

## 第4章 微生物検査の迅速化技術

### 第5節 センシメディア法

- 測定原理：液体培地+CO<sub>2</sub>センサー
- 適用可能な食品：炭酸飲料を除く食品全般
- 検出感度：1CFU/ml、1CFU/2.2ml、1CFU/10ml
- 測定に要する時間：検査用具によって異なる。(例：大腸菌1,000CFU/mlは9時間以内)
- 価格：バイオマティック20(1台) 95万円 (\*改定)

センシメディア(1ml用)1本 230円  
センシメディア(2.2ml用)1本 230円  
センシメディア(10ml用)1本 340円

#### はじめに

センシメディアシステムは、速くて、確実で、簡単で、低コストの「誰にでもできる」細菌検査を実現している。また、定性試験時に細菌を検出した場合、電話で自動通報してくれる機能を搭載している。センシメディアは、細菌増殖時間計測用インキュベーターであるバイオマティック20とともに、細菌の増殖程度を調べるシステムとして有用である。センシメディアは、このシステム自体を使用した高感度の細菌検出用具であり、単体でも使用できる。センシメディアシステムはDNA技術と融合した画像処理判定をするものや真菌用システムなどもあるが、本稿では基本システム(図-1)の紹介にとどめたい。

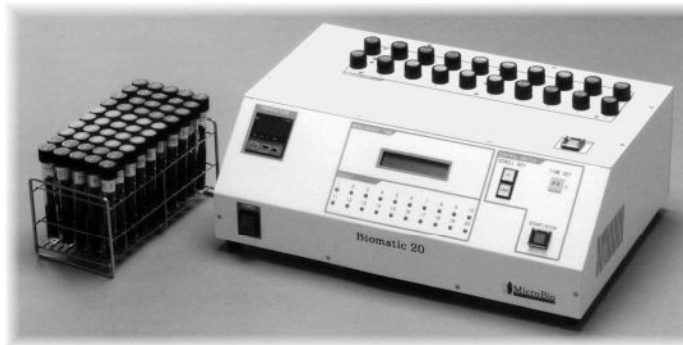


図-1 センシメディア バイオマティック20

センシメディアシステムの特徴として以下のことが挙げられる。

① 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（医薬品も含む）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。

② 食品工場でのアプリケーション

- ・ 酵母や乳酸菌など、微生物を利用した製造について、菌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。
- ・ 生菌による低濃度汚染の細菌検査が確実に実施できる。

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客観的な評価データに利用するなど、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。

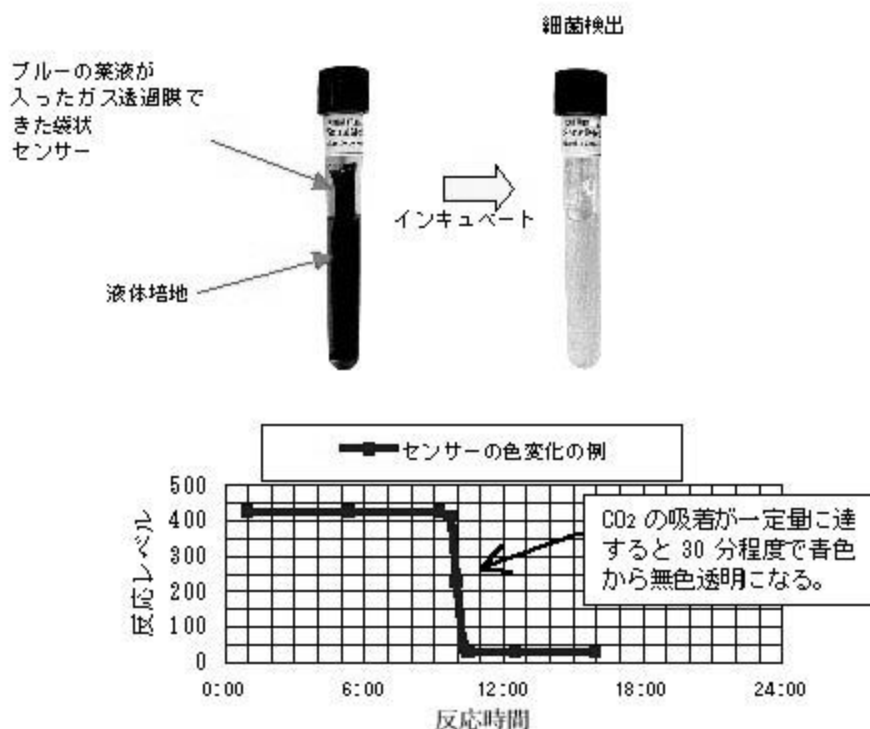
## 1. 測定原理

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、構成概念と測定原理を紹介する。この細菌検査用具・機器は、計測法体系の「試験モード」を利用している。

### 1.1 検出要素とセンサー

生菌の検出や菌の増殖程度を把握するシステムは、培養型が望ましい。また、検出要素としては、菌の増殖とセンサーの反応との相関性が極めて高く、広範な菌の検出に適用可能なものが望ましい。センシメディアシステムは、「菌増殖時に産生される CO<sub>2</sub> の量」を第1要素に採用している。相関性が低い pHシフトなどの呈色反応や後添加である試薬による呈色反応は、補助要素として活用している。

