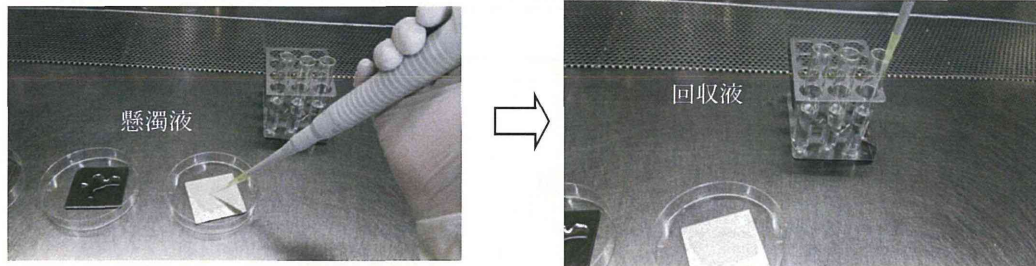


影響でキャリアー表面の一部に液が集まることから放置時間中は約 1 分毎に均一化操作を行う。

- 5) 5 分後にキャリアー表面の *E.coli* を懸濁した滅菌水 100  $\mu\text{L}$  をとり、回収液 10 mL に移し、よくかき混ぜる。同様に、キャリアー表面の *E.coli* を懸濁した消毒剤 1 種目及び消毒剤 2 種目 100  $\mu\text{L}$  をとり、回収液 10 mL に移し、よくかき混ぜる。他の 5 菌種を懸濁した滅菌水、消毒剤 1 種目及び消毒剤 2 種目についても同様の操作を実施する。



- 6) 各回収液を pH7.2 のリン酸緩衝液で段階希釈し、100 倍までの希釈液を調製する。
- 7) 各段階希釈液 1 mL ずつを滅菌済シャーレ 2 枚に添加し、SCD カンテン培地約 20 mL を用い、混釈法により菌数を計測する。
- 8) 培養条件は 30~35°C で 5 日間とする。コロニーの形成状態により、正確な菌数を計測できなくなる恐れがある場合は、5 日間よりも短い培養日数で計測しても差支えない。なお、コロニー計測は 30~300 CFU の範囲内のプレートを対象に行う。該当するプレートが無い場合又は 2 種類の希釈段階から 30~300 CFU の範囲内にあるコロニーを認めた場合は、希釈段階の少ない液で得られた計測値を採用する。
- 9) 消毒剤で懸濁し、シャーレ 2 枚で計測された菌数の平均値を「消毒後の菌数」、滅菌水で懸濁し、シャーレ 2 枚で計測された菌数の平均値を「初期菌数」とする。菌数の算出は次式による。

#### 【菌数の算出】

$$\text{菌数} = a \times b \times c \times d$$

a : シャーレ 2 枚の平均値【CFU】

b : 段階希釈倍数 (1 倍 or 10 倍 or 100 倍)

c : 10 (回収液の量)【mL】

d : 10 (消毒剤中の菌数に換算する係数。1 mL 中の 100  $\mu\text{L}$  に対する菌数を計測)

- 10) 「消毒後の菌数」と「初期菌数」をそれぞれ対数換算し、以下の式を使用して試験菌の対数減少量を算出する (小数点 2 桁目を四捨五入し、少数点 1 桁で表記する)。

#### 【計算式】

$$\text{対数減少量} = \text{Log}(\text{消毒後の菌数}) - \text{Log}(\text{初期菌数})$$

- 11) 他 7 種の材質のキャリアーについて、上記 1)~10) の操作を実施する。上記 1)~11) の操作について日にちを変えて、それぞれ 3 回繰り返す。

## 回収液組成の検討結果

## 7. 概要

検証濃度の各消毒剤を対象に、微生物の回収が可能となる液組成を検討した。その結果、表1に示す組成が全ての消毒剤に対して、微生物の回収が可能であることを確認した。

表1 回収液組成 (1000mL 中)

成分	最終濃度	秤取量
大豆レシチン	0.50%	5.0 g
ポリソルベート 80	4.00%	40.0 g
チオ硫酸ナトリウム 5 水和物	0.50%	5.0 g
L-ヒスチジン	0.20%	2.0 g
リン酸二水素カリウム	(15 mM)	2.0 g
カタラーゼ <sup>*1</sup>	4.8 w/v	50 mL
水	-	950 mL

\*1：熱により分解するため、ろ過滅菌による無菌化を行う。

## 8. 回収液の調製手順

以下の方法で調製した。

- (1) 大豆レシチン、ポリソルベート 80、チオ硫酸ナトリウム 5 水和物、L-ヒスチジン、リン酸二水素カリウム及び水を混和し、121°C で 15 ~ 20 分間高圧蒸気滅菌する。
- (2) よく振り混ぜ、室温にまで冷却する。
- (3) ろ過滅菌したカタラーゼを加え、全量 1000 mL とする。
- (4) 滅菌済の適当な分注器を用い、滅菌済の試験管等に回収液を 10 mL ずつ分注する。
- (5) 室温下、暗所で保管し、1 週間以内に使用する。

## 9. 検討手順

以下の手順で実施した。

- (1) 検証濃度の各消毒剤を調製し、その 0.1 mL を回収液 10 mL に添加した。
- (2) (1) に *Escherichia coli* ATCC 8739、*Staphylococcus aureus* ATCC 6538、*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027、*Bacillus subtilis* ATCC 6633、*Candida albican* ATCC 10231 及び *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 の  $10^3 \sim 10^4$  CFU を含んだ液 0.1 mL を個別に接種した。
- (3) (2)の液を 90 分程度放置し、作用させた。
- (4) (3) の液 0.1 mL ずつを 2 枚の SCD カンテン平板に接種し、カンテン表面塗抹法により、菌数を計測した。平板培地 2 枚で計測された菌数の平均値を「回収された試験菌数」

とした。

(5) 同時に、消毒剤の代わりに滅菌水を添加した回収液に対して同様の操作を行い、SCD カンテン平板培地 2 枚で計測された菌数の平均値を「イニシャル値」とした。

(6) (4) 及び (5) の培養条件は 30～35°C で 5 日間とした。

(7) 以下の式を使用して試験菌の回収率を算出した。

【計算式】

$$\text{回収率 (\%)} = \text{回収された試験菌数} / \text{イニシャル値} \times 100$$

(8) 試験菌の回収率が 50～200%であれば、回収液として適切と判断した。

## 10. 結果

消毒剤毎の試験菌に対する回収率の結果を表 2 に示す。

全ての消毒剤及び試験菌を良好に回収することが出来た。

表 2 回収液の微生物回収率

消毒剤		回収率 (%)								
		<i>S.aureus</i>			<i>P.earuginosa</i>			<i>E.coil</i>		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
過酸化水素	3.0%	91	89	82	81	85	111	89	97	100
過酢酸	0.21%	80	95	78	80	103	96	104	109	82
次亜塩素酸ナトリウム	0.020%	82	107	74	98	100	108	87	105	91
イソプロパノール	50%	80	104	92	80	114	100	96	109	95
エタノール	70%	98	88	86	114	112	109	99	145	102
ベンザルコニウム塩化物	0.05%	84	102	81	106	95	109	102	125	103
アルキルジアミノエチルグリシン塩酸塩	0.05%	63	94	92	90	96	82	107	104	94
クロルヘキシジングルコン酸塩	0.05%	91	104	77	100	96	114	86	144	93

消毒剤		回収率 (%)								
		<i>B.subtilis</i>			<i>C.albicans</i>			<i>A.brasiliensis</i>		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
過酸化水素	3.0%	105	103	92	79	107	97	108	80	78
過酢酸	0.21%	82	115	83	105	73	78	90	104	82
次亜塩素酸ナトリウム	0.020%	99	112	88	96	100	105	110	86	96
イソプロパノール	50%	108	99	98	93	73	85	111	114	92
エタノール	70%	95	110	87	95	87	85	107	94	102
ベンザルコニウム塩化物	0.05%	79	97	54	99	107	103	100	82	88
アルキルジアミノエチルグリシン塩酸塩	0.05%	94	94	86	100	93	97	104	84	71
クロルヘキシジングルコン酸塩	0.05%	93	115	82	93	80	123	106	88	116

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
山口進康、 那須正夫	微生物迅速検出法	佐々木次雄、 棚元憲一、 川村邦夫	新 GMP 微生物試験法 第2版	じほう	日本	2013	489-506

