＝短 報＝

マイクロコロニー法による食材中の 増殖能をもつ細菌数の迅速測定

見坂 武彦^{*1, *2}・馬場 貴志^{*1}・山口 進康^{*1}・那須 正夫^{*1, †}

(^{*1} 大阪大学大学院薬学研究科, ^{*2} 大阪大谷大学薬学部)

(受付: 平成 20 年 1 月 12 日)

(受理: 平成 20 年 11 月 4 日)

Rapid Enumeration of Bacteria with Growth Ability in Foods by Microcolony Method

Takehiko KENZAKA^{*1, *2}, Takashi BABA^{*1}, Nobuyasu YAMAGUCHI^{*1}
and Masao NASU^{*1, †}

(^{*1} Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871)

(^{*2} Faculty of Pharmacy, Osaka Ohtani University, Nishikiori-kita, Tondabayashi,
Osaka 584-8540; [†] Corresponding author)

The microcolony method is based on microscopic observation of the early stage of colony formation on laboratory media, which allows rapid and accurate enumeration of bacteria with growth ability via epifluorescence microscopy or microcolony automated counting system. In this study, the microcolony method was used to estimate the number of viable bacteria in various foods. The optimized protocol generated results on number of bacteria with growth ability in ground meat, pre-cut vegetables, frozen spinach, pre-cut melon, soybean curd, Chinese noodles, bean cake, white sauce, steamed cake within 24 hours. The accuracy of estimates by the microcolony method could be obtained by comparing the conventional plate counts. The results of this study showed that the microcolony method provides a useful tool to enumerate bacteria with growth ability in foods more rapidly and accurately than conventional plate counting.

Key words: Microcolony, Rapid detection, Viable bacteria

緒 言

食の衛生微生物学的安全性の確保において、食材中の生菌数の測定は、最も基本的かつ重要な検査の一つである。コッホが培養法の基礎を築いて以来、食品衛生の分野のみならず、細菌を採取うほとんどの分野で培養法は日常的に利用されてきた。しかしながら、1970年代後半以降、自然環境中の細菌の多くが、「生きているにもかかわらずこれまでの手法では培養が困難である」ことが明らかとなっている^{1, 7)}。また、培養法は結果が得られるまでに、時間を要するという課題があることから、迅速、高精度かつ簡便な生菌数測定法の開発が切望されてい

る。

呼吸活性や酵素活性を指標に生菌を計数する手法として、CTC (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride) や 6CFDA (6-carboxyfluorescein diacetate) を用いた蛍光活性染色法が研究分野で普及している¹⁹⁾。本染色法は、医薬品製造用水や生薬の微生物管理、また食品衛生等の分野で実用化に向けた検討が行われている^{9~11, 20)}。蛍光活性染色法は、約 1 時間で結果を得ることができるが、細菌の増殖能を評価することは困難である。食品や医薬品の微生物管理の現場では、培養法と同様に増殖を指標とする迅速な検出法も望まれている。また蛍光活性染色法などを用いて単細胞レベルで細菌を検出する場合、夾雑物の多い試料では擬陽性が出ることもある。これに対し、マイクロコロニー法では、コロニー形成の初期段階である数十 μm のマイクロコロニーを検出対象と

[†] 連絡先

^{*1} ☎565-0871 吹田市山田丘 1-6

^{*2} ☎584-8540 富田林市錦織北 3-11-1

して、蛍光顕微鏡などで観察・計数を行う¹⁴⁾。本法では、メンブランフィルター上に細菌を捕集し、培地表面に密着させ、数時間から24時間培養する。増殖能をもつ細菌はマイクロコロニーを形成することから、これを蛍光染色し、蛍光顕微鏡下で観察・計数することで、より迅速に測定することができる。また、環境中には細胞分裂・増殖はできるものの目で見える大きさのコロニーを形成できない細菌も多いことが知られており⁸⁾、マイクロコロニー法ではこのような細菌も含めて計数できる。

食中毒の原因となる細菌も、生理活性をもつが通常の手法では培養困難な生理状態となることがあり^{4, 15)}、温度変化や飢餓などのストレスに対して抵抗性をもつ場合がある⁶⁾。また、コロニーを形成しない状態であっても、宿主に摂取された後に増殖し病原性を示すことが報告されている^{5, 16)}。このことから、食品の中にも、加工時のストレスで一時的に目視可能なコロニーを作らない細菌や、培養条件の問題からマイクロコロニーしか作れない細菌が存在し、これらが食品中で増殖して危害あるいは食品劣化をもたらす可能性がある。

