できる。

3-2 食材中の菌数検出性能評価

食材中に含まれる自然由来微生物について、バイオプローラ計数値と培養法の比較を行った。培養法は、標準寒天培地を用い、36℃、48時間の条件とした。食材検体として、牛肉、豚肉、鶏肉、キャベツ、レタス、カイワレ大根、米、魚切り身を用いた。これらの食材を25g採取し、それを225mlの注射用生理食塩水中に浸し、30秒間、ストマッカー処理した。ストマッカー処理後、懸濁液を回収し、そこに含まれる微生物数を計数した。

バイオプローラ計数時には、ファンネルに8μmの不織布をプレフィルタとして設置した微生物回収ユニットを使用し、食材断片を除去した。図4に牛肉およびレタスから回収した微生物の検出結果を示す。この結果、培養法に対し、それぞれ $r=0.98$ 、 $r=0.97$ 以上の相関係数であった。ただし、供試菌のように、培養条件があらかじめ分かっている検体に比べ、高めの菌数がバイオプローラで検出される傾向にあった。また、表3に各種検体の培養法とバイオプローラの相関を示す。その結果、各種食材中に含まれる微生物の培養結果とバイオプローラの間には $r=0.90$ 以上の相関係数が得られた¹⁴⁾。以上より、食材中に含まれる微生物の内、難培養微生物を含む微生物をバイオプローラ

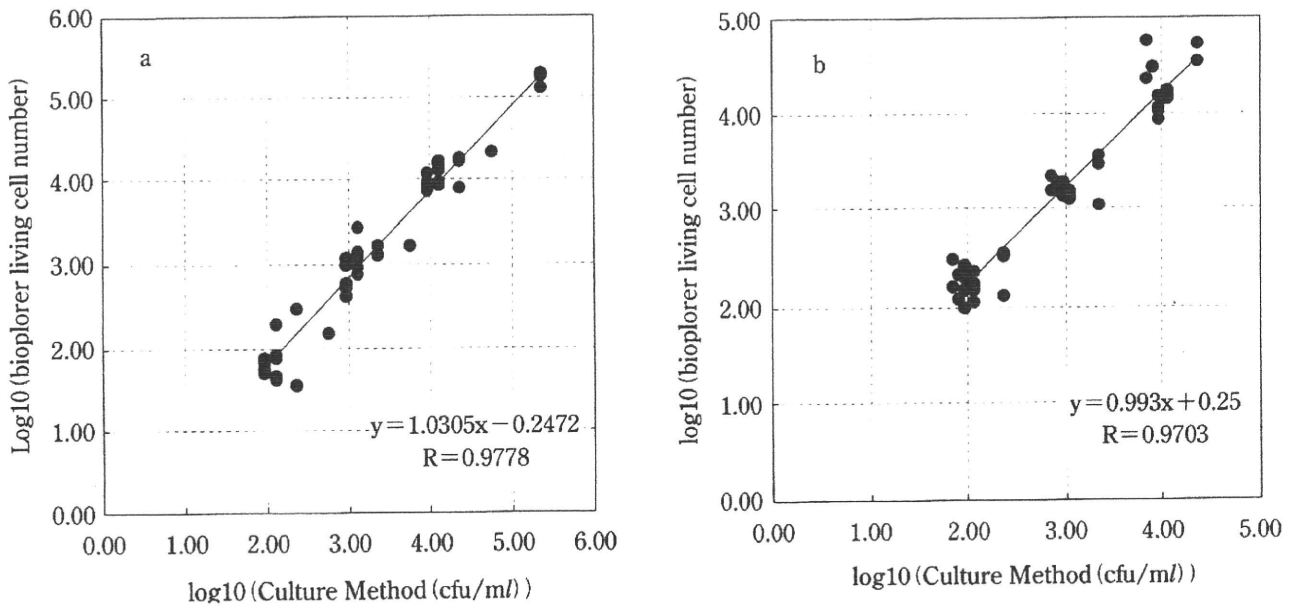


図4 バイオプローラと培養法における食材検体中の計数比較
食品検体中の菌液を各手法で計測した。培養条件は36℃、48時間
a:牛肉検体 b:レタス検体

表3 バイオプローラと培養法における各種食材由来細菌懸濁液の相関性

Samples	Correlation Coefficients	
	Regression Equation	Correlation Coefficient (r)
Beef	$Y = 1.03X - 0.25$	$r = 0.978$
Pork	$Y = 1.15X - 0.28$	$r = 0.995$
Chicken	$Y = 1.18X + 0.60$	$r = 0.998$
Cabbage	$Y = 0.89X + 0.10$	$r = 0.982$
Lettuce	$Y = 0.99X + 0.25$	$r = 0.970$
Radish Sprout	$Y = 0.97X - 1.33$	$r = 0.997$
Rice	$Y = 0.81X + 0.56$	$r = 0.954$
Fish	$Y = 1.21X + 0.01$	$r = 0.902$

