



物質工学科・准教授
高橋 利幸
(博士【理学】、
CompTIA CTT+
Classroom Trainer)

2007年3月 広島大学大学院理学研究科
博士課程(後期)修了
2007年4月 慶應義塾大学商学部
助教(自然科学)
2009年4月 都城工業高等専門学校
物質工学科 助教
2011年4月 都城工業高等専門学校
物質工学科 講師
2014年4月 都城工業高等専門学校
物質工学科 准教授
(現在に至る)

ポータブル可能な小型 FCM を用いた発酵生産に関わる 微生物細胞のオンサイト検出技術の開発

1. 研究背景と目的

微生物を用いた発酵生産プロセスは、食生活を支える代表的な食品製造工程である。バイオプロセスの現場において、使用する微生物の量や質の精密管理は、食品の品質(味・風味)を保障する鍵である。この観点から、現場管理者による製造現場でのオンサイト・センシング技術(現場検出技術)は、食品製造プロセスの異常を早期に検知する重要なシステムである。微生物の主要な検出技術として、①培養法、②顕微鏡法および③フローサイトメトリー(FCM)法がある。培養法は、設備的に最も簡便だが、微生物の増殖時間(数日程度)を必要とし、オンサイト・センシングに該当しない。顕微鏡法は、光学顕微鏡レベルであれば設備的にも簡便で済む。しかし、1測定データの量が少なく、一部のサンプリングがプロセス全体を反映しているかどうか判断するために多試料の観察を要し、結果として判定に時間を要する。FCM法は、粒子の光学特性を評価する方法として細胞生物学分野で活用され、微生物でもその検出・同定に使われてきた。1測定で多個体の情報を即座に得られるなど顕微鏡法にない利点があるが、従来機器は大型で高額機器のため、現場に持ち込むことが不可能であり、予算的に当該機器を導入できない場合も多く、必ずしもオンサイト・センシングに該当しなかった。

近年、試料吸引法を改変した小型フローサイトメーターが登場してきた(図1)。小型機は、コンパクト化・携帯性向上のために、従来機が有するいくつかの装備や機能が備わっていない。そのため、カタログ上の機器スペックは、性能的には高価格機より劣るが、携帯性を活かしたこれまで使用できなかった場面での活用の可能性を十分に備えている。本研究では、携帯性が高い小型フローサイトメーターを用いて、微生物の検出を可能とする

パラメーターの設定がどうか、また、微生物群の組成を明らかにできる分類学的な標識が可能かどうか検討した。

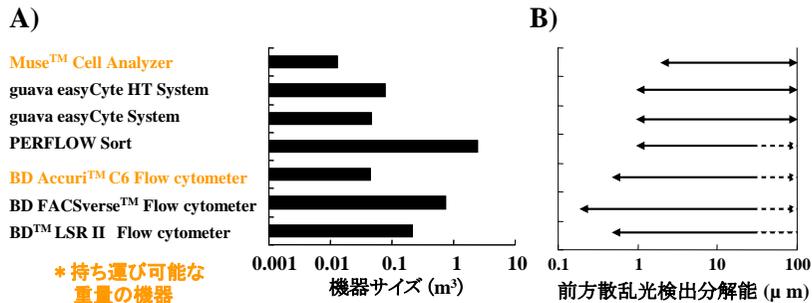


図1:カタログ上のフローサイトメーター特徴(機器サイズ[A]と前方散乱光の分解能[B])

2. 方法

2. 1. 実験微生物

今回、微生物として大腸菌 (*Escherichia coli*) 及び肺炎双球菌 (*Klebsiella pneumoniae*) を用いた。本研究は、当該小型フローサイトメーターを用いた評価系の条件設定の確立を主要目的として実施した。そのため、上記の微生物は、食品製造に関わる発酵微生物ではないが、モデル細菌である大腸菌を中心に評価システムの設定を行った。

2. 2. 実験に使用した小型フローサイトメーター

本研究では、微細管搭載型の小型フローサイトメーター (Muse Cell Analyzer, ミリポア社製) を用いた。本機器は、生物の光学検出のために、532 nm の緑色レーザーが光源として搭載され、光源照射された微粒子 (細胞を含む) からの前方散乱光および蛍光を検出できる。なお、本機器は、576/28 nm と 680/30 nm の2つのバンドパスフィルターを有し、それぞれ黄色と赤色蛍光を検出するシステムとなっている (Millipore Corporation, 2013)。