センシメディアは、滅菌済み試験管の中に培養液と CO<sub>2</sub> センサーが封入してある用具で、単体でも判定機能を有している。センサーは、精度と再現性を追求するため積分型にし、CO<sub>2</sub> の変化量を蓄積し、一定の値に達した時点で、出力に相当する色をデジタル信号のように比較的短時間（約 30 分）で無色透明に反転するように設定されている。（図－2）



図－2 センシメディアと CO<sub>2</sub> センサーの反応

## 1.1 採用している概念

定性試験用として一般化できる理論を構築するのあたり、次のような概念を採用している。

- a. 菌増殖特性の数値化、
- b. 標準菌株、
- c. 特性試験
- d. 学習モード、
- e. 特性データベース、
- f. 条件フィルター、
- g. 試験モード、
- h. 菌数把握

センシメディアを使用すれば、このような比較的高度な概念を実施できるが、これにより、数値化が可能となり、「誰にでもできる」細菌検査が実現できる。

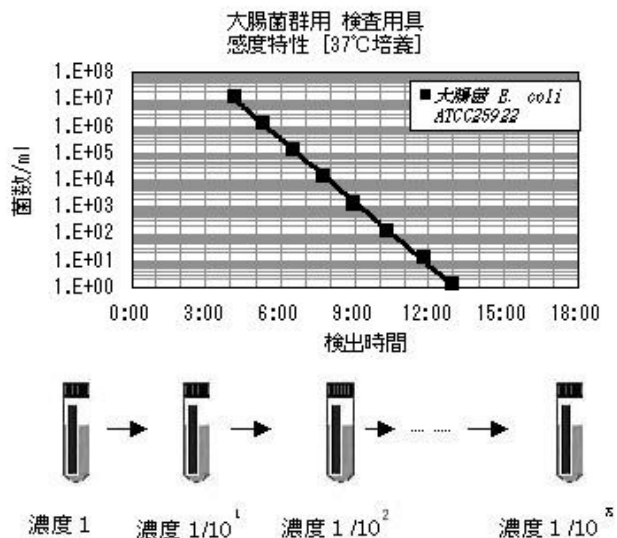


図-3 希釈系列と特性グラフ

### (1) 菌増殖特性の数値化

最初に、1つのパラメータ、例えば温度について、増殖の特性をグラフで表現できるようにする。バイオマティックは、試料を添加したセンシメディアを装填すると、培養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である。この機器を使用して、10倍ごとに希釈した系列の試料を1mIずつ添加した各センシメディアを一定温度下で培養してそれぞれの検出時間を計測する。

菌の増殖は1分裂で2倍になる指数関数的増殖なので、10の対数目盛りで表現できる。希釈系列による菌の検出時間データを、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-3に示すように、1回の試験でも、菌の増殖特性をほぼ直線で示すことができ、数値化できる。

### (2) 標準菌株

データ収集を実施する場合には、共通の菌と認識されたものを使用することが重要なので、ATCC番号や自社保存株のようなID番号が付された標準菌株を対象にする。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がない。

### (3) 特性試験

菌が持っている増殖特性を把握するための試験を、特性試験 (Characterization Test) と呼ぶ。グラフで菌の増殖程度が把握できると、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、培地の塩分濃度、pH、培地成分など、増殖促進や抑制に関連する各項目である。各希釈系列に対して、パラメータを段階的に変えてデータ収集することで、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を見つけ出すことができる。培養型検出システムの迅速性は、検出対象菌について、その菌が増殖する至適条件を与えることで達成できる。(図-4)

