

微生物の迅速検査技術

野田 直広 (のだ なおひろ)

浅野 貴正 (あさの たかまさ)

北出 雄二郎 (きたいで ゆうじろう)

① まえがき

近年、病原性大腸菌 O157 や牛乳による集団食中毒事故、抗生物質耐性菌による院内感染、SARS（重症急性呼吸器症候群）など、微生物にかかわるリスクが社会問題となっている。この傾向は、食流通の広域化や高齢化社会への移行、海外旅行者の増加により、今後、一層強まっていくだろう。こうした背景を受け、微生物汚染の迅速検査に対するニーズは非常に高くなっている。

一方、微生物の迅速検査技術は 1990 年代以降、大きく進展している^{(1), (2)}。富士電機では、これまで水や環境分野を中心に微生物の検査技術を培ってきた^{(3), (4)}。また、食品分野への適用を考えた生菌の自動計数装置「スマートバクテリアカウンタ」を開発し、大腸菌の標準菌株を約 15 分で迅速検査できることを実証した^{(5), (6)}。

さらに現在は、微生物種の識別が可能な迅速検査手法として、マイクロコロニー法の技術確立に取り組んでいる。

本稿では、以下の取組みを紹介する。

- (1) 微生物の検査技術とマイクロコロニー法
- (2) マイクロコロニーの迅速な形成と自動検出

② 微生物の検査技術とマイクロコロニー法

2.1 微生物の検査技術

微生物の検査にはさまざまな方法があるが、公定法およびそれに準ずる方法は、(1)培養法、(2)染色法であり、これらを発展させた方法が、(3)マイクロコロニー法、(4)抗原抗体反応や遺伝子を利用する染色法である。

(1) 培養法

微生物をその増殖能に基づいて検知する方法である。培地組成や培養温度、嫌気好気状態の設定によって、目的とする種の微生物を選択的に増殖させ、検出することが可能で、100 年以上にわたり微生物検査の主流となってきた。この方法の最大の問題は、検査時間が長く⁽⁷⁾、後追い検査からの脱却が困難な点である。食中毒や院内感染といった問題を解決するには、きわめて短時間で微生物汚染を検査で

きる手段が必要である。

(2) 染色法

微生物を試薬で染色し検出する方法である⁽⁷⁾。培養に依存しないことから、迅速な測定が可能な点が特長である。スマートバクテリアカウンタは染色法に含まれる技術であり、酵素活性を持つ細菌をカルボキシフルオレセイン・ジアセテート (CFDA) 試薬で蛍光染色し、それを自動計数している。従来は、染色した微生物の検出を、手間のかかる顕微鏡観察や高度な実験機器に依存してきた。スマートバクテリアカウンタのような迅速簡便な自動装置の登場により、今後、染色法は食品製造現場などで広く用いられるようになるだろう。

(3) マイクロコロニー法

マイクロコロニー法は、培養法を発展させた技術であり、微生物の成長を微視的な段階で検知することで、培養法より検査時間を短縮できる。次節以降で詳述する。

(4) 抗原抗体反応や遺伝子を利用する染色法

抗原抗体反応や遺伝子を利用する染色法は、現在、大学など研究レベルで最も活発に取り組まれている技術である。特に遺伝子をターゲットとする方法は、多くの検討が行われている^{(8), (9)}。

2.2 マイクロコロニー法

マイクロコロニー法を概念を図 1 に示す。図中のカーブは細菌や真菌の成長過程を模式的に示している。細菌や真菌は、培養開始後、誘導期を経てから分裂あるいは成長を始める。コロニーのサイズ（縦軸）が A に達すると、マイクロコロニー法で検出できる。目視で検出できるのは、コロニーが B のサイズになった時点であり、これが培養法の検査時間である。検出するコロニーのサイズを小さくすることで、マイクロコロニー法は、従来の培養法に対して検査時間を大幅に短縮できる。以下に、マイクロコロニー法の特長を列挙する。

