



細菌を迅速、高精度に検出する

那須正夫*

Key Words : bacteria, detection, "new method"

1. 蛍光活性染色

細菌学の基礎が築かれたのは、今から約100数十年前。パスツールやコッホが、今日の殺菌や培養法の基本となるすばらしい業績を残した。

細菌の大きさは約1ミクロン。当時は顕微鏡以外にこのように小さな粒子を扱える手法はなかったことから、まず培養することから始まった。増殖の速い細菌は1時間に数回は分裂することから、数日で一個の細菌を目に見えるほどにまで増やすことができる。一種のクローン技術である。培養法はその後100年をかけて成熟し、微生物に関係する幅広い分野で日常的に用いられ、基盤的な技術として深く浸透している。

しかし1980年ごろになると、環境中に生息する細菌の多くは従来の培養法では増やすことができない、つまりこれまでの方法ではとらえることができないことがわかってきた。そこで環境微生物学分野を中心に、培養に頼ることなく細菌を検出するための新手法開発が重要なテーマとなり、米国、EU、そして日本で次々と新しい方法論が登場している。

なかでも蛍光活性染色法は、目的に応じて蛍光染色剤を使い分けることにより、全菌数をはじめ、酵素活性や呼吸活性なども手軽に測定でき、また遺伝子プローブを用いることにより特定細菌の検出も可能なことからこの数年で急速に普及しつつある。

その結果、生きた細菌はほとんど存在していないと信じられていた水道水はもちろんのこと、医薬品

や食品の製造に用いるイオン交換水にも多くの細菌が生息していることがわかってきた。ただし、このようなデータは、決してそのような水が危険であるということではなく、私たちの周りには従来から報告されているよりもワンオーダー以上多い数の細菌が存在していたのに、われわれがそれを認識できていなかっただけのことである。

環境中には多種多様な細菌が生息し、そのごく一部が病原細菌・危害細菌として積極的に研究され、同時にそのための培養技術も開発された。自然環境中に生息するほとんどの細菌はヒトには無害であるばかりか、物質循環に大きな役割を果たしたり、様々なルートで上位の生態系に直接的・間接的に影響を与えている。そしてこのように生態系の根幹をなす微生物の生態を研究する分野として微生物生態学がある。しかし、すべての細菌を効率よく増殖させる培地がないこと、また栄養分の少ない環境で生息している細菌は目に見えるほどまでには増殖できないものが多いことなどから、環境中の細菌はその現存量さえ、正確にはわかっていなかったのである。

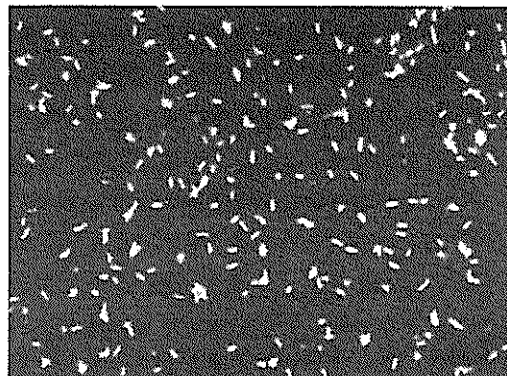


図1 ろ過、滅菌処理していないナチュラルミネラルウォーター中に含まれる細菌の蛍光顕微鏡写真
ナチュラルミネラルウォーターを長年にわたって利用してきたヨーロッパ諸国では、採取した原水を殺菌、ろ過などの処理をいっさい加えることなくそのまま容器詰めすることが常識となっている。

* Masao NASU

1950年9月生

1979年大阪大学大学院・医学研究科・博士課程修了
現在、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)、教授、医学博士、環境微生物学

