

はじめに

微生物の培養は、食品工業をはじめとしていろいろな産業で利用されているが、培養条件や菌の増殖程度を数値で表現して客観的に把握する一般化された方法があれば、その恩恵は多大なものがある。また、食中毒や品質問題を引き起こす菌の検出についても同様に、菌の増殖程度をグラフで表現できれば、広範な応用が可能となる。応用の例はいろいろあるが、その一部としては、次のようなものがある。

- a. 研究所でのアプリケーション
 - ・ 菌の性状がより完全な形で把握でき、菌自体の研究が促進され、かつ加速される。
 - ・ 菌の制御（医薬品も含め）や増殖促進に関する研究が効率良く実施できる。
 - ・ 培地の特性をグラフで表現できる。
- b. 食品工場でのアプリケーション
 - ・ 微生物を利用した製造のモニターが厳密にできる。
 - ・ 殺菌の程度が簡単に把握できる。
 - ・ 細菌検査が確実に実施できる。（特に生菌による低い汚染の検出には、検査システムの感度などの性能よりも試料中に含まれる菌の確率が問題となるため、培養が必要となる。）

その他、培地メーカーの製品品質管理や検査センターでの応用など、各種のアプリケーションがあるが、微生物の増殖に限らず、細胞（組織培養）にも応用することができる。

本稿では、マイクロバイオ社が独自で構築した概念を反映させた培養型の定性試験用細菌検査システム（特許第 3225484 号）について、その論理展開と構成概念を紹介する。

1. 論理展開の種類

論理を展開するにあたり、その要素が「規則」、「事例」、「結果」であるとすれば、組合せとしての論理展開も次の 3 種類に大別することができる。

帰納推論（Induction）

事例と結果から規則を推論

自然科学は、対象事例を観察して結果を確認し、規則を見つけ出して発展してきた。

（例：微生物学、古典物理など）

一般的には、細菌検査用具や機器の開発も観察主体で実施されている。

演繹推論（Deduction）

規則と事例から結果を推論

論理的な理論を構築して事例に適用し、結果を推測する。

（例：電子工学、相対性理論など）

エレクトロニクス機器などは、理論に基づき設計して開発され、その動作が確認される。

仮説形成（Abduction）

規則と結果から事例を推論

規則を仮定して結果を観察し、事例を推測する。この過程を踏まえ、仮説を補強して理論を形成する。

ここに紹介するマイクロバイオの細菌検査システムは、その新概念の構築にあたり、仮説形成のアプローチを採用している。概念としての規則を仮定して、これを対象事例としての微生物に適用して結果を観察し、事例、すなわち微生物を推測している。このアプローチにより、仮説とシステム開発との相互間でフィードバックすることにより、一般化できる理論が形成できる。

2. 採用されている概念

細菌検査システムを開発する前に、どのようなシステムにするのかを検討する必要がある。単に一種類の菌を検出する方法に特化することが開発目的ではないとすれば、定性試験用として一般化できる理論の構築が必要となる。これには仮説形成のアプローチが一番速く確実であり、まず、高度な概念を念頭において、その適用を模索する。このシステムで採用されている概念には、次のようなものがある。

- a. 菌増殖特性の数値化 (Expressing in Numerical Value)
- b. 標準菌株 (Standard Microorganism Under Test)
- c. 特性試験 (Characterization)
- d. 学習モード (Learning Mode)
- e. 特性データベース (Database)
- f. 条件フィルター (Conditional Filter)
- g. 試験モード (Test Mode)
- h. 菌数把握 (Number of Microorganism)

3. 概念を反映させたシステムの具現化

菌の増殖程度や性状を把握するシステムは、生きている菌を試験対象とする。菌の増殖程度をモニターするには、やはり培養に依存することになるが、生菌の増殖度合いを示す要素で何が検出に最適かを、まず検討する必要がある。検出要素を検討するうえで留意すべき点は、菌の増殖程度とそれに対する変化量との間の相関性である。この相関性がシステム全体の精度を大きく左右するので、数値化を念頭においたシステムの開発には、相関性の優れた検出要素を採用する。

検出要素

- ・ 菌増殖時に発生する CO₂ の量
(菌の増殖と極めて相関性が高い。広範な菌に適用可能。)
 - ・ 菌増殖時に使用される O₂ の量
(O₂の減る量を計測するには密閉容器が必要。主に好気性菌が対象。)
 - ・ 菌増殖時に発生する酸による pH の変化量
(変化していく過程がなだらか。試料の pH による影響が高い。)
 - ・ 菌が増殖したことによる電気抵抗の変化量
(変化していく過程がなだらか。センサーは試料接触型となる。)
 - ・ 菌の存在に応じた ATP の量
(試験対象菌のみによる変化量との相関性が比較的低い。)
 - ・ 抗原・抗体反応による反応量
(対象菌に対する反応そのものの特異性が高過ぎる傾向にある。)
- など、

