

食品中に含まれる耐熱性芽胞の簡易迅速検出

矢野未右紀・林 耕介*

微生物菌数の測定は、食品製造業において品質管理の最重要項目の一つである。しかし、従来法では結果が判明するまでに通常数日間を要するため、より迅速な検出法の開発が強く要望されている。

最近では、ホットペンダーなどでの飲料の販売が広がるにつれてフラットサワー菌による変敗の問題が生じている。このフラットサワー菌には、*Bacillus* 属の好熱性菌である *Bacillus stearothermophilus* が含まれる。*Bacillus stearothermophilus* は、50~60°Cで生育する高温性細菌であり、したがって、高温に強く通常の加熱条件では殺菌しづらいのが特徴である。また、生育条件が合わなくなると堅い殻におおわれた芽胞となり、環境が好転するまで休眠状態を保っている。芽胞は耐熱性をはじめ高度の耐久性、休眠性などを有することが知られている¹⁾。飲料などの缶詰製品が変敗する理由としては、製造時にフラットサワー菌が製品に混入し、芽胞のかたちでとどまり、ホットペンダーでの加温を引き金に発芽して栄養細胞となり増殖分裂活動を再開することにより変敗を引き起こすものと考えられる²⁾。

そこで、本研究では、缶詰製品の変敗の主原因となる混入した耐熱性芽胞を迅速に検出する方法として、耐熱性芽胞抗体の利用を検討した。

実験方法

1. 使用菌株

耐熱性芽胞菌は、*Bacillus stearothermophilus* IFO 12550 (以下 *B. stearothermophilus* とする。)を用いた。また、参考菌株として、同じく芽胞を形成する *Bacillus* 属の常温菌である *Bacillus subtilis* IFO3009 (以下 *B. subtilis* とする。)を使用した。

2. 培養条件

通常の培養を行うときは、富栄養培地である LB 培地

(0.5%酵母エキス、1%ポリペプトン、0.5%塩化ナトリウム、pH7.2)に炭素源としてグルコースを0.1%加えたものを使用した。

芽胞菌に芽胞をつくらせる目的で培養するときは、炭素源としては特に何も加えない細菌胞子形成用培地(0.5%ポリペプトン、0.3%肉エキス、0.0005%硫酸マンガン(1水和物)、pH7.5)を使用した³⁾。

また、寒天培地は液体培地に寒天を1.5%加えて調製した。

B. stearothermophilus は55°Cで、*B. subtilis* は37°Cで培養を行った。

3. 芽胞の調製

(1) 芽胞の形成

前培養液(LB培地3ml)に植菌し、一晩振とう培養したもの)の適当量を胞子形成用寒天培地に塗抹し、3~7日間培養した。

(2) 芽胞の染色

芽胞の生成過程は、Wirtzの変法⁴⁾により芽胞を染色して、顕微鏡で逐一観察し、ほとんど芽胞のみが観察されるようになるまで培養を続けた。また、芽胞収穫後の確認の際にも、芽胞染色を行った。

(3) 芽胞の収穫

ほとんど芽胞のみが観察されるようになった胞子形成用寒天培地に、冷却滅菌水3mlを加えてスプレッダーでかき取り、ピペットマンでかき取った菌液を吸い取り遠心管に入れて、4°C、12000rpmで15分間遠心した。遠心終了後、上清を捨てて沈殿を冷却滅菌水に懸濁し、再び同じ条件で遠心する一連の操作を数回繰り返した。最後に上清を捨てた後に得られた沈殿を冷却滅菌水1mlに懸濁し、エッペンドルフチューブに移したものを芽胞懸濁液として保存した。

4. 耐熱性芽胞に対する抗体の調製

芽胞検出実験に必要な *B. stearothermophilus* 芽胞に対

*愛知工業大学

する抗体の作製には、収穫した *B. stearothermophilus* 芽胞をもとにして得られたウサギ血清(発注先北山ラベス(株)伊那研究所)を、アマシヤム(株)製 Ampure PA Kit の抗体精製カラムに通して血清中の余分なたんぱく質を除去した。こうして得られた *B. stearothermophilus* 芽胞に対する精製抗体を本研究における芽胞検出実験に使用した。

