蛍光染色による細菌の可視化と迅速・高精度検出

山口 進 康・那 須 正 夫

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）
〒565-0871 吹田市山田丘 1-6

[受理: 2006 年 1 月]

細菌を蛍光色素で染色し、蛍光顕微鏡等を用いて直接観察することにより、その検出や生理活性の評価、属種の区別を個体レベルで数分から 1 日以内に行うことができる。また細菌の遺伝子を標的とすることにより、培養することなく特異的な検出や細菌群集構造解析が可能となる。これらの手法は培養を基本とする従来法と比較して短時間のうちに結果を得ることができるため、培養法のもつ課題を解決するものとしてその応用が期待されている。本稿では蛍光染色法、蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法、細胞内での遺伝子増幅法など、細菌を可視化し迅速・高精度に検出する手法について概説する。さらに計数の簡便化・自動化のための取り組みについて紹介する。

1. はじめに

微生物は約 38 億年前に最古の生命体として登場し、生物圏における炭素、窒素、硫黄など様々な物質の循環に中心的な役割を担うことにより、地球環境の創成、またその恒常性の維持に大きく寄与してきた。と同時に人類の歴史は病原微生物との戦いの歴史でもあった。

人類にとって微生物は非常に近い関係にあるにもかかわらず、科学的な研究が始まったのはほんの百数十年前である。19 世紀になり細菌の存在がはっきりと認識されるとともに細菌学は急速な進歩を遂げ、Koch による炭疽菌の確定、さらに“Koch の三原則”が提案され、それ以降数多くの病原細菌が発見されてきた。そして細菌学の進歩を支えたのが純培養法の確立である。この純培養法をもとにした細菌学の発展は、医学、薬学のみならず生物学、農学、発酵工学等の幅広い分野における微生物学の発展に大きく貢献していった。

しかしながら 1970 年代末、細菌を蛍光色素で標識し、蛍光顕微鏡下で直接観察する全菌数直接計測法が開発されて以来、我々の身の周りには通常の培養方法では検出の困難な微生物が数多く存在していることが明らかになってきた。例えば河川水中の 90% 以上の細菌は、一般的な培地ではコロニーを形成しない。したがって、これらの細菌は場

合によっては「存在しない」ものとして扱われてきた。しかしながら、これらの培養困難な細菌の多くは生理活性を有し、感染性や毒素産生能力を有しているものもあることが次第に明らかになってきている。また通常は容易に培養できる細菌も飢餓等による生理状態の変化により、培養が難しくなることが報告されている (30)。すなわち純培養法を基礎とする細菌学はほぼ成熟したように見えたが、自然環境中の細菌を対象とするにあたって新たな視点に立つ新手法が必要となった。

そこで、培養に依存しない微生物の現存量測定法、生理活性評価法、同定法や群集構造解析法が積極的に検討され、その一部は環境微生物学分野を中心に急速に普及しつつある。これらの手法には大きく分けて、細胞レベルで行うものと群集レベルで行うものがあり、培養に依存した方法に比べて、より迅速かつ精度の高い微生物の検出や属種の同定が可能となる。ここでは、細菌を可視化し迅速・高精度に検出するための新手法の原理を説明するとともに、それらの手法を用いた研究の現状について概説する。

2. 微生物の現存量測定法

微生物を培養することなく迅速・簡便に計数するには、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。

微生物を蛍光染色法により検出する利点としては、①操作が容易である、②核酸やタンパク質など目的に応じて様々な細胞内成分を標的にできることが挙げられる。本方法は通常、試料に蛍光染色剤を添加するのみであり、染色

時間は数分から 30 分である。したがって、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、非常に短時間のうちに微生物数を測定することができる。

表 1 に細菌の検出によく用いられている蛍光染色剤とその特性を示した。タンパク質や核酸など、様々な細胞内成分あるいは代謝反応を指標にでき、また励起波長・蛍光波長の異なる染色剤を併用することにより、後述のように試料中に存在する「生きている特定属種の細菌」のみを特異的に染め分けることもできる。ただし、蛍光染色剤はその性質上、変異原性や細胞毒性をもつものが多いので、その取り扱いには注意が必要である。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 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色可能な試薬がある一方、後述の FDA (fluorescein diacetate) など菌種によって染色性の低下するものもある。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しなければならない。

3. 生きている細菌の検出・定量

細菌を検出するにあたっては、その数のみではなく生理状態、すなわち生死の判別が重要となることが多い。ここでは「生きている」細菌（生菌）を細胞レベルで検出・定量するための手法について述べる。