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kitajima T., Muroi M., Yamashita N., and Tanamoto K.	Toll-like receptors required for <i>Dermatophagoides farinae</i> to activate NF- $\kappa$ B	Biol. Pharm. Bull.	37	74-80	2014
Shah N., de Oca M.M., Jover-Cobos M., Tanamoto K., Muroi M., Sugiyama K., Davies N.A., Mookerjee R.P., Dhar D.K., Jalan R.	Role of Toll-like receptor-4 in mediating multi-organ dysfunction in acetaminophen induced acute liver failure in mice	Liver Transpl.	19	751-761	2013
Ogura N., Muroi M., Sugiura Y. and Tanamoto K.	Lipid IVa incompletely activates MyD88-independent Toll-like receptor 4 signaling in mouse macrophage cell lines	Pathogens and Disease	67	199-205	2013
Nobuyasu Yamaguchi, Takahiro Nishiguchi, Fuangfa Utrarachkij, Orasa Suthienkul, Masao Nasu	16S ribosomal RNA gene-based phylogenetic analysis of abundant bacteria in river, canal and potable water in Bangkok, Thailand	Biol. Pharm. Bull.	36	872-876	2013
Tomoaki Ichijo, Hatsuki Hieda, Rie Ishihara, Nobuyasu Yamaguchi, Masao Nasu	Bacterial monitoring with adhesive sheet in the International Space Station-“Kibo”, the Japanese Experiment Module	Microbes Environ.	28	264-268	2013
Nobuyasu Yamaguchi, Syuhei Matsukawa, Yoko Shintome, Tomoaki Ichijo, Masao Nasu	Microchip-based Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism analysis for on-site analysis of bacterial communities in freshwater	Biol. Pharm. Bull.	36	1305-1309	2013

# 第20章

## 微生物迅速検出法

### はじめに

微生物の検出や計数には、培養法が広く用いられている。本方法は、①操作が容易である、②特殊な装置を必要としない、③低コスト、④各種の病原微生物に応じた培養条件が確立されている等の特徴を持っている。しかしながら、環境微生物学の進展とともに、その課題も明らかとなってきている。すなわち、①結果を得るまでに数日から数週間を要する、②選択した培養条件に適していない微生物は検出が難しい、③培養に伴いバイオハザードのリスクが増加すること等である。そこで培養に依存することなく微生物を捉えるために、蛍光染色法やPCR法等の迅速で簡便かつ高精度な検出・計数法が開発されてきている。

一方、医薬品の微生物管理においては、製造工程における継続的な検査と監視を行う技術、Process Analytical Technology (PAT) の重要性が認識され、迅速かつ精確な検出法が求められている。これに伴い、新しい手法に対する関心が欧州、米国などで高まり、その一部は日本でも導入が図られている。

ここでは、新手法の特徴や原理を説明するとともに、それらの手法を用いて超純水 (RO 水) や透析液中の細菌の動態解析を行った結果について概説する。

### 20-1 New Method (新手法) とは

環境微生物学分野や微生物生態学分野の研究が進展するとともに、微生物を培養することなく検出し、その属種に関する情報を得るための手法が開発されてきている<sup>1)</sup>。ヨーロッパ薬局方 (European Pharmacopoeia 6.0, Chapter 5.1.6) には、濁度測定法や平板培養法、MPN (Most Probable Number; 最確値) 法等の培養法に加え、代替法 (Alternative method) が紹介されている。その中には前培養を前提としたものもあるが、従来の培養法と比較して、より迅速に結果を得ることのできる方法が数多くあげられている。これらの迅速法は、RMM (Rapid Microbiological Method) と呼ばれることもある。

表 20.1 に European Pharmacopoeia 6.0 の Chapter 5.1.6. に収載されている代替法、および環境微生物学分野で用いられつつある最新の手法をまとめた。検出対象は、微生物の核酸、脂肪酸、蛋白質や代謝反応などさまざまである。また測定には、前処理した試料を滴下するだけの簡便なキットから大型で複雑な装置まで、多様なものが用いられる。感度も前培養による

表 20.1 新手法の一覧

分類と名称	検出対象	原理・特徴	検出・測定装置
1) 直接検出法			
蛍光顕微鏡法	菌体	微生物をフィルター上に捕集し蛍光染色後、蛍光顕微鏡下で検出・計数する。	蛍光顕微鏡
レーザースキャニングサイトメトリー	菌体	微生物をフィルター上に捕集し蛍光染色後、レーザーでフィルター全面をスキャンし、シグナルを検出する。精度が高い。	レーザースキャニングサイトメーター
フローサイトメトリー	菌体	蛍光染色した微生物を浮遊状態にし、高速でフローセル内を流しながらシグナルを検出する。迅速な解析が可能。	フローサイトメーター
On-chip フローサイトメトリー	菌体	フローサイトメトリーをマイクロ流路を刻んだデバイス（マイクロ流路デバイス）上で行う。前処理や染色を1枚のデバイス上で行うことも可能。	蛍光検出器
蛍光ファージアッセイ	菌体	蛍光標識したファージを細菌に感染させ、特定属種の細菌を検出する。	蛍光顕微鏡等
マイクロコロニー法	菌体	コロニー形成初期のマイクロコロニーを検出・計数する。平板培養法と同じ培養条件（培地組成、温度等）を使用できる。	蛍光顕微鏡等
2) 間接的測定法			
抗原検出法	抗原	微生物が持つ抗原に特異的な抗体を反応させ、発色反応や蛍光をもとに検出する。一部の微生物に対してキットが販売されている。	免疫クロマトグラフィ、マイクロプレートリーダー等
ファージアッセイ法	ファージの感染	検出対象とする細菌に特異的なファージを感染させ、溶菌により生じたプラークや菌体成分を検出する。	カンテン平板培地等
脂肪酸分析法	脂肪酸	微生物の種類によって脂肪酸組成が異なることを利用し、同定する。	ガスクロマトグラフィ等
フーリエ変換赤外分光法	菌体	菌体に赤外線を照射し、その赤外吸収スペクトルパターンから同定する。	フーリエ変換型赤外分光光度計
質量分析法	菌体成分	抽出した菌体成分の組成を質量分析法により分析し、その組成から同定する。	質量分析計
核酸増幅法	核酸	対象とする微生物のDNAやRNAをPCR法、RT-PCR法やNASBA法、MTA法等で増幅し、検出する。定量的PCRを用いれば定量も可能である。	電気泳動装置、マイクロチップ電気泳動装置
フィンガープリント法	DNA	微生物から抽出したDNAを制限酵素で切断し、そのパターンをもとに同定する。	電気泳動装置、キャピラリー電気泳動装置、マイクロチップ電気泳動装置
3) 増殖評価法			
インピーダンス法	増殖能	微生物が増殖の際に培地成分を利用して産生する代謝産物の増加により生じる電気抵抗や電気伝導度の変化を検出する。	電気計測器
ガス測定法	増殖能	微生物の増殖に伴う二酸化炭素の産生や酸素の消費等のガス量の変化を検出する。	ガス測定器
生物発光法	ATP	微生物細胞内のATPを酵素反応による発光現象をもとに検出する。	発光測定器
マイクロカロリーメトリー	熱	微生物が産生する微弱な熱を測定する。	マイクロカロリーメーター

European Pharmacopoeia 6.0のChapter 5.1.6.にAlternative methodとして収載されている手法に最新の手法を追加し、改変。

増菌が必要なものから、個々の菌体レベルで検出できるものまであり、目的とする精度とコストに応じて、手法を選択することが重要である。

PCR法を初めとする核酸増幅法は微量の微生物を検出可能であり、増幅した核酸の配列を解析することにより、検出した微生物の同定が可能となる。PCR法は第十五改正日本薬局方から、細菌や真菌を同定するための手法として参考情報に記載されている<sup>2)</sup>。

表20.1に示した手法は、微生物の検出や現存量測定を主な目的としている。これらの手法を用いて、まず試料中の微生物の存在を確認し、存在が認められれば、後述する方法を用いて優占種の属種に関する情報を得るとともに、その生理状態を評価することにより、詳細な微生物管理が可能となる。

## 20-2 新手法の原理

### 1. 蛍光染色法

微生物を培養することなく迅速・高精度に計数するには、微生物を蛍光試薬で染色し検出する方法、すなわち蛍光染色法が有効である。本手法を用いて試料中の微生物数を測定するには、蛍光染色した微生物を表面が平滑なフィルター（ポリカーボネート製フィルターやアルミナ製フィルターなど）上に捕集し、蛍光顕微鏡で直接計数する方法が一般的に用いられる<sup>1)</sup>。微生物数が少なく試料の過剰が多くなる場合は、フィルター上に微生物を捕集した後、蛍光染色し直接計数する方法が用いられる。

微生物を本方法により検出する利点としては、①操作が容易であり、かつ短時間である、②核酸や蛋白質など目的に応じてさまざまな細胞内成分を標的にできることがあげられる。一般的な染色時間は数分から30分であることから、検出までに要する時間は1時間以内であり、培養法と比較して、極めて短時間のうちに微生物数を測定することができる。このような特長から日本薬局方に参考情報として記載された<sup>3)</sup>。

ただし、蛍光染色剤はその性質上、変異原性や細胞毒性を持つものが多い。そのためSYBR Safeなど、より安全性の高い蛍光試薬の開発も行われている。またDAPI（4',6-diamino-2-phenylindole）やSYBR Greenのように細胞内への透過性が高く、ほとんどの属種の細菌を染めることが可能な染色剤がある一方、後述のfluorescein diacetate (FDA)のようにグラム陰性菌を染めにくい試薬や5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC)のようにグラム陽性菌が染まりにくい試薬もある。したがって蛍光染色剤を用いる場合には、その染色特性にも十分注意する必要がある。