精製の確認は SDS-PAGE (ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法)⁵⁾ により行い、血清および精製した抗体のたんぱく濃度は Bradford 法⁶⁾ により測定した。

5. イムノプロットング(免疫法)による芽胞の検出

芽胞は、イムノプロットングにより検出した。これは、抗体が対応する抗原(芽胞)とのみ選択的に結合する特異性の高い反応を利用する方法である。

イムノプロットングには、日本バイオ・ラッド(株)ラボラトリーズ(株)製 Immun-Blot Kit を使用した⁷⁾。

(1) 芽胞の検出限界

まず、*B. stearothermophilus* の芽胞懸濁液を 10 倍から 10^8 倍まで 8 段階に希釈した。メンブレンフィルター(MILLIPORE 社製 Immobilon-P) を $2\text{ cm} \times 4\text{ cm}$ の大きさに切って 1 cm^2 マスに区切ったものに段階希釈液を各々 $1\ \mu\text{l}$ ずつのせて、イムノプロットングを行った。

また、比較のため、*B. subtilis* についても同様の実験を行った。

(2) 各種飲料中に加えた芽胞の検出

実際に種々の飲料に *B. stearothermophilus* 芽胞を添加して飲料中に含まれる芽胞の検出実験を行った。

市販飲料水、スポーツ飲料、茶飲料を各 200ml 用意し、半分(100ml ずつ)に分けて、一方には芽胞を加え、他方にはコントロール用として芽胞を加えなかった。芽胞の入っている各飲料(以下芽胞入りとする。)およびコントロール用各飲料のそれぞれについて、吸引ろ過によりメンブレンフィルター(アドバンテック(株)製 Cellulose Nitrate Membrane Filter) 上に芽胞を捕集し、芽胞検出限界を調べたときと同様に、Immun-Blot Kit を用いてイムノプロットングを行った。

実験結果及び考察

1. 芽胞の検出限界

この実験で用いた *B. stearothermophilus* 芽胞懸濁液の濃度は、 1 ml あたり約 10^9 個であった。したがって、*B. stearothermophilus* 芽胞懸濁液を 10^6 倍希釈したもの $1\ \mu\text{l}$ に芽胞 1 個が存在する計算になる。イムノプロットングにおいて 10^6 倍希釈したところで発色が確認できれば、理論的には芽胞 1 個が検出できているものと考えられ

る。

Immun-Blot Kit を用いたイムノプロットングの結果、*B. stearothermophilus* 芽胞懸濁液を 10^6 倍希釈したところまで発色を確認することができた(図 1(A))。

また、*B. subtilis* について行った同様の実験において、*B. subtilis* の芽胞懸濁液の濃度は 1 ml あたり約 10^{10} 個であり、イムノプロットングを行ったところ、 10^4 倍希釈したところまでしか発色を確認することができなかった(図 1(B))。すなわち、*B. subtilis* 芽胞懸濁液の濃度から計算して、*B. subtilis* 芽胞の場合は 1 000 個以上集まっていないと検出できないものと思われる。

2. 各種飲料中の芽胞の検出

イムノプロットングにより芽胞の検出限界を調べた結果、芽胞 1 個単位の検出が可能であることが確認できたので、次に、実際に種々の飲料に *B. stearothermophilus* 芽胞を添加して飲料中に含まれる芽胞の検出実験を行った。

市販飲料水、スポーツ飲料、茶飲料を各 200ml 用意し、半分に分けて、一方には *B. stearothermophilus* 芽胞が約 5 000 個存在するように加え、他方にはコントロール用として芽胞を加えなかった。芽胞入り飲料各 100ml およびコントロール用芽胞なし飲料各 100ml のそれぞれについて、吸引ろ過によりメンブレンフィルター上に芽胞を捕集し、芽胞検出限界を調べたときと同様に Immun-Blot Kit を用いてイムノプロットングを行った結果を図 2 に示す。