1) 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 (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride)

表 1. 細菌の検出に用いられる主な蛍光染色剤

蛍光染色剤	励起波長 (nm)	蛍光波長 (nm)	染色対象	主な用途
Fluorescein-isothiocyanate (FITC)	494	518	タンパク質 (α-アミノ基)	細胞内タンパク質の定量, 蛍光抗体の標識
Rhodamine 123	505	533	細胞膜	細胞膜の活性の評価
Acridine orange	460/500	526/650	一本鎖・二本鎖核酸	核酸の染色, RNA/DNA 比の測定
Chromomycin A3	450	570	G-C 領域	DNA の定量, GC 含量の測定
Mithramycin	395	570	G-C 領域	DNA の定量, GC 含量の測定
4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	359	461	A-T 領域	DNA の定量, 全菌数測定
Hoechst 33258	352	461	A-T 領域	DNA の定量, 全菌数測定
Hoechst 33342	350	461	A-T 領域	DNA の定量, 全菌数測定
Ethidium bromide	518	605	二本鎖核酸	DNA の定量, 死細胞の検出
Propidium iodide	535	617	二本鎖核酸	DNA の定量, 死細胞の検出
Ethidium homodimer	518	605	二本鎖核酸	DNA の定量, 死細胞の検出
SYTOX Green	502	523	DNA	DNA の定量, 死細胞の検出
POPO-1	434	456	DNA	DNA の定量, 全菌数測定
BOBO-1	462	481	DNA	DNA の定量, 全菌数測定
YOYO-1	491	509	DNA	DNA の定量, 全菌数測定
TOTO-1	514	533	DNA	DNA の定量, 全菌数測定
TO-PRO-1	515	531	二本鎖核酸	死細胞の検出
TO-PRO-3	642	661	二本鎖核酸	死細胞の検出
SYTO 61	628	645	DNA, RNA	全菌数測定
SYBR Green I	290, 497	520	二本鎖核酸	全菌数測定, ウイルスの計数
SYBR Green II	254, 497	520	RNA	全菌数測定
SYBR Gold	300, 495	537	一本鎖・二本鎖核酸	全菌数測定, ウイルスの計数
Carboxyfluorescein diacetate (CFDA)	495	520	esterase により加水 分解される	生細胞の検出
Fluorescein diacetate (FDA)	495	520	esterase により加水 分解される	生細胞の検出
Carboxyfluorescein diacetate-acetoxymethylester (CFDA-AM)	495	520	esterase により加水 分解される	生細胞の検出
Calcein-AM	490	515	esterase により加水 分解される	生細胞の検出
5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC)	450	630	呼吸にともない還元 される	生細胞の検出
Tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC)	542	572		FISH 用プローブの標識
Texas Red	596	615		FISH 用プローブの標識
Cy3	550	565		FISH 用プローブの標識
Cy5	650	670		FISH 用プローブの標識
2-hydroxy-3-naphtic acid-2'-phenylanilide phosphate (HNPP)	350/550	562		FISH 用プローブの標識
5(6)-carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimide-ester (FLUOS)	494	518		FISH 用プローブの標識
5(6)-carboxytetramethyl-rhodamine-N-hydroxy- succinimide-ester (CT)	546	576		FISH 用プローブの標識
Alexa 488	495	519		蛍光抗体・PCR 産物の標識
Alexa 546	556	575		蛍光抗体・PCR 産物の標識

などの蛍光性テトラゾリウム塩や FDA (fluorescein diacetate) 系試薬が用いられる。

CTC は細胞の呼吸により蛍光性の結晶物に還元されるため、呼吸している細菌は CTC 染色後に青色または緑色の励起光を照射すると赤色の蛍光を発する。生きている細菌を 1, 2 時間以内で簡便に検出できることから、水環境中の細菌の検出に広く用いられている (26, 40)。また XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) は細胞の呼吸により水溶性の蛍光物質を生じるので、蛍光顕微鏡を使うことなく蛍光分光光度計により、呼吸している細菌の存在を確認できる (27)。