- (1) 培養法より検査時間が短い。
- (2) 培養条件の選択で目的の微生物だけを検出できる。
- (3) 培養法同様、微生物の増殖能をとらえており、衛生上



野田 直広

微生物迅速検査装置、水質計測機器の研究開発に従事。現在、富士電機アドバンステクノロジー(株)機器技術研究所副主任研究員。日本薬学会会員。日本防菌防黴学会会員。



浅野 貴正

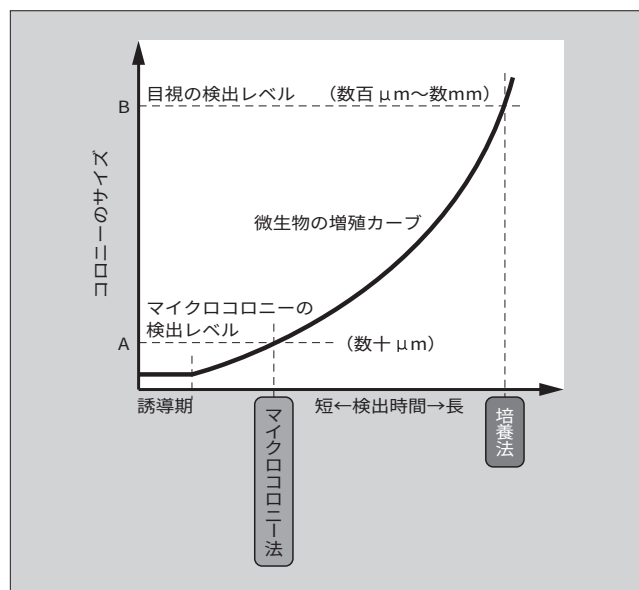
微生物迅速検査装置の研究開発に従事。現在、富士電機アドバンステクノロジー(株)機器技術研究所。日本機械学会会員。



北出 雄二郎

情報機器、制御機器、計測機器の研究開発に従事。現在、富士電機アドバンステクノロジー(株)機器技術研究所長。日本機械学会会員、日本デザイン学会会員。

図1 マイクロコロニー法の概念



のリスクに直結する指標である。

(4) 特殊な試薬が要らない。

③ マイクロコロニーの迅速な形成と自動検出

3.1 マイクロコロニーの迅速な形成

(1) 食中毒原因微生物

食中毒の原因微生物はサルモネラ菌、腸炎ビブリオなど数多いが、特に重要なのは、汚染指標微生物として検査される大腸菌（127 ページの「解説」参照）である。図2は、大腸菌（*Escherichia coli* K-12）のマイクロコロニー形成過程を顕微鏡観察したものである。培地は複数の比較で最もコロニー形成が速かった LB 寒天培地、培養温度は 37℃である。培養開始時、シングルセル（図中黒丸内の粒）の段階で画像中の大腸菌を認識するのは容易ではない。特に、微生物と同じような大きさや形状の粒子が混在する場合、画像から微生物を認識するのは困難である。一方、2～3 時間の培養を経ると、菌体の分裂・増殖によって、大腸菌は明瞭（めいりょう）なマイクロコロニーを形成した。マイクロコロニー法では、このような「成長する粒」を生きている微生物と判断する。したがってこの例では、大腸菌を 2～3 時間で検出できる。これは、従来の培養法、例えば、食品分野の公定法となっているデソキシコレート寒天培地による大腸菌群の推定試験が 20 時間を要するのに比べて、マイクロコロニー法はきわめて迅速な検査が可能なることを示している。

(2) 腐敗原因微生物

微生物の被害には、食中毒のほかにも腐敗の問題がある。腐敗原因微生物の代表例は、加熱殺菌で死滅しない耐熱性細菌、冷蔵状態のような低温でも増殖できる細菌である。耐熱性細菌としては、芽胞の形成によって耐熱性を発揮するバチルス属細菌およびクロストリジウム属細菌が挙げられる。低温で増殖する細菌としては、シュードモナス属細