センサーについて言えば、上の例に挙げた要素の変化量を検出するセンサーのどのタイプを採用しても、新概念を反映したシステムは開発できる。また、すべての変化量を同時にモニターするスーパーシステムを開発することも可能である。しかし、センサーについて重要なことは、センサーの感度 (Sensitivity) が良いことではなく、確実に一定量に反応する正確さである精度 (Accuracy) が良いことである。精度が良く、再現性 (Repeatability) が良くなければ、結果に偏差が生じるので数値化が困難になる。

概念を反映させるには、数値化することが最大の課題である。つまり、システムが高感度のセンサーを持っていることが問題ではなく、一定量を高精度に測る能力を持っていることが重要である。

a. 菌増殖特性の数値化 (Expressing in Numerical Value)

最初に、一つのパラメータについて結果をグラフで表現できるようにする。数値化を実現しようとする場合、偏差のない結果が提供できる精度の良いセンサーシステムが必要となる。一般的に、自然現象はなだらかに変化するものが多い。この変化をセンサーを用いて電気信号に変換し、エレクトロニクスで処理する方法が多く採用されている。培養型は横軸が時間軸になり、変化は数 10 時間にも渡って継続的に起こると考えた方が現実的である。このような変化に対して、しきい値 (Threshold Level) を設定して検出しようとする、信号やしきい値自体が少しでも変動すると、結果としての検出時間が著しく変動する。

また、検出を高感度にしようとしてセンサー信号を微分し、変化が顕著に現われた時点で検出するという方式を採用しているシステムもある。これは精度を犠牲にしているとともにノイズにも反応してエラーを生じ易い。

精度を追求する方式としては、センサーに入る変化量を蓄積し、一定の値に達した時点で、出力をデジタル信号のように反転するものが望ましい。

SensiMedia はシンプルなものではあるが、このような条件を考慮して考案された検出用具で、滅菌済試験管の中に培養液と CO₂ センサーが封入してある。センサーは、CO₂ を一定量吸着し、吸着量がしきい値に達した時点で、その色が濃紺色から無色透明に比較的短時間 (約 30 分) で変化する。つまり、この用具は CO₂ の一定量を検出してデジタル的反応をする機能を内在している。(図 1)

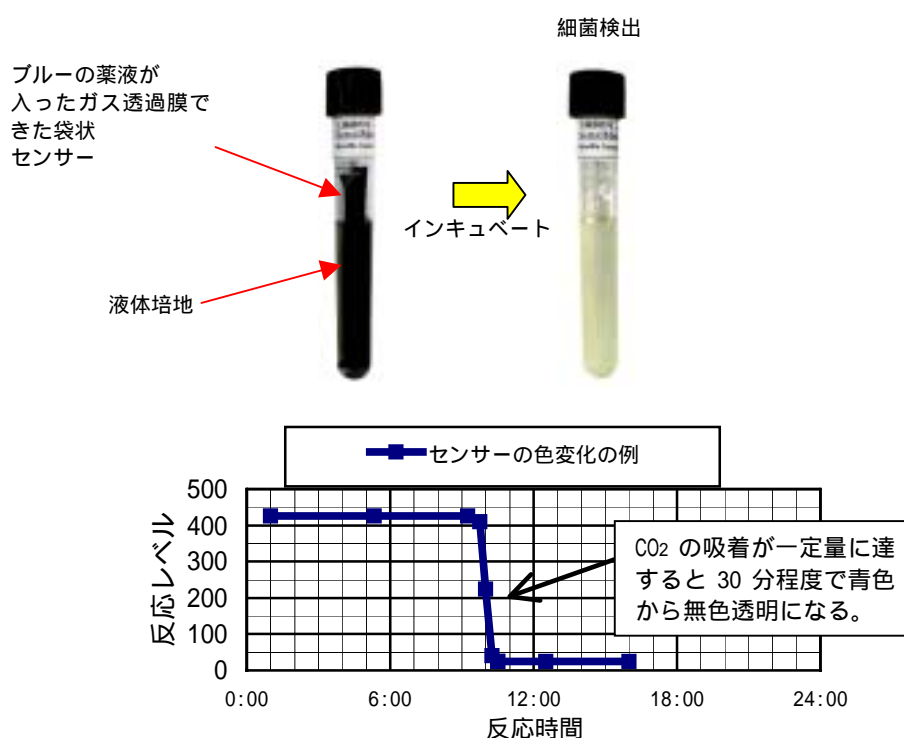


図 1 細菌検査用具 SensiMedia と CO₂ センサーの反応

また、試料を添加した細菌検査用具 SensiMedia を装填し、インキュベートしながらセンサーをモニターして検査開始時からセンサーが反応するまでの時間を計測する検査機器は比較的容易に作製できる。

