

食品中細菌数および呼気中病原体の迅速計測技術

Rapid Measurement Technology of Bacteria in Food and Pathogens in Exhaled Breath

富樫 盛典
Togashi Shigenori
佐々木 康彦
Sasaki Yasuhiko

竹内 郁雄
Takeuchi Ikuo
竹中 啓
Takenaka Kei

日立グループは、人々が安全で快適に暮らせる社会の実現をめざすことをグループビジョンの1つとして取り組んでいる。計測・分析分野では、この取り組みを、食生活や環境空間の安全確保に反映させる開発をめざしている。食生活の安全確保に向けては、食品中の細菌を蛍光色素で染色してマイクロ流路中を流して、レーザー照射によってその総数を迅速にカウントする技術を開発している。また、環境空間の安全確保に向けては、呼気中から環境空間に放出された病原体を捕集して、標識化されたミスト抗体との結合で、病原体を迅速に検知する技術を開発している。今後は、この技術の適用分野を増やし、安全で快適に暮らせる社会の実現を推進していく予定である。

1. はじめに

食生活の安全性確保に向けて、その社会的な関心が高まるにつれ、食品中の細菌検査の重要性が増してきている。従来、食品などの細菌検査では、寒天培地で細菌を培養して、生存している細菌数を算定する培養法が用いられている。しかし、培養法では細菌を見える状態にするためには24時間から48時間の培養時間を要し、簡便に短時間での計測が困難であることから、迅速な計測技術の開発が期待されている。そこで、日立グループは、培養法を用いずにマイクロ流体制御を活用した迅速かつ定量的な細菌数計測技術の開発を行っている。

一方、環境空間の安全確保に向けては、ウイルスなどの病原体によるパンデミックな呼吸器感染症、大気中を浮遊している微小粒子状物質(PM2.5)による呼吸器疾患などが問題となっている。前者の呼吸器感染症の病原体の検知方法として、簡易検査キットを用いる方法が一般的に知られているが、簡便性や迅速性においては課題があった。そこで、パンデミックな感染症例の水際対策への適用も視野に入れ、患者の呼気を採取することで病原体を検知する技

術を開発している。

ここでは、安全社会の実現に貢献する細菌および病原体の迅速計測技術について述べる。

2. 食品中の細菌数の迅速計測技術

培養法を用いずに迅速かつ定量的に細菌数を測定するために、蛍光染色した細菌をマイクロキャピラリー(幅40 μm ×深さ20 μm ×長さ2 mm)の中で1個ずつ流れに乗せて、励起光を横切るときの蛍光発光の回数から菌数を直接計数する「蛍光フローサイトメトリー法」を測定原理として採用した¹⁾(図1参照)。

上記の蛍光フローサイトメトリー法を使用して食品中の細菌数を計測する際の課題は、いかに生菌(生きている細菌)と夾(きょう)雑物とを判別するかである。夾雑物は、食品由来物質に加え、死菌(死んでいる細菌)や染色のために使用する蛍光色素の粒子(以下、蛍光色素粒子と記す)がある。これらの夾雑物は自家蛍光や蛍光色素による染色や吸着により蛍光を発するため、擬(ぎ)陽性(生

