



## 総菌数(全菌数)測定法について

### はじめに

健康志向の高まりや機能性表示食品制度の制定等を背景に、乳酸菌やビフィズス菌の食品への添加が注目されています。ヨーグルト、乳酸菌飲料、キムチ等の様々な発酵食品の多くには乳酸菌やビフィズス菌が生きた菌(生菌)として存在していますが、機能性表示に係る多くの食品の中には死んだ菌(死菌)が添加されているものもあります。発酵食品のように乳酸菌等が生きている場合は、一般細菌数や乳酸菌数等の培養法により生菌数の測定を行うことで、その食品の品質(菌数等)の評価が可能です。一方、殺菌乳酸菌の菌末やそれを添加した加工食品の場合は添加された菌が死菌であるため培養法では菌数の測定が出来ません。本稿では、培養法では測定が出来ないサンプルの菌数測定方法(総菌数測定法)についてご紹介します。

### 測定方法について

総菌数の測定法は顕微鏡を用いた方法が主流であり、血球計算盤測定法やDAPI(蛍光)染色法等が代表的な方法として挙げられます。いずれの方法もサンプルを希釈水に懸濁した試料液について、顕微鏡下で細胞の形態を1つ1つ観察・計測し、菌数を導き出すというものです。これらの方法の場合、死菌・生菌の識別は出来ないため、測定結果としては「総菌数(あるいは全菌数)」として扱われます。また、細菌は菌種によって球菌や桿菌等の形態を示しますが、分裂途中の細胞が含まれることも多く、すべての細胞がまったく同じ形態を示しているとは限りません。したがって、複数の菌種が混在しているサンプルについては観察される細胞の形態に明確な差がない限り、それぞれの菌種の菌数を区別して測定することは困難です。そのため、例えば、ある1種類の乳酸菌の死菌末を添加した製品であっても、「乳酸菌数」とは扱わず、「総菌数」としての測定結果となります。

### 1 サンプル(測定対象)の採取

採取はサンプルの形状(液状・半流動状・粉末状・固形状等)に合わせて方法を選択する必要があります。重要なことは、そのサンプルに含まれる死菌がサンプル中に均一に存在するの可否かという点です。例えば、菌末のようなある程度均一化されていることが想定される場合は少量の採取でも測定結果にあまり影響がないことが予想されます。それに対し、死菌を添加した加工食品の場合は、サンプル中で死菌が局在化している可能性があることから、正しい測定結果を導き出すためには、ある程度の採取量を必要とし、更にサンプル中に含まれる死菌を均一化させる必要があります。

### 2 試料液の調製

血球計算盤測定法やDAPI(蛍光)染色法いずれの方法においても採取したサンプルはリン酸緩衝生理食塩水等で希釈し、試料液とする必要があります。試料液の調製における重要なポイントは「1 サンプルの採取」と同様、均一化です。均一な試料液を調製出来るか否かは、結果

に大きな影響を与えます。加工食品のようなサンプルの場合、添加された菌がサンプルの中に埋め込まれたような状態で局所的に存在することも多いため、そのような状態のまま測定を進めてしまうと予想(理論値)と異なる菌数の結果になってしまう可能性があります。また、試料液中では菌体の凝集がよく発生します(写真-1 及び 2)。凝集しているということは試料液中で菌が局在していることを意味しており、結果がばらつく要因にもなるため、試料液中の菌体の凝集を無くし、いかに単一の菌体(細胞)に分散できるかが重要です。

試料液は菌体の凝集の解消、加工食品の場合は菌体以外の原材料由来の食品成分等の夾雑物から菌体を剥がす目的でミキサー等を用いて均一化を行います(写真-3 及び 4)。その際、過度の力が加わってしまうと菌体が壊れる可能性もあるため、試料液中での菌体の分散性や夾雑物の有無(写真-5 及び 6)を確認しながら行うことも、試料液の調製を行う上で重要です。

