

Title	蛍光活性染色法による環境中の微生物の活性評価
Author(s)	山口, 進康
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3155734">https://doi.org/10.11501/3155734</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

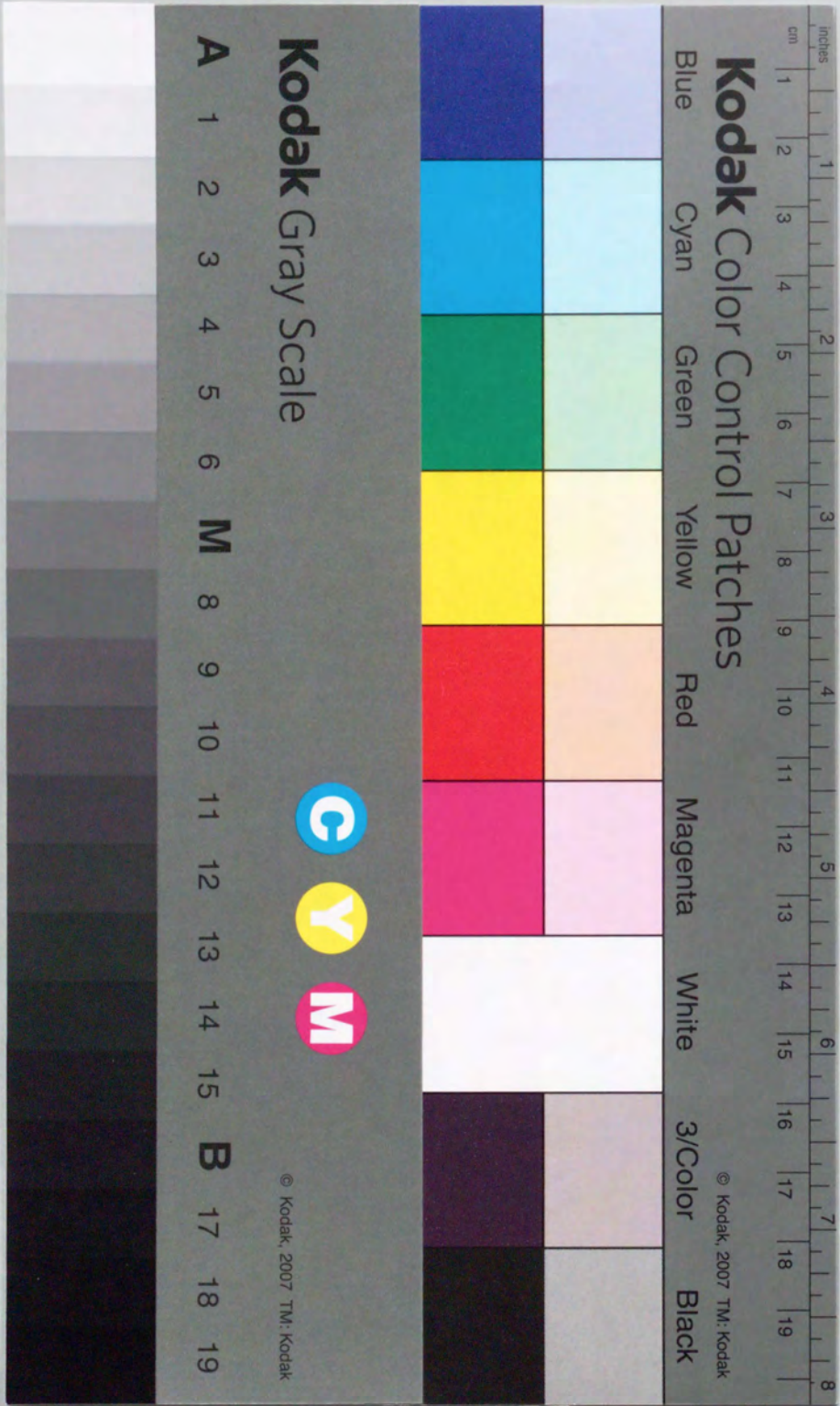
<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University



