

(iii) TE緩衝液：pH 8.0の1 mol/Lトリス緩衝液1.0 mLに0.5 mol/Lエチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム試液0.2 mLを加えた後、水を加えて100 mLとする。

(iv) 被検菌処理液：ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテルを1 vol%含むTE緩衝液を小分けし、凍結保存する。

(v) PCR反応液

10倍緩衝液*	5 μL
dNTP溶液**(各2.5 mmol/L)	4 μL
10 μmol/Lセンスプライマー	1 μL
10 μmol/Lアンチセンスプライマー	1 μL
耐熱性DNAポリメラーゼ(1 U/μL)	1 μL
水	36 μL

*10倍緩衝液

2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール・塩酸(pH 8.4)	100 mmol/L
塩化カリウム	500 mmol/L
塩化マグネシウム	20 mmol/L
ゼラチン	0.1 g/L

**dNTP溶液(dGTP, dATP, dCTP, dTTPの等モル混合液)

dGTP(2'-デオキシグアノシン5'-トリ リボスフェート, ナトリウム塩)	2.5 mmol/L
dATP(2'-デオキシアデノシン5'-トリ リボスフェート, ナトリウム塩)	2.5 mmol/L
dCTP(2'-デオキシシチジン5'-トリ フォスフェート, ナトリウム塩)	2.5 mmol/L
dTTP(2'-デオキシチミジン5'-トリ フォスフェート, ナトリウム塩)	2.5 mmol/L

なお、これらの成分を有する適当な製品を記載に従って用いてもよい。

(vi) シークエンシング試薬

シークエンシング方式には、プライマーを標識するダイプライマー(dye-primer)法、dNTPターミネーターを標識するダイターミネーター(dye-terminator)法など、種々の方法がある。DNA自動解析装置やプログラムに合った適切な試薬キットを使用する。

(vii) TAE緩衝液, 50倍濃縮

2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール 242 gに酢酸(100) 57.1 mL, 0.5 mol/Lエチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム試液100 mL及び水を加えて溶かし、1000 mLとする。

(viii) 1倍TAE緩衝液

用時、50倍濃縮TAE緩衝液を水で50倍に希釈する。

(ix) アガロースゲル

アガロース1.5 gに50倍濃縮TAE緩衝液2.0 mL, 臭化エチジウム(3,8-diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridinium bromide)溶液(1→100) 10 μL, 及び水100 mLを加えて加熱して溶かした後、60°Cに冷却する。

(x) ローディング緩衝液, 6倍濃縮

プロモフェノールブルー0.25 g, キシレンシアノールFF 0.25 g及びエチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物1.63 gを水50 mLに溶かし、グリセリン30 mLを加え、水を加えて100 mLとする。

(xi) PCR用プライマー

微生物	プライマー	塩基配列
細菌	10F	5'-GTTTGATCCTGGCTCA-3'
	800R	5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3'
	800F	5'-GGATTAGATACCCTGGTA-3'
	1500R	5'-TACCTTGTTACGACTT-3'
真菌	ITS1F	5'-GTAACAAGGT(T/C)TCCGT-3'
	ITS1R	5'-CGTTCTTCATCGATG-3'

(xii) ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル

本品は微黄色の粘性の液体である。

蛍光染色による細菌数の迅速測定法〈G4-8-152〉

本法は、蛍光染色を基本として、生理活性を持つ細菌を迅速に計数する手法を示す。生菌数の測定には、カンテン培地上で培養する方法が広く用いられている。しかし、環境中には増殖能を有しながらも通常的手法では培養困難な細菌が多く存在することから、蛍光又は発光などにより細菌を捉える新たな細菌検出法が開発されている。蛍光染色法では、蛍光色素で染色した細菌を、蛍光顕微鏡やフローサイトメーターなど、蛍光シグナルを検出する種々の装置により計数する。また、染色剤を選択することにより、死菌を含めた全細菌から種々の生理活性を有する細菌まで、計数することができる。DNAやRNAに結合する核酸染色剤を用いて細菌を計数する方法は、蛍光染色法の中でも最も基本となるものであり、細菌の生死にかかわらず核酸を持つ全ての細胞を対象とする。蛍光活性染色法は、細菌の呼吸活性や細菌細胞内に普遍的に存在するエステラーゼの活性などを指標とする。マイクロコロニー法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計数する。以下に、CFDA-DAPI二重染色法とマイクロコロニー法を示す。なおここに示した方法は、迅速・高精度に生理活性を持つ細菌数を測定するための手法であり、生菌とする基準がほかの方法と異なるため、測定値はほかの生菌数測定法よりも高くなることが多い。本法に示した方法は、実施者の経験などによって変更可能である。すなわち、本法に示した以外の試薬、器具、装置も合理性があれば使用可能である。

