

はじめに

食品業界においては細菌検査対象となる製品が、加熱などの殺菌工程を経たものと、生ものなどに2分される。このうち、比較的シェルフライフが長い殺菌工程を経た製品は、ほとんど無菌に近い状態であると言える。

本稿では、このような殺菌工程を経た製品において、品質問題を引き起こす菌や危害菌の生菌による微量な汚染の検出を確実に実施し、自動化が可能なセンシメディア法とその応用例を紹介する。

1. 食品業界における細菌検査

a) 生菌の検出

細菌検査用具や機器は、元来、医療用として開発されてきたものが多い。医療現場で使用される場合は、病原菌が体液などの検体中に存在したことが立証できれば、病気になった原因がはっきり究明できたことになるので、検体中の細菌が生菌か死菌かは問題にならない。このため、痕跡としての病原菌のDNAが検出されてもよいし、菌が生きていても死んでいても抗原抗体反応などで、病原菌を特定できてもよい。

食品加工業界で使用される細菌検査用具や機器も医療業界から転用されたものが多いが、検査対象となる製品は問題を起こさないように殺菌工程を経ているので、生きている細菌の検出が主体となる。

最終製品の場合、例えば牛乳などは熱処理などの殺菌工程を経てほとんど無菌状態に近い。検査の作業工程が多い場合は、作業による二次汚染の可能性も高くなる。

b) 検出システム

生菌検出システムは培養型に依存しているケースが多い。例えば、細菌検査の公定法には寒天培地を利用して細菌のコロニー数を計測するといった方法などが採用されている。

培養型以外では、PCR法やDNAプロービングなどのDNA関連技術、抗原抗体反応や酵素反応などを利用した研究開発が盛んに行なわれていて、細菌検査の迅速性が追求されている。

c) 検出の確率

細菌1,000個/ml以上のレベルであればハイテク技術を採用して感度を上げ、短時間内に反応させるということは比較的容易に実現できるが、むしろ問題になるのは、この高感度なシステムを1リッター中に1cfu存在する細菌に作用させることができるかどうかというような確率である。4～5時間で検出できるというDNA関連技術を利用した細菌検査システムが、18時間ほど試料を液体培地により前段培養する必要があったりするのは、このためである。したがって、生菌を迅速に検出するという観点から検査システムを見た場合、検出の確実な培養主体の検査手法に依存するケースが多い。

殺菌済食品における細菌検出の要点

- ・ 生きている菌を検出する。
- ・ 低濃度汚染の対象菌を検出する。
- ・ 検査作業を最小限にし、二次汚染を避ける
- ・ 迅速に検出する。

各検出方法の特徴

細菌検出の方法には、大別して培養型とハイテクノロジー型がある。

全般的に見て、その特徴は表1のようになる。

	培養型	ハイテクノロジー型
生菌	相関あり	あまり相関がとれない傾向
低濃度汚染	1cfu/mlでも可能	試料中に1000cfu/ml程度で検出可能
特異性	低い	高い(ATPは低い)

表1 培養型とハイテクノロジー型の特徴

2. SensiMedia™

SensiMedia™(特許第3225484号)は培養型の細菌検査用具で、滅菌済み試験管の中に培養液とCO₂センサーが封入してある。これに試料を添加して培養すると、試料に生菌が1cfuでも混入していれば増殖してCO₂センサーの色が濃紺色から無色透明になる。用具の特徴として、内蔵されたセンサーは、一定量のCO₂を吸着して色変化反応を開始し、反応が開始したら速やかに(約30分程度)色が切り替わることである(図1)。この検査用具は単体でも細菌検査が実施できる。

CO₂ の発生量と生菌の存在数との相関が高く、センサーは積分型であるため、くり返し精度が良い。また、液体培地を採用しているため、検出対象の菌について、増殖の至適条件にてやさしく培養できるので、生菌による微量汚染の検出や損傷菌と呼ばれる菌についても、この用具により確実に検出できる。