2. 3. 微生物細胞の光学標識

微生物を蛍光標識するために、Propidium Iodide (PI: 赤色蛍光) でエタノール固定した微生物 DNA を染色した。また、特定の微生物を検出するため、Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法の改良型高感度法の1つである Hybridization Chain Reaction (HCR)-FISH 法でエタノール固定した大腸菌の rRNA を Cy3 で蛍光標識 (黄色蛍光) して検出した。なお、HCR-FISH 法による大腸菌用プローブは、既報 (Yamaguchi et al., 2015) を参考に作成した。今回、小型フローサイトメーターを用いて、蛍光染色した微生物の細胞サイズ (Forward scatter: FSC)、赤色または黄色蛍光強度を測定した。また、小型機の性能評価を目的として、純水のみ (測定ノイズ)、非染色微生物および染色微生物を測定した。また、分類学的標識として、未標識大腸菌、HCR-FFISH 標識大腸菌および HCR-FFISH 標識大腸菌と肺炎双球菌の混合試料を測定した。

3. 結果と考察

3. 1. 小型フローサイトメーターによる微生物細胞の認識

小型フローサイトメーターは、複数のメーカーから販売されている。一般に、フローサイトメーターを使用した FCM 法は、血球や動物細胞などの分析を主要目的としてきた。小型機器も基本的には 10 μm 以上の真核生物用に設計された機器が多い。細菌の細胞サイズは 1 μm 程度で、従来型の大型機器でも FSC で何とか検出できるかどうかという細胞サイズである。本研究で使用した機器もヒト細胞の測定を想定しており、微生物測定は必ずしも推奨されていない (Millipore Corporation, 2013)。今回、小型機器が微生物測定に活用できるか検討した。その結果、蛍光色素で光学標識を必要とせずとも、FSC のみで十分に測定ノイズと微生物を区別できた。また、FSC に加え、蛍光標識により蛍光強度の面でも測定ノイズからさらに分離できた (図 2)。以上の結果から、少なくとも当該小型機器は、酵母菌等の真核細胞性の発酵微生物のサイズに加え、細菌サイズの発酵微生物も検出可能と推定できる。

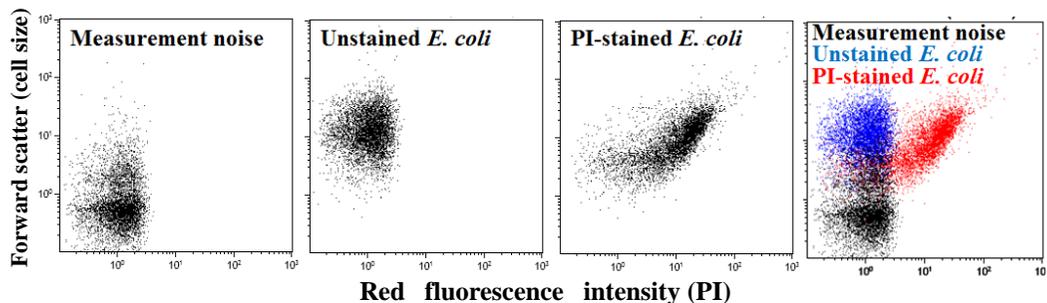


図2: 小型フローサイトメーターによる微生物細胞(大腸菌)の検出

3. 2. HCR-FISH 法を用いた微生物集団からの特定微生物の検出

発酵生産に利用される発酵微生物は、先人達の長期に渡る品質追及の結果として、純系統株が多い。しかし、アクシデントや管理不足で野生種が混入すると、純系統株は野生種よりも弱く、その増殖が阻害されたり、混入に気づかずに発酵プロセスに利用すると、最終製品の品質劣化の原因になる。したがって、DNA やタンパク質などの生物に共通した特徴を利用して生物の有無や数を検出・評価するだけでなく、特定の生物種だけを評価する技術も期待される。FISH 法は、生物種ごとの特徴的配列を利用した分子系統解析に利用される rRNA の配列に着目し、特定の rRNA 配列とだけ結合する蛍光標識したオリゴ DNA プローブを用いて、特定の生物種を検出する技術である。しかし、細菌の種類やその状態によっては生物活性が弱く、通常の FISH 法は微生物の検出には感度が不十分との報告が複数ある。実際に、FISH 法の感度改善のために、CARD-FISH 法や HCR-FISH 法など高感度 FISH 法が提案されている (Yamaguchi et al., 2015)。

本研究では、小型フローサイトメーターを用いて、HCR-FISH 法で標識した大腸菌を微生物集団から検出可能か検討した。本研究では、微生物集団から特定種を検出する前に、

HCR-FISH 法が上手く機能し、小型フローサイトメーターで大腸菌を評価できているか検討した。その結果、未標識の大腸菌と比べ、HCR-FISH 標識した大腸菌では十分な蛍光強度の増加を観察できた (図 3)。微生物種が異なると、細胞サイズや表面構造の違いを反映して、前方散乱光も相違がみられたが、種毎に区別できる程に明瞭ではなかった。一方、未標識の細菌の場合は、種が異なっても大きな蛍光強度の増加は確認されなかった。