1. CFDA-DAPI二重染色法

エステラーゼ活性を持つ細菌の検出にはfluorescein diacetate (FDA)系試薬が一般的に用いられる。FDA系試薬は細胞内のエステラーゼによって加水分解され、波長490 nm付近の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、その修飾体であるcarboxyfluorescein diacetate (CFDA)などが利用されている。核酸染色剤4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)を併用したCFDA-DAPI二重染色法の原理は以下のとおりである。無極性のCFDAは細胞内に浸透し、細胞内のエステラーゼにより蛍光性のcarboxyfluoresceinに加水分解される。このcarboxyfluoresceinは極性を持つために生細胞内に蓄積される。したがって、エステラーゼ活性を持つ細胞に青色励起光を照射した場合、carboxyfluorescein由来の緑色蛍光を発する。死細胞ではCFDAは加水分解されないために、蛍光性のcarboxyfluoresceinは生じない。一方DAPIは生菌・死菌の両

細胞内に浸透し、DNAのアデニン及びチミンが豊富な部分に特異的に結合するために、DNAを持つ全ての細菌が染色され、紫外線励起光下で青色蛍光を発する。したがって、本二重染色法により、青色励起光下ではエステラーゼ活性を持つ細菌のみを特異的に計数でき、また紫外線励起光下では全菌数(生菌数+死菌数)を測定できるので、エステラーゼ活性を持つ細菌及びDNAを持つ全ての細菌を計数することが可能となる。

1.1. 装置

1.1.1. 蛍光顕微鏡又はこれに準ずる蛍光観察装置

蛍光染色した細菌を計数するための装置で、種々の機種がある。使用する蛍光染色剤に応じた適切なフィルター系を用意する。蛍光顕微鏡、レーザー顕微鏡、フローサイトメーターなど、各種の蛍光観察装置がある。

1.2. 器具

- (i) ろ過装置(ファンネル、吸引フラスコ、吸引ポンプ)
- (ii) ポリカーボネート製メンブランフィルター(孔径0.2 µm)：粒子を表面で捕集できるフィルターであればポリカーボネート製でなくても良い。
- (iii) スライドガラス
- (iv) カバーガラス
- (v) 計数用接眼マイクロメーター(10×10のマスを区切ったもの)

1.3. 操作法

以下に、蛍光顕微鏡による測定法の一例を示す。

1.3.1. 試料の調製

細菌が、液体(水又は緩衝液)に均一に分散した状態となるように試料を調製する。

1.3.2. ろ過

ろ過装置のファンネルにポリカーボネート製メンブランフィルター(孔径0.2 µm)をセットする。適量の試料をろ過し、試料中の細菌をフィルター上に捕集する。

1.3.3. 染色

CFDAを終濃度150 µg/mL及びDAPIを終濃度1 µg/mLとなるように混合したCFDA染色用緩衝液適量を、ろ過装置のファンネルに注ぎ、約3分間、室温で染色した後、吸引ろ過する。ファンネルに無菌水を適量注ぎ、吸引ろ過し、フィルターに残った余分な蛍光染色剤を除く。フィルターを十分に乾燥させる。

