

論文の内容の要旨

論文題目 ホタルルシフェラーゼを用いた微生物検出法の迅速、高感度化に関する研究

氏名 榊原 達哉

【序論】

製薬業界、食品飲料業界等において、微生物検査は不良品の発生を防止し、高品質を保つ上で非常に重要な検査である。従来の微生物検出法である寒天培養法は、微生物を培養してコロニーを形成させて、これを計数するもので、混釈培養法とメンブレンフィルター(MF)法の2種類が汎用されている。しかしながら、結果を得るのに数日から1週間かかるという問題点がある。そこで、従来法よりも早く結果を得るために、ホタルルシフェラーゼ(FFL)を用いたATP法、RMDS(Rapid Microbe Detection System)法等が開発された。

ATP法とは、FFLを用いるATP発光試薬によって、試験管に採取した微生物の菌体内に存在するATPを発光量としてルミノメーターで測定することにより無培養で微生物数を定量する方法であり、米飯、生菓などの微生物数の多いサンプルに適用できる。しかしながら、サンプル中に含まれている菌体外ATPの影響によりバックグラウンド(BG)発光が高くなり感度良く定量できないことが問題となっていた。そこで、強力な菌体外ATP消去法が必要であると考えた。

一方、RMDS法とは、従来のMF法より迅速な微生物数の定量法として開発されたものである。これは、MF上に捕捉した微生物を培養して微小なコロニーを形成させ、菌体内ATPを抽出し、ATP発光試薬で発光させ、この輝点を高感度カメラであるRMDS装置で撮影して、輝点を計数することにより微生物数を定量するものであり、飲料、製薬用水などの微生物数が少なく過性の良いサンプルに適用されている。しかしながら、この方法ではATP発光試薬の発光量がATPの消費とともに減衰し積算発光量が不足しているので、培養して微小なコロニーを形成させてから測定する必要があった。そこで、無培養で微生物数を定量するためには、高い積算発光量を得られる発光試薬の開発が必要であると考えた。

本研究では、微生物数を無培養で高感度かつ迅速に定量する分析法の確立を目指して、①強力な菌体外 ATP 消去法の開発による ATP 法による微生物数定量の高感度化、及び②高い積算発光量を得られる発光試薬の開発による RMDS 法による無培養での微生物数定量を試みた。

【本論】

1. ATP 法による微生物数定量の高感度化

強力な菌体外 ATP 消去法を確立し BG 発光を少なくすることでシグナルノイズ(SN)比を向上させ、ATP 法による微生物数定量の高感度化を図るため、様々な ATP 分解酵素を探索した。その結果、アデニンリン酸デアミナーゼ (ADase) (ATP、ADP、AMP 等のアデニンヌクレオチド類からの脱アミノ化反応を触媒する酵素)とアピラーゼ (APase) (ATP、ADP、ITP、IDP 等からの脱リン酸化反応を触媒する酵素)に着目した(図1)。両酵素を併用した結果、1%酵母エキスの BG 発光を 2.4×10^6 RLU(Relative Light Unit)から 25 RLU に低下できた(図2)。

米飯由来サンプルの BG 発光は 14200 RLU であったが、本 ATP 消去法で処理することにより、38 RLU に低下でき、米飯中の微生物数を 400 CFU(Colony Forming Unit)/gまで無培養での定量を可能とした(図3)。このように、BG 発光の減少による SN 比向上により、ATP 法による微生物数定量の高感度化が達成された。

2. RMDS 法による無培養での微生物数定量

2-1. ピルビン酸オルトリン酸ジキナーゼ (PPDK)を用いた FFL 酵素サイクリング系の構築

従来の RMDS 法の欠点は、ATP 発光試薬による1CFUあたりの菌体内 ATP の積算発光量が不足しているため、微生物の培養を必要とすることである。そこで、微生物を培養する代わりに、1CFU あたりの菌体内 ATP 及び AMP をサイクリングして高い積算発光量を得られる発光試薬 (PPDK 発光試薬)の開発を試み、これにより MF 上にて無培養状態の微生物の検出が可能になると考えた。

PPDK は、AMP、ピロリン酸及びホスホエノールピルビン酸(PEP)から、ATP、ピルビン酸及びリン酸の生成を触媒する酵素である(図4上段)。そこで、PPDK と FFL を組み合わせることで、FFL により ATP から生成した AMP 及びピロリン酸を再び ATP に変換してサイクリングさせ、高い積算発光量を得られるか否かを検討した(図4)。また、PPDK 発光試薬中の ATP 及び AMP による BG 発光を低下させるために ADase を添加したところ、BG 発光は 2.6×10^6 RLU から 510 RLU に低下した。これらの結果、PPDK 発光試薬の 5 分間の積算発光量は、従来の ATP 発光試薬の場合に比べて 43 倍に達し(図5)、高い積算発光量を得ることに成功した。