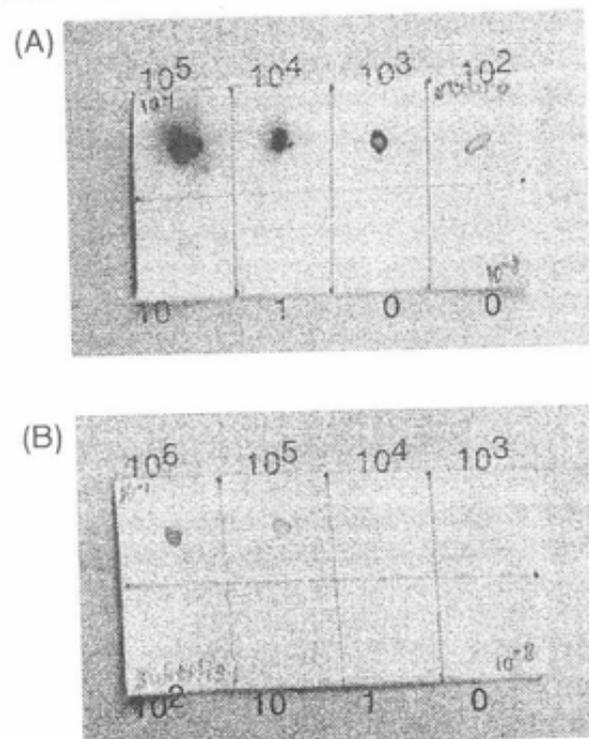


図 1 免疫法による芽胞の検出限界

- (A) *B. stearothermophilus* 芽胞 (1 個以上で発色を確認)
 (B) *B. subtilis* 芽胞 (10^3 個以上で発色を確認)

