

目次

	頁
第1章 序論	3
第2章 マルチプレックス PCR 法を用いたビール混濁性細菌の包括的な菌種同定検出法の開発	
第1節 緒言	17
第2節 材料および方法	19
第3節 結果	
1 ビール混濁性乳酸桿菌用マルチプレックス PCR 法の開発	
(1) プライマー設計と検出感度評価	24
(2) 特異性評価	25
(3) 反応性評価	25
2 <i>Pectinatus</i> 属菌用マルチプレックス PCR 法の開発	
(1) プライマー設計	25
(2) 検出感度評価	26
(3) 特異性評価	26
(4) 反応性評価	26
3 ビール混濁性乳酸球菌用マルチプレックス PCR 法の開発	
(1) プライマー設計と検出感度評価	26
(2) 特異性評価	27
(3) 反応性評価	28
4 人工陽性対照 DNA の作製	28
第4節 考察	45
第5節 要約	48
第3章 ビール馴化が乳酸菌に及ぼす影響の考察	
第1節 緒言	49
第2節 材料および方法	52
第3節 結果	
1 ビール混濁性乳酸菌のビール馴化現象の解析	
(1) メンブレンフィルターろ過性の調査	56
(2) ビール馴化株の形態観察	56

(3) 菌体サイズの解析	56
(4) ビール馴化菌のフィルター通過時の電子顕微鏡観察	57
2 難培養ビール混濁性乳酸菌株の取得	
(1) <i>L. lindneri</i> DSM120692 および <i>L. paracollinoides</i> JCM111969 ^T 株のビール馴化現象の観察	57
(2) ヒートショックによる難培養化への影響	58
(3) 得られた難培養株を用いたフィルター性能評価試験	58
第4節 考察	75
第5節 要約	80
第4章 マイクロコロニー法を用いたビール混濁性乳酸菌の迅速検出法の開発	
第1節 緒言	81
第2節 材料および方法	84
第3節 結果	
1 マイクロコロニーCFDA法の開発	
(1) 供試菌の選定	87
(2) 染色試薬の選定	87
(3) 培養時間の検討	88
(4) 検出感度の評価	88
(5) ビール非混濁性菌に対する選択性の評価	88
2 マイクロコロニーFISB法の開発	89
第4節 考察	101
第5節 要約	104
第5章 総括および今後の展望	105
略語表	108
参考文献	111
原著論文	121
謝辞	122

第1章

序論

ビールの起源は、紀元前四千年メソポタミア文明まで遡るとされており、シュメール人がビールを作る様子が陶板に記録されている（濱口 1988）。それ以前にも麦の栽培と貯蔵は行われていたため、ビールはすでに作られていたとも考えられているが、確固とした証拠は見つかっていない。当時のビールは、娯楽や余暇で楽しむ嗜好品というよりは、不衛生な飲料水の代用品、重要なビタミンの補給源、あるいは宗教上のキープアイテム、時には労働の賃金として珍重されていたと考えられている（橋本 1998, Hill 2009）。また、紀元前三千年頃にはすでにエジプトでも多く飲まれており、高い醸造技術を有していたといわれている（都島 1996）。その後、ビールの製造方法は各地へ伝播し、地中海を経て欧州へ伝わったとされ、すでに1世紀頃にはドイツで本格的にビール醸造が行われていたと伝えられている。

現在、我々が口にするビールに、爽快な味と香りを付与する重要な役割を果たしているホップであるが、中世以前のヨーロッパにおけるビール醸造ではホップに限らず多様な草本根皮類が使用されていた。11世紀後半から、ビールの防腐効果が優れていることが認識されるようになり、現在のようにホップが多用されるようになっていった。このホップとは、*Humulus lupulus* というアサ科に属する多年草で、ルプリンと呼ばれる顆粒中の成分（ホップ樹脂）が麦汁煮沸中に異性化してイソ α 酸となり、水溶性で苦味を持つ物質となる。Fig 1-1 にイソ α 酸の構造式を示す。このホップ成分はグラム陽性菌に対してプロトンイオンフォアとして作用し、細胞膜内外のプロトン勾配を消失させることにより抗菌活性を示すと報告されている（Fig 1-2）（Simpson 1993a, Simpson and Fernandez 1994, Sakamoto 2002）。

ビールはこのホップ成分による抗菌作用の他にも、pHが低いこと（3.8-4.7）、アルコールを含むこと（0.5-10%）、溶存酸素が極めて低いこと、炭酸ガス圧が高いこと、酵母による発酵工程を経るため、栄養分が少ないことなどから、微生物的に安定な食品とされている。しかしながら、一部の微生物種はこのような過酷な条件でも生育することができ、ビールに混濁や異臭を引き起こすことが知られ、ビール混濁性菌と呼ばれている（Back 1994a, Sakamoto and Konings 2003）。ビール混濁性菌による汚染事故は、100 ml あたり数個レベルという低い菌数で引き起こされるのに加えて被害の規模が大きいこと、消費者の信用の失墜を招くとともに企業に大幅な損失をもたらすことは必至であり、ビール醸造においては厳しく管理されている。このビール混濁性菌には、乳酸菌を主としたグラム陽性細菌、*Pectinatus* 属菌や *Megasphaera* 属などの偏性嫌気性のグラム陰性細菌、および一部の酵母が

含まれる (Table 1-1)。原料に由来する芽胞やカビの胞子などは、ビール中で増殖できないためビール混濁性菌には含まれていない。

グラム陽性のビール混濁性細菌は主に乳酸菌である。その中でも、*Lactobacillus* 属菌および *Pedococcus* 属菌による微生物汚染が最も深刻で、この2属によるドイツでの微生物汚染事故の割合は1994年の知見では69%、2003年では87%と報告されている (Fig 1-3, Back 1994a, 2003)。また、チェコにおける調査で、微生物汚染の原因となった菌はすべて乳酸菌に属していたとの報告がある (Hollerova and Kuciznakova 2001)。これら乳酸菌の中でも、*L. brevis*、*L. lindneri* および *Ped. damnosus* は、微生物汚染事故の原因菌として占める割合が最も多い。

L. brevis は微生物汚染件数の中で最も頻度が高いと報告されており、ビール醸造に携わる者を長年にわたり悩ませてきた。近年、分子生物学的手法を用いてそのホップ成分への耐性機構が詳しく調べられている (Sakamoto 2002, Suzuki 2008, Iijima et al 2009, Iijima 2010)。同じく強いビール混濁性を有する *L. lindneri* は、製品ビールだけでなく半製品からも検出される菌で、高い耐熱性を示すことから、殺菌工程が不十分であると混濁などの品質事故を引き起こすことが海外製ビールで知られている (Back 1992, 1994a, Back et al 1996, Suzuki in press)。さらに、ビールの微生物検査に一般的に使用される培地での生育は遅いが、ビール中での増殖が速いため、取り扱いに注意が必要な菌のひとつである (Sakamoto 2002)。こうしたビール製造環境に適応した性状に加え、自然環境からの分離報告がないことから、*L. lindneri* はビール環境特有の乳酸菌種であるとも考えられる。その他の *Lactobacillus* 属でも、*L. casei* や *L. corymiformis*、*L. plantarum* は比較的弱いビール混濁性を持ち、ホワイトビールのようなホップ含量の低いビールでの汚染が報告されている (Back 1994a)。2004年に新菌種提案された *L. paracollimoides* は、シードル変敗乳酸菌の *L. collimoides* の近縁種であるが、*L. collimoides* がビール混濁性を持たないのに対して、強い混濁性を持ちビール醸造環境から多く検出されることが示された (Suzuki 2004a, 2004c, Kitahara et al 2010)。また、2006年にはドイツおよびイタリアのビールから単離された株が *Lactobacillus backi* として新菌種提案された (Bohak et al 2006)。本菌種は、*L. corymiformis* と形態が酷似しているものの、マルトース資化性とジアセチル産生能が欠損している点が異なっている。その他、数種の *Lactobacillus* 属菌がビール混濁性を持つとして報告されているが (Table 1-1, Back 1987, Farrow et al 1988)、本研究では現在一般的にビール混濁性菌として扱われている菌種、および日本において流通している市販ビールで混濁性が確認されている菌種をビール混濁性菌として扱うこととした。このように、60種近い *Lactobacillus* 属の中で、10数種がビールの微生物汚染事故に関与していることが知られているものの、その種には分類学上の共通点はなく、また、同じ種でも株によって混濁性が異なることが、ビール混濁性乳酸菌の検査

方法を困難にさせている。

一方、乳酸球菌については *Pediococcus* 属菌が最も注意を要する菌であり、2 連もしくは 4 連球菌としてビール中に見出され、ビール混濁菌性の同定が困難であった時代にはザルチナ菌 (*sarcinae*) やビールザルチナ病などと呼ばれていた。本属の中でも、*Ped. damnosus* はホップ耐性と低温における生育性が強く、発酵・熟成工程でジアセチルを産生し、異臭発生の原因となることが多い (Sakamoto and Komings 2003, Suzuki in press)。*Ped. mopmatus* は pH4.2 以上の低いホップ含量のビールを混濁させることが知られており、発酵工程よりも培養酵母から検出されることが知られている (Sakamoto 2002)。また、2002 年に *Pediococcus* 属の系統発生の解析が行われ、Coors 社のカルチャーコレクション (主にビール醸造場にて単離) が再同定された結果、新菌種 *Pediococcus claussemi* が見出された (Dobson et al 2002)。

長い間、グラム陰性菌はビール混濁性細菌として重要視されておらず、最も注目されていたのは低い pH 環境でも生育できる酢酸菌であった。しかしながら、近年のビール醸造技術の進歩によりビール中の溶存酸素量が劇的に減少したことで、好気性細菌である酢酸菌のビール混濁性菌はもはや深刻に扱われることはなくなった。その反面、以前は製品ビールの空寸部分の酸素によって生育が阻害されていた偏性嫌気性細菌による微生物汚染が問題となり、*Pectinatus* 属菌と *Megasphaera* 属菌による汚染事故例が報告されるようになった (Jespersen and Jacobson 1996)。

Pectinatus cerevisiophilus は 1978 年にビールから分離された嫌気性菌として初めて報告され (Lee et al 1978, 1980)、以降、ドイツやスカンジナビア、日本でも検出が相次いだ (Back et al 1979, Haikara 1985, Takahashi 1983)。その後、*Pect. cerevisiophilus* と同様に特徴的な鞭毛や特性を持ちながらも、糖資化性や遺伝学的背景が本菌種とは区別される株が混濁ビールから単離され、分離源のドイツの都市名にちなんで、*Pectinatus fisingensis* と命名された (Shleifer et al 1990)。

Pectinatus 属に属する上記 2 菌種は、側面に鞭毛を持つ桿菌で、若い細胞は特徴的な X 字型の運動性を示し、老化に伴って長く伸張してヘビのような動きを示すことが知られていた (Lee et al 1978, 1980, Kreg 1984)。培地をベースとした試験において、アルコール 4.5 % (w/v) まで耐性で、至適 pH は 4.5 との報告がある。また、グラム陰性菌に特徴的な外膜を有しているものの、厚いペプチドグリカン層を持っているなどのグラム陽性菌の特徴も見られることから、*Pectinatus* 属菌はグラム陰性菌とグラム陽性菌の中間体という見方もされている (Haikara et al 1981, Chelack and Ingledew 1987)。*Pect. cerevisiophilus* および *Pect. fisingensis* に汚染されたビールは著しく混濁し、硫化水素、メルカプタンにより、発生する硫黄臭や腐乱臭といった不快な香味を呈するため、製品ビールに混入した場合の被害は甚大である。これら *Pectinatus* 属菌による微生物事故は、1993 年では約 21 %、2002 年では約

7%との報告がある (Fig 1-3)。以上述べた *Pectinatus* 属菌はグラム染色で陰性となり、運動性を示すとともに、カタラーゼ陰性という特徴を有していたが、2004 年に新菌種提案された *Pectinatus portalensis* (Gonzalez, et al 2004)はグラム陰性球菌で運動性を示さず、2006 年に新菌種提案された *Pectinatus haikarae* はグラム陰性桿菌でカタラーゼ陽性であった (Juvenon and Suihko 2006)。しかしながら、*Pect. portalensis* については菌株保存機関における保存株が当該菌種ではなかったことが判明し、菌種として抹消されている。そのため、本論文では *Pect. portalensis* をビール混濁性菌として扱っていない。

Pectinatus 属と近縁である *Megasphaera cerevisiae* は 1976 年に初めて混濁ビールから単離された偏性嫌気性の球菌であり、当時既知であった *Megasphaera elsdeni* とは異なる種と結論づけられ、新菌種提案された (Weiss et al 1979, Engelmann and Weiss 1985)。*M. cerevisiae* はアルコール 5.5 % (w/v)、pH 4.3 まで耐性であり、ビール工場で最も高い嫌気度を要求する偏性嫌気性菌であるとされている (Chelack and Ingledew 1987)。アルコール度数の低いビールに著しい混濁を引き起こし、硫化水素や短鎖脂肪酸を産生することから、*Pectinatus* 同様、被害が大きい菌種である。しかしながら、*Megasphaera* 属菌による微生物事故は、1994 年には約 3 %、2003 年には約 2 %と事故件数は比較的少ない (Fig 1-3, Back 1994a, 2003)。さらに、*Pectinatus* 属はビール工場の排水溝や設備からの検出も報告されるのに加え、ヨーロッパやアメリカの多くの国で製品汚染例が散見されるのに対して、*Megasphaera* 属はドイツ、オーストラリアおよびフィンランドでのみ報告されており、本来の棲息環境や汚染源は定かではない (Haikara and Helander 2006)。近年では、2006 年に *Megasphaera suecensis* および *Megasphaera paucivorans* が新たにビール混濁性を持つ新菌種として報告された (Juvenon and Suihko 2006)。この 2 菌種とも、既報の *M. cerevisiae* と同じく、グラム陰性の球菌で運動性は示さず、カタラーゼ陰性であった。

Pectinatus 属と *Megasphaera* 属は加熱ビールの製品が主流の欧米では、樽製品でのみ危害菌となるのに対して (Chelack and Ingledew 1987)、非加熱ビールである生ビールが主流の日本では缶やびんなどの販売形態について危害菌となるため、パッケージング工程や環境も含めて最大限の注意を払う必要がある。

一方、偏性嫌気性細菌の *Zymophilus raffinovorans* と *Zymophilus paucivorans* が醸造用酵母やビール醸造の廃棄物から単離されているが (Schleifer et al 1990)、それぞれ pH 5 以上、pH 6 以上のビールで混濁性を有するという知見がある (Haikara and Helander 2006)。一般的に日本で製造されるビールはコーンスターチ等の副原料比率が高いため、麦芽由来の pH 緩衝能が低く、海外で製造される麦芽 100 % ビールに比較して pH が低い傾向にあることから、本論文では *Zymophilus* 属菌など低 pH では混濁性を持たないビール混濁性細菌の検査系から外すことにした。

以上、これまで知られているビール混濁性細菌について述べた。このように、ビールを
変敗させる菌種は非常に限られているため、ビール業界においては一般的に検査対象菌種
を限定した微生物品質管理がなされてきた。そこで次に、具体的な微生物管理手法につい
て述べる。

ビール工場におけるビールの製造工程の概略を図示する (Fig 1-4)。ビール混濁性微生物
に関する品質管理はビールの製造工程全般、および製造現場の環境全般に渡って厳しく行
われているが、本論文では最終的な製品ビールの品質管理について述べることにする。工
場製造されたビールを市場に出荷し問題なく流通させるには、ビールを混濁させる微生物
が製品ビール中に含まれないことを確認する必要がある。最も精度が高く確実な方法とし
ては、実際の製品ビールに検出された菌を接種し、ビール中で増殖するか否かを確認すべ
ばよい。しかし、本法では結果が得られるまで少なくとも数週間を要するため、製造後数
日に出荷を決定する必要がある製造現場の品質管理方法には適していない (Casey et al
1981a, 1981b, Suzuki et al. 2004c, 2005)。そこで、一般的には前述の既知ビール混濁性細菌を
検出できる検査培地で培養を行い、出現したコロニーから菌体を採取して同定する方法が
使用されてきた。

このように検査培地で検出された微生物種の同定方法として、1980年代までは、主にグ
ラム染色ならびに糖の酸化性等の伝統的な実験手法が主流であった。しかし、本法による
同定結果は判定まで時間を要する上に、得られた結果が曖昧な場合もあったため、品質管
理上満足できる水準ではなかった。その後、1990年代から徐々に、PCR法を用いた遺伝子
増幅法が菌種同定に適用されるようになり、ビール製造各社がそれぞれ独自にプライマー
を設計しビール混濁性細菌判定のPCR法を開発するようになった (Tsuchiya et al 1992,
Taguchi et al 1995, Sakamoto 1997, Motoyama and Ogata 2000, Braune et al 2003, Kiehne et al
2003, Nakakita et al 2003, World et al 2005)。この菌種特異的PCR法の利点は、その精度の高
さに加えて、グラム染色などの性状調査をベースとした同定方法に比較して、検査にかか
る時間が数時間程度まで短縮できることであった。また、新しいビール混濁性乳酸菌の報
告がされた場合にも、新しく検査方法を構築して既知菌種同定法に追加すればよく、網羅
的な微生物検査体制を維持することが可能であった (Sakamoto et al 1997, Funahashi et al
1998, Motoyama and Ogata 2000)。

このように、検査培地による培養法と菌種特異的PCR法を組み合わせる微生物検査
法がビール業界で定着する中、新たな問題点が4つ浮かび上がってきた。

1つめの問題点は、これまで知られていなかったビール混濁性を持つ新菌種が続々と報告

されるようになったことである。Table 1-1 に近年追加されたビール混濁性細菌を示した。1 菌種に対して 1 種類の PCR 検査法が必要となる、個別の菌種特異的 PCR 法は、対象とするビール混濁性細菌が多くなるとサンプル数が増加し煩雑になってくる。一方で、事前にグラム染色などの性状調査を行って、対象菌種を絞り込むと、検査体制に漏れが発生することが予想された。

そこで、第 2 章では、既知ビール混濁性細菌の菌種同定法を一括して行うことで、検査に要する時間の短縮をはかり、同時に作業の煩雑さを解消することを目的として、マルチプレックス PCR 法の構築を行った。

2 つ目の問題点としては、菌種同定 PCR 法の前段階である培養法において、すべてのビール混濁性細菌が検出できていない場合、微生物検査に漏れが生じる点である。すなわち、ビール環境において難培養菌の存在が問題となってきたのである。

近年、貧栄養環境や極限環境で生息する微生物種から、検出培地で増殖しない菌、いわゆる難培養菌が多く報告されており、最近では自然環境に棲息する微生物の大部分が難培養状態にあることが、多くの微生物研究者により認識されつつある (Colwell et al 1985, Roszak and Colwell 1987, Oliver 2005, 2010, Kogure 2006)。このような難培養あるいは培養不能状態 (VNC あるいは VBNC Viable but Nonculturable State) という概念は 1985 年頃から認識され始めたものの、さまざまな議論の的になっている (Nicolò et al 2011)。その理由としては、自然界の細菌を実験室の限られた培地で培養できないことを培養不能と呼ぶには適していないのではないかという見方があるためである。例えば、自然界で海水中に生息していた微生物にとっては、固く水分の少ない寒天培地への移行は大きなストレスがかかる。また、酸素分圧や他の生物との相互作用も微生物にとっては大きな変化である (Kogure 2006)。そのため、そもそも自然界の細菌が実験室で用いている培地で、コロニーという単一種が密集した状況に向かって増殖するのは厳しいとみるべきだという意見も少なくない。このように、難培養あるいは培養不能という言葉の使い方は検討の余地があると思われるが、本論文では、乳酸菌の計測培地として一般的に使用されている、MRS 培地のようなビールの検査培地上で増殖が確認できない菌という定義で、難培養菌という呼び方を使用することにした。

さらに冒頭で述べたとおり、ビールは微生物にとって貧栄養、あるいは極限に近い環境と言っても過言ではない。また、ビール製造の長い歴史において、微生物汚染があったビールから原因菌が単離できない、ビール中では増殖し混濁等の異常を示すものの検査培地には生育しないといった例は少なくない。これらのことを考え合わせると、ビール混濁性微生物はある条件下では、一般的に検査に使用される培地に対して難培養性を示すように

なることが予測されていた。

そこで筆者らは、ビール製造工程におけるフィルター除菌工程において、実験室で栄養分に富む培地で増殖したビール混濁性細菌と、ビール工場で長期間ビール成分に接触した菌は挙動が異なるとの仮説をたてて、従来の培養法で発生しうる検査漏れの可能性について検証したので第3章で述べる。

3つ目の問題点として、培養法は非常に時間がかかるため、短時間で製品の出荷判定を行うビール生産現場での検査には不向きであることが挙げられる。これまで、ビール業界では多くの検査培地が開発され、比較検討されてきた (Casey and Ingledew 1981a, 1981b, Beuchat 1993, Jespersen and Jacobsen 1996)。しかしながら、培養法によって目視でコロニーが検出できるまでには、製品検査から少なくとも2~3日、生育の遅い菌では1週間以上かかることもある。さらに、損傷菌などの、ストレスがかかり増殖能が低下している細菌にとっては、新しい環境で数千倍に増殖しなければならないため、培養段階で選択圧がかかってしまう (野田ら 2004, 土戸 2010)。そこで、筆者らは培養法のデメリットを解消できる検出法の検討を行うこととした。

培養法よりも短い期間で微生物検出を行う試みは、以前から盛んに行われており、例として濁度や pH 変化、ATP などに着目した迅速検査法が開発されてきた (Table 1-2)。その中でも、近年の CCD カメラや画像解析、顕微鏡の進歩により、蛍光染色剤を用いた全菌数直接計測法が様々な分野で取り上げられている。本法は、培養を介さずにサンプル中の微生物を蛍光染色し、蛍光顕微鏡下で直接検出する方法である (Amann and Schleifer 1995, Yamaguchi and Nasu 2004)。水環境中には通常の培地でコロニーを形成しない細菌が多く存在することから、河川や海洋水、医薬品製造用水の微生物解析手法として研究開発が進んできた (Pernthaler et al 2002, Dorigo et al 2005, Yamaguchi et al 2007)。近年では、蛍光試薬の種類も増え、生菌のみの計測や、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) を用いて複数菌種の検出が簡便に行えるようになってきている (Boules et al 1999, Savichtcheva et al 2005, Olver 2010)。一方で、ビール混濁性細菌を培養を介さずに蛍光プローブで検出ならびに菌種同定を行う直接 FISH 法が開発が試みられたものの (Yasuhara et al 2001)、自家蛍光を発する物質によるバックグラウンドノイズが実用上の問題点として指摘された。

このような背景の中、培養法と全菌数直接計測法との技術的なギャップを埋めるため、マイクロコロニー法が注目を集めるようになった (Rodrigues and Kroll 1989, Kawai 1999, Takahashi et al 2000, Ferrari et al 2006, Wang et al 2007)。マイクロコロニー法とは、目視で確認できるコロニーになるまで培養を待つのではなく、初期の増殖段階の微小コロニーを顕微鏡で検出する手法である。この場合、目視で判別できるコロニーが数百万~数千万

cells の集まりであるのに比較して、マイクロコロニーは数十～数百 cells で検出できるため、培養時間が短くなる。さらに、本法は生菌のみを検出できる方法であることに加え、増殖能が低下し、コロニーにまで増殖できない菌体を検出できる可能性が高くなるため、感度の向上も期待できる。そこで、筆者らは、マイクロコロニー法を適用したビール混濁性乳酸菌の迅速検査法を開発したので、第4章で述べる。

最後に 4 つめの問題点として、未知のビール混濁性細菌に対して十分に対応できていないことが懸念された。前述のように、近年の微生物の検出と単離技術、および遺伝学的同定手法の進歩により、新規ビール混濁性細菌が続々と報告されている。裏を返せば、新菌種として報告のない未知のビール混濁性細菌はこれからも次々と出現すると考えられる。新菌種提案されたビール混濁性細菌については、新しく菌種特異的 PCR 法を用いた検査法を追加していけばいいが、全く知見のないビール混濁性細菌は検査から漏れることになる。そのため、既知菌だけでなく、未知のビール混濁性細菌も含めて幅広く、しかしながら、ビール混濁性を確実に有する細菌を検出できる検査法が必要となってくる。そこで、第4章においてマイクロコロニー法による迅速検査法に、難培養ビール混濁性細菌の検出培地として開発された ABD 培地を組み合わせることで、未知菌種にも対応可能な検査法を開発した。

Table 1-1. Beer spoilage bacteria and wild yeasts.^a

Gram-positive bacteria

Rod-shaped

Lactobacillus brevis
L. brevisimilis
L. buchneri
L. casei
L. collmoides
L. corymiformis
L. lindneri
L. malefermentans
L. parabuchneri
L. paracollmoides^b
L. plantarum
L. backi^b

Cocci

Pediococcus dammosus
Ped. dextrimicus
Ped. mopmatus
Ped. claussem^b
Kocuria kristinae

Gram-negative bacteria

Rod-shaped

Pectinatus cerevisiophilus
Pect. frisingensis
Pect. haikarae^b
Selemonas lactificex
Zymophilus paucivorans
Zymophilus raffinosivorans
Megasphaera cerevisiae
Megasphaera paucivorans^b
Megasphaera suecensis^b

Wild yeast *Brettanomyces/Dekkera* spp.
Candida spp.
Pichia membranifaciens
Torulopsis spp.
Schizosaccharomyces spp.
Sacharomyces cerevisiae

^aCited and edited from Jaspersen and Jakobson 1996.

^bCurrently proposed beer spoilage species within 10 years.