2-2. PPDK 発光試薬を用いる MF 上での微生物数定量の検討

次に PPDK 発光試薬を MF 上の無培養状態の微生物に適用し、PPDK-RMDS 法による微生物数定量について検討した。MF に種々の微生物の1CFU の菌体内 ATP に相当する量の ATP をスポットし、PPDK 発光試薬を噴霧して、RMDS 装置で 5 分間測定することにより感度を調べた。その結果、0.31 から 5.0 amol/spot の ATP を検出することができ、本法は MF 上の 1CFU の無培養状態の微生物に由来する ATP を輝点として検出できる感度を有することが判った。各種微生物(ブドウ状球菌、大腸菌、乳酸菌、緑膿菌)を PPDK-RMDS 法に供したところ、いずれも無培養で輝点として検出することに成功した(図6)。各微生物とも輝点数とコロニー数はほぼ一致し、従来の MF 法 (35°C、48 時間培養)と良好な相関関係 ($R^2=0.973$) が示された(図7)。このように、PPDK 発光試薬を用いて菌体内

ATP 及び AMP 由来の輝点を RMDS 装置にて撮影し、微生物数を無培養で定量することができ、RMDS 法の迅速化が達成された。

2-3. 菌体内アデニンヌクレオチド (AN) 含量の分別定量

PPDK-RMDS 法においては、水などのように、栄養源を含まないサンプルも対象となる。そこで PPDK-RMDS 法で糖非存在下の大腸菌の検出を試みたところ、その存在を確認でき、その輝点数と CFU はほぼ一致した。このような栄養源を含まないサンプルでは、菌体内 ATP 量が減少して、検出ができない可能性もあったが、PPDK-RMDS 法では微生物の検出が可能であった。そこで、AN 含量を分別定量する方法を開発し、栄養源の有無による菌体内 AN の組成変動を調べ、PPDK-RMDS 法がサンプル中の栄養源の有無になぜ影響されないのかを検討した。

菌体内 AN 含量を分別定量するために、3 種類の発光試薬を作製した。総 AN (ATP、ADP 及び AMP の合計量) を測定する発光試薬は、ATP+AMP 量 (ATP 及び AMP の合計量) を測定する PPDK 発光試薬にピルビン酸キナーゼ (PK) (ADP 及び PEP から ATP の生成を触媒する酵素) を添加して作製した。ATP 量を測定する試薬は PK も PPDK も含有しない。各発光試薬に各 AN 溶液を別々に、あるいは混合して添加し測定を行ったところ、いずれも安定な発光パターンを示し、目的とする AN が検出されていることがわかった。各 AN の検量線は、それぞれ良好な直線性、感度及び再現性を示し、これら 3 種類の発光試薬によって各 AN を分別定量できると考えられた (図8)。

これらの発光試薬により各菌体内 AN 含量を分別定量した結果、糖存在下では菌体内 AN のほとんどは ATP であり、菌体内 ATP+AMP 量は、総 AN の 90%以上であった。一方、糖非存在下では ATP の割合が数%と極端に少なくなる微生物 (大腸菌と乳酸菌) があったが、これらの微生物では AMP の割合が増加していた。各微生物の菌体内 ATP+AMP 量は、糖の有無に関らず PPDK-RMDS 法で検出可能な 0.31 amol/CFU 以上であり、総 AN の約 80%以上を占めていた。また、各微生物の菌体内 ADP 量は、糖の有無に関らず総 AN の約 20%以下であった。

これらの結果より、菌体内 ATP 及び AMP の合計量は糖の有無に大きく影響されないため、PPDK-RMDS 法は栄養源を含まないサンプル中の微生物の無培養検出にも有用であると考えられた。また、菌体内 ADP は総 AN の約 20%以下であるため、ADP を測定しなくても、十分な感度が得られることも判った。

【総括】

本研究において微生物数を無培養で高感度かつ迅速に定量する分析法の確立を目指して、①ATP 法による微生物数定量の高感度化、ならびに②RMDS 法による無培養での微生物数定量を達成した。①においては、ADase と APase を併用する強力な菌体外 ATP 除去法を確立し、これにより、菌体外 ATP を除去し、BG 発光の減少による SN 比向上によって、ATP 法による微生物数定量の高感度化が達成された。②においては、FFL と PPDK の反応を組み合わせることで、FFL により生成した AMP 及びピロリン酸を再び ATP に変換してこれをサイクリングさせ、高い積算発光量が得られる PPDK-FFL 酵素サイクリング系を確立した。この系によって、無培養状態での菌体内 ATP 及び AMP 由来の輝点を、RMDS 装置で画像検出でき、RMDS 法の迅速化が達成された。また、PPDK-RMDS 法は、サンプル中の栄養源の有無による影響を受けにくい点でも有用であった。