菌の増殖は1分裂で2倍になる指数関数的増殖（Binary Fission）なので、10の対数目盛りで表現できる。試料を10倍毎に希釈した希釈系列の試料を1mlずつ添加したSensiMedia検査用具を一定温度下で培養して各用具の検出時間を計測し、縦軸が菌数の対数目盛りで横軸が時間のグラフに表すと、図2に示すように、1回の試験でも、ほぼ直線の特性が得られる。こうしてグラフで表現できるということは、数値化ができたことを意味する。

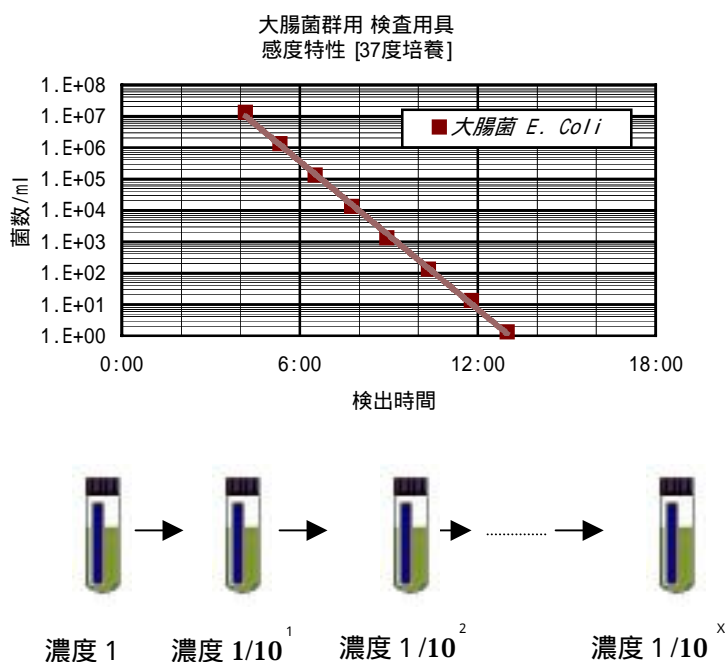


図2 希釈系列と特性グラフ

CO₂ は、化学反応や酵素などの影響により発生する場合がある。いわゆる液体培地の組成中の成分と添加された試料によって生じる場合や試料自身が CO₂ を含んでいることすらあるが、このような場合でも、汚染のない同じ試料 1ml を SensiMedia に添加し、プロトコルの時間を十分越えた時間中ネガティブ（センサーが陰性）であれば、検出に支障をきたさない。つまり、代謝により産生される CO₂ に加えて、与えられた条件下において他の要因で発生する CO₂（バックグラウンドノイズ（Background Noise））も希釈系列により描かれたグラフに織り込まれたことになり、増殖の程度を把握する障害にはならない。更に、増殖過程で CO₂ が発生しない対象菌についても、代謝により産生するもので二次的に CO₂ を発生させれば同様の結果を得ることができると言える。

b. 標準菌株（Standard Microorganism Under Test）

データ収集を実施する場合には、ATCC 番号のような ID 番号が付された標準菌株を対象にする。この場合、菌の分類が問題なのではなく、データを収集する場合に、共通の同じ菌と認識されたものを使用することが重要なのである。標準菌株のデータなくして野生菌株のデータはあまり意味をなさない。また、微生物にも係わらず、その検査に対する考え方としては、化学物資や電子部品などに対する検査と同様なものとして取り組む。

c. 特性試験（Characterization）

数値化が可能になり、グラフで菌の増殖程度を把握できるようになると、標準菌株を検査対象にして、パラメータを増やし、多次元の特性試験を実施することができる。培養条件に関するパラメータとは、培養温度や培地の塩分濃度、pH、組成を構成する各成分など、増殖促進や抑制に関連する各々の項目のことである。各希釈系列に対して、温度を数度毎に変えてデータを収集したり、塩分濃度を段階的に変えて収集したり、pH も同様に段階的に変えて収集することは、概念として多次元の特性試験を実施していることになる。標準菌株に対して特性試験を実施すれば、その菌の増殖が最も速い至適条件（Optimal Condition）を見つけ出すことができる。

培養型検出システムの検出迅速性は、検出対象菌に、その菌の増殖する至適条件を与えることで達成できる。

下図 3 は、*Alicyclobacillus cycloheptanicus* に対して実施した特性試験の一部の例で、培養温度と pH の影響が示されている。