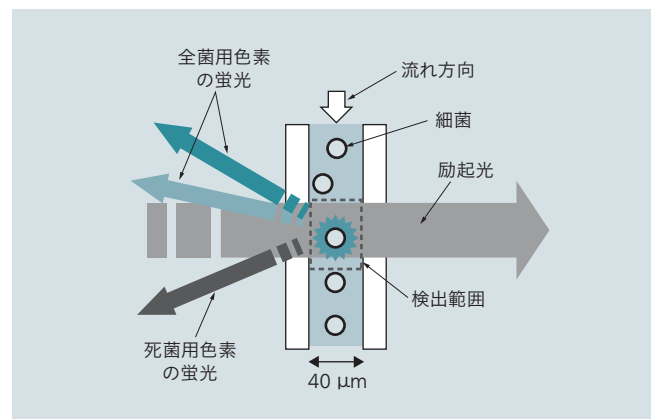


図1 | 蛍光フローサイトメトリー法

蛍光染色した細菌をマイクロキャピラリーの中で1個ずつ流れに乗せて、励起光を横切るときの蛍光発光の回数から菌数を直接カウントしている。

菌として誤計測すること)の要因となる。

そこで、前記の擬陽性の課題を解決する新たな計測技術として、1種類の全菌用蛍光色素と1種類の死菌用蛍光色素を用いる通常の「二重染色法」に代わり、2種類の全菌用蛍光色素と1種類の死菌用蛍光色素を用いる「三重染色法」を開発した²⁾。この方法では、生菌は全菌用蛍光色素の2種類の蛍光を発生し、死菌は全菌用蛍光色素と死菌用蛍光色素の3種類の蛍光を発生する。一方、各蛍光色素の粒子は1種類の蛍光を発生するので、蛍光の組み合わせで生菌を判別できるようになるのが特徴である(図2参照)。

また、食品の持つ自家蛍光も擬陽性となることが知られている。特に野菜類は色素体が豊富であることから自家蛍光が多い。405 nmで励起した場合のじゃがいも(加熱品)のデンプン、ほうれんそうのクロロフィル、にんじんのカロテンからの自家蛍光の例を図3に示す。同図を見て分かるように、食品ごとに自家蛍光の蛍光波長(蛍光色)も相対強度(蛍光量)もまちまちであり、単純に判別すること

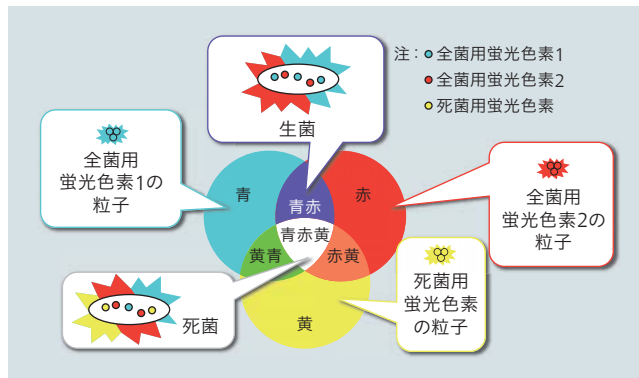


図2 | 蛍光色素粒子との判別 (三重染色法)
各蛍光色素の粒子は1種類の蛍光を、生菌は全菌用蛍光色素の2種類の蛍光を、死菌は全菌用蛍光色素と死菌用蛍光色素の3種類の蛍光を発生している。

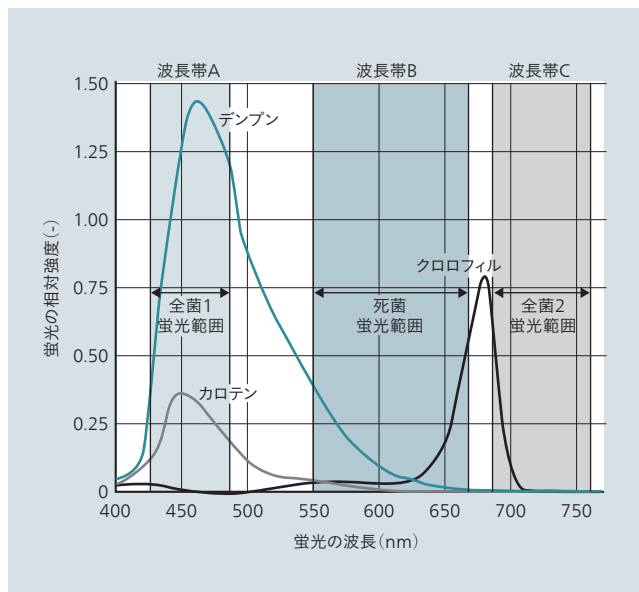


図3 | 食品の自家蛍光との判別
波長405 nmのレーザーで励起した場合のじゃがいものデンプン、ほうれんそうのクロロフィル、にんじんのカロテンからの自家蛍光の例を示している。