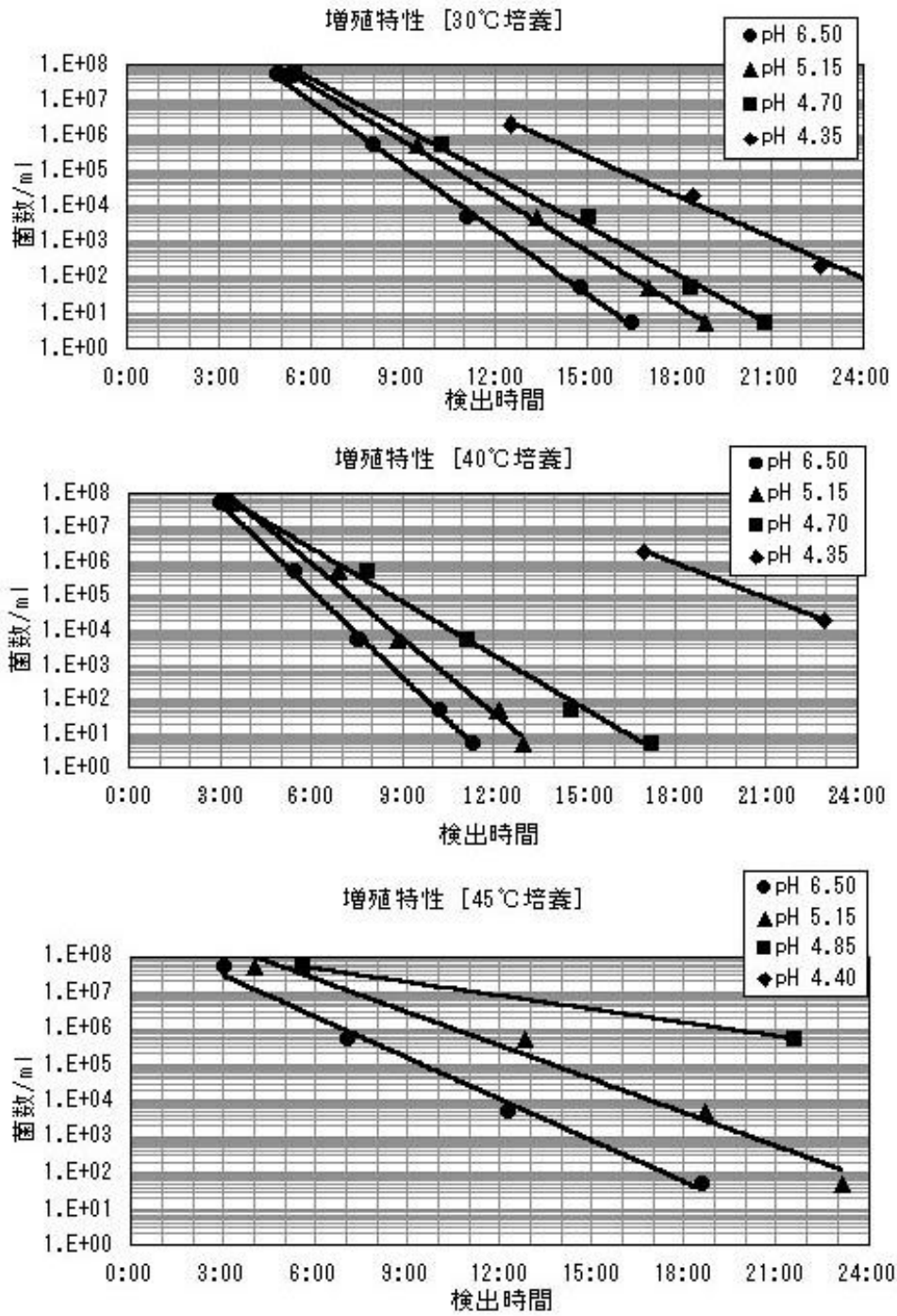


図-4 培養温度 30℃、40℃及び 45℃における pH の影響

#### (4) 学習モード

標準菌株を使用し、いろいろなパラメータを変化させて特性試験を実施し、その菌の増殖特性を把握するモードを、標準菌株から学ぶということから学習モード (Learning Mode) と呼ぶ。標準菌株について、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)。また、特定菌選択用に最適な培地の組成を科学的に決定することができる。

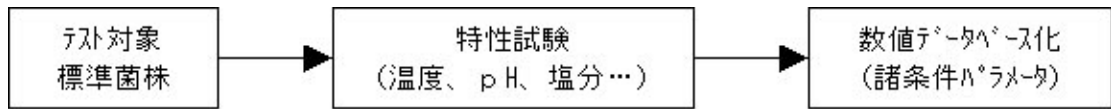


図-5 学習モード

#### (5) 特性データベース

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しておけば、細菌検査用具を開発する速度が加速度的に速くなる。

#### (6) 条件フィルター

検出開始時間から一定時間の窓 (ウインドウ) を設け、検出対象菌のみが増殖できるような条件を設定すれば、この時間帯は、対象菌についての選択フィルターとして動作する。これを条件フィルターと呼ぶ。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、すで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の間に著しい差を設けることができる。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によって構成される条件フィルターの概念が反映されていないので、そのままでは検査用具には採用できない。

増殖程度が極端に異なり、1 ml 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、検出開始時から 1 CFU が検出されるまでの一定時間は、時間軸につい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、最も速く増殖するのが対象菌であるので、この一定時間 (プロトコル) 内では対象菌のみが検出される。(図-6)