蛍光活性染色法による環境中の微生物の活性評価

山 口 進 康





蛍光活性染色法による環境中の微生物の活性評価

山 口 進 康



## 目次

緒論	1
本論	
第一章 蛍光活性染色法の染色条件の検討	5
第二章 フローサイトメトリーによる活性解析系の作成	15
第三章 HNPP-Fast Red TR in situ ハイブリダイゼーション (HNPP-FISH) 法の開発	26
第四章 蛍光染色法の活性汚泥解析への応用	36
総括	45
結論	48
謝辞	49
参考文献	50



## Abbreviations

6CF	6-carboxyfluorescein
6CFDA	6-carboxyfluorescein diacetate
6CFDA(+)	number of esterase-active bacteria
A.T.	atmospheric temperature
CFU	colony forming units
CTC	5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride
CTC(+)	number of respiring bacteria
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
EC	electric conductivity
FISH	fluorescent in situ hybridization
FITC	fluorescein isothiocyanate
FITC-FISH	fluorescent in situ hybridization with mono-FITC-labeled oligonucleotide probes
HNPP	2-hydroxy-3-naphthoic acid-2'-phenylanilide phosphate
HNPP-FISH	HNPP and Fast Red TR in situ hybridization
PI	propidium iodide
TDC	total direct count (total bacterial number)
TOC	total organic carbon
W.T.	water temperature

## 緒論

細菌をはじめとする微生物は、我々人間にとって最も身近な生物である。皮膚表面や消化管内にはそれぞれの環境に適応した細菌が常在菌として生息し、一定のフローラを形成している。そして有害な細菌の増殖を抑えることにより、健康の維持に大きく役立っている。一方、ペストやコレラ、結核などの伝染病を引き起こし、多くの人を死に追いやってきたのも微生物である。また日々口にする発酵食品を生み出すのも微生物であれば、食物を腐敗させるのも微生物である。さらに、我々を取りまく環境、すなわち大気、水圏、土壌中にも多種多様な細菌が存在し、生態系の恒常性の維持や物質循環に大きな役割を果たしている。我々人間は微生物に囲まれて生活を営んでおり、これまでの人類の歴史は微生物との共存ならびに戦いの繰り返しであったと言っても過言ではない。

このように微生物は我々の生活に深く関与しているにもかかわらず、その存在がはっきりと認識されるようになったのはわずか百数十年前のことである。すなわち、パスツールによる自然発生説の否定とコッホらによる微生物の発見を契機として19世紀の中頃に微生物学が始まり、それ以来、微生物学は人類にとって深刻な問題である疾病の解決、また身近な問題である発酵や腐敗現象の解明を主な目的として発展してきた。そして、その過程でペニシリンやストレプトマイシンなどの抗生物質、マーキュロクロムやクレゾールなどの殺菌・消毒剤が発見・開発され、多くの感染症が克服されたかに見えた。しかしながら、MRSA（メチシリン耐性黄色ブドウ球菌）やVRE（バンコマイシン耐性腸球菌）などの出現とともに、これらの抗生物質耐性細菌による院内感染症が1980年代以降拡がっており、社会的な問題になっている。さらには百日咳、ジフテリア、A型溶血性連鎖球菌感染症などの再興感染症、また腸管出血性大腸菌O157や下痢原性のクリプトスポリジウムに代表される新興感染症<sup>1)</sup>が我々を脅かしつつある。開発途上国をはじめとして1700万人を越す人々が依然として呼吸器感染症や下痢、マラリアやエイズにより亡くなっており、全世界での死亡原因の33%は感染症である<sup>1)</sup>。我が国においても、昭和初期までは死因の第一位であった肺炎が、75歳以上の高齢者の死因として1980年代後半から再び大きな位置を占めるようになっている<sup>2)</sup>。