筆者らは、マイクロコロニーを自動計数する装置を製作し、飲用水や自然環境水中の生きた細菌を迅速かつ客観的に計数できることを報告した^{2, 3)}。本研究では、食材中の増殖能をもつ細菌の計数に本法を応用するためのプロトコルを検討し、食品の細菌検査におけるその有用性を探った。

材料および方法

1) 食材試料

供試試料として、市販されている、挽肉（牛豚合挽）、カット野菜（レタス、紫キャベツ、キャベツ、キュウリ、ニンジンなどを混合したもの）、冷凍ほうれん草、カットメロン、木綿豆腐、中華生麺、おはぎ（ばたもち）、ホワイトソース（主原料は生クリーム、バター、粉乳、小麦粉など）、蒸しパン、豚カツを用いた。

2) マイクロコロニー法

それぞれ10 gの試料をフィルター付ストマッカー用袋に入れ、90 mlのリン酸緩衝生理食塩水(0.85% NaCl, 0.00425% KH_2PO_4 [pH 7.2])を加えた。ストマッキング処理を行った後、試料の一部を孔径5 μm のセルロース混合エステル製フィルター（直径25 mm, アドバンテック）でプレろ過した。10~100 μl のろ液を希釈して孔径0.2 μm のポリカーボネート製フィルター（直径25 mm, アドバンテック）でろ過し、フィルター上に細菌を捕集した。フィルターを標準寒天培地上に置き、37°Cで6時間および20時間培養し、マイクロコロニーを形成させた。

4%中性緩衝ホルムアルデヒド溶液を染み込ませたる紙の上に、マイクロコロニーの生じたフィルターをろ過面を上にして30分間静置し、細菌を固定した。次に無菌水を含むろ紙上に、フィルターを1分間置くことによ

り、洗浄した。さらに、染色液(10 × SYBR Gold [Invitrogen], 2% Tween 20)を含むろ紙上に、フィルターを10分間静置し、マイクロコロニーを染色した。無菌水を含むろ紙上に、フィルターを1分間置いて、フィルターを洗浄した。フィルターを1分間風乾した後、イマージョンオイルを1滴滴下したスライドガラス上にのせた。その上からイマージョンオイルを1滴滴下し、カバーガラス(18×18 mm, マツナミ)をかぶせてフィルターを封入した。自動計数装置 MGS-10 LD (中央電機計器製作所)を用いて³⁾、フィルター上の100 mm²内のマイクロコロニーを計数した。

3) 混釈平板培養法

マイクロコロニー法の試料調製と同様に、10 gの試料をストマッキング処理した。試料を適宜希釈し、各希釈段階につき1 mlずつ3枚の滅菌シャーレに分注し、約45°Cに保温した標準寒天培地を加え混釈した。37°C、2日間培養した後、コロニーを計数した。

結 果

1) 前処理

食材試料中には固形成分が多いため、ろ過の際にフィルターの目詰まりだけでなく、蛍光顕微鏡での観察時に非特異的な蛍光が生じた(Fig. 1A)。このため、ほとんどの食材で目視計数が困難であった。そこで、試料原液をあらかじめ孔径5 μm のフィルターでプレろ過したところ、このような粒子を除くことができ、マイクロコロニーの計数が容易になった(Fig. 1B)。

冷凍ほうれん草とカット野菜では、クロロフィルが多く含まれるため、赤色の自家蛍光を発した(Fig. 1C)。SYBR Goldで染色したマイクロコロニーを目視計数する場合では、その色相により識別可能であるが、今回用いたマイクロコロニー自動計数装置では、色成分をもとにした画像処理を行わないため、擬陽性となった。しかし、試料原液をあらかじめ孔径5 μm のフィルターでプレろ過することで、このような自家蛍光をもつ断片を取り除くことができた(Fig. 1D)。

2) 染色条件

食材中の細菌が形成したマイクロコロニーは蛍光が弱かったため、食材の菌数測定に先立ち、以下のように染色条件を検討した。染色時間については、10分から1時間まで検討したが、染色性は向上しなかった。ホルムアルデヒドは、蛋白質を変性させることで、蛍光染色剤の細胞内透過性を向上させる作用があり、逆に過剰な変性は蛍光染色剤の核酸への結合を阻害する可能性がある。今回、ホルムアルデヒド溶液で30分間細菌を固定した後、1分間洗浄してホルムアルデヒドを除くことにより、十分な蛍光が得られた。

カット野菜中の細菌のマイクロコロニーをFig. 1Eに示す。上記のように、水試料用のマイクロコロニー法のプロトコル³⁾を改良することにより、食材試料中の細

Fig. 1. Fluorescent micrographs of food samples. (A) Chinese noodle sample stained with SYBR Gold before prefiltration. (B) Chinese noodle sample stained with SYBR Gold after prefiltration. (C) Frozen spinach sample before prefiltration. (D) Frozen spinach sample after prefiltration. (E) Microcolony of bacteria in cut vegetable sample. Scale bar represents 50 μm .

