

# 微生物を色で見る

## — 酵素基質培地 —

### Chemistry-based colony color observation of target microorganisms — chromogenic culture media —

関東化学株式会社 試薬技術部 / 帝京大学 医真菌研究センター 課長 / 研究員 **金子 孝昌**  
Takamasa Kaneko, PhD (Manager)  
Reagent Development Dept, Kanto Chemical / Teikyo University Institute of Medical Mycology



#### キーワード

特異酵素、特異基質、酵素基質培地

## 01 | はじめに

1881年に、ドイツのRobert Kochによって開発された寒天培地による分離培養技術は、その後の約130年の間に様々な種類が各微生物の分離培養用として開発・改良されてきた。近年ではマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法(質量分析法)、遺伝学的検査法、免疫学的検査法などが利用できるようになったが、今もなお微生物検査における分離培養は重要な位置を占め、“生きた生物”として“微生物”を捕らえる手法はこれからも続くと考えられる。

培地そのものも従来から様相を変え、目的の微生物の検出法として、様々な選択物質が報告され、目的に応じた選択分離培地が利用できるようになっている。しかしながら、臨床、公衆衛生、食品衛生の分野を問わず、微生物検査の最大の問題点は1)検出までに時間のかかること、2)分離鑑別に熟練を要することである。分離培養の時点で目的とする微生物を推定同定できる分離培地の開発は微生物検査を簡便化し、ひいては迅速化につながると考えられる。

1970年代にフランスのパスツール研究所で最先端の診断技術を研究していた、Dr. Alain Rambachは、各種微生物の特異的な代謝を利用した鑑別手法を考案し、酵素基質培地の先駆者となったことは有名な話である。現在、同博士の研究成果はCHROMagar™シリーズ製品として、世界的に活用(社会貢献)されるようになった。本稿では、酵素基質培地の成り立ちと原理、利用、そして今後の展望について概説したい。

## 02 | 古典的な鑑別・分離培養

様々な微生物が存在する検体から目的とする微生物を分離培養する方法は古くから考案されてきたが、方法論として大きく二つに分けられる。

### 1) 選択剤を培地に加えた選択分離培養

目的とする微生物を優先的に発育させる方法で、腸内細菌科細菌の分離培地に添加される胆汁酸塩や色素、ブドウ球菌の分離培地に添加されるフェニルアルコールや高濃度の塩などが挙げられる。さらに目的の微生物を絞り込むため、抗生物質を添加するケースもある。例えば、腸管出血性大腸菌O157に用いられるセフィキシムやノボジオシンであったり、カンピロバクターに用いられるバンコマイシンやトリメトプリム、アンフォテリシンBなどである。

### 2) 発育コロニーの色調や形態による鑑別分離培養

目的とする微生物を鑑別する方法で、卵黄反応や亜テルル酸の還元、特定の糖分解をpH指示薬で鑑別する方法、硫化水素産生による硫化鉄の形成、溶血性、エスクリン分解能、テトラゾリウム塩類の還元などが用いられてきた(図1)。

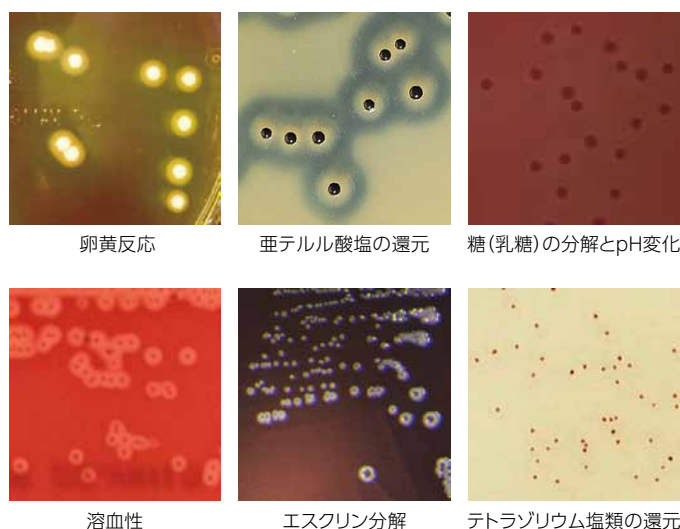


図1 典型的な培養所見(発育コロニーの色調や形態)

本手法による分離には、前述1)による目的微生物以外の発育阻害も応用されるが、特異性の高い鑑別を行なうことは難しいものであった。例えば糖の分解をpH指示薬で確認する方法