#### 1) 全菌数直接測定法

試料中の全微生物数を培養することなく測定するために、核酸結合性の蛍光試薬が用いられる。従来はacridine orangeやethidium bromideなどが用いられていたが、変異原性が高いことから、より安全性の高いDAPIやSYBR Greenなどが用いられている。DAPIはDNAのアデニンやチミンの多い部分に結合する性質を持つ。SYBR Green Iは二本鎖核酸に、SYBR Green IIは一本鎖核酸に特異的に結合する。したがって、これらの蛍光染色剤を目的に応じて用いることにより、DNAを標的とした全細菌の検出や、RNA合成の盛んな生理活性の高い

細菌のみを検出することが可能になる。また SYBR Gold は蛍光の輝度が高く、ウイルスの検出にも有効である。

## 2) 蛍光活性染色法

試料中の個々の細菌の生理状態を把握するための蛍光染色剤として、CTC などの蛍光性テトラゾリウム塩や FDA 系試薬が用いられる<sup>1)</sup>。

CTC は細胞の呼吸により蛍光性の結晶に還元され細胞内に蓄積されるため、呼吸している細菌は CTC による染色後に青色励起光または緑色励起光を照射すると、赤色蛍光を発する。生きている細菌を 1 時間以内に簡便に検出できることから、水試料中の生菌の検出に繁用されている<sup>4,5)</sup>。

FDA 系試薬は細胞内に普遍的に存在する酵素であるエステラーゼによって蛍光物質に加水分解されるため、本染色法を用いることにより、エステラーゼ活性を持つ細菌や真菌は青色励起光下で緑色蛍光を発する。なお FDA はグラム陰性菌に対する染色性が低いため、CFDA (carboxyfluorescein diacetate)<sup>5)</sup> が開発され、一般的に利用されている。計数までに要する時間は数分から 30 分であり、河川水<sup>5)</sup> や地下水<sup>6)</sup>、医薬品製造用水<sup>7)</sup>、病院内の手洗い用水<sup>8)</sup>、さらにコショウ<sup>9)</sup> や生薬<sup>10)</sup> などに存在する生菌数の迅速・簡便な測定に応用されている。

## 3) マイクロコロニー法

マイクロコロニー法は、直径 10～100  $\mu\text{m}$  の微小なコロニーを蛍光染色し、蛍光顕微鏡等を用いて計数する方法である。試料中の細菌をフィルター上に捕集し、培地上に数時間～十数時間静置する。生じたマイクロコロニーを蛍光試薬で染色し、観察・計数する<sup>1)</sup>。

本方法では通常の平板培養法と同じ培地を使用でき、より短い時間で増殖能を持つ細菌を検出可能である。また通常の条件では培養困難である細菌でも、培養条件の最適化により、マイクロコロニーを形成する場合もある<sup>11)</sup>。したがって、マイクロコロニー数は通常、コロニー数よりも高い値となる傾向にある<sup>7)</sup>。

なおマイクロコロニーの検出にあたっては、ルシフェラーゼを用いた発光反応により ATP (アデノシン三リン酸；細胞の呼吸により産生される) を対象とすることも可能である。

## 4) 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 法

リボソーム RNA (rRNA) は細胞内で蛋白質を合成するリボソームの構成因子であり、rRNA 上には微生物の属や種に特異的な配列が存在している。したがって rRNA の配列を用いることにより、細菌の系統分類が可能となる (図 20.1)。

FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) 法は、検出対象とする細菌や真核微生物に特異的な rRNA 配列に対して相補的な配列 (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、特定の微生物を細胞レベルで検出する方法である<sup>12,13)</sup>。本方法の概略は以下のとおりである<sup>1)</sup>。まず試料中の細菌を中性緩衝ホルマリンで処理し、プローブや試薬を菌体内に入りやすくする。次に処理した細胞をメンブレンフィルター上に捕集する。検出対象に対して特異的な蛍光標識プローブを含むバッファーを用いて、フィルター上の細胞に対するハイブリダイゼーションを行った後、洗浄操作により非特異的に反応したプローブを除く。最後に DAPI 等で対比染色を行い、観察する。対象とする細菌を培養することなく、その属種レベルで数時間から 1 日以内に検出できることから、1990



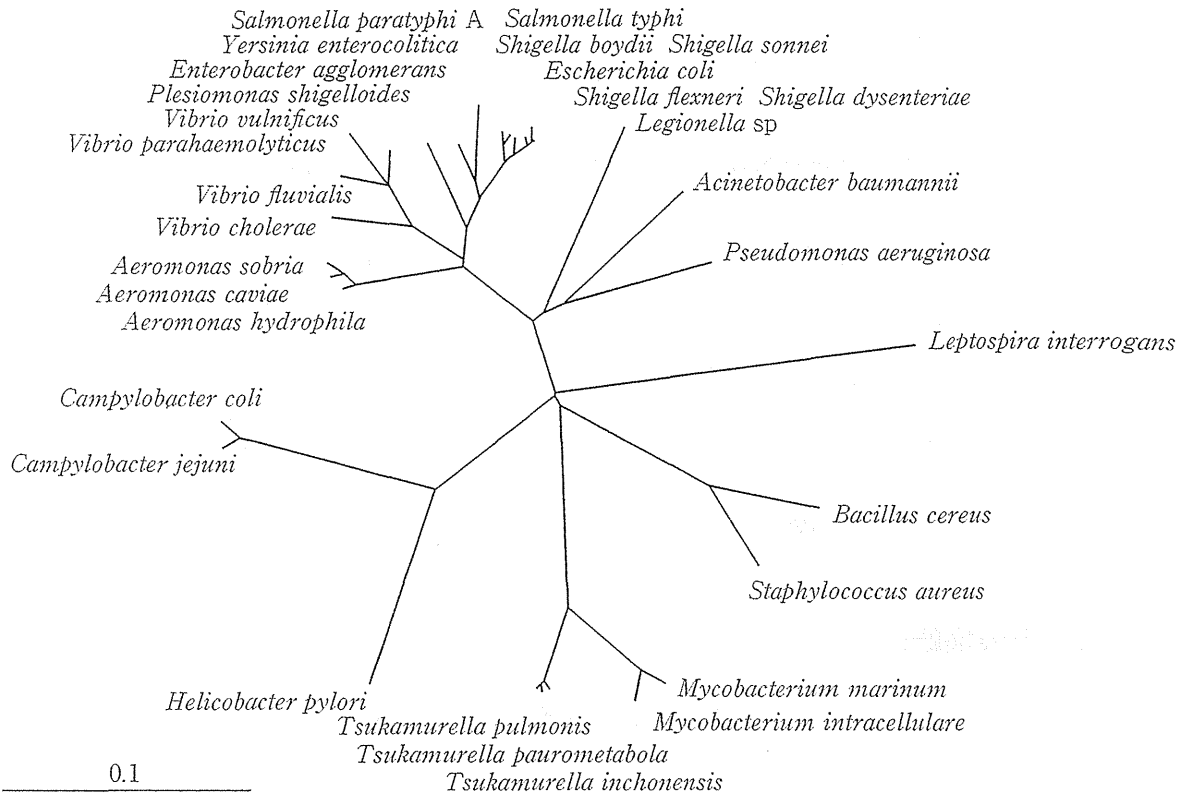


図 20.1 細菌の 16S rRNA 遺伝子の配列をもとに作成した系統樹  
rRNA 上には、全ての細菌に共通な領域と細菌種によって配列が変化する可変領域が存在する。

年代以降、環境微生物学分野を中心に急速に普及している。

FISH 法を用いた微生物の検出においては、特異性の高いプローブを用いることが重要である。多くの研究者が、対象とする微生物に適したプローブを独自に設計しており、そのデータベースとして probeBase (<http://www.microbial-ecology.net/probebase/>) が公開されている。

また蛍光プローブとしては、Cy3 や Cy5 で標識した DNA オリゴヌクレオチドプローブが広く用いられている。これは受託合成サービスが安価になり、独自に設計したプローブの特異性の評価を容易に行えるようになってきたことが理由の 1 つである。

一方、人工核酸の利用も試みられている。ペプチド核酸 (Peptide Nucleic Acid; PNA) は DNA や RNA とは異なり、リン酸結合ではなくペプチド結合で骨格を形成している核酸である。DNA や RNA ではリン酸部位に電荷が存在するが、PNA には電荷が存在しない。したがって、PNA プローブは菌体内に入りやすく、通常の DNA オリゴヌクレオチドプローブを用いた FISH 法では検出が困難な微生物等に対しても、良好な結果を得ることができる。架橋化核酸 (Bridged Nucleic Acid [BNA]; Locked Nucleic Acid [LNA] と呼ばれる) は糖の 2' 位と 4' 位を架橋した人工核酸で、この架橋により天然の核酸にみられる構造の変化 (ゆらぎ) を抑止している。BNA プローブは立体構造の安定性が高く、DNA オリゴヌクレオチドプローブでは相補鎖を形成しにくかった rRNA 配列に対してもハイブリダイズするため、検出精度が向上する。