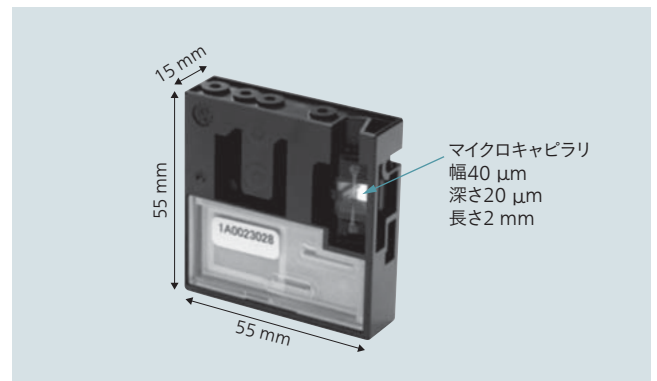


図4 | プロセスの自動化を実現するカセット
蛍光フローサイトメトリー法の検体前処理における微量分注や食品屑(くず)の除去、細菌の蛍光染色などのプロセスをマイクロ流体制御で自動化している。

は困難である。そこで、この技術では、可視光域で3帯域の波長を計測し、蛍光プロファイルを取ることによって細菌からの信号なのか、自家蛍光なのかを識別することとしている。

さらに、これらの蛍光染色など、一連の操作を自動化する手のひらサイズのカセットも開発した。カセットの外観を図4に示す。内部に計測1回分の試薬や検体、廃液を内包する使い切りタイプである。また、カセット内のマイクロ流路内では、蛍光フローサイトメトリー法の検体前処理における微量分注や食品屑(くず)の除去、細菌の蛍光染色などを自動で行う高度なマイクロ流体制御を行っている。

3. 細菌数の迅速計測装置「カセットラボONE」

三重染色法(図2参照)、食品の自家蛍光との判別(図3参照)、およびプロセスの自動化を実現するカセット(図4参照)を搭載した細菌数の迅速計測装置を図5に示す。この装置は、2011年秋に「カセットラボONE」として上市されたコンパクトな卓上製品であり、製品名の由来ともなる以下の3点が特徴である³⁾。

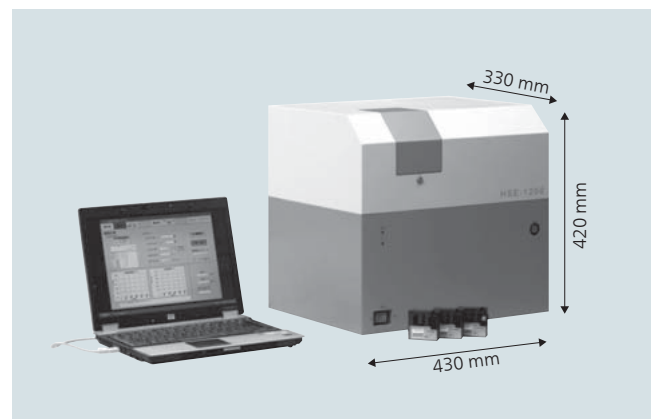


図5 | 細菌数の迅速計測装置「カセットラボONE」
カセット式の簡単操作、培養法を用いずに細菌数を計測、90分で迅速計測の3つの特徴を備えた卓上の細菌数迅速計測装置である。