Table 1-2. Recently conducted rapid methods for microbiological detection

Categories	Method
Physical	Impedance/Conductance measurement
	Microcalorimetry
	pH-metry
	Turbidometry
	Flow cytometry
Biochemical	Direct Epifluorescence Filter Technique (DEFT)
	ATP bioluminescence
	Protein fingerprinting
	DNA/RNA fluorescent staining
	Immunoanalysis (ELISA)
	Radiochemical
Molecular	Gas Chromatography
	Molecular Probes (DNA/RNA)
	Ribotyping/Riboprinting
	Karyotyping
	End-point PCR
	Real-time PCR
	RAPD PCR
Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)	

第2章

マルチプレックス PCR 法を用いた ビール混濁性細菌の包括的な菌種同定検出法の開発

第1節 緒言

1986年にPCR法が開発されてから、分子生物学は飛躍的に進歩した。ごく少量のDNAが数時間で何倍にも増幅できるPCR法は、少数のビール混濁性微生物種を扱うビール業界の微生物管理にも普及しつつある。近年では、既知のビール混濁性細菌に対する菌種特異的プライマーの設計のほか、ビール混濁性乳酸菌が持つホップ耐性遺伝子、*hopA*・*hopC*をターゲットとすることで乳酸菌のビール混濁性を調査する手法なども研究されている (Sami 1997, Suzuki 2004, Suzuki et al. 2005, Ijima 2006)。

序章で述べたように、食品業界における微生物検査において多用され、確実に迅速な検査法のひとつが対象菌種をしぼった菌種特異的PCR法である。一般的には、PCR法を実施する前段において、顕微鏡観察やグラム染色、カタラーゼ試験といった性状調査を行い、ある程度菌種を絞りこみ、可能性のある菌種に対応した菌種特異的PCR法を実施することが多い。しかしながら、この前段階における性状調査は判断が目視によることが多いことに起因して、調査結果が曖昧なことも少なくないことから、PCR法の対象菌種選択における判断ミスとなる可能性があり、検査漏れの危険性が否定できない。

また、第1章Table 1-1に示したように、近年の微生物分離技術および同定技術の進歩により、新しいビール混濁性菌が続々と報告されている。これらの新菌種に対して菌種特異的PCR法を開発し追加していくことは、PCR法に供するサンプル数の増加を招き作業が煩雑になるとともに、性状調査による絞り込みが難しくなる可能性が高くなる。

そこで、筆者らは複数菌種の菌種特異的PCR法を包括して実施することが可能なマルチプレックスPCR法を構築し (Fig. 2-1)、選択培地で検出されたすべての菌体に対して網羅的な検査を簡便に行う手法を構築した。

一方、微生物の菌種を同定するために用いられるPCR法では、PCR反応の信頼性を保証するために、陽性対照DNAにより正常に増幅反応が起こることを確認しなければならない。そのため、従来は検査対象とする菌のDNAを陽性対照とするPCR反応によって、プライマー対の反応性検査が行われていた。しかしながら、PCR反応を行う際、操作上のミスによりサンプルDNAに陽性対照DNAが混入してしまった場合は、サンプルが本来は陰性で

あるにもかかわらず、陽性と誤判定される恐れがある。

多数の PCR プライマーを単一の反応系で混合するマルチプレックス PCR 法では、複数の菌種を一斉に検査できる利点がある一方、各プライマーの反応性を確認するためには対応する個々の菌種の数だけ陽性対照 DNA 用の反応チューブ数が必要とされ、試験点数が多くなるという問題点が残る。また陽性対照を複数混合して PCR 反応に供している場合もあるが (Macián 2004, McDonough 2005)、各プライマー対の増幅産物の長さが類似している場合には、電気泳動後のバンドが重なり判別が困難になる可能性もある。

そこで、本研究では、誤判定を防止でき、かつ、それぞれの陽性対照のバンドが明確に判別でき、すべてのプライマー対の反応性を 1 反応系で確認できるマルチプレックス PCR 法用の陽性対照の作製法を開発した。

第2節 材料および方法

(1) 菌株および培養条件

本研究では Japan Collection of Microorganisms (JCM)、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)、the American Type Culture Collection (ATCC)、IAM culture collection (2008年にJCMへ移管)、財団法人発酵研究所 (IFO、現在は独立行政法人製品評価技術基盤機構へ移管)、the National Collections of Industrial, Food and Marine Bacteria, Ltd 研究所 (NCFB、現在は NCIMB 株)、Valtion Teknillinen Tutkimuskeskus (VTT)および当社の ABBC と HC バクテリアカルチャーコレクションに保存されている菌株を用いた (Table 2-1,2-4,2-5)。乳酸菌の培養は、塩酸で pH を 5.5 に調整した MRS 培地 (Merck 社) を用いて、嫌気条件下、25°C で行った。嫌気培養は嫌気チャンパー (Coy 社) で行った。*Pectinatus* 属菌、*Megasphaera* 属菌およびビール工場環境検出菌はチオグリコレート (TGC) 培地 (日本製薬社) を用いて、嫌気条件下、30°C で培養した。

(2) マルチプレックス PCR 法用プライマーの設計

構築したマルチプレックス PCR 法を便宜上、L multiplex (*Lactobacillus* 属ビール混濁性乳酸桿菌 6 菌種)、P multiplex (*Pectinatus* 属 2 菌種)、および C multiplex (*Cocci*、ビール混濁性乳酸球菌 4 菌種) と呼ぶこととする。

対象菌種検出用プライマー対のみを用いたシンプレックス PCR 法 (Table 2-2、以降シンプレックス PCR 法と記載)、およびマルチプレックス PCR 法用プライマー (Table 2-3) は、インターネット上のデータベースから取得した各菌種の 16S rRNA 遺伝子および 16S rRNA 遺伝子と 23S rRNA 遺伝子との ITS (Internal transcribed spacer) 領域の塩基配列をもとに菌種特異性の高い部分を選択し、18-23 塩基長のプライマーを作製した。

Lactobacillus brevis、*L. paracollinoides*、*L. coryniformis* の上流プライマーと、*L. brevis* の下流プライマー、*L. lindneri* の上下流プライマー対および *Pectinatus* 属菌用の上下流プライマー対は、既報のプライマー配列を用いた (Sakamoto et al. 1997, Funahashi et al. 1998, Motoyama and Ogata 2000)。

L. paracollinoides の上流プライマー L74P-1 は (Table 2-3)、Funahashi らが報告した *L. paracollinoides* 特異的プライマー L74P3-4 (5'-TTTTAACATCGGATGAG-3', Table 2-2) の 5' 側に 3 塩基対付加した配列を用いてマルチプレックス PCR 法用プライマーを設計した (Funahashi et al. 1998)。

L. casei の上流プライマー LCP11 は (Table 2-2, 2-3)、Sakamoto らが設計した *L. casei* 特異的プライマー (5'-ATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGC-3') の 5' 側を 6 塩基対短くした配列を

用いマルチプレックス PCR 法用プライマーを設計した (Sakamoto et al 1997)。

L. plantarum の上流プライマー-L74P-1 は(Table 2-3)、*L. plantarum* JCM 1149^T 株の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列 (accession no. D79210) と近縁種、*L. brevis* DSM 20054^T 株 (accession no. M58810)、*L. casei* ATCC 334 株 (accession no. D86517)、*L. coryniformis* DSM 20001^T 株 (accession no. M58813)、および *L. paracollinoides* JCM 11969^T 株 (accession no. E16651) の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列について、DNASIS pro ソフトウェア (日立ソフトウェアエンジニアリング社) を用いて、マルチプルアライメント解析を行い、菌種特異的プライマーを設計した。

Pediococcus damnosus と *Ped. mopinatus* 検出用共通プライマー、および *Ped. clausseii* 検出用プライマーは(Table 2-2, 2-3)、*Ped. damnosus* DSM 20331^T 株 (accession no. AJ318414)、*Ped. mopinatus* DSM 20285^T 株 (accession no. AJ271383)、*Ped. clausseii* DSM 14800^T 株 (accession no. AJ621555) の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列と、近縁種 *Ped. acidilactici* DSM 20284^T 株 (accession no. M58833)、*Ped. pentosaceus* DSM 20336^T 株 (accession no. AJ305321)、*Ped. parvulus* DSM 20332^T 株 (accession no. D88528)、*L. dextrinicus* DSM 20335^T 株 (*Ped. dextrinicus*, accession no. D87679) の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列についてマルチプルアライメント解析を行い、シンプレックス PCR 用プライマーおよびマルチプレックス PCR 法用プライマーを設計した。

Megasphaera cerevisiae 検出用プライマーは、*M. cerevisiae* VTT E-85230 株の 16S rRNA 遺伝子配列 (accession no. L37040) と、近縁種 *Pectinatus cerevisiophilus* ATCC 29359^T 株 (accession no. AF373026)、*Pect. frisingensis* ATCC 33332^T 株 (accession no. AF373027)、*Selenomonas lactifex* DSM 20757^T 株 (accession no. AF373024)、*Zymophilus paucivorans* DSM 20756^T 株 (accession no. AF373025)、*Zymophilus raffinovorans* DSM 20765^T 株 (accession no. DQ217599) の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列についてマルチプルアライメント解析を行い、シンプレックス PCR 法用プライマーおよびマルチプレックス PCR 法用プライマーを設計した。

バクテリアのユニバーサル反応用上流プライマー-111412 は、Sakamoto らが設計した細菌用ユニバーサルプライマー (5'-GCAACGAGCGCAACCC-3') の 3' 側を 5 塩基対短くした配列を用い、下流プライマー-1392r2 は、Sakamoto らが設計した細菌用ユニバーサルプライマー (5'-ACGGGCGGTGTGTRC-3') の 3' 側を 5 塩基対短くした配列を用いマルチプレックス PCR 法用プライマーを設計した (Sakamoto et al 1997)。

人工陽性対照作製用 PCR 法には、*S. faerjei* ゲノム DNA 配列 (accession No. V00636, J02459, M17233, X00906) をもとに 37-41 塩基対のプライマーを作成した。*S. faerjei* ゲノム DNA 配列の任意の領域を各菌種ごとに選定し、各マルチプレックス PCR 法用上流プラ

プライマーの3'側に、上記で選択した領域の5'末端の約20塩基を結合させた人工陽性対照作製用上流プライマーを設計した。また、各マルチプレックスPCR法用下流プライマーの3'側に、上記で選択した領域の3'末端の約20塩基の相補的配列を結合させた人工陽性対照作製用プライマーを設計した。Table 2-4 に人工陽性対照作製用プライマーと配列、および対応するマルチプレックスPCR法用プライマー配列を下線で示した。

プライマー合成はタカラバイオ株式会社とオペロンバイオテクノロジー株式会社に委託した。

(3) PCR 法反応条件

PCR キットは PerfectShot Ex Taq (Takara Bio 社) を用いて行った。シンプレックス PCR 法では各プライマーを 1 μ M ずつ、マルチプレックス PCR 法においては各プライマーを Table 2-3 に示した濃度になるよう添加した後、抽出した DNA 溶液を 5 μ l 添加し、50 μ l の反応系でマルチプレックス PCR を行った。サーマルサイクラーは GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems 社) を使い、PCR 反応条件は次の通り行った。

94°C	2分30秒	} 30 サイクル
94°C	15秒	
55°C	15秒	
72°C	30秒	
72°C	3分	

PCR 反応液 5 μ l を 2 % アガロースゲル (Sigma 社) で TAB 緩衝液を用いた電気泳動を行った。電気泳動後の染色は、SYBR Green I (Invitrogen 社) を用いて PCR 産物の検出を行った。DNA のサイズマーカーには 100 bp DNA ladder (Takara Bio 社) を用いた。

(4) 検出感度評価

検出感度評価に用いる DNA は、実用性を考慮して操作性に優れた次のような方法で抽出した。寒天培地上に生育したコロニーの一部を 25 μ l の DNA 抽出キット Prepman Ultra Sample Preparation reagent (Applied Biosystems 社) に懸濁し、98°C、10 分間熱処理した。続いて、メーカーのマニュアルに従って遠心分離を行い、上清 20 μ l を滅菌水で 5 倍希釈したものを DNA 溶液とした。検出限界菌数を調査する際には、25 μ l の Prepman Ultra Sample Preparation reagent (Applied Biosystems 社) に対して、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 cells となるように調製した各菌懸濁液より DNA を抽出した。抽出方法はメーカーのマニュアルに従った。抽

出した DNA 溶液を用いて、マルチプレックス PCR 法、対象菌種検出用プライマーのみを用いたシングルプレックス PCR 法、および細菌のユニバーサルプライマーを用いた DNA 抽出確認用 PCR 法（以降、ユニバーサルプライマー-PCR 法と記載）を行い、3 種類の PCR 法において検出限界を比較することにより、検出感度の実用水準を評価した。

(5) 反応性評価

検出対象菌種の同種異株に対する反応性評価に用いる DNA 溶液は、第 2 章第 2 節 (4) と同様にして抽出を行った。抽出した DNA を用いてマルチプレックス PCR 法を行い、検出対象菌種の全ての菌株で予測される大きさのバンドが生じるかを調査した (Table 2-2)。

(6) 特異性評価

特異性評価で用いる DNA は、検出対象外菌種において擬似バンドが出やすい条件で特異性評価を行うため、高い精製度が期待できる DNA 抽出キット MagExtractor-Genome (Toyobo 社) および DNA 自動抽出装置 MFN-2000 (Toyobo 社) を用いて抽出した (Takeuchi *et al.* 2005)。抽出した DNA を用いてマルチプレックス PCR 法を行い、擬陽性バンドの有無を調査した。

(7) 人工陽性対照の作製

PerfectShot Ex Taq (Takara Bio 社) を用い、Table 2-4 に示した各プライマーを上流下流それぞれ 1 μ M ずつ添加した後、i-Prep Genomic DNA (タカラバイオ社) の 1000 倍希釈溶液 5 μ l を添加し、50 μ l の反応系で PCR を行った。サーマルサイクラーは GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems 社) を用い、PCR 反応条件は次の通り行った。

94°C	2分30秒	} 30サイクル
94°C	30秒	
55°C	30秒	
72°C	30秒	
72°C	3分	

それぞれの菌種に対応する人工陽性対照作製用プライマーから得られた PCR 反応増幅産物を、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 社) を用いて、キットに添付のプロトコールに従い精製した。精製された DNA 溶液を分光光度計 NanoDrop ND-1000 (Nanodrop 社) の核酸測定モードにて測定し、核酸濃度が 30 ng/ μ l となるように滅菌蒸留水で調整し、人工陽性対照溶液とした。続いて、L multiplex、P multiplex、または C multiplex の各々が対象と

する菌種の人工陽性対照溶液を 100 倍～5000 倍の範囲で希釈したものを混合し、人工陽性対照 DNA 混合液とした。

作製した人工陽性対照 DNA 混合液 5 μ l を用いてマルチプレックス PCR 法を実施し、推定される分子量の増幅断片がすべて検出されることを確認した（特開 2007-259730）。

第3節 結果

1 ビール混濁性乳酸桿菌用マルチプレックス PCR 法の開発

(1) プライマー設計と検出感度評価

ビール混濁性乳酸桿菌に対するマルチプレックス PCR 法においては、これまでの知見でビールの微生物汚染菌として報告されている乳酸桿菌のうち、比較的ビール混濁性の強い 6 菌種 *Lactobacillus brevis*, *L. lindneri*, *L. paracollinoides*, *L. coryniformis*, *L. plantarum*, および *L. casei* を検出対象とした (Table 2-1)。上記 6 菌種を一括して検出するため、16S rRNA 遺伝子の塩基配列をもとに作られた既報のプライマー、LBP2、L74P4-3、LOP4、LPP1、および LCPI と、*L. lindneri* 以外の 5 菌種の 16S rRNA 配列の中の共通配列で設計された下流プライマー UNP1、および *L. lindneri* 特異的プライマー対 LLITSF8 と LL23SR12 を混合し、ビール混濁性乳酸桿菌用マルチプレックス PCR 法プライマーミックスを作製した (Table 2-3)。本プライマーミックスを用いて、対象 6 菌種の DNA を鋳型にマルチプレックス PCR 法を実施した。

作製したビール混濁性乳酸桿菌用マルチプレックス PCR 法プライマーミックスを用いて検出感度の評価を行った。各検出対象菌種の代表株、*L. brevis* ABBC45、*L. lindneri* DSM20690^T、*L. paracollinoides* JCM11969^T、*L. coryniformis* JCM1164^T、*L. plantarum* JCM1149^T、および *L. casei* ATCC 334 を選択し、各 DNA 希釈系列に対し、ユニバーサルプライマー PCR 反応、シンプレックス PCR 法、およびマルチプレックス PCR 反応を行った (data not shown)。しかしながら、マルチプレックス PCR 法による検出感度は、シンプレックス PCR 法と同等の検出感度が得られなかった。PCR 反応の検出感度を改善するための施策の一つとして、プライマーの塩基対の長さを短くすることが効果的であることが知られているが、短すぎる場合は非特異的な反応が起こりやすくなり、対象菌種以外の微生物で陽性となる可能性が高くなる。そこで、*L. paracollinoides* に特異的な上流プライマー L74P4-3 と、*L. casei* に特異的な上流プライマー LCPI の塩基対の長さを調整し、検出感度の改善と特異性の向上を図ることとした。L74P4-3 の 3' 側に 3 塩基対長い配列を有する L74P1 と、LCPI の 3' 側を 6 塩基対短くした配列を有する LCP11 を上記プライマー LBP2、LLITSF8、LL23SR12、LOP4、および LPP7 とを適当な濃度比率で混合し、ビール混濁性乳酸桿菌用マルチプレックス PCR 法 (*L. multiplex*) プライマーミックスを作製した (Table 2-3)。各対象菌種に対する PCR 増幅産物の電気泳動写真を Fig 2-2 に示した。

作製したマルチプレックス PCR 法用プライマーミックスを用いて、上記 6 菌種の各検出対象菌種代表株 DNA 希釈系列を用いた検出感度評価を行った。その結果、いずれの菌種においても菌種特異的プライマー対を用いたシンプレックス PCR 法と同等の感度を示した

(Fig 2-3, 2-4)。

(2) 特異性評価

マルチプレックス PCR 法を行うにあたって確認すべきことのひとつは、検出対象とする菌種以外の微生物種に対して擬陽性反応が起こらないことである。シンプレックス PCR 法と比較して、1 反応系に含有するプライマーの数が多いマルチプレックス PCR 法は、PCR 反応中の非特異的な増幅反応が起こりやすいことが予想された。そこで、16S rRNA 配列が類似している近縁乳酸菌 6 菌種と、ビール工場における微生物検査で頻出する細菌（ビール工場環境検出菌）14 菌種より抽出した DNA を用いて、ビール混濁性乳酸桿菌用マルチプレックス PCR 法を行い、特異性の評価を行うこととした。その結果、検出対象菌種の DNA を用いた場合には予測される大きさの PCR 産物が得られたが、近縁菌とビール工場環境検出菌のどの菌種においては擬似バンドとなるような PCR 産物の増幅は観察されなかった。(Table 2-5)。

(3) 反応性評価

構築したビール混濁性乳酸桿菌用マルチプレックス PCR 法を製品の品質管理の一端として利用するためには、各検出対象菌種である *L. brevis*、*L. lindneri*、*L. paracollinoides*、*L. coeniformis*、*L. plantarum*、および *L. casei* に属する様々な菌株を用いた場合に、検出が可能であるかを確かめることが肝要である。そこで、*L. brevis* 55 株、*L. lindneri* 6 株、*L. paracollinoides* 12 株、*L. coeniformis* 6 株、*L. plantarum* 10 株、および *L. casei* 18 株より抽出した DNA を用いて、ビール混濁性乳酸桿菌マルチプレックス PCR 法を実施し、反応性を評価した (Table 2-6)。その結果、調査したすべての菌株において、それぞれの菌種で推定される大きさの PCR 産物が認められた分子量の増幅産物が認められた (data not shown)。

2. *Pectinatus* 属菌用マルチプレックス PCR 法の開発

(1) プライマー設計

偏性嫌気性のビール混濁性桿菌を一括して検出することを目的とし、*Pectinatus cerevisiophilus* と *Pect. frisingensis* を検出対象菌とする *Pectinatus* 属マルチプレックス PCR 法を構築することとした。*Pect. cerevisiophilus* および *Pect. frisingensis* の菌種特異的プライマーは、上流プライマーが 16S rRNA 遺伝子内に、また、下流プライマーは 16S-23S rRNA 遺伝子スペーサー領域に設計されている (Motoyama and Ogata 2000)。*Pect. cerevisiophilus* および *Pect. frisingensis* を一括して検出するため、この既報プライマー4 種類を配合し、*Pectinatus* 属用マルチプレックス PCR 法 (P multiplex) プライマーミックスを作製した。Table 2-3 にブラ

プライマーの配列と 1 反応液中のプライマー量、および増幅産物の大きさを示した。また、各対象菌種に対する PCR 増幅産物の電気泳動写真を Fig. 2-2 に示した。

(2) 検出感度評価

作製した *Pectinatus* 属用マルチプレックス PCR 法用プライマーミックスを用いて、各検出対象菌種基準株 *Pect. cerevisiophilus* DSM 20467^T および *Pect. fisingensis* DSM 6306^T の DNA 希釈系列を用いた検出感度評価を行った。その結果、いずれの菌種においても菌種特異的プライマー対を用いたシングルプレックス PCR 法と同等の感度を示した (Fig. 2-5)。

(3) 特異性評価

検出対象とする菌種以外の微生物種に対して擬陽性反応が起こらないことを確認するために、調製した *Pectinatus* 属用マルチプレックス PCR 法用プライマーミックスを用いて、特異性の評価を行った。*Pectinatus* 属菌の近縁種である *Selenomonas lactocifex*、*Zymophilus paucivorans*、および *Zymophilus raffinovorans* と、ビール工場における微生物検査で頻出する細菌 (ビール工場環境検出菌) 14 菌種より抽出した DNA を用いて *Pectinatus* 属菌用マルチプレックス PCR 法を行った。これらの菌株と、前述のビール工場環境検出菌から抽出した DNA を用いて *Pectinatus* 属菌マルチプレックス PCR 法を行い、特異性の評価を行うこととした。その結果、検出対象菌種の DNA を用いた場合には予測される大きさの PCR 産物が得られたが、近縁菌とビール工場環境検出菌のどの菌種においては擬似バンドとなるような PCR 産物の増幅は観察されなかった。(Table 2-5)。

(4) 反応性評価

構築した *Pectinatus* 属用マルチプレックス PCR 法が、各検出対象菌種である *Pect. cerevisiophilus* および *Pect. fisingensis* に属する他の菌株を用いた場合に、検出が可能であるかを確かめるため、*Pect. cerevisiophilus* 5 株、および *Pect. fisingensis* 47 株より抽出した DNA を用いて、*Pectinatus* 属菌マルチプレックス PCR 法を実施し、反応性を評価した (Table 2-6)。その結果、調査したすべての菌株において、それぞれの菌種で推定される大きさの PCR 産物が認められた分子量の増幅産物が認められた (data not shown)。

3 ビール混濁性球菌用マルチプレックス PCR 法の開発

(1) プライマー設計と検出感度評価

上記ビール混濁性乳酸桿菌用マルチプレックス PCR 法および *Pectinatus* 属用マルチプレックス PCR 法は、主として性状調査で桿菌が検出された際に適用できる。しかしながら、

桿菌であっても短桿菌の場合は球菌の可能性が否定できない場合もある。そこで、ビール混濁性球菌として知られている *Pedococcus dammosus*, *Ped. claussemii*, *M. cerevisiae* に加えて、弱いビール混濁性を持つが知見が少なく危険性が不明である *Ped. mopinatus* を検出対象菌種とし、一括して検出するビール混濁性球菌用マルチプレックス PCR 法を構築した。Table 2-2 に示した、それぞれの菌種特異的プライマーを混合して検出感度を評価したところ、*Ped. claussemii* および *Ped. mopinatus* において著しい感度の低下が見られた (data not shown)。また、*Ped. dammosus* と *Ped. mopinatus* の菌種特異的プライマー間で非特異的な反応が認められたため (data not shown)、この3菌種で新たにプライマーを合成した。プライマーの再設計にあたり、*Ped. dammosus* と *Ped. mopinatus* の 16S rRNA 塩基配列は高い相同性を示すことから (Dobson et al 2002)、2つの菌種を区別できるプライマーの設計が困難であった。また、マルチプレックス PCR 反応液に混合するプライマーの種類が増加すればするほど、予期せぬ PCR 反応の発生原因になり、検出感度低下や疑似バンドの増加などの問題が生じる恐れがある。以上のことから、*Ped. dammosus* と *Ped. mopinatus* の2菌種においては、菌種特異的なプライマーではなく両菌種を検出する共通プライマーを、16S rRNA 配列から設計することとし、PIDF1 および PIDR8 を作製した。

このように設計した2菌種共通プライマー対と、*Ped. claussemii* および *M. cerevisiae* のマルチプレックス PCR 法用プライマーを配合し、ビール混濁性球菌マルチプレックス PCR 法 (C multiplex, C cocci) 用プライマーミックスを作製した (Table 2-3)。各対象菌種に対する PCR 増幅産物の電気泳動写真を Fig 2-2 に示した。

作製したビール混濁性球菌用マルチプレックス PCR 法プライマーミックスを用いて、各検出対象菌種基準株 *Ped. dammosus* JCM 5886^T, *Ped. mopinatus* DSM 20285^T, *Ped. claussemii* DSM 14800^T, および *M. cerevisiae* DSM 20462^T の DNA 希釈系列を用いた検出感度評価を行った。その結果、いずれの菌種においても菌種特異的プライマー対を用いたシンプレックス PCR 法と同等の感度を示した (Fig 2-6)。