FISH 法の検出対象である rRNA は蛋白質合成に用いられる RNA であり、対数増殖期の細菌では定常期に比べて細胞内の rRNA 量が多くなる。そこで FISH 法における各細胞の蛍光強度をもとに細菌の生理状態を把握できる。しかしながら、rRNA は分解速度が遅く、生理活性

が低下した細胞内にも残存していることから、FISH法のみでは細菌の生理状態を正確には評価しにくい。そこで「生理活性を有する特定微生物」を検出するためのFISH法も検討されている。

生理活性を持つ細菌を細胞レベルで検出する手法として、前述のマイクロコロニー法や蛍光活性染色法がある。そこで、これらの手法をFISH法に併用した手法が考案されている。マイクロコロニーに対してFISHを行うマイクロコロニーFISH法<sup>14)</sup>により、増殖能を持つ細菌のモニタリングが可能である。本方法では検出対象が直径10～100 $\mu\text{m}$ のマイクロコロニーであるため、細菌と同等の大きさを持つ夾雑物が存在する試料においても区別がしやすく、高精度な検出が可能である。

蛍光染色剤CTCは、呼吸している細菌細胞内で赤色蛍光性の結晶であるCTCフォルマザンに還元される。したがって、CTCにより染色した試料に対してFISHを行うCTC-FISH法により、呼吸能を持つ特定属種の細菌を検出できる<sup>15)</sup>。

## 2. 核酸増幅法

PCR法は特定のDNAを指数関数的に増やす方法であり、ごくわずかな遺伝子であっても特異的に増幅できるので、試料中の極少量の微生物をその遺伝子をもとに検出するために用いられる。PCRにおいては検出対象に特異的なプライマーを用いることが重要であり、さまざまな微生物種に対するプライマーが報告されているほか、遺伝子情報データベースを用いて独自に設計することも可能である<sup>1)</sup>。なお試料によってはPCRを阻害する物質を含んでいる場合があり、この場合は試料の希釈や精製が有効である。また市販のDNAポリメラーゼ中には、微量の細菌DNAが混入している。したがって、細菌DNAが少ない試料から全細菌を検出するためのプライマー(ユニバーサルプライマー)を用いて検出を行う場合には、擬陽性が生じやすいので注意が必要である。なおユニバーサルプライマーを用いた際の擬陽性の発生を防ぐために、細菌DNAの混入を抑えたDNAポリメラーゼも市販されている。

定量的PCR法は試料中の標的微生物に由来する核酸を定量するためのPCR法であり、競合PCR(competitive PCR)法とリアルタイムPCR法がある。このうちリアルタイムPCR法は専用の装置が販売されていることもあり、環境微生物学分野でも広く用いられてきている。

リアルタイムPCR法はPCRの増幅産物量をリアルタイムで測定する方法であり、迅速かつ定量性に優れている。多くの試料を一度に処理でき、データ解析を自動化できる特長を持っている。本方法では、サーマルサイクラーと蛍光検出装置を一体化した機器を使用する。まず段階希釈した標準核酸を用いて、核酸の増幅が指数関数的に起こる濃度範囲において、各希釈段階の核酸の初期量と一定量の増幅産物が得られるPCRサイクル数をプロットした検量線を作成する。次に、未知濃度の標的核酸が含まれた試料についてPCRを行い、検量線の作成に用いた量と同じ量の増幅産物が得られるPCRサイクル数を求め、作成した検量線を用いて試料中の標的核酸の量を求める<sup>1)</sup>。条件の最適化により、試料水1mLに10個以下で存在する細菌を検出可能である。

## 3. 微生物群集構造解析法

試料中に存在する微生物の種とその現存量を、細胞レベルではなく、群集レベルで明らかに

することも可能である。特にPCR技術の普及とともに、遺伝子から微生物群集構造を解析する手法が環境微生物学分野で広く用いられている<sup>1)</sup>。

### 1) DGGE 法, TGGE 法

微生物群集構造の解析には、DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis: 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動) 法や TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis: 温度勾配ゲル電気泳動) 法が用いられている。通常のゲル電気泳動がDNA断片の長さに基づいて分離を行うのに対し、DGGEやTGGEではDNA断片をその配列の違いに基づき分離する。二本鎖DNAはその塩基配列に依存して、変性剤(尿素、ホルムアミドなど)の濃度や温度により、部分的に一本鎖に解離する。部分的に解離した二本鎖DNAは、完全な二本鎖の状態に比べて電気泳動時にゲル中での移動速度が極端に遅くなる。したがって、長さが同じで塩基配列の異なるDNA断片を、変性剤濃度勾配を持つゲル中で電気泳動(DGGE)あるいは温度勾配を持つゲル中で電気泳動(TGGE)すると、塩基配列に応じて泳動が止まるため、それらを分離することが可能となる<sup>16)</sup>。

DGGEゲル、TGGEゲル上の個々のバンドはそれぞれ異なる微生物属種に由来し、各バンドの輝度は存在する細菌の量を反映する。したがって、バンドの数を調べることにより試料中の微生物群集の多様性を、各々のバンドの輝度により各微生物種の相対的な現存量を知ることができる<sup>17)</sup>。また特定のバンドの消長を追跡することにより、特定の細菌のモニタリングが可能となる<sup>18)</sup>。

DGGEやTGGEを行うにあたっては、専用の電気泳動装置が販売されており、またそのノウハウも多く報告されてきている。また、ゲルから特定のバンドを切り出し、そのシークエンスを解析することにより、属種に関する情報を直接的に得ることができる<sup>19)</sup>。そしてその配列情報をもとにして、特異的なモニタリングのためのプローブやプライマーを設計できる<sup>19)</sup>。

なおDGGEではゲル間の変性剤濃度勾配のわずかな差が電気泳動結果に影響を与え、バンド位置がずれる原因となる。したがって、ゲル間でバンドのパターンの比較を行うにはTGGEのほうが適しているが、DGGEではTGGEに比べてより明瞭なバンドパターンを得ることができる。

### 2) T-RFLP 法

制限酵素はDNAの特定の塩基配列部位を切断する性質を持つ酵素である。例えば制限酵素の一種である*EcoR* IはDNA上のGAATTCの部分認識し、GとAの間で切断する。したがって、同じ長さで異なる塩基配列を持つ遺伝子を制限酵素により切断すると、異なる長さのDNA断片が得られる。この原理を用いて微生物群集構造を解析する手法が、T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism: 末端標識制限酵素断片多型分析) 法である<sup>20)</sup>。

T-RFLP法の原理を図20.2に示した<sup>1)</sup>。試料中の微生物群集から全DNAを抽出し、rRNA遺伝子上の全細菌に共通な配列を対象としてPCRを行う。この際に蛍光標識したプライマーを使用することにより、生じるPCR産物の末端を蛍光標識する。PCR産物を*Hha* Iや*Msp* Iなどの制限酵素で切断した後、キャピラリー電気泳動装置を用いて電気泳動し、蛍光標識された末端を持つPCR産物(DNA断片)を検出する。そして検出されたDNA断片の数や各々の蛍光強度を測定することにより、細菌の群集構造を解析する。

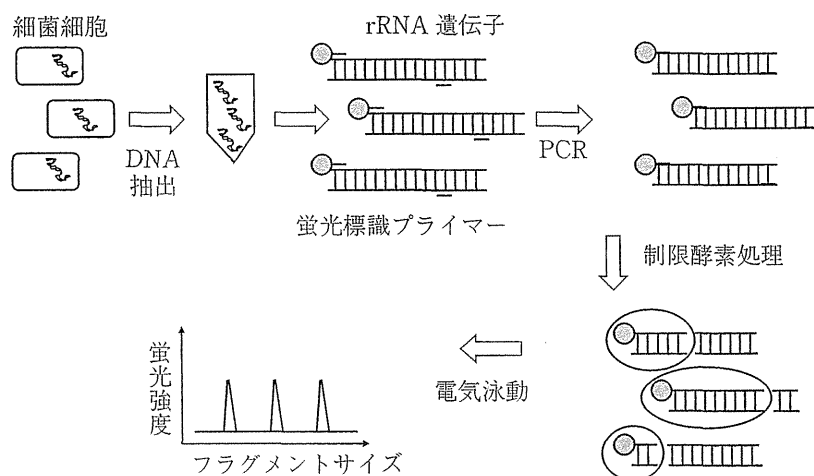


図 20.2 T-RFLP 法の原理

T-RFLP法では前述のDGGE法やTGGE法とは異なり、特定のPCR産物を直接切り出してそのシーケンスを解析することができず、使用する制限酵素の種類によって得られるピークのパターン（プロファイル）が変化する。しかしながら、キャピラリー電気泳動装置を用いるので、電気泳動操作を自動化できる。またDGGE法やTGGE法に比べて結果の再現性が高く、異なる泳動で得られた結果を容易に比較できるという特徴を持っている。さらに制限酵素処理により得られたrRNA遺伝子増幅産物断片の長さを測定することにより、その細菌の属種に関する情報を得ることが可能である。したがって、電気泳動により求められるプロファイルをもとに、微生物群集の構成種を推定できる。