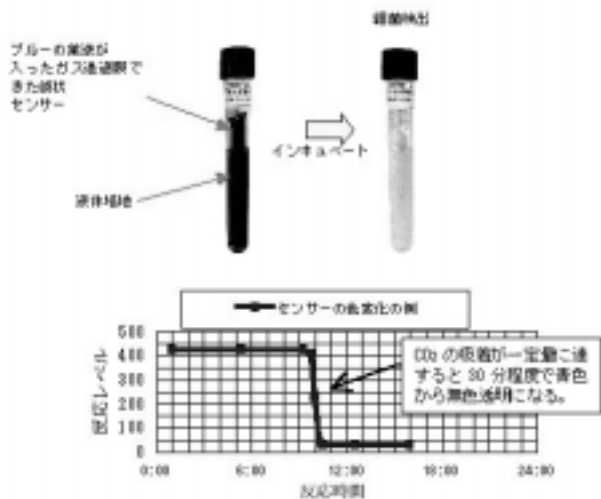


図1 CO₂ センサーの動作

3. SensiMedia™と自動機器

SensiMedia™には試料の添加量に応じて容器のサイズが異なり、基本形としてはSMシリーズとSMLシリーズの2種類があり、それぞれに検査機器が用意されている。各検査機器は、培養機能と反応までの培養時間を計測する機能と検出時の自動電話警報機能を有しているため夜間の自動検査などには有用である。

a) SensiMedia™SMシリーズとBiomatic™20

試料1ml 添加用のSensiMedia™が20本装填できる自動細菌検査機器として、Biomatic™20が用意されている(図2)。



図2 SensiMedia™標準型 SMシリーズ (16ml 試験管採用) と Biomatic20

自動電話警報システムは、メッセージをダイヤル発信する装置まで、機器から無線で信号を送るタイプがよく利用されている(図3)。このシステムは汚染度が高いほど、自動的に早く警報を発信する。



図3 Biomatic™20 と自動電話警報システム

b) SensiMedia™SMLシリーズとBiomatic™VDCS

試料5mlを添加して使用するSensiMedia™(SMLシリーズ)には、この用具が40本装填できる機器としてBiomatic™VDCS (Video Detection Culturing System) L-40が用意されている(図4)。



図4 SensiMedia™大容量 SMLシリーズ (40ml 試験管採用) と Biomatic™VDCS L-40



図5 L-40 インキュベーターモジュール内部

VDCS L-40 は、試料添加量の多い SML シリーズの SensiMedia™ 用として開発された自動細菌検査機器であり、インキュベータ内部は図 5 のようになっている。標準 SensiMedia™ である SM シリーズ用には用具が 60 本装填できる VDCS S-60 が用意されている。各用具を培養しながら試験管内の CO₂ センサーをビデオカメラによりモニターし、コンピュータにより画像処理して菌検出を判定する。検査を開始してから反応するまでの時間を計測でき、自動で電話警報もできる。VDCS L-40 は、ひとつのインキュベータモジュールについて大容量の SensiMedia™ を 40 本収容でき、20 本ごとに 2 温度帯が設定できる。また、最大 4 インキュベータモジュール（検査用具最大装填本数 160 本）をひとつのシステムとして接続できる。VDCS S-60 も 4 インキュベータモジュール（検査用具最大装填本数 240 本）を接続できる。

4. グラフによる把握

積分型センサーを採用している SensiMedia™ は、微分型センサーを持つ検査システムと比べると、くり返し精度が良く、菌の希釈系列による試料のデータなどが、1 回の試験でもグラフで表現できる。

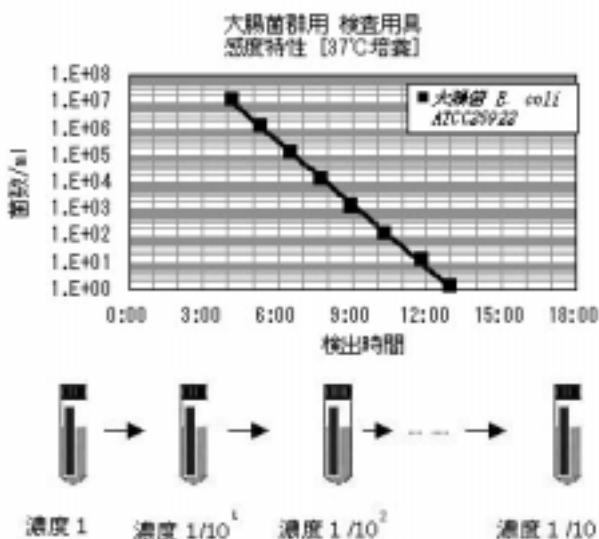


図 6 大腸菌群用培養中の大腸菌の増殖特性

図 6 は、大腸菌の希釈系列による試料 1 ml を 8 本の大腸菌群用 SensiMedia™ に添加してデータを収集したときの結果をグラフで示している。これによると、10 の 0 乗（1～10cfu）の大腸菌による低濃度の汚染は、検出に 13 時間ほど要することが分かる