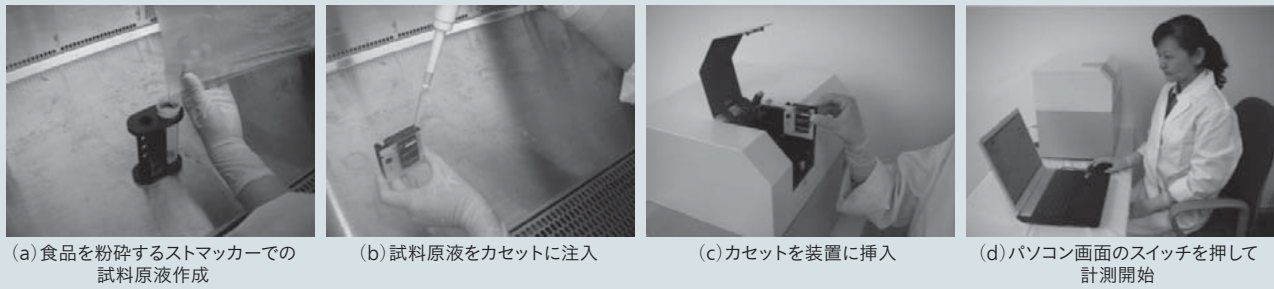


図6 | 細菌数の迅速計測装置「カセットラボONE」の操作手順

(a) 食品を粉砕するストマッカーでの試料原液作成, (b) 試料原液をカセットに注入, (c) カセットを装置に挿入, (d) パソコン画面のスイッチを押して計測開始の4つの操作のみである。

- (1) easy Operation : カセット式の簡単操作
- (2) Non-culture : 培養法を用いずに細菌数を計測
- (3) Extremely fast : 90分で迅速計測

この装置の操作手順は, (a) 食品を粉砕するストマッカーでの試料原液作成, (b) 試料原液をカセットに注入, (c) カセットを装置に挿入, (d) パソコン画面のスイッチを押して計測を開始するという4つのみである (図6参照)。装置はパソコンに接続することが前提であるが, 専用ソフトウェア画面から装置の状況をモニタすることができ, 直感的な操作画面となっている。

卓上装置「カセットラボONE」(図5参照)を用いて, 購入した実食材(トマト, ごぼう, もやし, レタス, ほうれんそう, 紫キャベツなど)中の細菌数を計測した結果を図7に示す。横軸が上記食材中の細菌数を寒天培地による従来法で計測した結果であり, 縦軸がこの装置で計測した結果である。両者の計測結果を比較すると, 非常によく相

関がとれていることが分かり, 90分で迅速計測するこの装置による計測結果は, 寒天培地による従来法(24時間)の結果を再現できていることが分かる。

4. 環境空間中の病原体の迅速計測技術

一方, 環境空間の安全確保に向けては, インフルエンザや結核などの病原体による呼吸器感染症が問題となっている。病原体の検知方法として, 患者の鼻腔(く)から粘液を採取する簡易検査キットを用いる方法が一般的に知られているが, 簡便性や迅速性においては課題があった。そこで, パンデミックな感染症例の水際対策への適用も視野に入れ, 感染者の粘液ではなく呼吸を採取し, 呼吸中の病原体を自動で捕集・検知する技術の開発を行っている(図8参照)。その状況について次に述べる。