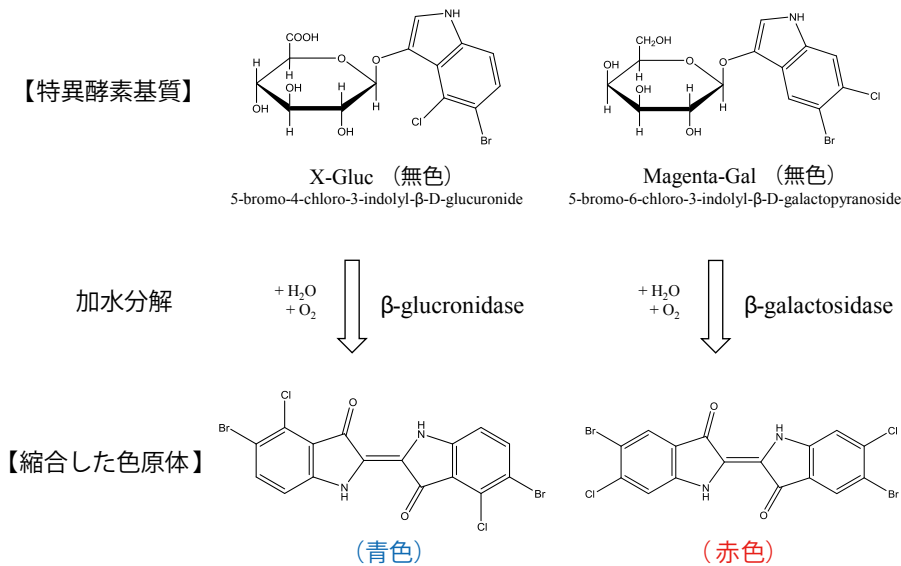


図2 代表的な発色原理

では、pH変化の影響が培地全体に広がり、近接するコロニーは明瞭な変化が確認できないからである。

### 03 | 酵素基質培地の原理

酵素基質培地とは、目的とする微生物が特異的に代謝する基質に色原体(発色もしくは発光物質)を標識した特異酵素基質を含ませた培地をさす。微生物が特異酵素基質を取り込んで代謝すると色原体が解離し、縮合し、発色して微生物を染めるという原理に基づくものである(図2)。特異酵素基質は無色であるが、目的の微生物が産生する特異酵素により加水分解されると、解離した色原体が縮合し発色する単純な反応原理である。図3では大腸菌の産生するβ- glucuronidase(特異酵素)がX-Gluc(特異酵素基質)を加水分解し、縮合したBromochloroindigoが青色の産物として菌体を染めるといった酵素基質培地のイメージを示す。

特異酵素基質には各種のものが用意できるが、一般的には糖もしくは脂質の酵素基質に対してnitrophenol、indoxyl誘導体および4-methylumbelliferoneが、アミドおよびアミノ酸に対してはnitroanilineおよびnaphthylamineが色原体として利用される。なかでもindoxyl誘導体による発色は拡散性が低く、青系や赤系色といった色調を示すことから、固形(寒天)培地でのコロニーの呈色に利用されている。

このような反応は単純であるが、微生物が利用する基質は多数あり、最も重要なことは目的とする微生物に選択的な特異性の高い基質を作る、もしくは選ぶことである。さらに、簡単に想像されることであるが、大腸菌群のような一群をまとめて検出する場合には、群に共通する特異的な基質が必要となる。

例えば、大腸菌・大腸菌群用酵素基質培地は食品企業の品質管理の簡易・迅速化の流れから広く利用され始めている。従来法とは異なり、推定試験、確定試験および完全試験のステップがなく、特異酵素であるβ- glucuronidase活性(大腸菌)ならびにβ- galactosidase活性(大腸菌群)を指標として同定するものである。これにより、煩雑な鑑別検査工程が軽減され、ひいては検査時間を短縮することができる(図4)。

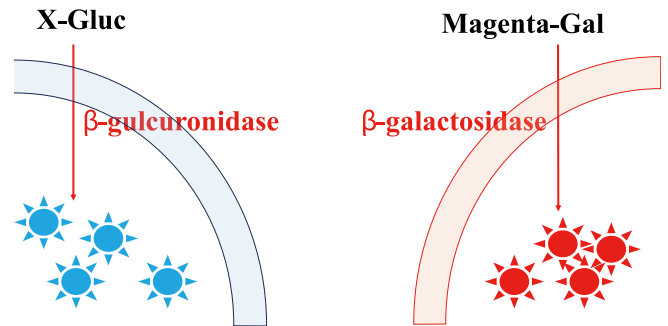


図3 酵素基質培地の原理(イメージ)