。このことは、この時間以降は試料中に試験対象と同じ菌は 1cfu も存在しない確率が非常に高いことを意味している。つまり、14 時間以上も培養時間が経過して、センサーが陰性を保持していれば、添加した 1 ml の試料中には大腸菌が存在していなかったと言える。

このグラフ手法を用いて、特性試験（図 7 はその例）、いわゆる温度、pH、塩分濃度、培養液の各成分などを小刻みに変化させて菌の希釈系列を試料とした培養データを収集することを実施すれば、培養の至適条件を見つけることができる。培養条件が良くなれば速くセンサーが反応してグラフの直線の傾きが急になる。増殖を加速できれば、より早く“検出対象菌がない”ことが確認できる。

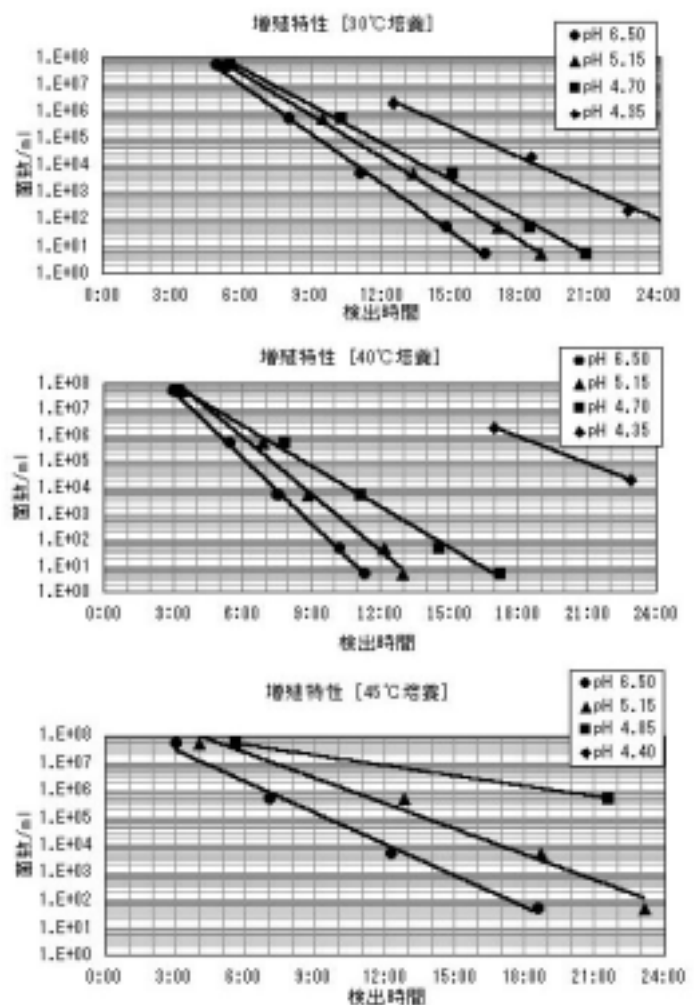


図 7 特性試験例：Alicyclobacillus cycloheptanicus の培養温度 30、40 及び 45 における pH の影響

5. 検査用具の概念

検出対象菌の増殖が一番速い培養条件（温度や組成など）を設定し、更に他の菌の増殖が抑制されるものを組成の一部にしておけば、概念的にはその菌のみが増殖できるような条件が設定できる。このようにすれば、培養開始時間から 1cfu の増殖が検出されるまでは対象菌についての選択フィルターとして動作する（図 8）。一般的にこのような培地は選択培地と呼ばれているが、SensiMedia™ はこの選択性を科学的に極端に良くした培地に CO₂ センサーが封入してあるものと考えてよい。