TEL 06-6879-8170

FAX 06-6879-2074

E-Mail nasu@phs.osaka-u.ac.jp

図2は、医薬品製造に用いている精製水中に存在する細菌数を異なる手法で評価した結果である。横軸は100mlあたりの細菌数で、縦軸は試料採取日である。

全菌数は、核酸と特異的に結合する蛍光染色剤である4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)を用いて測定している。DAPIは紫外線によって励起され、青色蛍光を発するので、この蛍光を蛍光顕微鏡下で観察することで、全菌数を求めることができる。DAPI染色による全菌数測定では死菌も計数してしまうので、呼吸活性を有する細菌の検出には、蛍光染色剤5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC)を用いた。CTCは細菌の呼吸により緑色励起光下で赤色蛍光を発するCTC-formazanに還元される。この赤色蛍光を検出することにより呼吸活性を有する細菌を特異的に計数する。また蛍光染色剤6-carboxyfluorescein diacetate(6CFDA)を用いることにより、細菌に普遍的にかつ多量に存在するエステラーゼを指標として生菌を計数できる。6CFDAは細胞内のエステラーゼにより加水分解されて青色励起光下で緑色蛍光を発する6-carboxyfluorescein

になり細胞内に蓄積される。この緑色蛍光を検出することによりエステラーゼ活性を有する細菌を検出することができる。

分裂・増殖能力を持つ菌数の測定には、一般的に用いられるコロニー計数法に加えて、マイクロコロニー法とDirect Viable Counting(DVC)法を用いた。前者では、コロニー形成の初期段階であるマイクロコロニーを蛍光染色し、蛍光顕微鏡下で観察する。後者は、栄養分である基質および細菌の分裂を阻害するキノロン系抗菌剤を試料に加えてインキュベートすることで増殖能を有する細菌を伸長・肥大させ、それを計数する方法である。

エステラーゼ活性を有する細菌数は全菌数の約50%を占め、呼吸活性を持つ細菌、マイクロコロニー法およびDVC法により求めた増殖能を有する細菌も全菌数に対して0.5~20%の割合で存在した。なお精製水中の細菌は従来から用いられている培地ではほとんどコロニーを形成しないが、ここで用いたR2A培地では少ないながらもコロニーを形成するものがあることがわかる。

このようにほとんど栄養分のない精製水をはじめ、水環境中には現行の培養法では検出できない細菌が多数存在していることがわかり、蛍光活性染色法を用いることにより1時間前後でその現存量はもとより、生理活性などについても知ることができるようになったのである。

2. 種を調べる

医薬品製造原水である精製水中の細菌種を、従来の培養法とPCR-DGGE(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis;変性剤濃度勾配ゲル電気泳動)法により検討した。メンブレンフィルター上に濃縮した細菌から直接DNAを抽出し、PCR-DGGE法で調べ、優占種の16S rDNAに由来するバンドをDGGEゲルから切り出し、その塩基配列を決定したところ、精製水中の優占種はプロテオバクテリアのαサブクラスに属する細菌であり、既知の病原細菌の16S rDNAと相同性はないことがわかった(図3 Band 1)。また精製水中のこの細菌を蛍光活性染色し、フローサイトメータなどで解析したところ、生理活性を有していることが確認できた。一方、フィルター上に集めた細菌を通常の微生物管理に用いられているR2A培地、Soybean casein digest(SCD)寒天培地、およびSCD液体培地上で培養し、コロニーを形成

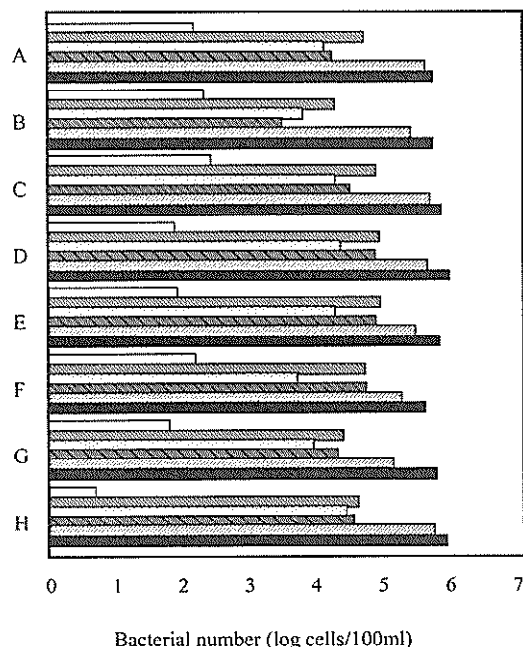


図2 医薬品製造用水中の細菌数.

