

これからの微生物検出について (簡易,迅速測定法を中心に)

大分事業所 医薬分析グループ 西島 裕人 / 増山 博幸

1 はじめに

医薬品、食品及び環境などさまざまな分野の製品や製造工程の管理（例えばGMP, HACCP）において、微生物試験及び検出された微生物の同定を行うことは衛生管理、汚染原因の究明及びバイオハザード等の面から重要である。現在、それらの微生物試験の公定法では、培養法が基本となっている。本法は培養を伴うため、培地調製や滅菌処理等の操作が煩雑なだけでなく、結果が得られるまで2日から10日程度を必要とする。また、対象は病原菌であることが多く、発見されても対応が遅れてしまう恐れがあるため、簡便かつ迅速な試験法の開発が求められている。

近年、Polymerase Chain Reaction（以下、PCR法という）に代表される遺伝子検出法や免疫学的手法を利用した技術の発展により、微生物（特に病原菌）を特異的に検出することを目的として、多くの簡易、迅速測定法が開発、キット化されている。本稿では、昨年から業務展開している遺伝子解析による微生物同定法と注目すべき微生物の迅速測定法について紹介する。

2 遺伝子解析による微生物の迅速同定

従来、検出された微生物の分類・同定は微生物固有の形態観察やオキシダーゼ、カタラーゼテスト等の代謝機能に着目した表現形質法が中心であった。しかし、表現形質法による微生物同定試験では

作業が煩雑で熟練した操作が必要である。

結果報告まで1箇月以上を要する。
判定の結果が客観性にかける。
微生物種により手法が異なる。
同定不可となるケースがある。
などの問題点が指摘されていた。

近年、分子生物学、遺伝子解析機器及びデータベースのめざましい発展により、遺伝子解析による微生物同定法

が注目を浴びている。本同定法による利点として

- 作業が簡便である。
- 作業が迅速（結果取得まで2日間程度）である。
- 客観性のある手法である。
- 共通の手法で試験が行える。
- 再現性の高い手法である。



微生物のコロニーからDNAを抽出
対象とする微生物のコロニーを無菌的にDNA抽出試薬に添加し、懸濁後、加熱処理してDNAの抽出を行う。



rDNAの特定領域をPCRにより増幅及び蛍光標識シーケンス反応
抽出したDNAについて遺伝子増幅装置を用いてPCRを行い、rDNAの特定領域（細菌は16SrDNA、真菌は28SrDNA D2領域）を増幅する（図2参照）。PCR終了後、DNA（PCR産物）の精製を行う。アガロースゲル電気泳動で目的領域のDNAが増幅されたことを確認した後、精製したPCR産物について同装置を用いて、蛍光標識シーケンス反応を行う（図3参照）。シーケンス反応後、反応物の精製を行う。



DNAシーケンサーによるDNA配列の解析
DNAシーケンサーを用いて、精製したシーケンス反応物のキャピラリー電気泳動を行い、目的領域のDNA配列の自動解析を行う。



データベース照合、微生物同定
自動解析されたDNA配列のデータについて市販されているソフトを用いて確認した後、市販及び公共のデータベースと照合し、正確で迅速な微生物の近縁種の推定（同定）を行う。

