

Fig. 3 Annual introduction of isolators for the production of sterile pharmaceutical products in Japan (from ISPE report)

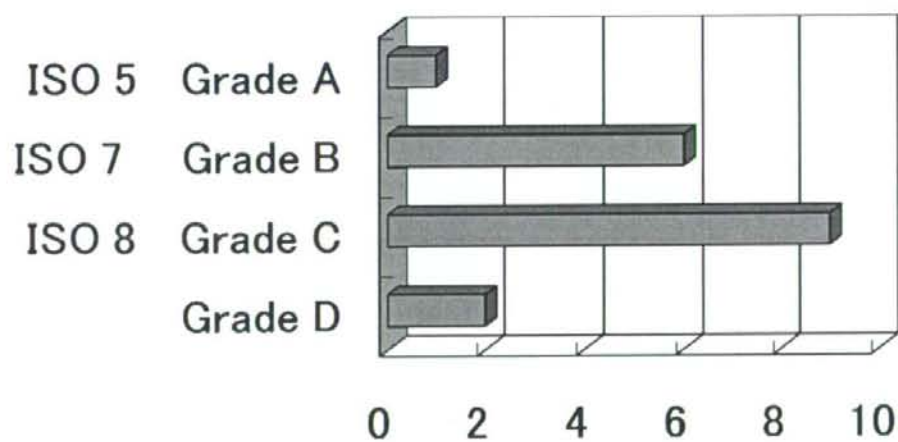


Fig. 4 The environment surrounding isolators (from ISPE report)

3.2 Integrated closed system (ICS) for sterile bulk products

Conventional aseptic manufacturing of bulk drug substance often uses freeze-drying technology. Until recently, a bulk material sterilized was typically processed by the following procedures: transfer to a tray, vacuum freeze-drying using a freeze-dryer, recovery of dried powder from the tray, crushing of the dried powder, and dispensation of the powder into a sterile container. A series of these procedures were undertaken by handling sterilized drug solution and dry powder in open air, requiring manual operations and ultimately increasing risk of contamination due to the exposure of drug solution or dry powder to the environment and humans. Today, these sequential operations can be performed in a closed system by using a freeze-dryer (developed by: Kyowa Vacuum Engineering Co., Ltd.) (Fig. 5). The basic concept of the closed manufacturing system is the ice lining technology — a method of forming an ice-lining layer between a heat transmitting medium (heat transfer surface) and drug solution to recover freeze-dried drug substance avoiding adherence of drug substance to the heat transfer surface (Fig. 6 and 7).

This closed-system technology has enabled technicians to freeze-dry, crush, and recover drug substances in a closed system without requiring the use of trays and other containers as the sources of contamination. The closed system is also capable of clean-in-place (CIP) and sterilization in place (SIP) to minimize a risk of contamination of bulk drug substance from the environment and/or humans. Furthermore, running costs of production can be greatly reduced since the system does not require the installation or use of a sterile filling facility, filling machine, and trays, which are essential in the conventional freeze-drying process.

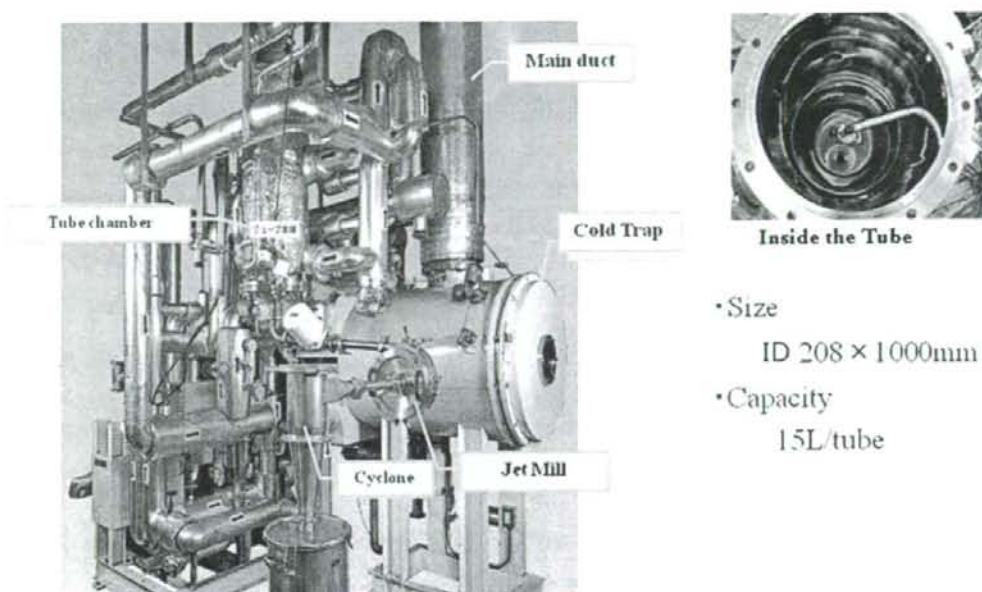


Fig. 5 Outline of integrated closed system (ICS)