菌のマイクロコロニーを自動計数装置で計数することが可能となった。

3) 食材中のマイクロコロニー形成細菌数

各食材におけるマイクロコロニー形成細菌数および従来法で得られたコロニー形成細菌数を Fig. 2 に示す。挽肉、カット野菜、カットメロンなど非加熱食材は、増殖が速い細菌が多く、6 時間の培養で得られたマイクロコロニー形成細菌数は、従来法で得られた細菌数よりも高くなった。これらの試料を 20 時間培養した場合では、マイクロコロニーが大きくなり過ぎるために、計数不能であった。

挽肉、カット野菜、カットメロン以外の試料では、6 時間では十分な大きさのマイクロコロニーが形成されていなかったため、20 時間培養した。豚カツでは、十分な

加熱処理を行っているため、培養法およびマイクロコロニー法ともに細菌は検出されなかった。20 時間培養した試料では、冷凍ほうれん草を除いて、マイクロコロニー形成細菌数はコロニー形成細菌数の 30~7,000 倍高い値となった。

考 察

本研究では、増殖能をもつ細菌を迅速に計数できるマイクロコロニー法に着目し、種々の食材に対する本法の有用性を検証した。ミネラルウォーターや地下水などに対して最適化したプロトコルを一部改良し、前処理を行うことにより、水環境試料に比べ夾雑物を多く含む食材試料にも応用できた。平板培養法と比較したところ、ほぼすべての試料でマイクロコロニー法の計数値が高く

Fig. 2. Number of viable bacteria in food samples determined by microcolony method (mCFU) and plate counting (CFU). Samples were cultured for 2 days in plate counting, and 20 hours (*6 hours) in microcolony method. Detection limits in pork cutlet sample** were 2×10^2 mCFU/g in microcolony method and 10 CFU/g in plate counting.

なり、十分な検出感度があることを確認できた。また自動計数装置の使用により、計数時の省力化が可能であった。

マイクロコロニー法で得られた計数値は、試料によっては、平板培養法の値よりも30~7,000倍高くなるものがあった (Fig. 2)。この理由として、食品加工時のストレスで一時的にコロニーを形成できない状態の細菌が多いことや、培養条件が適さないため目視可能な大きさのコロニーにまで増殖できない細菌が多いことが挙げられる。一定条件下でコロニーを形成できない細菌も、宿主に摂取された後に病原性を示すことがあり^{5, 12, 13)}、食品中で増殖して食品劣化をもたらす可能性もある。このことから、コロニー形成しない増殖能をもつ細菌も衛生微生物学的に重要であると考えられる。

平板培養法では結果が得られるまでに時間を要するが、マイクロコロニー法では多くの試料で24時間以内に結果が得られることから、検査時間を短縮することができる。細菌の増殖速度は、その種類の特性だけでなく食材の加熱履歴や保存温度、栄養分などにより大きく影響されることから¹⁷⁾、さらに多様な食材に応用するにあたっては、食材の種類に応じた培養時間を設定することが必要となる。

これまでに、野菜試料をブレロ過し、蛍光抗体法により細菌を顕微鏡観察できることが報告されている¹⁸⁾。本研究では、自動計数装置を用いたマイクロコロニーの計

数においてもその有用性を確認できたが、試料によっては、ブレロ過した場合でも、メンブレンフィルターが目詰まりを起こすものがあった。中華生麺、おはぎ、蒸しパン、豚カツなどは、デンプン、グルテンが多く含まれているために、少量しかろ過することができず、供試できる重量は0.001~0.01 gであった。すなわち、検出限界は $2 \times 10^2 \sim 2 \times 10^3$ mCFU/gとなり、平板培養法 (10 CFU/g) よりも低かった。しかしながら、菌数測定が可能であったことから (Fig. 2)、試料のろ過量をもとにした検出限界を明確にすることで、細菌数が検出限界を超える場合には、細菌数の変化を従来法よりも迅速にとらえることができると考えられる。また食品製造現場において、食材の加熱などの殺菌処理の確認にも本法が応用できると考えられる。

油分や粘性が高い食材などでは、フィルターが目詰まりを起こし、上記に示したプロトコールで直ちに測定できないものもあると予想される。今後、ブレロ過だけでなく、酵素処理などの前処理条件を検討することで、より多様な食材に応用できる可能性もある。また、ろ過などの操作性の向上のために使い捨てのデバイスが開発されれば、普及が促進されると考えられる。将来、食品分野でも本法が細菌検査の迅速化の一助になるものと期待される。