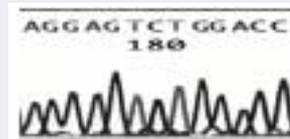


図1 遺伝子解析による同定フロー

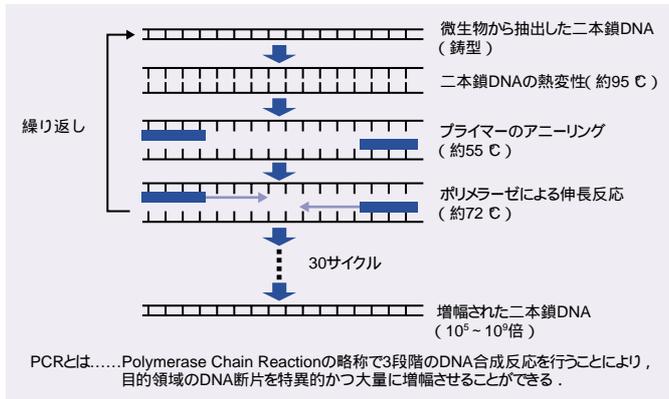


図2 PCR法の原理

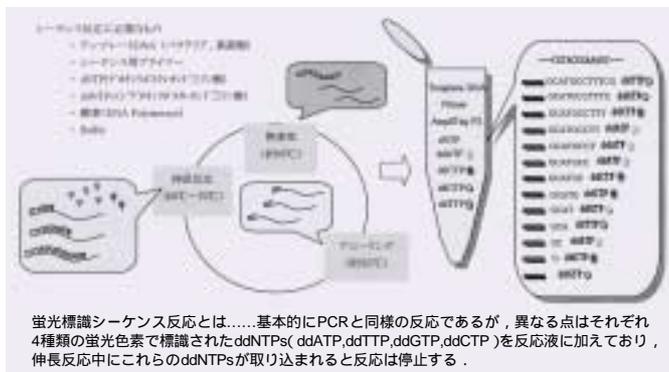


図3 蛍光標識シーケンス反応の原理

などが挙げられる。更に微生物の同定が迅速に行われた際に、以下の知見、対応策等のメリットが速やかに得られる。

微生物が検出された際に汚染源，病原性の知見が得られる。

二次汚染防止，殺菌処理法等の対応策が得られ，その対策の効力が評価できる。

製造工程の監視，品質チェックができる。

～ により，消費者に対して安全性の情報を提供でき，信頼関係が築ける。

以上のことから，微生物同定は迅速かつ正確な情報提供が求められている。このため，我々の施設でも遺伝子解析による微生物同定法を実施し，顧客の要望に十分応えられる解析体制を構築している。また，本同定法は，平成16年末に告示された日本薬局方第二追補の参考情報として収載され，確立された手法であると言える。このよ

うな背景から，今後，本同定法が主流となることが考えられる。

遺伝子解析による微生物同定法は，ターゲットとする遺伝子は微生物の進化の歴史が記憶されており，微生物種に固有の遺伝子領域をもつリボソームDNA (rDNA) である。この領域(細菌は16SrDNA，真菌は28SrDNA D2領域)はデータ量が非常に豊富であり，系統発生的に微生物を分類することにおいて有効

である。図1に本同定法を用いた試験過程を，図2にPCR反応の原理を，図3にシーケンス反応の原理をそれぞれ示す。

3 病原菌の簡易，迅速測定法の現状について

医薬品製剤及び食品等中の病原菌を検出するために一般的に行われている検査は，増菌培養，選択分離培養，鑑別培養と目的菌の分離のために何度も培養を繰り返した後，疑わしいコロニーについて生化学性状試験，血清型別試験，毒素産生性試験等を行なう^{1), 2)}。このため，判定結果が得られるまでに多大な労力と1週間程度の時間を必要としている。現在，病原菌の検出でキット化されている迅速測定法は，主に酵素免疫測定法(ELISA法)やイムノクロマト法などの免疫

学的検出法とPCR法などの遺伝子検出法に大別される。以下に主要な測定法について述べる^{3), 4), 5), 6)}。また，図4に従来法である培養法と迅速測定法の試験過程を示し，表1にそれぞれの測定法の対象となる病原菌，検出感度，分析時間をまとめたものを示す。

3.1 免疫学的検出法

3.1.1 ラテックス凝集法

抗体をラテックス粒子に結合させ，凝集反応により菌の存在を判別する方法で，病原菌の血清型や分離菌株の毒素を証明する方法として開発された。ラテックス試薬をスライド凝集板に塗布し，菌体と混ぜるのみで陽性(凝集塊有り)，陰性(凝集塊無し)の判定ができる。本法は操作が簡便で反応時間は短く，判定が容易であるが，食品や医薬品製剤等からの病原菌を証明する方法としては検出感度などに問題がある。一般的に増菌培養後，選択分離培地上の疑わしい集落について用いるため，培養法との併用となる。

3.1.2 酵素免疫測定法(ELISA法)