(2) 特異性評価

検出対象とする菌種以外の微生物種に対して擬陽性反応が起こらないことを確認するために、調製したビール混濁性球菌用マルチプレックス PCR 法プライマーミックスを用いて、特異性の評価を行った。ビール非混濁性 *Pedococcus* 属菌と考えられている *Ped. acidilactici*, *Ped. dextrinicus*, *Ped. pentosaceus*, *Ped. parvulus*, および醸造場より分離されることがあるビール非混濁性乳酸球菌 *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc paramesenteroides*, *Enterococcus casseliflavus* を検出対象外近縁菌種として扱った (Priest 1987)。これらの菌株より抽出された DNA を用いて、ビール混濁性球菌用マルチプレックス PCR 法を行い、特異性を評価し

た。その結果、ビール混濁性球菌用マルチプレックス PCR 法は、検出対象菌種の DNA を用いた場合には予測される大きさの PCR 産物が得られたが、検出対象外近縁菌種では、擬似バンドとなるような PCR 産物の増幅は観察されなかった (Table 2-5)。次に、ビール工場環境検出菌より抽出した DNA を用いて新菌種対応ビール混濁性球菌用マルチプレックス PCR 法を行ったところ、ビール工場環境検出菌からは擬似バンドとなるような PCR 産物は検出されなかった (Table 2-5)。

(3) 反応性評価

構築したビール混濁性球菌用マルチプレックス PCR 法が、各検出対象菌種である *Ped. dammosus*、*Ped. mopimatus*、*Ped. claussemi*、および *Megasphaera cerevisiae* に属する他の菌株を用いた場合に検出が可能であることを確かめるため、*Ped. dammosus* 13 株、*Ped. mopimatus* 2 株、*Ped. claussemi* 1 株、および *Megasphaera cerevisiae* 3 株より抽出した DNA を用いて、ビール混濁性球菌用マルチプレックス PCR 法を実施し、反応性を評価したところ、調査したすべての菌株において、それぞれの菌種で推定される大きさの PCR 産物が認められた分子量の増幅産物が認められた (Table 2-6)。

4. 人工陽性対照 DNA の作製

マルチプレックス PCR プライマーの配列を 5' 側に、 λ ファージ DNA 上の任意の領域の配列を 3' 側に有するようにプライマーを設計し、人工陽性対照作製用プライマーとした。このプライマーを用いて λ DNA を鋳型に PCR 反応を行なうと、両端にマルチプレックス PCR プライマー対の配列を持ち、その内側に λ DNA 領域を持つ合成 DNA が増幅される (Fig 2-7)。具体的に、L multiplex において *L. brevis* に対するマルチプレックス PCR 用プライマー対 LBP2 と UNP1 を例にとると、まず、 λ ファージ DNA 配列から任意に 100bp の領域 A を選択し、LBP1 とこの領域 A の両端の 5' 末端の塩基配列を持つ人工陽性対照 DNA 作製用プライマー APOSIF1 を設計する。次に、領域 A の 3' 末端の塩基配列を持つ人工陽性対照 DNA 作製用プライマー APOSIR1 を設計し、APOSIF1 と APOSIR1 を用いて λ ファージ DNA を鋳型に PCR 反応を行う。その結果、[LBP2 配列 (40 bp)-領域 A (108 bp)-UNP1 配列 (38 bp)] という構成の 186 bp のキメラ DNA 断片が得られる。次に *L. lindneri* に対するマルチプレックス PCR プライマー対、LLITF8 および LL23SR12 について、 λ ファージ DNA 配列から任意に 200 bp 程度の領域 B を選定し、同様に合成 DNA 断片を作製する。この操作を残りの 4 菌種の L multiplex 用プライマー対で繰り返すことにより、塩基数の異なる増幅産物が 6 種類得られることとなる。以上のようにして作製する増幅産物は、選定する λ DNA 領域の長さによって大きさの調節が自由自在にできるため、各マルチプレックス法で用いられてい

るプライマー対ごとに cDNA 領域の長さを変化させ、同時に反応させた場合でも電気泳動により明確に分けることが可能となった。このようにして得られた増幅産物を、マルチプレックス PCR 法を行なった際にすべてのバンドがほぼ均等に検出されるように適当な濃度比で混合し、人工陽性対照 DNA 溶液とした。本研究で構築した各マルチプレックス法における人工陽性対照用プライマーを Table 2-4 に示した。下線は、それぞれに対応するマルチプレックス PCR 法用プライマーの配列を表す。作製した人工陽性対照 DNA 溶液を鋳型に、それぞれ対応するマルチプレックス PCR 法用プライマーミックスを用いてマルチプレックス PCR 法をおこなったところ、推定される増幅産物のバンドが認められた (Fig 2-8)。このことから、マルチプレックス PCR 法の反応液に含まれていたプライマーがすべて正常に機能していることが確認できた。

Table 2-1. List of reference strains used in this study

Methods	Target species	Strain number ^a
L multiplex	<i>L. lindneri</i>	DSM 20690 ^T
	<i>L. brevis</i>	ABBC45
	<i>L. paracollinoides</i>	JCM 11969 ^T
	<i>L. casei</i>	ATCC 334
	<i>L. coryniformis</i>	JCM 1164 ^T
	<i>L. plantarum</i>	JCM 1149 ^T
P multiplex	<i>Pect. cerevisiphilus</i>	DSM 20467 ^T
	<i>Pect. frisingensis</i>	DSM 6306 ^T
C multiplex	<i>Ped. dammosus</i>	JCM 5886 ^T
	<i>Ped. mopmatus</i>	DSM 20285 ^T
	<i>Ped. clausenii</i>	DSM 14800 ^T
	<i>Megasphaera cerevisiae</i>	DSM 20462 ^T

^aReference strains of target species for each multiplex PCR method are listed

Table 2-2. Primers used for species-specific PCR

Target species	Primers	Direction	Primer sequences (5' to 3')	Target DNA	Predicted product size ^a (bp)	Reference
<i>L. brevis</i>	LBP2	Forward	CTGATTTCAACAATGAAGC	16S rDNA	861	Sakamoto et al. 1997
	UNP1	Reverse	CCGTCAAATTCCTTTGAGTTT	16S rDNA		Sakamoto et al. 1997
<i>L. hubbsii</i>	LLITSF8	Forward	AACCTACACCGATCAAAAATC	ITS region	850	patent No P2003-174905
	LL2SR12	Reverse	CTTAACTTCGATGCAACT	23S rDNA	854	patent No P2003-174905
<i>L. parvialbimoides</i>	L74P43	Forward	TTTTAAGATCGGATGAG	16S rDNA		Futabayashi et al. 1998
	UNP1	Reverse	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT	16S rDNA	729	Sakamoto et al. 1997
<i>L. casei</i>	LCP11	Forward	GAACCGCATGGTCTTGCC	16S rDNA		this study
	UNP1	Reverse	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT	16S rDNA		Sakamoto et al. 1997
<i>L. corviformis</i>	LOP4	Forward	GGGACTAGAGTAAGTGTAGTCC	16S rDNA	453	Sakamoto et al. 1997
	UNP1	Reverse	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT	16S rDNA		Sakamoto et al. 1998
<i>L. placentum</i>	LPP1	Forward	TGGACCGCATGGTCCGAGC	ITS region	490	Sakamoto et al. 1997
	UNP1	Reverse	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT	16S rDNA		Sakamoto et al. 1997
<i>Pect. corcovatiphilus</i>	16C-F	Forward	CGTATGCAGAGATGCATATT	16S rDNA	621	Motoyama et al. 2000
	IC-R	Reverse	CACCTTTACAAAGTATCTAC	ITS region		Motoyama et al. 2000
<i>Pect. frungens</i>	16F-F	Forward	CGTATCCAGAGATGGATATT	16S rDNA	761, 883	Motoyama et al. 2000
	IF-R	Reverse	CCATCCCTTTGAAAATCTC	ITS region		Motoyama et al. 2000
<i>Pect. chimonis</i>	PDAF3	Forward	GCTTGCATCGAAGGTGATTTG	16S rDNA	142	this study
	PDAR5	Reverse	AAAAATAAACCAATGC GGTTTCAT	16S rDNA		this study
<i>Pect. nospicatus</i>	PINOF1	Forward	TAATACCGCATAAATAAAGTA	16S rDNA	299	this study
	PINOR1	Reverse	TCACACACGTTCTTCTCC	16S rDNA		this study
<i>Pect. chausseus</i>	PCLAF1	Forward	CTCCTTTCTAAGGAATAATAC	16S rDNA	220, 410	this study
	PCLAR1	Reverse	GGCAAAGTGGTTTATGAG	16S rDNA		this study
<i>Megaphobea cepharote</i>	Me-t1	Forward	ACCGAATACGATCTAAAG	16S rDNA	881	this study
	Me-t2	Reverse	CTTCCGAAAGAAGAACAGG	16S rDNA		this study

^abp base pairs

Table 2. 3. Primers used for multiplex PCR

Methods	Primers	Direction	Primer sequences (5' to 3')	Target species	Target DNA	Amount in one tube(μ l) ^a	Reference	
L multiplex	LBP2	Forward	CTGATTTCAACAAATGAAGC	<i>Lactobacillus brevis</i>	16S rDNA	0.6	Sakamoto et al. 1997	
	L74P-1	Forward	GGATTTTAAACATCGGATGAG	<i>L. panacollinoides</i>	16S rDNA	0.4	this study	
	LCF11	Forward	GAACCGCATGGTTCITGGC	<i>L. casei</i>	16S rDNA	0.4	this study	
	LOP4	Forward	GGACTAGAGTAACTGTTAGTCC	<i>L. cornuformis</i>	16S rDNA	0.4	Sakamoto et al. 1997	
	LPP7	Forward	GTGTAAAGAAAGAACTTATC	<i>L. plantarum</i>	16S rDNA	1.2	this study	
	LLITS8	Forward	AACTTACACCGATCAAAAATC	<i>L. hindawi</i>	ITS region	0.8	patent No.P2003-174905	
	LL3SR12	Reverse	CTTAAACCTTCGATGCAACT	<i>L. hindawi</i>	24S rDNA	0.8	patent No.P2003-174905	
	UNP1	Reverse	CCGTCAAITTCCTTTGAGTTT	<i>Lactobacillus</i> (consensus primer)	16S rDNA	1.0	Sakamoto et al. 1997	
	P multiplex	16C-F	Forward	CGTATGCAGAGATGCATATT	<i>Pectinatus cerevisiophilus</i>	16S rDNA	0.8	Motoyama et al. 2000
		IC-R	Reverse	CAGCTCTTACAAGTATCTAC	<i>Pect. cerevisiophilus</i>	ITS region	0.8	Motoyama et al. 2000
16P-F		Forward	CGTATCCAGAGATGGATATT	<i>Pect. frisingensis</i>	16S rDNA	0.8	Motoyama et al. 2000	
IF-R		Reverse	CCATCCTCTTGA AAAATCTC	<i>Pect. frisingensis</i>	ITS region	0.8	Motoyama et al. 2000	
C multiplex	PIDF1	Forward	TGTGAGAGTAACTGCTCATG	<i>Pedhococcus danuensis</i> & <i>Pod</i>	16S rDNA	0.8	this study	
	PIDR8	Reverse	ACGCTAATCTCTTTTGTTA	<i>Pod. danuensis</i> & <i>Pod. mopaniensis</i>	16S rDNA	0.8	this study	
	PCLAF3	Forward	CATTCGGTTAAAAGAAATCA	<i>Pod. clausenii</i>	16S rDNA	0.8	this study	
	PCLAR3	Reverse	GGTTAAATACCGTCACTGGG	<i>Pod. clausenii</i>	16S rDNA	0.8	this study	
	Me-F1	Forward	ACCGAATACGGATCTAAAAG	<i>Megaspheera cerevisiae</i>	16S rDNA	0.8	this study	
	Me-r1	Reverse	TTAAGACCGACTTACCGA	<i>Megaspheera cerevisiae</i>	16S rDNA	0.8	this study	
	U114F2	Forward	GCACAGGCGG	bacteria (universal sequence)	16S rDNA	1.0	this study	
	U139R2	Reverse	ACGGGGGGTG	bacteria (universal sequence)	16S rDNA	1.0	this study	

^aPrimer concentration:100 μ M

Table 2-4 Primers for artificial positive controls

Methods	Primers ^b	Direction	Primer sequences (5' to 3')	Corresponding multiplex primer	Predicted product size (bp) ^a
L multiplex	APOS1P1	Forward	<u>CTG</u> ATTCAACAATGAAGCGAAGCGAAGGACAACCTGAAG	LBP2	186
	APOS1R1	Reverse	CCGTCAAATCCTTTGAGCTTATATGTTGGTATTCCTCCCTC	UNP1	
	APOS1P1L	Forward	<u>AACTT</u> CACCCGATCAAAAATTCGGGTGTCACGGTGGTG	LLTSP8	292
	APOS1R1L	Reverse	<u>CTTAA</u> CTTGCATGCAACTCACCGTTACGTTGTATCTG	LL23SRU2	
	APOS1P1.74	Forward	<u>GG</u> ATTTAACATCGGATGAGGACATCACCAATTAAGGGC	L74P1	393
	APOS1R1.74	Reverse	CCGTCAAATCCTTTGAGCTTCTGTATGCCGGTTTAAACG	UNP1	
	APOS1P1C	Forward	<u>GAA</u> CCGATGGTCTTGGCAACTCGGTCGGTTACCCGG	LCP11	518
	APOS1R1C	Reverse	CCGTCAAATCCTTTGAGCTTGGCGGTGATGTAACAC	UNP1	
	APOS1P1O	Forward	<u>GGG</u> ACTAGATAACTGTTAGTCCGCTTTTAAAGACTGAACGC	L0P1	640
	APOS1R1O	Reverse	CCGTCAAATCCTTTGAGCTTATTTGATGAAGCCAGGAG	UNP1	
	APOS1P1P	Forward	<u>GT</u> GTAAAAGAAAGAACTTATCTGATAGGTTGCATGCTAG	LPP7	847
	APOS1R1P	Reverse	CCGTCAAATCCTTTGAGCTTGGTATCGTTTGAGGGCAG	UNP1	
	APOS1P1C2	Forward	<u>CGT</u> ATGCAGAGATGCATATTGAACCTCTCTGTTTACTG	16C-P	250
	APOS1R1PC	Reverse	CACCTTTACAAGTATCTACCAGACATCATGATTCAGC	IC-R	
APOS1P1PF	Forward	<u>CGT</u> ATCCAGAGATGGATJTTCTTAACTCAACAGAGATGC	16P-F	433	
APOS1R1PF	Reverse	CCATCCTCTTGAAAATCTCCAGGTGCAGTACAGCATG	IF-R		
C multiplex	APOS1P1D	Forward	<u>TGT</u> GAGAGTAACTGCTCAUGGATTTCTGGCGATTGAAG	P1D1	205
	APOS1R1PD	Reverse	ACGCCATAATCTCTTTGGTTAGGCTTATCCCAGGAATCTG	P1D8	
	APOS1P1CL	Forward	<u>CAT</u> TCCGGTAAAAGAATCAAGATGGAGTCTGAGGTC	PCLAF3	350
	APOS1R1PCL	Reverse	<u>GGT</u> AAAATACCCTCACTGGTTCATTTGCCACCGTTTGCAC	PCLAR3	
APOS1P1MC	Forward	<u>ACCG</u> ATACGATCTAAAGTAAAGCAAGCAATGCGCTAG	Me-13	500	
APOS1R1MC	Reverse	<u>TAA</u> AGACCGACTTACCGAATTGCTCTTTGCCCCGTC	Me-14		

^abp base pairs.

^bPrimers used for the amplification of artificial positive control DNAs. The underlined parts correspond to the sequences of species-specific PCR primers listed in Table 2. All primers were designed in this study.

Table 2-5. Specificity evaluation of each multiplex PCR method

Species tested ^a	Multiplex PCR method ^b		
	L	P	C
<i>Lactobacillus brevis</i> ABB045	+	N T	N T
<i>Lactobacillus buchneri</i> DSM 20690 ^T	+	N T	N T
<i>Lactobacillus paracollinoides</i> JCM 11969 ^T	+	N T	N T
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334	+	N T	N T
<i>Lactobacillus coryniformis</i> JCM 1164 ^T	+	N T	N T
<i>Lactobacillus plantarum</i> JSM 1149 ^T	+	N T	N T
<i>Lactobacillus buchneri</i> JCM 1115 ^T	-	N T	N T
<i>Lactobacillus fermentum</i> JCM 1173 ^T	-	N T	N T
<i>Lactobacillus fructivorans</i> JCM 1117 ^T	-	N T	N T
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> JCM 1012 ^T	-	N T	N T
<i>Lactobacillus parakefiri</i> JCM 8573 ^T	-	N T	N T
<i>Lactobacillus parabuchneri</i> DSM 5707 ^T	-	N T	N T
<i>Pectinatus cerevisiiphilus</i> DSM 20467 ^T	N T	+	N T
<i>Pect. frisingensis</i> DSM 6306 ^T	N T	+	N T
<i>Selenomonas lactificus</i> DSM 20757 ^T	N T	-	N T
<i>Zymophilus paucivorans</i> DSM 20756 ^T	N T	-	N T
<i>Z. raffinosivorans</i> DSM 20765 ^T	N T	-	N T
<i>Pedococcus acidilactici</i> JCM 5885 ^T	-	N T	-
<i>Ped. dextranicus</i> JCM 5887 ^T	-	N T	-
<i>Ped. pentosaceus</i> JCM 5890 ^T	-	N T	-
<i>Ped. parvulus</i> JCM 5889 ^T	-	N T	-
<i>Lactococcus lactis</i> JCM 5805 ^T	-	N T	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> JCM 6124 ^T	-	N T	-
<i>Leuconostoc panamense</i> NCFB 803 ^T	-	N T	-
<i>Enterococcus casseliflavus</i> HC268	-	N T	-
<i>Ped. damnosus</i> JCM 5886 ^T	N T	N T	+
<i>Ped. mopaniensis</i> DSM 20285 ^T	N T	N T	+
<i>Ped. clausenii</i> DSM 14800 ^T	N T	N T	+
<i>Megasphaera cerevisiae</i> DSM 20462 ^T	N T	N T	+
<i>Lactococcus lactis</i> HC311 ^c	-	-	-
<i>Clostridium beijerinckii</i> HC350	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i> HC367	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i> HC417	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i> HC432	-	-	-
<i>Staphylococcus warneri</i> HC437	-	-	-
<i>Propionibacterium acnes</i> HC440	-	-	-
<i>Bacillus thuringiensis</i> HC442	-	-	-
<i>Pantoea agglomerans</i> HC453	-	-	-
<i>Paenibacillus amylolyticus</i> HC459	-	-	-
<i>Paenibacillus janniae</i> HC466	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> HC475	-	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i> HC534	-	-	-
<i>Sporolactobacillus racemicus</i> HC566	-	-	-

^aClosely related species to the target groups and 14 frequent brewery isolates were evaluated for the specificity tests with three multiplex PCR methods

^bSymbols - negative reaction, N T - not tested

^cStrains HC311-HC566, represent the 14 frequently detected species in breweries

Table 2-6. Strains used for the determination of reactivity of multiplex PCR methods

Species	Culture Collection	No
<i>Lactobacillus brevis</i>	JCM	1059 ^T , 1170
	ABBC	3, 4, 12, 34, 36, 37, 42, 43, 44, 45, 46, 56, 64, 65, 67, 70, 76, 77, 78, 79, 84, 85, 86, 99, 100, 104, 399, 400, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 411, 412, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 421, 422, 423, 424, 425, 427, 429, 431, 432
<i>L. lindneri</i>	DSM	20690 ^T , 20691, 20692
	HC	92, 95, 98
<i>L. paracollinoides</i>	JCM	11969 ^T
	ABBC	75, 81, 82, 83, 90, 91, 92, 93, 420, 516, 1X51
<i>L. casei</i>	ATCC	334
	JCM	1134 ^T
	IAM	1045 (JCM 20024)
	ABBC	39, 52, 72, 73, 96, 206, 222, 223, 226, 376, 410, 413, 426, 428, 430
<i>L. corymiformis</i>	JCM	1164 ^T
	ABBC	94, 95, 101, 102, 252
<i>L. plantarum</i>	JCM	1149 ^T
	IAM	1041
	ABBC	38, 55, 58, 80, 87, 97, 203, 377
<i>Pectinatus frisingensis</i>	DSM	6306 ^T , 20465, 20759, 20760, 20761
	ABBC	136, 437, 451, 453, 454, 455, 456, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499
<i>Pect. cerevisiphilus</i>	DSM	20467 ^T , 20466, 20762, 20763
	ABBC	474
<i>Pedococcus dammosus</i>	JCM	5886 ^T
	IFO	3889, 3896
	ABBC	2, 15, 16, 17, 18, 23, 24, 25, 478, 500
<i>Ped. claussemii</i>	DSM	14800 ^T
<i>Ped. mopimatus</i>	DSM	20285 ^T , 20287
<i>Megasphaera cerevisiae</i>	DSM	20462 ^T
	JCM	6129
	ABBC	515

第4節 考察

ビール混濁性乳酸菌 6 菌種 *Lactobacillus brevis*, *L. lindneri*, *L. paracollinoides*, *L. coymiformis*, *L. plantarum*, および *L. casei* を一括して検出するマルチプレックス PCR 法を構築した。プライマーの設計箇所、長さおよび配合比率を調整し、検出感度についてシンプレックス PCR 法と比較したところ、対象菌種の DNA 溶液希釈系列において検出限界となる希釈段階は同程度であったことから (Fig 2-2, 2-3)、今回構築したビール混濁性乳酸桿菌用マルチプレックス PCR 法は、従来のシンプレックス PCR 法と同等の検出感度を有することが示された。続いて、近縁のビール非混濁性乳酸菌 6 菌種とビール工場環境菌 14 菌種に対してビール混濁性乳酸桿菌用マルチプレックス PCR 法を適用したところ、擬似バンドとなるような PCR 産物は確認できなかったことから (Table 2-5)、本 PCR 法が実用水準を満たす特異性を有していることが示された。さらに、代表株以外の *L. brevis*, *L. lindneri*, *L. paracollinoides*, *L. coymiformis*, *L. plantarum*, および *L. casei* の供試株に対してビール混濁性乳酸桿菌用マルチプレックス PCR 法を行ったところ、どの PCR 反応においても推定される増幅産物が認められたため、本 PCR 法が実用水準を満たす反応性を有することが確認できた。このビール混濁性乳酸桿菌用マルチプレックス PCR 法の構築過程においては、対象 6 菌種中、5 菌種に対応する下流プライマーを共通プライマーにし、配合するプライマーの種類を少なくすることで、非特異的な増幅反応を抑えている。

次に、*Pectinatus* 属の 2 菌種である *Pectinatus cerevisiophilus* および *Pect. frisingensis* を一括して検出するマルチプレックス PCR 法を構築した。16S rRNA 遺伝子と ITS 領域に設計された既報のプライマーを配合し、シンプレックス PCR 法と比較したところ、対象菌種の DNA 溶液希釈系列において検出限界となる希釈段階は同程度であったことから (Fig 2-4)、今回構築した *Pectinatus* 属菌用マルチプレックス PCR 法は、従来のシンプレックス PCR 法と同等の検出感度を有することが示された。続いて、近縁のビール非混濁性細菌とビール工場環境菌 14 菌種に対して *Pectinatus* 属菌用マルチプレックス PCR 法を適用したところ、擬似バンドとなるような PCR 産物は確認できなかったことから (Table 2-5)、本 PCR 法が実用水準を満たす特異性を有していることが示された。さらに、代表株以外の *Pectinatus* 属菌の供試株に対して *Pectinatus* 属菌用マルチプレックス PCR 法を行ったところ、どの PCR 反応においても推定される増幅産物が認められたため、本 PCR 法が実用水準を満たす反応性を有することが確認できた。

続いて、ビール混濁性球菌 4 菌種 *Pedococcus damnosus*, *Ped. mopimatus*, *Ped. clausenii*, および *Megasphaera cerevisiae* を一括して検出するビール混濁性球菌用マルチプレックス PCR 法を構築した。プライマーの設計箇所、長さおよび配合比率を調整し、シンプレックス

クス PCR 法と比較したところ、対象菌種の DNA 溶液希釈系列において検出限界となる希釈段階は同程度であったことから (Fig 2-5)、今回構築したビール混濁性球菌用マルチプレックス PCR 法は、従来のシンプレックス PCR 法と同等の検出感度を有することが示された。また、近縁のビール非混濁性 *Pedococcus* 属菌 4 菌種、ビール非混濁性乳酸球菌 3 菌種、およびビール工場環境菌 14 菌種に対してビール混濁性球菌用マルチプレックス PCR 法を適用したところ、擬似バンドとなるような PCR 産物は確認できなかったことから (Table 2-5)、本 PCR 法が実用水準を満たす特異性を有していることが示された。さらに、*Ped. damnosus*、*Ped. mopimatus*、*Ped. claussemii*、および *Megasphaera cerevisiae* の供試株に対してビール混濁性球菌用マルチプレックス PCR 法を行ったところ、どの PCR 反応においても推定される増幅産物が認められたため、本 PCR 法が実用水準を満たす反応性を有することが確認できた。本ビール混濁性球菌用マルチプレックス PCR 法においては、*Ped. damnosus* と *Ped. mopimatus* に対応する共通プライマーを使用することで、配合するプライマー数を少なくする施策を採用した。

以上述べたように、本章で構築したマルチプレックス PCR 法では、*Lactobacillus* 属 6 菌種、*Pectinatus* 属 2 菌種、およびビール混濁性乳酸球菌 4 菌種をあえて別の PCR 反応系として開発に着手した。その理由は 2 つある。ひとつは、12 菌種を一括して検出するマルチプレックス PCR 法を構築するためには、多数のプライマーを 1 反応系に組み込むことになるため、開発が困難になることである。