図2 大腸菌のマイクロコロニー

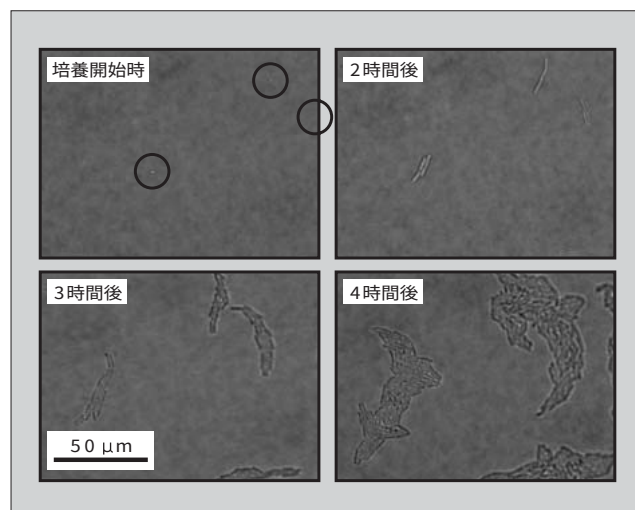
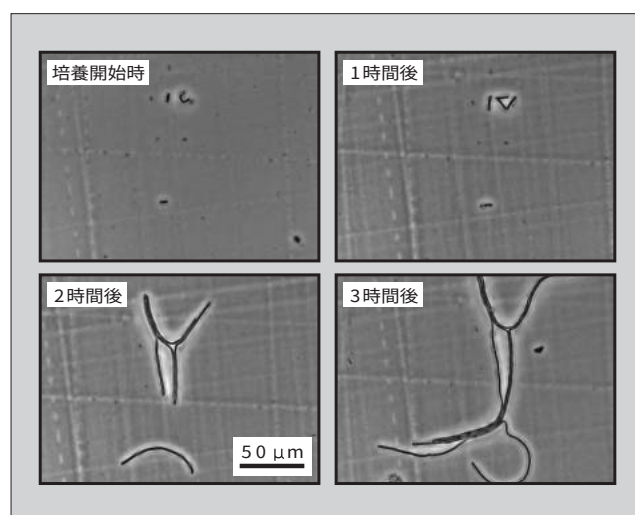


図3 セレウス菌のマイクロコロニー



菌が知られている。

図3はバチルス属の一種であるセレウス菌（*Bacillus cereus*）のマイクロコロニーを観察した顕微鏡画像である。大腸菌とは異なり、マイクロコロニーは線状に成長している。セレウス菌の場合、2 時間以内にはマイクロコロニーを検出することができ、従来の培養法が 18～24 時間を要するのに対して、大幅に検査時間が短縮できる。

腐敗原因微生物としては真菌（かび）も重要である。真菌は孢子を形成して空中に飛散し、乾燥にも耐えるため、多くの分野で汚染が問題になっている。しかし、真菌の検査には 1 週間程度の培養を要しており、特に、食品や製菓分野で迅速検査が求められている。

図4は、食品分野の代表的な汚染原因真菌であるこうじかび（*Aspergillus niger*）の発芽過程を観察した顕微鏡画像である。真菌は増殖プロセスが細菌と異なっている。こうじかびの場合、細胞分裂で増殖するのではなく、孢子からの発芽、菌糸の伸長という過程で成長する。マイクロコロニー法で真菌を検知するには、孢子の膨張、あるいは発芽後の菌糸の成長をとらえ、増殖能を持つ微生物と判断す

る。特に、発芽が起こるとサイズや形状が大きく変化するため、容易に検知できる。今回のこうじかびの場合、6～9時間で胞子が発芽し、検出できることが分かった。従来、マイクロコロニー法は細菌の検出に適用された研究が多かったが、今回、同じ原理が真菌の検出にも有効であることが分かった。

3.2 マイクロコロニー形成の特徴による微生物種判別

培養によって目視検知可能なサイズまで成長したコロニーは、微生物の種類によらずほぼ円形になる。それは、数 μm 程度の微生物が肉眼でとらえられるサイズまで成長するには数百～数千倍に増殖しなくてはならず、その中で成長方向がランダム、すなわち等方的になるためである。

一方、マイクロコロニーの段階では、コロニー形成の様子は、微生物の種類によってそれぞれ固有の特徴を示す。それは、増殖・成長のプロセスが、微生物おのおの異なるためである。このことを利用すれば、コロニー形成状況の違いから微生物種の判別が可能である。具体的な特徴としては、

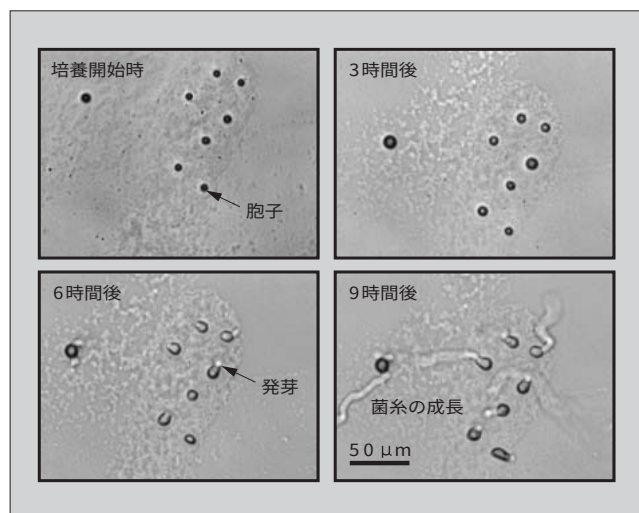
- (1) コロニーの形状（複雑度、円形度、縦横比）
- (2) コロニー形状の変化のパターン（重心位置）
- (3) 変化のタイミング