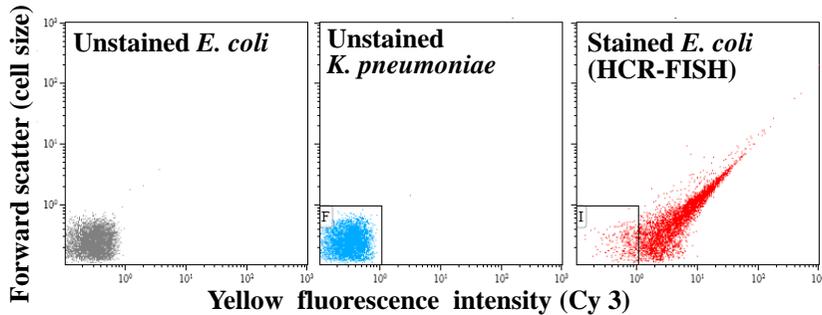


図3:HCR-FISH 法による微生物細胞(大腸菌)の検出

次に、HCR-FISH 標識した大腸菌と未標識の肺炎双球菌を混合し、混合試料から HCR-FISH 標識した大腸菌を検出できるか評価した。その結果、測定に使用する試料の細胞密度を制御することによって、小型フローサイトメーターで未標識の肺炎双球菌と HCR-FISH 標識した大腸菌とを明確に区別できた (図 4)。一方、試料中の細胞密度が一定濃度以上の場合、複数細胞をまとめて評価しているようで、2 つの細胞群を明確に認識できなかった。

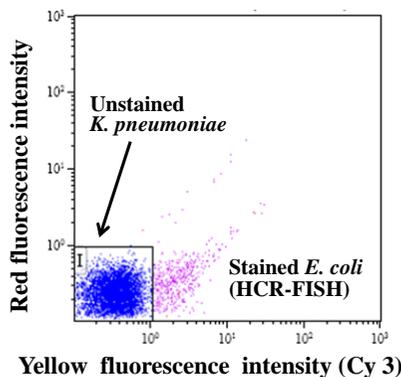


図4:HCR-FISH 法による混合試料中における特定の微生物細胞(大腸菌)の検出

従来型の大型フローサイトメーターは、シース液を使った Hydrodynamic focusing (流体力学的絞り込み) により、試料中の細胞集団の流れを単一縦列の流れに作りかえ、1 細胞ずつレーザー照射し、個々の細胞の光学特性を評価可能にしている。これに対して、小型機は、シース液を搭載しないことでコンパクト化と携帯性を実現している。したがって、流体力学的絞り込みなしで単一縦列の流れに近い状況を作り出すために、マイクロキャピ

ラリーに細胞集団を通過させ、個々の細胞の光学特性を評価できるように工夫している。しかし、細菌の細胞サイズはマイクロキャピラリーよりも十分に小さい。そのため、正確な測定のために、小型機販売のメーカーが推奨する測定対象（真核生物細胞；直径 10 μm 以上）よりも試料中の細胞密度の十分な制御が必要であるといえる。

4. 結論

当該小型機器は、細菌サイズの微生物も光学検出可能であった。また、HCR-FISH 法などの分類学的標識と試料中の細胞密度の調整により、混合試料から特定微生物の検出が可能であった。

5. 謝辞

本研究は、公益財団法人サッポロ生物科学振興財団研究助成の支援により実施されました。関係各位に心より御礼申し上げます。

6. 引用文献

Millipore Corporation. MuseTM Cell Analyzer User's Guide. Hayward, California, pp 1–124, 2013.
T. Yamaguchi, S. Kawakami, M. Hatamoto, H. Imachi, M. Takahashi, N. Araki, T. Yamaguchi, K. Kubota. In situ DNA-hybridization chain reaction (HCR): a facilitated in situ HCR system for the detection of environmental microorganisms. *Environmental Microbiology*, pp. 2532-2541, 2015.
T. Yamaguchi, B. M. Fuchs, R. Amann, S. Kawakami, K. Kubota, M. Hatamoto, T. Yamaguchi. Rapid and sensitive identification of marine bacteria by an improved in situ DNA hybridization chain reaction (quick HCR-FISH). *Systematic and Applied Microbiology*, pp. 400-405, 2015.

7. 本研究に関する学会報告等

冬野憂介, 高橋利幸; 迅速・簡便な微生物細胞レベルでのオンサイト・センシング技術の開発, 平成 27 年度 日本水環境学会九州沖縄支部研究発表会, 2016.