もう一方の理由は、実際の運用上、柔軟に使える検査系が求められていたことである。分子生物学的手法がビール混濁性細菌の判定に有用であることは前述した通りであるが、伝統的な性状調査は対象とする微生物菌種を把握する上で重要であることにはかわりはない。また、今回のマルチプレックス PCR 法構築の目的としては、性状調査が曖昧であった場合に、可能性のある菌種に対応する PCR 同定法を適用させることであるため、基本的には顕微鏡観察とグラム染色の結果をもとに試験を行うことを想定した。たとえば、適用の例として、顕微鏡観察において明らかな桿菌が認められ、グラム染色では不定という結果であれば、検出された菌体に対して L multiplex と P multiplex を実施すればよい (Fig 2-9)。また、グラム陽性であるが、桿菌と球菌の区別が付かない場合には L multiplex と C multiplex を行えばよく、このほかにも性状調査結果のパターンによって柔軟に対応できる。

さらに、本研究においては製造現場での実用を考慮して、DNA 抽出法や PCR 反応で使用する試薬を選択した。すなわち、PCR 反応にも使用でき、微量な菌体から簡単に DNA 抽出を行うことができる、Prepman Ultra Sample Preparation reagent (Applied Biosystems 社) や、

PCR 用 DNA ポリメラーゼ、反応バッファーおよび dNTP Mixture がすでに混合されている PerfectShot Ex Taq (Takara Bio 社)、ならびに電気泳動したゲルの染色には洗淨、脱色操作が必要なく、Ethidium Bromide よりも変異原性が低い SYBR Green I (Invitrogen 社) を使用した。その結果、試薬や試料のコンタミネーション防止や、作業者の操作手順の簡略化、さらには試験環境の安全性確保につながったと考えている。

最後に、本研究で用いられた人工陽性対照 DNA は、*λ*ファージ DNA 配列上の任意の長さの領域を用いて作製されるため、選定する領域の長さを変えることで複数の陽性対照のバンドを明確に分けることができた。従って、マルチプレックス PCR 法で配合されたすべてのプライマー対の増幅反応を 1 反応系で確認することが可能となったため、微生物試験法の簡易化、誤操作の防止さらに試験費用の低減につながることを期待される。また、万一サンプル DNA に陽性対照が混入した場合でも、サンプルと陽性対照の増幅産物の長さが異なるため、誤判定を防ぐことができる。本研究で *λ*ファージ DNA を用いた理由は、マルチプレックス PCR 法で対象とする菌種と近縁種でないこと、および様々なメーカーから市販されており容易に入手可能であったためである。すなわち、*λ*ファージ DNA 以外にも *φ*X174 ファージ DNA (Accession No. NC-001422) などのような配列が既知で入手可能な DNA でも代用は可能である。しかしながら、選定する *λ*ファージ DNA 配列上の領域は、前述のように塩基数を変化させることで互いに判別は可能であるが、人工陽性対照同士で非特異的な増幅反応が起こらないためにも、互いに重ならない領域を選ぶのが望ましい。このような設計上の注意点はあるものの、本人工陽性対照 DNA は、前述のように高い応用性を持ち、また、プライマーの設計と短時間で終了する PCR 反応によって簡便に作製できる点が優れていると考えている。

本人工陽性対照 DNA 作製法は、ビール混濁性細菌の検査法だけでなく、様々な分野のマルチプレックス PCR 法で利用できることから、今後の新規検査法の構築においても活用されることが期待される。

第5節 要約

近年、新規ビール混濁性細菌の報告が相次ぐことから、検査対象菌種が増え、操作が煩雑となるため、個別のシンプレックス PCR 法による検出菌同定が実用上困難になりつつある。一方、菌種同定 PCR 法に供する前段で行われる性状調査の結果は曖昧であり、対象菌種が絞り込めない状況により、製品の微生物検査において混濁性菌の検査漏れが問題となってきた。そこで、強いビール混濁性細菌として報告されている 12 菌種を対象としたマルチプレックス PCR 法を構築した。

ビール混濁性乳酸菌 6 菌種、*Lactobacillus brevis*、*L. lindneri*、*L. paracollinoides*、*L. coeliformis*、*L. plantarum*、および *L. casei* を一括して検出する L multiplex、*Pectinatus* 属 2 菌種 *Pectinatus cerevisiophilus* および *Pect. frisingensis* を一括して検出する P multiplex、ならびにビール混濁性球菌 4 菌種 *Pedococcus danmosus*、*Ped. mopinatus*、*Ped. clauseni*、および *Megasphaera cerevisiae* を一括して検出する C multiplex を構築し性能を調査したところ、いずれも実用水準を満たした検出感度、特異性、および同種異株に対する反応性を有していることが示された。本研究により、簡単で迅速なビール混濁性細菌の網羅的検査を構築することができた。

さらに、 λ DNA 配列と対象ビール混濁性細菌の遺伝子配列を組み合わせた人工陽性対照 DNA 溶液の作製法を開発した。本 DNA 溶液を使用することにより、微生物試験環境に対象菌 DNA 溶液を持ち込むことなく、1 反応系ですべてのプライマーの反応性を確認することが可能となった。

第3章

ビール馴化が乳酸菌に及ぼす影響の考察

第1節 緒言

日本において最も流通しているビールは加熱殺菌されていないビール、いわゆる生ビールであり、近年の消費者の嗜好の変化により、生ビールの製造は日本を始め世界的に増加傾向にある。生ビールの製造工程では、加熱による殺菌工程を行わないため、新鮮な香味が保たれる反面、微生物リスクが高くなる。そのため、多くの生ビールは製造工程において珪藻土ろ過やフィルターろ過法を用いた除菌処理がなされている (Baek 1992, Broderick 1982)。その中でも、メンブレンフィルターによるろ過法は除菌性能と耐圧性に優れているのに加え、取り扱いが簡便なことからも、近年多用されるようになっており、生ビールを微生物汚染から守るための最後の砦と言っても過言ではない、重要な管理ポイントの一つである (Kunze 2004)。近年のビール業界でも国内総生産量の 8 割以上がメンブレンフィルターによるバイオバーデン管理、除去が行われているとも言われている (中村ら 2007)。

メンブレンフィルターによる一般的なろ過滅菌は 1970 年代から急速に進歩を遂げてきた。主に、高温で滅菌できない医薬品や飲料に用いられ、0.20/0.22 μm フィルターが無菌ろ過フィルターとして使用されてきた。日本薬局方での定義は、「一般に滅菌を目的とした滅菌フィルターは膜の有効ろ過面積 (cm^2) 当たり、適切な条件下で培養された指標菌 *Brevundimonas diminuta* (ATCC19146) 又はこれより小さな適当な菌を 10^7 個以上チャレンジして二次(ろ過後)側に無菌のろ液が得られること」としている (第 15 改正日本薬局方)。また、ASTM (American Society for Testing and Materials: ASTM F838-05) と HIMA3 (Health Industry Manufacturers Association) にも同様の記述がある。すなわち、フィルターのろ過性能とはバクテリアチャレンジ試験で有効性が示されるものと規定されているが、本試験は破壊検査であるため、物理的な処理による非破壊的な「完全性試験」で代用されている。日本においてメンブレンフィルターを提供している会社は数社存在するが、各ロットの品質保証には非破壊の完全性試験のデータが汎用されている (吉本 1997, 川村 1998)。

ここで、ビール製造工程においては商業的無菌性、すなわち有害細菌や流通条件下で製品の変質あるいは腐敗の原因となる微生物が死滅・生育不可能な状態にあることが重要であり、すべての微生物を除去する必要はないこと、あるいは 0.20/0.22 μm のメンブレンフィルターはビールろ過の際に圧力損失が大きいことから、実際のビール製造では除菌フィルターとしてやや孔径が大きい 0.45 μm 、あるいは 0.65 μm のものが一般的に使用されていることを補足しておく (Kunze 2004、

Freeman 2006)。

これらの市販メンブレンフィルターの性能はメーカーや素材によって大きく異なるのが現状である。すなわち、ビール工場において適切な微生物管理を行うには、除菌フィルターの性能を精査し、管理基準に見合ったフィルターを選択することが重要となってくる。この選択基準の一つとして挙げられるのがフィルターの孔径であり、一般にその孔径に対応する微生物を指標菌とした除菌性能で規定される (Table 3-1, Bowman et al 1967, Ohsumi et al 1991, Jorntz et al 2002)。一方、ビールに対する除菌性能を評価するためには当然ビール混濁菌を対象とした性能評価を行うことが適しているが、ビール業界ではフィルター試験に関する詳細な条件は明確に定められていない。そこで、ビールろ過を用いた除菌フィルターを正しく見極めるためには、適切な性能評価試験条件を検討する必要がある。

本研究ではビールろ過工程におけるメンブレンフィルターの性能評価試験条件の検討を行い、適切な指標菌の選定、および培養条件について調査することにした。まず、適切な性能評価試験を行うにあたって、実際のビール製造工程を想定した微生物菌種の選択が重要となる (Priest and Stewart 2005)。醸造工程や酵母タンクでの汚染は一次汚染と呼ばれ、これまでの知見から *L. brevis* や *L. lindneri* などが原因菌となることが知られている (Fig. 3-1, Back 1994a)。また、パッケージング工程での混入は二次汚染と呼ばれ、*Pectinatus* 属や *Megasphaera* 属などの偏性嫌気性菌が代表的であることが報告されている。従って、メンブレンフィルターを評価するにあたっては醸造工程で混入したビール混濁性菌が除菌対象となることから、*Lactobacillus* 属に代表される一次汚染菌を供試菌として選択することが望ましいと考えた。

序章で述べた通り、*Lactobacillus* 属菌のうち、*L. lindneri* や近年新菌種提案された *L. paracollinoides* はビール製造現場や回収容器から分離される事例が増加しており、通常の検査培地で検出が難しいものが多いことが報告されている (Back 1994c, Suzuki et al 2004b, 2004c)。その一方で、菌株保存機関から購入できる株は、当該機関が培養培地として推奨する MRS 培地で良好な生育性を示す。すなわち、このような実験室で購入・保管されて培養される菌株と、ビール工場環境に生育する株では生理的に大きな違いがあると考えられた。また、自然環境から分離してきた状態と実験室で培養を繰り返した株では、菌体の大きさやフィルターろ過性に違いが現れるという知見もあることから (Anderson and Heffernan 1965, Wang et al 2008, Silbaq 2009)、フィルターろ過工程における微生物品質管理の指標菌株として MRS 培地で培養した実験室株を用いるのは適していないと考えられた。

一方、これまでの知見から、ビール混濁性乳酸菌はホップを含むビール環境に長年生育することによってホップ耐性機構を獲得していったことが提唱されており、ビールに深く馴化した状態が本来の状態であることが示唆されている (Suzuki et al 2008a, 2008c)。そこで、本研究においてはこの状態を模擬的に作り出すため、一定期間ごとにビールで植え継ぎを繰り返す、いわゆるビール馴

化を行った株を用いることとした。

このような背景をふまえて、除菌フィルター性能評価試験の検討を行い、ビール混濁性乳酸菌がビール環境に順応した場合のリスクについて考察を行った。

第2節 材料および方法

(1) 菌株および培養条件

本研究では Japan Collection of Microorganisms (JCM)、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) および当社の ABBC と LA、HC バクテリアカルチャーコレクションに保存されている菌株を用いた。培養は、塩酸で pH を 5.5 に調整した MRS 培地 (Merek 社) を用いて、嫌気条件下、25°C で行った。MRS 培地に難培養性を示すビール混濁性乳酸菌株 *Lactobacillus lindneri* DSM 20692TM および *L. paracollimoides* JCM 11969TM (以降、viable-but nonculturable を示す vn をつけた株番号で表記する) は、後述のビール馴化方法によって取得した。*L. lindneri* DSM 20692TM および *L. paracollimoides* JCM 11969TM の培養には ABD (Advanced Beer-spoiler bacteria detection) 培地を用いた。ABD 培地の組成を Table 3-2 に示した。

(2) ビールへの馴化

ガス抜きしたピルスナー・タイプのビール (Super Dry, Asahi Breweries 社) をガス抜き後、pH 4.2 になるよう 5N NaOH で調整し、フィルターユニット (Nalgene 社) による除菌後 10ml ずつポリプロピレン製のチューブに分注した。分注したガス抜きビールに、約 5×10^5 cells となるように接種した *L. paracollimoides* 株および *L. lindneri* 株を繰り返し植え継いだ。なお、植え継ぎは、*L. paracollimoides* 株については 4 日間ごと、*L. lindneri* 株については 7~10 日間ごとに行った。

(3) フィルターろ過試験および LRV 測定方法

MRS 培地、又はガス抜きビール (NaOH で pH 5.0 に調整) で培養した菌体を 50 ml のガス抜きビール (pH 4.2) に最終菌濃度が 10^6 - 10^7 cells/ml となるように懸濁し、滅菌済みの 0.65 μ m 孔径のメンブレンフィルター (Durapore, Millipore 社) を載せた 47 mm 口径のフィルターホルダー (PP-47, Advantec 社) を用いてろ過した (Fig. 3-2)。ろ液は、50 ml のガス抜きビール (NaOH で pH 7.0 に調整) を入れた滅菌プラスチックで受けることにより、菌体が低 pH 下に長時間接触しないようにした。メンブレンフィルターに投じる菌液 (一次側) の菌濃度と、ろ過されたろ液 (二次側) の菌濃度を MRS 寒天培地上の Colony forming units (CFU) にて計測し、下式により LRV (Log Reduction Value) を算出した (Ohsumi et al. 1991, Brough et al. 2002)。

$$LRV = \log_{10} \{ (\text{一次側菌濃度}) / (\text{二次側菌濃度}) \}$$

例えば、 10^6 cells/ml の菌液 (一次側) をフィルターろ過し、ろ液 (二次側) の菌濃度が 10^4 cells/ml となった場合には、LRV は 2 となる。

(4) 電子顕微鏡観察

ビール馴化菌、および未馴化菌を遠心分離によって回収し、1 %のグルタルアルデヒドで 4°C、4 時間処理した後、1 %四酸化オスミウムで 4°C、3 時間処理し固定した。ビール馴化菌を過後フィルターの電子顕微鏡観察においては、フィルターが四酸化オスミウムに対する耐薬品性がなかったため、1 %のグルタルアルデヒドで 4°C、4 時間処理することにより固定を行った。固定サンプルは 30 %から 99.5 %のエタノール濃度まで 10 %刻みで室温にて脱水を行い、酢酸イソアミルにて置換した後、臨界点乾燥機で乾燥した。白金蒸着を行ったのち、走査型電子顕微鏡 (S-4300, Hitachi 社)にて観察を行った。

(5) 蛍光活性染色法による乳酸菌の検出および菌体サイズの計測

菌体を終濃度 1 µg/ml DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, Sigma-Aldrich 社) と CFDA (5-[and 6-] carboxyfluorescein diacetate [5(6)-CFDA, Invitrogen 社], 50 µg/ml in PBS buffer [pH 7.4])で染色し、0.4 µm 孔径のポリカーボネートフィルター (Advantec 社)に集菌し、µFinder (マイクロファインダー)微生物検査システム (Asahi Breweries 社)で検出と計測を行った。

µFinder 微生物検査システムはオートフォーカスユニットを搭載した Leica 社製落射蛍光顕微鏡と、CCD カメラ、XY 軸自動ステージおよびそれらを制御するソフトがインストールされたパソコンから構成されている。検出方法は、まず一次検出モードで供試メンブレン全体を低倍率 (×100) で高速にスキャンし、蛍光を発する物体の場所を特定する。次に二次検出モードで一次検出物を高倍率 (×200) で精査し、形状や蛍光強度から微生物が否かを自動判定する。自動で切り替わる蛍光ブロックを使用しているため、どちらの検出モードでも 3 種類の波長の違う蛍光色素の検出ができるようになっている (Motoyama et al 2008, 2009)。本研究においては、一次および二次検出で CFDA を検出するように設定した。

(6) 難培養乳酸菌株取得の確認

ガス抜きビールで繰り返し継代培養することによって生育性の低下した *Lactobacillus* 属株について、ガス抜きビール植え継ぎ 1 回目の株と MRS 寒天培地生育性を比較することにより、難培養乳酸菌株取得の成否を確認した。本試験では、MRS 寒天培地への植菌量は培養液を滅菌生理食塩水で 1000 倍希釈した希釈液 20 µl とし、生菌数の測定にはガス抜きビールを用いた MPN (Most probable number: 最確数) 法ならびにエステラーゼ法を用いた (deMan 1975, Hurley and Roscoe 1983, 食品衛生検査指針 2004)。ここで、MPN 法は連続した試料の希釈系列を用いて培養を行い、陽性になった試験管数から確率的に菌数を算出する手法であり、希釈段階を増やすに従って精度が高くなることが知られている (衛生試験法注解 2016)。ガス抜きビールを用いた MPN 法については、精度を高めるため、それぞれの培養液の希釈系列について 5 本のガス抜きビールを

使用し、ビール生育性を示す菌数を推定した。一方、エステラーゼ法については、菌培養液を滅菌蒸留水で1000倍希釈し、その希釈液20 µlを50 ml滅菌生理食塩水に懸濁後、ポリカーボネート製メンブランフィルター(孔径0.4 µm, Advantec社)で集菌し、CFDA染色液(5-(and 6-)carboxyfluorescein diacetate (5(6)-CFDA, Invitrogen社)50 µg/ml, PBS buffer (pH 7.4))を染み込ませた濾紙にのせ、30°Cで30分遮光にてインキュベートした。染色後、PBS/Glycerol(各1:1で混合)を染み込ませたナイロンフィルター(Millipore社)にメンブランを移し替え、メーカーの推奨法に従い、µFinder微生物検査システム(Asahi Breweries社)にて計測を行なった。なお、本研究においては、ビール生育性を示すが、MRS寒天培地で生育性を示さないあるいは10日以上コロニーの形成に要するものを難培養性を示すビール混濁性乳酸菌株と定義した。

(7) 乳酸菌のビール混濁性の確認

pH 4.2に調整したガス抜きビールに、*Lactobacillus*属乳酸菌を接種し、25°Cで最長60日まで観察を行い、混濁が認められた場合にビール混濁性を有すると判断した。また、同じ菌液を用いてMRS寒天培地における生育性調査を並行して行った。

(8) MRS寒天培地における生育性調査

ガス抜きビールで植え継ぎを行った*Lactobacillus*属株について、培養液を滅菌生理食塩水で1000倍希釈し、その希釈液100 µlをMRS寒天培地に塗抹した。25°Cで嫌気培養を行い、14日間まで毎日観察を行い、コロニーの形成の有無を確認した。MRS寒天培地における生育性の調査は、それぞれの株について10回から20回の植え継ぎ毎を自安に実施した。

(9) ビール混濁性乳酸菌のヒートショック処理

ガス抜きビールで30回植え継いだ*L. lindneri* DSM 20692株および*L. paracollinoides* JCM 11969^T株に対して、それぞれ60°C10分および52°C5分処理した後、MRS寒天培地で25°C、14日間培養し、培地生育性を確認した。同時に、第3章第2節(7)ビール混濁性調査を行った。

(10) 蛍光活性染色法によるフィルター性能評価試験

フィルターろ過試験方法は前述と同様に行った後、一次側の菌液および二次側のろ液をCFDA染色し、0.4 µm孔径のポリカーボネートフィルター(Advantec社)に集菌し、µFinder微生物検査システムを用いて検出を行った。

(11) 難培養ビール混濁性乳酸菌の生菌数測定

難培養菌の計測にはMPN法を用い、MRS寒天培地における生育性調査に供した培養液に含

まれる生菌数を測定した。それぞれの菌株の培養液について 10 倍段階希釈系列を作成し、あらかじめ pH 5.0 に調整し 15 ml 容ポリプロピレン製チューブに分注しておいたガス抜きビール 10 ml に、各希釈系列について 3 本ずつ接種した。接種後のガス抜きビールは、25°C で 14 日間嫌気培養を行い、それぞれのガス抜きビールにおける生育の有無をもとに、MPN table を用いて生菌数を推定した。さらに、MRS 培地で難培養性を示すビール混濁性乳酸菌を検出する培地として鈴木らによって開発された ABD 培地に、フィルター性能評価試験で得られた一次側、ならびに二次側の菌液を塗抹し、25°C で嫌気条件下で培養し CFU を計測することにより、菌濃度、および LRV を算出した (Suzuki et al. 2008e)。

第3節 結果

1 ビール混濁性乳酸菌のビール馴化現象の解析

(1) メンブランフィルターろ過性の調査

これまでの研究で、ビール混濁性乳酸菌はビール環境に馴化している時と選択培地で生育した状態では生理学的に大きな違いがある可能性については前述した通りである。そこで、ビール馴化現象がフィルター除菌性能にどのような影響を及ぼしているかを調査するため、*Lactobacillus* 属 4 菌種において、それぞれビールに馴化している菌(ビール馴化菌)と、馴化していない菌(未馴化菌)におけるフィルター捕獲率を計測した(Table 3-3)。MRS 寒天培地で培養した未馴化菌と、ビールで数回植え継いだ馴化菌を、0.65 μm 孔径のミリポア社製フィルターでろ過し、MRS 寒天培地における Colony forming units (CFU)で計測した菌濃度からその除菌性能を LRV で示した。その結果、*Lactobacillus brevis*, *L. lindneri*, および *L. backi* においては、ビール馴化により著しい LRV の減少が認められ、フィルターによる除菌効率が菌濃度に換算して1桁〜3桁下がることが分かった。一方、*L. paracollimoides* JCM 11969^T においては二次側ろ液から菌は検出されず、ビール馴化による除菌率への影響はほとんど認められなかった。

(2) ビール馴化株の形態観察

フィルターろ過では、微生物をふるい効果により繊維間隙に捕捉することにより除菌している(Ohsumi et al 1991)。そのため、除菌性能は、細菌のサイズと孔径との関係に大きく左右されると考えられる。そこで、前述の LRV 測定試験において見出されたフィルター除菌性能の違いの原因を探るため、走査型電子顕微鏡を用いて、ビール馴化による形態的な変化を観察した。

L. brevis ABBC45 と *L. lindneri* DSM 20690^T のビール馴化菌及び未馴化菌を固定し、走査型電子顕微鏡にて観察した(Fig 3-3, 3-4)。ビール馴化した *L. brevis* ABBC45 では個々の細胞が非常に短くなっており、MRS 培地で通常観察されるような長い菌はほとんど観察されなかった。一方、ビール馴化した *L. lindneri* DSM 20690^T は、サイズの大きい菌体は存在するものの、その存在比は未馴化菌と比べて著しく小さくなっていることが判明した。

(3) 菌体サイズの解析

電子顕微鏡観察により、ビール馴化菌は未馴化菌よりも顕著に矮小化していることが認められたため、菌体サイズの変化を統計的に調べることにした。*L. brevis* ABBC45 及び *L. lindneri* DSM 20690^T のビール馴化菌及び未馴化菌を、CFDA(細胞内酵素であるエステラーゼに反応し蛍光を発する)を用いた蛍光活性染色法に供試したのち、 μFinder にて検出を行い、ランダムに選んだ 40 菌体について専用の解析ソフトにより、菌体の長さや幅を測定し解析した。

その結果、両菌種においてビール馴化菌が未馴化菌に比べて著しく矮小化していることが示唆された (Fig 3-5)。特に、*L. brevis* ABBC45 は細胞の長さの平均値が半分以下になっており、細胞のサイズが短桿状へシフトしているという顕微鏡観察で得られた知見と一致した。また、*L. lindneri* DSM 20690^T についても同様の結果が得られ、ビール馴化菌は未馴化菌と比較して、細胞の長さが顕著に短くなっていることが明らかとなった。

(4) ビール馴化菌のフィルター通過時の電子顕微鏡観察

ビール馴化菌がどのように除菌フィルターを通過していくのかを観察するため、ビール混濁性菌を接種したビールをろ過した後のメンブレンフィルターを用いて電子顕微鏡観察を行った (Fig 3-6)。ビール馴化した *L. brevis* ABBC45 を 1×10^6 cells/ml となるようにガス抜きビールに接種し、メンブレンフィルターをろ過した後、フィルターの一次側と二次側、及び切断面の 3 方向から観察した。その結果、一次側ではフィルター表面の孔を隙間なく覆うように多量の菌が付着しており、その大きさは大小混在しているのが観察された (Fig 3-6B)。また、切断面を観察したところ、フィルター繊維の間隙を縦に通過している菌体が観察された (Fig 3-6C)。一方、二次側の表面にはまれに菌体が単独、あるいは数個のかたまりで付着しているのが観察され (Fig 3-6D-F)、その大きさは一定して微小なものがほとんどであり、一次側で観察された状態とは異なっていた。

2 難培養ビール混濁性乳酸菌株の取得

(1) *L. lindneri* DSM 20692 および *L. paracollimoides* JCM 11969^T 株のビール馴化現象の観察

前述のビール馴化菌の調査から、ビール混濁性乳酸菌がビール馴化により矮小化することが明らかとなった。また、ビール環境から分離されるビール混濁性乳酸菌は MRS 培地で生育しにくいことがこれまでの知見から得られている。そこで、ビール馴化をさらに繰り返した場合、どのような影響を菌体にもたらすのかを調査した。

L. lindneri DSM 20692 株および *L. paracollimoides* JCM 11969^T 株を、pH 4.2 に調整したガス抜きビールで繰り返し植え継ぎ、MRS 寒天培地における生育性を調査した。植え継ぎ回数 10 回目の *L. lindneri* DSM 20692 株および *L. paracollimoides* JCM 11969^T 株を、MRS 寒天培地に塗抹したところ、培養開始 4 日目にコロニーの形成が確認され始めるものの、その数は随時的に増加し、14 日目には大小まばらなコロニーが観察された (Table 3-4, Fig 3-7a)。この現象は、植え継ぎ 1 回目においてほとんどすべてのコロニーが 4 日目に形成され、14 日目では均一な大きさのコロニーとして観察されるのと対照的であった (data not shown)。植え継ぎ 30 回目においては、最初のコロニーが形成されるのが培養開始 6-7 日目であり、培養 14 日目において観察されるほとんどのコロニーが微小であった (Table 3-4)。また、MPN 法で推定される生菌数と MRS 寒天培地で計測されたコロニー数 (colony forming unit (CFU)) との間に違いが認められた。すなわち、CFU で測定された