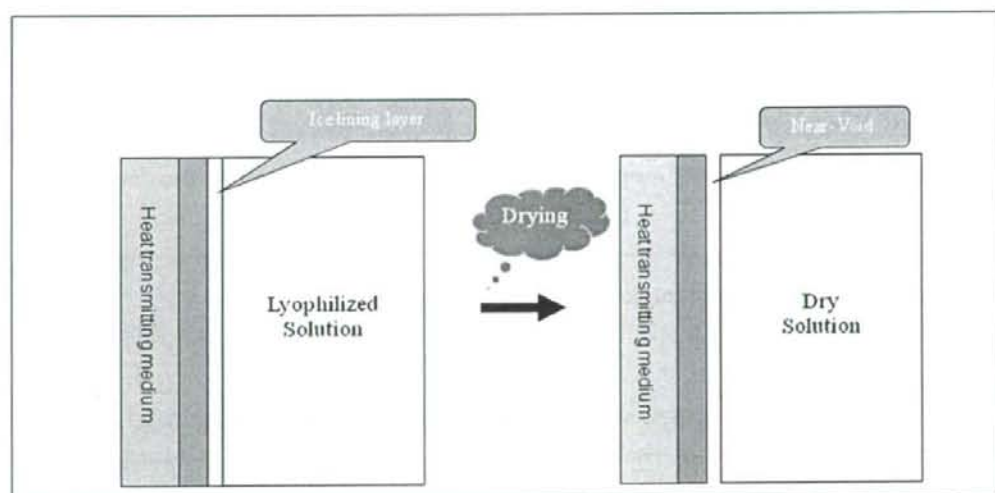


Fig. 6 Ice lining method

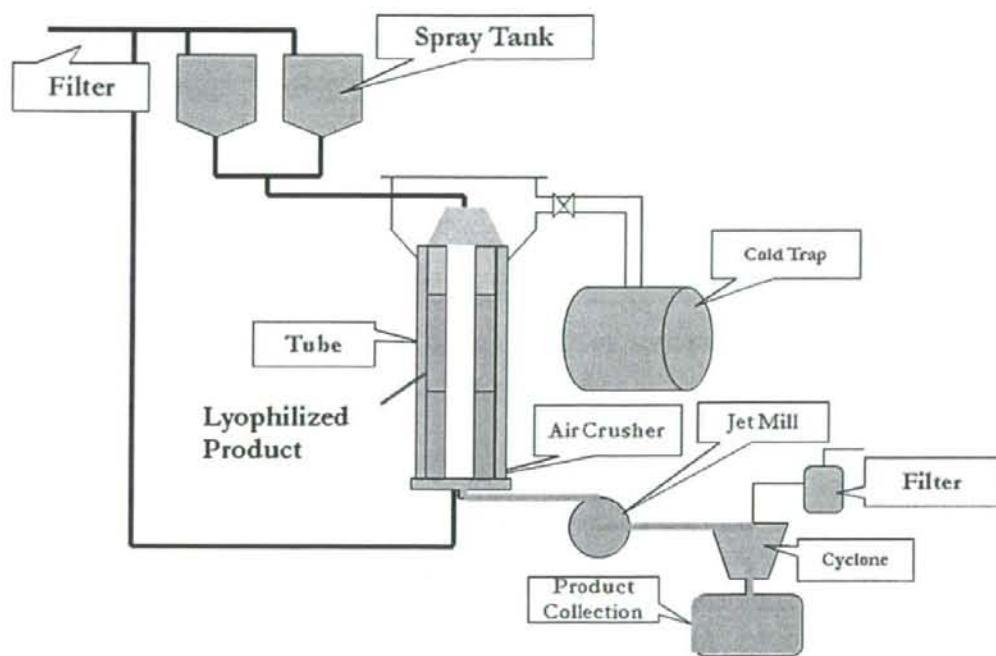


Fig. 7 Flow of integrated closed system (ICS)

3.3 Automatic ampoule-loading/unloading technology in freeze-drying chamber

Automatic loading to and unloading from a freeze-drying chamber of freeze-dried drug products in ampoule requires highly automated technology. It has long been considered to be difficult to collect ampoules into trays following a rapid filling process (400 ampoules/min @ 1ml); however, such an automated production line system is already in operation in Japan.

Arrangement of ampoules unloaded from the filling machine in trays requires the flow of ampoules to be changed from continuous to intermittent, since the action of arrangement itself is an intermittent action. A transportation apparatus (conveyor) capable of changing the transportation distance has been developed, allowing automated stable ampoule loading/unloading procedures with trays.

There is also a production line system equipped with apparatus capable of automatically loading and unloading ampoules and vials of different sizes after filling. Production efficiency is compromised if trays or containers need to be changed according to the size of ampoules or vials. As a counter action to decreasing efficiency, a new type of tray equipped with a partition plate with spring has been developed. The handling of

this tray has been automated and a production line system handling multiple sizes of ampoules and vials is already in commercial use.

3.4 Revolution drive-free aseptic isolators

The automation of ampoule or vial collection into trays in an aseptic isolator requires a built-in mechanism that can invert trays within an isolator. A multi-articulated robot is one solution; however, it creates waste space within the isolator. At present, a new apparatus that has a revolution drive not inside but outside the isolator to indirectly drive mechanical parts within the isolator is available in practical use (developed by: IDK Co., Ltd.) (Fig. 8)

The above-mentioned technologies have been combined and a multiple production line system integrated with isolator-equipped ampoule filling, vial filling, ampoule sealing, and vial stoppering machines and, in addition, an automatic guided vehicle transporting ampoules and vials collected in trays among these machines and as many as 5 freeze-drying chambers have been employed for aseptic product handling in controlled areas (Fig. 9-12).