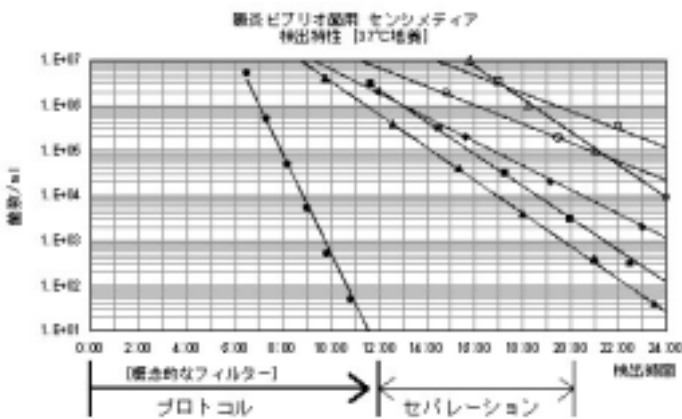


図 8 SensiMedia™ の検査用具としての動作

6. 検査設定のバリエーションと応用例

センシメディア法は CO₂ センサーを採用した用具を使用する細菌検査法のひとつであるが、この方法を利用して寒天培地や培養液あるいは他の検出システムを開発したり、これらの特性を把握したりすることができる。これにより、細菌検出システム全体を各々のシステム長所を取り入れた検査設定をすることが可能となる。

一般的な検出対象菌についての検出設定例は、下記のとおりである。

a) 大腸菌群の検出

汚染の指標として実施されている大腸菌群の検出には、大腸菌群用 SensiMedia™ が利用されている。この用具は、マーガリンやバターなどの油性固形物も容易に溶解できるように培地組成が工夫されている。検出特性は、図 9 のようになる。

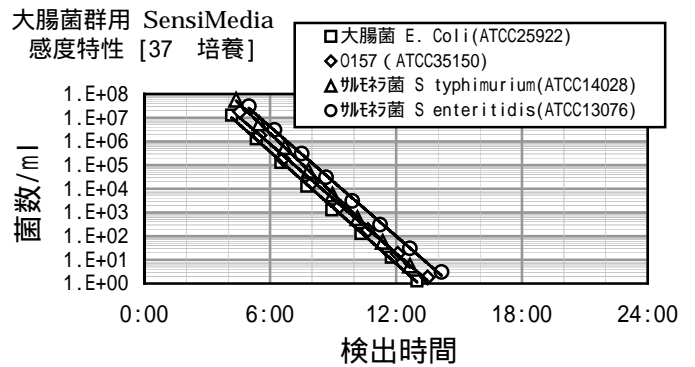


図 9 大腸菌群用 SensiMedia™

1cfu の大腸菌群も存在しないことが 14 時間程度の培養で確認できる。

b) 大腸菌の検出

大腸菌用 SensiMedia™ の検出特性は、図 10 に示す。この検査用具は、48 時間で大腸菌を選択的に検出できるようにしてある。また、MUG (4-メチルumbiliferyl-β-D-グルクロン) が添加してあり、培養液中に大腸菌が存在すれば、紫外線を照射するとプロス全体がライトブルーの蛍光を発する。この MUG 試験によりクレブシエラと分別ができる（図 11）。検出培養温度は 43 とする。