菌数は、MPN 法で推定される生菌数の半数以下であり、多くの細胞が培地生育性を失っていることが分かった。さらに、植え継ぎ 70 回目においては、*L. paracollimoides* JCM 11969^T 株については MPN 法で 1100 個の生菌数が存在すると推定されたにも拘わらず、培養 14 日目においても MRS 寒天培地でのコロニー形成は認められなかった (Table 3-4)。同様の現象が、*L. lindneri* DSM 20692 株でも認められた。このようにして得られた MRS 培地へ難培養性を示す株を本研究では難培養株と呼び、*L. lindneri* DSM 20692^M および *L. paracollimoides* JCM 11969^M と表記することにした。

(2) ヒートショックによる難培養化への影響

ビール馴化現象の観察により、*L. lindneri* DSM 20692 株および *L. paracollimoides* JCM 11969^T 株はガス抜きビールで繰り返し植え継ぐと、MRS 寒天培地で生育性が低下することが認められた。序章で述べたように、環境微生物学における近年の研究報告によると、自然環境に棲息する微生物のほとんどは分離培地でコロニーを形成しない難培養状態にあることが分かっており、温度変化や飢餓条件など、何らかのストレスを受けた菌は難培養状態に移行しやすいことが示唆されている (Oliver 2005)。一方、ビール製造現場で行われている洗浄では、薬剤や高温蒸気を使用する場合が多く、このような環境変化がビール製造環境で棲息する乳酸菌にとって度重なるストレスとなり得る。また、海外ビールで行われる製品ビールの殺菌工程でも、加熱処理が行われている。そこで、高温ストレスがビール混濁性乳酸菌の難培養化にどのように影響するかを調査した (Table 3-5)。ガス抜きビールで 30 回植え継いだ *L. lindneri* DSM 20692 株および *L. paracollimoides* JCM 11969^T 株を、それぞれ 60°C10 分、あるいは 52°C5 分加熱処理したところ、MPN 法で 460 個の生菌数が推定されたのにも拘わらず、MRS 寒天培地ではコロニー形成が確認されなかった。しかしながら、2 株ともビール混濁性を保持していることが確認された。

(3) 得られた難培養株を用いたフィルター性能評価試験

ガス抜きビールで 40 回～70 回植え継ぐことにより得られた難培養菌は、培地での CFU (colony forming unit) を計測できなくなるため、ビール混濁菌の場合、菌濃度を測定するにはガス抜きビールを用いた MPN 法を用いる。しかしながら、MPN 法は試験期間に 2 週間を要するため、フィルター性能評価試験のような、品質管理上、定期的にチェックを行うべき試験法には適していない。そこで、迅速に結果を得られることが期待される蛍光活性染色法を用いて、フィルターの性能を評価する試験方法を検討した。また、難培養ビール混濁性乳酸菌を感度よく検出できる ABD (Advanced Beer-spoiler bacteria detection) 培地が鈴木らによって開発されている (Suzuki et al 2008c)。そこで、本章では、蛍光活性染色法と並行して本培地を使用して試験を行った。

難培養株 *L. lindneri* DSM 20692^M 及び *L. paracollimoides* JCM 11969^M をガス抜きビールで生

育させ、メンブレンフィルターでろ過した後、一次側の原液と二次側のろ液に含まれる菌体を CFDA 染色し、 μ Finder 微生物検査システムで計測することにより LRV を算出し MPN 法と比較した (Table 3-6)。また、同じ一次側の原液と二次側のろ液を ABD 培地で培養し、CFU の計測、および LRV の算出を行い、MPN 法と比較した (Table 3-6)。その結果、蛍光活性染色法により算出された LRV は MPN 法、および ABD 培地で得られた LRV とほぼ同じ結果となった。

Table 3-1. Standard test species for determining microbiological retention rate^a.

Pore size (μm)	Species
0.80, 0.65	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
0.45	<i>Serratia marcescens</i>
0.30	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
0.20	<i>Brevundimonas diminuta</i>
0.10	<i>Acholeplasma laidlawii</i>

^acited from <http://www.advantec.co.jp/japanese/hinran/tanpin/mf.html>

Table 3-2. Compositions of ABD medium for detection of beer-spoilage LAB and MRS broth^a

Medium	ABD Medium	MRS broth (powder)		
Compositions (L ⁻¹)	MRS broth (powder)	2.61 g	Peptone	10.0 g
	Sodium acetate	0.5 g	Meat extract	8.0 g
	Cycloheximide	10 mg	Yeast extract	4.0 g
	Agar	15.0 g	Glucose	20.0 g
	Beer	1000 mL	Dipotassium	2.0 g
	Final pH	5.0	hydrogen	2.0 g
			Tween 80	1.0 g
			Diammonium	2.0 g
			hydrogen citrate	2.0 g
			Sodium acetate	5.0 g
			MgSO ₄	0.2 g
		MnSO ₄	0.04 g	
		Final pH	5.7	

^aThe use of 52.2 g powder is recommended by the manufacturer (Merck, Darmstadt, Germany) for preparing 1.0 L MRS broth with distilled water. The compositions of MRS for 1.0 L are shown in this table and the 5% portion of MRS broth is included in 1.0 L ABD medium.

Table 3-3. Reductions in LRV induced by beer adaptation of LAB^a.

Strain	LRV ^b	
	Non-adapted	Beer-adapted
<i>Lactobacillus brevis</i> ABBC45	4.15, 4.22	2.87, 2.77
<i>L. brevis</i> ABBC64	4.97, 4.95	3.78, 3.44
<i>L. lindneri</i> DSM 20690 ^T	5.59, 5.82	2.46, 2.39
<i>L. lindneri</i> DSM 20692	5.74, 6.10	2.65, 2.80
<i>L. paracollinoides</i> JCM 11969 ^T	>6.12, >6.17	>5.52, >5.69
<i>L. backi</i> LA21	6.00, 6.45	5.10, 4.75

^aThe experiments were conducted in duplicates.

^b> indicates that no bacterial cells were detected after the filtration.

Table 3-4. Acquisitions of hard-to-culture variants of beer spoilage LAB^a

Strains	Number of subcultures ^b	Detection time (days)	CFUs	MPN ^c
<i>L. lindneri</i> DSM 20692	0	4, 4	417, 513	240
	10	4, 4	696, 788	460
	30	6, 6	181, 145	460
	70	ND, 14	ND, 1	240
<i>L. paracollinoides</i> JCM 11969 ^T	0	4, 4	486, 445	460
	10	4, 4	580, 725	460
	30	7, 7	141, 156	750
	70	ND, ND	ND, ND	1100

^aThe experiments were conducted in duplicates. The detection time shows the incubation time (days) when the first colonies were detected on MRS agar. The experiments were performed in duplicates. N.D.: Not detected

^b*Lactobacillus* strains were repeatedly subcultured in degassed beer (pH 4.2) for the number of times indicated in the table.

^cThe viable cell counts were calculated on the basis of the most probable number (MPN) method, using degassed beer (pH 5.0)

Table 3-5. Effects of beer adaptation and sublethal heat treatment on culturability on MRS agar.^a
30th subculture

	No heat treatment			Sublethal heat treatment ^b		
	Detection time (days)	CFUs	Viable cell counts	Detection time (days)	CFUs	Viable cell counts
<i>L. lindneri</i>						
DSM 20692	7.7	252,308	1100	N.D., N.D.	N.D., N.D.	460
<i>L. paracollimoides</i>						
JCM 11969 ^T	7.7	141,156	750	N.D., N.D.	N.D., N.D.	460

^a*L. lindneri* DSM 20692 and *L. paracollimoides* JCM 11969^T were repeatedly subcultured in degassed beer and examined for culturability on MRS agar. The total colony counts on MRS agar were counted on the 14th day and indicated as CFUs. The detection time shows the incubation time (days) when the first colonies were detected on MRS agar. The experiments were performed in duplicates. Viable cells were counted by most probable number (MPN) method, using the three sets of degassed beers (pH5.0). N.D.: Not detected.

^bThe 30th subcultures of *L. lindneri* DSM 20692 and *L. paracollimoides* JCM 11969^T were subjected to sublethal heat treatment, 60°C for 10 min and 52°C for 5 min, respectively. After heat treatment, 10 µl culture of *L. lindneri* DSM 20692 and 100µl culture of *L. paracollimoides* JCM 11969^T were inoculated on MRS agar.

Table 3-6. Comparative study of LRV obtained from direct and MPN methods for counting hard-to-culture cells^a.

Strain	Direct counting	LRV ^b	
		MPN method	ABD medium
<i>Lactobacillus lindneri</i> DSM 20692 TM	5.11, 5.26	5.07, 4.97	5.17, 5.02
<i>L. paracollinoides</i> JCM 11969 TM	>6.52, >6.60	>5.08, >5.08	>5.08, >5.15

^aThe experiments were conducted in duplicates.

^b> indicates that no bacterial cells were detected after the filtration.

第4節 考察

メンブレンフィルターを用いたビールのろ過工程は、製品の微生物品質を管理する上で極めて重要な工程であることから、フィルターの性能評価を適切に行わなければならない。本研究では栄養源が豊富である通常の乳酸菌検査用 MRS 培地で生育させた株とともに、ビール環境で生育した菌体の状態を再現するために、pH 調整したビールで数回植え継いだビール馴化株を用いてフィルターろ過試験を行った。強いビール混濁性を有する *Lactobacillus* 属菌 4 菌種 6 株のうち、*L. paracollinoides* を除く 5 菌種 5 株で、ビール馴化後の LRV 低下が認められた (Table 3-3)。特に、*L. brevis* 2 株と *L. lindneri* 2 株において、LRV で 2-3 の減少、菌数に換算すると 100 倍から 1000 倍フィルターを通過しやすくなっていることが観察された。このことから、ビール混濁性乳酸菌の一部の菌種はビールで植え継いだ場合に顕著な LRV 低下が認められ、ビールへの馴化によって除菌フィルターを通過しやすい状態に移行していることが示唆された。序章で述べたように、フィルターろ過における微生物の捕捉は、フィルターの孔径よりも大きい異物が孔に通過を阻まれ捕捉されるというふるい効果によるものであるため (Ohsumi et al 1991)、フィルター捕捉率に最も影響する要因は菌体のサイズ変化であることが推察された。そこで次に、顕著に LRV 低下が認められた *L. brevis* ABBC45 株と *L. lindneri* DSM 20690^T 株について走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いた形態観察を行うことにした。

MRS 培地で培養した *L. brevis* ABBC45 株を SEM で観察したところ、ほとんどの細胞が長桿状になっていたのに対し、ビール馴化した細胞は、短桿菌のみが観察された (Fig 3-3)。一方、*L. lindneri* DSM 20690^T 株では、MRS 培地で生育した細胞の大多数が、*L. brevis* 同様、長桿菌であったが、ビール馴化株では、短桿菌の割合が増えたものの、長桿菌も混ざっていることが分かった (Fig 3-4)。このように、菌種により、長桿菌と短桿菌の割合は異なるものの、どちらもビール馴化によって矮小化傾向にあることが示唆された。しかしながら、顕微鏡による観察は傾向を瞬時に捉えられる反面、定量的・統計的なデータは得ることができない。そのため、蛍光活性染色法を用いた菌体サイズの測定を行ったところ、両菌種において、ビールに馴化した菌は未馴化菌と比較して細胞の長さとともに幅も減少傾向にあることが明らかとなった (Fig 3-5)。ここで、蛍光染色を用いて菌体サイズを測定すると、蛍光検出時のハロ、あるいは菌の状態による染色性の低下によって誤差が生じる可能性があったが、本研究で用いた検出方法においては検出する蛍光強度の幅が設定できたこと、ならびに、絶対値ではなく相対的な大きさの違いを把握することが主目的であったことから、本実験手法を選択したことを補足しておく。これらの結果から、ビール混濁性乳酸菌の多くの菌種はビール馴化によってメンブレンフィルターを通過しやすくなること、また、その原因のひとつは細胞の矮小化によることが明らかとなった。

1991 年に大隈らは、ナイロン製および親水性フッ素樹脂製のメンブレンフィルターの細菌捕捉機構について解析しており、孔径 0.2 μm のフィルター表面に 1 μm 程度の孔があること、また、菌体が吸着ではなくふるい分け効果によって捕捉されていく様子が観察されている (Ohsumi et al 1991)。さらに、メンブレンフィルターによる除菌メカニズムは SEM による基礎研究が有効であると考察している。本研究においても、電子顕微鏡による解析を菌体の観察のみならず、フィルターの観察に取り入れることにした。フィルターの一次側、二次側、および内部の菌体の観察を行った結果、メンブレンフィルターの一次側表面の部分で大多数の菌がびっしりと表面を覆う状態、および、一部の微小な菌体が、フィルター内部の間隙を通過して二次側に漏れて出ている様子が観察された (Fig 3-6)。興味深いことに、二次側に漏れてくる菌体は、数個の塊で観察されたことがしばしばあったことから、フィルター間隙の中でも、通過しやすい部位が存在する、あるいは、菌体が通過することで通り道が開けることが推察される。また、顕微鏡で観察されたメンブレンフィルター間隙は菌体と比較して非常に大きく、0.65 μm という表示孔径から連想されるよりも、菌形状や菌体サイズによって細菌の捕捉効率が変動しやすいことが視覚的に認識できた。このことから、食品の製造工程で数値化されたデータを吟味するだけでなく、微生物学的にミクロな解析の重要性を改めて指摘したい。

このように、ビール馴化によって一部の乳酸菌種で形態変化が認められたことから、ビールへの馴化を高度に繰り返したところ、*L. lindneri* DSM 20692 株および *L. paracollimoides* JCM 11969^T 株において、10 回、30 回、70 回と植え継ぎを重ねるに従い、徐々に MRS 寒天培地でのコロニー形成能が低下する傾向が認められた (Table 3-4, Fig 3-7)。植え継ぎ回数が 70 回目においては、*L. lindneri* DSM 20692 株および *L. paracollimoides* JCM 11969^T 株はビール混濁性を有するものの、MRS 寒天培地上でコロニーを形成しない状態が観察された。この状態を本研究では「通常の乳酸菌検出培地で培養不能」という定義をもって難培養株と呼ぶことにした。

この難培養化現象は、*L. lindneri* DSM 20692 株および *L. paracollimoides* JCM 11969^T 株をガス抜きビールで 30 回植え継いだ後、ヒートショックを行うことによっても誘導されることが本研究で明らかとなった (Table 3-5)。すなわち、ガス抜きビールで 30 回植え継いだ *L. lindneri* DSM 20692 株および *L. paracollimoides* JCM 11969^T 株に対して短時間の加熱処理を施した結果、ビールでは生育するものの MRS 培地では生育能を失っていることがわかった。このような現象は、損傷菌の研究分野でも報告されている事例であり (Kogure 2006, Morichi 2006)、熱ストレスが *L. lindneri* DSM 20692 株および *L. paracollimoides* JCM 11969^T 株の難培養化を促進したことが推察された。ここで、最も注意すべきことは、こうした加熱処理と同じ状態が製造設備の殺菌洗浄工程で日常的に行われていることである。すなわち、製造工程における配管内やタンクの洗浄には過酢酸や苛性ソーダのような薬液や、高温の蒸気が用いられており、棲息する微生物にとって一時的なストレスとなり得る。当然ながら、こうした処理は衛生管理を徹底する上で必要なことであるが、微生物リスクが存在

することを把握して管理に取り組むことが重要である。本研究により、このような新たな微生物管理ポイントが明らかになったことは今後のビール混濁性微生物を研究する上で非常に意義深いと考えている。

近年、環境微生物の難培養状態の研究が進むにつれて、自然界に生存する微生物の多くは難培養状態にあることが明らかになっており、一部の微生物は難培養化により矮小化することが示されている (Byrd 2000, Millet 2000, Oliver 2005, 2010)。また、海洋細菌は飢餓状態で矮小化することや (Kjelleberg et al 1982, Møyer and Morita 1989.)、その他のストレス環境下で菌体が小さくなる現象が報告されている (Baatout et al 2007, Weart et al 2007, Onyango et al 2010)。一方で、“難培養微生物”とは微生物研究者の立場から見た概念であり、微生物の立場からするとある環境にしか棲息できないほどその環境に進化・適応した微生物、すなわち環境絶対適応微生物であるという考え方が提唱されている (Kudo and Ohkuma 2006)。本研究では、ビール混濁性乳酸菌がビールに馴化することで矮小化し、さらに深く馴化すると MRS 培地に生育しなくなるという現象が観察された。これらのことを考え合わせると、ビール混濁性乳酸菌は長時間ビール成分と接触し続けることでビール環境に絶対的に適応し、同時に殺菌工程や洗浄工程で高温ストレスを受けるなどして徐々に難培養化し、それとともに細胞が矮小化することが推察される。この一連の現象を品質管理の視点からみると、ビール混濁性乳酸菌がろ過フィルターを通過しやすくなるリスクに加えて、微生物検査を培養法を基本とした検出方法で行っている場合には、検査漏れが発生することになり、ビール製造に携わる者にとっては大きな脅威となることが容易に想像できる。

これらのリスクを回避する方法として考えられるのは、フィルター性能評価試験をビールに馴化した株を用いて行い、正確に除菌効率を把握することである。本研究では、取得した難培養株を用いたフィルター性能評価試験を検討した。*L. lindneri* DSM 20692TM 株および *L. paracollinoides* JCM 11969TM 株を用いて MPN 法と蛍光活性染色法、さらに MRS 培地で難培養性を示すビール混濁性乳酸菌を高感度に検出できる ABD 培地で計測した菌数から LRV を算出したところ、すべての手法でほぼ同じ結果が得られたことから (Fig. 3-6)、蛍光活性染色法がビール環境に広く棲息する可能性の高い MRS 培地に難培養性を示す菌の微生物管理に適用できることが示された。

さらに、本研究から得られたビール混濁性乳酸菌の性状に関しても、非常に興味深い知見が多い。そのひとつが、ビール馴化による細胞の矮小化がなぜ引き起こされるかという問いであり、ビール中のエタノールの存在や pH が低いこと、あるいはビール中の貧弱な栄養分による飢餓など、いくつかの要因が考えられる。その中で最も注目すべき要因が天然の抗菌成分であるホップであり、ビール混濁性乳酸菌のホップ成分に対する耐性機構が関与していると考えている。序章でのべた

通り、ホップ成分はグラム陽性菌に対してプロトンイオノフォアとして作用していることが報告されており、ビール混濁性乳酸菌は多剤排出ポンプによってホップ成分を菌体外に排出していることが示唆されている (Sami et al 1998, Sakamoto et al 2002, Iijima et al 2006)。このことから、本研究で観察されたビール馴化した乳酸菌の矮小化現象は、ホップ成分との接触を最小限に防ぎ、ホップ耐性機構を賦与する排出ポンプ HorA および HorC、ならびに proton-translocating ATPase などの膜タンパク質の発現を効率的に制御するために、表面積を小さくすることでビール環境に適応するのであると推察できる (Fig 3-8)。この点については未だ仮説にすぎないが、ビール馴化による形態変化はビール混濁性乳酸菌を知る上で興味深く、今後さらに解析する余地がある。

また、ビール混濁性乳酸菌がフィルターを通過しやすくなる要因についても、考察を加えておきたい。本研究の実験結果から、菌体の矮小化がフィルター通過性を高めていることが推察されたが、他にも要因がある可能性は否定できない。例えば、*Pseudomonas aeruginosa* のフィルター通過現象では、菌体外への酵素分泌能や網状構造をくぐりぬける性質が要因とも考察されている (Hasegawa et al 2003)。また、Wang らにより、*Hylemonella gracilis* (約 $0.12 \mu\text{m}^3$) は $0.20 \mu\text{m}$ フィルターを通過しない *B. diminuta* (約 $0.08 \mu\text{m}^3$) よりも体積が大きいにもかかわらず、孔径 $0.1 \mu\text{m}$ フィルターを通過することを報告しており、細菌の形状とともに柔軟性がフィルター通過性に大きな役割を演じていることを推測している (Wang et al 2008)。乳酸菌には運動性がないため、運動性によりフィルター間隙をくぐり抜ける可能性はないと思われるが、菌体の柔軟性や細胞外への多糖類などの分泌能や細胞の柔軟性がフィルター通過現象の一因になっている可能性も否定できない。

さらに、フィルター性能評価試験において、*L. paracollinoides* JCM 11969^T が他の *Lactobacillus* 属と比較して LRV 挙動が異なることも新しい知見である。すなわち、ビール馴化によるフィルター通過性の変化がビール混濁性乳酸菌の全般に言えるのではなく、菌種に依存することが明らかとなった。このことは、第1章で述べたようにビール混濁性乳酸菌が分類学上の菌種を越えた多様性を示すというこれまでの見識を裏付ける知見でもあり、今後の研究でその全容が明らかになることが期待される。

最後に、今回得られた難培養株が、なぜ MRS 培地で生育できなくなったのかについて、考察しておきたい。難培養株 *L. lindneri* DSM 20692 株をポリカーボネートメンブレン上に捕捉し、ABD 培地で2日培養し微小なコロニーを形成させた後、新しい ABD 培地、あるいは MRS 寒天培地へ移行し、CFDA および propidium iodide で二重染色し顕微鏡観察を行った実験結果がある (Fig 3-9, Suzuki and Asano, 2008a)。ABD 培地で生育したコロニーは CFDA によって緑色に染色された菌体がほとんどであるのに対し、MRS 寒天培地へ移行したマイクロコロニーは、propidium iodide で染色された赤い菌体がほとんどであった。propidium iodide は生菌の細胞膜は通過できないが、損傷を受けた死菌の膜を通過し、DNA ならびに RNA と結合して蛍光を発するされることが知られて

いることから (Boulós et al. 1999, Amor et al. 2002)、本難培養株は MRS 寒天培地に移行すると急速に死滅することが示唆された。この理由としては 2 通りの仮説が考えられる。ひとつは、ビールのような過酷で栄養成分が少ない環境に深く適応した株は栄養要求の範囲が狭くなっているため、過剰な栄養成分に接触するとショック死のごとく死滅するというものである (Oliver 2005, Shintani 2006, Suzuki and Asano 2008a)。もうひとつの仮説は、本研究で得られた難培養株が種々の成分に対して感受性が高まっており、MRS 培地に含まれる 1 つあるいは複数の成分に対して過敏に反応し死滅するという考え方である。損傷菌、すなわちストレスを受けて死滅には至らないものの部分的に毀損した不安定状態の菌においては、各種環境因子への感受性の増大が示唆されていることから (Morichi 2006)、本難培養株についても MRS 培地成分のうち酢酸ナトリウムや、酵母エキス、ペプトン、硫酸マンガンならびに Tween 80 といった成分により生育阻害がおこる可能性は高いと考えている (Suzuki et al. 2008c, 2009)。しかしながら、このような MRS 培地での死滅傾向についての研究はまた開始されたばかりであり、本難培養株を様々な角度から解析することによって真相を追究していきたい。

第5節 要約

ビール製造工程の微生物管理において、除菌フィルターは最後の砦とも言える重要な工程である。しかしながら、これまで除菌フィルターの性能評価試験で用いられる微生物種と培養条件について検討した報告例はほとんどない。一方、ビール環境に生息するビール混濁性乳酸菌が、実験室で通常見られる生態とは異なる可能性については、以前から危惧されていた。本研究は、除菌フィルター性能を実情に近い状態で評価する目的で、供試菌とその培養条件について検討を行ったものである。その結果、ビール環境に順応しているビール混濁性乳酸菌は通常の実験室株よりもフィルターを通過しやすくなっていることが明らかとなり、その要因の一つが矮小化であることが示唆された。すなわち、通常の MRS 培地培養株では正確なフィルター性能評価ができていない危険性が認められた。

そこで、強いビール混濁性を示す *L. lindneri* ならびに *L. paracollinoides* について、さらに高度にビール馴化を行い性状調査を行ったところ、植え継ぎ回数が増加するに従って、*L. lindneri* DSM 20692 株および *L. paracollinoides* JCM 11969^T 株は徐々に MRS 培地上の生育性が低下することが観察された。さらに、ビールで 40 回から 70 回程度の植え継ぎを行った株、および 30 回植え継いだ後ヒートショックを施した株では、MPN 法や蛍光活性染色法では一定数の生菌数が確認できるのに対して、MRS 培地で全く検出できなくなる現象が観察され、ビールへの高度な馴化、ならびに加熱によるストレスによって難培養化が引き起こされることが示唆された。これらのことから、ビールに極度に馴化した乳酸菌株は、培地で検出されることなく品質事故を引き起こす可能性が示唆された。

以上のことから、ビール環境に順応したビール混濁性乳酸菌は、メンブレンフィルターを用いた除菌工程、および MRS 培地を使用した微生物検査を逃れる可能性が示唆され、ビール馴化株、あるいは難培養株を用いた微生物管理の重要性が示された。

第4章

マイクロコロニー法を用いた ビール混濁性乳酸菌の迅速検出法の開発

第1節 緒言

食品製造業では「食の安全性」を確保するため、徹底した衛生管理が求められている。その品質管理の一環として行われている微生物検査には、一般的に培養法が用いられており、公定法である食品衛生法はそれに則った形で記述されている。培養法におけるコロニー計測は、基本的な実験技法であるが、細菌のなかには、目視でコロニーを観察できるようになるまでには長時間を要するもの、あるいは数回の分裂で増殖を停止するものが存在する。