臨床診断の分野ではもっとも幅広く用いられており，抗原抗体反応と酵素基質反応が組み合わされた手法である。具体的には，特異抗体をマイクロタイ

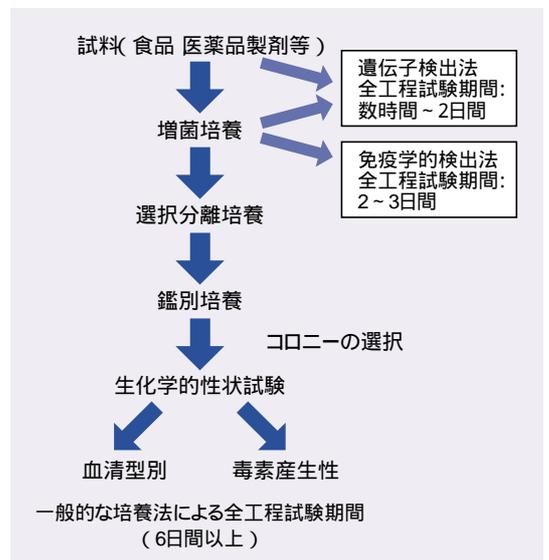


図4 病原菌検査の過程(培養法と迅速測定法の比較)

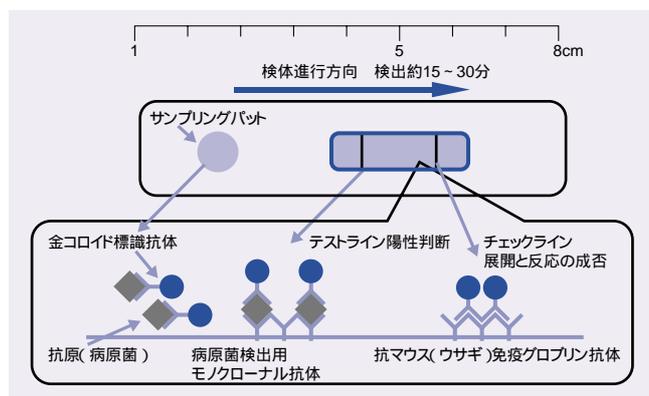


図5 イムノクロマト法の原理

タープレートあるいはチューブに固着化し、試料を添加する。特異抗原（病原菌）が存在すると抗体と結合する。これに酵素標識抗体と基質を加えると、発色反応により呈色する。検出感度は1 mL当たり $10^3 \sim 10^5$ 個であるので、食品や医薬品製剤等から直接病原菌を検出することは困難である。このため、培養法との併用が必要となる。

3.1.3 イムノクロマト法

ELISA法を応用した方法で、その原理（一例）を図5に示す。

試料を試料導入部に滴下し、抗体が特異抗原（病原菌）と結合し抗原抗体複合体を形成する。その複合体が展開部を毛細管現象により移動し、抗体を線上に塗布させた部分（テストライン）で集中的に捕捉させることで色付きの線が現れ、陽性と判定する。また、余剰の金コロイド標識抗体が展開部をさらに移動し、チェックラインに固定化された抗マウス（ウサギ）免疫グロブリン抗体に結合し、金コロイドの色付きの線が生じる。この線により、正常に反応が進行していることを確認する。測定時間は15分～30分ほどで非常に簡易、迅速であるが、検出感度は1 mL当たり 10^5 個程度であり、培養及び濃縮等の前処理との併用が必要となる。

3.1.4 磁気ビーズ法

大腸菌O-157の検査で増菌培養を

短縮化する方法として注目を集めた。抗体を結合させた磁気ビーズに試料を混合し、反応させた後、特異抗原（病原菌）が結合した磁気ビーズを磁気で集めることにより、目的病原菌を効率よく分離・濃縮できる手法であ

る。この利点から、本法とELISA法を組み合わせると、効率よく病原菌を検出する手法も開発されている。

3.2 遺伝子検出法

3.2.1 DNAプローブ法

目的病原菌の特異的な遺伝子をターゲットとして結合するオリゴヌクレオチドプローブを用いて検出する方法である。プローブは酵素、蛍光標識団などで標識されており、目的病原菌を蛍光、発光などにより検出する。プローブの配列を目的に合わせて選択することにより、多種多様な病原菌の検出が可能となる。ただし、試料中の病原菌は微量であるため、検出の前段階として増菌培養が必要である。