などが挙げられる。

表1は、上述の大腸菌、セレウス菌、こうじかびについて、マイクロコロニー形成の特徴を整理したものである。大腸菌はコロニー形状やその変化のパターンが異なることから、明らかにセレウス菌やこうじかびと区別ができる。セレウス菌とこうじかびとは、増殖速度の違いのために、複雑度など形状変化のタイミングが異なり、区別することができる。

従来、培養法における微生物種の判別は、培養条件（培地、温度、嫌気好気条件など）の設定に依存してきた。今回、新たな手法として、マイクロコロニーの形状に基づいて微生物種の判別を行うことができた。これは、マイクロコロニー法が単に培養法を時間短縮しただけでないことを

図4 こうじかびのマイクロコロニー（発芽過程）



示しており、マイクロコロニー法の有効性として重要である。

3.3 マイクロコロニー自動検出の検討

従来、形成したコロニーの検出は顕微鏡で行うケースが一般的であったが、今後、マイクロコロニー法の普及の課題となるのは検出の自動化である。今回、富士電機では、マイクロコロニー検出の自動化を検討したので紹介する。

図5は、マイクロコロニー検出実験の状況である。この実験では、 ϕ 90 mm のシャーレの中で大腸菌のマイクロコロニーを寒天培地上に形成させ、それを CCD カメラで画像としてとらえて画像データをパソコンに伝送した。パソコンで受けた画像（図6）に対してエッジ検出を行った結果、画像中のマイクロコロニーを検知することができた。

表1 微生物種によるマイクロコロニー形状の違い

微生物 特徴量	大腸菌	セレウス菌	こうじかび
複雑度	増殖により増大。 3～4時間後ピーク。 その後減少。	増殖により1～2 時間後から急激 に増大。	6～9時間で発芽 した後、増大。
円形度	増殖により減少。 その後増大。	増殖により減少。	発芽後、減少。
縦横比	増殖により増大。 その後減少。	増殖により増大。	発芽後、増大。
重心位置	常にコロニー領域に 含まれる。	増殖によりコロ ニー領域から外 れる場合がある。	増殖によりコロ ニー領域から外 れる場合がある。

図5 マイクロコロニー検出実験の状況

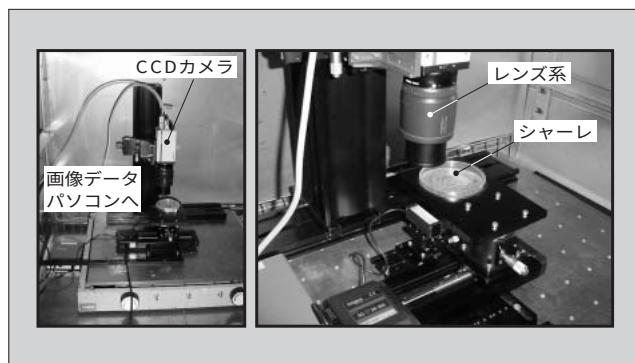
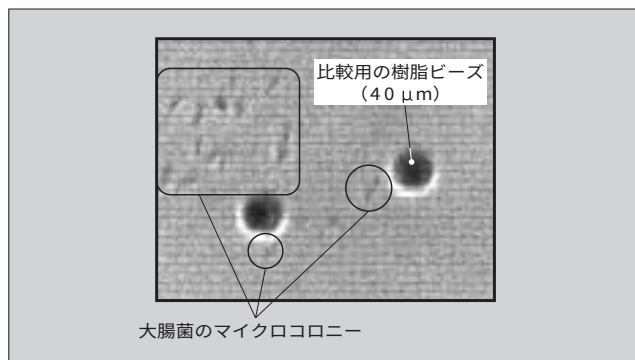


図6 実験装置でとらえたマイクロコロニーの画像



今回は 5 μ m の分解能を持つ光学系で、幅 10 μ m 以上に成長したコロニーを認識できた。また、標準的に用いられる ϕ 90 mm のシャーレでは 10 秒程度の短時間で全面をスキャンできることが分かった。これらの結果から、マイクロコロニーを迅速簡便にとらえる自動装置は、十分実現可能であることが分かった。

