フローサイトメトリー法による細菌数の簡便・迅速計測

佐々木康彦¹, 竹内郁雄¹, 渡邊祐介¹, 稲波久雄²

¹ 株式会社日立パワーソリューションズ

² 株式会社日立製作所 日立研究所

Easy and Rapid Live Bacteria Counter by Flow Cytometry

Yasuhiko SASAKI¹, Ikuo TAKEUCHI¹, Yusuke WATANABE¹, and Hisao INAMI²

¹Hitachi, Ltd., Hitachi Research Laboratory, ²Hitachi Power Solutions Co., Ltd.,

1. はじめに

近年、食品の安全性確保や品質管理についての社会的な関心が高まることにより、食品の微生物検査の重要性が増してきている。従来の食品などの微生物検査では、寒天培地で細菌を培養して、生存している細菌を算定する培養法が用いられている。しかし、培養法では細菌の生存を計数できる状態にするために、複雑な作業を行い、さらに長時間の培養時間を要することから、簡便で迅速に計測することが困難であった。そこで、簡便に自動計測が可能で、さらに迅速な細菌数計測の実現をめざして、食品向けのカセット式迅速細菌数計測装置カセットラボ[®]ONEを開発した。以下に、その概要について紹介する。

2. 迅速計測

一般生菌数の計測は「培養法」が公定法となっているが、計測時間の短縮と複雑な作業の解消を狙い、近年の分子生物学や電子工学を応用してさまざまな「迅速計測」が考案されてきた。「迅速」の定義は様々であるが、「食品微生物検査における究極の夢は、理化学検査並みの早さ、つまり数十分、遅くとも数時間で生菌数、大腸菌群、サルモネラ、黄色ブドウ球菌、嫌気性生菌数、カビ・酵母やその他の必要な検査結果すべてが判明することである [1].」とされており、目指すべき計測時間の目安の1つとなると考える。Table 1は「一般生菌数計測」を前提とした各種の「迅速計測」の比較表である。

一般生菌の迅速計測は菌体の培養を行わない方式と培養を行う方式の2種類に分けられる。同表記載の方

式のうち、蛍光染色法、ATP法は培養を伴わないため、計測時間が数十分程度と短いことが長所だが、検査者が試薬を追加するなどの複数の作業が必要で、また検出感度が低いことが短所である。

一方、代謝反応比色法、インピーダンス法およびデジタル顕微鏡法は概ね6~12時間以上の培養を行う方法であり、検出感度が高く、検査者の作業数も少ない長所があるが、総検査時間が長いことが短所である。

筆者らは、迅速性を確保するために非培養法を、定量性を確保するために蛍光染色法を、簡便性を確保するためにフローサイトメトリー法を選択した。

3. フローサイトメトリー法の原理

フローサイトメトリー法は微細な粒子を流体中に分散させ、その流体を細く流して、個々の粒子を光学的に分析する手法であり、装置はフローサイトメーターとよばれ、分子生物学を始めとして様々な分野で用いられている。その詳細は考案者の流れをくむBECKMAN COULTER社の「FCMの原理入門講座」[i]を参照頂くのが一番適切であろう。

3.1 フローサイトメトリー法による食品中の一般生菌数の計測

蛍光染色法のフローサイトメトリー法を使用して食品中の生菌数を計測するときの課題は、計測を行う前に夾雑物を取り除くための精製が必要であると指摘している [2][3]。夾雑物は、食品由来の物質に加え、死菌や染色のために使用する蛍光色素の粒子（以下、蛍光色素粒子）がある。これらの夾雑物は自家蛍光や蛍

Table 1 Rapid counting method for the number of viable bacteria.

	方法	計測原理	迅速性	定量性	簡便性 (サンプル調整)
蛍光 染色法	フローサイト メトリー法	蛍光染色した細菌を1個ずつ細い流れに乗せて、励起ビームを横切る時の蛍光発光の回数から菌数を直接計数する方法	50分～	直接計数	原液作製 残渣除去 試薬添加
	イメージング サイトメトリー法	フィルター上にトラップした細菌を蛍光染色し、励起光を照射した蛍光画像の光点から菌数を直接計数する方法	20分～	直接計数	原液作製 試料濾過 試薬添加 洗浄
	ATP法	細菌に含まれるATPをルシフェラーゼを用いて発光させた光量から菌数を換算する方法	40分	換算	原液作製 試薬添加 分注
	代謝反応比色法	細菌の代謝による培地基質の変化を色調の変化として光学的に検出して菌数に換算する方法	9時間 (大腸菌)	換算	原液作製
	デジタル顕微鏡法	寒天培地で混釈したシャーレを培養しながら、細菌の増殖による微小なコロニーの影像から菌数を直接計数する方法	6～8時間 (大腸菌)	直接計数	原液作製 希釈系列
	インピーダンス法	細菌の代謝による培地中のイオン化合物の濃度を電気的变化として検出して菌数に換算する方法	6～24時間	換算	原液作製