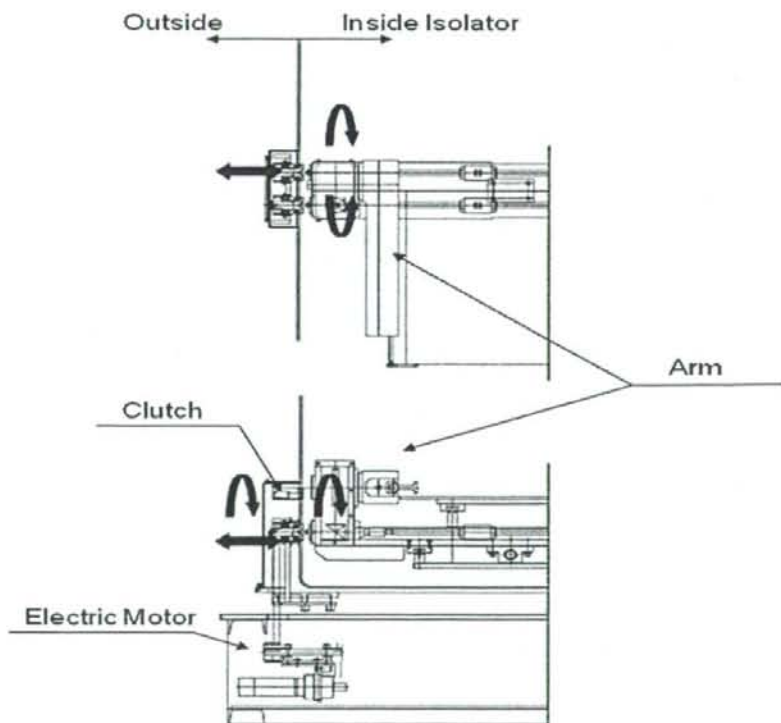


Fig. 8 Principle of drive-free aseptic isolator



Fig. 9 AGV station for lyophilizers in aseptic area

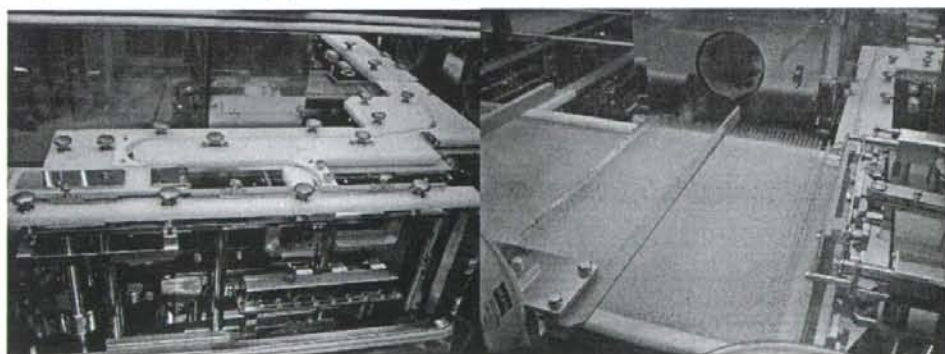


Fig. 10 Ampoule collection and buffer conveyer in isolator
<Filling Capacity; 400-Ampoules/min for 1ml & 2ml>



Fig. 11 Vials/ampoules automatic loading for lyophilizer in closed RABS

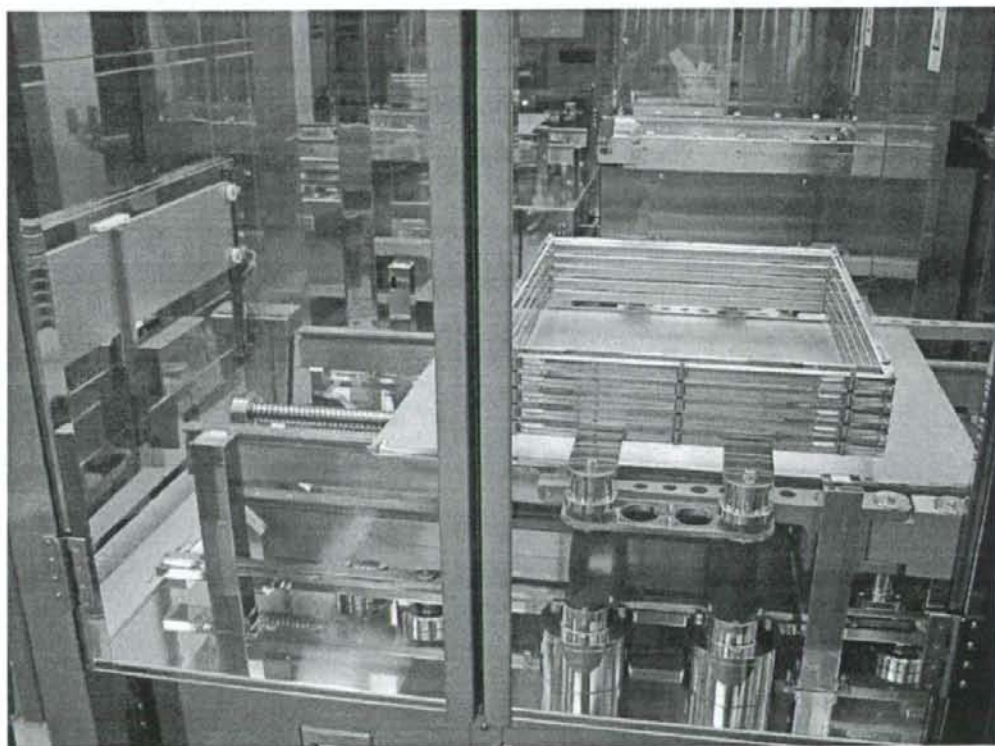


Fig. 12 Tray stacking system in isolator

4. Foreign substance inspection apparatus

It may be a specific characteristic of the Japanese people, but consumers are keenly concerned about the contamination of foreign matters in pharmaceutical products. Pharmaceutical manufacturers are forced to invest an extensive amount of

time and energy in preventing contamination during the manufacturing process. As an illustration of a company's measures, an automatic inspection apparatus developed by a Japanese pharmaceutical company Eisai Co., Ltd. is briefly described in the following section.