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、エステラーゼ活性をもつ微生物を FDA により染色し青色励起光を照射すると緑色の蛍光を発する。なお FDA はグラム陰性菌に対する染色性が低いため、6CFDA (6-carboxyfluorescein diacetate) (40) や SFDA (5- (and 6-) sulfofluorescein diacetate) (36) が開発され、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 (40) や地下水 (20)、医薬品製造用水 (6)、病院内の手洗い用水 (22)、さらにコショウ (35) や生薬 (21) 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。図 1 はナチュラルミネラルウォーター中の細菌を 6CFDA と DAPI で二重染色し、蛍光顕微鏡下で観察した結果である。紫外線励起光下ではすべての細菌が DAPI 由来の蛍光を発するのに対し (図 1A)、青色励起光下ではエステラーゼ活性をもつ細菌のみが蛍光を発する (図 1B)。したがって、同一視野の両画像を比較することにより、個々の細菌のもつ生理活性を評価できる。さらに、死細胞のみを染める propidium iodide と 6CFDA を併用することにより、生菌と死菌を染め分けることも可能である (41)。

2) DVC (Direct viable count) 法

DVC 法は、試料に培地成分と細胞分裂阻害作用をもつ抗菌剤 (ナリジクス酸など) を添加し短時間反応させる方法で、タンパク質合成を行う細菌は抗菌剤によって細胞分裂

が阻害されるため伸長・肥大する。この伸長・肥大した細菌数を蛍光染色後、蛍光顕微鏡下で計測する (11) (図 2A)。細菌の生死を評価する上でタンパク質合成能は大きな指標となるため、環境微生物学分野で用いられている。特に後述の FISH 法と組み合わせることによって、特定属種の微生物の生理状態を評価できる (8)。しかし、抗菌剤に耐性をもつ細菌は伸長・肥大化を起こすことなく細胞分裂をしてしまうため、DVC 法ではそのような細菌を増殖していないと判断してしまう。そこで Joux らは複数の抗菌剤を組み合わせた改良法を報告している (5)。またサイズの異なる細菌が混在する試料では、細胞の伸長・肥大を客観的に判別することが難しくなる。そこで当研究室では、増殖能力をもつ細菌を選択的に溶菌させることにより生きている細菌数を測定する qDVC 法を開発している (45) (図 2B)。従来の DVC 法においては観察者の主観により生菌・死菌の判別がされていたが、qDVC 法ではタンパク質合成能をもつ細菌を客観的に計数可能である。

3) マイクロコロニー法

マイクロコロニー法は、直径 10 ~ 100 μm 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 (図 3)。肉眼で確認できるサイズのコロニーを形成するまでに長時間を要する細菌に対して、本方法を用いることにより迅速な計数が可能となる。また増殖にともなう栄養源の減少や周囲に存在する細菌が産生する物質による増殖阻害により、目視検出可能なサイズのコロニーを形成しにくくなることもある。マイクロコロニー法ではこのような細菌も検出可能であるため、平板培養法と同じ培地を用いた場合に、得られる計数値は高くなる傾向にある (6)。また単細胞を染色する蛍光活性染色法に比べてマイクロコロニー法では強い蛍光が得られるために検出が容易であり、細菌と同サイズの蛍光性夾雑物が存在する場合でも区別しやすい。なおマイクロコロニーの計数にあたっては、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) を検出することも可能である。

図 1. CFDA-DAPI 二重染色法によるナチュラルミネラルウォーター中の細菌の検出

(A) と (B) は蛍光顕微鏡の同一視野を励起光を変えて観察した結果。

(A) 紫外線励起光下での観察結果。すべての細菌が DNA 結合性蛍光染色剤である DAPI 由来の蛍光を発している。

(B) 青色励起光下での観察結果。エステラーゼ活性をもつ細菌のみが蛍光染色剤 CFDA 由来の蛍光を発している。

図 2. Direct viable count (DVC) 法および qDVC 法の原理

- (A) DVC 法：試料にキノロン系抗菌剤と酵母エキスを添加し、数時間静置する。タンパク質合成能をもつ細菌は細胞分裂が阻害されるために伸長・肥大するので、生理活性をもたない細菌と区別できる。
- (B) qDVC 法：試料にキノロン系抗菌剤と酵母エキス、グリシンを添加し、数時間静置する。増殖能をもつ細菌はグリシンを取り込むことにより細胞壁が壊れやすくなる。そこで凍結融解処理などにより増殖能をもつ細菌を選択的に壊し、元の菌数と比較することにより、生きている細菌数を算出する。

図 3. マイクロコロニー法の原理

フィルター上に捕集した細菌を培地上で数時間～1日静置し、直径 10～100 μm のマイクロコロニーを形成させる。マイクロコロニーを蛍光染色後、蛍光顕微鏡等で観察・計数する。