1970年代ごろから、培養法を介さず、試料中の微生物種を蛍光顕微鏡下で直接計測する方法が医薬品および食品業界で広まってきた。中でも環境微生物分野で多用される FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) 法を用いた直接 FISH 法は、対象となる微生物が特異的に持つリボソーム RNA (rRNA) 配列に相補的な配列 (プローブ) を蛍光標識し、微生物細胞内の rRNA を標的としてハイブリダイゼーションを行うことにより、特定の微生物を検出する方法である (Yasuhara et al. 2001, Yamaguchi et al. 2007)。そのため、迅速な検出と確実な菌種同定を行うことができる。しかしながら、本法では蛍光強度が細胞内の rRNA 量に依存するため、生理活性の低い状態では蛍光強度が低く検出しにくい。また、数 μm の菌体を検出するには高い感度が求められる反面、試薬や実験器具由来のバックグラウンドノイズが問題となってしまうのが難点であった。

一方、マイクロコロニー法は第1章で述べた通り、目視で確認できるコロニーになるまで培養を待つのではなく、初期の増殖段階の微小コロニーを顕微鏡で検出する手法である。サンプルをメンブレンでろ過し、一定時間培養した後、蛍光活性染色を施し顕微鏡で観察するのが一般的な手順である。ビール業界においても、1970年前後から酵母や細菌のマイクロコロニー法が開発されており、死菌を検出することなく、増殖能を有する生菌のみが検出できる点がメリットとされてきた (Day 1987, 丹羽 1991, Yasui and Yoda 1997, Kanda 2007, 中村ら 2007)。しかしながら、これまでのマイクロコロニー法においては細胞内 ATP を検出する、あるいは微生物の生細胞内に普遍的に存在するエステラーゼによって蛍光物質に加水分解される FDA (fluorescein diacetate) 系試薬を用いた染色法を用いる場合がほとんどであり、細菌の存在、および生菌数を確実に把握できるものの、検出菌種の同定はもと

より、ビール混濁性の判定ができないことがネックとなっていた (Hill 2009)。

そこで本研究では、迅速なビール混濁性細菌検査法の構築を目的として、マイクロコロニー法と FISH 法の利点を組み合わせたマイクロコロニー-FISH 法を検討することとした。すなわち、マイクロコロニー法により培養法よりも短時間で生菌の検出を行い、陽性であった場合には FISH 法を連続して行うことで確実な菌種同定ができる手法である。この際、マイクロコロニー-FISH 法で検出されるのは数十 μm のマイクロコロニーであるため、FISH 法の弱点であったノイズやバックグラウンドによる検出感度低下や非特異的な検出は抑えられることが期待された。

このように二つの手法の利点を組み合わせて迅速検査法を構築する構想が固まったものの、吟味しなければならなかったのが対象とするビール混濁性細菌種と、ビール中から単離したビール混濁性細菌をマイクロコロニーになるまで生育させる培地であった。まず、本法の構築では対象とする菌種はビール混濁性乳酸菌、特に *Lactobacillus* 属菌に絞って行うこととした。その理由は、*Lactobacillus* 属菌がビール混濁事故の大半を占めること (Fig 1-3, Baek 1994a, 2003)、および *L. paracollinoides* と *L. lindneri* は培養法での検出が困難であると報告されていたことにある (Baek 2005, Suzuki et al 2008b, 2008c)。一方、培地の選択においては、ビールという過酷な環境で棲息してきた菌の回復および増殖を促進でき、かつ、ビール混濁性細菌を漏れなく検出できる培地が要求された。長いビール醸造微生物管理の歴史において、最も労力がかかっているのはビール混濁性細菌の選択培地だといえるほど多くの培地が開発されてきた (Priest 1987)。しかしながら、現在でも複数種の培地を併用することが推奨されており、未だに 1 種類でビール混濁性細菌を網羅的に検出することはできないとされている (Casey and Ingledew, 1981a, 1981b, Jaspersen and Jakobsen 1996, Lotenberger and Elter 2004)。このようなビールの微生物検査における培地の開発の歴史は多様なビール混濁性菌種とビール醸造に関わる者との戦いの歴史とも言える。すなわち、検査培地には単離された菌の代謝を回復する機能、および環境菌を検出しないという選択性が求められるが、回復を補助する要素を重視すると腸内細菌のようなビール混濁性を持たない環境顕出菌が生育できるようになり、反対に選択性を高めると細菌の生育は遅延するなど、両者を両立させるのは難しいからである。このような背景を踏まえて、本研究においては、Suzuki らによって開発された、MRS 培地で難培養性を示すビール混濁性乳酸菌株を高感度に検出できる ABD 培地を用いることにした (Suzuki et al 2008c)。

本法の培養工程に ABD 培地を用いることは本迅速検査法に二つのメリットをもたらす。一つは、マイクロコロニー法に選択性を付与することである。ABD 培地は本来ガス抜きをしたビールに MRS 培地を少量加えたものが主体となっているため (第 3 章 Table 3-2)、高

い選択性を持ってビール混濁性乳酸菌を検出できる一方、ビール混濁性を持たない乳酸菌や腸内細菌、工場環境菌はほとんど生育しないとされており (Suzuki et al. 2008c)、本法で ABD 培地を使用した場合、検出されるマイクロコロニーは高い確率でビール混濁性細菌であると考えられた。二つ目のメリットとしては、未知のビール混濁性細菌を検出できる可能性が高くなることである。第 1 章で述べた通り、培養法を用いたビールの微生物検査においては、MRS 培地等の非選択性培地で検出された菌コロニーに対して、既知のビール混濁性細菌種か否かを調査する菌種同定が行われる。従って、既知ビール混濁性菌種として同定されない場合、あるいは、目視で判別できるほどのコロニーには増殖できないような菌体は、このような微生物検査で擬陰性判定をされる可能性がある。これに対して、選択性の高い ABD 培地と、早い増殖段階で検出できるマイクロコロニー法を組み合わせる場合には、未知菌種を漏らさず見つけ出せる検査法が構築できると考えられた。

以上のことから、ABD 培地で短時間培養させたビール混濁性乳酸菌のマイクロコロニーを検出し、FISH 法による同定を行うマイクロコロニー-FISH 法の構築を行った。

第2節 材料および方法

(1) 菌株および培養条件

本研究では Japan Collection of Microorganisms (JCM)、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)、the American Type Culture Collection (ATCC) および当社の ABBC、HA、LA バクテリアカルチャーコレクションに保存されている菌株を用いた(Table 4-1, 4-2)。ビール混濁性乳酸菌の培養は、ガス抜きし水酸化ナトリウムで pH を 5.0 に調整したビール (Super Dry, Asahi Breweries 社) を用いて嫌気条件下、25°C で行った。ビール混濁性乳酸菌の MRS 培地難培養株は、第 3 章第 2 節で示した方法で取得した。ビール非混濁性乳酸菌は、塩酸で pH を 5.5 に調整した MRS 液体培地 (Merck 社) を用いて、嫌気条件下、25°C で行った。ビール工場環境検出菌はチオグリコレート (TGC) 液体培地 (日本製薬社) を用いて、嫌気条件下、30°C で培養した。これらの培養方法はマイクロコロニー法の前培養として用い、マイクロコロニー-CFDA 法およびマイクロコロニー-FISH 法には、第 3 章 Table 3-2 に示す組成の ABD (Advanced Beer-spoiler Detection) 培地を用いた。評価には定常期の菌体を使用した。

(2) 供試ビール混濁性乳酸菌株の選択

培地での生育が遅いビール混濁性乳酸菌株を選択するため、Table 4-1 に示す株を ABD 培地で培養し、目視でコロニーが確認できるまでの日数が 5 日以上要する株を選択した。選択した乳酸菌株を Table 4-3 に示す。

(3) マイクロコロニー-CFDA 法における検出感度の評価

乳酸菌あるいはビール工場環境類出菌の前培養液をバクトメーター (エルマー社) で計測し菌濃度を確認した後、約 100 cells となるように菌数を調整し、ガス抜きして pH 4.2 に調整したビール 50 ml に懸濁した。この菌懸濁液をポリカーボネート製メンブレンフィルター (ポアサイズ 0.4 μm , Advantec 社) にろ過集菌した。集菌後、ABD 培地を用いて 25°C にて嫌気培養を行った。所定時間培養後のメンブレンフィルターは 50 $\mu\text{g/ml}$ の 5(6)-carboxyfluorescein diacetate (CFDA, Invitrogen 社) を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.4) に浸漬し、遮光条件下 30°C、30 分間インキュベートすることにより染色した。染色後、PBS/Glycerol (1:1) で湿らせたナイロンフィルター (Millipore 社) 上にメンブレンを移し、 μFinder 微生物検査システム (Asahi Breweries 社) により CFDA で染色されたマイクロコロニー数の計測を行った。本研究では、8 個以上の細胞から成る菌塊をマイクロコロニーとして計測した。また、培養法によるコロニー数と比較するため、同様の菌懸濁液を混

合セルロースエステルフィルター (0.45 μm , ミリポア社) に集菌し、ABD 培地に載せて 14 日間、25°C で嫌気培養を行い CFU を計測した。

(4) マイクロコロニー-CFDA 法の選択性の評価

Table 4-2 に示すビール工場環境類出菌種とビール非混濁性乳酸菌種を、それぞれチオグリコレート (TGC) 液体培地 (日本製薬社) あるいは MRS 液体培地 (Merck 社) で培養後、バクトメーター (エルマー社) で計測し菌濃度を確認し、約 500-1000 cells となるように生理食塩水あるいは滅菌水 50 ml に懸濁した。この菌懸濁液をポリカーボネート製メンブレンフィルター (ポアサイズ 0.4 μm , アドバンテック社) にろ過集菌し、第 4 章第 2 節 (3) と同様に検出した。また、植菌数を確認するために同じ液量の同じ菌液を TGC 寒天培地あるいは MRS 寒天培地で培養し CFU を計測して約 500 cells 以上が植菌されていることを確認した。

(5) マイクロコロニー-FISH 法

CFDA 染色されたマイクロコロニーを μFinder 微生物検査システムにより検出後、メンブランを 50 % EtOH in PBS, 75 % EtOH in PBS, 100 % EtOH を浸み込ませたら紙に順次載せ、室温で 2 分間インキュベートすることにより固定および脱水を行った。次に、メンブランを 1 mg/ml lysozyme in TE, 1 mg/ml Proteinase K in TE を浸み込ませたら紙に順次載せ、室温で 10 分間インキュベートした。引き続き、*L. brevis*, *L. lindneri*, *L. paracollinoides* の各菌種に特異的な Cy3 標識プローブ (100 μM) を菌種ごと、あるいは 3 菌種のプローブ全てを Hybridization バッファー (0.9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 5 mM EDTA (pH 8.0), 0.02 % SDS, 10 % (v/v) ホルムアミド, 10 % Blocking Reagent (GE ヘルスケア社)) に 1 % 量添加し、さらに終濃度 1 $\mu\text{g/ml}$ となるように DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, Sigma-Aldrich 社) を添加し染色液を調製した。蛍光プローブは Yasuhara らの方法に従って作製した (Table 4-4, Yasuhara et al. 2001, 2002, 2004)。染色液を浸み込ませたら紙にメンブランを載せ、モイスチャーチャンバー内で遮光条件下、46°C、90 分間インキュベートすることにより FISH 染色した。染色後、 μFinder 微生物検査システムを用いて、FISH 染色されたマイクロコロニーの検出を行った。

(6) μFinder 微生物検査システムによる計測

μFinder 微生物検査システム (Asahi Breweries 社) はオートフォーカスユニットを搭載した Leika 社製落射蛍光顕微鏡と、CCD カメラ、XY 軸自動ステージおよびそれらを制御するソフトがインストールされたパソコンから構成されている。検出方法は、まず一次検出モー

ドで供試メンブレン全体を低倍率（×100）で高速にスキャンし、蛍光を発する物体の場所を特定する。次に二次検出モードで一次検出物を高倍率（×200）で精査し、形状や蛍光強度から微生物が否かを自動判定する。自動で切り替わる蛍光ブロックを使用しているため、どちらの検出モードでも 3 種類の波長の違う蛍光色素の検出ができるようになっている (Motoyama et al. 2008, 2009)。本研究においては、マイクロコロニー-CFDA 法では一次および二次検出で CFDA を、マイクロコロニー-FISH 法では一次検出で DAPI を、二次検出で Cy3 と DAPI を検出するように設定した。

第3節 結果

1. マイクロコロニー-CFDA 法の開発

(1) 供試菌の選定

本法の構築にあたり、ビール混濁性が強く、迅速な検査が最も期待される *Lactobacillus brevis*、*L. paracollinoides*、および *L. lindneri* を検出対象菌種とした。そこで、これら3菌種の当社保有株の中で最も生育の緩慢な株を選択し、マイクロコロニー法の検証に使用することとした。Table 4-1 に、上記3菌種の当社保有株のうち比較的緩慢な生育を示す株と、ABD培地において25°C、嫌気培養した際に、目視でコロニーが確認できるまでの日数を示した。その結果、*L. brevis*の供試株はすべて3日でABD培地上でコロニー形成が確認され、株間で顕著な差がなかったことから、標準的な生育を示す ABBC45 株と ABBC64 株を代表株として使用することにした。また、*L. paracollinoides* においては、供試した14株中9株が4日でコロニーが判別できたのに対し、5株は5日を要したため、この5株を代表株として使用することとした。さらに、*L. lindneri*の供試株7株すべてが、目視で確認できるコロニーに生育するまで5日～6日を要したため、7株すべてを代表株として今後の評価に使用することとした。

(2) 染色試薬の選定

微生物の生理状態を把握する蛍光染色剤として、CTC (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazorium chloride) などの蛍光テトラゾリウム塩や、FDA (fluorescein diacetate) 系試薬が用いられることが多い。また、核酸の染色試薬として、Acridine Orange や SYBR Green, DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) などが挙げられる。一般的に、死んだ細胞のほうが染色が有効であり多用されているものの、固定処理なしで生細胞を良好に染める試薬がいくつか存在し、そのひとつが Fluorescein diacetate (FDA) である。FDA系試薬は生きて菌体に含まれる酵素であるエステラーゼにより分解を受け、分解産物となって初めて蛍光を発するため (Fig 4-1)、微生物の生死判定が菌種に依存せずに行えるという利点がある (Kawai et al 1999)。そのため、生菌のみが製品における危害菌となるビール醸造においては、死菌を検出しない本試薬を用いた検出法は擬陽性を減らす点でも優れていると考えられた。また、本マイクロコロニー検査法においては、すべての微生物種で汎用性が高いことが求められる上に、製造現場に導入する場合の運用コストを考慮する必要があったため、安価で菌種に依存しない CFDA (carboxyfluorescein diacetate) を選択した。マイクロコロニー-CFDA法を用いた検査フローを Fig 4-2 に示す。

(3) 培養時間の検討

マイクロコロニー-CFDA 法における ABD 培地上での培養時間を検討するため、選別した *L. brevis*、*L. paracollmoides* および *L. lindneri* のそれぞれの代表株をビールで前培養後メンブレンに補足し、ABD 培地で培養開始後一定時間ごとに CFDA 染色し、蛍光を発するマイクロコロニーが検出できるかを調べた (Table 4-3)。その結果、ビール混濁性乳酸菌の中でも生育が緩慢な *L. lindneri* はすべて 62~64 時間、*L. paracollmoides* はすべて 40 時間、*L. brevis* はすべて 20 時間の培養時間で明確なマイクロコロニーを検出することが可能であった (Fig. 4-3)。また、数回しか分裂していない微小コロニーが良好に染色され、検出できていることが確認できた (Fig. 4-4)。

(4) 検出感度の評価

マイクロコロニー-CFDA 法を製品の微生物試験に使用できるかどうかを見極めるポイントとして、伝統的な培養法と同等の検出感度を有することを確認する必要がある。そこで、*L. brevis* ABBC45 株と ABBC64 株、*L. paracollmoides* JCM 15731 株と、MRS 培地に難培養性を示す JCM 11969TM ならびに JCM15729TM 株、さらに *L. lindneri* DSM20690 株と MRS 培地に難培養性を示す DSM 20692TM 株ならびに HC92TM 株について、同時に一般的培養法とマイクロコロニー-CFDA 法に供し感度を比較した (Table 4-5)。すなわち、1 サンプルあたり 30~300 cells となるように調整した菌液を、ABD 培地に塗抹し 14 日間培養して計測した CFU と、同じ菌液をポリカーボネートメンブレンにろ過後、上記 (3) で検討した培養時間を経てマイクロコロニー-CFDA 法で検出したマイクロコロニー数を比較した。その結果、*L. brevis* の代表株 2 株においては、培養法とマイクロコロニー-CFDA 法での感度の違いは認められず、むしろマイクロコロニー-CFDA 法の検出コロニー数の方が上回っていた。また、*L. paracollmoides* および *L. lindneri* においても、培養法とマイクロコロニー-CFDA 法での感度の違いは認められなかった。

(5) ビール非混濁性菌に対する選択性の評価

緒言で述べたように、ABD 培地はビール混濁性菌に対する高い選択性を有することが示されている。本研究で構築したマイクロコロニー-CFDA 法の選択性は、主として ABD 培地による選択性に基づいているため、本法のビール混濁性菌の選択性は高いと考えられた。しかしながら、初期の増殖段階の微小コロニーを顕微鏡で検出する手法であるため、ビール非混濁性菌が自視で確認できるほどには生育できなくとも、マイクロコロニーを形成するまでの増殖能を有している場合、擬陽性判定を生じる可能性がある。

そこで、ビール工場環境で頻出する微生物に対して、マイクロコロニー-CFDA 法が有効

であるかを検証した。Table 4-2 に示す腸内細菌科、*Bacillus* 属、*Clostridium* 属、*Staphylococcus* 属などに属するビール環境頻出 14 菌種に対して、培養時間を 20 時間および 72 時間に設定しマイクロコロニーCFDA 法を実施したところ、いずれの供試株においても蛍光染色されたマイクロコロニーは検出されなかった (Table 4-2)。また、*Clostridium beijerincki* HC350 株、*Staphylococcus warneri* HC437、および *Staphylococcus* 属菌 HC475 株以外の株で CFDA 染色された single cell が観察された (data not shown)。

同様に、ビール混濁性を持たない乳酸菌についても選択性を調査したところ、*L. brevis*、*L. paracollinoides*、*L. lindneri* など分類学上主要なビール混濁性乳酸菌種に属するものの、株レベルでは混濁性を示さない菌株に対しても、マイクロコロニーCFDA 法で擬陽性となる乳酸菌の検出はなかった (Table 4-2)。しかしながら、すべての株で割合は違うものの、植菌数の 0.1-2 % 程度の single cell が CFDA 染色されている様子が観察された (data not shown)。さらに、*Lactobacillus casei* ATCC334 株は、10 日培養したメンブレンを CFDA 染色して検出したところ、植菌数の 0.5 % 程度がマイクロコロニーを形成していることが分かった (data not shown)。

2 マイクロコロニー-FISH 法の構築

FISH 法は微生物の菌体内に含まれる標的遺伝子に対して特異的なプローブを設計することにより対象とする微生物種のみを蛍光染色する手法で、これまでにビール混濁性細菌についても rRNA を標的とした菌種特異的な検査法が報告されている (Yasuhara et al. 2001, 2002, 2004)。本研究で構築したマイクロコロニーCFDA 法は、ビール混濁性乳酸菌を迅速に、かつ高い選択性を持って検出できる方法であるが、検出菌の菌種同定が同時にできることは検査法の適用範囲を広げ、醸造工程における迅速な対応にもつながる。また、マイクロコロニーを形成する段階、すなわち対数増殖期のような生理活性が高い状態の細菌では、rRNA が数千コピー存在するため、蛍光強度が高くなり、高感度に検出できることが期待された。そこで筆者らは、マイクロコロニーCFDA 法で検出を行い、陽性であった場合にさらに FISH 法を組み合わせることで、同時に菌種同定を行う手法の構築を試みた。

L. brevis、*L. paracollinoides*、および *L. lindneri* をマイクロコロニーCFDA 法によって検出した。検出したコロニーに対してエクソールを用いた固定処理を行い、それぞれ菌種特異的なプローブをミックスしたプローブカクテルで処理し FISH 法を行った。その結果、これらのプローブは本法に適合した場合に交差反応することなく、該当する菌種を正しく識別できた (Table 4-6)。Fig. 4-5 に実際の CFDA 染色法および FISH 法の試験結果を示した。その結果、コロニー形状が破壊されることなく連続的に蛍光染色が行われていることが観察された。

Table 4-1. List of test strains and detection time on ABD medium

Species	Strain no ^a	Detection time (days)	Species	Strain no	Detection time (days)
<i>L. brevis</i>	ABBC3	3	<i>L. lindneri</i>	DSM 20690 ^T	5
	ABBC34	3		DSM 20692	5
	ABBC37	3		HC92	5
	ABBC42	3		HC95	5
	ABBC43	3		HC98	5
	ABBC45	3		DSM 20692 ^{vn}	6
	ABBC45 ^c	3		HC92 ^{vn}	6
	ABBC46	3		JCM 11969 ^T	5
	ABBC56	3	JCM 15728 (LA3)	5	
	ABBC64	3	JCM 15729 (LA4)	4	
	ABBC69	3	JCM 15730 (LA7)	4	
	ABBC70	3	JCM 15731 (LA8)	5	
	ABBC84	3	ABBC75	4	
	ABBC85	3	ABBC82	4	
	ABBC86	3	ABBC83	4	
	ABBC100	3	ABBC91	4	
	ABBC104	3	ABBC92	4	
	ABBC400	3	ABBC93	4	
	ABBC402	3	ABBC420	4	
	ABBC403	3	JCM 11969 ^{vn}	5	
	ABBC404	3	JCM 15729 ^{vn}	5	
	ABBC405	3	<i>L. backi</i>	LA21	4
	ABBC407	3	<i>Pediococcus</i>	ABBC478	4
	ABBC408	3	<i>damosus</i>	ABBC500	4

^a ABBC, HC and LA – our culture collections principally consisting of brewery isolates, JCM – Japan Collection of Microorganisms, DSM – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. The parenthesis indicates the strain number described in the prior literature. vn indicates the deeply beer-adapted variants that lost the culturability on conventional MRS medium. c indicates the horA⁻-deficient variant (Sano et al. 1998).

Table 4-2. Selectivity of microcolony-CFDA method for nonspoilage strains ^a

	Species	Strain no ^b	Detection
Frequent nonspoilage isolates from brewery environments	<i>Lactococcus lactis</i>	HC311	-
	<i>Clostridium beijerinckii</i>	HC350	-
	<i>Serratia marcescens</i>	HC367	-
	<i>Citrobacter freundii</i>	HC417	-
	<i>Enterobacter cloacae</i>	HC432	-
	<i>Staphylococcus warneri</i>	HC437	-
	<i>Propionibacterium acnes</i>	HC440	-
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	HC442	-
	<i>Pantoea agglomerans</i>	HC453	-
	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	HC459	-
	<i>Paenibacillus jamilae</i>	HC466	-
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	HC475	-
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	HC534	-
	<i>Sporolactobacillus racemicus</i>	HC566	-
	Nonspoilage LAB	<i>Lactobacillus brevis</i>	ABBC12
<i>Lactobacillus brevis</i>		JCM 1059 ^T	-
<i>Lactobacillus lindneri</i>		DSM 20692 ^{NB}	-
<i>Lactobacillus paracollinoides</i>		ATCC 8291	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>		JCM 1149 ^T	-
<i>Lactobacillus cozymiformis</i>		JCM 1164 ^T	-
<i>Lactobacillus casei</i>		ATCC 334	-
Spoilage LAB	<i>Lactococcus lactis</i>	IAM 1150	-
	<i>Lactobacillus brevis</i>	ABBC45	+
	<i>Lactobacillus lindneri</i>	DSM 20690 ^T	+
	<i>Lactobacillus paracollinoides</i>	JCM 11969 ^T	+

^a Approximately 100 cells of test strains were trapped on polycarbonate filters and incubated on ABD medium. After 72 h of incubation, the formation of microcolonies was examined. + The presence of microcolonies was detected. - Microcolonies were undetectable.

^b NB indicates a nonspoilage variant acquired from a beer-spoilage LAB strain (Suzuki et al. 2005).

Table 4-3. Detection time for microcolony-CFDA method.^a

Species	Strains	Detection time
<i>L. brevis</i>	ABBC45	20h
	ABBC64	20h
<i>L. lindneri</i>	DSM 20690 ^T	62h
	DSM 20692	62h
	HC92	64h
	HC95	64h
	HC98	64h
	DSM 20692 TM	62h
	HC92 TM	62h
<i>L. paracollinoides</i>	JCM 11969 ^T	40h
	JCM 15728	40h
	JCM 15731	40h
	JCM 11969 TM	40h
	JCM 15729 TM	40h

^a Approximately 10 cells of each test strain were trapped on membrane filter and the time required for detection was investigated. All the experiments were carried out in triplicates and the detection time was identical for each of the cases.