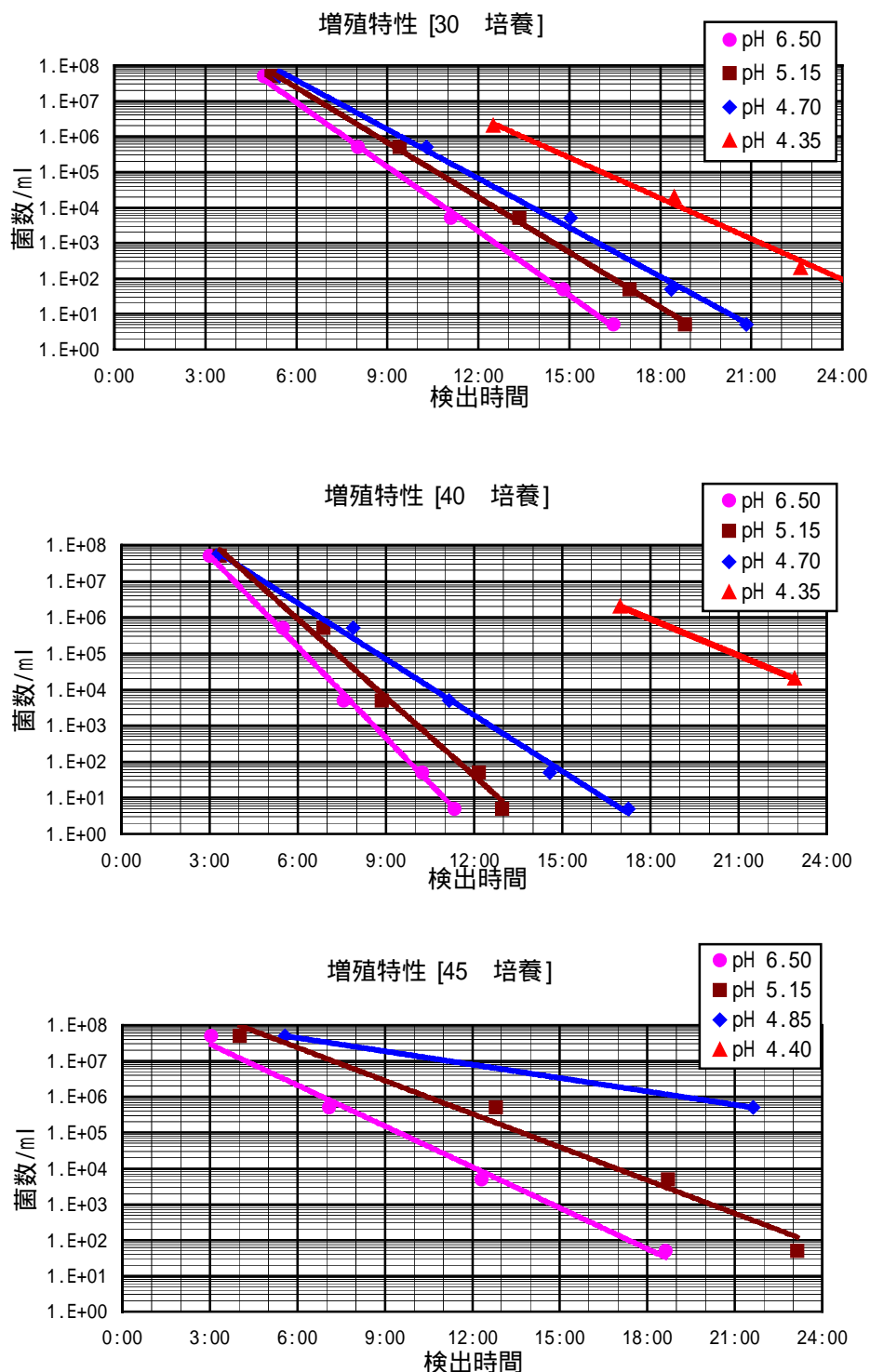


図 3 培養温度 30、40 及び 45 における pH の影響

これにより、培養温度は 40 で pH は中性に近い方がこの菌は増殖が良いことが分かる。

また、下図 4 は、市販されているココアの菌に対する増殖抑制効果についてソイビーンカゼインダイジェスト培養液を使用して特性試験を実施し、その結果を示した例である。