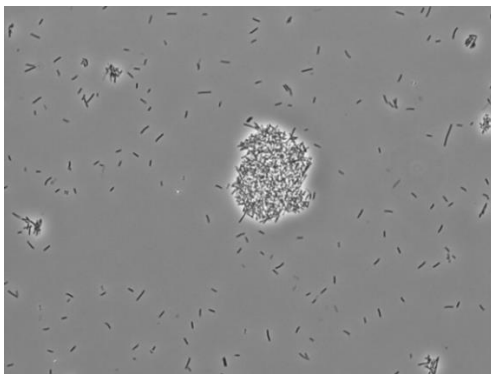


写真-1 試料液中の菌体の凝集例

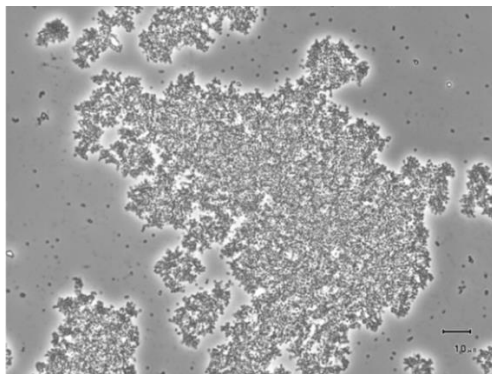


写真-2 試料液中の菌体の凝集例

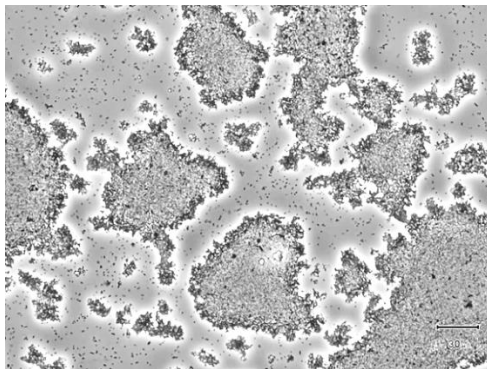


写真-3 均一化前の試料液の一例

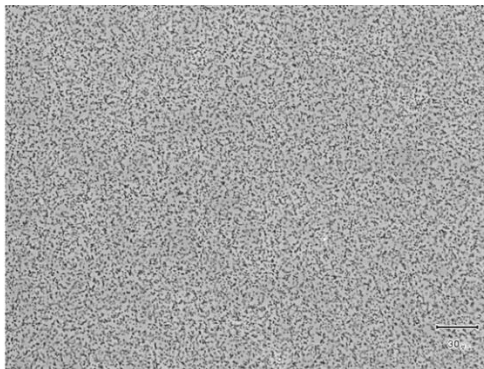


写真-4 均一化後の試料液の一例

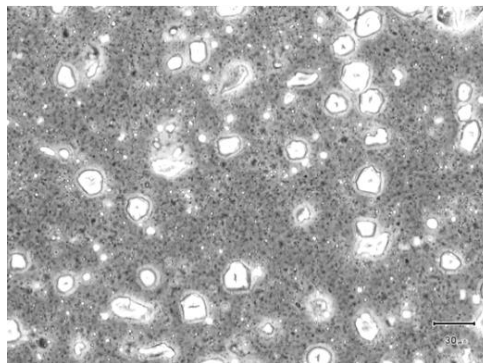


写真-5 夾雑物の多い試料液の一例

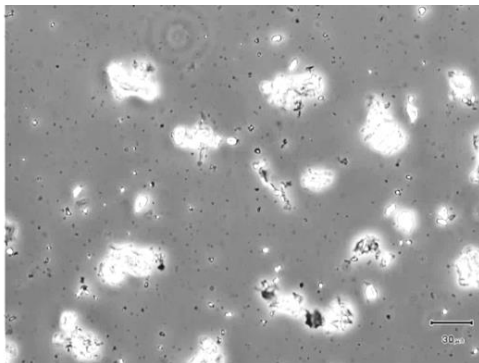


写真-6 夾雑物の多い試料液の一例

### 3 測定及び算出

測定の方法には血球計算盤測定法や蛍光(DAPI)染色法があり、いずれの測定方法も一定以上の菌数(細胞数)が必要になります(表-1)。測定を行う際はサンプルに含まれる理論菌数、サンプルの夾雑物の有無を考慮して測定法を選択します。いずれの測定法の場合も顕微鏡での観察に適切な菌数の濃度に調整する必要があるため、試料液はリン酸緩衝生理食塩水等を用いて希釈したものを測定用試料液とします。なお、細胞の数を計測する必要があるため、細胞の形態が維持されていない場合(細胞と認識出来ない場合)は測定が出来ません。

表-1 各測定法における必要最低菌数

サンプル種	血球計算盤測定法	蛍光(DAPI)染色法
菌末	10 <sup>9</sup> 以上/g 又は ml	10 <sup>4</sup> 以上/g 又は ml
液体等	10 <sup>8</sup> 以上/g 又は ml	10 <sup>3</sup> 以上/g 又は ml
加工食品等	—	10 <sup>8~9</sup> 以上/g 又は ml

#### 3-1 血球計算盤測定法

血球計算盤測定法は測定用試料液をマス目の付いた計算盤上で計測し、総菌数を算出する方法です。計算盤は、規格によりいくつかの種類に分かれており、細菌用はバクテリアチャンバー、酵母及びカビ用はトーマの血球計算盤等、測定対象により用いる計算盤が異なります。血球計算盤を用いた測定は計算盤とカバーガラス以外に複雑な器具・器材を必要としないため、簡易的に検査が出来ることが利点として挙げられます。しかし、本法は試験者の経験等により結果にばらつきが出やすい測定法でもあるため、その点は留意が必要です。

血球計算盤は計算盤とカバーガラスで構成され、カバーガラスと計算盤との間に一定の空間、算定室が出来ます(図-1)。算定室内に測定用試料液を加え、顕微鏡で観察することで1マス(もしくは区画)当たりの細胞数を計測することが出来ます。得られた数値は所定の数式に代入して総菌数を算出することで、一定容積あたりの細胞数を計測することが可能です(写真-7)。

