



蛍光染色法の原理と応用

松下エコシステムズ株式会社 バイオセンシング事業プロジェクト 田代義和

1. はじめに

蛍光染色法は、微生物や動植物の細胞を蛍光染色試薬で染色し、蛍光顕微鏡を用いて観察、計数を行う方法である。細菌内の DNA や RNA の核酸と特異的に結合する acridine orange (AO) や 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI) などの蛍光染色試薬を用いて蛍光染色し、Nuclepore filter でろ過した後、フィルター上の微生物を蛍光顕微鏡下で直接計数する全菌数直接計数法¹⁾あるいは直接落射蛍光フィルター法²⁾と呼ばれる方法が、最近急速に普及しつつある。河川、海水や土壌のような環境中に存在する細菌の中には、生存しているものの培養困難な状態のもの (viable but nonculturable; VBNC) が少なからず存在することが明らかになっており、従来の培養法では測定することが困難なこのようなVBNCも培養することなくシングルセルレベルで測定することができる。特に海水中の細菌を測定する方法としては、AO や DAPI を用いた全菌数直接計数法が標準的に用いられている。また、食品の分野でも生乳中の細菌数測定に AO を用いた蛍光染色法が用いられている。

蛍光染色試薬³⁾には、核酸と特異的に反応する染色試薬の中で、細胞膜を透過する特性を有するため、生死菌 (生菌および死菌) を染色する上記 AO や DAPI などの他に、生細胞の細胞膜を透過できず、死細胞のみ浸透して染色する propidium iodide (PI) や ethidium bromide (EB) などがある。生死菌と死菌を染色する試薬を細菌に二重染色し、細胞膜の透過性を指標とすることで、生菌と死菌の区別をすることが可能である。また、生菌だけが有しているエステラーゼと反応する 6-carboxylfluorescein diacetate (6CFDA) を用いて、エステラーゼ活性を指標とした生菌数を測定するものや蛍光グルコース⁴⁾を用いて蛍光基質を取り込むことで、生菌を蛍光染色する試薬がある。その他細菌の呼吸活性に伴う電子伝達系の作用を利用して、5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC) を用いて、呼吸活性を有する細菌のみを測定する試薬もある。

その他、大腸菌群および大腸菌がそれぞれ有している β -galactosidase や β -glucuronidase の酵素と特異的に反応する発光基質を用いる方法や特定の細菌に特異的な遺伝子プローブを用いた FISH 法 (fluorescent in situ hybridization) との組合せで特定の細菌に対して蛍光ラベルを行い、フローサイトメトリーや蛍光顕微鏡で検出する方法が最近盛んに研究されている。

2. 蛍光染色法を応用した「バイオプローラ」⁵⁾

バイオプローラ (図1) は、上記蛍光染色法とメンブレンフィルター法との組合せを測定原理として、従来蛍光顕微鏡を用いて目視で細菌をカウントしていたのに対し、蛍光発光した点を画像処理で細菌と認識して自動的にカウントする装置である。バイオプローラに用いている蛍光染色法の原理を図2に示す。核酸と結合する蛍光染色試薬 α 、 β を用いており、細胞膜の透過性の違いで生/死菌 (生菌および死菌の両方) と死菌を判別し、生/死菌数から死菌数を差し引いて、生菌数を算出する。

代表的な菌である黄色ブドウ球菌 (NBRC12732)、大腸菌 (NBRC3301)、サルモネラ (NBRC3315) に関するバイオプローラと標準寒天培地での培養法による比較検証の結果を図3~5に示す。また、食材への適用例として、野菜 (レタス) と食肉 (牛肉) について、バイオ

フローラと培養法による検証実験の結果を図6～7に示す。いずれも非常に高い相関性を示すデータを得ている。なお、バイオフィローラの仕様の詳細、技術資料は下記の弊社のホームページに記載しており、参考にして頂きたい。

(<http://panasonic.biz/bioplorer/>)

3. バイオフィローラの活用方法

①前処理技術の開発

バイオフィローラで細菌の測定を行う場合、メンブレンフィルターを用いているため、ろ過が必要である。また、検体中に蛍光物質が含まれており、それが菌と同様の発光画像になる場合には、誤カウントする可能性がある。したがって、このような検体に対しては、ろ過を阻害している成分の除去や、予め蛍光物質を除去するなどの前処理が必要である。当社では、このような検体に対して前処理技術を開発しており、その一例を示す。

化粧品の乳液やクリームなどは、このままではろ過が困難であるが、当社が開発した前処理試薬と混合して遠心分離を行うことで化粧品の成分が分離し、その成分を除去することでろ過が可能になる場合がある。

また、水産関連の魚介類に関しては、ろ過が難しく、またその成分が蛍光物質の場合もある。このような検体に対しては酵素を利用することで、蛍光物質も分解されて測定できる場合がある。

いずれの方法も検体の種類や成分などによって、適用できないものもあるので、事前に十分な検証が必要であるとともに、検体に最も適した前処理技術の開発が今後とも必要である。

②培養法との相関性

蛍光染色法での細菌計測はVBNCも測定するため、通常の培養法との結果とは一致しない場合がある。特に食品関連の検体では、標準寒天培地を用いて $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ で 24～48 時間培養するのが一般的であるが、このような場合、嫌気性細菌、好塩細菌や低温細菌は除外されるため過小評価される場合がある。例えば、魚介類やその冷蔵品の場合、培養温度を 20°C の低温にしたり、培地に食塩を添加することで、通常の培養条件と比較して数倍から数桁以上高い菌数を得ることがあると報告⁶⁾されている。また、通常の培養方法では検出しにくいある種の乳酸菌などが商品の変質、変敗の要因⁷⁾になることもある。