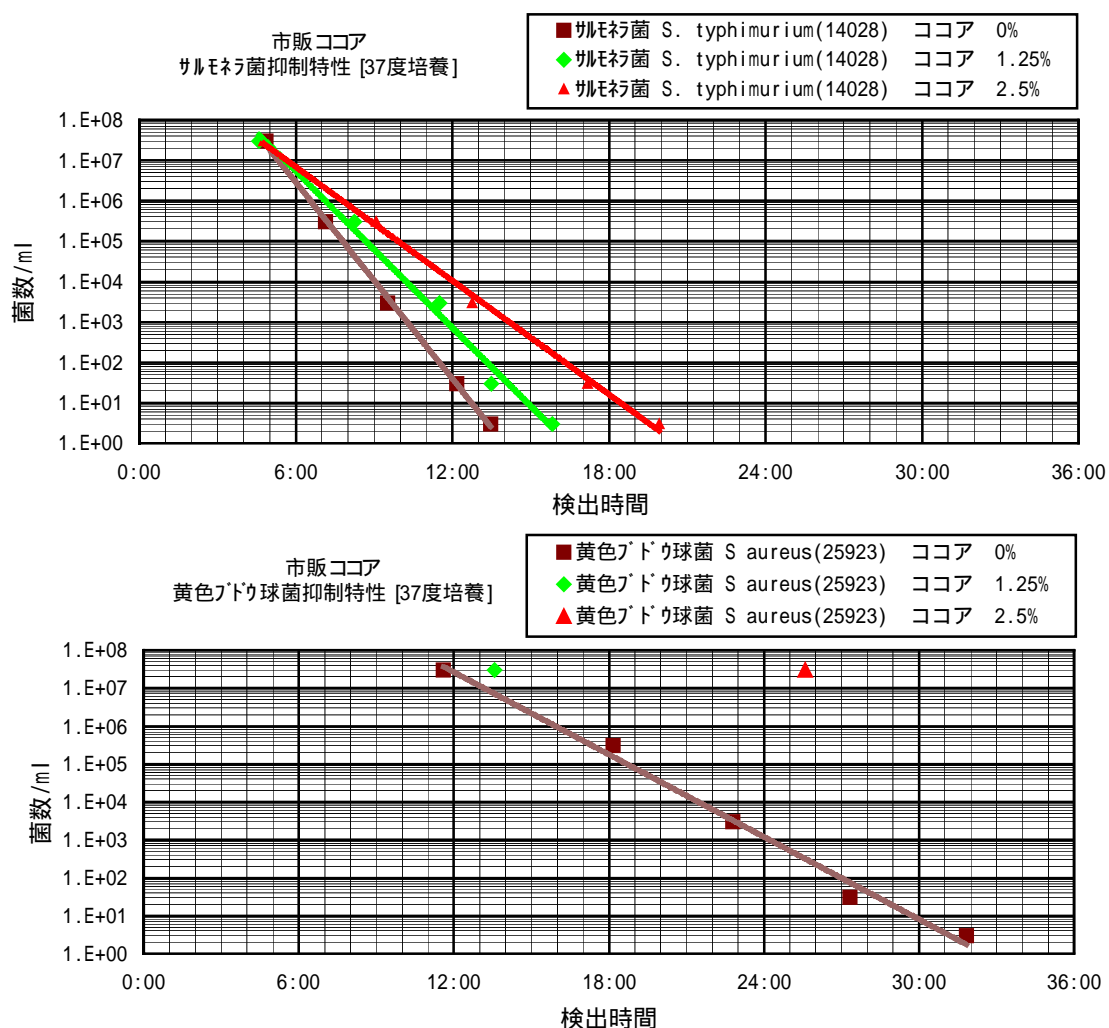


図 4 ココアの菌増殖抑制効果 (サルモネラ、黄色ブドウ球菌)

このグラフより、グラム陰性菌であるサルモネラは、ココアを 1%程度ずつ培養液に添加していった時に増殖が段階的に抑制されるが、グラム陽性菌である黄色ブドウ球菌は菌濃度が希釈された試料では増殖が確認できなくなることから殺菌されていることが分かる。

d. 学習モード (Learning Mode)

標準菌株に対して多次元の特性試験が実施できるということは、パラメータを増やせば増やすほど完全な形で標準菌株の性状について学習できることを意味している。対象としている菌の性状が十分に把握できていれば、精度の高い検査用具の開発が容易になる。(図 5)

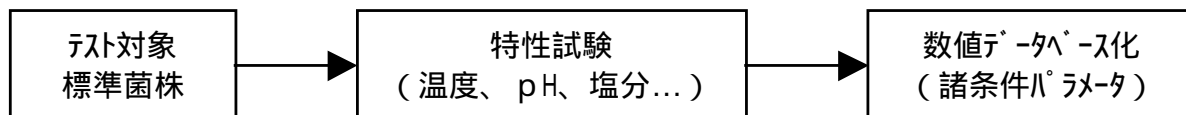


図 5 学習モード

テスト対象の標準菌株に対して温度、pH、塩分濃度、増殖促進剤、他の細菌の抑制剤など、多数のパラメータについて特性試験(Characterization)を実施して、数値によりデータベース化する。

特定菌選択用に最適な培地の組成が科学的に決定できる。

e. 特性データベース (Database)