3.2.2 PCR法

目的病原菌の特異的な遺伝子をター

ゲットとして図2のようにPCRにより増幅させ、増幅したDNAを濁度または蛍光で検出する方法である。プライマーの配列を目的病原菌に特異的な配列で設計し、PCRを行うことにより、多種多様な病原菌の特異的な検出が簡易、迅速に可能である。理論的には1個の菌から検出可能であるが、試料中には核酸分解酵素（DNase）などのPCR反応阻害剤を含む場合があり、すべての試料において本法が利用できるとは限らない。本法は検出感度上昇、生菌と死菌の区別及びPCR反応阻害剤を希釈する目的により、増菌培養を行ってから検出する場合が多い。

4 今後、注目すべき微生物の簡易、迅速測定法について

3では目的病原菌に絞って、定性的に検出する簡易、迅速測定法について紹介した。それらの手法の多くは増菌培養を必要とした。ここでは、培養を伴わないで試料中に含まれる病原微生物をより簡易、迅速に測定する2つの手法について紹介する。

4.1 DNAマイクロアレイ（DNAチップ）法⁷⁾

DNAマイクロアレイとは検査対象菌の特異的領域（50塩基程度）について合成したプローブを、ガラス版上に

表1 病原菌検出における迅速測定法の一覧

	測定法	対象病原菌	検出感度(個)	操作時間 (培養時間込み)
免疫学的手法	ラテックス凝集法	大腸菌O-157, 黄色ブドウ球菌, サルモネラ, カンピロバクター, リステリア 他		培養法との併用 (2~3日間)
	ELISA法	大腸菌O-157, 黄色ブドウ球菌, サルモネラ, カンピロバクター, リステリア 他	$10^3 \sim 10^5$ 個/mL	1~2時間 (2~3日間)
	イムノクロマト法	大腸菌O-157, 黄色ブドウ球菌, サルモネラ, カンピロバクター, リステリア, レジオネラ	10^5 個/mL 程度	15分~30分 (2~3日間)
	免疫磁気ビーズ法	大腸菌O-157, サルモネラ		ELISA法などと 併用(2~3日間)
遺伝子検出法	DNAプローブ法	大腸菌O-157, 黄色ブドウ球菌, サルモネラ, カンピロバクター, リステリア, エルシニア	1個/25g	数時間 (2~3日間)
	PCR法	大腸菌O-157, サルモネラ, カンピロバクター, リステリア, ボツリヌス 他	1個~	2時間程度 (2~3日間)

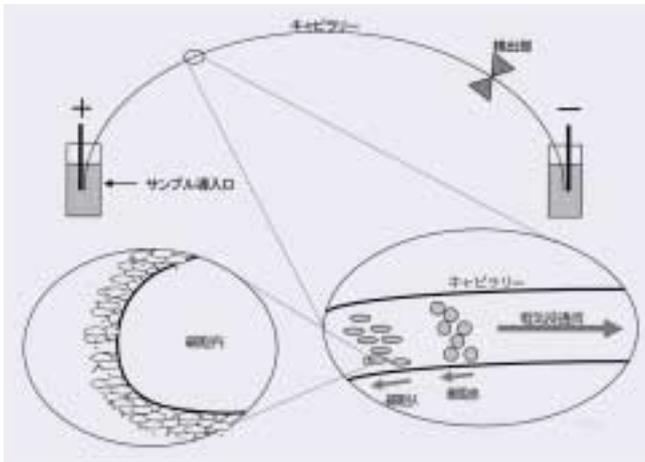


図6 キャピラリー電気泳動法による微生物分離の原則

高密度にスポットしたものである。1平方センチメートル当たり数千個の異なるプローブを固定でき、本技術は人の遺伝子疾患の解析に用いられている。今後、医薬品製剤、食品及び環境試料中の多種多様な微生物の中から病原微生物を網羅的に解析することが可能であると思われる。その原理は、試料のDNAを抽出し、蛍光標識を行った後、DNAマイクロアレイに導入する。プロットしたプローブとDNA配列が一致したものが結合し、ガラス板上に固定化される。その後、未結合のDNAを洗浄し、用いた蛍光標識団の励起波長を照射すると試料のDNAが結合したプローブのみ蛍光を発する。この蛍光パターンをコンピュータにより解析することにより、簡易、迅速に病原菌の検出、同定が可能となり、網羅的な解析が行える。検出感度を上げるためにPCR法との併用も行われている。