4.1 Development for automatic inspection machine

Eisai Co., Ltd., started to develop machine to inspect for insoluble foreign particles in order to improve the quality of their injectable pharmaceutical products. In 1970s, Eisai found the light-transmission SD (Static Division) System to be the most reliable and cost-effective method in order to detect foreign particles in products.

Based on the pharmaceutical manufacturers' requirement to inspect also the cosmetic defects such as crack or scratch on the container, Eisai Machinery added CCD camera and vision system for cosmetic inspection. Following the performance of the filling machine, Eisai Machinery also developed a high performance machine series Eisai Machinery Inspection System (EIS®), whose highest performance is 600 syringes/cartridges and 400 vials per minute (Fig. 13 and 14).



Fig. 13 Outline of automatic inspection machine (EIS-A206S)

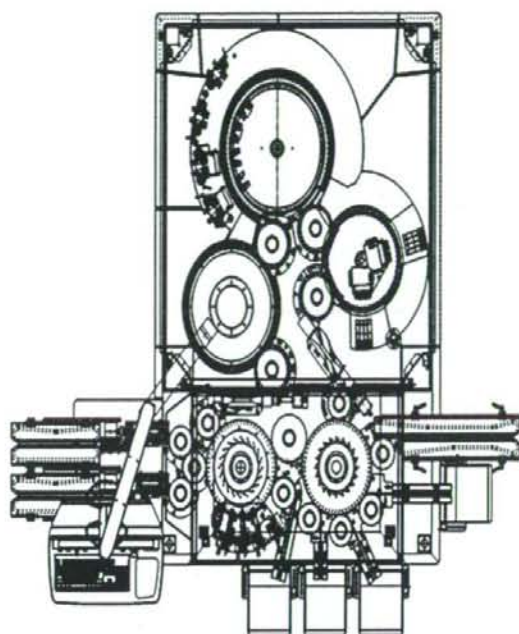


Fig. 14 Drawing of machine layout (EIS-A206S)

4.2 Layout of the automatic inspection machine

The containers such as syringe or cartridges are supplied from upper-stream machine through double in-feed conveyors and transmitted to the oscillating star-wheel, on which serious cosmetic defects such as missing cap, bend needle etc. are inspected by vision system and discharged, because such containers may give damage to the machine system and mechanism.

The containers are spun at high speed to remove most of bubbles, as bubble is sometimes a source of false detection of particles. If containers have no serious defect or bubble, they go to the camera table, where detailed cosmetic defects are inspected, for vials as example, such as body, neck and heel, fill level, cap/crimp/liquid color and crimp etc.

Finally the containers are inspected twice at SD table, on which particle contamination is strictly inspected. Accepted containers are selected mechanically and transferred into the out-feed conveyor, which is connected to the down stream machine. While rejected containers due to the inspections are brought to 3 separate reject trays

(in this type 3 reject trays) based on customers configurations.

4.3 Functions

1) SD system (Fig. 15)

SD system is a system that:

- Light projector transmits the high intensity light beam perpendicular to the container
- Stack of small sensors (light receiving diodes) is located at the other side of the container
- The container to be inspected rotates between 1,000 and 5,000 RPM before inspection and suddenly stopped by a brake just before inspection. At that time, container is stationary but the liquid inside continues rotating.
- Any particles in the solution block a portion of the transmitted light, casting a shadow that is detected by an array of small light-receiving diodes.
- The instantaneous change in the light intensity is measured, while printing on the container surface can be canceled.

By analyzing only the change in light intensity caused by moving particles, the signals can be distinguished from static light reduction caused by stationary object such as scratches, dirt, and printing on the container surface, significantly decreasing the rejection of qualified products (false rejects). Unlike camera-based systems that capture, process and compare images, the SD system reads voltage fluctuation in real time.

The key to detection, however, is not to reject good product. Due to narrow gray zone of SD system curve (Fig. 16), the system enables to minimize both the passing of bad products and rejecting good products.