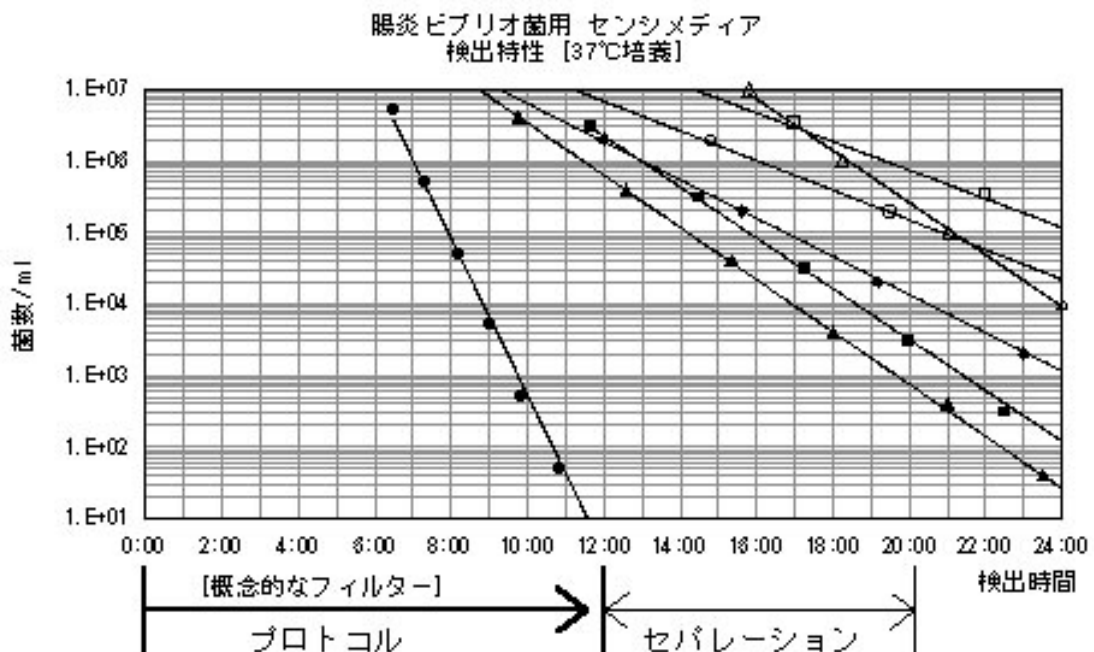


図-6 条件フィルター

検査プロトコルの時間を経過した後、次に増殖の速い菌の 1,000/ml が検出される時間までをセパレーションとすれば、セパレーションの取れた時間内はセンサーが陰性を保っている。

(7) 試験モード

検出対象菌用に設定された条件フィルターを適用したものが細菌検査用具センシメディアである。試験モード (Test Mode) は、条件フィルターを適用したセンシメディアを用いて、いわば、学習モードの逆作業を実施している。選択性を含めた検査用具の精度は、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。雑多な菌を含む試料に対して、温度、pH、塩分濃度、増殖促進剤、他の細菌に対する抑制剤などから構成された対象菌フィルター条件を適用すると、条件に合致した対象菌が検出される (図-7)。

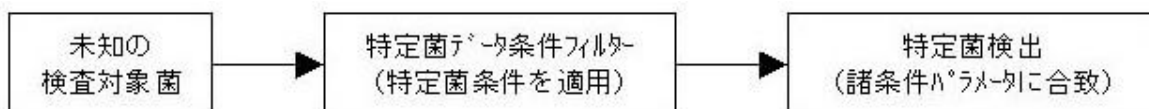


図-7 試験モード

(8) 菌数把握

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 (フィルターに相当する時間ウインドウ) 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とることができる。(図-8)

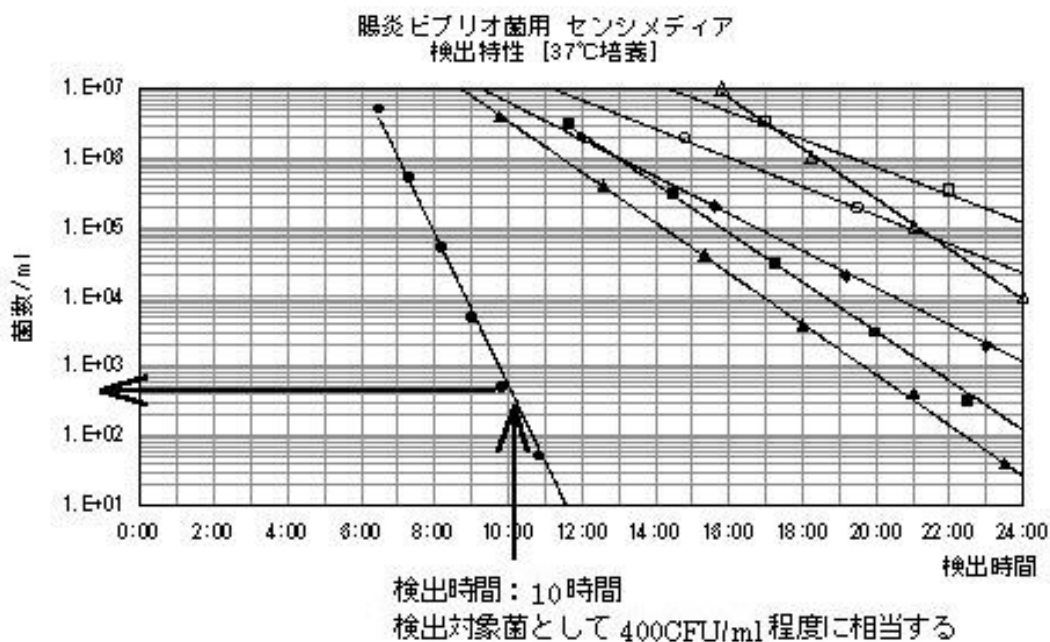


図-8 菌数の把握

## 2. 測定方法

測定作業は、基本的に2ステップだけである。検出したい菌用のセンシメディアのキャップを開けて試料1mlを添加し、キャップを締めて培養する（1CFU/1,000ml以下の低汚染を検出する場合は、前培養する）。プロトコル終了時にセンサーを目視確認して菌の有無をチェックする（図-9）。自動検出を実施したい場合には、試料を添加したセンシメディアをバイオメック（細菌増殖時間計測用インキュベーター）にセットする。必要があれば、確定試験を実施する。