DGGE法、TGGE法、T-RFLP法にはそれぞれ長所と短所があり、一概にどの方法が優れているとはいえない。各々の特徴をよく理解したうえで、研究目的に応じて使い分ける、あるいは併用することが重要である。

## 20-3 新手法の応用とバリデーション

### 1. 医薬品製造用水

これまでに述べた方法を用いて、医薬品製造用水中の細菌数を測定し、細菌群集構造を解析した。図20.3は医薬品製造用水（イオン交換水）中の細菌数を、平板培養法（SCD培地および100倍希釈SCD培地を使用）、マイクロコロニー法、CTC染色法（呼吸活性を評価）、CFDA染色法（エステラーゼ活性を評価）、DAPI染色法（生菌・死菌ともに染色）を用いて測定した結果である<sup>7)</sup>。通常用いられているSCD培地上にはコロニーが生じなかったが、100倍希釈したSCD培地上には試料水100 mLあたり $10^2$ のコロニーが生じた。これは培地が不適切な場合にはコロニー形成菌数を過小評価することを示したものである。またマイクロコロニー法や蛍光活性染色法を用いることにより、試料水100 mL中に生理活性を有する細菌が $10^4 \sim 10^5$ 、すなわち最適化した培地を用いて得られる生菌数よりもさらに100～1,000倍の生菌が存在していることがわかった。したがって、医薬品製造用水の衛生微生物学的管理にあたっては、従来の平板培養法に加えて、蛍光活性染色法やマイクロコロニー法を用いる重要性

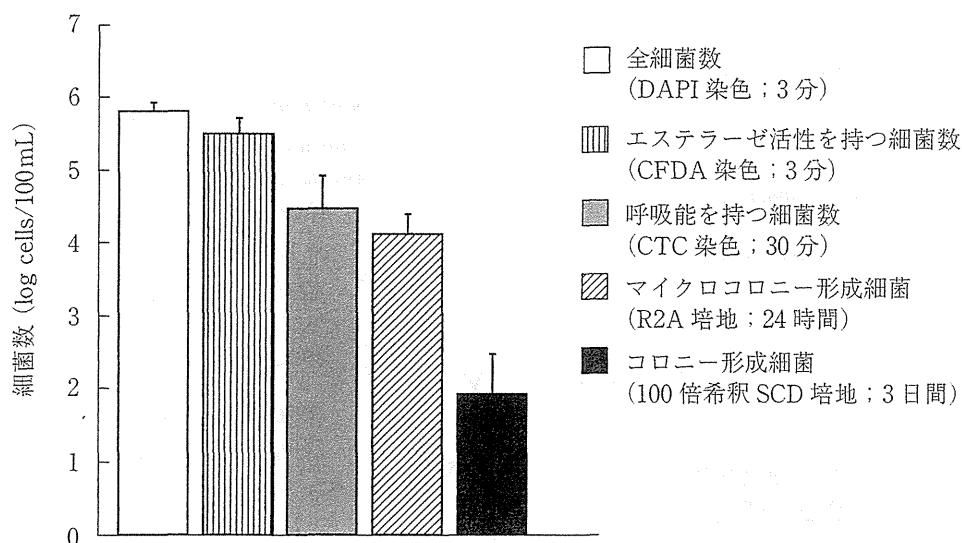


図 20.3 医薬品製造用水 (イオン交換水) 中の細菌数

細菌数は平板培養法 (100 倍希釈した SCD 培地を使用), マイクロコロニー法, CTC 染色法, CFDA 染色法, DAPI 染色法により測定した. 平板培養法において SCD 培地を用いた場合はコロニーは検出できなかったが, 培地を希釈して使用することにより検出が可能となった [Kawai *et al.*, *J. Appl. Microbiol.*, 86: 496, 1999].

が示された.

医薬品製造用水中に, 平板培養法では検出困難な細菌が多く存在することを確認したうえで, その細菌群集構造を DGGE 法により解析した. 精製水中に存在する全細菌から抽出した DNA に対して, ユニバーサルプライマーを用いた PCR により 16S rRNA 遺伝子の部分配列 (約 450 bp) を増幅し, DGGE 法により解析した. 同時に, R2A カンテン培地や SCD 培地上に生じた細菌コロニー群から抽出した 16S rRNA 遺伝子についても PCR-DGGE による解析を行った<sup>19)</sup>. DGGE ゲルより得られたバンドの配列を解析することにより, 優占種が *Proteobacteria*  $\alpha$ -subclass に属する細菌である一方, SCD 培地で検出される細菌は *Proteobacteria*  $\gamma$ -subclass に属する細菌であることがわかった. すなわち, 培地で検出される細菌は必ずしも優占種ではないことがわかった<sup>19)</sup> (図 20.4).

## 2. RO 水および透析液

マイクロフィルター (MF) と逆浸透膜 (RO 膜) を用いた処理水再生システム内の細菌モニタリングを行った結果, システム内で細菌数や細菌群集構造が著しく変化していることがわかった (図 20.5, 20.6). 図 20.6 に示した DGGE ゲルから各工程における特徴的なバンド (A ~ F) を切り出し, シークエンスを解析した結果を系統樹に表した (図 20.7).

原水 (食品工場の処理水) では *Simonsiella* 属の近縁種が優占種であり, マイクロフィルター処理後は *Stenotrophomonas* 属が優占種となった. タンクに貯留し紫外線で処理した後は *Bosea* 属が増加した. すなわち, 処理水の再生処理が進むにつれて, 優占種が水環境に広く分布する *Proteobacteria*  $\beta$ -subclass から貧栄養環境に生息する *Proteobacteria*  $\alpha$ -subclass に変化することがわかった<sup>21)</sup>. これらの結果は, 水の有機物濃度に応じてその環境に適した細菌種が生息していることを示している. このように, 新手法を用いて細菌モニタリングを行うことにより, 各工程における微生物の動態を高精度に理解することが可能となり, より的確な対策を講じることができるようになる.

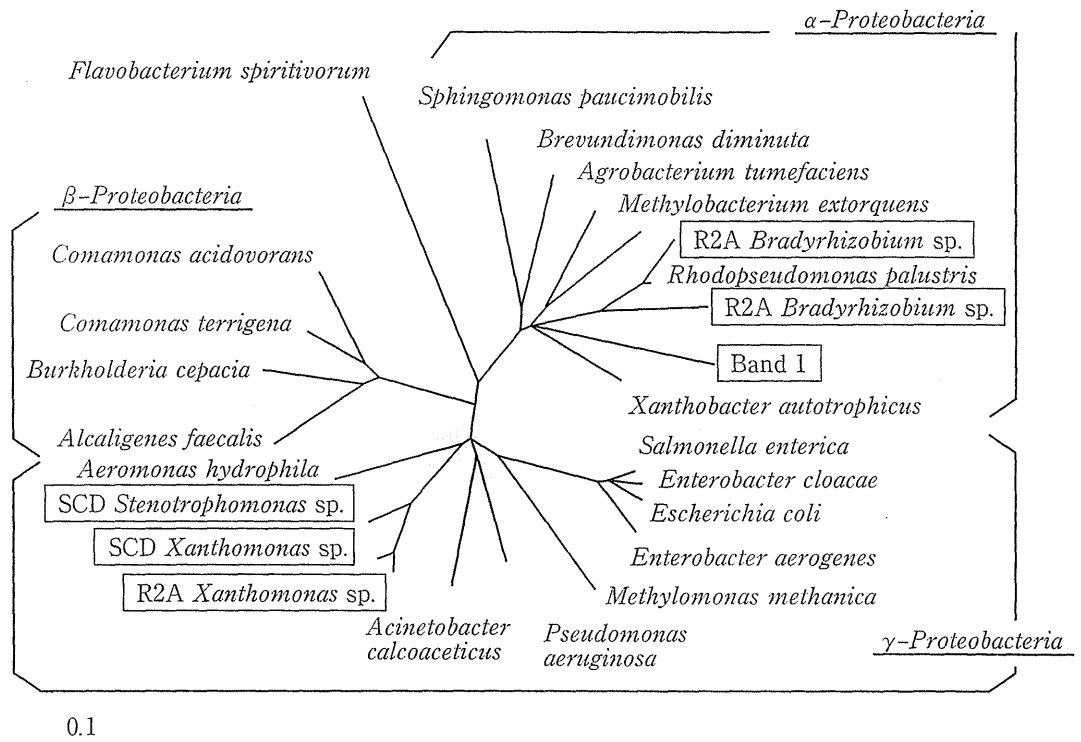


図 20.4 医薬品製造用水（イオン交換水）に存在する細菌の系統分類

Band 1 : DGGE 法により求めた細菌群集中の優占種 [Kawai et al., Appl. Environ. Microbiol., 68: 699, 2002].