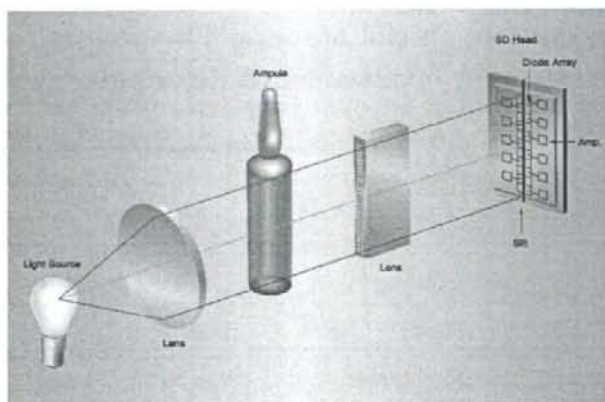


Fig. 15 SD system
[Visual & SD System]

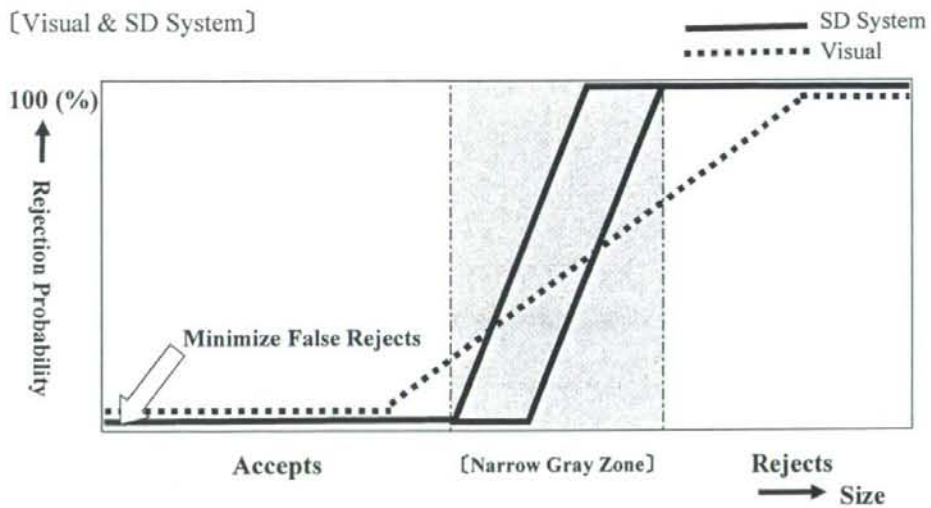


Fig. 16 Foreign particle detection characteristic curve

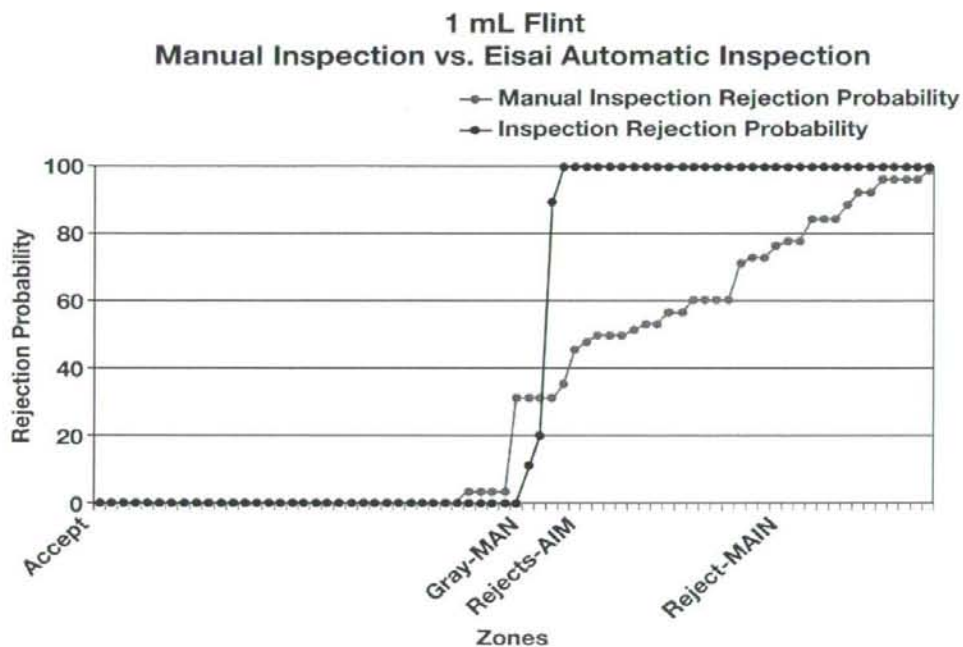


Fig. 17 Rejection probability of manual inspection vs. automatic inspection

2) Vision system

SD system recognized particles with the change of the shadow or light intensity, therefore cosmetic defects such as scratch, crack, aluminum crimp of vials and/or unmoving particles in the containers can not be inspected by SD system. Such defects and particles can be rejected by the vision system inspection.

Cameras are set based on the inspection purpose, such as body crack, cap color etc. Up to 24 images can be captured with 360° of the container at each inspection. Inspection results are determined at image processing circuit capturing images from spinning products.

3) Other functions

In order to meet qualitative and productive requirement from global manufacturers, the latest machine (model EIS·A series) has following functions

(1) Retrieve system

EIS·A series store inspection data for each container. The data can be retrieved and used to fine tune inspection parameters without running actual products

through the machine. A graphical display provides visual verification of each inspection performed.

(2) Spin control

For accurate particle inspection, new Controlled Spin System of EIS-A series keeps container at the proper spin speed by monitoring the feedback from rotating spindle cap.

(3) Oscillating drive unit

In order to realize higher inspection speed without any loss of accuracy of detection and stability of the transportation, newly developed oscillating drive unit is used for EIS-A series (e.g. EIS-A206S).

Furthermore, EIS-A series have pre-inspection oscillating drive mechanism which enables better inspection performance.

(4) Transportation

EIS-A series have Automatic Re-Inspection function as optional. This function returns un-inspected containers to the pre-spin table for a full re-inspection (except containers on the pre-inspection star wheel). Setting for such second-pass inspection is user configurable through the HMI.

