受賞者総説

HACCP 対応型バイオセンサーの開発に関する研究^{*1}

(平成 10 年度日本水産学会賞技術賞受賞)

遠 藤 英 明^{*2}

東京水産大学水産学部食品生産学科

近年、安全で良質な食品の生産・確保に有効な管理手法として Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) が注目され、水産食品業界においてもその導入が進められている。HACCP は従来の品質管理と異なり、原料が工場を経てそれが食卓に運ばれるまでの全ての過程において、予測される健康危害因子をモニタリングすることを求めている。これらの危害因子は、細菌やウィルスなどの生物学的危害、薬剤や自然毒などの化学的危害、そして金属片ガラス片等の食品への混入による物理的危害に大別することができる。HACCP ではこれら因子を、可能な限り連続的にリアルタイムでモニタリングする必要がある。この中で、物理的危害については金属探知器等の利用により、そのモニタリングが可能であるといわれている。しかし、その他の危害、特に生物学的危害因子については、それらを直接認識してモニタリングすることは、現在のところ極めて困難である。したがって、細菌やウィルスのような危害因子を、それらのコントロールに関連した温度、湿度、時間、圧力等のパラメータにおきかえることによって、間接的にそれらをモニタリングし、監視を行っているのが現状である。

一方近年になって、生体の持つ優れた機能とエレクトロニクス技術とを組み合わせたバイオセンサーの開発研究が国内外において精力的に進められ、様々な物質の測定が可能になってきた。バイオセンサーは図 1 に示すように、酵素、生物代謝、免疫反応などの生体機能を、目的の物質を識別する分子識別素子として利用する。そしてそれらの生体機能素子は、目的の物質に反応する際、化学物質、熱、光、音等の変化を生ずる。この変化を、電極や半導体等の種々の物理化学デバイスを用いて電気信号に置き換えることにより、目的の物質を定量あるいは検出する原理に基づいている。¹⁾ バイオセンサーの最大の特徴は、目的とする生化学情報を特異的に迅速かつ簡単に測定できるところにあり、最近ではこのよう

図 1 バイオセンサーの原理

な情報の計測・収集をバイオセンシングとよんでいる。

本研究では、HACCP においてこれまで直接的なモニタリングが困難とされてきた危害因子を検出するため、バイオセンシング技術を用いた新しい測定法の確立を試みたので、以下にその概要を述べる。

1. 食品衛生監視用バイオセンシングシステムの開発

著者らは、HACCP に対応可能な食品衛生監視用バイオセンシングシステムの開発を目指して、近年微生物学の分野でも利用が注目されているフローサイトメトリー (FCM) と、時計の発信素子として広く用いられている水晶振動子を応用したセンシングシステムについて研究した。

1) FCM を応用したセンシングシステム

FCM とは、細胞にレーザーを照射し、そこから得られた情報により、細胞の形態や細胞内情報を解析する手法である。²⁾ 図 2 に示すように、FCM は試料となる細胞とシース液をフローチャンバーの中に移送することにより、細胞を 1 個 1 個遊離した状態で一列に並べてレーザーを照射し、個々の細胞情報を解析することができる。細胞に当たった光は前方に散乱する光 (前方散乱光) と、この光に対して直角に散乱する光 (側方散乱光) に分けられる。前方散乱光は主に細胞の相対的な大きさを

^{*1} Development of biosensor systems for HACCP.

^{*2} Hideaki Endo (Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Fisheries, Konan, Minato, Tokyo 108-8477, Japan).