4.2 キャピラリー電気泳動(CE)装置を用いた迅速測定法^{8),9)}

本技術は微生物の細胞表面の多くが負に荷電していることを利用して、CE装置を用いて目的病原菌を特異的に検出するものである。簡易、迅速であり、定量性を有するという利点がある。その原理は、電圧が印可されたキャピラリー内の細胞はプラス電極方向へ泳動しようとする。同時に、内壁を処理

していない汎用の溶解シリカキャピラリーチューブ内では、細胞の泳動速度を上回る電気浸透流がマイナス電極方向へ発生しているため、細胞はマイナス電極方向へ押し流される。こうした泳動条件下の細胞の泳動速度は細胞の表面の荷電状態により異なるた

め、適切な泳動条件下においては異種細胞が異なる泳動速度を提示し、微生物細胞同士はお互いに分離が可能になる。その原理を図6に示す。また、少ない細胞数を確実に測定する必要がある場合には、微生物細胞を何らかの方法で蛍光標識した後にレーザーなどの励起による蛍光検出法を用いる。サルモネラの検出例から、操作時間は細胞の標識後、30分以内でサルモネラ菌のみ選択的に、かつ数個レベルの細胞数で定量が可能であり、1細胞の検出から可能と思われる。しかし、通常分離法ではキャピラリーの片端に数十nL程度の試料しか注入しないため、たとえ1細胞レベルの検出が可能な光学系を準備しても得られる最大濃度感度はせいぜい 1×10^5 細胞/mL程度である。少数微生物の検査に十分な感度を得るためには、CE注入前での試料溶液の濃縮(遠心法やメンブレンフィルター法)が必要である。

5 おわりに

最近、高品質で多様化しつつある医薬品及び食品などの製品、そしてそれを作り出す各製造工程、更には環境(例えば、住宅や公共施設など)や環境からの試料などの品質チェックやトラブル対策などに微生物試験の範囲は拡大してきており、かつ、試験結果のスピード化が強く求められてきています。

また、微生物試験なしでバイオハザードのリスク管理は考えられません。

我々はこうした社会や顧客ニーズに応えるため、本試験における簡易、迅速化が安全・安心確保に非常に重要であると認識しており、今後とも積極的に微生物試験技術の開発や実用化を目指して参ります。

文献

- 1) 日本薬局方解説編集委員会編；“第十四改正日本薬局方 解説書”，廣川書店(2001)
- 2) 厚生労働省監修；“食品衛生検査指針 微生物編”，日本食品衛生協会(2004)
- 3) 伊藤 武 監修；“食品微生物の簡便迅速測定法はここまで変わった！”，サイエンスフォーラム(2002)
- 4) CMPジャパン編集部；“食品と開発”，CMPジャパン，VoL.37，No.1，p.16～24(2002)
- 5) 村瀬 稔；“ジャパンフードサイエンス”，日本食品出版，VoL.42，No.4，p.27～p.33(2003)
- 6) 小林一寛；“ジャパンフードサイエンス”，日本食品出版，VoL.42，No.4，p.34～p.41(2003)
- 7) 山田 博子，江崎 孝行；“食品と開発”，CMPジャパン，VoL.37，No.1，p.6～p.8(2002)
- 8) 鳥村 政基；“食品工業”，光琳，VoL.47，No.8，p.20～24(2004)
- 9) 鳥村 政基；“月刊フードケミカル”，食品化学新聞社，2月号，p.45～48(2005)



西島 裕人
(にしじま ひろと)
大分事業所
医薬分析グループ



増山 博幸
(ますやま ひろゆき)
大分事業所
医薬分析グループ