4. 特定の微生物の検出・定量

細胞表面の抗原や細胞内の遺伝子を指標として、培養することなく特定の微生物を検出するための方法も積極的に研究されている。

1) 蛍光抗体法

蛍光染色剤で標識した抗体（蛍光抗体）を試料中の微生物と反応させた後、抗体由来の蛍光を検出することによって、対象とする微生物を直接検出する方法である。本方法は操作が簡便であり、1, 2 時間での迅速な検出が可能であ

図4. マルチカラー FISH による大腸菌, *Alcaligenes*, ブドウ球菌の同時検出

大腸菌および *Alcaligenes* の各々に特異的なプローブを異なる蛍光色素で標識し, 3 種の菌の混合試料に対して FISH を行った後に, DNA 結合性の蛍光染色剤 DAPI で対比染色をした。大腸菌は赤色, *Alcaligenes* は緑色, いずれのプローブともハイブリダイズしなかったブドウ球菌は青色の蛍光を発している。

るために危害微生物の検出によく用いられている (32)。また蛍光抗体法と先述の 6CFDA 染色法, CTC 染色法や DVC 法を併用することによって, 検出対象とする細菌の生理状態を明らかにすることが可能である (31, 44)。

2) 蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (Fluorescence in situ hybridization; FISH) 法

リボソーム RNA (rRNA) は, 細胞内でタンパク質を合成するリボソームを構成する RNA である。rRNA 上にはすべての生物に共通な配列, すべての細菌に共通な配列と, 細菌の属や種に特異的な配列が存在している。FISH 法は検出対象とする細菌がもつ特異的な rRNA 配列に相補的な

配列 (プローブ) を蛍光標識し, 菌体内の 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細菌を細胞レベルで検出する方法である (1, 4)。本方法の概略は以下の通りである。まず試料中の細菌を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 (19)。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が特徴である。

FISH 法を用いた特定属種の細菌の検出においては, 特異性の高いプローブの使用が重要である。多くの研究者が対象とする細菌に適したプローブを設計し報告しており, そのデータベースとして probeBase (<http://www.microbial-ecology.de/probebase/>) が無料で利用できる。

FISH 法では, 蛍光強度は菌体内の rRNA 量に依存する。対数増殖期などの生理活性の高い状態にある細菌では rRNA は数千コピー存在するため, FISH 法により容易に検出できる。しかしながら, 環境中の細菌の多くは生理活性の低い状態にあることから rRNA 含量が低く, またサイズが小さいことから通常の方法では蛍光の認識が困難である場合がある。そこで, ①微弱な蛍光を検出できる高感度な CCD カメラの利用, ② Cy3 などのより蛍光強度の高い色素を用いたプローブの標識により, 検出感度の向上が図られている。また, Lebaron (14) や Schonhuber (29) らは酵素反応を用いた蛍光増強法 (Catalyzed reporter deposition [CARD]-FISH 法) を報告している。

FISH 法を用いて複数種の細菌を検出するにあたっては, 試料を一旦分けた後, 各々のサブサンプルに対して異なる

図5. in situ PCR 法の原理

細胞壁の透過性を上げる処理を行った後, 菌体内で PCR を行う。菌体内で増幅した標的 DNA を蛍光標識することにより, 特定の遺伝子をもつ微生物の高精度な検出を行う。

プローブを1種類ずつ用いて FISH を行い、得られた結果を併せて考察することが多い。ここでプローブの配列と FISH の条件を検討することにより、一つの試料に対して複数の蛍光プローブを同時に使用するマルチカラー FISH が可能である (図 4)。すなわち異なるプローブのハイブリダイゼーション条件が同じになるように、用いるバッファーの塩濃度やハイブリダイズの温度を最適化する。

FISH法の検出対象であるrRNAはタンパク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属種の細菌」を検出するための FISH 法も検討されている。生理活性をもつ細菌を細胞レベルで検出する方法として、①放射性同位元素で標識した基質を取り込んだ細菌をオートラジオグラフィーで検出するマイクロオートラジオグラフィー法、②増殖能をもつ細菌のみを伸長・肥大化させる DVC 法 (11)、③増殖能をもつ細菌をコロニー形成の初期段階で検出するマイクロコロニー法、④生理活性を有する細菌を特異的に染色する蛍光活性染色法 (40) 等が用いられている。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。Lee らはマイクロオートラジオグラフィー法と FISH 法を組み合わせた方法 (FISH-MAR) を報告している (15)。また、DVC 処理をし