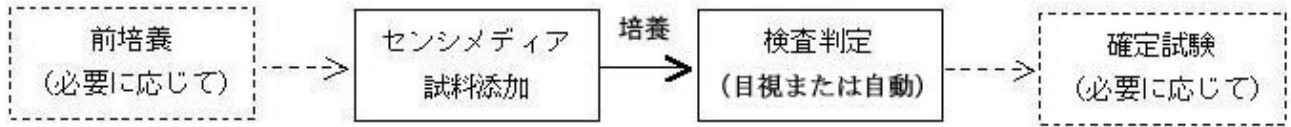


図-9 センシメディアによる検査

以下に2種類のセンシメディアを紹介する。

### (1) 0157用センシメディア

0157用センシメディアのキャップを開けて試料を1ml添加し、キャップを締めて、培養する。この用具の検出特性により、プロトコルを確認する（図-10）。

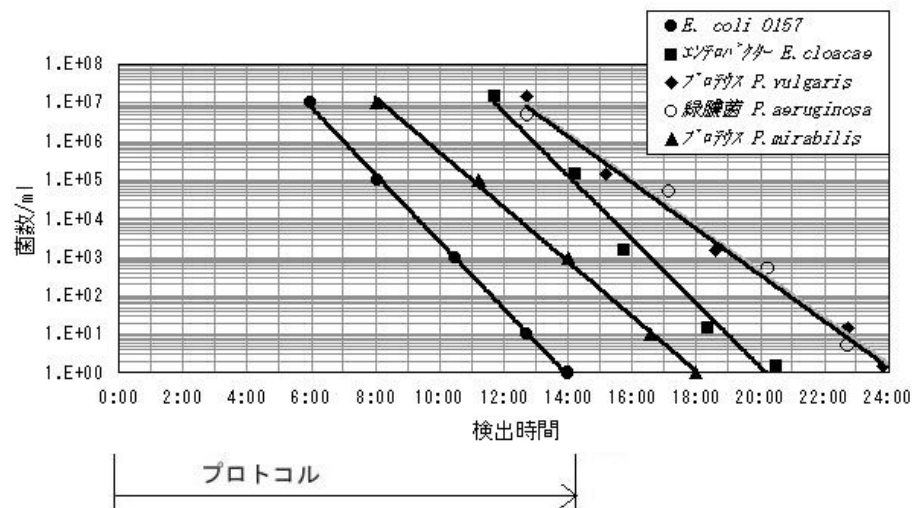


図-10 0157用センシメディアの検出特性（37°C培養）

プロトコルの時間内に陽性となったものについてインドール確認試験（図-11）を実施する。センシメディアのキャップを開けコバック試薬を0.5ml添加する。1分間静置して上層部分の色調の変化を確認する。インドール反応陽性で0157の場合、赤色～濃赤色となる。陰性の場合、黄色～ピンク色となる。