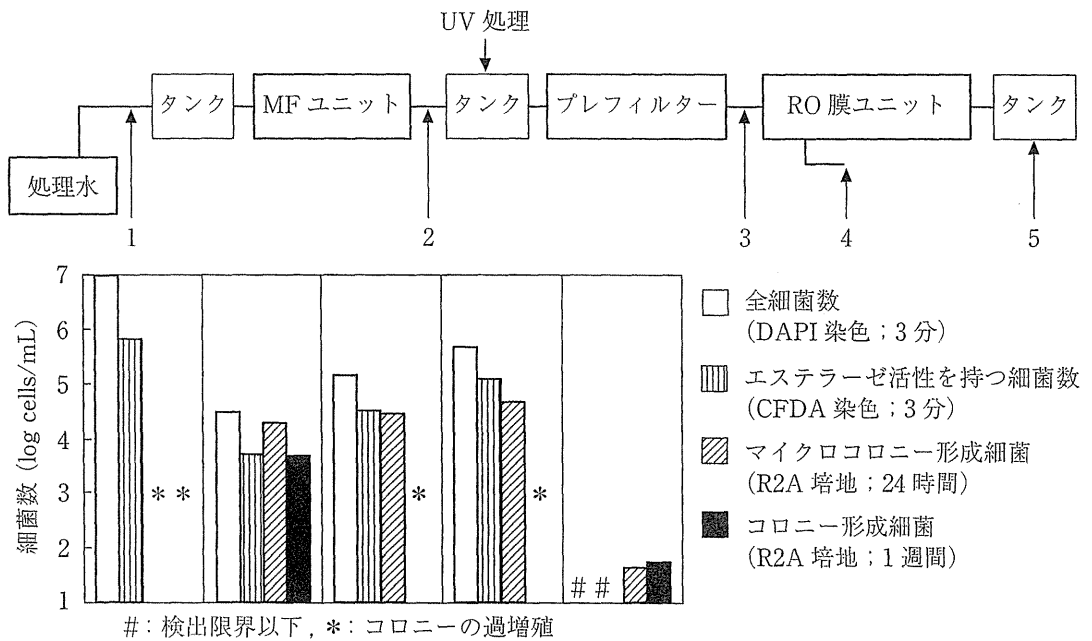


図 20.5 食品工場の処理水再生システムにおける細菌数の変化

細菌数は平板培養法（R2A 培地を使用）、マイクロコロニー法、CFDA 染色法、DAPI 染色法により測定した [Baba et al., Microbes Environ., 24: 163, 2009].

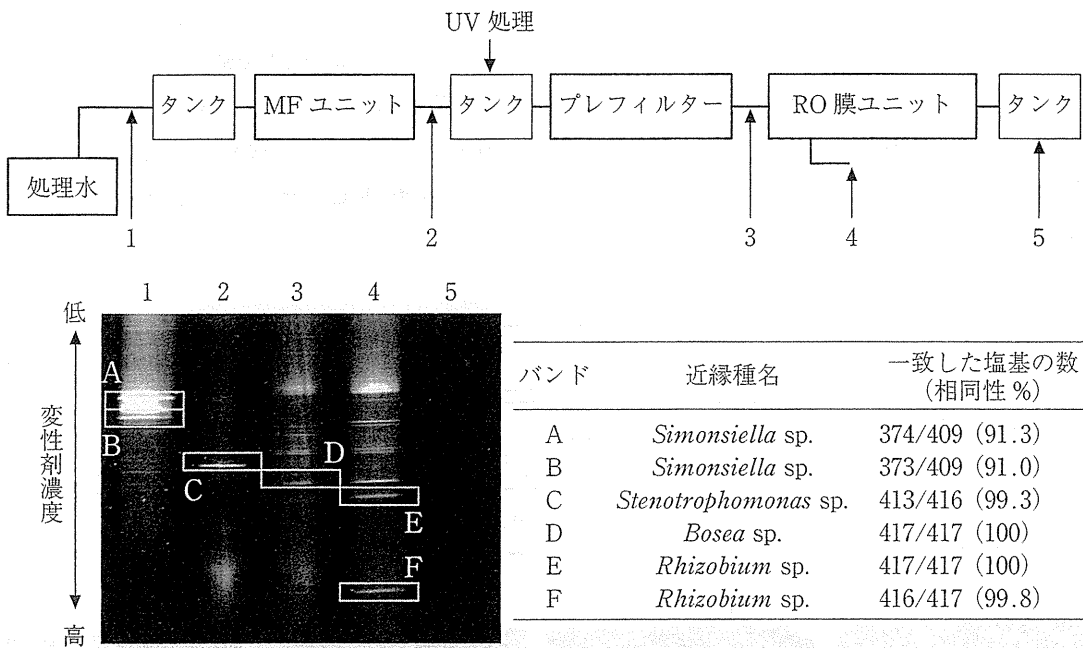


図 20.6 食品工場の処理水再生システムにおける細菌群集構造の変化 [Baba et al., *Microbes Environ.*, 24: 163, 2009]

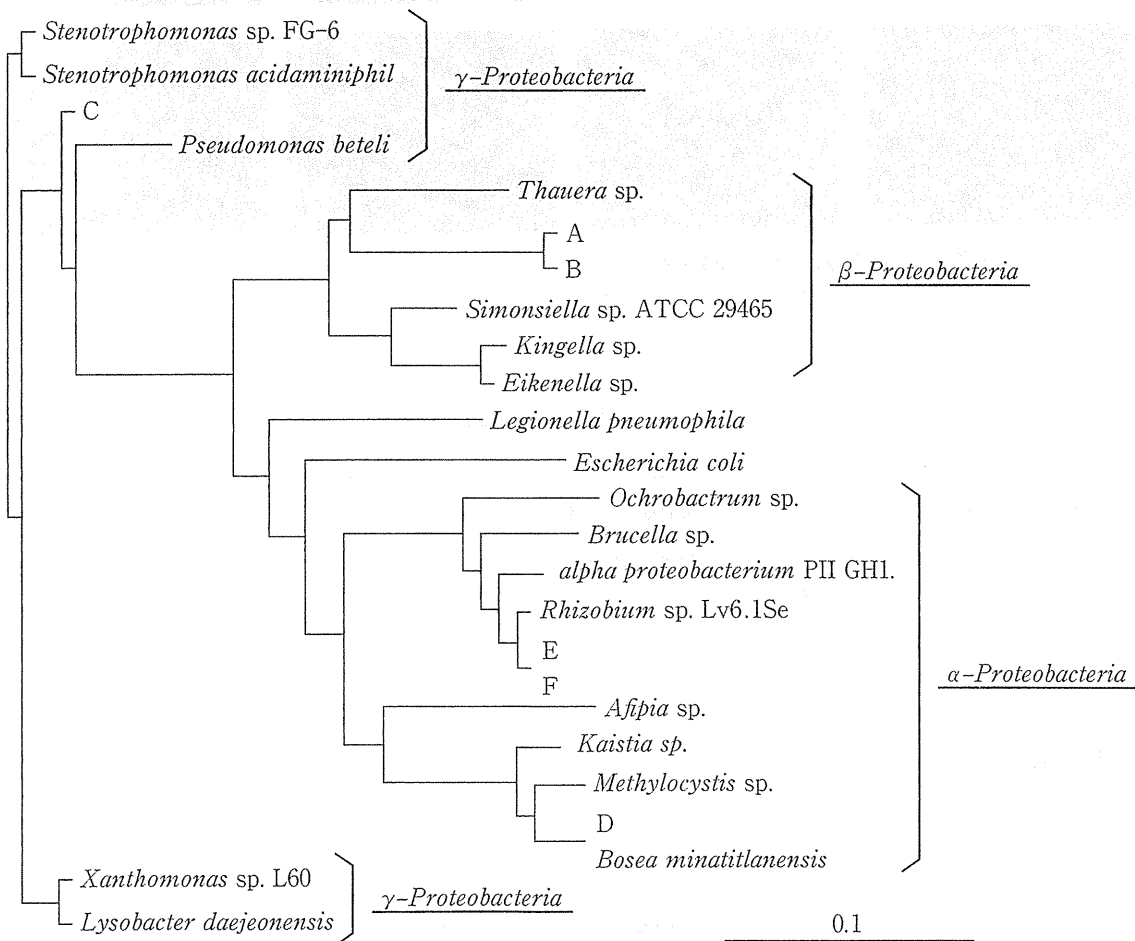


図 20.7 食品工場の処理水再生システムにおける各工程の優占種  
 図中の A ~ F は図 20.6 に示した各バンドに相当している [Baba et al., *Microbes Environ.*, 24: 163, 2009].