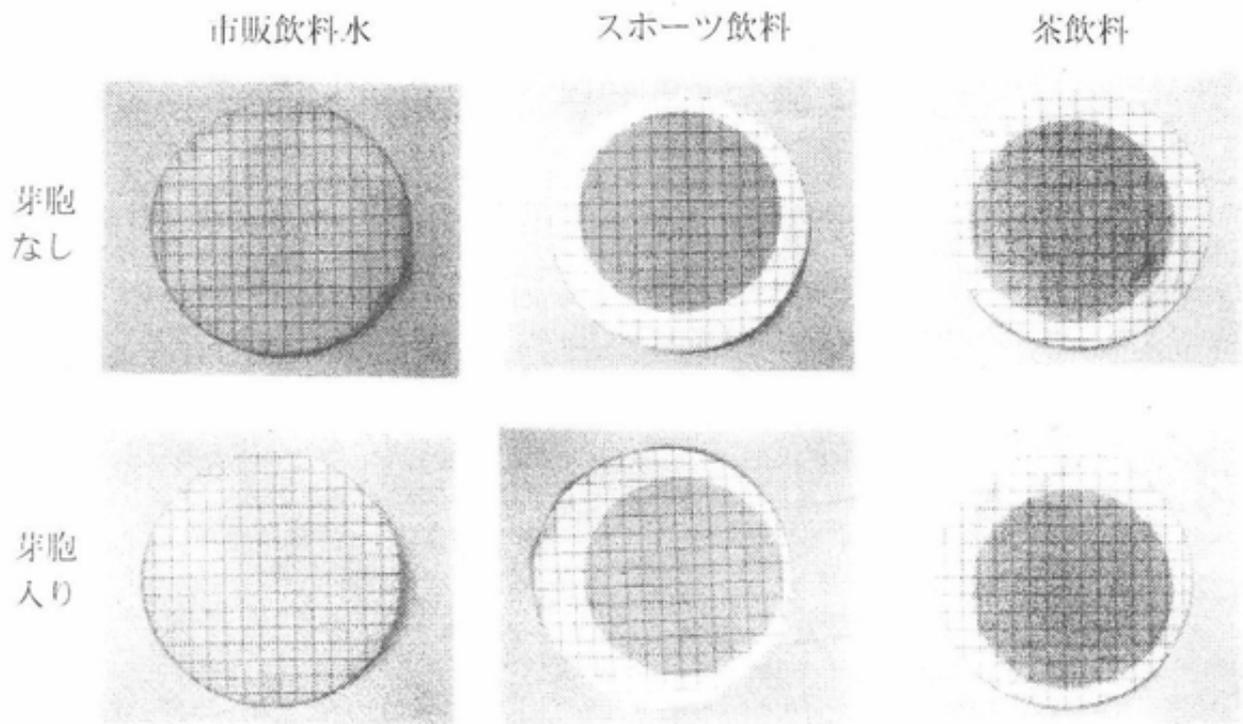


図2 各種飲料中の芽胞の検出
 上段、コントロール（芽胞なし）；下段、芽胞入り；左、市販飲料水；中、スポーツ飲料；右、茶飲料

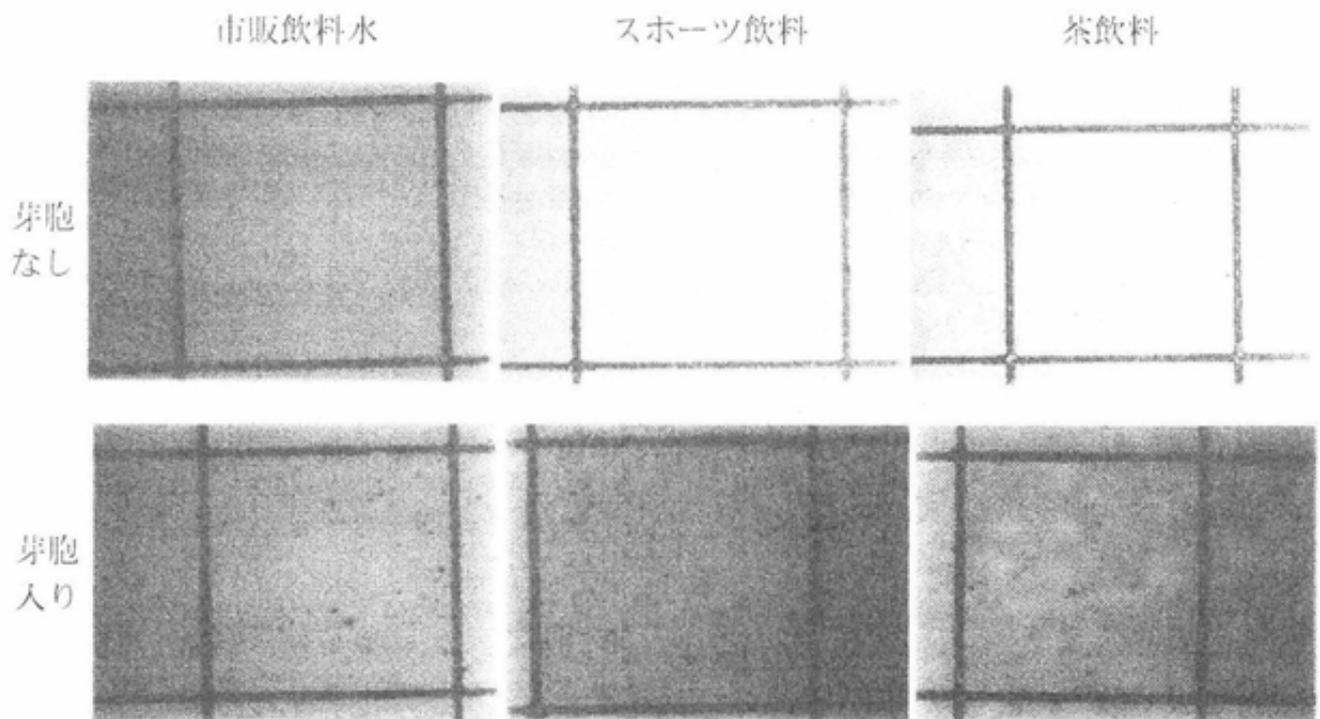


図3 各種飲料中の芽胞の検出（拡大）
 上段、コントロール（芽胞なし）；下段、芽胞入り；左、市販飲料水；中、スポーツ飲料；右、茶飲料

飲料によって発色反応に要する時間やバックグラウンドの色が多少異なっていたが、いずれの芽胞入り飲料からも、芽胞の存在を思わせる紫色の発色点を多数観察することができた。