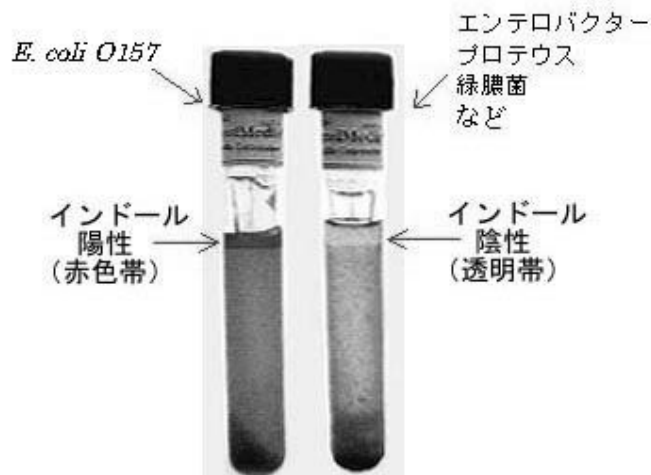


図-11 インドール確認試験

(2) 腸内細菌用センシメディア

腸内細菌用センシメディアのキャップを開けて試料を 1ml 添加し、キャップを締めて、培養する。この用具の検出特性により、プロトコルを確認する（図-12）。

大腸菌群が腸内細菌かによりプロトコルを決める。菌種によって液体培地の pH 反応色も異なる（図-13）。

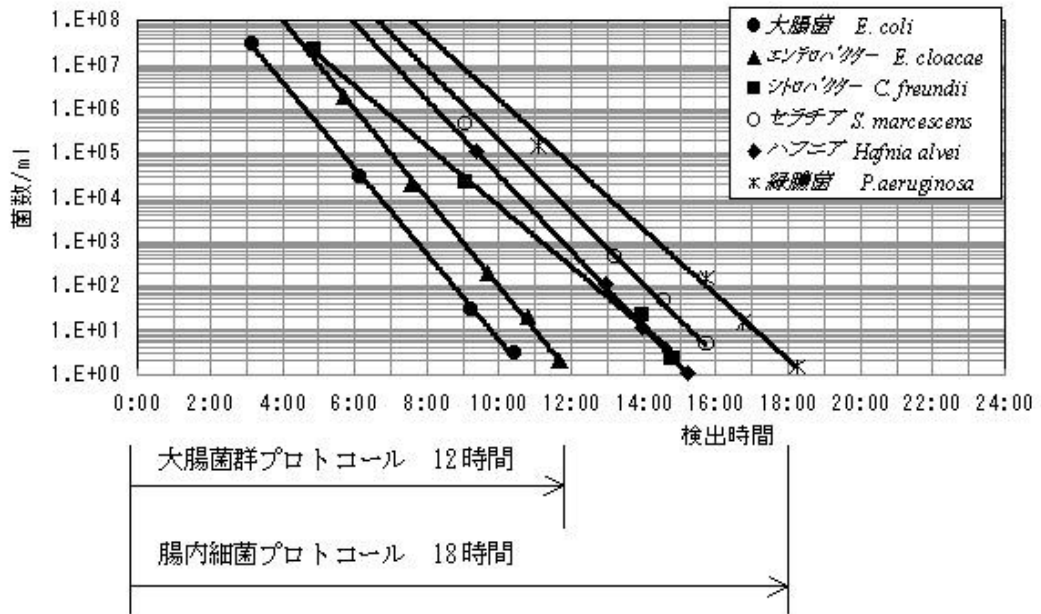


図-12 腸内細菌用センシメディア検出特性

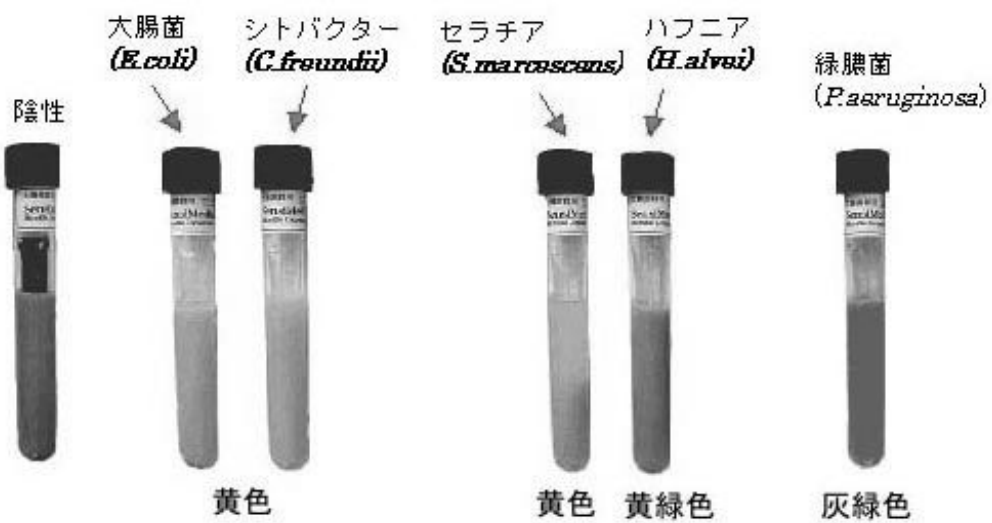


図-13 菌検出時における液体培地の反応色

### 3. 応用例

センシメディア法は生菌の増殖程度をグラフで把握できるように考案されたものであるため、細菌検査自体がアプリケーションの1つである。他のアプリケーションとしては、食品添加物の菌制御機能の研究、殺菌処理効果の確認、抗生物質の効果確認などがあるが、特に菌に関連した研究のアプリケーションについてはデータが数値で確認できるので、研究が著しく加速される。

#### (1) 殺菌処理効果の確認試験

大腸菌などの殺菌対象菌を含んだ試験試料から1mlを取り、センシメディアに添加し、バイオマティックにセットして培養する。バイオマティックでセンサーが反応した時間を読みとり、菌数(A)を把握する。次に、処理後の試験試料から1mlを採取し、同様に菌数(B)を把握する。減少した菌数(A-B)が殺菌された菌数となる(図-14)。

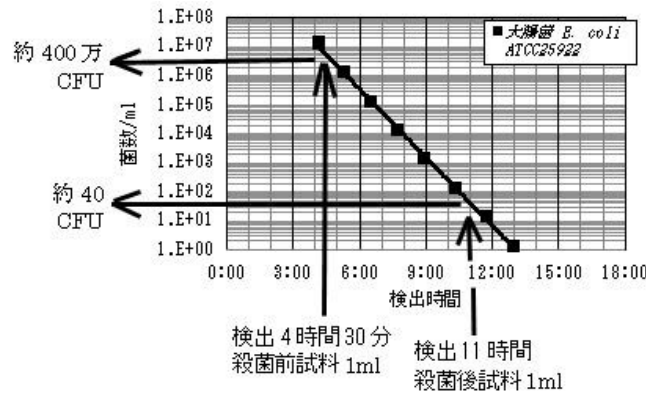


図-14 大腸菌群用センシメディアを利用した殺菌効果の確認例(37°C培養)