さらに、透析液調製システムにおいても同様の解析を行った<sup>22)</sup>。DAPIにより染色した全細菌およびR2A培地を用いて形成させたマイクロコロニーの蛍光顕微鏡写真を図20.8に示した<sup>23)</sup>。原水である水道水中にはマイクロコロニーを形成する細菌は存在しなかったが、活性炭処理により全細菌数およびマイクロコロニー数が急増した。また調製したRO水では減少した細菌数およびマイクロコロニー数が、その貯留により再び増加することがわかった。調製した透析液中には細菌は存在しなかった。

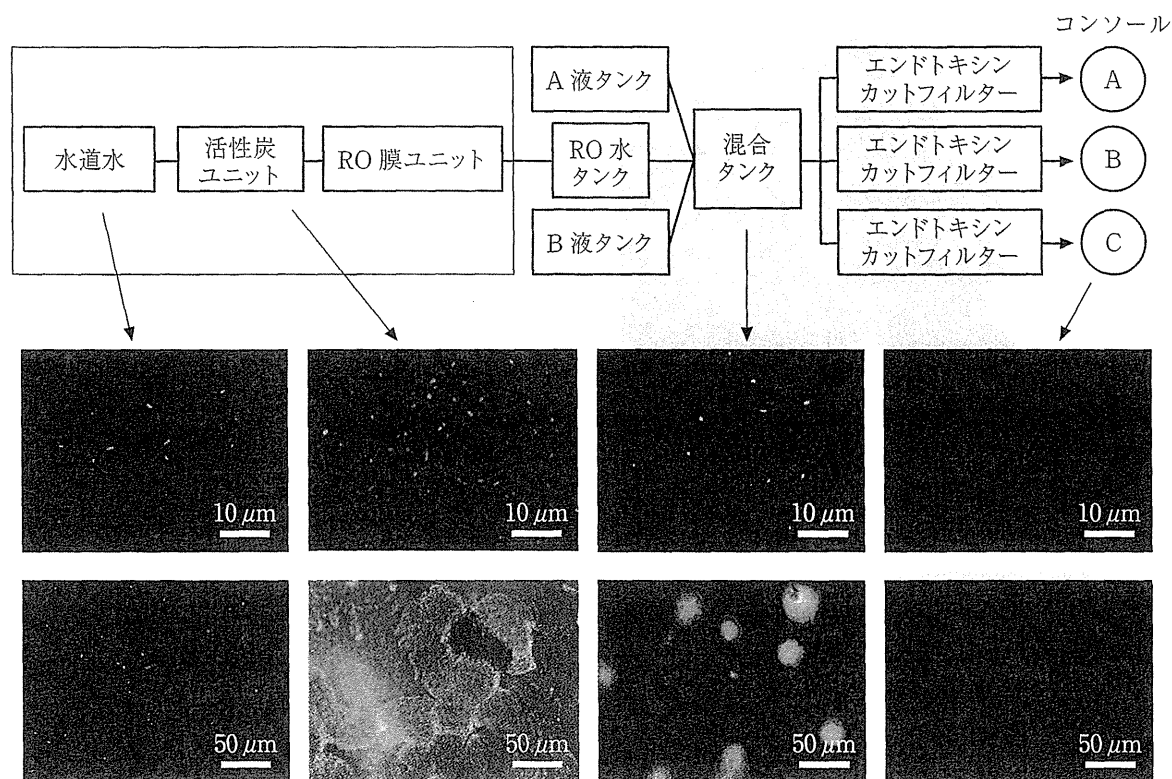


図20.8 透析液調製システムにおける細菌数の変化

上段：DAPIにより染色した全細菌，下段：R2A培地により形成させたマイクロコロニー。

超純水や透析液の製造システムにおける細菌の動態解析では、新手法を用いて高精度な細菌数測定や生理活性評価を行うことが可能である。一方、多くの試料について日常的に検査するには、精確な細菌数測定ではなく、細菌数の変化を把握し、「アラートレベル」、「アクションレベル」等を判定することにより、対処方針を決定することも有用である。今後、異常を判断するためのデータを十分に蓄積することにより、目視によるレベル管理も可能になると考えられる。

### 3. 血小板製剤

新手法は、適切な前処理を行うことにより、血小板製剤のような混濁試料にも応用することができる。血小板製剤は血液凝固機能の維持のために、22℃前後で低速振とうしながら保存される。しかしながら、この保存環境は細菌にとって増殖に適しているため、血小板製剤中に細菌が混入していた場合は、輸血患者に敗血症などの感染症を引き起こす要因となる。

血小板製剤による感染症を防ぐために、細菌汚染検査には一般的に培養法が用いられてい



る。しかしながら、4日間の保存期間中に精確な結果を得ることが難しいため、新手法の適用が望まれている。新手法の1つである蛍光活性染色法を血小板製剤の微生物管理に用いるにあたっては、血小板の大きさが細菌と同等であり、蛍光試薬によって染色されるために細菌との区別が難しいことが課題としてあげられる。

そこで、血小板を選択的に消化するための前処理法を開発することにより、前処理に30分、細菌のろ過と蛍光染色に15分、計数に15分と、1時間以内に血小板製剤中の細菌を検出することが可能となった<sup>24)</sup> (図20.9)。新手法を幅広い分野に普及させるためには、適切な前処理法を検討することが重要である。

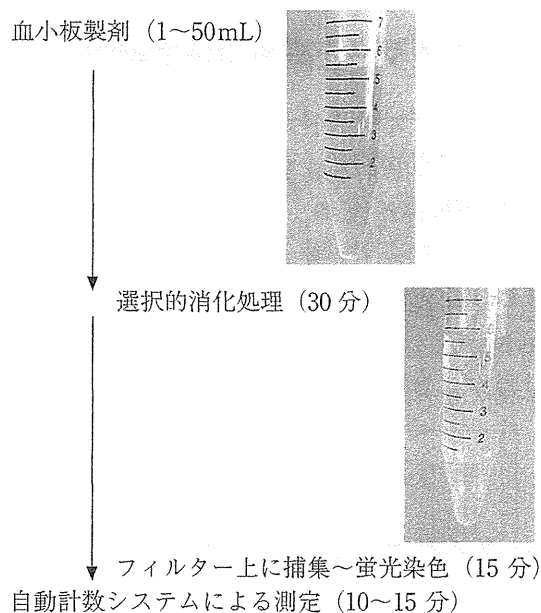


図20.9 血小板製剤中の細菌数迅速測定法の概要と、前処理による血小板の選択的消化  
[Motoyama, et al., *Transfusion*, 48: 2364, 2008]

#### 4. 新手法の課題

当研究室で2005年に新手法の技術研修会を行ったところ、参加者からは「操作は簡単である」、「迅速に結果を得ることができるのですぐにでも使いたい」との意見が寄せられた一方で、「細菌捕集用のポリカーボネート製フィルターが取り扱いにくい」、「蛍光顕微鏡の操作に慣れが必要」との意見もあった。蛍光顕微鏡は後述のフローサイトメーターやレーザースキャニングサイトメーターと比べて、機器本体やメンテナンス費用が安価である。ただし、蛍光顕微鏡を用いて目視により試料を観察するには、熟練者であっても1試料につき20~30分を要する。研究室以外で新手法を日常的に利用するためには、手法のさらなる簡便化と測定自動化が重要であり、また手法のバリデーションが必要である。

## 20-4 手法の簡便化・自動化

### 1. 画像解析

蛍光顕微鏡を用いた微生物計数の省力化と定量性の向上，測定者間に生じる計数誤差の軽減のために，画像解析システムの利用が検討されている<sup>25~27)</sup>。画像撮り込み後は，粒子抽出，菌体と異物の判別，菌数測定までの一連の操作が自動的に行われるため，顕微鏡観察に伴う時間と労力の軽減が可能である。

### 2. レーザースキャニングサイトメーターと細菌数自動測定装置

レーザースキャニングサイトメーターはスライドガラス上やフィルター上に捕集した全ての細胞にレーザー光を走査し，シグナルを検出する装置である。したがって，微生物数の少ない試料であっても定量性の高い計数が可能となる<sup>28)</sup>。しかしながら，本装置は価格が数千万円であるため，普及には至っていない。そこで，より安価な細菌数自動測定装置が国内の数社から販売されている。これらの装置は試料をセットし焦点を合わせた後，画像の撮り込みから計数までの操作を全自動かつ短時間（数分～十数分間）で行うことが可能である<sup>29, 30)</sup>。また微生物の検出のみを目的とし，計数が必要ではない場合は，数十万円の簡易型蛍光画像観察装置が利用可能である。