Additionally, EIS-A series has "Loop Validation" (optional), which allows product set up under actual production conditions by recycling test container set through the machine except pre-inspection area.

4.4 Advantage for using automatic inspection machine

1) Quality improvement

Automated inspection systems are generally selected over manual and semi-automated visual subsystem in order to increase output and improve inspection accuracy. Figure 17 is plotted according Knapp Study methodology, comparing the rejection probability of samples using manual inspection vs. automated inspection. An increased rejection capability of the automatic inspection in the reject zone shows improved security over that of the manual inspection.

2) Productivity improvement

Michael de la Montaigne (Eisai Machinery U.S.A. Inc.) et al. performed a study from 2004 to 2005 to evaluate the economic efficiency of manual and automatic inspection method. Considering the fixed and variable costs including man power costs, the study indicated that automatic inspection's efficacy is more than double of the

semi-automatic inspection machine and about 15 times of the manual system. The study also suggested that the initial high costs of the automatic system can be compensated by its higher efficiency within a couple of years.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge Eisai Co., Ltd., Astellas Pharma Inc., Kyowa Vacuum Engineering Co., Ltd., and IDK Co., Ltd., for providing their data and figures.

厚生労働科学研究費補助金（医薬品医療技術研究事業）
分担研究報告書

RO 水製造システムにおける細菌の動態

研究分担者 那須正夫 大阪大学大学院薬学研究科（衛生化学）
研究協力者 馬場貴志 大阪大学大学院薬学研究科（衛生化学）
山口進康 大阪大学大学院薬学研究科（衛生化学）

研究要旨：逆浸透膜処理ろ過システムにより調製される RO 水は、医薬品製造にも用いられている。RO 水には残留塩素が含まれないため、細菌が増殖しやすく、バイオフィウリングによるフィルターの目詰まりや水質の低下が問題となっている。そこで、蛍光活性染色法やマイクロコロニー法を用いて、RO 水製造プロセスにおける細菌数および細菌群集構造の変化を明らかにした。また走査型電子顕微鏡下で遺伝子配列を指標として特定属種の細菌を検出できる SEM-ISH 法を用いて、RO 膜上の細菌の可視化を行った。

A. 研究目的

医療分野においては、様々なグレードの水が用途に合わせて用いられている。なかでも逆浸透膜（Reverse osmosis membrane: RO 膜）を用いて処理された Reverse osmosis water (RO 水) は原水に含まれる粒子のほぼ全てを除去でき、さらにイオンなどの塩類も除去できることから、広く利用されている。

しかしながら、RO 膜は高い除去能力をもつ反面、孔径が数 nm と非常に小さいため、原水に含まれている夾雑物によって目詰まりが起き、ろ過効率が低下する。なかでも、細菌などの微生物の付着によるバイオフィウリングが問題となっている。RO 膜は塩素に弱いため、RO 膜の前段階に塩素除去工程が必須であることも、細菌の増殖を助長する要因の一つであると考えられる。したが

って、RO 水の水質の維持には、製造プロセスにおける細菌の動態を明らかにすることが必要である。

環境微生物学分野における多くの研究により、自然環境中の微生物の大部分は通常の方法では培養困難であることが、明らかとなってきている。これにともない、微生物を培養することなく、迅速・簡便、さらには高精度に定量するための手法が検討されている¹⁻⁸⁾。中でも蛍光試薬を用いて微生物を染色し蛍光顕微鏡下で検出する直接計数法は、環境微生物学分野を中心に広く用いられてきている。

これらの方法のうち、蛍光活性染色法は微生物細胞内のエステラーゼ活性を指標として、生菌を検出できる方法である。また、マイクロコロニー法は、フィルター上に捕

集した細菌を培地上で短時間培養することにより、マイクロコロニーを形成させ、増殖能をもつ細菌を計数する方法である。

そこで今回、蛍光活性染色法およびマイクロコロニー法を用いて、RO 水製造プロセスにおける細菌数の変化を明らかにした。さらに、16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR-DGGE 法により、RO 水製造プロセスにおける細菌群集構造の変化を見た。優占種の推定にあたっては、DGGE ゲルから特徴的なバンドを切り出し、そのシーケンスを解析することにより、細菌種を決定した。

また、劣化した RO 膜上に細菌がどのように存在するのかを明らかにするには、その直接検出が有効である。そのための手法としては、蛍光標識プローブを用いて特定属種の細菌を検出する蛍光 in situ hybridization (FISH) 法が考えられる。しかしながら、FISH 法では夾雑物由来の自家蛍光と細菌由来の蛍光を区別することが困難である。一方、RO 膜表面の詳細な観察が可能な走査型電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscopy ; SEM) では、詳細な形態観察はできるものの、観察しているものが生物か非生物かを判別することは困難である。そこで本研究では、遺伝子情報をもとに、特定細菌を検出できる ISH 法と、高倍率で固体表面を観察できる SEM を併用した Scanning Electron Microscopic-in situ hybridization (SEM-ISH) 法⁹⁾に着目し、RO 膜上の細菌検出を試みた。SEM-ISH 法は、高真空 SEM を用い試料表面の詳細な形態観察を行うと同時に、標的細菌に特異的な遺伝子プローブがハイブリダイズした菌体を視覚的に確認することが可能な方法であ