#### (2) 添加物による細菌増殖抑制効果試験

市販ココアの *Salmonella* 菌および黄色ブドウ球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た結果を図-15に示した。グラム陰性菌である *Salmonella* 属菌は、ココア濃度の上昇に伴い、増殖が抑制されることが分かる。グラム陽性菌である黄色ブドウ球菌は、ココアを少量添加するだけで増殖が抑制された。

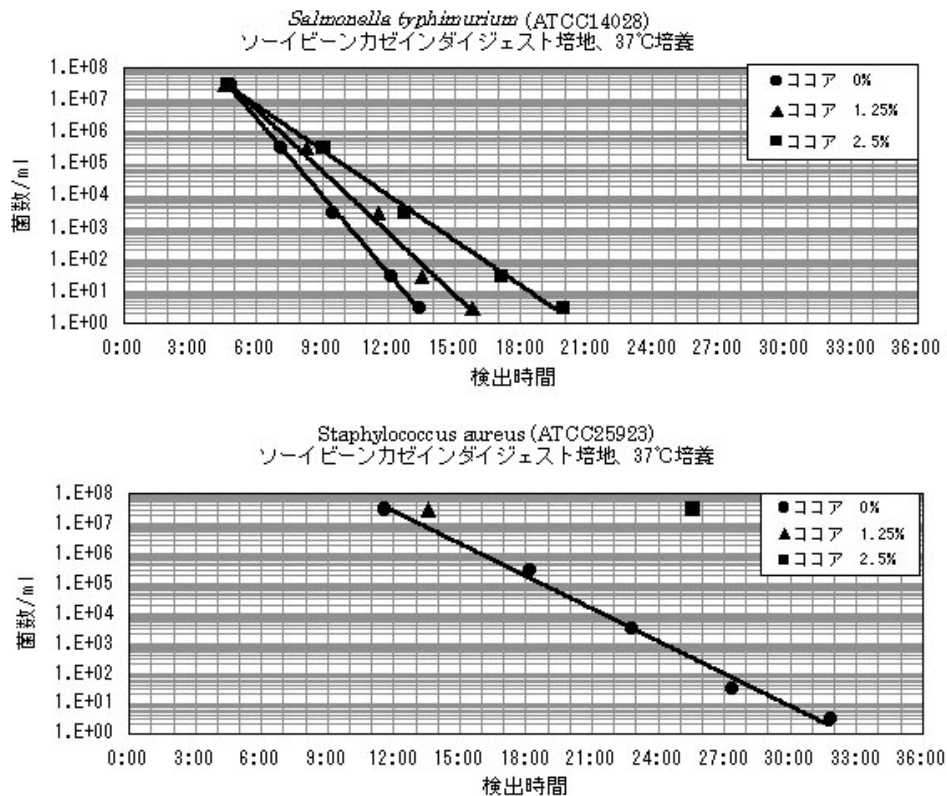


図-15 市販ココアの細菌増殖抑制効果

### (3) 抗生物質の細菌増殖抑制効果試験

抗生物質は菌の増殖を阻害するが、殺菌するわけではないので、1 CFU以上の増殖がグラフで確認でき、抗生物質の増加に応じて増殖が遅延し、特性直線が右へシフトする（図-16）。