本研究を製薬業界、食品飲料業界等における微生物検査に適用して迅速、高感度化することにより、微生物汚染による不良品発生率の低下、製品の迅速な出荷等が可能となることが期待される。

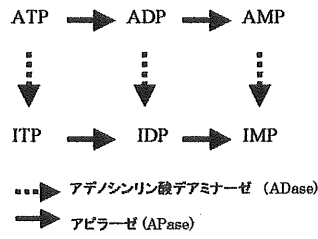


図1. ADase と APase による ATP 分解経路

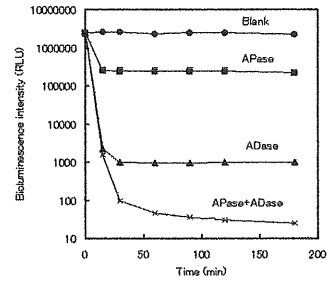


図2. 各種酵素による1%酵母エキスのバックグラウンド発光の低下

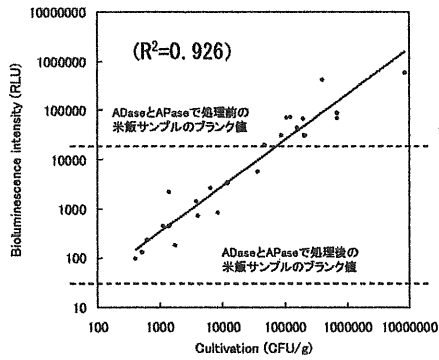


図3. 米飯中微生物数の定量値の比較

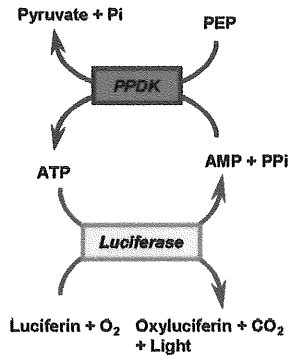


図4. PPK を用いたホタルルシフェラーゼ酵素サイクリング系

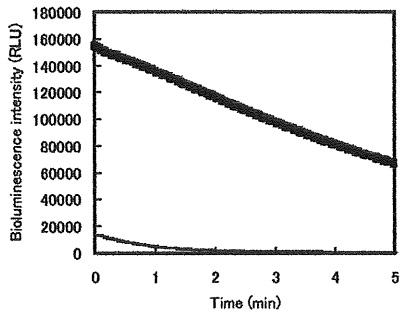


図5. PPK 発光試薬(太線)と従来の ATP 発光試薬(細線)の発光パターンの比較

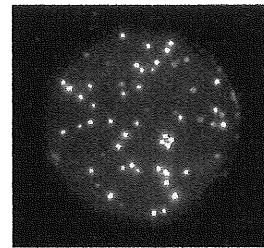


図6. PPK-RMDS 法による画像(大腸菌)

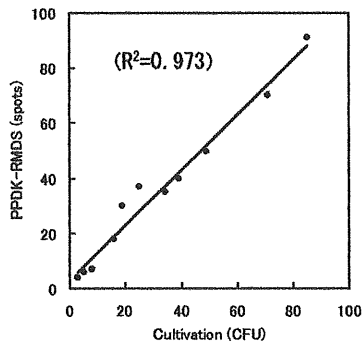


図7. 輝点数と CFU の相関

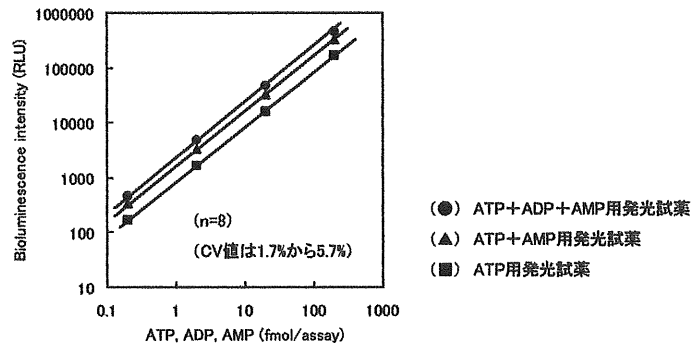


図8. 各発光試薬による ATP, ADP, AMP 等量混合液の検量線