5. 呼吸中病原体の迅速検知用の試作装置

採取した呼吸(図8参照)に含まれる病原体を迅速検知する装置を図9に示す。この装置では, 感染者の呼吸を採

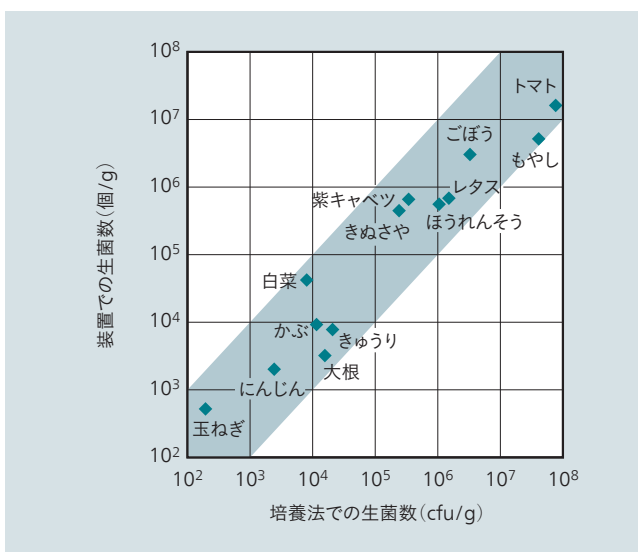


図7 | 食品中の細菌数の測定例

実食材(トマト, ごぼう, もやし, レタス, ほうれんそう, 紫キャベツなど)の細菌数を計測した結果を, 寒天培地による従来法で計測した結果である。



図8 | 感染者からの呼吸採取

患者の粘液ではなく, 呼吸を採取して病原体を捕集している。

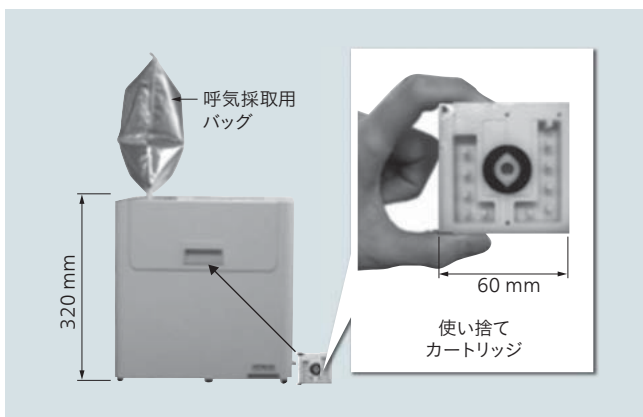


図9 | 呼吸中の病原体の迅速検知装置と使い捨てカートリッジの外観
呼吸採取用バッグと使い捨てカートリッジを装置本体に搭載したシステムである。

取した呼吸バッグ，呼吸中の病原体を捕集・検知するための使い捨てカートリッジ，呼吸や試薬をカートリッジ内で流動させるためのポンプと病原体を光学検知するための光検出器で構成されている。

使い捨てカートリッジを取り付けた状態の迅速検知装置の内部構成を図10に示す。使い捨てカートリッジは，インパクション法を行うための多孔板（孔径70 μm），ガラ

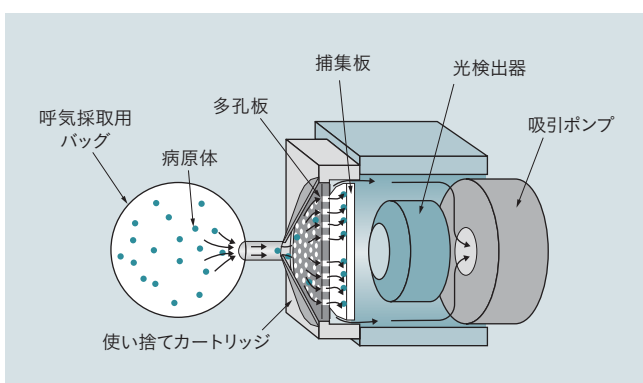


図10 | 呼吸中の病原体の迅速検知装置の内部構成
使い捨てカートリッジの捕集板に病原体をインパクション捕集し，捕集板上で病原体を蛍光検知する一連のプロセスをシステム化している。

ス捕集板，カートリッジ内を流動する試薬保持容器を備えている。使用時には，呼吸を吹き込んだ呼吸採取用バッグ（3 L）と使い捨てカートリッジを検知装置に取り付け，外部パソコンにより動作させることで，4つのプロセス（捕集：1分，標識：5分，洗浄：4分，検知：1秒）を自動的に実施することが可能である（図11参照）。

6. ミスト標識法による抗原抗体反応の高速化

採取した呼吸（図8参照）中の病原体と蛍光色素の結合率の大幅向上で検知の迅速化を実現することを目的として，捕集した病原体に蛍光色素を含むミストを衝突させる「ミスト標識法」⁴⁾（図11参照）を開発した。ミスト標識法 [病原体粒子1個を保持する平板に蛍光色素を含むミスト（直径5 μm，液量0.07 pL）を衝突させた場合] と，従来法 [ウイルス粒子1個を保持するウェルに蛍光色素水溶液（高さ5 mm，液量100 μL）を追加した場合] の反応空間の大きさを比較し，図12に示す⁵⁾。ミスト標識法の反応空間は，従来法での反応空間に比べて非常に小さくなる。そのため，病原体粒子（抗原）の濃度は高くなり，蛍光色素（抗体）と病原体粒子の結合反応は高速化される。ミスト標識