Table 4-4. Sequences of Microcolony-FISH probes for beer-spoilage lactobacilli^a

Species	Sequence (5' to 3')	
<i>Lactobacillus brevis</i>	5'-CGTCAACCCCTTG AACAGTTA-3'	
	5'-AACGTCTTATCTCTAAGATT-3'	
	5'-GACTCCCGAAGGTTATCTCA-3'	
	5'-TCTGCC TCAACTTGACTA T-3'	
	5'-CCTCTATGCCGAGCCTTCC-3'	
	5'-TACATCAATTTACTGAAAC-3'	
	5'-AATCGTGTGCACACCATAGC-3'	
	5'-GACTCATCACCAGACTTGAC-3'	
	5'-TCGT CACGCCTTGTCCTTAG-3'	
	5'-CTGGCGCTTCCCTACTAAAAT-3'	
	<i>L. paraacollinoides</i>	5'-TGGTGAACCGTTACTCCACC-3'
		5'-ACCGTCAACGTCTGAACAGT-3'
		5'-CTTAGGTTAGCACAGTATGT-3'
5'-CCACCTGTATCTGCGTCCC-3'		
5'-CCGAAGGTTACCGAACCGAC-3'		
5'-ACCATCGGTTAAGATGGCTG-3'		
5'-ACCTTGTTCAACTACCAACA-3'		
5'-CACAAATTTGGTGGTATCCT-3'		
5'-TCAAACACACTTTACTAGTA-3'		
5'-CCAATCGTGGCGCACGGCTTA-3'		
<i>L. lindneri</i>		5'-GTGGTTCTCGTTGTTATACG-3'
	5'-AGTTGCTCTCACGGTCGTTG-3'	
	5'-GACTCCGTAAAGGTTATCCAA-3'	
	5'-TCACTCTCTTTGGTGCAGCT-3'	
	5'-TTCGATTTCAATTAACGAGAC-3'	
	5'-CTACGGCAACATACTAAAAC-3'	
	5'-TCCATCAGTATGCATAACTT-3'	
	5'-CATGGGTTACTTCTCTACTT-3'	

^aCited from Yasuhara et al. 2001

Table 4-5. Recovery tests of microcolony-CFDA method.

Species	Strains	Incubation time	CFDA staining ^a	CFU on ABD ^b
<i>L. brevis</i>	ABBC45	20h	185.3±7.5	145.0±5.3
	ABBC64	20h	390.3±28.0	284.7±15.2
<i>L. imdneri</i>	DSM 20690	64h	109.3±12.7	119.0±8.7
	DSM 20692 [™]	64h	122.7±14.2	141.0±17.8
	HC92 [™]	64h	100.7±11.4	86.0±4.6
<i>L. paracollmoides</i>	JCM 15731	40h	46.7±11.9	40.0±16.0
	JCM 11969 [™]	40h	180.0±19.0	144.7±22.4
	JCM 15729 [™]	40h	116.0±6.2	94.0±7.0

^a Approximately 30-300 cells were trapped on polycarbonate membrane filters and incubated for the periods indicated. Microcolonies were detected by μ Finder Inspection System. The numbers of CFDA-stained microcolonies are expressed as mean value \pm standard deviation obtained from three experiments.

^b The identical portions of cells were trapped on mixed cellulose ester membrane filters and incubated on ABD medium for 14 days. The detected colony forming units (CFUs) were expressed as mean value \pm standard deviation obtained from three experiments.

Table 4-6 Specificity of microcolony-FISH method^a

Species	Strains	Species-specific probes		
		<i>L. brevis</i>	<i>L. hindneri</i>	<i>L. paracoliformes</i>
<i>L. brevis</i>	ABBC45	+	-	-
	ABBC64	+	-	-
<i>L. hindneri</i>	DSM 20692	-	+	-
	HC92	-	+	-
<i>L. paracoliformes</i>	ICM 11969 ^T	-	-	+
	ICM 15728	-	-	+
	ICM 15729	-	-	+
<i>L. backi</i>	LA21	-	-	-

^a CFDA-stained microcolonies were subjected to FISH staining. + Microcolonies were stained positively with species-specific probes. - Microcolonies were stained negatively with species-specific probes.

第4節 考察

近年、消費者の嗜好によって加熱しない生ビールが主流となる傾向に付随して、ビールの製造から出荷までの日数が短縮されてきている。すなわち、製造直後の新鮮なビールのおいしさを訴求するためには、工場で保管している期間をできるだけ短くすることが肝要となってきた。そのためには、製品ビールの品質検査が短時間で終了することが不可欠であり、最も時間を必要とする微生物検査の迅速性が求められている。

そこで本研究では、培養法による長期培養時間を短縮することで、微生物検査の迅速化を図る目的で、ABD培地で生育できる菌が形成する微小なコロニーを検出し、FISH法によって菌種同定を行う、マイクロコロニーFISH法の検討を行った。

対象としたビール混濁性乳酸桿菌 *Lactobacillus brevis* 24株、*L. paracollimoides* 14株、および *L. lindneri* 7株の中のABD培地生育日数を調べたところ、目視でコロニー形成が確認できるまでに、*L. brevis* はすべて3日、*L. paracollimoides* は9株が4日で5株が5日、*L. lindneri* は7株すべてで5日以上を要することが分かった (Table 4-1)。この結果は、*L. paracollimoides* および *L. lindneri* は培養法での検出が困難であるという知見と合致する (Back 2005, Suzuki et al 2008b, 2008c)。さらに、これらの株でマイクロコロニーの形成過程を観察した結果、*L. brevis* は20時間、*L. paracollimoides* は40時間、*L. lindneri* においては62-64時間で、メンブレン上のほとんどすべての菌がマイクロコロニーを形成していることが判明したため、この培養時間を固定して検出感度の確認を行うことにした (Table 4-3, Fig. 4-3)。

本迅速検査法を構築するにあたっては、新規検査法での測定菌数が培養法でのCFUと比較して遜色がないことが重要である。そこで、同一の供試菌液を用いてマイクロコロニーCFDA法と培養法の検出感度を比較することにした。その結果、供試したいずれの菌種でも培養法でのCFU数と同等あるいはそれ以上のマイクロコロニー数が検出されたことから、本法が実用水準の検出感度を有していることが分かった (Table 4-5)。特に、*L. brevis* の2株ではCFDA染色されたマイクロコロニー数は培養法でのCFUを上回る結果となったことから、マイクロコロニーCFDA法はコロニーを形成せず増殖能が低い菌体も検出できていることが明らかとなった。

一方、数回分裂した程度のマイクロコロニーを検出できる (Fig. 4-4) という高い感度は、裏を返せば、ビール非混濁性細菌を誤判定してしまう可能性があるということになる。しかしながら、工場環境で検出される細菌や、ビール混濁性を持たない近縁乳酸菌では、マイクロコロニーCFDA法で陽性反応が認められなかったことから (Table 4-2)、本法の特異性が必要十分であることが確認できた。しかしながら、供試したほとんどの株で、CFDA染色された single cell が観察されたことから、それらの株は増殖能は持たないが死滅せず生

存していることが分かった (data not shown)。このようなビール非混濁性株の観察結果は、FISH 法では擬陽性となるリスクとなることから、本マイクロコロニー-CFDA 法がビール中で生存できる菌体ではなく、増殖する可能性を持つ菌体を特異的に検出している優位性を裏付ける結果と思われる。

以上の結果から、マイクロコロニー法が高い選択性を持ってビール混濁性乳酸菌を検出できることが分かったため、さらに FISH 法で菌種の同定を試みたところ、*Lactobacillus brevis*、*L. paracollinoides*、および *L. lindneri* を正しく判別できたことから、マイクロコロニーを CFDA で染色して検出し、続けて FISH 法を行うという、連続した迅速検査法が確立できた。

本研究では蛍光試薬として CFDA を用いている。しかしながら、マイクロコロニー法の検出の中で細胞内 ATP に着目した手法は数多い。ビール産業においては、ミリポア社が開発した Microstar-RMDS という ATP バイオルミネッセンス法に基づいたマイクロコロニー検査法の評価が行われている (Nakakita et al 2002)。本法は、簡便に高感度かつ生存している微生物種の検出が行えるという利点がある一方、検出限界以上の ATP 発光量が必要なため、数個レベルのマイクロコロニーを検出するのは困難である。また、試薬に混入、あるいは実験器具に付着した、検査対象微生物以外に由来する ATP がバックグラウンドを上昇させる、あるいは菌体が破壊されてしまうので検出後に続けて行うことができる同定試験が限られてしまうといった運用上の問題もある。これに対し、本研究で構築したマイクロコロニー法では、細胞内に取り込まれ、細胞内で蛍光物質へと変化する CFDA を用いていること、あるいは、1 個の細胞から検出可能な μ Finder を用いたことから、短時間の培養で確実にマイクロコロニーを検出でき、同時に FISH 法による菌種同定を行うという連続性をもたせることができた。

さらに、本研究でマイクロコロニー法に ABD 培地を用いたことにより、培地の選択性に基づき、未知のビール混濁性乳酸菌を検出できる可能性が広がったと言える。近年になって分離・同定されたビール混濁性細菌にはビール中では生育できるものの、従来の検査培地では生育できないものも存在することが報告されている (Suzuki 2010)。また、ビール環境で棲息してきた細菌にとって、寒天培地で突然巨大コロニーを形成することは多大なエネルギーを消費する必要があることを考えあわせると、ABD 培地上でも数回の増殖しかできないビール混濁性細菌が存在する可能性は否定できない。

加えて、マイクロコロニーを形成できる、すなわち増殖能を持つ微生物種を検出することにも大きな意義がある。ビール中で生存している菌種は多くいるものの、増殖して品質に悪影響を及ぼさない限り、ビールに有害な菌とはみなされない (Lawrence and Priest 1981)。

そのため、本法で生菌、あるいは増殖可能な微生物種だけを対象とすることは、必要十分な範囲に検査対象を絞り込むことになり、無駄な労力を省き検査に要する時間を短縮することにもつながったと考えられる。

本研究で行った培養時間の検討の結果、*L. brevis* は 20 時間、*L. paracollumoides* は 40 時間、そして *L. lindneri* では 62-64 時間が必要と結論づけた。しかしながら、各培養時間は擬陰性を避けるために植菌数のほぼ全数を検出可能な培養期間である。そのため、もっと短時間の培養でも検出は可能である。例えば、*L. brevis* は培養開始から数時間で、また *L. lindneri* は培養 20 時間の時点でも株によっては 7-8 割がマイクロコロニーを形成しているのが観察されたことから (data not shown)、実際に運用する場合は一定時間(例えば 10 時間)ごとに検出を行うことが望ましい。また、一度蛍光顕微鏡での検出を行ってしまうと、検鏡時のコンタミネーションや励起光・染色試薬による細菌への影響により、再び培養に戻すことができなくなるため、1 サンプルあたり複数枚のメンブレンで並行して試験する必要がある。しかしながら、このような操作は煩雑であることから、将来的には菌体への影響が少ない蛍光検出法や試薬を用いることにより、検出を何回も行う、あるいは培養時間を延長してもう少し観察を続けるといった手法が開発できると考えている。

マイクロコロニー法への期待は 1987 年の文献に記述が残っているが、培養法に近い原理であり有用性が見込まれるものの、“extremely laborious and not amenable to automation”と書かれている (Shaw 1987)。しかしながら、蛍光顕微鏡や CCD カメラ、制御ソフトの進歩により、現在では非常に短時間でマイクロコロニーの検出を行うことが可能となっている。本法では 1 メンブレンあたり約 10 分ほどで、異物の有無を判断する一次スキャンが終了するため、実際のビール工場の膨大な生産量に対応するサンプル数に十分に対処できると考えられる。本研究において、今後分析機器の進歩に応じて検査法の検出感度や迅速性向上の検討を行う必要性を指摘できたことは意義深いと考えている。

第5節 要約

ビール混濁性乳酸菌はごくわずかな菌数でも製品ビールで増殖することから、ビールの微生物検査には確実な検出力を持つ培養法が用いられてきた。一方、培養法は結果を得るまでに長時間かかるため、緊急時の出荷の可否を判断するには不向きであるため、培養に依存しない直接 FISH 法などの迅速検査法が開発されてきたが、非微生物粒子由来のノイズが問題となっていた。本報告では、難培養株も含めて包括的にビール混濁性乳酸菌を検出できる ABD 培地と、蛍光染色法を組み合わせた新規検査系の開発を行い、ビール混濁性乳酸菌を3日以内で検出する方法を確立した。本法では第一ステップとして、ABD 培地上での短時間培養によりビール混濁菌を特異的に増殖させ、第二ステップとして、自動検出できる蛍光顕微鏡にて蛍光染色された微小マイクロコロニーを高感度で検出する。この方法における検出感度および特異性を調査したところ、数 cells/検体レベルの混入混濁菌を検出できる感度を有し、さらにビール混濁性を持たない工場環境類出菌に対して擬陽性反応を示さないことが確認された。

また、検出されたマイクロコロニーに対して、ビール混濁性乳酸菌の rRNA 遺伝子と相補する配列を持つ蛍光プローブを用いて FISH 法を行ったところ、煩雑な操作を必要とせず菌種同定できたことから、連続してビール混濁性乳酸菌判定ができるマイクロコロニー-FISH 法が構築できたことが示された。

第5章

考察および今後の展望

近年のビール類の消費傾向は、最終製品の加熱殺菌を行わない生ビールの製造・販売が主流となっている。そのため、ビールの発酵および熟成工程から容器への充填工程に至るまで、厳しい微生物管理が必要とされている。一方、製造コストを削減するために、発酵・熟成期間、あるいは製造から市場に出回るまでの期間を可能な限り短縮する傾向が日本のみならず世界的にも広がってきている。また、ビールは製造から時間を経るほど香味が劣化するため、市場に流通し、消費者の手元に届くまでの時間はできる限り短い方がよい。しかしながら、ビールの醸造工程、および製造から出荷までの保留期間の短縮を行うためには、適切な微生物検査を短時間で行う必要がある。本研究では、このような背景の中、微生物検査の迅速化を目的とし、ビール混濁性細菌に焦点をあてて研究を行った。本論文は①マルチプレックス PCR 法を用いたビール混濁性細菌の包括的な菌種同定検出法の開発（第2章）、②ビール馴化が乳酸菌に及ぼす影響の考察（第3章）、および③マイクロコロニー法を用いたビール混濁性乳酸菌の迅速検出法の開発（第4章）の3部から構成される。

第2章において、微生物検査で検出された細菌のビール混濁性判定のための手法の一つとして多用されている菌種特異的シンプレックス PCR 法を刷新し、簡便で包括的に既知ビール混濁性細菌の検出を可能とするマルチプレックス PCR 法、L multiplex、P multiplex、C multiplex を開発した。いずれのマルチプレックス PCR 法においても、菌種特異的 PCR 法と同等の検出感度と実用水準の反応性を有していることが明らかとなった。さらに、各対象菌種の近縁種や、ビール工場環境から頻出する細菌種に対して各マルチプレックス PCR 法を用いたところ、陽性反応は認められず高い特異性を有することが示された。このように、12 菌種のビール混濁性細菌に対して、3 種類のマルチプレックス PCR 法により網羅的な検出を簡便に行うことが可能となったことは、毎日製造現場で行われる微生物検査の煩雑さを減らす効果があるだけでなく、性状調査における判断ミスを補い堅実な品質管理を行う基盤となると考えている。一方で、コンタミネーションによる誤判定の原因となる対象菌種の DNA を検査系に持ち込むことなく、かつ、1 反応系ですべてのマルチプレックス PCR 法のプライマーの反応性を確認できる人工陽性対照 DNA の作成法を開発し本検査法をより確実に簡便にすることができた。このような対象菌種の DNA 配列と、それとは別個の遺伝子配列を有する、いわばキメラ DNA 断片を利用した陽性対照は、ビール混濁性細菌以外にも様々なマルチプレックス PCR 法に広く応用することができるため、今後の検査法の構築

に役立つことが期待される。以上のことから、本研究は既知ビール混濁性細菌種の検査法を簡便で迅速にしたばかりでなく、今後続々と発見される可能性の高い新菌種に対応した検査法の導入へ余地を残すという意味で意義深いと考えている。

第3章では、ビール醸造工程で行われているメンブレンフィルターによるろ過除菌工程の微生物管理について、実験室株とビールに馴化した菌体を用いた場合にどのような差が生じるかについて研究を行った。その結果、ビール混濁性乳酸菌 *L. lindneri* および *L. paracollinoides* はビールに馴化すると矮小化し、除菌フィルターを著しく通過しやすくなることが分かった。さらに、高度にビールへの馴化を繰り返したところ、ビールでは混濁性を示すにもかかわらず、通常の乳酸菌検査培地である MRS 培地では生育しない株を取得することができた。これらのことから、ビールという貧栄養でアルコールやホップ成分のような抗菌物質を含む過酷な環境は、一部の乳酸菌種において、細胞の矮小化や MRS 培地への難培養性を引き起こすことが考察された。さらに、ビール醸造工程の微生物管理に用いる供試菌については、ビールに馴化した株を用いることが適していることが示唆された。今日、ビール業界のみならず、企業が製品の製造工程の微生物品質管理について情報を開示することは極めて少ない。そのような現状の中、本研究で行ったフィルターろ過工程に関する研究内容を論文投稿ならびに学会発表をおこなったところ、ビール業界の多くの関係者から共感と高い評価を頂くことができたため、ビール醸造微生物学の発展に大きく貢献できたのではないかと考えている。

第4章においては、検査に長期間を要するが確実な検出力をもつ培養法と、培養を介さずに微生物の検出を行うことのできる直接 FISH 法の両方の利点を生かしたマイクロコロニー FISH 法を用いて、ビール混濁性乳酸菌の迅速検査法を構築した。本法は培養法と同等の検出感度を有するとともに、ビール混濁性を持たない乳酸菌株やビール工場環境類出菌に対して擬陽性反応を示さないことが確認された。さらに、マイクロコロニー形成までの培養過程において ABD 培地を用いたことにより、第2章のような従来の既知菌種を検出する菌種特異的 PCR 法では検出できない未知のビール混濁性細菌や、第3章で明らかとなった MRS 培地に難培養性を示すビール混濁性乳酸菌を検出することが可能となった。本法は、ABD 培地の改良や、分析機器の進歩、ならびに蛍光試薬およびプローブの変更など、さらに性能を高められる可能性を秘めており、今後も研究開発を続けることでより迅速で確実な微生物検査法を構築していきたい。

ビール混濁性細菌に関する研究は、時代とともに変化している。例えば、製造方法が改良され、容器内の溶存酸素が低減されることにより偏性嫌気性菌が問題となる、あるいは消費者嗜好の変化により非加熱ビールが主流となることで微生物リスクが高まるなど、ビールの微生物耐久性を左右する要因は様々である。さらに、近年は健康志向の高まりや酒

税法の改定などに起因して、麦芽を使用しないビールやノンアルコールビールの消費が増加傾向にあり、さらに微生物リスクが高まることが予想されることから、今まで以上に厳しい微生物管理が求められると考えられる。一方で、ビール混濁性微生物の分野においては多くの先輩が様々な面から研究してきた成果により、その性状や制御に関する知見が蓄積されてきた。今後は、それらの知見を実際の微生物品質管理および微生物検査に役立てるとともに、さらなるビール混濁性微生物の研究に役立つ新しい知見を開拓していくことが重要である。本分野の更なる進展とビール醸造の発展に大いに期待したい。

略語表

ABBC	Asahi Breweries Bacterial Collection
ABC	Adenosine 5'-triphosphate binding cassette
ABD	Advanced Beer-spoiler Detection
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosine triphosphate
bp	Base pairs
CCD	Charge Coupled Device
CFDA	CFDA (5-[and 6-] carboxyfluorescein diacetate
CFU	Colony forming unit
C multiplex	Multiplex PCR method for beer-spoilage cocci
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	2'-Deoxyribonucleoside-5'-triphosphate
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
FDA	Fluorescein diacetate
FISH	Fluorescent <i>in situ</i> hybridization
HC	Culture collection for bacterial strains isolated from brewery environments
IFO	Institute for Fermentation, Osaka
ITS	Internal transcribed spacer
JCM	Japan Collection of Microorganisms
kb	Kilo-base pairs
LA	Culture collection for unidentified lactic acid bacteria strains
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification
LB	Luria-Bertani
<i>L. casei</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
<i>L. collinoides</i>	<i>Lactobacillus collinoides</i>
<i>L. coagulans</i>	<i>Lactobacillus coagulans</i>

<i>L. backi</i>	<i>Lactobacillus backi</i>
<i>L. brevis</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
<i>L. lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>L. lindneri</i>	<i>Lactobacillus lindneri</i>
L. multiplex	Multiplex PCR method for beer-spoilage <i>Lactobacillus</i> species
<i>L. paracollmoides</i>	<i>Lactobacillus paracollmoides</i>
LRV	Log reduction value
M	Molarity
<i>M. cerevisiae</i>	<i>Megasphaera cerevisiae</i>
<i>M. paucivorans</i>	<i>Megasphaera paucivorans</i>
MPN	Most Probable Number
MRS	de Man, Rogosa and Sharpe
<i>M. sueciensis</i>	<i>Megasphaera sueciensis</i>
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCFB	National Collection of Food Bacteria
NCIMB	the National Collections of Industrial, Food and Marine Bacteria
no	Number
ORF	Open reading frame
PBS	Phosphate buffered saline
<i>Pect. cerevisiphilus</i>	<i>Pectinatus cerevisiphilus</i>
<i>Pect. frisingensis</i>	<i>Pectinatus frisingensis</i>
<i>Pect. portalensis</i>	<i>Pectinatus portalensis</i>
PCR	Polymerase chain reaction
<i>Ped. acidilactici</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>Ped. claussemii</i>	<i>Pediococcus claussemii</i>
<i>Ped. dammosus</i>	<i>Pediococcus dammosus</i>
<i>Ped. dextrinicus</i>	<i>Pediococcus dextrinicus</i>
<i>Ped. mopimatus</i>	<i>Pediococcus mopimatus</i>
<i>Ped. parvulus</i>	<i>Pediococcus parvulus</i>
<i>Ped. pentosaceus</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>Pect. frisingensis</i>	<i>Pectinatus frisingensis</i>
<i>Pect. hankarai</i>	<i>Pectinatus hankarai</i>
P multiplex	Multiplex PCR method for <i>Pectinatus</i> species

<i>Pect. portalensis</i>	<i>Pectinatus portalensis</i>
rDNA	Ribosomal ribonucleic acid gene
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RNA	Ribonucleic acid
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SMR	Small multidrug resistance
T	Type strain
TAE	Tris hydroxyethyl-acetate-ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid
TGC	Thioglycolate
U	Unit
VNC	Viable but Nonculturable State
VTT	Valtion Teknillinen Tutkimuskeskus

参考文献

- Amann, R. I., Ludwig, W. and Schleifer, K. H. (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation *Microbiol Rev* **59**, 143-169
- Amor, K. B., Breeuwer, P., Verbaarschot, P., Rombouts, F. M., Akkermans, A. L., De Vos, W. M. and Abee, T. (2002) Multiparametric flow cytometry and cell sorting for the assessment of viable, injured, and dead bifidobacterium cells during bile salt stress *Appl Environ Microbiol* **68**, 5209-5216
- Anderson, J. I. W., and Heffernan, W. P. (1965) Isolation and characterization of filterable marine bacteria *J Bacteriol* **90**, 1713-1718
- ASTM (American Society for Testing and Materials : 米国材料試験協会) F838-05 Standard test Method for Bacteria Retention of Membrane Filters Utilized for Liquid Filtration²
- Baatout, S., Leys, N., Hendrickx, L., Dams, A. and Mergeay, M. (2007) Physiological changes induced in bacteria following pH stress as a model for space research *Acta Astronautica* **60**, 451-459
- Back, W., Weiss, N. and Seidel, H. (1979) Isolierung und systematische Zuordnung bierschädlicher gramnegativer Bakterien II Gramnegative anaerobe Stäbchen *Brauwiss* **32**, 233-238
- Back, W. (1980) Bierschädliche Bakterien *Brauwelt* **120**, 1562-1569
- Back, W. (1987) Neubeschreibung einer bierschädlichen Laktobazillen-Art *Lactobacillus mevisimilis* spec. nov. *Mamatsshu Brau* **34**, 267-276
- Back, W. (1992) Flash pasteurization- membrane filtration *Brauwelt Int* **10**, 42-49
- Back, W. (1994a) Secondary contaminations in the filling area *Brauwelt Int* **4**, 326-333
- Back, W. (1994b) Einteilung der bierschädlichen Bakterien. In Back, W. (ed), "Farbatlas und Handbuch der Getränkebiologie," Verlag Hans Carl, Nürnberg, Germany, **1**, 62-67
- Back, W. (1994c) Nachweis von Bierschädlingen mittels NBB. In Back, W. (ed), "Farbatlas und Handbuch der Getränkebiologie", Nürnberg, Verlag Hans Carl **1**, 145-155
- Back, W. (2003) Biofilme in der Brauerei und Getränkeindustrie *Brauwelt* **24/25**, 766-777
- Back, W. (2005) Brewery, in Back, W. (Ed), *Colour Atlas and Handbook of Beverage Biology*, Verlag Hans Carl, Nürnberg, 10-112
- Back, W., Bohak, I., Ehrmann, M., Ludwig, W. and Schleifer, K. H. (1996) Revival of the species *Lactobacillus lindneri* and the design of a species-specific oligonucleotide probe *Syst Appl Microbiol* **19**, 322-325
- Back, W., Breu, S. and Weigand, C. (1988) Infektionsursachen im Jahre 1987 *Brauwelt* **31/32**,