た菌体に対して FISH を行う DVC-FISH 法 (8) や、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 (10) により増殖能をもつ細菌のモニタリングが可能である。CTC は細菌の呼吸により還元され、赤色蛍光性の結晶である CTC-formazan に菌体内で変化する。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、呼吸能をもつ特定属種の細菌を検出できる (9)。

3) 細胞内での遺伝子増幅法

FISH法は微生物細胞内のrRNA上の特定の配列を特異的に蛍光標識し、検出する技術である。その蛍光強度は標的とする rRNA の量に比例するため、細胞内に数コピーしか存在しない遺伝子を標的とする場合は、検出に十分な蛍光を得ることが困難となる。そこでこのような細胞内にわずかしかいない遺伝子を標的に特定の細菌を細胞レベルで検出する方法として、細胞内で特定の DNA 配列を増幅する in situ PCR 法 (12, 13, 33, 34) がある。

In situ PCR法の原理を図5に示した。本方法においては菌体内に DNA 合成酵素 (DNA ポリメラーゼ) が入り、かつ PCR により増幅された DNA (PCR 産物) が細胞外に漏れ出さないように試料を前処理する必要がある。そのためにはリゾチームやタンパク質分解酵素などが用いられる。標的とする細菌の検出には菌体内に蓄積されたPCR産物に対して FISH を行う、あるいは PCR 中に増幅産物を直接蛍光標識する方法が用いられる。前者では増幅産物に対するハイブリダイゼーションを行うために操作が増えるが、バックグラウンドが低くなり、検出がしやすくなる。

図 6. In situ PCR 法および in situ LAMP 法による大腸菌 O157 の特異的検出 (参考文献 17 より抜粋)
大腸菌 O157 および大腸菌 K-12 の混合試料に対し、in situ LAMP (A, B, C) および in situ PCR (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った。A ~ C および D ~ F は蛍光顕微鏡の同一視野を励起光を変えて撮影。紫外線励起下では全ての菌が蛍光を発している (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 (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 (E) のに対し、in situ LAMP 法では蛍光抗体の併用が可能である (B)。

図7. CPRINS-FISH法の原理

通常のPCRとは異なり、1種のプライマーのみを用いて、細胞内で増幅反応を行う。細胞内の増幅産物（長い一本鎖DNA）に蛍光標識したポリヌクレオチドプローブをハイブリダイズさせ、検出する。

In situ PCR法は、標的とするrRNAや遺伝子のコピー数が少ない細菌を検出するために用いられる。しかしながら、検出対象とする菌種に応じて前処理条件を最適化する必要があるため、複数の属種の細菌が混在する試料に対しては検出精度が低下する。すなわち、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ために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することによりバックグラウンドが高くなり、検出精度が低くなる。この課題の解決のためには、増幅産物の分子量が大きく細胞外へ漏出しにくい遺伝子増幅反応を、細胞内で行うことが有効である。

そこで当研究室では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法を開発している(図6)(17)。In situ LAMP法の特徴として、等温反応であるために反応中に細胞が壊れにくく、蛍光抗体の併用により特異性の高い検出が可能となることが挙げられる。本方法の課題としては、対象とする配列によっては特異的なプライマーの設計が困難な場合があることが挙げられる。

細胞内に生じた増幅産物をハイブリダイゼーションにより特異的かつ簡便な操作で検出するためには、増幅産物が二本鎖DNAではなく一本鎖DNAであることが望ましい。そこで当研究室では、より高精度に標的細菌を検出できる方法として、cycle primed in situ amplification—fluorescent in situ hybridization (CPRINS-FISH) 法(7)(図7)およびin situ rolling circle amplification (in situ RCA) 法(18)(図8)を開

発し、アンピシリン耐性遺伝子をもつ河川水中の細菌の検出に用いている。CPRINS-FISH法は約半日で結果を得ることができ、他の細胞内遺伝子増幅法に比べて操作が簡便である。In situ RCA法は操作過程が多いが、より精度が高いために擬陽性が生じにくく、また蛍光抗体の併用が可能である。