したがって、通常の培養条件での値との相関性だけでなく、上記の視点も考慮して品質管理、工程管理などにバイオフィローラの活用を図ることが重要である。

③培養法との組合せ

従来、培養法の結果で品質管理などを行っているために、培養法との一致や相関性を要求されることが多い。このような要望に対して、当社ではバイオフィローラの高い検出能力と培養法とを組合わせた方法も開発しており、お客様にご提案している。

ひとつは、メンブレンフィルターに検体をろ過した後、短時間培養することで形成した微小コロニーを計測する方法である。ふたつめは、検体を液体培地と混合したものを培養して増殖する菌の有無を確認する方法である。いずれの方法も通常の培養法と比較して短時間で結果を判断することができ、また、従来の方法と培地や培養条件を同じにすることで高い相関性を得ることができると考えている。

4. おわりに

蛍光染色法は、迅速に細菌を検出する方法としては最適な手法であるが、培養法とは検出原理が異なるために、培養法との結果と絶対値が異なったり、相関性が得にくい場合がある。しかしながら、培養法では菌が検出されなくても、実際の商品では問題が生じることもある。迅速性は、安全性の確保や在庫削減などの経営的なメリットがあるため、微生物検査の目的に適した蛍光染色法の活用方法を期待するとともに、今後応用展開を図っていく所存である。

参考文献

- 1) R.L.Kepner, JR., J.R.Pratt, Microbiological Reviews, 58(4), 603-615(1994)
- 2) 春田三佐夫ら編集: 食品微生物検査の簡易化、自動化、迅速化、p.51-57, サイエンスフォーラム(1985)
- 3) 那須正夫: 防菌防黴, 23(4), 151-156(1995)
- 4) K.Yoshioka, H.takahashi, T.Homma, M.Saito, B.Oh, Y.Nemoto, H.Matsuoka, Biochim Biophys Acta, 1289(1), 5-9(1996)
- 5) 田代義和、島北寛仁: ジャパンフードサイエンス, 41(12), 92-97(2002)
- 6) 藤井建夫: 食品と開発, 37(5), 7-11(2002)
- 7) 内藤茂三: 防菌防黴, 27(3), 171-181(1999)





図1 バイオフローラ外観

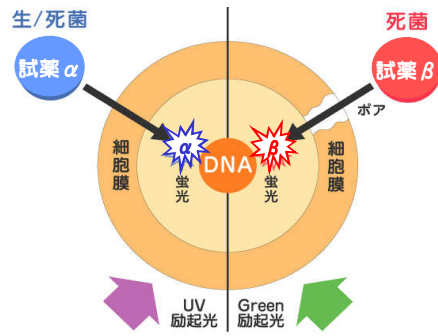


図2 蛍光染色法による発光原理

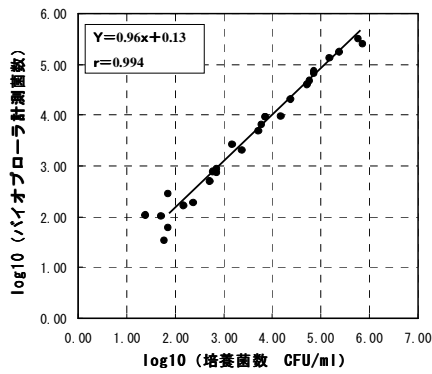


図3 黄色ブドウ球菌の相関関係

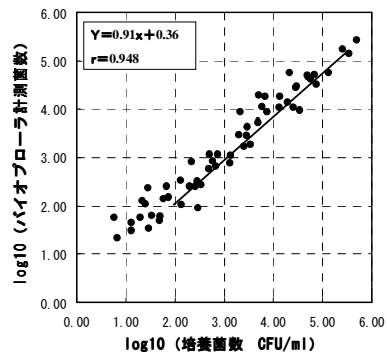


図4 大腸菌の相関関係

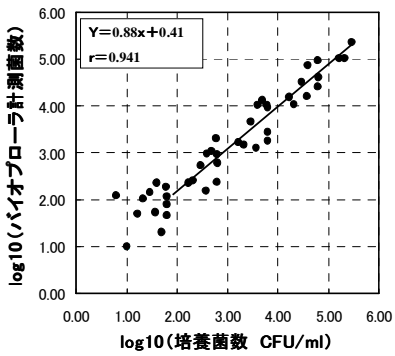


図5 サルモネラの相関関係

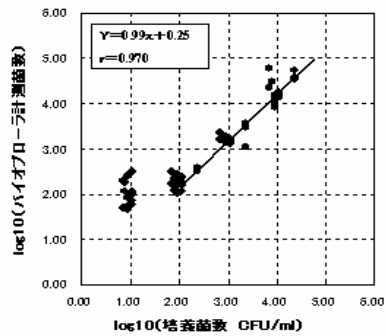


図6 レタスの相関関係

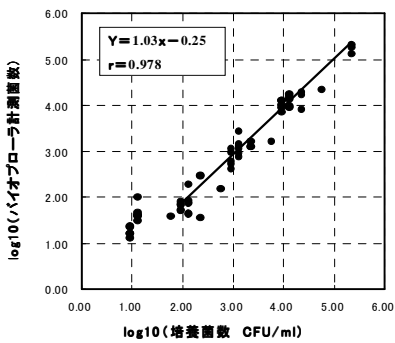


図7 牛肉の相関関係