- コロニー形成細菌
- ▨ DVC法による増殖能を有する細菌
- ⋯ マイクロコロニー形成細菌
- ▩ 呼吸活性を有する細菌
- ▨ エステラーゼ活性を有する細菌
- 全細菌

A~Hは採水日時の異なる試料であることを示す。

させ、DNA抽出後、同様にPCR-DGGE法により解析した結果、R2A培地、SCD寒天培地、SCD液体培地ではこの優占種の細菌を検出できなかった。この結果から、精製水中に存在する優占種の細菌は生理活性を有しているものの、通常用いられている培地および培養条件では検出できない細菌であることがわかった。

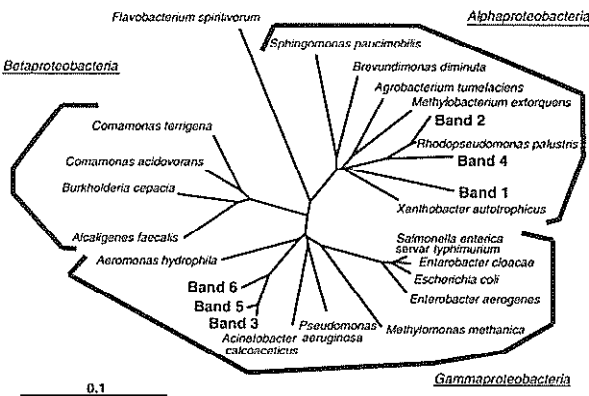


図3 精製水中に存在する優占種の系統分類
 Band 1 : 優占種の細菌
 Band 2~4 : R2A 培地上で検出された細菌
 Band 5 : SCDA 培地上で検出された細菌
 Band 6 : SCDB 培地上で検出された細菌

培養法による現行の微生物管理では、真の優先種を知ることができないのである。優占種の細菌は報告されている病原細菌と相同性はなかったが、医薬品の品質管理上、培養困難な細菌のもつ酵素により製品が分解される、あるいはこれらの細菌由来の菌体成分そのものによって製品品質の劣化を招いてしまう危険性がある。また細菌の検出技術の進展とともに、飲料水など厳格に微生物管理された水であっても、そこには生理活性を有する細菌が多数存在することが明らかとなってきている。今後は現行の微生物管理手法および管理基準を見直すとともに、新手法の実験プロトコルを一般化し、公定法を補完する手法として現場においても日常的に用いられるよう整備する必要がある。

3. 細菌と遺伝子を検出する

特定の細菌を簡便に検出するための方法として、16SrRNAの種特異的な配列をプローブとする蛍光 in situハイブリダイゼーション (fluorescence in situ hybridization ; FISH)法が普及しつつある。しかし、細胞内の遺伝子のコピー数が少ない場合には、FISH法では検出感度が不十分となることがある。