図2 FCMの測定原理

表し、側方散乱光は細胞の複雑さを表す指標となる。また試料細胞を、蛍光プローブで標識あるいは染色することによって、細胞の特異的検出や細胞内DNAやタンパク質含量などを測定することができる。また、図のようにFCMは、レーザーの前を細胞が1個1個遊離した状態で通過する構造であるため、単位時間当たりの通過した細胞の数をカウントすることにより、試料中の細胞数の測定が可能である。さらに特定の細胞を検出するには、その細胞の特異的抗体を作製し、蛍光プローブで標識した後、その蛍光を測定することにより可能となる。これまでFCMは、医学の分野を中心に真核細胞等の解析に広く用いられてきたが、最近では細菌細胞への適用も精力的に行われている。³⁻⁶⁾

本研究ではこのFCM技術を、まず細菌の生菌数測定に応用した。ここでは生菌と死菌を識別するため、細胞内のエステラーゼ活性により蛍光体に加水分解されるfluorescein diacetate (FDA)⁷⁾の利用を考えた。すなわち生細菌と死細菌を各々FDAで染色した後、FCMで解析してそれらの識別を試みた。その結果、両菌体の間には異なったFCMのヒストグラムが得られ、それらの識別が可能であることがわかった。次にFCMを用いて、細菌の生菌数測定を行ったところ、 10^4 – 10^9 cells/mlの範囲で平板培養法で得られた結果との間に良い相関関係が認められた。一検体の測定所要時間は60秒であり、菌体の前処理を含めても35分以内で測定が可能であった。⁸⁾ また、水産食品に付着している細菌の数をFCMで測定するために、超音波振動エネルギーを利用した菌体脱離を試み、この前処理を行うことにより、ある程度の菌数をモニタリングできることがわかった。³⁾

一方、HACCPでは原料そのものに危害を及ぼす因子についてもモニタリングを考慮する必要がある。そこで

図3 FCMによる細菌の測定結果
A, *Lactococcus garvieae*; B, *Escherichia coli*

著者らは、近年、水産養殖場において大きな問題となっている魚類病原性細菌(*Lactococcus garvieae*)の迅速な特異的検出について、FCMの適用を試みた。まず、病魚より分離された*L. garvieae*の菌体細胞をウサギに免疫し、その抗体(抗血清)を得た。次にこれを、*L. garvieae*または養殖場に共存していると考えられる数種の細菌に添加して抗原抗体反応させた後、さらにFITC標識二次抗体と反応させ、FCMを用いて測定した。図3に*L. garvieae*と*Escherichia coli*(対照)の測定結果をスクアッタグラム(散布図)で示した。横軸はFITCの蛍光強度を、縦軸の前方散乱光は細胞の相対的な大きさを表し、さらにスクアッタグラム中の点1つが細菌細胞1個を表す。これらの図から明らかなように、*L. garvieae*については高い蛍光強度が認められたが、*E. coli*では抗体を添加しても反応しないため、蛍光強度は極めて低かった。したがって、FCMのスクアッタグラムを解析することにより、魚類病原性細菌の存在を知ることが可能であると考えられる。また、本測定法による一検体の測定所要時間は120秒であり、抗原抗体反応等の前処理を含めても3時間以内で測定が可能であった。⁹⁾

さらに本研究では、食品中の残留抗生物質の迅速検出法の確立を目的に、細菌の形態変化を指標とした測定法についても検討した。本研究ではアンピシリンをモデルとして、これが細菌に作用した際の細胞の形態変化をFCMの前方散乱光および側方散乱光によって解析した。その結果、アンピシリン濃度に応じて、細胞の形態に変化が認められ、これを指標にアンピシリンの検出が可能であることが示唆された。⁴⁾ 現在、定量的な測定を目指して検討を重ねている。