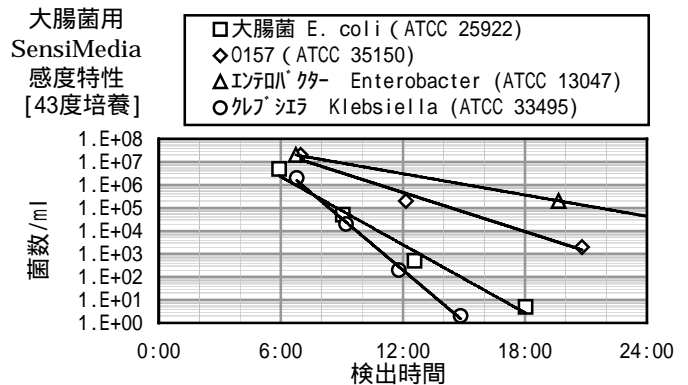


図 10 大腸菌用 SensiMedia™ の検出特性



図 11 大腸菌の MUG 試験

更に，図 12 に示すように，大腸菌であることの確認のため，コバック試薬を添加してインドール試験も実施することができる。

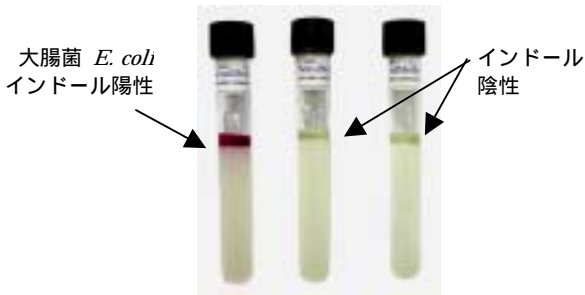


図 12 大腸菌のインドール試験

b) O157 の検出

食肉などにおける O157 用の特性は，図 13 のようになる。

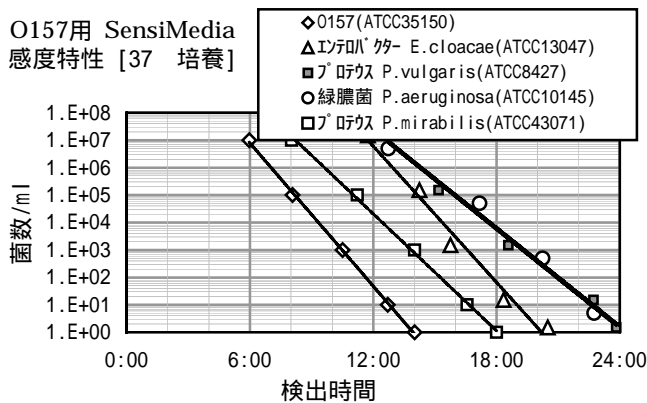
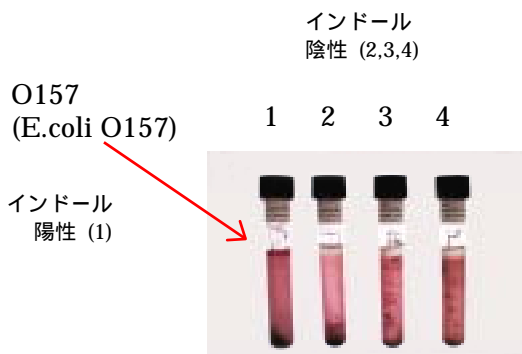


図 13 O157 用 SensiMedia™ の検出特性

1cfu の O157 が存在しないことは 14 時間で確認できるが，14 時間以内に菌が検出された場合は，コバック試薬を添加して大腸菌であることを確認するインドール試験を実施することもできる（図 14）。



No.	菌種	インドール反応
1	<i>E.coli O157</i>	+
2	<i>Enterobacter.spp</i>	-
3	<i>Proteus.spp</i>	d
4	<i>P.aeruginosa</i>	-

図 14 インドール試験

c) サルモネラの検出

このサルモネラ検出用 SensiMedia™ を使用すれば，試料中に 1cfu のサルモネラが存在しないことが 18 時間程度で確認できる。培養液は，図 15 のような特性をもっているが，出来る限りサルモネラを優しく培養しながら，シトロバクターのような性状の近い他菌の増殖をできるかぎり抑制している。

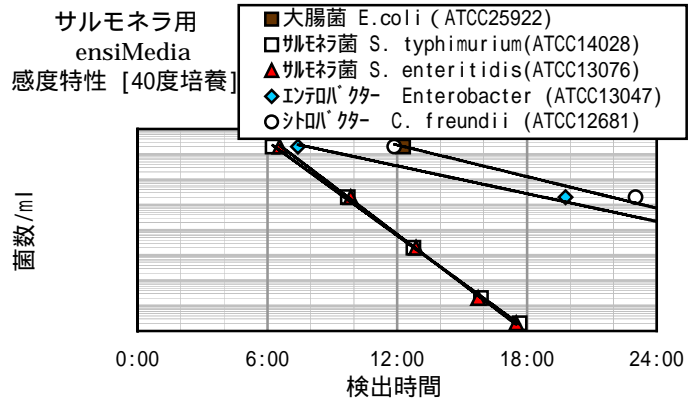


図 15 サルモネラ用 SensiMedia™ の検出特性

このサルモネラ用培養液を採用した寒天培地は，サルモネラが存在すると培地の色が赤くなり，コロニーは硫化水素産生により黒色を呈する（図 16）。大腸菌の増殖はほぼ完全に抑制されているので，ペットフードや家畜飼料用原材料などの汚染度の高い試料でも検査が容易である。