細胞内で特定の遺伝子を増幅する方法は、通常のFISH法では検出できない細菌をも細胞レベルで検出できる方法として有用であり、今後の発展が期待される技術である。

5. 省力化・自動化

これまでに述べた手法を普及させ活用するためには、その標準化と省力化、さらには自動化が重要である。

蛍光染色を行った試料の観察には蛍光顕微鏡が一般的に用いられる。蛍光顕微鏡は操作が比較的容易であり、後述のレーザー顕微鏡やフローサイトメーターと比べて、機器本体、メンテナンス費用が安価である。しかしながら、蛍光顕微鏡を用いて目視により試料を観察するには、熟練者であっても一試料につき15～30分を要し、研究室以外での日常的な利用には限界がある。したがって、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。当研究室では低倍率で画像を撮り込み、各粒子の色情報をもとに微生物細胞と夾雑物を区別し計数する画像解析ソフトウェア「BACS (Bacteria auto-counting system)」を作成している(23, 24, 39)。顕微鏡画像の取得には一般的には100倍の対物レンズが使用されるが、BACSでは40倍の対物レンズを使用するため、一視野あたりの細胞数が多くなり、高精度な計数が可能となる。画像撮り込み後は、粒子抽出、菌体と夾雑物の判別、菌数測定までの一連の操作を自動的に行うため、顕微鏡観察にともなう時間と労力の軽減が可能である。

蛍光顕微鏡画像の自動撮り込みのための検討も行われている。Pernthalerらは既存の顕微鏡ステージ操作システムを改良し、海洋試料中の特定細菌のモニタリングに応用している(25)。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を走査し、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(16)。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。そこで当研究室では、より安価な細菌自動計数装置を共同研究により開発している。本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(1, 2分間)で行うことが可能である。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。

レーザー顕微鏡は水銀ランプを光源とする通常の蛍光顕微鏡とは異なり、蛍光染色した細胞にレーザー光を走査し、得られる蛍光を光電子増倍管で検出した後、画像解析する

図 8. In situ RCA 法の原理

細胞内 DNA 上の標的配列に対して、環状化するプライマーをハイブリダイズさせ (1)、ライゲーションを行うことにより、標的配列を含む環状の DNA を作製する (2)。この環状 DNA に対して RCA プライマーを用いて RCA 反応を行うことにより、細胞内に長い一本鎖 DNA が生成する (3)。生じた増幅産物を FISH により検出する (4)。

システムである。試料由来の蛍光をピンホールを通して検出することにより、共焦点像が得られる点が特徴である。この共焦点像は焦点面以外の蛍光を含まないために、光軸 (Z 軸) 方向の解像度が高い。したがって、共焦点像を複数枚重ね合わせることで、観察像の立体構築が可能となる。すなわち、バイオフィルムなどの厚みのある試料を破壊することなく、その内部構造を三次元的に観察することが可能となる (2, 38)。

フローサイトメトリー (FCM) は液中を移動する個々の細胞にレーザー光を照射し、得られる散乱光や蛍光を解析する手法である (3, 37)。フローサイトメーターの特長としては、①数分間で数万個の細胞を測定できるので、既存の方法と比較してはるかに多数の細胞についての情報が短時間に得られる、②客観性ならびに定量性が高い、③個々の細胞がもつ複数の生物学的特徴 (細胞のサイズ、核酸含量、タンパク質含量など) を同時に測定できることが挙げられる。また、機種によっては特定のシグナルを発する細胞のみを分取 (ソーティング) できるため、生理活性をもつ微生物や特定の属種の細菌のみを分取し解析することも可能である。当研究室ではこれらの特長を生かし、細菌群集の生理活性 (エステラーゼ活性、呼吸活性) の迅速評価 (42) や腸管出血性大腸菌 O157 の生理活性の評価 (31, 44) を行っている。

また微細加工技術の発展とともに、数 cm 四方の樹脂に深さ・幅数十 μm の流路を刻み、その流路を用いてフローサイトメトリーを行う On-chip flow cytometry が有望な手法

として期待されている (28, 43)。On-chip flow cytometry の特徴は、①チップがシングルユースデバイスである (再使用しない)、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閉鎖系での解析を短時間でできることが挙げられる。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、また使用したチップ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。

6. おわりに

蛍光染色法や遺伝子検出法、遺伝子増幅法の開発と改良、また検出機器や画像解析技術の進歩により、細菌の可視化がこれまで以上に容易になってきている。これらの手法は細菌や細胞内の遺伝子の迅速・高精度な検出を可能にするものであるため、環境中における細菌の動態解析や遺伝子水平伝播の細胞レベルでの解明、また感染症の早期診断への応用が進みつつある。純培養法の確立が細菌学の発展において大きな原動力となったように、微生物の可視化技術の進歩とともに、これまでは方法論的な限界により未知であった事実が次々に明らかになっていくものと期待される。

文 献

- 1) Amann, R.I., Krumholz, L., Stahl, D.A. (1990): Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. J.