2) 水晶振動子を応用したセンシングシステム

上述のようにFCMを応用することにより、特定の細

³⁾ 長野嘉之、遠藤英明、林 哲仁、渡辺悦生：平成10年度日本水産学会春期大会講演要旨集，1998，p. 190。

⁴⁾ 塚谷仁美、遠藤英明、村松 宏、林 哲仁、渡辺悦生：平成10年度日本水産学会春期大会講演要旨集，1998，p. 193。

菌を迅速に検出することが可能となった。しかしこの方法は、研究室レベルではその威力を発揮できるが、装置が大型かつ高価であることから、現在のところ実際の現場で使用するには少々困難な面もあった。そこで著者らは、小型軽量のバイオセンシングシステムの開発を目指して、検出デバイスとして水晶振動子を利用することを考えた。水晶振動子は、腕時計の発振素子として現在広く利用されており、一定の電圧を加えると規則正しく歪み、それが共振することにより一定の周波数および抵抗値を維持する性質を有する。¹⁰⁾ また振動子の表面に、物が付着あるいは堆積すると、その重みにより共振周波数が変化する。我々はこの特性に着目し、水晶振動子と抗原抗体反応とを組み合わせ、細菌の特異的検出を試みた。すなわち、抗原と抗体が反応した際、それらは互いに結合し、凝集して沈降する。この沈降物が水晶振動子の表面に堆積し、振動子の共振周波数が変化するのではないかと考えた。その結果、硝化細菌をモデルとして実験を行ったところ、抗原抗体反応を共振周波数の変化として測定できることがわかった。また、硝化細菌以外の菌体に対しては、応答が認められず、目的の細菌を特異的に検出できることがわかった。^{*5} 今後は、抗体の種類を組み合わせることにより、食中毒菌や大腸菌群等の検出にも応用できるよう研究を進めるつもりである。

2. 食品プロセス制御用センシングシステムの開発

微生物のもつ機能を利用して、各種の有用物質を生産させるプロセス、すなわちバイオプロセスは、食品産業界において重要な役割を担っている。バイオプロセスの中核となるものはバイオリアクターであるが、これを効率よく運転し、目的とする物質の生産性を高めるためには、リアクター内の種々のパラメーターを測定し、制御する必要がある。しかしながら、これまでバイオリアクターの測定で実際に使われているのは、温度、圧力、pH、溶存酸素量などの測定用センサーに過ぎなかった。そこで著者らは、これまでオンライン・リアルタイムでのモニタリングが困難とされてきた基質/生産物濃度、微生物菌体量、培養液粘度等を測定できる各種センサーの開発を試みた。

まず半導体加工技術を利用して、アルコール発酵上重要な測定項目であるアルコールとグルコースを同時測定するための、複合型酵素センサーを製作した。これをフローシステムに組み込むことにより、連続的な基質/生産物の測定を可能にした。次に微生物菌体量を測定するために、超音波の利用を考えた。すなわち、微生物の懸濁液中に超音波を送波器で発信させ、微生物によって吸収され減衰した音波の強度を受波器で受信することによ

り、その減衰率から菌体濃度を求められると考えた。¹¹⁾ さらに、培養液の粘度をモニタリングするために、前述の水晶振動子の利用を考えた。すなわち、水晶振動子の共振抵抗は粘度を反映したパラメーターであるため、これを発酵槽に直接装着し、粘度測定を試みた。¹²⁾ 以上、これらのセンサーよりオンラインモニタリングシステムを構築し、各パラメータの測定を行った。その結果、いずれの場合も従来法による測定結果との間に良い相関が認められ、それらの迅速測定を可能にした。¹³⁾

一方、遺伝子工学の発展にともない、最近では遺伝子組換え酵母を利用した発酵食品に関する研究が数多く行われている。こうした中で組換え酵母のプラスミド保持率を知ることは、目的とする物質の生産性を高めるために極めて重要である。著者らは、蛍光プローブとデジタル画像処理技術を利用したイメージセンサーシステムを構築することにより、迅速なプラスミド保持率の測定を試みた。すなわち、ウラシルを選択マーカーとする宿主に、プラスミドを導入された組換え菌は、オロチン酸のアナログ体である 5-フルオロオロチン酸 (5-FOA) を代謝系に取り込むことにより衰弱する。これに対して非組換え菌である宿主は、5-FOA を代謝系に取り込むことができないためウラシルを取り込み、正常に生育できると考えられる。したがって、衰弱した細胞あるいは正常な細胞を蛍光プローブで染色し、上述のシステムを用いて解析することにより、両者の識別が可能であると考えた。その結果、組換え菌体と非組換え菌体の混合試料から、組換え菌の存在割合を測定したところ、30～80% の範囲でその測定が可能であり、一検体当たりの分析所要時間は 4 時間以内であった。¹⁴⁾