コロニーを観察する場合は，センシメディア法と同様に，プロトコルの概念を導入し，培養開始から 24 時間後という観察時点を設定して検査する。

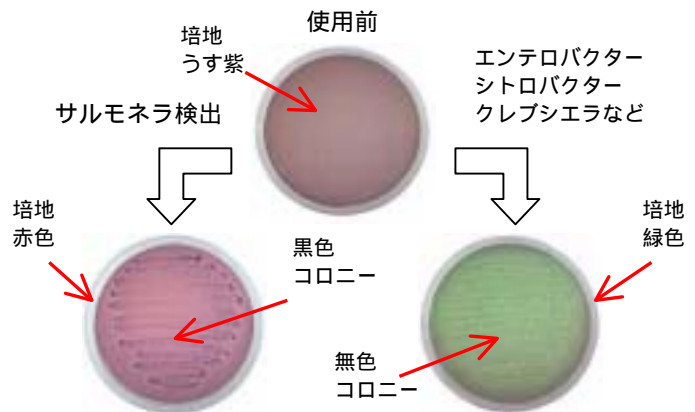


図 16 サルモネラ検出時の状態

d) 黄色ブドウ球菌の検出

この用具では、1cfu の黄色ブドウ球菌が存在しないことが 24 時間で確認できる（図 17）。

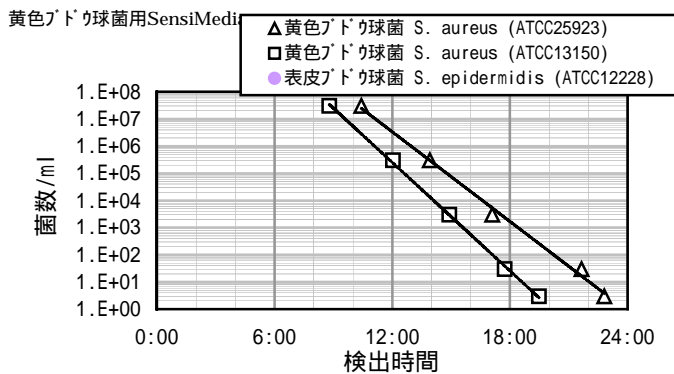


図 17 生理食塩水用 黄色ブドウ球菌検出用具

牛乳や生乳が試料の場合は、試料が培地組成の一部となり、球菌の増殖が促進されて、表皮ブドウ球菌と黄色ブドウ球菌とのセパレーションが十分に確保できなくなるため、牛乳や生乳が試料の場合には、専用用具として特性の異なる SensiMedia™ が用意されている。

e) 酵母の検出

酵母検出用 SensiMedia™ は、ワインの品質管理などに利用されているが、乳酸菌飲料中の酵母検出にも利用されている。乳酸菌を入れて発酵させた乳製品や乳酸菌飲料は、製品に含まれている乳酸菌の菌数が法律により 1ml 当り 100 万あるいは 1,000 万以上含有しているものと定められている。このような乳酸菌飲料に酵母が混入すると品質問題を引き起こす可能性がある。

多量に乳酸菌を含む試料の中から微量の酵母を検出することになるが、検査対象の製品に利用される乳酸菌がホモ型の場合は、増殖過程において CO₂ を発生しないので、酵母用 SensiMedia™ は酵母が発生する CO₂ のみに反応する。また、ホモ型、ヘテロ型のいずれの場合でも酵母用 SensiMedia™ には、クロラムフェニコールを組成の一部に採用しているので、これにより増殖が抑制され、酵母の検出を更に確実にしている。

ヨーグルトや乳酸菌飲料の試料 1ml を SensiMedia™ に添加して 28 で培養すれば、酵母汚染 1cfu のレベルまで 36 時間程度で検出できる（図 18）。

酵母用 SensiMedia 感度特性 [28 培養]

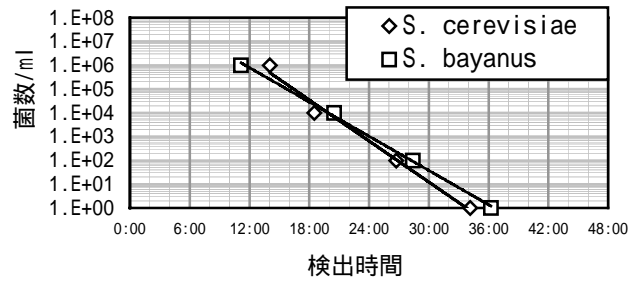


図 18 酵母の検出特性

e) 乳酸菌の検出

乳酸菌用 SensiMedia™ は、マヨネーズやドレッシングなどの試料に用いられるケースが多いがビールや日本酒に存在する火落菌検出にも有用である。また、この培養液の組成をベースにした寒天培地は、乳酸菌飲料やヨーグルトなどにおける菌数の把握にも使用される。