光色素による染色や吸着により蛍光を発するため、生菌として誤計測する要因となる [2]。よって、蛍光染色を用いたフローサイトメトリー法では、夾雑物が多く含まれている食品中の生菌数を計測すると、夾雑物が計測結果に影響を与え、正しい生菌数が計測できないことが予想される。

ここで、通常のフローサイトメトリー法では、夾雑物を取り除く精製の工程を別の装置で行い、フローサイトメトリー法で生菌数計測を実施している [4][5]。精製の方法には遠心分離法やカラム法など [6] があり、これらの方法は生菌と夾雑物を高い精製度で分離することが可能である。

しかしながら、これらの生菌と夾雑物との分離には、専用の装置と複雑な作業が伴うために、筆者らは、精製により物理的に生菌と夾雑物を分離してから生菌数計測を実施するのではなく、精製を実施せずに、生菌と夾雑物を判別することを検討した。

3.2 蛍光色素粒子との判別

Fig. 1(a) に、全菌用蛍光色素（生菌と死菌を染色する色素）1種類と死菌用蛍光色素（死菌を染色する色素）1種類を使用したときの生菌、死菌、全菌用蛍光色素粒子、死菌用蛍光色素粒子の蛍光の様子、Fig. 1(b) に、全菌用蛍光色素2種類と死菌用蛍光色素1種類を使用したときの生菌、死菌、全菌用蛍光色素粒子、死菌用蛍光色素粒子の蛍光の様子を示す。(a)の全菌用蛍光色素1種類と死菌用蛍光色素1種類を使用したときは生菌と全菌用蛍光色素粒子は同じ色の蛍光を発するため、蛍光色から生菌と全菌用蛍光色素粒子を判別することは困難である。これに対して、全菌用蛍光色素2種類と死菌用蛍光色素1種類を使用すると、生菌は全菌用

蛍光色素2種類から成る2色の蛍光色を発し、2種類の全菌用蛍光色素粒子はそれぞれの1色の蛍光色のみしか出さないため、生菌と2種類の全菌用蛍光色素粒子を判別することが可能になる。カセットラボ[®]ONEは、全菌用蛍光色素2種類と死菌用蛍光色素1種類を使用する「多重染色」方式により、蛍光色素粒子からのバックグラウンドを従来と比較して2桁以上低減することが出来、計測下限値を 10^2 個/mLまで下げることが可能とした。

3.3 食品の自家蛍光との判別

蛍光染色法における問題の1つとして、食品のもつ自家蛍光が擬陽性となることである。とくに野菜類は色素体が豊富であることから自家蛍光が多い。Fig. 2は405nmで励起した場合のジャガイモ（加熱品）のデンブ、ほうれん草のクロロフィル、人参のカロテンからの自家蛍光の例である。同図でわかる通り、食品ごとに自家蛍光の蛍光波長（蛍光色）も相対強度（蛍光量）もまちまちであり、単純に判別することは困難である。ここで、カセットラボ[®]ONEでは、可視光域で3帯域の波長を計測し、蛍光プロファイルを取ることで細菌からの信号なのか、自家蛍光なのかを識別することとした。

3.4 蛍光色素の「非特異吸着」との判別

本装置で用いる蛍光色素は核酸に結合した場合に蛍光量が増加するとされているが、現実には核酸以外の物質に非特異的に吸着する。この非特異吸着は多重染色の場合でも不特定の蛍光色素の組み合わせで発生するので、擬陽性が増加して計測下限値が高くなり、計測が困難となっていた。非特異吸着は脂肪、タンパク

Fig. 1 The bacteria which dyed the fluorescence and particles of the fluorescent dyes.

質などの生体高分子で起きやすく、このためフローサイトメトリー法では動物性食材中の細菌計測は極めて困難であった。

Fig. 3に示すように、カセットラボ[®]ONEはこの非特異吸着した蛍光色素からの蛍光のみを消去し、細菌の核酸に結合した色素からの蛍光はそのまま計測する技法を開発し [8]、動物性食材での細菌数計測を可能とした。

Fig. 2 Fluorescence spectra of homogenized vegetables excited by excitation light of 405nm.