標準菌株について特性試験を実施して学習し、性状を網羅したデータベースを構築すれば、細菌検査用具を開発する速度が加速度的に速くなる。また、増殖の抑制や薬剤の効果、DNA 解析などであらかじめ判明している因子の発現なども確実に評価できるようになり、多種類の菌について厳密な分類 (Categorization) も可能となる。

f. 条件フィルター (Conditional Filter)

標準菌株について収集されたデータに基づいて、検出対象菌について温度や組成を含めた培養条件を至適条件にすれば、この菌を一番速く増殖させることができる。このような条件下では、既に対象菌以外の菌の増殖はある程度抑制されている。さらに追い打ちをかけるように、他の菌の増殖だけを抑制する成分を添加していけば、対象菌と他の菌の増殖とに著しい差を設けることができる。極端な場合は、対象菌の増殖にとても優しく、他の菌は死滅するという培養状態を作り上げることができる。一般的にこのような培地は、選択培地と呼ばれているが、増殖時間や抑制程度が反映されていない。

増殖程度が極端に異なり、1m l に 1 CFU の検出対象菌が存在する時に検出される時間が正確に把握されていて再現性が確実である場合、概念的には時間軸に対してフィルターの状態となっている。このような培養条件下で、雑多の菌が混入している試料を添加して培養すると、一番速く増殖するのが対象菌であるので、一定の時間内では対象菌のみが検出される。(図 6)

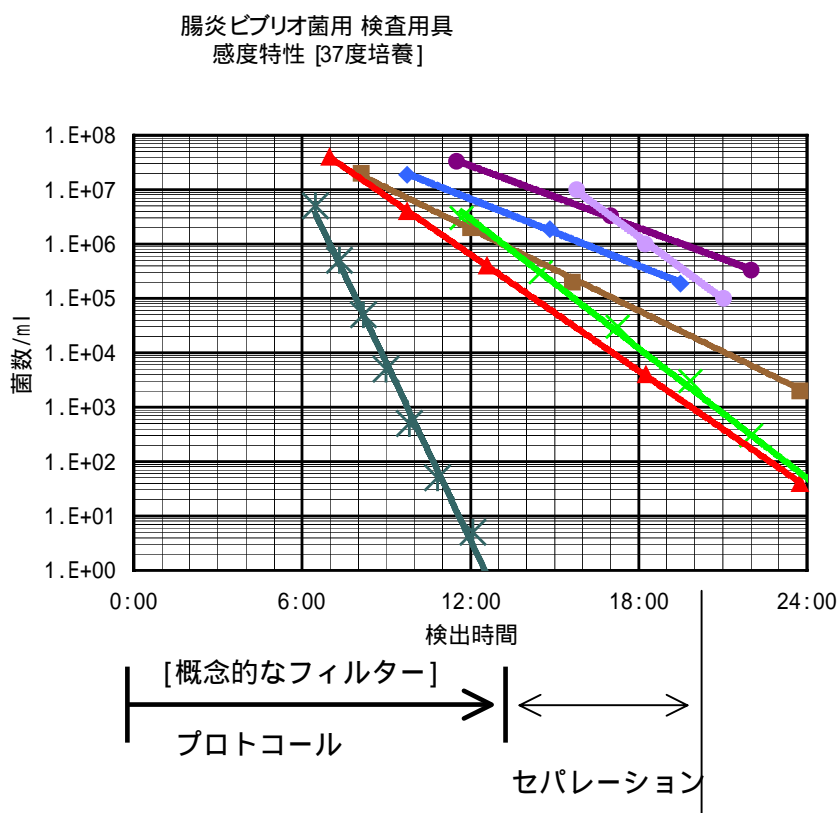


図 6 条件フィルター応用例

検査プロトコール (Protocol) の時間を経過した後、その時点から他の菌で対象菌の次に増殖の速い菌の 1000/m l が検出される時間までをセパレーション (Separation) とすれば、他のその菌が 1000/m l の汚染がある場合でも、セパレーションの時間内はセンサーが陰性を保っている。

g. 試験モード (Test Mode)

検出対象菌用に設定された条件フィルターを適用し、学習モードの逆作業を実施する。検査用具について言えば、用具の精度は、学習モードにおいて収集されたデータの緻密さに依存する。(図7)