乳酸菌とある種の連鎖球菌との間に共生関係が存在することは周知のとおりであり、ヨーグルトが速くできるが、このことから SensiMedia™ には組成を検討して乳酸菌の増殖を加速し、発育の遅い *L. fructivorans* や *L. brevis* などが迅速に検出できるようにしてある。また、各種抑制剤と pH5.0 により大腸菌やブドウ球菌及びバシルス菌を強く抑制している。

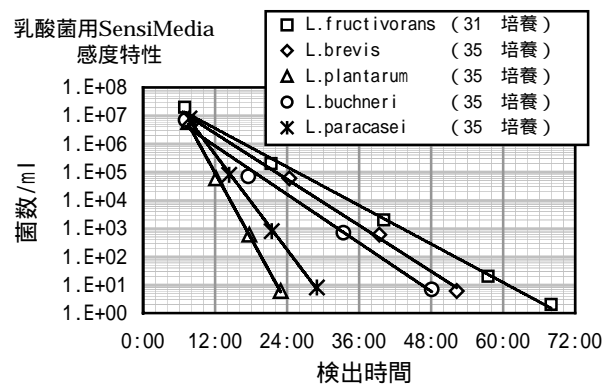


図 19 乳酸菌用

L. fructivorans は、31 で培養したとき、1cfu が存在しないことが 68 時間程度で確認できる（図 19）。SML タイプを使用すれば、フィルター法が採用できるので、簡便に確立の高い検出が実施できる。

f) 火落菌の検出

アルコールに強い乳酸菌である火落菌用の液体培地は、乳酸菌用 SensiMedia™ の組成に 8% 濃度のエタノールを添加したものである。また、寒天培地は、この液体培地に寒天を追加したもので、火落菌の数を把握できるようにしてある。更に、試料のアルコール濃度により 8% にアルコール濃度をユーザーが検査時にセットできるように、添加量が加減できる SensiMedia™ も用意されている。培地濃度が濃く設定されていて試料の添加量が多くとれるので、検出の確立が高くなる。



図 20 火落菌用液体培地，寒天培地

図 20 は、フィルター法を実施したもので、乳酸菌の沈殿が発生するので判定が容易である。1cfu が存在しないことの確認時間（プロトコル）は、アルコール濃度によって異なるが 3 日程度となる。

g) *Alicyclobacillus acidoterrestris* の検出

酸性に強い芽胞菌である *Alicyclobacillus* 属は、果汁を変敗させるので 1990 年代に入り問題となっていたが、増殖の至適温度帯が 50 や 60 など寒天培地での培養がむずかしく、菌自体の研究が困難なため、検査体系の確立が遅れていた。センシメディア法では、液体培地を採用しているため、*Alicyclobacillus* 用 SensiMedia™ を比較的容易に開発できている。

オレンジ果汁入りの飲料では、至適温度帯が 60 の *Alicyclobacillus acidocaldarius* はオレンジに含まれる物質により増殖が抑制されるので、オレンジジュース中で増殖が可能であり変敗の原因となる *Alicyclobacillus acidoterrestris* が検出できればよい（図 21）。

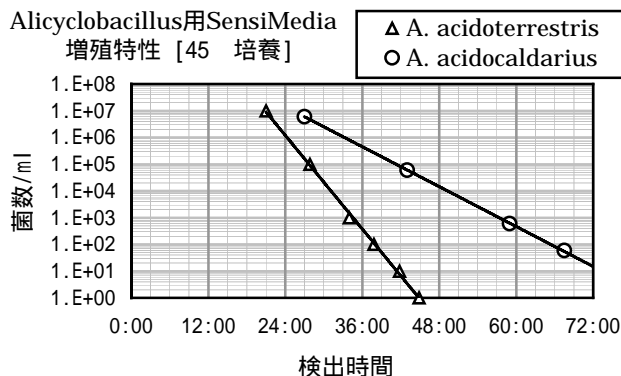


図 21 *Alicyclobacillus acidoterrestris* 用

48 時間でセンサーが反応しなければ、1cfu が存在しないことになる。この時間内で、*A. acidocaldarius* によりセンサーが反応した場合には、菌量が多過ぎるので、それは別の観点から問題となる。