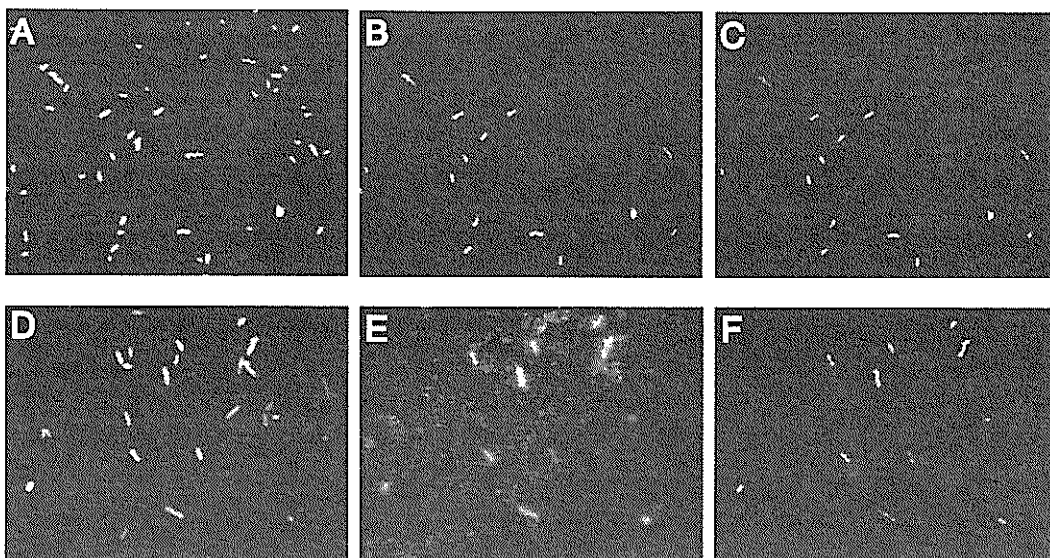


図4 In situ PCR法および in situ LAMP法による大腸菌O157の検出。
 試料 : *Escherichia coli* O157 : H7と *Escherichia coli* K-12の混合試料。
 各菌に対しベロ毒素に特異的なプライマーを用いて in situ LAMP(A, B, C)または in situ PCR反応(D, E, F)を行った後、FITC標識抗 *E. coli* O157 : H7抗体およびDAPIにより対比染色した。A~CおよびD~Fは同一視野を励起光を変えて撮影した。
 A, D : 紫外線励起。全ての細菌がDAPI由来の蛍光を発している。
 B, E : 青色励起光下。大腸菌O157のみがFITC標識抗体由来の蛍光を発するが、in situ PCRを行った試料ではバックグラウンドが高い(E)。
 C, F : in situ LAMP(C)および in situ PCR(F)の結果。緑色励起光下、ベロ毒素遺伝子を保有する大腸菌O157のみが蛍光を発している。

そのような場合には、標的遺伝子を細胞内で増幅する *in situ* PCR法が有効だが、細菌検出への適用は未だ世界的にも途上の技術である。本方法の問題点として、検出対象とする菌種により前処理条件が異なることが挙げられる。すなわち、多種多様な細菌種によって構成されている細菌群集に対して一定の条件で前処理を行った場合、処理が不十分な菌種ではDNAポリメラーゼが菌体内に入りにくいいためPCRが起こらず、一方処理が過剰な菌種ではPCR産物が細胞外へ漏出しバックグラウンドが高くなり、検出精度が低くなる。またPCRにおける加熱・冷却のサイクルにより細胞が変形し、一部の菌では溶菌することもある。そこでLAMP(Loop-Mediated Isothermal Amplification)法を用いて細胞内で遺伝子増幅を行う *in situ* LAMP法を検討した。LAMP法は、①使用するDNAポリメラーゼの分子量がPCRで使用するDNAポリメラーゼよりも小さく、前処理を標準化しやすい、②増幅産物の分子量が大きく、細胞外へ漏出しにくい、③等温反応であるため菌体が損傷を受けにくいなどの特長をもつ。

In situ LAMP法ならびに *in situ* PCR法による菌体内のペロ毒素遺伝子の検出結果を図4に示した。大腸菌O157および大腸菌K-12の混合試料に対し、*in situ* LAMP(図4-A,B,C)および *in situ* PCR(図4-D,E,F)により、菌体内のペロ毒素遺伝子を増幅した。さらにFITC標識抗大腸菌O157抗体で染色後、DAPIにより対比染色を行い、蛍光顕微鏡下で観察した。紫外線励起下では全ての細菌が蛍光を発している(図4-A,D)のに対し、緑色励起光下ではペロ毒素遺伝子を保有する大腸菌O157のみが蛍光を発している(図4-C,F)。また *In situ* PCR法では反応中に菌体が損傷を受け、抗大腸菌O157蛍光抗体と反応しにくくなっている(図4-E)のに対し、*in situ* LAMP法では蛍光抗体の併用が可能であった(図4-B)。

細胞内で特定の遺伝子を増幅する本手法は、通常のFISH法では検出できない微生物をもシングルセルレベルで検出できることから、今後の発展が期待されている。

以上紹介した方法は標準株ではすでにプロトコールが確立しつつあり、また水環境中の微生物群集構造解析に応用が進められている。今後、目的に応じて最適化することにより、微生物モニタリングの広い分野に普及していくものと考えている。しかし、