- Bacteriol. **172**, 762–770.
- 2) Bloem, J., Veninga, M., Shepherd, J. (1995): Fully automatic determination of soil bacterium numbers, cell volumes, and frequencies of dividing cells by confocal laser scanning microscopy and image analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 926–936.
 - 3) Davey, H.M., Kell, D.B. (1996): Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiol. Rev.* **60**, 641–696.
 - 4) DeLong, E.F., Wickham, G.S., Pace, N.R. (1989): Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* **243**, 1360–1363.
 - 5) Joux, F., Lebaron, P. (1997): Ecological implications of an improved direct viable count method for aquatic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3643–3647.
 - 6) Kawai, M., Yamaguchi, N., Nasu, M. (1999): Rapid enumeration of physiologically active bacteria in purified water used in the pharmaceutical manufacturing process. *J. Appl. Microbiol.* **86**, 496–504.
 - 7) Kenzaka, T., Tamaki, S., Yamaguchi, N., Tani, K., Nasu, M. (2005): Recognition of individual genes in diverse microorganisms by cycling primed in situ amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 7236–7244.
 - 8) Kenzaka, T., Yamaguchi, N., Prapagdee, B., Mikami, E., Nasu, M. (2001): Bacterial community composition and activity in urban rivers in Thailand and Malaysia. *J. Heal. Sci.* **47**, 353–361.
 - 9) Kitaguchi, A., Yamaguchi, N., Nasu, M. (2005): Enumeration of respiring *Pseudomonas* spp. in milk within six hours by fluorescence in situ hybridization following formazan reduction. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 2748–2752.
 - 10) Kitaguchi, A., Yamaguchi, N., Nasu, M., submitted.
 - 11) Kogure, K., Simidu, U., Taga, N. (1979): A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.* **25**, 415–420.
 - 12) 黒川 顕, 谷佳津治, 那須正夫 (1997) : in situ PCR 法による腸管出血性大腸菌の検出. *日本細菌学会誌* **52**, 513–518.
 - 13) Kurokawa, K., Tani, K., Ogawa, M., Nasu, M. (1998): Abundance and distribution of bacteria carrying *sltII* gene in natural river water. *Lett. Appl. Microbiol.* **28**, 405–410.
 - 14) Lebaron, P., Catala, P., Fajon, C., Joux, F., Baudart, J., Bernard, L. (1997): A new sensitive, whole-cell hybridization technique for detection of bacteria involving a biotinylated oligonucleotide probe targeting rRNA and tyramide signal amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3274–3278.
 - 15) Lee, N., Nielsen, P.H., Andreasen, K.H., Juretschko, S., Nielsen, J.L., Schleifer, K.-H., Wagner, M. (1999): Combination of fluorescent in situ hybridization and microautoradiography—a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1289–1297.
 - 16) Lemarchand, K., Parthuisot, N., Catala, P., Lebaron, P. (2001): Comparative assessment of epifluorescence microscopy, flow cytometry and solid-phase cytometry used in the enumeration of specific bacteria in water. *Aquat. Microb. Ecol.* **25**, 301–309.
 - 17) Maruyama, F., Kenzaka, T., Yamaguchi, N., Tani, K., Nasu, M. (2003): Detection of bacteria carrying the *stx2* gene by in situ loop-mediated isothermal amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 5023–5028.
 - 18) Maruyama, F., Kenzaka, T., Yamaguchi, N., Tani, K., Nasu, M. Visualization and enumeration of bacteria carrying a specific gene sequence by in situ rolling circle amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*, in press.
 - 19) Maruyama, A., Sunamura, M. (2000): Simultaneous direct counting of total and specific microbial cells in seawater, using a deep-sea microbe as target. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2211–2215.
 - 20) 呂瀬章文, 内山知二, 山口進康, 那須正夫 (1999) : 蛍光染色法による地下水中の細菌数の迅速な測定. *防菌防黴* **27**, 785–792.
 - 21) Nakajima, K., Nonaka, K., Yamamoto, K., Yamaguchi, N., Tani, K., Nasu, M. (2005): Rapid monitoring of microbial contamination on herbal medicines by fluorescent staining method. *Lett. Appl. Microbiol.* **40**, 128–132.
 - 22) 仲島道子, 上田博美, 富永信子, 秋吉愛子, 山口進康, 那須正夫 (1998) : 蛍光活性染色法を用いた紫外線殺菌水の衛生微生物学的評価. *防菌防黴* **26**, 245–249.
 - 23) Ogawa, M., Tani, K., Ochiai, A., Yamaguchi, N., Nasu, M. (2005): Multicolour digital image analysis system for identification of bacteria and concurrent assessment of their respiratory activity. *J. Appl. Microbiol.* **98**, 1101–1106.
 - 24) Ogawa, M., Tani, K., Yamaguchi, N., Nasu, M. (2003): Development of multicolor digital image analysis system to enumerate actively respiring bacteria in natural river water. *J. Appl. Microbiol.* **95**, 120–128.
 - 25) Pernthaler, J., Pernthaler, A., Amann, R. (2003): Automated enumeration of groups of marine picoplankton after fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 2631–2637.
 - 26) Rodriguez, G.G., Phipps, D., Ishiguro, K., Ridgway, H.F. (1992): Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1801–1808.
 - 27) Roslev, P., King, G.M. (1993): Application of a tetrazolium salt with a water-soluble formazan as an indicator of viability in respiring bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2891–2896.
 - 28) Sakamoto, C., Yamaguchi, N., Nasu, M. (2005): Rapid and simple quantification of bacterial cells using a microfluidic device. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 1117–1121.
 - 29) Schonhuber, W., Fuchs, B., Juretschko, S., Amann, R. (1997): Improved sensitivity of whole-cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3268–3273.
 - 30) Siegle, D.A., Kolter, R. (1992): Life after log. *J. Bacteriol.* **174**, 345–348.
 - 31) Tanaka, Y., Yamaguchi, N., 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.
 - 32) Tanaka, Y., Yoshimitsu, M., Yamaguchi, N., Tani, K., Nasu, M. (1998): Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 in river water determined by flow cytometry. *Microb. Environ.* **13**, 77–83.
 - 33) Tani, K., Kurokawa, K., Nasu, M. (1998): Development of a direct in situ PCR method for detection of specific bacteria in natural environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1536–1540.
 - 34) Tani, K., Muneta, M., Nakamura, K., Sibuya, K., Nasu, M. (2002): Monitoring of *Ralstonia eutropha* KT1 in groundwater on bioaugmentation experimental field by in situ PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 412–416.
 - 35) 谷佳津治, 山本かおり, 山口進康, 那須正夫 (1998) : 活性染色法による香辛料中の細菌の迅速な検出. *防菌防黴* **26**, 415–421.
 - 36) Tsuji, T., Kawasaki, Y., Takeshima, S., Sekiya, T., Tanaka, S. (1995): New fluorescence staining assay for visualizing living microorganisms in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3415–3421.