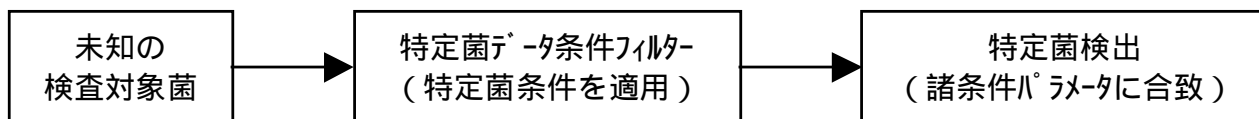
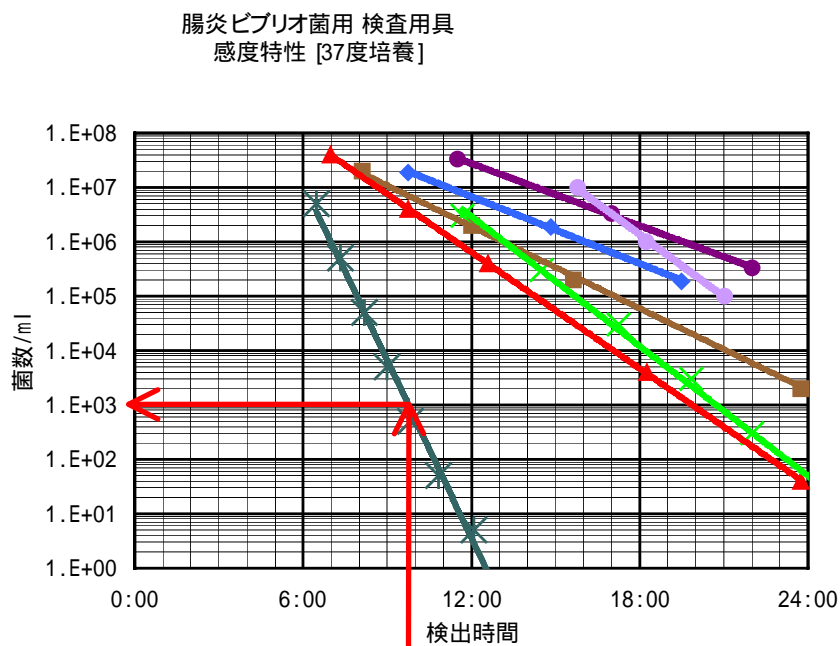


図7 試験モード

未知の検査対象菌に対して、温度、pH、塩分濃度、増殖促進剤、他の細菌の抑制剤など、特定菌の諸条件をフィルターとして適用させると、条件に合致した菌が検出される。

h. 菌数把握 (Number of Microorganism)

試験モードとして条件フィルターを適用して菌が検出された場合、検査プロトコル(条件フィルターに相当する時間)内では検査対象菌のみが反応するので、あらかじめ把握されている増殖特性より検出時間に相当する菌数を読み取ることができる。(図8)



検出時間：10 時間
試験対象菌数として約 1000 に相当する。

図8 菌数の把握

特定菌についてフィルターを適用して限定すれば、この菌についての菌数を把握できる。しかしながら、一般生菌数の把握については、全ての菌について同じ増殖特性を示す培養条件を作り出さない限り、検出時間と菌数との間に厳密な相関性は希薄である。つまり、全ての菌の増殖特性が1本のグラフの直線で表す必要があり、定量試験については、それに相応しい概念体系を要する。

次のグラフ（図9）は、どんな菌でも増殖する培養液を使用した場合の増殖特性の例である。各菌によるグラフの傾きと直線の位置が同じではないので、検出時間と全部の菌による生菌数との間に相関はとれない。