る。

B. 研究方法

1) 試料

水質の低下が見られた RO 水製造システムにおいて、原水、マイクロフィルターろ過後の水、RO 供給水、RO 濃縮水および RO 水を採取した。

2) 蛍光活性染色法

生菌・死菌を含めた全細菌数の測定には 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI ; Sigma 社) を用い、エステラーゼ活性を有する細菌数測定には carboxyfluorescein diacetate (CFDA ; Sigma 社) を用いた。試料中の細菌をポリカーボネートフィルター (直径 25 mm、孔径 0.2 μm ; Advantec 社) 上に捕集し、染色用バッファー (0.1 mM phosphate buffer [pH 8.5]、5% [w/v] NaCl、0.5 mM EDTA) を添加した後、CFDA 溶液 (10 mg/ml DMSO 溶液) および DAPI 溶液 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 水溶液) をそれぞれ終濃度 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加し、約 3 分間染色を行った。観察にあたっては、蛍光顕微鏡 (E-400 ; ニコン社) の青色励起光下でエステラーゼ活性を有する細菌を計数し、UV 励起光下で全細菌を計数した。計数にあたっては、20 視野を計数し、菌数の平均値が 2 以下または 0 の視野数が 5 視野以上の場合に検出限界以下とした。

3) マイクロコロニー法

試料中の細菌をポリカーボネートフィルター (直径 25 mm、孔径 0.2 μm ; Advantec 社) 上に捕集し、フィルターのろ過面を上

にして R2A 培地上に 25°C で 24 時間静置した。その後 4%ホルマリンを染みこませたろ紙 (No.2, 直径 25 mm ; Whatman 社) 上にフィルターを 30 分以上静置してフィルター上の細菌を固定した。SYBR Gold 溶液 (Invitrogen 社; 終濃度 10×, 2% [w/v] Tween 20) を染みこませたろ紙の上に 10 分間静置し染色した後、無菌水を染みこませたろ紙の上に約 1 分間静置してフィルターを洗浄し、蛍光顕微鏡を用いてマイクロコロニーを観察・計数した。観察にあたっては、蛍光顕微鏡 (E-400) の青色励起光下で計数した。計数にあたっては、20 視野を計数し、マイクロコロニー数の平均値が 2 以下または 0 の視野数が 5 視野以上の場合に検出限界以下とした。

4) 平板培養法

各試料について、R2A 培地を用いた培養 (平板塗抹培養法) を 25°C で 7 日間行い、生じたコロニーを目視で計数した。

5) PCR-DGGE 法

細菌の DNA は Tsai and Olson¹⁰⁾の方法にしたがって抽出した。16S リボソーム RNA gene (16S rDNA) を標的とし、全細菌に共通な 16S rDNA 配列を EUB933-GC-clamp および EUB1387 のプライマーセットを用いて PCR により増幅した。EUB933 プライマーの 5' 末端には 40 bp の GC-clamp を付加した。得られた PCR 増幅産物を 40~70% の変性剤濃度勾配をつけたポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。100% 変性剤は 7M の尿素および 40% のホルムアミドを含有する。電気泳動は 55°C で行い、20V で 10 分間泳動した後、100 V で 14 時

間泳動した。電気泳動後、ゲルを SYBR Gold 溶液 (終濃度 10,000×) で染色し、ゲルリーダーにより観察した。各試料について特徴的なバンドをゲルから切り出し、クロニング後にシーケンスの解析を行なった。

6) SEM-ISH 法

パラホルムアルデヒドで固定した試料を真空乾燥し、スライドガラス上に乗せた後、ビオチン標識 EUB338 プローブを含有するハイブリダイゼーションバッファーを滴下し、46°C で 2 時間ハイブリダイゼーションを行った。その後、洗浄用バッファーで 48°C、15 分間洗浄した。ハイブリダイゼーション後の試料をアルカリ溶液に 10 分間浸した後、酸性溶液を添加し、室温で 5 分間静置することにより中和処理を行った。無菌水で洗浄した後、PBS に浸し、室温で 15 分間ブロッキングを行った。PBS を除き、ナノゴールド標識ストレプトアビジン (Nanoprobes) 溶液に浸し、室温で 30 分間反応させ、さらに PBS に浸し、10 分間洗浄を行なった。次に金増感を行った後、PBS に浸し、洗浄を行った。試料をスライド上に固定し、走査型電子顕微鏡 (JSM-5610L ; 日本電子) の試料室内において 1 時間凍結乾燥を行った。乾燥後、試料表面を金コーティングした後、SEM で観察した。二次電子 (Secondary electron) 像で試料の形態観察を行い、反射電子 (Backscatter electron) 像で元素番号の大きい元素の集中している部分を検出した。

C. 研究結果および考察

- 1) RO水製造過程における細菌数の変化
図 1 に、蛍光活性染色法等により測定し

た RO 水製造過程における全細菌数、エステラーゼ活性をもつ細菌数、マイクロコロニー形成細菌数およびコロニー形成細菌数の変化を示した。今回対象とした RO 水製造システムで原水として用いられているのは、高度処理された排水であるため、全細菌数が 10^7 cells/ml と高かった。またマイクロフィルターろ過後の水および RO 供給水に比べて、RO 濃縮水中の細菌数は高い傾向にあった。RO 水には、ほとんど細菌が検出されなかった。

このように、RO 水の製造工程において、全菌数ならびに生理活性をもつ細菌数がろ過や UV 処理によって大きく変化していることがわかった。特にタンク貯留により細菌数が増加していたことから、タンクにおける微生物管理の重要性が示された。