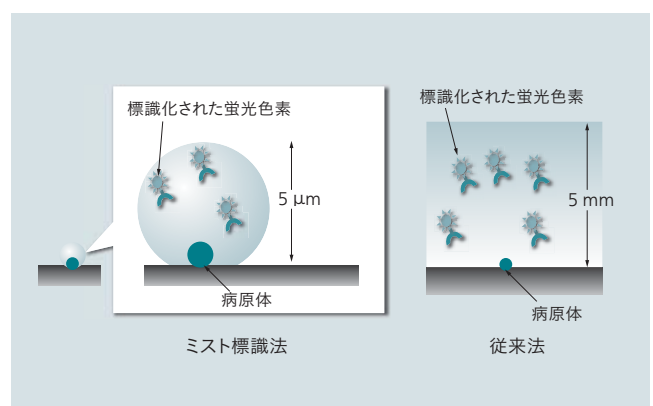


図12 | ミスト標識法と従来法の空間の大きさの比較
ミスト標識法（5 μm）と従来法（5 mm）の空間比較である。

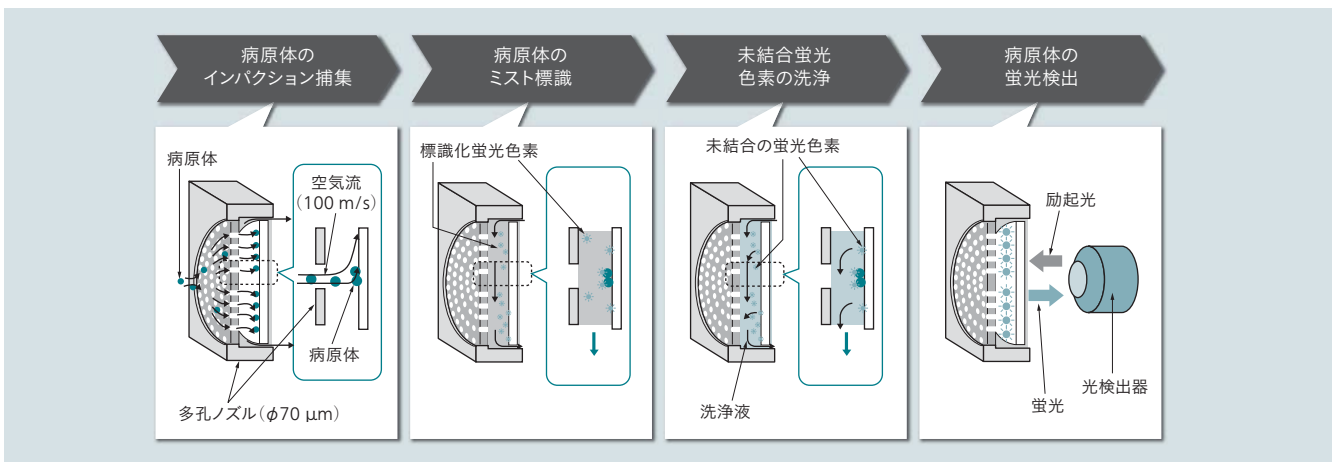


図11 | 呼吸中の病原体の迅速検知装置の一連のプロセス
使い捨てカートリッジの捕集板に病原体をインパクション捕集し，捕集板上で病原体を蛍光検知する4つのプロセス（捕集：1分，標識：5分，洗浄：4分，検知：1秒）を自動化している。