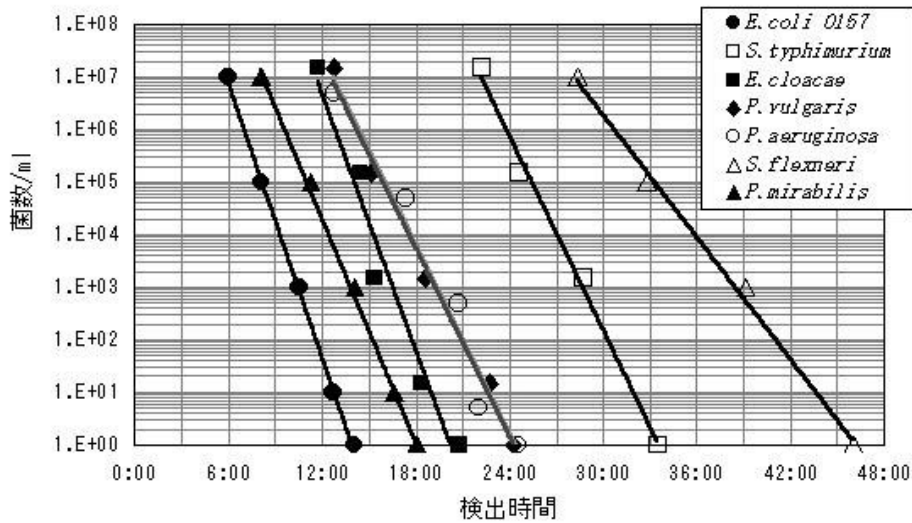


図-16 0157用抗生物質による菌の抑制特性

## 4. 使用に際しての注意点

センシメディアを保存するには、直射日光を避け、暗所冷蔵する。さらに、以下の点に注意する。

### (1) 試料中のCO<sub>2</sub>の影響

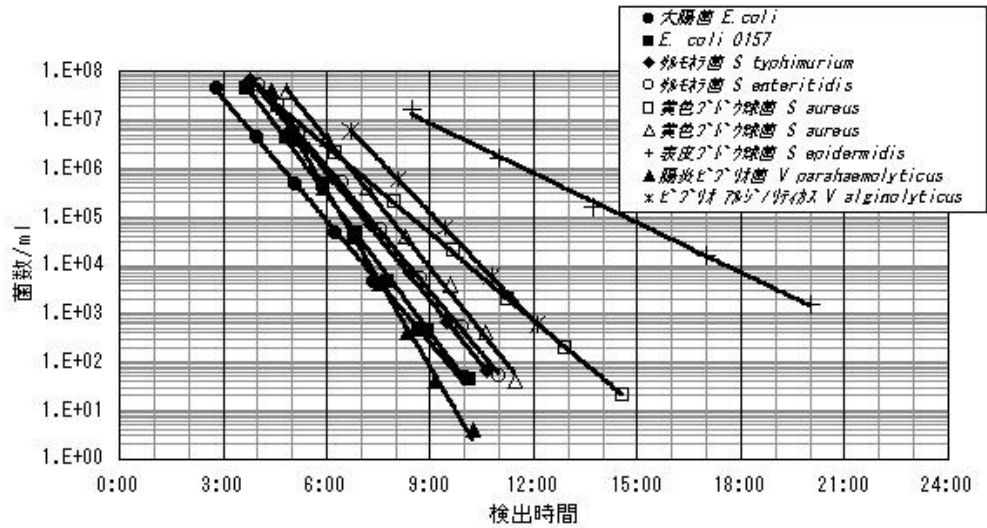
このシステムの検出要素はCO<sub>2</sub>であるので、CO<sub>2</sub>を含む試料の影響や化学反応および酵素反応などより発生するCO<sub>2</sub>の影響を受ける場合があるので注意を要する。しかしながら、このような場合でも、試料を添加したセンシメディアがプロトコルの時間を十分越えた時間中ネガティブ（センサーが陰性）であれば、検出に支障はきたさない。代謝により産生されるCO<sub>2</sub>に加えて、与えられた条件下において他の要因で発生するCO<sub>2</sub>（バックグラウンドノイズ）も希釈系列により描かれたグラフに織り込まれていることになる。

### (2) 試料中の増殖抑制物による影響

試料によっては、pHや増殖抑制効果のある添加物（ポリフェノールやマスタードなど）を含有している場合があり、検出対象菌の増殖が極度に影響されている場合があるので、あらかじめ対象菌の試料中での増殖特性を把握しておく必要がある。

### (3) 生菌数の把握

特定菌について条件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、すべ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なので、生菌数の把握は難しい。図-17に一般細菌用センシメディアを使用した場合の増殖特性の例を示した。各菌株により回帰直線が異なるので、検出時間と生菌数との間に相関は取れない。

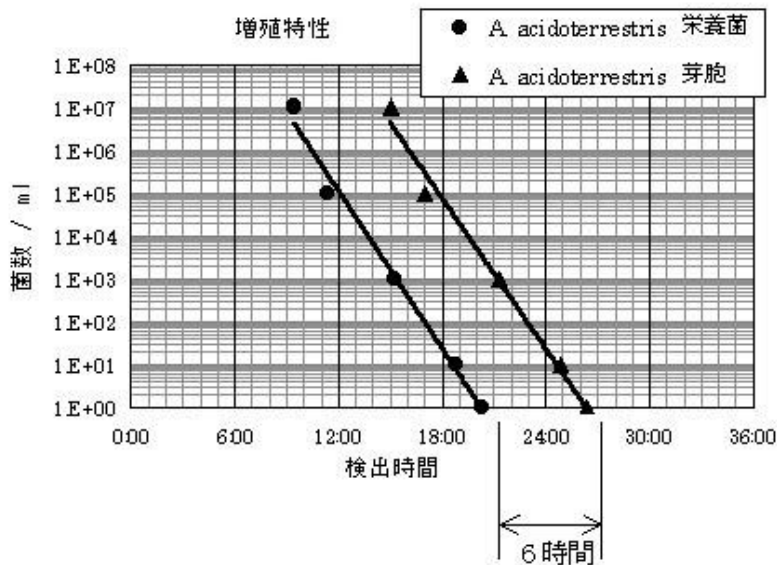


図－17 一般細菌用（無菌検査用）培養液の増殖特性（37℃培養）

#### (4) 芽胞菌の検出

芽胞菌の場合には、発芽しているか否かが問題となるので注意を要する。果汁飲料で問題になることのある *Alicyclobacillus acidoterrestris* を例にとれば（図－18）、完全に発芽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。芽胞を発芽させる手段としてヒートショックがある。

[小川廣幸]



図－18 芽胞菌 *Alicyclobacillus acidoterrestris* の増殖特性（50℃培養）

小川廣幸：センシメディア法，サイエンスフォーラム，食品微生物の簡便迅速測定法はここまで変わった！，158～165（2002）

#### 参考文献

- 1) 小川廣幸ら：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, 58～61（2000）
- 2) 小川廣幸：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, 39～41（2001）
- 3) 小川廣幸：細菌増殖特性の数値化とその応用，食品と開発，Vol. 37, No. 1, 66～70（2002）

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