3. 食品分析用バイオセンサーシステムの開発

迅速な食品分析法の確立を目的に、水産缶詰および魚血液中のグルコース濃度、¹⁵⁾ 水産食品中のリン濃度、¹⁶⁾ 魚肉に含まれる各種ビタミン類、¹⁷⁻¹⁹⁾ 魚肉中のトリメチルアミン濃度²⁰⁾等を測定するための各種バイオセンサーシステムを開発した。これらのシステムは、固定化酵素膜または固定化微生物膜とクラーク型酸素電極とを組み合わせることにより、生体触媒の生化学反応によって生じた溶存酸素量の変化から目的の物質を定量する原理に基づいている。各センサーシステムを食品分析に適用したところ、従来は分析に長時間を要した測定項目を、数分間で測定することが可能であった。さらに本研究では、単一のセンサーで複数の物質を同時に測定できるシステムの開発を試みた。すなわち、複数の固定化酵素膜を用いて、酵素反応の時間差を作り出すことにより、イノシン-ピボキサンチン同時測定用センサー、²¹⁾ イノシ

*5 遠藤英明, 傅 民, 迫 一慶, 林 哲仁, 村松 宏: 平成 11 年度日本水産学会春期大会講演要旨集, 1999, p. 39.

ン酸測定用センサー²²⁾等を試作し、迅速・簡便な魚肉の鮮度測定を可能にした。

以上述べたように、過去 10 年余りにわたって食品分析や水産関連分野における重要な測定項目を迅速にモニタリングできるバイオセンシングシステムの開発に取り組んできた。目の前に山積する諸問題に取り組み、一つずつ解決していくうちに、いつの間にか食品に携わる者が避けては通ることのできない HACCP の問題に対していくつか回答が得られ、結果的にこのような栄誉ある賞をいただくこととなった。これで全ての問題が解決できたとは全く思っていないが、いささかの貢献ができたのなら幸いである。なお今後いっそうの研鑽を積んで、水産の分野に貢献したいと考えている。なお、本研究は多くの共同研究者の方々の協力を得て行われたものである。渡辺悦生東京水産大学教授、軽部征夫東京大学教授、林哲仁東京水産大学教授をはじめ、多くの先生方に終始ご指導ご鞭撻を賜った。皆様に心から御礼申し上げます。