図3は、図2の一部を拡大したものである。コントロール用の芽胞を加えていない飲料では発色点が見られないのに対して、芽胞入りの方は多数の発色点が出現している。

今回実験した各種飲料の中で発色に最も時間を要したのは市販飲料水であった。飲料によって発色反応に要する時間が異なった理由としては、飲料中に含まれている成分のうちの何かが発色反応に影響を及ぼし(今回の場合は促進)たのではないかと考えられる。

また、飲料によってバックグラウンドの色が異なったのは、もともと飲料には多かれ少なかれ色がついていることや、飲料中の成分の一部に抗体が非特異的に結合して発色基質によって発色したことなどが理由として考えられる。

さらに、イムノプロットリングによってメンブレン上に現れる紫色の発色点が芽胞由来であることを確認するために、芽胞数の比較実験を行った。すなわち、市販飲料水100mlに *B. stearothermophilus* 芽胞が約50個含まれるように加えて、吸引ろ過によりメンブレンフィルター上に芽胞を捕集し、そのメンブレンについてイムノプロットリングを行った。メンブレン上に発色によって現れた紫色の点は、肉眼で平均55個を数えた。一方、イムノプロットリングによってメンブレン上に現れた紫色の点の数と比較するため、やはり *B. stearothermophilus* 芽胞が約50個含まれるように調製した市販飲料水100mlを吸引ろ過して、得られたメンブレンをLB寒天培地上にのせて55℃で培養し、翌日生えてきたコロニーの数を数えたところ、平均71個であった。

イムノプロットリングを行ったメンブレン上に発色によって現れた紫色の点の数と、LB寒天培地上にのせたメンブレン上に生えてきたコロニーの数がほとんど変わらず、あらかじめ予想された個数とほぼ一致したことから、発色によって現れた紫色の点は芽胞の存在を示しており、本検出法により飲料中の芽胞が検出できているものと考えられる。

今回は肉眼で発色点を数えたが、コロニー数自動計測装置や高感度な光検出装置などの器械を用いれば、より正確な数を測定することも可能であろう。

飲料などの缶詰製品を製造中に、製品に何らかの理由で菌が混入することにより食品が腐敗するのを早期発見するための検出システムは、細菌類が製品に混入していないかを確実に検出でき、かつ、簡便であることが望まれる。しかし、現在のところ、*B. stearothermophilus* 芽胞の検出には培養をしなければならず時間がかかる。飲料中から

B. stearothermophilus 芽胞を1個単位で迅速に検出可能な本手法を実用化すれば、今までより簡便で迅速な検出システムが確立できるものと期待される。

要 約

耐熱性芽胞菌 *Bacillus stearothermophilus* を材料に、抗原抗体反応を利用した芽胞の検出を試みた。*Bacillus stearothermophilus* 芽胞に対する精製抗体を用いてイムノプロットリングを行い、芽胞の検出限界を調べた結果、芽胞1個単位の検出が可能であることが確認できた。そこで、実際に種々の飲料に *Bacillus stearothermophilus* 芽胞を添加して飲料中に含まれる芽胞数を本検出法を用いて計測したところ、あらかじめ予想された個数とほぼ一致したことから、本検出法により飲料中の芽胞が検出できているものと考えられる。

文 献

- 1) 蜂須賀養悦: 芽胞学—芽胞をめぐる形態学と生物学— (東海大学出版会, 東京), (1988).
- 2) 近藤雅臣・渡部一仁編: スポア実験マニュアル—微生物の芽胞・胞子の基礎研究から応用研究まで— (技報堂出版, 東京), p.127 (1995).
- 3) 微生物研究法懇談会編: 微生物学実験法 (講談社, 東京), p.443 (1975).
- 4) Bartholomew, J. W., Lechtman, M. D. and Finkelstein, H.: *J. Bacteriol.*, 90, 1146 (1965).
- 5) Laemmli, U. K.: *Nature*, 227, 680 (1970).
- 6) Bradford, M. M.: *Anal. Biochem.*, 72, 248 (1976).
- 7) Blake, M. S., Johnston, K. H., Russell-Jones, G. J. and Gotschlich, E. C.: *Anal. Biochem.*, 136, 175 (1984).