- 37) Vives-Rego, J., Lebaron, P., Caron, G.B.-V. (2000): Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 429–448.
- 38) Wagner, M., Assmus, B., Hartmann, A., Hutzler, P., Amann, R. (1994): In situ analysis of microbial consortia in activated sludge using fluorescently labelled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and confocal scanning laser microscopy. *J. Microsc.* **176**, 181–187.
- 39) Yamaguchi, N., Ichijo, T., Ogawa, M., Tani, K., Nasu, M. (2004): Multicolor excitation direct counting of bacteria by fluorescence microscopy with the automated digital image analysis software BACS II. *Bioimages* **12**, 1–7.
- 40) Yamaguchi, N., Kenzaka, T., Nasu, M. (1997): Rapid in situ enumeration of physiologically active bacteria in river waters using fluorescent probes. *Microb. Environ.* **12**, 1–8.
- 41) 山口進康, 那須正夫, 崔 承泰, 近藤雅臣 (1994) : Fluorescein diacetate/Propidium iodide 二重染色法による芽胞形成細菌の生活環の解析. *防菌防黴* **22**, 65–68.
- 42) Yamaguchi, N., Nasu, M. (1997): Flow cytometric analysis of bacterial respiratory and enzymatic activity in the natural aquatic environment. *J. Appl. Microbiol.* **83**, 43–52.
- 43) Yamaguchi, N., Sakamoto, C., Yamada, M., Nagase, H., Seki, M., Nasu, M., submitted.
- 44) Yamaguchi, N., Sasada, M., Yamanaka, M., Nasu, M. (2003): Rapid detection of respiring *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice, milk and ground beef by flow cytometry. *Cytometry*. **54A**, 27–35.
- 45) Yokomaku, D., Yamaguchi, N., Nasu, M. (2000): An improved direct viable count procedure for quantitative estimation of bacterial viability in freshwater environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 5544–5548.