### 3. フローサイトメーターとマイクロ流路デバイス

フローサイトメトリーは液中を高速で流れる個々の細胞にレーザー光や高圧水銀ランプ光を照射し，得られる散乱光や蛍光を解析する装置である<sup>31, 32)</sup>。しかしながら，高価格であることやメンテナンスが煩雑であることが普及の妨げとなっている。そこで，深さ・幅数十 $\mu\text{m}$ の微小流路を刻んだ数cm四方のマイクロ流路デバイスを用いてフローサイトメトリーを行うOn-chipフローサイトメトリーが有望な手法として期待されている<sup>33~36)</sup>。On-chipフローサイトメトリーの特徴として，①マイクロ流路デバイスがシングルユースである，②通常のフローサイトメトリーに比べて少ない（数十マイクロリットル）試料で解析ができる，③閉鎖系での解析を小型の装置を用いて短時間（1時間以内）でできる，④流路のデザインにより染色等の反応を1枚のデバイス上で行うことができる点があげられる。すなわち，より少ない試料を用いた閉鎖系での解析を迅速にでき，また使用したマイクロ流路デバイスをすぐに滅菌処理できることから，操作時のバイオハザードのリスクを下げる事が可能である。

図20.10に今回作製したマイクロ流路デバイスを示した。このマイクロ流路デバイスを用いて，大腸菌数を測定した結果を図20.10に，飲用水（除菌・殺菌していないナチュラルミネラルウォーターおよび浄水器を通した水道水）中の細菌数測定を行った結果を図20.11に示した<sup>35)</sup>。

デバイスの大きさは5cm×2.5cmであり，シリコン樹脂であるpolydimethylsiloxane (PDMS) で作製した。マイクロ流路の幅は70 $\mu\text{m}$ ，深さは15 $\mu\text{m}$ である。マイクロ流路中を流れる細菌細胞を整列させるために，流れに対して垂直方向に位置するようにマイクロ流路を刻み，ここを流れる液（シース液）を用いてサンプル流を絞る。図20.10のグラフは蛍光染色

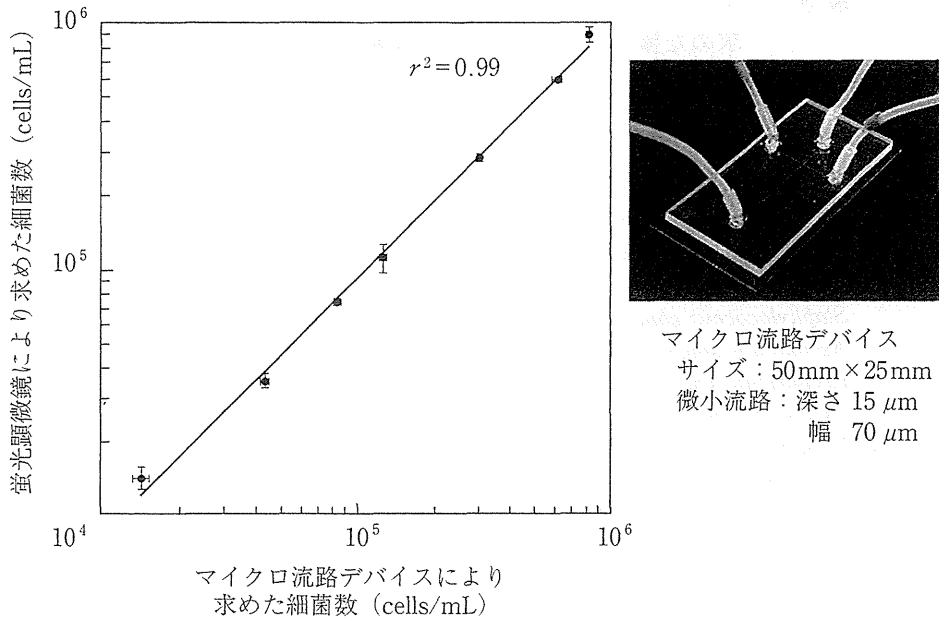


図 20.10 作製したマイクロ流路デバイスと大腸菌数の測定結果  
[Yamaguchi, et al., *J. Microbiol. Methods*, 68: 643, 2007]

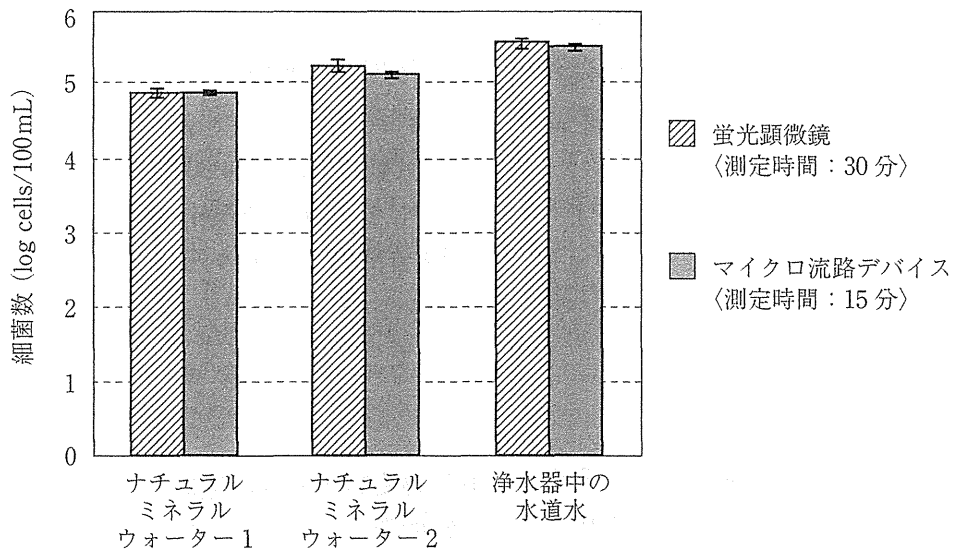


図 20.11 マイクロ流路デバイスおよび蛍光顕微鏡を用いて測定した飲用水中の細菌数  
試料には、除菌・殺菌していないナチュラルミネラルウォーターおよび浄水器を通した水道水を用いた  
[Yamaguchi, et al., *J. Microbiol. Methods*, 68: 643, 2007].

剤 SYBR Green II で染色した大腸菌を On-chip フローサイトメトリーにより検出した結果である。測定精度が蛍光顕微鏡と同等であり、本手法における細菌数の測定範囲が  $10^4$  cells/mL から  $10^6$  cells/mL であることがわかる。また On-chip フローサイトメトリーにより求めた飲用水中の細菌数や測定に要する時間も、蛍光顕微鏡と同等以上であった (図 20.11)。これらの結果は微生物迅速検出における On-chip フローサイトメトリーの可能性を示すものである。

表 20.2 キャピラリー電気泳動装置およびマイクロチップ電気泳動装置で求めた標準菌株の DNA の制限酵素断片長

菌種/制限酵素名	フラグメントサイズ (bp)	
	キャピラリー	マイクロチップ
<i>Alcaligenes faecalis</i> / Hha I	65	72
<i>Pseudomonas fluorescens</i> / Hha I	65	72
<i>Aeromonas sobria</i> / Msp I	66	74
<i>Escherichia coli</i> / Msp I	67	74
<i>Staphylococcus epidermidis</i> / Mbo I	151	155
<i>Aeromonas sobria</i> / Mbo I	222	228
<i>Escherichia coli</i> / Mbo I	222	216
<i>Pseudomonas fluorescens</i> / Msp I	313	313
<i>Escherichia coli</i> / Hha I	347	343
<i>Aeromonas sobria</i> / Hha I	348	350
<i>Alcaligenes faecalis</i> / Msp I	421	452

#### 4. マイクロチップ電気泳動

T-RFLP 法においても、マイクロデバイスの利用が有望である。通常の T-RFLP 解析にはキャピラリー電気泳動装置が使用されるため、結果を得るには1時間以上を要する。ここで、マイクロチップ電気泳動装置を用いることにより、その短縮化が可能となる。表 20.2 は、5種の標準菌株から得られた PCR 産物をそれぞれ3種の制限酵素によって切断することにより得られた DNA 断片を、キャピラリー電気泳動装置およびマイクロチップ電気泳動装置で分析した結果である。分析にあたり、キャピラリー電気泳動装置では約 80 分を要したが、マイクロチップ電気泳動装置を用いることにより 15 分以内に短縮でき、測定値は近似していた。したがって、T-RFLP 解析にマイクロチップ電気泳動装置を用いることにより、細菌群集の迅速かつ簡便なプロファイリングが可能になるものと考えられる。

#### おわりに

以上述べたように、環境微生物学分野、微生物生態学分野の発展とともに、多くの新手法が開発されている。これらの手法の中には、日常的業務に利用され始めているものもあれば、研究段階の萌芽的なものもある。またオンサイトでの自動解析のために、マイクロ流路デバイスを初めとする新たな測定・分析技術の微生物学分野への応用が試みられている。今後、さらなる簡便化（自動化）、低コスト化、そして標準化を目指し、バリデーションのプロトコルを確立することにより、新手法が普及していくものと考えられる。

#### ■ 参考文献

- 1) 大阪大学大学院薬学研究科遺伝情報解析学分野（衛生化学）：環境微生物学実験プロトコル。KEY LAB, 大阪（2006）
- 2) 厚生労働省：遺伝子解析による微生物の迅速同定法。第十五改正日本薬局方，東京，pp.1580-1581（2006）〔<http://jpdn.nihs.go.jp/jp15/>〕