文 献

- 1) I. Karube and H. Endo: Biosensors in Biodegradation of Wastes; in "Biological Degradation of Wastes" (ed. by A. M. Martin), Elsevier Applied Science, England, 1992, pp. 103-131.
- 2) M. Al-Rubeai and A. N. Emery: Flow cytometry in animal cell culture. *Bio/Technology*, **11**, 572-579 (1993).
- 3) R. Allman, A. C. Hann, R. Manchee, and D. Lloyd: Characterization of bacteria by multiparameter flow cytometry. *J. Appl. Bacteriol.*, **73**, 438-444 (1992).
- 4) B. Magarinos, J. L. Romalde, A. Cid, and A. E. Toranzo: Viability of starved *Pasteurella piscicida* in seawater monitored by flow cytometry and the effect of antibiotics on its resuscitation. *Letters in Appl. Microbiol.*, **24**, 122-126 (1997).
- 5) J. P. Diaper, K. Tither, and C. Edwards: Rapid assessment of bacterial viability by flow cytometry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 268-272 (1992).
- 6) J. P. Diaper and C. Edwards: The use of fluorogenic esters to detect viable bacteria by flow cytometry. *J. Appl. Bacteriol.*, **77**, 221-228 (1994).
- 7) T. H. Chzanowaki, R. D. Crotty, J. G. Hubbard, and R. P. Welch: Applicability of the fluorescein diacetate method of detecting active bacteria in fresh water. *Microb. Ecol.*, **10**, 179-185 (1984).
- 8) H. Endo, J. Nakayama, T. Hayashi, and E. Watanabe: Application of Flow Cytometry for Rapid Determination of Cell Number of Viable Bacteria. *Fisheries Sci.*, **63**, 1024-1029 (1997).
- 9) H. Endo, J. Nakayama, H. Ushio, T. Hayashi, and E. Watanabe: Application of Flow Cytometry for Rapid Detection of *Lactococcus garvieae*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **75**, 295-306 (1998).
- 10) G. G. Guilbault and J. M. Jordan: Analytical uses of piezoelectric crystals. *CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **19**, 1-28 (1988).
- 11) H. Endo, K. Sode, K. Ogura, K. Ohya, and I. Karube: Determination of Microbial Concentration with a Piezoelectric Gum Sensor. *J. Biotechnol.*, **12**, 307-316 (1989).
- 12) H. Endo, H. Muramatsu, K. Sode, and I. Karube: On-line Monitoring of the Viscosity in Dextran Fermentation Using Piezoelectric Quartz Crystal. *Biotechnol. Bioeng.*, **36**, 636-641 (1990).
- 13) 遠藤英明, 鈴木正康, 早出広司, 民谷栄一, 軽部征夫: バイオプロセス用センサーによるデキストラン発酵のオンラインモニタリング. 化学工学論文集, **17**, 559-564 (1991).
- 14) H. Endo, M. Suzuki, K. Sode, E. Tamiya, and I. Karube: Rapid Determination of Plasmid-carrying Yeast Cell by Using an Imaging Sensor System. *Biotechnol. Bioeng.*, **38**, 1331-1336 (1991).
- 15) E. Watanabe, H. Endo, Y. Ikeda, N. Shibamoto, T. Hayashi, and K. Toyama: Determination of Glucose in Fish Muscle and Serum with an Enzyme Sensor. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **52**, 711-717 (1986).
- 16) E. Watanabe, H. Endo, and K. Toyama: Determination of Phosphate Ions with an Enzyme Sensor System. *Biosensors*, **3**, 297-306 (1988).
- 17) H. Endo, C. Matsunaga, M. Hoshi, T. Hayashi, R. Takai, and E. Watanabe: Determination of Dehydroascorbic Acid by Enzyme Sensor System with a Parallel Flow Cell. *Biosens. Bioelectron.*, **9**, 501-507 (1994).
- 18) H. Endo, A. Kamata, M. Hoshi, T. Hayashi, and E. Watanabe: Microbial Biosensor System for Rapid Determination of Vitamin B₆. *J. Food Sci.*, **60**, 554-557 (1995).
- 19) H. Endo, N. Inada, M. Hoshi, T. Hayashi, and E. Watanabe: Application of Biomass Sensor System to Determination of Pyridoxine. *J. Tokyo Univ. Fish.*, **84**, 31-36 (1997).
- 20) N. Li, H. Endo, T. Hayashi, R. Takai, and E. Watanabe: Development of a Trimethylamine Gas Biosensor System. *Biosens. Bioelectron.*, **9**, 593-599 (1994).
- 21) E. Watanabe, H. Endo, T. Hayashi, and K. Toyama: Simultaneous Determination of Hypoxanthine and Inosine with an Enzyme Sensor. *Biosensors*, **2**, 235-244 (1986).
- 22) E. Watanabe, H. Endo, and K. Toyama: Determination of Inosine-5'-monophosphate in the Presence of Inosine and Hypoxanthine with an Enzyme Sensor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **29**, 341-355 (1988).