4 あとがき

迅速簡便な微生物検査技術として、マイクロコロニー法を紹介した。今回得られた成果を以下に列挙する。

- (1) マイクロコロニー法により、食中毒原因菌をはじめ、耐熱性細菌、真菌などの汚染原因菌を検出できる。
- (2) 検出時間は培養法より大幅に短縮できるほか、マイクロコロニーの形状から微生物種の判別が可能である。
- (3) コロニーの検出は自動装置によって迅速簡便に行うことが可能である。

微生物検査の迅速化は、食品や製薬、医療などさまざまな分野で衛生管理を向上させ、汚染や感染のリスクを低減し、社会的なコスト削減にも大きく寄与すると期待される⁽¹⁰⁾。今回の成果を踏まえ、今後、マイクロコロニー法を用いる迅速検査の商品化に取り組んでいきたい。

本件に関しては、大阪大学大学院薬学研究科那須正夫教授、山口進康助手、九州大学大学院農学研究院宮本敬久助教授から多くのご指導をいただいた。末筆ながら謝意を表する。

参考文献

- (1) 谷佳津治ほか. 微生物生態学の手法にみる 90 年代の進展. Microbes and Environments. vol.12, no.2, 1997, p.41-56.
- (2) 宮本敬久. 食品衛生細菌の簡易迅速検査法. 日本食品科学工学会誌. vol.47, no.3, 2000, p.173-180.
- (3) Nogami, T. et al. Estimation of bacterial contamination in ultrapure water: Application of the anti-DNA antibody. Anal. Chem. vol.70, no.24, 1998, p.5296-5301.
- (4) 野田直広ほか. バクテリオファージを用いた大腸菌迅速計測技術の開発. 環境システム計測制御学会. vol.4, no.1, 1999, p.9-13.
- (5) 高橋一仁ほか. 食品衛生管理ソリューション. 富士時報. vol.75, no.6, 2002, p.363-366.
- (6) 野田直広ほか. 細菌迅速定量装置の開発. 日本薬学会第 123 年会要旨集. no.3, 2003, p.199.
- (7) 厚生労働省生活衛生局監修. 食品衛生検査指針(微生物編). 1990.
- (8) Yamaguchi, N. et al. Detection of Specific Bacterial Cells with 2-Hydroxy-3-Naphthoic Acid-2'-Phenylanilide Phosphate and Fast Red TR In Situ Hybridization. Appl. Environ. Microbiol. vol.62, no.1, 1996, p.275-278.
- (9) 黒川顕ほか. In Situ PCR 法による腸管出血性大腸菌の検出. 日本細菌学会誌. vol.52, no.2, 1997, p.513-518.
- (10) 清水潮. 食中毒の社会的費用. 日本食品微生物学会雑誌. vol.19, no.3, 2002, p.87-94.

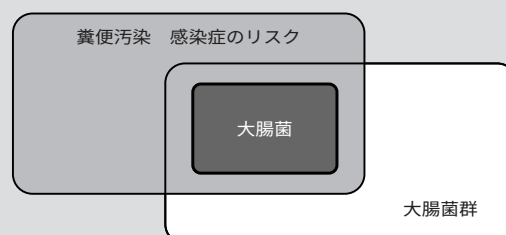
解説 汚染指標微生物として検査される大腸菌

微生物学的な安全を保障するには、汚染の可能性のあるあらゆる病原微生物を検査しなくてはならない。しかし、コストや手間を考慮すると、すべての病原微生物を日常的に検査するのは困難である。そこで、汚染の程度を評価する指標としている微生物が「汚染指標微生物」である。

病原微生物の多くは動物の糞便(ふんべん)に由来するため、汚染指標微生物は糞便汚染を反映する必要がある。従来、食品や水道など、多くの分野で糞便汚染の指標微生物とされてきたのは「大腸菌群」である。

ところが、大腸菌群には糞便に由来しない細菌も含まれている。より正確に糞便汚染を評価するには「大腸菌」の方が適している(右図参照)。これまで大腸菌群を汚染指標としてきたのは、大腸菌だけを簡単に

検出できる方法がなかったからである。しかし近年、大腸菌だけを検出する技術が確立された。これを受け、水道水の試験では 2004 年 4 月から、大腸菌を汚染指標とすることが決定した。今後、食品をはじめ多くの分野で、糞便汚染指標として大腸菌を重視するようになると思われる。





＊本誌に記載されている会社名および製品名は，それぞれの会社が所有する
商標または登録商標である場合があります。