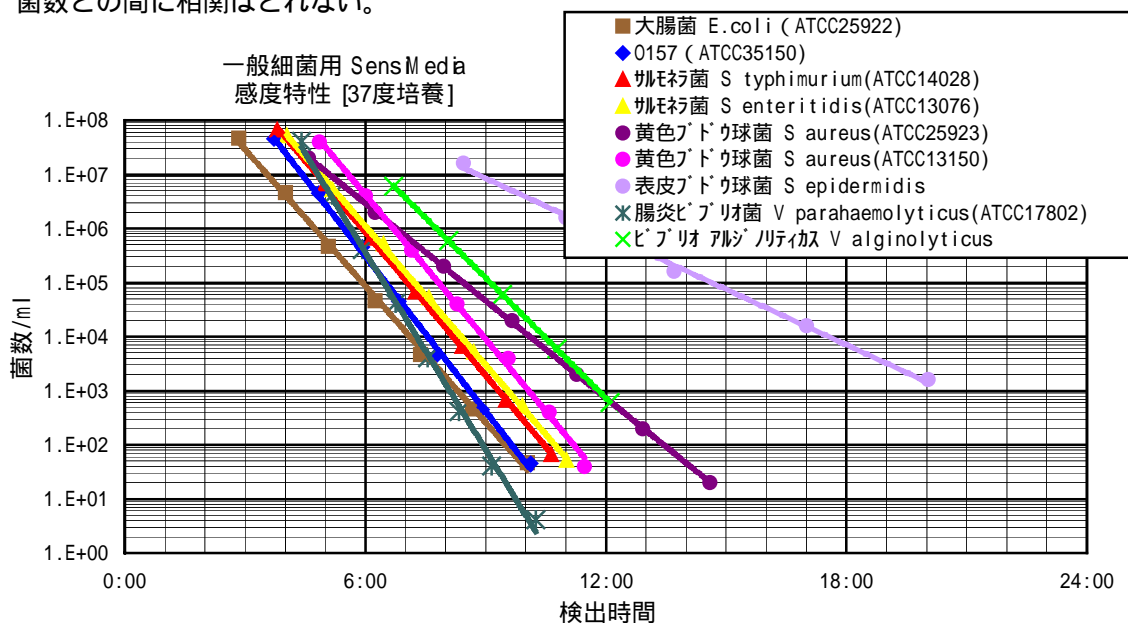


図9 一般細菌用（無菌検査用）培養液の増殖特性

また、芽胞菌の場合には覚醒状態が問題となるので注意を要する。*Alicyclobacillus acidoterrestris* を例（図10）にとれば、完全に覚醒している状態から培養を始めた場合と芽胞状態から培養を始めた場合とでは6時間程度の差を生じる。芽胞を覚醒させる手段としてヒートショックがあるが、この有効性も100%ではない場合には、希釈系列で特性を把握した時に中間位置に特性直線が描かれる。しかしながら、その中間の特性を利用した場合でも、ヒートショックの手法としての有効性を織り込んだ特性でもあるので、熱による殺菌効果の確認をいうようなアプリケーションに使用する場合にも、問題なく利用できる。この場合、どの程度菌が死んだかは検出時間の差により把握できる。また、差の菌数は正しく求められるが、菌数そのものは、芽胞の菌数がグラフ直線には反映されていないので、寒天培地で芽胞まで培養して確認した時の菌数と比べると一定の比率で少なく表現される。

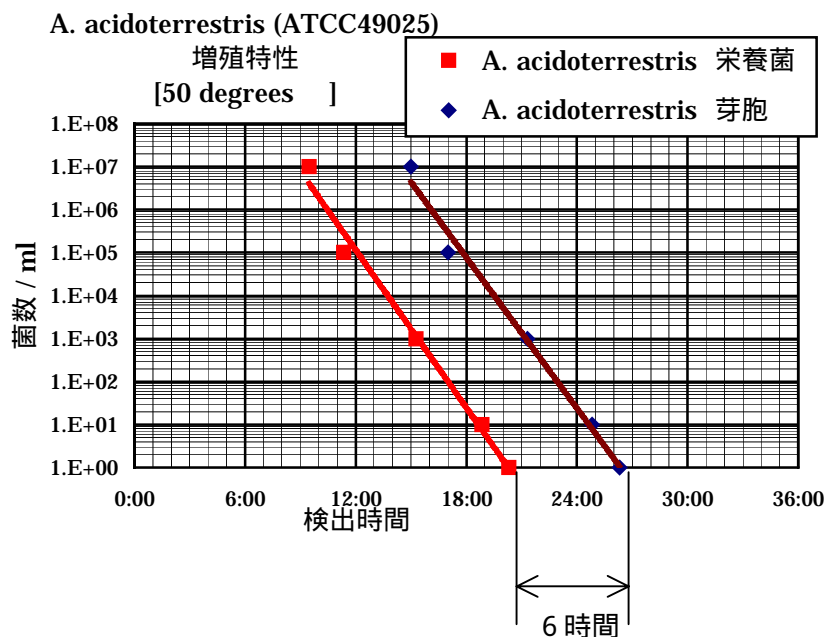


図10 *Alicyclobacillus acidoterrestris* 増殖特性

おわりに

製品開発する上において、良いアイデアが問題にされるが、採用する技術の根幹をなす概念（コンセプト（Concept））がより重要となる。良い概念が構築できれば、応用範囲は一つの製品開発にとどまらない。

応用分野を細菌検査に限定して考えてみても、ここに紹介したようなバックボーン（背骨）となる概念があることにより、これを反映したシステムは、観察を効率良く、また能率良く、かつ正確に実施できる。帰納法的アプローチを実施する場合にも、試行錯誤の実験をむしろシステムティックに行ない、規則性を素早く発見することが可能になる。また、概念の恩恵により、例え未知の細菌についてでも、精度の良い検出用具が容易に開発できる。

小川,：“細菌増殖特性の数値化とその応用”，食品と開発, Vol.37, No.1 , pp.66-70 (2002.1)

参考文献

- 1)小川,他：“呈色反応方式による細菌検査の数値化”，食品工業, Vol.43, No.14 , pp.58-61 (2000.7)
- 2)小川,：“論理的手法による寒天培地の開発（例：サルモネラ菌用）”，食品工業, Vol.44, No.10 , pp.39-41(2001.5)

<http://www.microbio.co.jp>
<mailto:info@microbio.co.jp>