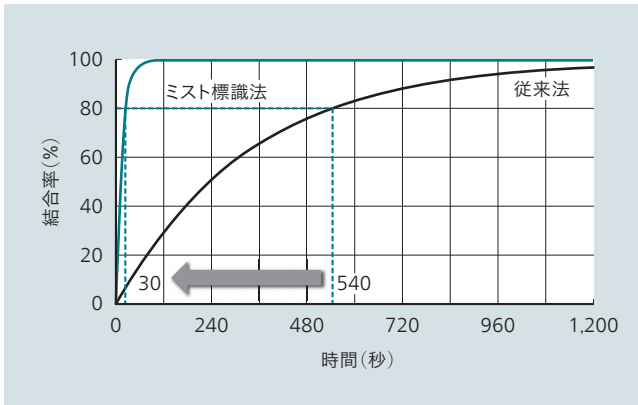


図13 | 抗原抗体反応の結合率の時間依存性を数値解析した結果
ミスト標識法と従来法の結合率の時間依存性の比較である。

表1 | ストレプトアビジン化蛍光色素の結合率
ミスト標識法と従来法の結合率の比較を示している。

	結合率 (%)
ミスト標識法	93
従来法	4

法と従来法について、抗体と抗原が結合し抗原抗体複合体を生成するときの結合率の時間依存性を数値解析した結果を図13に示す。従来法では、抗原抗体の結合率が80%になるのに要する時間が540秒である。これに対して、ミスト標識法では、抗原抗体の結合率が80%になるのに要する時間が30秒であり、大幅に短縮されていることが分かる。

次に、ミスト標識法での結合率を実験で評価した。病原体の模擬粒子として、表面にビオチンが結合している直径0.2 μmマイクロ粒子（以下、ビオチン化粒子と記す。）を使用し、蛍光色素にはストレプトアビジンが結合している蛍光色素（以下、ストレプトアビジン化蛍光色素と記す。）を用いた。また比較のため、従来法としてビオチン化粒子を捕集した捕集基板の表面をストレプトアビジン化蛍光色素の水溶液に5分間浸漬して結合反応を行った。反応時間5分でのビオチン化粒子とストレプトアビジン化蛍光色素の結合率（ストレプトアビジン化蛍光色素の蛍光を検出したビオチン化粒子の割合）は、ミスト標識法が93%以上となり、従来法（結合率4%）よりも結合率を大幅に向上できることを確認した（表1参照）。

7. 病原体の迅速計測装置の評価結果

試作した迅速計測装置の評価実験結果を紹介する。気中病原体の代用品として、呼気採取用バッグに大腸菌O157の死菌を霧化封入し、迅速計測装置の評価実験を実施した。呼気採取用バッグ中の菌数を変化させたときに計測した、赤色LED (Light Emitting Diode) による光検出器の出力値を図14に示す。パーティクルカウンタで計測した呼

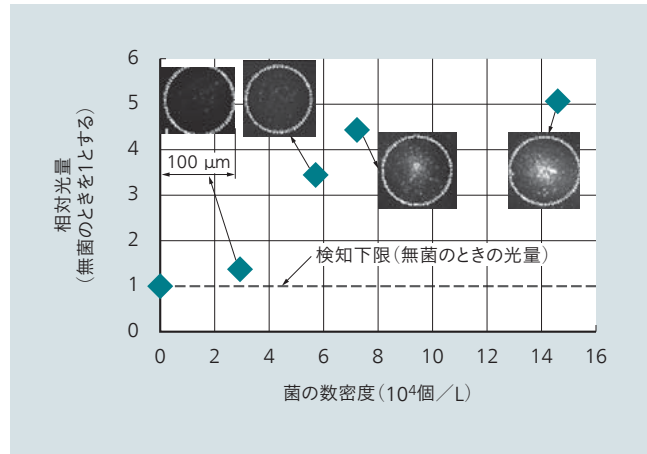


図14 | 呼気中の病原体の検知装置の評価結果

呼気採取用バッグに大腸菌O157の死菌（気中病原体の代用品として使用）を霧化封入し、呼気採取用バッグ中の菌数を 3×10^4 個/L $\sim 1.5 \times 10^5$ 個/Lの範囲で増加させたとき、光検出器の出力値は1より大きくなり、菌の検知を確認できている。

気採取用バッグ中の粒子数を呼気採取用バッグ中の菌数とし、無菌のときの出力値を1としたときの相対値を光検出器の出力値とした。蛍光色素にはHiLyte Fluor[®] 647（蛍光波長670 nm）を標識した抗O157抗体を使用した。無菌のときの出力値が1より大きいとき、呼気採取用バッグ中の菌の存在を認めることができたとすると、呼気バッグ中の菌数を 3×10^4 個/L $\sim 1.5 \times 10^5$ 個/Lの範囲で増加させたとき、光検出器の出力値は1より大きくなった。菌数とともに出力値も増加しており、上記の菌数の範囲では、この装置で菌を検知することを確認できた⁶⁾。