このような方法を社会に定着させるためには、その迅速化・省力化、さらには自動化が重要である。

そこで特別な練習なしに蛍光顕微鏡観察ができるよう、各粒子の色情報をもとに細菌と夾雑物を区別し計数する画像解析モジュール「BACS (Bacteria auto-counting system)」やマルチカラー解析を行なうためのBACS IIを作成した。また操作性の向上と自動化を目的に、試料をステージにセットした後は、焦点合わせやステージの移動、画像の取り込み、計数を全自動で行なえる簡易蛍光顕微鏡システムを企業と共同で開発している。

環境中の細菌のうち培養法でとらえることのできるものは、多くても20~30%。普通は1%未満である。また環境中では細菌間の遺伝子伝達があることより、培養にたよらない新検出法は「細菌」と「遺伝子」の環境内動態解析研究、さらには遺伝子生態学研究に必須のツールとして広まりつつある。

謝 辞

本稿を作成するにあたりご協力いただいた大阪大学大学院薬学研究科、谷佳津治 講師、山口進康 助手、見坂 武彦 研究員、大日本製薬株式会社、川井真好さんに深謝いたします。

参 考 文 献

- Yamagichi, N., Kenzaka, T. and Nasu, M. (1997): Rapid *in situ* enumeration of physiologically active bacteria in river waters using fluorescent probes. *Microb. and Environ.*, 12, 1-8.
- 谷佳津治, 山口進康, 那須正夫(1997): 蛍光染色によるシングルセルレベルでの細菌検出. 衛生化学, 43, 145-154.
- Yamaguchi, N. and Nasu, M. (1997): Flow cytometric analysis of bacterial respiratory and enzymatic activity in the natural aquatic environment. *J. Appl. Microbiol.*, 83: 43-52.
- Kenzaka, T., Yamaguchi, N., Tani, K. and Nasu, M. (1998): rRNA-targeted fluorescent *in situ* hybridization analysis of bacterial community structure in river water. *Microbiology*, 144: 2085-2093.
- Kawai, M., Yamaguchi, N. and Nasu, M. (1999): Rapid enumeration of physiologically active bacteria in purified water used in the pharmaceuti-

cal manufacturing process. *J. Appl. Microbiol.*, 86, 496-504.

Iwamoto, T., Tani, K., Nakamura, K., Suzuki, Y., Kitagawa M., Eguchi, M. and Nasu, M. (2000): Monitoring impact of in situ biostimulation treatment on groundwater bacterial community by DGGE. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 32, 129-141.

Yokomaku, D., Yamaguchi, N. and Nasu, M. (2000): Improved direct viable count procedure for quantitative estimation of bacterial viability in freshwater environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 5544-5548.

Tanaka, Y., Yamaguchi, N. and Nasu, M. (2000): Viability of *Escherichia coli* O157:H7 in natural river water determined by the use of flow cytometry. *J. Appl. Microbiol.*, 88: 228-236.

Kenzaka, T., Yamaguchi, N., Prapagdee, B., Mikami, E. and Nasu, M. (2001): Bacterial community composition and activity in urban rivers in Thailand and Malaysia. *J. Health Sci.*, 47: 353-361.

Kawai, M., Matsutera, E., Kanda, H., Yamaguchi, N., Tani, K. and Nasu, M. (2002): 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.

Tani, K., Muneta, M., Nakamura, K., Shibuya, K. and Nasu, M. (2002): Monitoring of *Ralstonia eutropha* KT1 in groundwater in an experimental bioaugmentation field by in situ PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 412-416.

Maruyama, F., Kenzaka, T., Yamaguchi, N., Tani, K. and Nasu, M.: Detection of bacteria carrying the stx2 gene by in situ loop-mediated isothermal amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*, in press

Ogawa, M., Tani, K., Yamaguchi, N. and Nasu, M.: Development of multicolor digital image analysis system to enumerate actively respiring bacteria in natural river water. *J. Appl. Microbiol.*, in press.

Yamaguchi, N., Sasada, M., Yamanaka, M. and Nasu, M.: Rapid detection of respiring *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice, milk and ground beef by flow cytometry. *Cytometry*, in press.