センサーが反応した場合、添付の酸化還元反応試薬を指示量添加し、30 分から 1 時間加温すれば、プロスの色により検出対象の *A. acidoterrestris* が検出されているかどうか判定できる（図 22）。



図 22 *A. acidoterrestris* と類似菌の鑑別

h) 腸内細菌の検出

牛乳専用の SensiMedia™ として腸内細菌検出用がある。試料は 2.2ml 添加するように設定されていて、液体培地の色により大腸菌群とその他の腸内細菌との識別ができる。

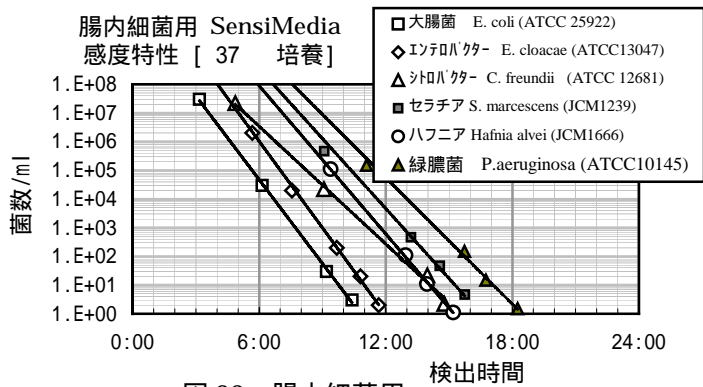


図 23 腸内細菌用

大腸菌群 1cfu が存在しないことは、12 時間程度で確認できる (図 23)。

i) 無菌検査

牛乳や豆乳のような栄養価の高い飲料は、飲料自体が培養液と同様の効果を持っている。理想としての細菌検出は、その製品自体に増殖する問題菌を迅速に検出することなので、製品そのものを培養してその菌の存在を検出すればよいことになる。例えば、ある工場で 5 種類の飲料を製造しているとして、これらについて A 菌の検出を実施したいとする。これらの製品のうち製品 4 と 5 が乳酸菌飲料であるため、pH が低く、酵母以外は、増殖しないことが確認されている。

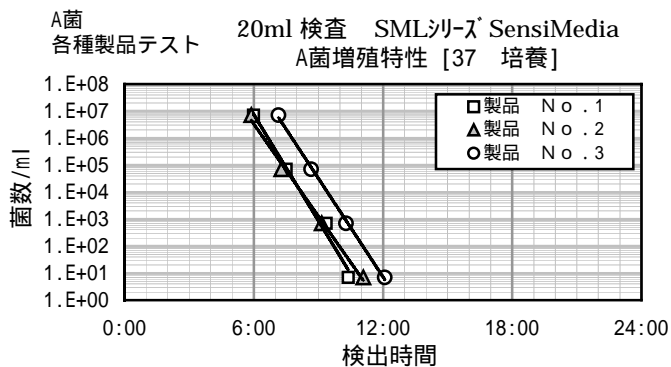


図 24 A 菌の無菌検査

製品 (1,2,3) 中における細菌 A の増殖特性は図 24 のとおりなので、大容量 SensiMedia™ のプランク用具に 20ml の製品をそれぞれ添加して Biomatic™ VDCS L-40 にセットし、37 で培養すれば、A 菌 1cfu が存在しないことは 14 時間で確認できる。

おわりに

食品業界においては、消費サイクルが加速してきて、細菌検査も速ければ速いほど良いとされているが、業務全体から見て合理的に十分な時間をかけた検査が必要であり、また、確率を考慮した確実な検査が実施できるような設定をする必要がある。

生菌検出システムについては、何をもって検出対象菌がないことが明確なのかが重要なポイントとなり、食品中における生菌による低濃度汚染の検出は、“いかに速く菌を検出する”かが問題ではなく、“問題になる菌がない”ことを必要十分な時間をかけて確認することが、より大切であると言える。

小川廣幸：確実な生菌検出 SensiMedia 法とその応用，食品工業，Vol.46, No.16，48～56（2003）

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）
- 4) 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）
- 5) 小川廣幸：ビデオモニター型細菌検出装置 Biomatic™ VDCS（Video Detection Culturing System），ジャパンフードサイエンス，Vol.42, No.4，69～75（2003）

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