文 献

- 1) Amann, R.L., Ludwig, W. and Schleifer, K.H.: Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, **59**, 143-169 (1995).
- 2) 馬場貴志, 那須正夫: 医薬品製造用水の微生物管理 迅速分析法の現状と将来. *クリーンテクノロジー*, **16**, 6-9 (2006).
- 3) 馬場貴志, 山口進康, 青木一洋, 那須正夫: マイクロコロニー自動計数システムによる水環境中の生菌数の迅速計測. *防菌防黴*, **35**, 719-724 (2007).
- 4) Besnard, V., Federighi M. and Cappelletti, J.M.: Evidence of viable but non-culturable state in *Listeria monocytogenes* by direct viable count and CTC-DAPI double staining. *Food Microbiol.*, **17**, 697-704 (2000).
- 5) Colwell, R.R., Brayton, P., Herrington, D., Tall, B., Huq, A. and Levine, M.M.: Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* O1 revert to a cultivable state in the human intestine. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **12**, 28-31 (1996).
- 6) Colwell, R.R.: Viable but nonculturable bacteria: A survival strategy. *J. Infect. Chemother.*, **6**, 121-125 (2000).
- 7) Hobbie, J.E., Daley, R.J. and Jasper, S.: Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, 1225-1228 (1977).
- 8) Kaeberlein, T., Lewis, K. and Epstein, S.: Isolating 'uncultivable' microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science*, **296**, 1127-

- 1129 (2002).
- 9) Kawai, M., Yamaguchi, N. and Nasu, M.: Rapid enumeration of physiologically active bacteria in purified water used in the pharmaceutical manufacturing process. *J. Appl. Microbiol.*, **86**, 496–504 (1999).
- 10) Kitaguchi, A., Yamaguchi, N. and Nasu, M.: Enumeration of respiring *Pseudomonas* spp. in milk within six hours by fluorescence *in situ* hybridization following formazan reduction. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 2748–2752 (2005).
- 11) Nakajima, K., Nonaka, K., Yamamoto, K., Yamaguchi, N., Tani, K. and Nasu, M.: Rapid monitoring of microbial contamination on herbal medicines by fluorescent staining method. *Lett. Appl. Microbiol.*, **40**, 128–132 (2005).
- 12) Pommepuy, M., Butin, M., Derrien, A., Gourmelon, M., Colwell, R. R. and Cormier, M.: Retention of enteropathogenicity by viable but nonculturable *Escherichia coli* exposed to seawater and sunlight. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 4621–4626 (1996).
- 13) Rahman, I., Shahamat, M., Chowdhury, M. A. and Colwell, R. R.: Potential virulence of viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* type 1. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 115–120 (1996).
- 14) Rodrigues, U. M. and Kroll, R. G.: Rapid selective enumeration of bacteria in foods using a microcolony epifluorescence microscopy technique. *J. Appl. Bacteriol.*, **64**, 65–78 (1988).
- 15) Roszak, D. B. and Colwell, R. R.: Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.*, **51**, 365–379 (1987).
- 16) Shleeve, M. O., Bagramyan, K., Telkov, M. V., Mukamolova, G. V., Young, M., Kell, D. B. and Kaprelyants, A. S.: Formation and resuscitation of “non-culturable” cells of *Rhodococcus rhodochrous* and *Mycobacterium tuberculosis* in prolonged stationary phase. *Microbiology*, **148**, 1581–1591 (2002).
- 17) Tamplin, M. L.: Growth of *Escherichia coli* O157:H7 in raw ground beef stored at 10°C and the influence of competitive bacterial flora, strain variation, and fat level. *J. Food Prot.*, **65**, 1535–1540 (2002).
- 18) Tortorello, M. L., Reineke, K. F. and Stewart, D. S.: Comparison of antibody-direct epifluorescent filter technique with the most probable number procedure for rapid enumeration of *Listeria* in fresh vegetables. *J. AOAC Int.*, **80**, 1208–1214 (1997).
- 19) Yamaguchi, N., Kenzaka, T. and Nasu, M.: Rapid *in situ* enumeration of physiologically active bacteria in river waters using fluorescent probes. *Microb. Environ.*, **12**, 1–8 (1997).
- 20) Yamaguchi, N., Sasada, M., Yamanaka, M. and Nasu, M.: Rapid detection of respiring *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice, milk and ground beef by flow cytometry. *Cytometry*, **54A**, 27–35 (2003).