では検出していると考えられるが、高い相関係数値から、これら食材中の微生物検査法として、培養法の代替法としてバイオプロローラを利用できると考えられる。

3-3 生乳中の微生物数検出性能評価

生乳は文字通り「生もの」であるため迅速計測が求められる。そのために、ミルククーラーেশションのような集乳現場では、非培養法として、顕微鏡を用い、目視で計数するブリード法が利用されている²⁹⁾。ブリード法は迅速にできる手法であるが、計数が困難であり、技量に伴う個人差が大きい。そのため、検査のデバイス化が求められている。また、生乳中には、カゼインや脂肪球、体細胞など微生物と同等若しくはそれ以上の大きさの粒子が多数存在しており、0.4 μ mのメンブレンフィルタによるろ過・回収が困難である。また、これらの粒子が励起光に対し蛍光を発するため、事前にこれらの粒子を除去することが非培養法にとって重要である。

そこで、われわれは、界面活性剤とタンパク質分解酵素を利用した最適な分解条件を検討し、こ

れらの成分が、カゼイン、脂肪球、体細胞を効率よく分解する一方で、微生物細胞を溶解しない新規の生乳用前処理試薬を開発した。生乳0.1mlに対し、界面活性剤0.5ml、タンパク質分解酵素1.0mlを加え、60 $^{\circ}$ C、3分間処理する。その結果、白濁していた生乳が透明になり、全量ろ過することができた(図5)。前処理後の生乳は、カゼイン、脂肪球、体細胞によるろ過・計測妨害物質がほとんど存在せず、含まれる微生物の計数が可能であった。次に本手法とブリード法の比較を行なった。その結果、ブリード法と高い相関($r=0.90$)が確認された(図6)。微生物懸濁液や各種食材に比べ、相関係数は低値であったが、これはブリード法のバラツキが要因であると考えられる。実際、バイオプロローラの変動係数は、5.9(=CV)%(<2.2 $\times 10^5$ cells/ml)~7.1(=CV)%(>3.2 $\times 10^5$ cells/ml)であったが、ブリード法は27.8(=CV)%(<2.2 $\times 10^5$ cells/ml)~39.6(=CV)%(>3.2 $\times 10^5$ cells/ml)であり、バイオプロローラ法は、ブリード法に比べ計測が安定していることが確認された。特に4.0~7.0(Log[cells/ml])の範囲においては、検出菌数が集中していたこともあり、

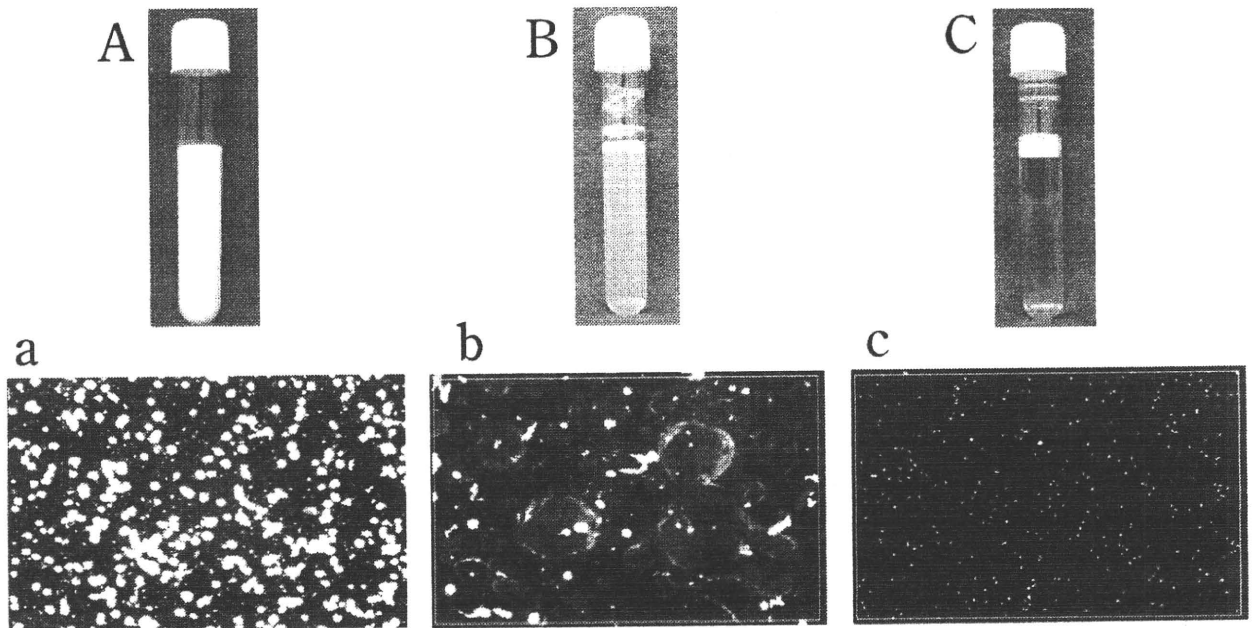


図5 前処理後の生乳変化

生乳0.1mlを界面活性剤およびタンパク質分解酵素で分解処理。

A、a：無処理 B、b：界面活性剤およびタンパク質分解酵素を添加直後 C、c：加温処理後

大文字：生乳の変化 小文字：バイオプロローラ計測画像