1358-1362

- Beuchat, L. R. (1993) Selective media for detecting and enumerating foodborne yeast *Int J of Food Microbiol* **19**, 1-14
- Bohak, I., Thelen, K. and Beimfohr, C. (2006) Description of *Lactobacillus backi* sp. nov., an obligate beer-spoilage bacterium *Monatsschr Brauwiss* **59**, 78-82
- Boulos, L., Prevost, M., Barbeau, B., Coallier, J. and Desjardins, R. (1999) LIVE DEAD BacLight application of a new method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water *J Microbiol Methods* **37**, 77-86
- Bowman, F., Calhoun, M. P. and White, M. (1967) Microbiological methods for quality control of membrane filters *J Pharm Sci* **56**, 222-225
- Braune, A. and Eidtmann, A. (2003) First experiences using realtime-PCR as a rapid detection method for brewery process control at Beck & Co *Proc Eur Brew Com Congr, Dublin*, IRL Press Oxford, 112
- Broderick, H. M. (1982) Beer packaging, a manual for the brewing and beverage industries, p.368-374, Master Brewers Association of Americas, WI, USA
- Brough, H., Antoniu, C., Carter, J., Jakubik, J., Xu, Y. and Luts, H. (2002) Performance of a novel viresolve NFR virus filter *Biotechnol Prog* **18**, 782-795
- Byrd, J. J. (2000) 培養不能状態に先立つ形態変化 In Colwell, R. R. and Grimes, D. J. (eds) 培養できない微生物たち. ASM press, Chapter 2, 7-18
- Casey, G. P. and Ingledew, W. M. (1981a) II. Selective Media for the isolation of lactic acid bacteria *Brewer's Digest* **56**, 38-45
- Casey, G. P. and Ingledew, W. M. (1981b) III. Selective Media for Gram-Negative bacteria *Brewer's Digest* **56**, 24-35
- Chelak, B. J. and Ingledew, W. M. (1987) Anaerobic Gram-negative bacteria in brewing – a review *J. Am Soc Brew Chem* **45**, 123-127
- Colwell R. R., Brayton P. R., Grimes D. J., Roszak D. B. and Palmer L. M. (1985) Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* in the environment implications for release of genetically engineered microorganisms *Bio Technology* **3**, 817-820
- Day, A. (1987) Rapid detection of microbial spoilage In Priest, F.G. and Campbell, I. (eds), *Brewing Microbiology*, Elsevier Applied Science, London, Chapter 8, 207-231
- deMan, J. C. (1975) The probability of most probable numbers *Eur J Appl Microbiol* **1**, 67-78
- Dobson, M., Deneer, H., Lee, S., Hemmingsen, S., Glaze, S. and Ziola, B. (2002) Phylogenetic analysis of the genus *Pediococcus*, including *Pediococcus claussemii* sp. nov., a novel lactic

- acid bacterium isolated from beer *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 2003-2010
- Dorigo, U., Volatier, L. and Humbert, J. (2005) Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities *Water Research* **39**, 2207-2218
- 衛生試験法注解 (2010) 121(3) 最確数法 日本薬学会編, 金原出版, p60-63
- Engelmann, U. and Weiss, N. (1985) *Megasphaera cerevisiae* sp. nov.: A new Gram-negative obligately anaerobic coccus isolated from spoiled beer. *System Appl Microbiol* **6**, 287-290
- Ferrari, B. C., Tujula, N., Stoner, K. and Kjellberg (2006) Catalyzed reporter deposition-fluorescence in situ hybridization allows for enrichment-independent detection of microcolony-forming soil bacteria *Appl Environ Microbiol* **72**, 918-922
- Farrow, J. A. E., Phillips, B. A. and Collins, M. D. (1988) Nucleic acid studies on some heterofermentative lactobacilli. Description of *Lactobacillus malefermentans* sp. nov. and *Lactobacillus parabuchneri* sp. nov. *FEMS Microbiol Lett* **55**, 163-168
- Freeman, G. (2006) Filtration and stabilization of beer. In Bamforth, C. W. (ed), *Brewing New Technologies* CRC press, Boston
- Funahashi, W., Suzuki, K., Ohtake, Y. and Yamashita, H. (1998) Two novel beer-spoilage *Lactobacillus* species isolated from breweries. *J. Am. Soc. Brew. Chem* **56**, 64-69
- Gonzalez, J. M., Jurado, V., Laiz, L., Zimmermann, J., Hermosin, B. and Saiz-Jimenez, C. (2005) *Pectinatus portulensis* sp. nov. In validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSEM, list no. 102 *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 547-549
- Haikara, A. (1985) Detection of anaerobic Gram-negative bacteria in beer. *Monatsschr Brauereiwiss* **38**, 239-243
- Haikara, A. and Helander, I. (2006) *Pectinatus*, *Megasphaera* and *Zymophilus*. In M. Dworkin (ed), *The Prokaryotes: an Evolving Electronic Database for the Microbiological Community*, 3rd edn, release 3.5, New York, Springer
- Haikara, A., Penttila, L., Enari, T. and Lounatmaa, K. (1981) Microbiological, biochemical, and electron microscopic characterization of a *Pectinatus* strain. *Appl Environ Microbiol* **41**, 511-517
- 濱口 和夫 (1988) ビールうんちく読本 p61-69
- Hasegawa, H., Naganuma, K., Nakagawa, Y. and Matsuyama, T. (2003) Membrane filter (pore size, 0.22-0.45 µm, thickness, 150 µm) passing-through activity of *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species with indigenous infiltration ability. *FEMS Microbiol Lett* **223**, 1, 41-46
- 橋本 直樹 (1998) ビールのはなし-Part 2 おいしさの科学, 1-10

- Hill, A. E. (2009) Microbiological stability of beer. In Bamforth, C. W. (ed), Beer: A quality perspective. Elsevier, London, 121-154.
- HIMA 3 (Health Industry Manufacturers Association : 医療産業製造業者協会) Document No. 3 Vol. 4 Microbiological Evaluation of Filters for Sterilizing Liquids. 1982.
- Hollerova, I. and Kubizniakova, P. (2001) Monitoring gram positive bacterial contamination in Czech breweries. *J Inst Brew* **107**, 355-358.
- Hurley, M. A. and Roseoc, M. E. (1983) Automated statistical analysis of microbial enumeration by dilution series. *J Appl Bacteriol* **55**, 159-164.
- Iijima, K., Suzuki, K., Ozaki, K. and Yamashita, H. (2006) *horC* confers beer-spoilage ability on hop-sensitive *Lactobacillus brevis* ABBC45^{cc}. *J Appl Microbiol* **100**, 1282-1288.
- Iijima, K., Suzuki, K., Asano, S., Ogata, T. and Kitagawa, Y. (2009) HorC, a hop-resistance related protein, presumably functions in homodimer form. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**, 1880-1882.
- 飯島 和丸 (2010) ビール混濁性細菌の包括的検出法構築に関する研究 (東京大学博士論文) 第1章, pp. 4-8.
- Jespersen, L. and Jacobsen, M. (1996) Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. *Int J Food Microbiol* **33**, 139-155.
- Jornitz, M. K., Soelkner, P. G., and Meltzer, T. H. (2002) Sterile filtration--a review of the past and present technologies. *PDA J Pharm Sci Technol* **56**, 192-195.
- Juvonen, R. and Suihko, M.-L. (2006) *Megasphaera paucivorans* sp. nov., *Megasphaera suecensis* sp. nov. and *Pectinatus haikarai* sp. nov., isolated from brewery samples, and emended description of the genus *Pectinatus*. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 695-702.
- Kanda, H. (2007) MicroStar-RMDS-SPS (ATP-bioluminescence method) Rapid biological monitoring for practical use. *Proc Am Soc Brew Chem*, O-18, Fairmont Express.
- Kawai, M., Yamaguchi, N. and Nasu, M. (1999) Rapid enumeration of physiologically active bacteria in purified water used in the pharmaceutical manufacturing process. *J Appl Microbiol* **86**, 496-504.
- Kawamura, K. (1998) 微生物除去フィルター選定の注意点と管理方法. *Beverage Japan* **195**, 64-65.
- Kiehne, M., Berghof-Jager, K., Fandke, M. and Gronewald, C. (2003) Detection of beer spoilage organisms by real-time PCR. *Proc Eur Brew Conv Congr, Dublin*, IRL Press, Oxford, 106.
- Kitahara, M., Sakamoto, M. and Bennno, Y. (2010) *Lactobacillus similis* sp. nov., isolated from fermented cane molasses. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 187-190.
- Kjelleberg, S., Humphrey, B. A. and Marshall, K. C. (1982) Effect of interfaces on small, starved

- Marine Bacteria *Appl Environ Microbiol* **43**, 1166-1172
- Kogure, K. (2006) Bacteria in Viable but Nonculturable State 食衛誌 **47**, 251-254
- Kreig, N. R. Anaerobic gram-negative straight, curved and helical rods (1984) Pages 604, 655, and 685 in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 1, Williams and Wilkins Baltimore
- Kudo, T. and Ohkuma, M. (2006) 難培養微生物の利用研究の最前線 特集にあたって *Bio Industry* **23**, 11, 5-7
- Kunze, W. (2004) *Technology brewing and malting*, 3rd ed., p. 453-487, VLB Berlin, Germany
- Lawrence, D. R. and Priest, F. G. (1981) Identification of brewery cocci *Proc Eur Brew Com* **217-227**
- Lee, S., Mabee, M. and Jangaard, N. (1978) *Pectinatus*, a new genus of the family *Bacteroidaceae* *Int J Syst Bacteriol* **28**, 582-594
- Lee, S., Mabee, M., Jangaard, N. and Horieuchi, E. (1980) *Pectinatus*, a new genus of bacteria capable of growing in hopped beer *J Inst Brew* **86**, 28-30
- Lotenberger, J. and Elter, J. (2004) Nutrient Media for microbiological quality control *Brauwelt Int* **22**, 52-53
- Macián, M. C., Chenoll, E. and Aznar, R. (2004) Simultaneous detection of *Carnobacterium* and *Leuconostoc* in meat products by multiplex PCR *J Appl Microbiol* **97**, 384-394
- McDonough, E. A., Barrozo, C. P., Russel, L. K. and Metzgar, D. (2005) A multiplex PCR for detection of *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumoniae*, and *Bordetella pertussis* in clinical specimens *Mol Cell Probes* **19**, 314-322
- Millet, V. and Lonvaud-Funel (2000) The viable but non-culturable state of wine micro-organisms during storage *Lett Appl Microbiol* **30**, 136-141
- Morichi, T. (2006) 損傷菌ならびに貧栄養菌の特性およびこれらの菌の修復・培養条件について (2) *J Antibact Antifung Agents* **34**, 429-437
- Motoyama, Y. and Ogata, T. (2000) Detection of *Pectinatus* spp. by using 16S-23S rDNA spacer regions *J Am Soc Brew Chem* **58**, 4-7
- Motoyama, Y., Yamaguchi, N., Matsumoto, M., Kagami, N., Tani, Y., Satake, M. and Nasu, M. (2008) Rapid and sensitive detection of viable bacteria in contaminated platelet concentrates using a newly developed bioimaging system *Transfusion* **48**, 2364-2369
- Motoyama, Y., Yamaguchi, N., Matsumoto, M., Ichijo, T., Nagumo, H., Kagami, N., Tani, Y., Satake, M. and Nasu, M. (2009) *Staphylococcus epidermidis* forms floating micro-colonies in platelet concentrates at the early stage of contamination *J Health Science* **55**, 726-731
- Moyer, C. L. and Morita, R. Y. (1989) Effect of growth rate and starvation-survival on the viability

- and stability of a psychrophilic marine bacteria *Appl Environ Microbiol* **55**, 1122-1127
- Nakakita, Y., Takahashi, T., Tshuechiya, Y., Watari, J. and Shinetsuka, K. (2002) A strategy for detection of all beer-spoilage bacteria *J. Am Soc Brew Chem* **60**, 63-67
- Nakakita, Y., Maeba, H. and Takashio, M. (2003) Grouping of *Lactobacillus brevis* strains using *gvrB* gene *J. Am Soc Brew Chem* **61**, 157-160
- 中村 光晴、小林 央子 (2007) 清涼飲料水製造および品質管理における最新の技術動向について *ジャパンプードサイエンス* **46**, 58-63
- 丹羽 源廣 (1991) 微生物マイクロコロニーの蛍光染色の応用による微生物迅速測定装置の開発 *J. Antibact Antifung Agents* **19**, 309-316
- Nocolò, M. S., Gioffrè, A., Carnazza, S., Plantania, G., Silvestro, I. D. and Guglielmino, P. P. (2011) Viable but Nonculturable state of foodborne pathogens in grapefruit juice. A study of laboratory *Foodborne Pathogens and Disease* **8**, 1-7
- 野田 直広、浅野 貴正、北出 雄二郎 (2004) 微生物の迅速検査技術 *富士時報*, **77**, 124-127
- Ohsumi, M., Yamada, N. and Toya, M. (1991) Bacterial retention mechanisms of membrane filter *Pharm Tech Japan* **7** (11), 69-75
- Oliver, J. D. (2005) The viable but nonculturable state in bacteria *J Microbiol* **43**, 93-100
- Oliver, J. D. (2010) Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria *FEMSMicrobiol Rev* **34**, 415-25
- Onyango, L. A., Dunstan, R. H. and Roberts, T. (2010) Filterability of staphylococcal species through membrane filters following application of stressors *BMC Research Notes* **3**, 152
- Pernthaler, A., Pernthaler, J., Schttenhofer, M. and Amman, R. (2002) Identification of DNA-synthesizing Bacterial cells in Coastal North Sea Plankton **68**, 5728-5736
- Priest, F. G. (1987) Gram-positive brewery bacteria. In Priest, F.G. and Cambell, I. (eds), *Brewing Microbiology* Elsevier, London, 121-154
- Priest, F. G. and Stewart, G. G. (2005) *Handbook of brewing*, 2nd ed., p 537-541 and p 608-627. Taylor and Francis Group, FL, USA
- Rodriguess, U. M. and Kroll, R. G. (1989) Microcolony epifluorescence microscopy for selective enumeration of injured bacteria in frozen and heat-treated foods *Appl Environ Microbiol* **55**, 778-787
- Rozsak, D. B. and Colwell, R. R. (1987) Survival strategies of bacteria in the natural environment *Microbiological Reviews* **51**, 365-379
- Sakamoto, K. (2002) Beer spoilage bacteria. In PhD thesis of the university of Groningen **Chapter**

- Sakamoto, K., Funahashi, W., Yamashita, H. and Eto, M. (1997) A reliable method for detection and identification of beer-spoilage bacteria with internal positive control PCR (IPC-PCR) *Proc Eur Brew Conv Congy, Maastricht*, IRL Press Oxford, 631-638.
- Sakamoto, K. and Konings, W. N. (2003) Beer spoilage bacteria and hop resistance *Int J Food Microbiol* **89**, 105-24
- Sakamoto, K., van Veen, H. W., Saito, H., Kobayashi, H. and Konings, W. N. (2002) Membrane-bound ATPase contributes to hop resistance of *Lactobacillus brevis* *Appl. Environ. Microbiol* **68**, 5374-5378
- Sami, M., Yamashita, H., Kadokura, H., Kitamoto, K., Yoda, K. and Yamasaki, M. (1997) A new and rapid method for determination of beer-spoilage ability of lactobacilli *J. Am Soc Brew Chem* **55**, 137-140
- Sami, M., Suzuki, K., Sakamoto, K., Kadokura, H., Kitamoto, K. and Yoda, K. (1998) A plasmid pRH45 of *Lactobacillus brevis* confers hop resistance *J Gen. Appl Microbiol* **44**, 361-363
- Sasaki, T. and Tanamoto, K. (2001) 医薬品研究, **32**(12), 814-819
- Savichtcheva, O., Okayama, N., Ito, T. and Okabe, S. (2005) Application of a direct fluorescence-based Live/Dead staining combined with fluorescence in situ hybridization for assessment of survival rate of *Bacteroides* spp. in drinking water *Biotechnol Bioeng* **92**, 356-363
- Schleifer, K.-H., Leuteritz, M., Weiss, N., Ludwig, W., Kirchhof, G. and Seidel-Rufer, H. (1990) Taxonomic study of anaerobic, Gram-negative, rod-shaped bacteria from breweries: emended description of *Pectinatus cerevisiophilus* and description of *Pectinatus frisingensis* sp. nov., *Zymophilus raffinovorans* gen. nov., and *Zymophilus paucivorans* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **40**, 19-27
- Shaw, S. (1987) Microbiological monitoring in the brewery *Brewer's Guardian* **116**, 10-13
- Shintani, H. (2006) 損傷菌ならびに貧栄養菌の特性およびこれらの菌の修復・培養条件について (1) *J. Antibact. Antifung. Agents* **34**, 427-428
- 食品衛生検査指針 (2004) 第2章 細菌, 2 汚染指標菌 (3) 検査手順 p135-p137
- Silbaq, F. S. (2009) Viable ultramicrocells in drinking water *J Appl Microbiol* **106**, 106-117
- Simpson, W.J. (1993a) Ionophoric action of *trans*-isohumulone on *Lactobacillus brevis* *J Gen Microbiol* **139**, 1041-1045
- Simpson, W.J. (1993b) Studies on the sensitivity of lactic acid bacteria to hop bitter acids *J Inst Brew* **99**, 405-411

- Simpson, W. J. and Fernandez J. L. (1992) Selection of beer-spoilage lactic acid bacteria and induction of their ability to grow in beer *Lett. Appl. Microbiol.* **14**, 13-16
- Simpson, W. J. and Fernandez J. L. (1994) Mechanism of resistance of lactic acid bacteria to *trans*-isohumulone *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **52**, 9-11
- 鈴木康司 (2004) 乳酸菌のビール混濁能を判定できる遺伝子マーカーの探索 乳酸菌のビール混濁性に関する研究 (東京大学博士論文) 第1章, pp 3-6
- Suzuki, K. (2008) Chapter 14- Beer spoilage lactic acid bacteria. In "Beer in Health and Disease Prevention", Elsevier Science, San Diego, USA, 150-164
- Suzuki, K. (2010) ビール混濁性乳酸菌の起源に関する考察およびそこから得られた知見の微生物管理技術への応用 (1) 醸協 **105**, 512-521
- 鈴木康司 (in press) 5-4 乳酸菌による食品の変敗 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス 京都大学学術出版会
- Suzuki, K., Funahashi, W., Koyanagi, M. and Yamashita, H. (2004a) *Lactobacillus paracollinoides* sp. nov., isolated from brewery environments *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 115-117
- Suzuki, K., Koyanagi, M. and Yamashita, H. (2004b) Genetic characterization and specific detection of beer-spoilage *Lactobacillus* sp. LA2 and related strains *J. Appl. Microbiol.* **96**, 677-683
- Suzuki, K., Ozaki, K. and Yamashita, H. (2004c) Genetic marker for differentiating beer-spoilage ability of *Lactobacillus paracollinoides* strains *J. Appl. Microbiol.* **97**, 712-718
- Suzuki, K., Iijima, K., Ozaki, K. and Yamashita, H. (2005) Isolation of hop-sensitive variant from *Lactobacillus lindneri* and identification of genetic marker for beer-spoilage ability of lactic acid bacteria *App. Environ. Microbiol.* **71**, 5089-5097
- Suzuki, K. and Asano, S. (2008a) Beer-spoilage lactic acid bacteria – A quest for 150 years of mysteries *Bioscience and Industry* **66**, 184-190
- Suzuki, K., Asano, S., Iijima, K., and Kitamoto, K. (2008b) Sake and beer spoilage lactic acid bacteria — A review, *J. Inst. Brew.* **114**, 209–223
- Suzuki, K., Asano, S., Iijima, K., Kuriyama, H., and Kitagawa, Y. (2008c) Development of detection medium for hard-to-culture beer-spoilage lactic acid bacteria, *J. Appl. Microbiol.* **104**, 1458–1470
- Suzuki, K., Asano, S., Ogata, T. and Kitagawa, Y. (2009) ビール混濁乳酸菌における難培養性株の取得および性状解析 日本農芸化学大会要旨集 2P1016B
- Taguchi, H., Yasui, T. and Kamiya, T. (1995) An improved discriminating method of beer spoilage *Lactobacilli* from non-spoilage brewery contaminants *Proc. Eur. Brew. Com. Congr., Brussels* IRL Press Oxford, 73
- Takahashi, N. (1983) Presumed *Pectinatus* strains isolated from Japanese beer *Bull. Brew. Sci.* **28**,

- Takahashi, T., Nakakita, Y., Watari, J. and Shimotsuka, K. (2000) A new rapid Technique for detection of microorganisms using bioluminescence and fluorescence microscope method *J Biosci Bioeng* **89**, 509-513
- Takeuchi, A., Iijima, K., Suzuki, K., Ozaki, K. and Yamashita, H. (2005) Application of ribotyping and rDNA internal space analysis (RISA) for assessment of microflora in brewery environments *J. Am Soc Brew Chem* **63**, 73-75
- 土戸 哲明 (2010) 微生物のストレス損傷とこれからの食品衛生 食品と開発, **45**, 4-6
- Tsuchiya, Y., Kaneda, H., Kano, Y. and Koshino, S. (1992) Detection of beer spoilage organisms by polymerase chain reaction technology *J. Am Soc Brew Chem* **50**, 64-67
- 都島 惟男 (1996) THE BEER ビールのすべて 食品産業新聞社, 18-20
- Wang, X., Yamaguchi, N., Someya, T. and Nasu M. (2007) Rapid and automated enumeration of viable bacteria in compost using a micro-colony auto counting system *J Microbiol Methods* **71**, 1-6
- Wang, Y., Hammes, F., Duggelin, M. and Egli, T. (2008) Influence of size, shape, and flexibility on bacterial passage through micropore membrane filters *Environ Sci Technol* **42**, 6749-6754
- Weart, R. B., Lee, A. H., Chien, A.-C., Haeusser, D. P., Hill, N. S. and Levin, P. A. (2007) A metabolic sensor governing cell size in bacteria *Cell* **130**, 335-347
- Weiss, N., Seidel, H. and Back, W. (1979) Isolierung und systematische Zuordnung bierschadlicher gramnegativer Bakterien. I. Gramnegative strict anaerobe Kokken *Brauwiss* **32**, 189-194
- World, K., Bleken, A. and Hage, T. (2005) Practical experiences on the use of TaqMan Real-Time PCR as a microbiological routine quality control method for fermenters at Rignes Brewery *Proc Eur Brew Conv Congr, Prague*, IRL Press Oxford, 129
- Yamaguchi, N. and Nasu, M. (2004) 第7章 難培養微生物の *m situ* 検出法 In Kudo, T. and Ohkuma, M. (eds) 難培養微生物研究の最新技術 シーエムシー出版 p69-82
- Yamaguchi, N., Baba, T., Nakagawa, S., Saito, A. and Nasu, M. (2007) Rapid monitoring of bacteria in dialysis fluids by fluorescent vital staining and microcolony methods *Nephrol Dial Transplant* **22**, 612-616
- Yamaguchi, N., Ichijo, T., Ogawa, M., Tami, K. and Nasu, M. (2004) Multicolor excitation direct counting of bacteria by fluorescence microscopy with the automated digital image analysis software BACS II *Biomages* **12**, 1-7
- Yasuhara, T., Motoyama, Y., Ogawa, A., Kagami, N. and Kawatsura, K. (2004) Rapid and automated inspection system of beer-spoilage bacteria *Proc World Brewing Congress Contribution P-72*

- Yasuhara, T., Takahashi, K. and Motoyama, Y. (2002) ラクトバチルス属菌及びペディオコッカス属菌検出のための塩基配列、およびそれらの菌の検出方法 Japanese Patent Application JP 2002-034578
- Yasuhara, T., Yuuki, T. and Kagami, N. (2001) Novel quantitative method for detection of *Pectinatus* using rRNA targeted fluorescent probes *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **59**, 117-121
- Yau, T. and Yoda, K. (1997) Imaging of *Lactobacillus brevis* single cells and microcolonies without a microscope by an ultrasensitive chemiluminescent enzyme immunoassay with a photon-counting television camera *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4528-4533
- 吉本 孝澄 (1997) Bio process Technical Sheet Millipore TSV9702

原著論文

Asano, S., Suzuki, K., Ozaki, K., Kuriyama, H., Yamashita, H. and Kitagawa, Y. (2008) Application of multiplex PCR to the detection of beer-spoilage bacteria. *J. Am Soc Brew Chem* **66**, 37-42

Asano, S., Suzuki, K., Iijima, K., Motoyama, Y., Kuriyama, H. and Kitagawa, Y. (2007) Effects of morphological changes in beer-spoilage lactic acid bacteria on membrane filtration in breweries. *J Biosci Bioeng* **104**, 334-8

Asano, S., Iijima, K., Suzuki, K., Motoyama, Y., Ogata, T. and Kitagawa, Y. (2009) Rapid detection and identification of beer-spoilage lactic acid bacteria by microcolony method. *J Biosci Bioeng* **108**, 124-9

Suzuki, K., Iijima, K., Asano, S., Kuriyama, H. and Kitagawa, Y. (2006) Induction of viable but nonculturable state in beer spoilage lactic acid bacteria. *J Inst Brew* **112**, 295-301

関連特許 特開 2007-259730 マルチプレックスPCR用人工陽性対照DNA群の作製法

謝辞

本研究を行うにあたり御指導と御高配を賜りました東京大学・北本勝ひこ教授に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行に格別の御理解と御高配を賜りましたアサヒビール株式会社・荻田伍代表取締役会長兼 CEO、泉谷直木代表取締役社長兼 COO、西野伊史監査役、川面克行常務取締役兼常務執行役員、青木賢吉酒類研究開発本部長、北川泰食品技術研究所長、笹本武志酒類技術研究所長、大竹康之研究開発戦略部長、尾形智夫酒類微生物技術部長、尾崎一隆嗜好調査部長、栗山英俊氏、山下博博士、佐見孝栄養生理解析部長、坂本幹太博士に深く感謝致します。

研究を遂行する上で共同研究者として貴重な御助言と暖かい激励を頂きました鈴木康司名古屋工場品質管理部長、飯島和丸博士、本山靖朗博士に深謝致します。

研究を遂行する上で御助言と暖かい激励を頂きましたアサヒビール株式会社・望月直樹食の安全研究所長、鯉川彰香味成分解析部長、河野克典博多工場醸造部長、渡農昌弘茨城工場品質管理部長、山岸裕美氏、大内佳奈子氏、伊藤大和氏、金子奈央氏、四方美穂博士、下津智志氏、楠慧三氏、藤原崇晃氏、八幡和久氏に深謝致します。

また、研究の遂行と検査法の構築において多くの御支援を頂きましたアサヒビール株式会社・研究開発センター、本店、工場の皆様に厚く御礼を申し上げます。

最後に、論文執筆に多大な理解を示し、絶えず協力してくれた家族に深く感謝します。