本法で測定可能なサンプルは、菌末や液体等の夾雑物のない(少ない)ものです。加工食品等の夾雑物が多いサンプルについては、顕微鏡で計測を行う際に菌体との識別が困難である場合や夾雑物に菌体が隠れてしまうことにより物理的に計測の障害になってしまう場合があるため、基本的にはこの方法で測定は出来ません。

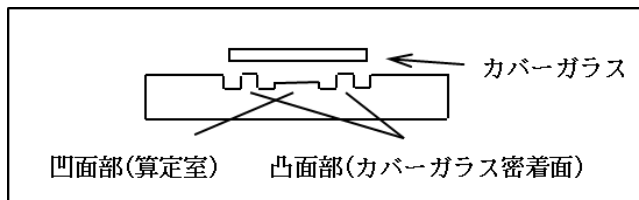


図-1 計算盤の模式図

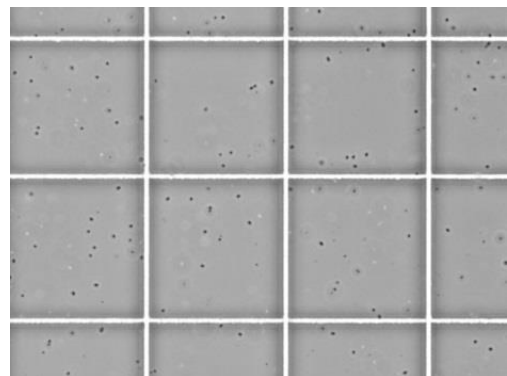


写真-7 顕微鏡下での総菌数の計測例

### 3-2 蛍光(DAPI)染色法

蛍光(DAPI)染色法は DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)の蛍光色素で測定用試料液中の細胞を染色し、蛍光を発する細胞数を計測することにより総菌数を算出する方法です。DAPIは2本鎖DNAのA-T領域に結合し、蛍光顕微鏡下で観察すると死菌・生菌に関わらず染色された細胞は青白い蛍光を発します。本法では血球計算盤測定法で判別のつかない細胞様の形態の夾雑物(例えば、油脂等は細胞との識別が困難である場合が多い)との識別が可能です。ただし、あくまで蛍光を発する細胞を対象とするため、染色性が悪い、または染色されない細胞(DNAが消失している細胞)については計測が出来ません。なお、DAPI以外にもアクリジンオレンジ等の蛍光色素を利用することも可能です。

測定用試料液はメンブランフィルターでろ過し、メンブランフィルター上に捕集された菌体を DAPI で染色します。蛍光染色したメンブランフィルターを蛍光顕微鏡で観察し、蛍光を発する細胞を計測します(写真-8 及び 9)。総菌数は1視野あたりの面積もしくは接眼マイクロメーターを用いて算出し、測定用試料液のろ過量や希釈倍率からサンプルの総菌数を算出します。

本法で測定の対象となるサンプル種は幅広く、夾雑物の多いサンプルでも比較的測定が可能です。ただし、加工食品の場合は1g(ml)あたり $10^8 \sim 10^9$ 以上の菌数が含まれるサンプルでないと、測定用試料液をメンブランフィルターでろ過する際に目詰まりを起こしてしまい、測定出来ない場合が多くあります。



写真-8 DAPI 染色法における計測の一例

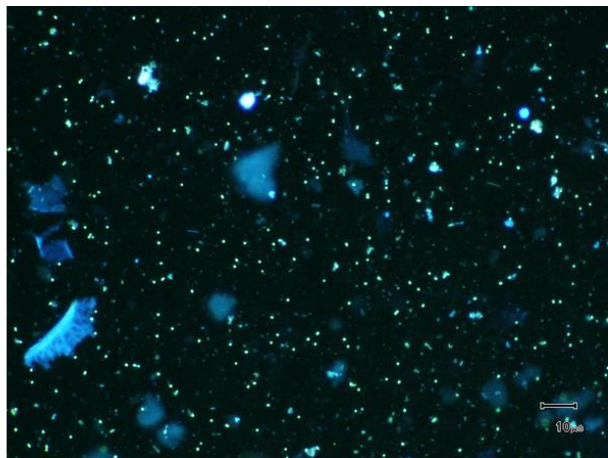


写真-9 DAPI 染色法における計測の一例

### おわりに

総菌数の測定は、同じサンプルを繰り返し測定しても結果の数値にばらつきが生じるものです。したがって、あるサンプルの総菌数を測定したい場合は、同じサンプルについて複数回の測定を行うことで、そのサンプルのばらつき方を把握することも重要であり、複数回の測定結果の平均値を採用することが望ましいと考えられます。

### 参考資料

- ・日本薬学会編：衛生試験法・注解，p83-84（2015）金原出版