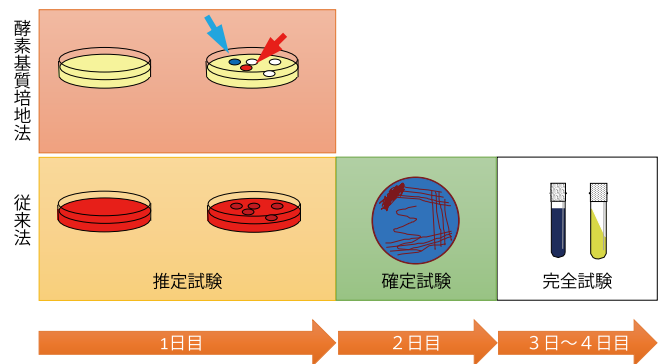


図4 検査の流れ

現在、大腸菌・大腸菌群以外にも多くの研究が展開され、各種微生物の特徴となる特異酵素と特異酵素基質が報告されている(表1)。なお、例えば色原体である4-methylumbelliferone(M)をindoxyl(X)などに替えることもでき、目的の微生物を適切な色調に呈色させることが可能である。これら特異酵素基質を含有した培地は、推定同定用のスクリーニング培地として臨床、公衆衛生、食品衛生の分野で広く活用されるに至った。さらに、これら特異酵素基質と選択物質を組み合わせることにより、薬剤耐性菌のスクリーニングも可能な酵素基質培地が開発され<sup>18, 19)</sup>、薬剤耐性菌の感染管理が最重要課題である臨床分野で利用され始めた。

表1 発色・発光酵素基質誘導体(例)

菌種・菌群	特殊酵素	特異基質
<i>Streptococcus pyogenes</i>	L-pyrrolidonyl aminopeptidase <sup>1)</sup>	L-pyrrolidonyl-β-naphthylamide
<i>Enterococcus</i> spp.	L-pyrrolidonyl aminopeptidase <sup>1)</sup>	L-pyrrolidonyl-β-naphthylamide
	β-glucosidase (esculinase) <sup>1, 2)</sup>	M-β-glucopyranoside
<i>Staphylococcus aureus</i>	L-leucine aminopeptidase <sup>3)</sup>	L-leucine-β-naphthylamide
	acid phosphatase	X-phosphate
<i>Neisseria</i> spp.	DNase	X-thymidine-5'-phosphate
	γ-glutamyl aminopeptidase <sup>4)</sup>	γ-glutamyl β-naphthylamide
	β-galactosidase	M-β-galactopyranoside
<i>Branhamella catarrhalis</i>	hydroxyproline aminopeptidase	L-hydroxyproline-β-naphthylamide
	butyrate esterase <sup>5, 6)</sup>	M-butyrate
Coliform	β-galactosidase <sup>7, 12)</sup>	M-β-galactopyranoside
<i>Esherichia coli</i>	β-glucuronidase <sup>7, 8, 12)</sup>	M-β-glucuronide
<i>Salmonella</i> spp.	L-pyrrolidonyl aminopeptidase <sup>9)</sup>	L-pyrrolidonyl-β-naphthylamide
	caprylate esterase <sup>10)</sup>	M-caprylate
<i>Klebsiella, Enterobacter</i>	β-xylosidase <sup>11, 12)</sup>	M-β-xylopyranoside
<i>Proteus, Providencia, Morganella</i>	L-tryptophane deaminase <sup>12)</sup>	L-tryptophane
<i>Listeria monocytogenes</i>	β-cellobiosidase	M-β-cellobioside
	alanine aminopeptidase <sup>13, 14)</sup>	DL-alanine-β-naphthylamide
<i>Clostridium difficile</i>	L-Proline aminopeptidase <sup>15)</sup>	L-Proline-β-naphthylamide
<i>Candida albicans</i>	L-Proline aminopeptidase <sup>16)</sup>	L-Proline-β-naphthylamide
	β-galactosaminidase <sup>16, 17)</sup>	M-β-Galactosaminide

## 04 | 酵素基質培地の利点と課題

呈色所見を図5に示すが、利点としては以下のようなことが挙げられる。

- 1) 発色による鑑別になるため、客観性に優れる。
- 2) 培地とコロニーのコントラストが良く判別しやすい。
- 3) 反応が特異的である。
- 4) 酵素による代謝反応は主に菌体内で生じるため、色素の拡散や近接するコロニーの影響がほとんどない。
- 5) 特異酵素基質を組み合わせることにより、一枚の培地で複数の微生物が推定同定できる。
- 6) 機械による自動判別・菌数計測が可能となり、全自動判定のシステム化ができる<sup>20)</sup>。

課題としては以下のようなことが挙げられる。

- 1) 培地自体の価格はやや高価となる(採用している検査法に関わる全ての試薬コストや時間を考えれば利用価値は高い)。
- 2) 従来の培地と検出法が異なるため、まれに結果の合わないことがある。