以上のように、カセットラボ[®]ONEでは、精製を実施せずに、生菌と夾雑物（蛍光色素粒子や食品の自家蛍光および蛍光色素の非特異吸着）を判別している。

4. カセットラボ[®]ONEの構成

4.1 マイクロキャピラリー方式

一般に、フローサイトメトリー法ではシースフローを用いてサンプルフローを数 μm 程度にしぼるが、圧力調整、シース液およびフローセルの清掃が必要となり、装置が大型化すること、液体のハンドリングが煩雑であること、メンテナンスの手間が大であることから、カセットラボ[®]ONEは樹脂にて流路を形成した「マ

Fig. 3 Conceptual diagram of fading.

マイクロキャピラリー方式」のフローサイトメーターとした。マイクロキャピラリーは必要な流量、流速の要求から幅 $40\ \mu\text{m}$ ×深さ $20\ \mu\text{m}$ ×長さ $2\ \text{mm}$ としたが、試行錯誤の末にようやく光学シリコンゴムを射出成形で製作可能となり量産化が実現できた。

装置の外観写真を Fig. 4 に示す。大きさは W430 mm, H420 mm, D330 mm, 重量 25 kg とコンパクトであり、卓上設置型である。

4.2 カセット方式の狙い

フローサイトメーターは細胞などの解析に有力な武器であるが、操作が煩雑となる点是否めない。また、注入する蛍光色素の量や濃度、送液量など操作者に依存する部分が多く、測定に個人差がでる。そこで操作の簡便さを狙い、必要な色素などを予め定量し、カセットに注入しておくことで、個人差の発生を防止した。

Fig. 5 にカセットの外観写真を、Fig. 6 にその概略構造を示す。カセットは検体槽、食品屑を除去するフィルタ、蛍光色素を内蔵した染色槽、検体と色素を混合する混合槽、これらを繋ぐ流路、マイクロキャピラリーからなり、検体の送液、色素との混合、菌の検出部位であるマイクロキャピラリーへの送液はシーケンス制御された空気圧で行う。フローサイトメーターでは検出部のフローセルが試料で汚れるため、この清掃が必要であることを述べたが、本装置はこのカセットを使い切りタイプとすることにより、清掃などのメンテナン

スの手間を省けることが特徴の1つである。

4.3 生菌判別アルゴリズム

前述の通り、カセットラボ[®]ONE は全菌用蛍光色素を2種類、死菌用蛍光色素を1種類用いる3重染色法を採用している。そのため、3色の蛍光波長帯を観察しており、波長 A は全菌用蛍光色素1からの蛍光観測波長帯、波長 B は死菌用蛍光色素からの蛍光観測波長帯、波長 C は全菌用蛍光色素2からの蛍光観測波長帯となっている。Fig. 7 に植物の自家蛍光にこれらの観測波長帯を重ねたものを示す。生菌の判別アルゴリズムは 生菌 = $A \cdot B(-) \cdot C$ (A, B, C は波長帯 A, B, C の出力値) としている。Table 2 にこの単純なアルゴリズムを用いて、自家蛍光、色素自身のノイズから生菌を判別できることを示した。

5. 操 作

装置の操作は Fig. 8 の通り、①ストマッカーでの試

Fig. 4 View of rapid live bacterial counting system (Cassette Lab[®] ONE).

Fig. 5 View of the Cassette.

Fig. 6 Structure of the cassette.

Fig. 7 Wavelength range of the fluorescence detection.

Fig. 8 How to use Cassette Lab[®] ONE.

料原液作製，②試料原液をカセットに注入，③カセットを装置に挿入，④パソコン画面のスイッチを押して計測を開始のみである。装置はパソコンに接続することが前提であるが，専用ソフト画面から装置の状況がモニターでき，直感的な操作画面となっている。操作画面例を Fig. 9 に示す。

6. 測定例

6.1 検出データの生菌判別

前述の生菌判別アルゴリズムの一例として，Fig. 10 に示す魚介類の検出データを用いて説明する。同図 (a) は，生魚（冷凍品）をストマッキングした懸濁液を滅菌希釈水で 10 倍希釈して試料原液として検出したデータで，同図 (b) は，この試料原液に菌を添加して菌数を調整して検出したデータである。なお，菌数を調整するために追加した菌は，生魚の懸濁液を液体培地に接種して増菌したものをを用いている。同図は，菌や夾雑物などを蛍光検出した信号を全菌用蛍光色素 1 の波長 A，死菌用蛍光色素の波長 B および全菌用蛍光色素 2 の波長 C の三色について表示した散布図である。同図 (a) の生魚の試料原液では，生菌判別された検出点（青色点）が全菌用蛍光色素 1 の 500 以下のところ（図中，点線円内）に集中しており，生菌と擬陽性が混在している領域となる。

一方，(b) の試料原液に菌を添加した場合は，生菌判

Table 2 The algorithm to distinguish between live bacteria and foreign fluorescent substances.