上記の実験以外にも、風疹（しん）ウイルス抗原を吸着させた粒子を呼気採取用バッグに散布して捕集および検知を行ったところ、10分で粒子を検知できることを確認できている。

8. おわりに

ここでは、安全社会の実現に貢献する細菌および病原体の迅速計測技術について述べた。

食生活の安全確保に向けては、食品中の細菌を蛍光色素で染色してマイクロ流路中を流して、レーザー照射によってその総数を迅速にカウントする技術の開発状況を述べた。一般的な食品中では簡便かつ90分で迅速な細菌計測が実現できている。しかし、添加物が多いものや脂肪などが極端に多い食品中での計測にはまだ課題があるが、この技術が食品工場における微生物検査の迅速化の一助になれば幸いである。

また、環境空間の安全確保に向けては、呼気中から環境空間に放出された病原体を捕集して、マイクロスケールの

※) HiLyte Fluorは、米国AnaSpec社の商標あるいは登録商標である。

標識化されたミスト抗体との結合で、病原体を迅速に検知する技術の開発状況を述べた。この装置において、大腸菌O157（気中病原体の代用品）および風疹ウイルス抗原を吸着させた粒子を呼気採取用バッグに散布して捕集および検知を行ったところ、10分で粒子を検知できることを確認できている。また、この技術を感染症患者からの呼気採取による病原体検知に適用することで、パンデミック感染症例の水際対策に効果が期待されるため、今後は大学や医療機関での臨床評価での実証をめざしていく予定である。

参考文献など

- 1) 佐々木, 外: 食品衛生検査における細菌数の迅速計測装置, 日本機械学会誌, Vol.116, No.1132, pp.144~145 (2013.3)
- 2) 竹中, 外: カセット式マイクロフローサイトメトリ法を用いた生菌数迅速計測装置の開発, 日本機械学会論文集C編, Vol.77, No.774, pp.401~410 (2011.2)
- 3) カセット式迅速細菌数計測装置「カセットラボONE」概要・特長, http://www.hitachi-power-solutions.com/products/product02/p02_69.html
- 4) K. Takenaka, et al.: Rapid airborne virus detection using mist-labeling based on micro reaction process, Proc. of 14th Miniaturized System for Chemistry and Life Sciences, paper ID-1109 (2012.10)
- 5) S. C. B. Gopinath, et al.: An RNA aptamer that distinguishes between closely related human influenza viruses and inhibits haemagglutinin-mediated membrane fusion, Journal of General Virology, Vol.87, pp.479-487 (2006)
- 6) 富樫, 外: マイクロ流体制御による浮遊病原体の検知装置の開発, 日本機械学会茨城講演会論文集, pp.21~22 (2013.9)

執筆者紹介



富樫 盛典

1995年日立製作所入社, 日立研究所 機械研究センタ ロボティクス研究部 所属
現在, マイクロ流体制御技術を活用した各種分析・製造装置の研究に従事
工学博士
化学工学会会員, 日本機械学会会員, 日本化学会会員, 日本流体力学学会会員, 室内環境学会会員



竹内 郁雄

1983年 日立製作所入社, 株式会社日立パワーソリューションズ 情報・制御システム本部 コンピュータエンジニアリング部 所属
現在, 迅速細菌数計測装置の開発に従事
電気学会会員, 日本機械学会会員



佐々木 康彦

1992年 日立製作所入社, 株式会社日立パワーソリューションズ 情報・制御システム本部 コンピュータエンジニアリング部 所属
現在, 迅速細菌数計測装置の開発に従事
日本機械学会会員, 日本防菌防霉学会会員, 日本食品工学会会員, 日本食品微生物学会会員



竹中 啓

2001年日立製作所入社, 日立研究所 機械研究センタ ロボティクス研究部 所属
現在, マイクロ流体制御技術を活用した各種分析・製造装置の研究に従事
化学工学会会員, 日本機械学会会員, 室内環境学会会員