## 05 | おわりに

微生物検査の迅速化は時代の要望であり、質量分析法、遺伝学的検査法、免疫学的検査法などの近代的手法によって微生物検査の簡易・迅速化は発展してきている。とはいえ、従来どおりの分離培養検査も重要な位置を占め、それ自身が簡易・迅速でなければならない。これからの微生物検査は、特異性の高い酵素基質培地の応用が必要不可欠であり、増々、応用できる微生物の範囲を広げていくべきである。今後の同定細菌学の研究が発展することに期待したい。

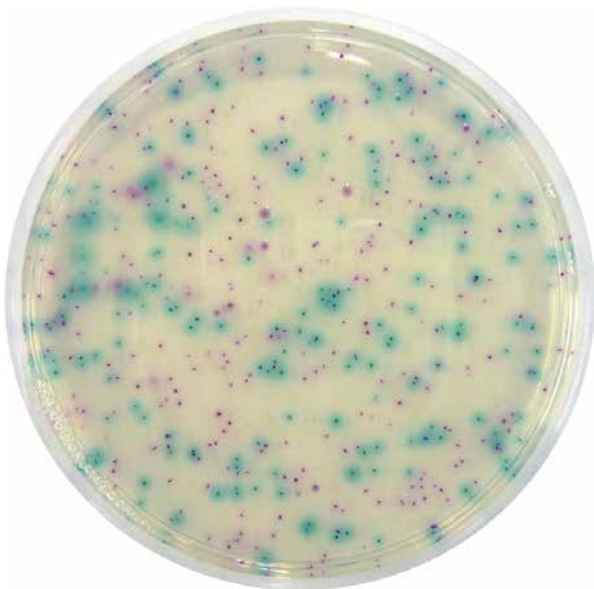


図5 コロニーの呈色所見(クロモアガーECC)

## 参考文献

- 1) R. R. Facklam, L. G. Thacker, B. Fox, L. Eriquez, *J. Clin. Microbiol.* **15**(6), 987-990 (1982).
- 2) K. J. Panosian, S. C. Edberg, *J. Clin. Microbiol.* **27**(8), 1719-1722 (1989).
- 3) R. Facklam, N. Pigott, R. Franklin, J. Elliott, *J. Clin. Microbiol.* **33**(4), 885-887 (1995).
- 4) R. F. D'Amato, L. A. Eriquez, K. M. Tomfohrde, E. Singerman, *J. Clin. Microbiol.* **7**(1), 77-81 (1978).
- 5) M. Vaneechoutte, G. Verschraegen, G. Claeys, P. Flamen, *J. Clin. Microbiol.* **26**(6), 1227-1228 (1988).
- 6) S. F. Dealler, M. Abbott, M. J. Croughan, P. M. Hawkey, *J. Clin. Microbiol.* **27**(6), 1390-1391 (1989).
- 7) S. C. Edberg, M. J. Allen, D. B. Smith, *Appl. Environ. Microbiol.* **54**(6), 1595-1601 (1988).
- 8) M. Kilian, P. Bülow, *Acta. Pathol. Microbiol. Scand. B.* **84B**(5), 245-251 (1976).
- 9) M. Mulczyk, A. Szewczuk, *J. Gen. Microbiol.* **61**(1), 9-13 (1970).
- 10) M. Olsson, A. Syk, R. Wollin, *J. Clin. Microbiol.* **29**(11), 2631-2632 (1991).
- 11) J. L. Sepúlveda, C. E. Stager, J. R. Davis, *J. Clin. Microbiol.* **28**(2), 177-181 (1990).
- 12) M. Manafi, M. L. Rotter, *Int. J. Food Microbiol.* **14**(2), 127-134 (1991).
- 13) P. Kämpfer, *J. Clin. Microbiol.* **30**(5), 1067-1071 (1992).
- 14) A. G. Clark, J. McLaughlin, *J. Clin. Microbiol.* **35**(8), 2155-2156 (1997).
- 15) D. P. Fedorko, E. C. Williams, *J. Clin. Microbiol.* **35**(5), 1258-1259 (1997).
- 16) J. L. Perry, G. R. Miller, D. L. Carr, *J. Clin. Microbiol.* **28**(3), 614-615 (1990).
- 17) J. L. Perry, G. R. Miller, *J. Clin. Microbiol.* **25**(12), 2424-2425 (1987).
- 18) J. Merlino, M. Leroi, R. Bradbury, D. Veal, C. Harbour, *J. Clin. Microbiol.* **38**(6), 2378-2380 (2000).
- 19) P. Nordmann, D. Girlich, L. Poirel, *J. Clin. Microbiol.* **50**(8), 2761-2766 (2012).
- 20) M. L. Faron, B. W. Buchan, C. Vismara, C. Lacchini, A. Bielli, G. Gesu, T. Liebregts, A. van Bree, A. Jansz, G. Soucy, J. Korver, N. A. Ledeboer, *J. Clin. Microbiol.* **54**(3), 620-624 (2016).