Name of Particle	Wavelength Range		
	A	B	C
Live Bacterium	○	×	○
Dead Bacterium	○	○	○
Potato (Starch)	○	○	×
Spinach (Chlorophyll)	×	○	○
Carrot (Carotene)	○	×	×
Fluorescent Dye 1 for Live and Dead Bacteria	○	×	×
Fluorescent Dye 2 for Live and Dead Bacteria	×	×	○
Fluorescent Dye for dead bacteria	×	○	×

○ : The particle emits this fluorescent light.

× : The particle doesn't emit this fluorescent light.

別された検出点（青色点）が全菌用蛍光色素 1 の 2000 を超えるところまで広がっており，(a) の点線円と同等の範囲外に存在する多くの検出点が添加した生菌由来のものであることがわかる。このようにして，生菌由来の領域から生菌数を計数する。

6.2 食品の測定例

Fig. 11 は実際の食品（生鮮野菜，乳製品，肉類，惣菜，海藻，菓子，乾物，漬物，魚介類）を市場から購入し，測定したものである。同じく培養法と比較しているが，下限値が 10^2 個/mL まで伸びている。ただし，食材によっては素材そのままでの計測ではなく，適宜「希釈」や 1~2 回程度の「遠心操作」が必要であった。また，動物性食材については 3.4 に述べた，「非特異吸着」を対策する成分をカセット内に内蔵して測定を行っている。

7. おわりに

食品工場での微生物検査に簡便迅速測定法を導入するメリットは，

①微生物検査自体を効率化できる，②微生物検査結果が迅速に得られることで，製品出荷を早めることがで

Fig. 9 Operation screen.

(a) Only Homogenized fish

(b) Homogenized fish which added bacteria

Wavelength Range A : Fluorescent Dye 1 for Live and Dead Bacteria
 Wavelength Range B : Fluorescent Dye for Dead Bacteria
 Wavelength Range C : Fluorescent Dye 2 for Live and Dead Bacteria

Fig. 10 Scatter diagrams of three channel data from homogenized fish.

き、製品の倉庫保管料が大幅に軽減される、③市場における製品のフレッシュネスが改善される、④陽性検体発生時に迅速なフィードバックができる。の4つであると考えられている [1]。

本報では、カセットラボ®ONE についてその測定原理、夾雑物との分離方式、生菌の判別方式などについて説明してきた。種々の食品中では、簡便かつ迅速な細菌計測が実現できているが、添加物が多いものや脂肪などが極端に多いものは計測が困難である。また、希釈や遠心操作などの前処理が必要な食材も多々ある。この点ではまだまだ開発途上であり、未解決の課題ももっているが、上記メリットの実現のための一助になれば幸いである。

Fig. 11 Correlation of live bacteria count in homogenized food.

今後、ユーザーの方々の要望を満足すべく、さらなるブラッシュアップを図って行く所存である。

引用文献

- 1) T. Ito, J. Sato; "Quick and simple assay of the microorganism in food changed so much ! (Shokuhin Biseibutsu no Kanben Zinsoku Sokuteihou ha Kokomade Kawatta!)", SCIENCE FORUM, 2002, p.3.
- 2) R. A. Patchetta, J. P. Backa, A. C. Pinder1, Rohan G. Krolla; Enumeration of bacteria in pure cultures and in foods using a commercial flow cytometer, Food Microbiology, **8**, 119-125 (1991).
- 3) C. Laplace-Builhé, K. Hahne, W. Hunger, Y. Tirilly, J. L. Drocourt; Application of flow cytometry to rapid microbial analysis in food and drinks industries, Biol Cell, **78**, 123-128 (1993).
- 4) T. S. Gunasekera, P. V. Attfield, D. A. Veal; A flow cytometry method for rapid detection and enumeration of total bacteria in milk, Appl Environ Microbiol, **66**, 1228-1232 (2000).
- 5) C. Holm, L. Jespersen; A flow-cytometric gram-staining technique for milk-associated bacteria, Appl Environ Microbiol, **69**, 2857-2863 (2000).
- 6) K. A. Stevens, L. A. Jaykus; Bacterial separation and concentration from complex sample matrices: a review, Critical Reviews in Microbiology, **30**, 7-24 (2004).
- 7) H. Inami, Y. Watanabe; Determination of viable count in food samples with rapid live bacteria counter using cassette-type flow cytometry (in Japanese), Jpn. J. Food Microbiol., **30**, 22-27 (2013)

引用 URL

[i] <http://www.bc-cytometry.com/FCM/fcmprinciple.html>