1.3.4. プレパラートの作製

スライドガラスに蛍光顕微鏡用イマージョンオイルを1滴落とす。その上に風乾したフィルターをろ過面を上にして置く。その上に蛍光顕微鏡用イマージョンオイルを1滴滴下し、カバーガラスを被せてフィルターを封入する。油浸対物レンズを用いる場合は、カバーガラスの上に更に蛍光顕微鏡用イマージョンオイルを1滴滴下する。

1.3.5. 計数

蛍光顕微鏡下で1000倍の倍率で観察・計数する。CFDA-DAPI二重染色の場合は、紫外線励起光による退色を防ぐために、まず青色励起光下で緑色蛍光を発する(エステラーゼ活性を持つ)細菌を計数した後、同一視野について紫外線励起光下で青色蛍光を発する(DNAを持つ)細菌を計数する。蛍光顕微鏡の接眼マイクロメーターの計100マス内に観察される蛍光染色剤由来の蛍光を発する細菌について、無作為に視野を選んで20視野以上計数し、以下の式に従って細菌数を算出する。なお、検鏡面積はあらかじめ接眼マイクロメーターと対物マイク

ロメーターで測定しておく。また、計数にあたっては1視野当たり10～100細胞程度になるようにろ過量を調節する。したがって、1視野当たりの細胞数が多すぎる、又は少なすぎる場合は試料の再調製を行う。(1視野当たりの平均細胞数が2個以下の場合、又は1視野当たりの細胞数が0個の視野が5視野以上ある場合は、検出限界以下とする。)

菌数(cells/mL)

$$= \{ (1 \text{視野当たりの細菌数の平均値}) \times (\text{ろ過面積}) / \{ (\text{ろ過量}) \times (\text{検鏡面積}) \}$$

1.4. 試薬・試液

- (i) 無菌水：水を孔径0.2 µmのメンブランフィルターでろ過した後、121°Cで15分間高圧蒸気滅菌する。注射用水を用いても良い。
- (ii) CFDA溶液、10 mg/mL：CFDA 50 mgをジメチルスルホキシドに溶かし、5 mLとする。遮光下、-20°Cで保存する。
- (iii) CFDA染色用緩衝液：塩化ナトリウム5 gに0.1 mol/Lエチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム試液0.5 mL及び薄めたリン酸二水素二ナトリウム試液(1→3)を加えて溶かし、100 mLとする。この液にリン酸二水素ナトリウム二水和物溶液(1→64)を加えてpH 8.5に調整する。孔径0.2 µmのメンブランフィルターでろ過する。
- (iv) DAPI溶液、10 µg/mL：DAPI 10 mgを無菌水100 mLに溶かす。無菌水で10倍希釈して、孔径0.2 µmのメンブランフィルターでろ過する。遮光下、4°Cで保存する。
- (v) 蛍光顕微鏡用イマージョンオイル

2. マイクロコロニー法

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、蛍光顕微鏡などで観察・計数することにより、増殖能を持つ細菌数を短時間の培養で測定することができる。本法ではメンブランフィルター上に細菌を捕集し、そのメンブランフィルターを培地上に静置し短時間培養した後、マイクロコロニーを計数する。肉眼で確認できる前段階のコロニーを検出するため、増殖能力を持つ細菌を迅速かつ高精度に計数することができる。マイクロコロニーの染色には、種々の核酸染色剤を用いることができる。

2.1. 装置

2.1.1. 蛍光顕微鏡又はこれに準ずる蛍光観察装置

蛍光染色した細菌を計数するための装置で、種々の機種がある。使用する蛍光染色剤に応じた適切なフィルター系を用意する。蛍光顕微鏡、レーザー顕微鏡など、各種の蛍光観察装置がある。

2.2. 器具

- (i) ろ過装置(ファンネル、吸引フラスコ、吸引ポンプ)
- (ii) ポリカーボネート製メンブランフィルター(孔径0.2 µm以下)：粒子を表面で捕集できるフィルターであればポリカーボネート製でなくても良い。
- (iii) スライドガラス
- (iv) カバーガラス
- (v) ろ紙(No.2)
- (vi) 計数用接眼マイクロメーター(10×10のマスを区切ったもの)

2.3. 操作法

以下に、蛍光顕微鏡による測定法の一例を示す。