蛍光活性染色法は 1 時間以内、マイクロコロニー法は約 1 日で結果を得ることができることから、これらの方法は RO 水製造システムにおける細菌数モニタリングにも有用であることが確かめられた。

2) RO 水製造過程における細菌群集構造の変化

図 2 に DGGE 法の原理を示した。DGGE 法は塩基配列の異なる DNA 断片では変性剤濃度勾配ゲルにおける電気泳動速度が異なることを利用して、そのバンドパターンから試料中の細菌属種の数とそれらの相対的な量を推定する方法である。図 2 から、*Alcaligenes calcoaceticus*、*Escherichia coli*、*Pseudomonas putida* の 3 種の細菌由来の DNA 断片を、変性剤濃度勾配ゲル上で明確に区別できることがわかる。

PCR-DGGE 法を用いて RO 水製造システ

ムにおける細菌群集構造の変化を解析した結果、処理工程が進むにつれて優占種が一般的な水環境中に広く生息する β -proteobacteria (図 3-A、B) や有機物の多い環境に生息する γ -proteobacteria (図 3-C) から、貧栄養環境に生息する α -proteobacteria (図 3-D、E、F) へと変化していることが明らかとなった (図 3)。これは様々な処理により水に含まれる有機物等が除去され、それにより細菌数や活性、優占種が変化したと考えられる。今後、様々な施設において同様の解析を行うことにより、RO 水製造工程における安全管理が可能となり、より安心・安全な医薬品製造用水を確保することができるものと考えられる。

3) RO 膜上の細菌の可視化

RO 膜上に付着している細菌に対し 16S rRNA を標的とした EUB338 プローブを用いてハイブリダイゼーションを行い、SEM で観察した結果を図 4 に示した。二次電子像では RO 膜の表面に様々な夾雑物が付着していることが観察できたものの、その中の細菌の存在を形態から判別することは困難であった。この二次電子像と反射電子像を重ねることにより、遺伝子を標的として RO 膜上の細菌を可視化し検出できた。

今回の結果をもとに、RO 膜上の細菌数を算出すると、 $10^6 \sim 10^7$ cells/cm² の細菌が存在することになる。RO 膜を利用した水処理システム内は貧栄養な水環境であるが、多くの細菌が RO 膜上に濃縮され、付着していると考えられる。

また本研究では、ほぼすべての細菌を検出対象とする EUB338 プローブを用いて細菌の存在を可視化した。特定細菌を標的

としたプローブを用いることにより、その特異的な検出も可能である。

SEM-ISH法は細菌だけでなく、膜などの表面構造を詳細に観察できることから、水処理システム内の細菌モニタリングに応用することにより、システム内のどこに細菌が付着しやすいのか、あるいは増殖しやすいのかを明らかにすることができると考えられ、システムの衛生微生物学的な管理に大きく貢献できると考えられる。

D. 結論

1. 蛍光活性染色法およびマイクロコロニー法により、RO水製造過程における細菌数の変化の迅速モニタリングが可能

E. 参考文献

1. 谷佳津治、山口進康、那須正夫：蛍光染色によるシングルセルレベルでの細菌の検出。衛生化学、**43**: 145-154 (1997)
2. Yamaguchi, N. and M. Nasu. Flow cytometric analysis of bacterial respiratory and enzymatic activity in the natural aquatic environment. *J. Appl. Microbiol.*, **83**: 43-52 (1997)
3. Kawai, M., N. Yamaguchi and M. Nasu. Rapid enumeration of physiologically active bacteria in purified water used in the pharmaceutical manufacturing process. *J. Appl. Microbiol.*, **86**: 496-504 (1999)
4. Kawai, M., E. Matsutera, H. Kanda, N. Yamaguchi, K. Tani and M. Nasu. 16S ribosomal DNA-based analysis of bacterial diversity in purified water used in pharmaceutical manufacturing processes by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**: 699-704 (2002)
5. Kawai, M., J. Yamagishi, N. Yamaguchi, K. Tani and M. Nasu. Bacterial population dynamics and community structure in a pharmaceutical manufacturing water supply system determined by real-time PCR and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Appl. Microbiol.*, **97**: 1123-1131 (2004)
6. Nakajima, K., K. Nonaka, K. Yamamoto, N. Yamaguchi, K. Tani and M. Nasu. Rapid monitoring of microbial contamination on herbal medicines by fluorescent staining method. *Lett. Appl. Microbiol.*, **40**: 128-132 (2005)

である。

2. RO水製造過程における細菌群集構造の変化および優占種の推定は、PCR-DGGE法により可能である。
3. バイオフィウリングを起こす細菌の可視化には、SEM-ISH法が有効であると考えられる。
4. 上記の方法により、RO水製造システムの適切な維持管理が可能となる。

7. Yamaguchi, N., C. Sakamoto and M. Nasu. Rapid and simple quantification of bacterial cells using a microfluidic device. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**: 1117-1121 (2005)
8. 山口進康、那須正夫：蛍光染色による細菌の可視化と迅速・高精度検出. *日本細菌学雑誌*, **61**: 251-260 (2006)
9. Kenzaka, T., A. Ishidoshiro, N. Yamaguchi, K. Tani and M. Nasu. rRNA Sequence Based Scanning Electron Microscopic Detection of Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**: 5523-5531 (1997)
10. Tsai, Y. L. and B. H. Olson. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**: 1070-1074 (1991)