また、我々の食生活や生活様式の変化にともない、外食産業のみならず家庭内においても調理時間の短縮のためにカット野菜や冷凍・冷蔵食品などの加工食品を利用する機会が増加している。同時に、より安価な食材を求めて魚介類や畜産物の海外からの輸入が急増しているが、その一部からはコレラ菌やサルモネラ菌に汚染されたものが見つかる。さらには、健康に対する意識の変化から減塩食品や保存料無添加の食品が数多く販売されており、これらの食品の衛生管理が徹底していない場合、大規模な集団食中毒が引き起こされる危険性がある。公式に食中毒統計が発表されるようになった昭和27年（1952年）以来、食中毒の患者数は依然として減少しておらず<sup>3)</sup>、食品や飲用水の適切な衛生管理の実施が現在の食品保健分野における大きな課題となっている。

さらに、住まいにおけるエアコン<sup>4)</sup>や家庭用加湿器<sup>5,6)</sup>の微生物汚染、24時間風呂のレジオネラ菌汚染問題<sup>7)</sup>など、これまでには無かった問題が起これつつある。

以上のような微生物に起因する問題を未然に防ぎ、被害を最小限にとどめるには、原因となる微生物の正確かつ迅速な検出とその環境中における動態の解明が欠かせない。しかしながら、現在一般的に用いられている培養法では微生物の検出に数日を要するため、培養期間中に被害が広がっていくという大きな問題点がある。さらに、1970年代後半の全菌数直接計測法<sup>8)</sup>の確立を機に、それまでの微生物学の常識を覆す事実、すなわち我々をとりまく環境中にはこれまで微生物学において開発されてきた方法では培養、検出できない細菌が高い割合で存在することが明らかとなってきている<sup>9-11)</sup>。例えば、都市近郊の河川水1 ml中には $10^4 \sim 10^6$ の細菌が存在しているが、通常法で培養できるのはそのうちの1～10%である<sup>12,13)</sup>。また土壌1 g中には $10^9 \sim 10^{10}$ の細菌が存在するものの、その1%しか寒天平板培地上にコロニーを形成しないことが知られている<sup>14,15)</sup>。と同時に、培養法では検出の難しいこれらの細菌の一部が環境中において感染能力や毒素産生能力を保持していること、周囲の温度や栄養分の変化によって増殖能力を取り戻すことが次第に解明されてきている<sup>16-20)</sup>。

したがって、先に述べた微生物に起因する様々な問題を解決するためには、培養に依存しない新たな手法を開発しなければならない。特に、食品や医療現場の微生物汚染を評価する場合には全菌数のみならず生菌数を測定する必要がある、また食

中毒や感染症を解決するためにはその原因となる微生物を検出しなければならない。したがって、より有効な対策を立てるために、微生物の活性（生死）を評価する方法、および特定の微生物を検出するための新しい方法の開発が切望されている。

本研究では生理活性を持つ微生物を迅速かつ簡便にシングルセルレベルで検出する手法として、蛍光活性染色法の開発を行った。活性を持つ細菌の検出にあたっては、生細胞内に普遍的に存在する酵素であるエステラーゼの活性、ならびに細菌の持つ呼吸能に着目した。すなわち、細菌のエステラーゼ活性の評価にはエステラーゼによって蛍光物質6-carboxyfluoresceinに加水分解される6-carboxyfluorescein diacetate (6CFDA)<sup>21-23)</sup>を用いた。また細胞の電子伝達系において蛍光物質に還元される5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC)<sup>24-28)</sup>を用いて、呼吸能を持つ細菌の検出を試みた。

なお研究にあたっては、試料として河川水を選んだ。これは、河川水中には土壌と比べて夾雑物が少なく、湖沼水と比べて自家蛍光を発する植物プランクトンが少ないので、蛍光染色法を検討するための試料として適しているためである。また、河川は淡水資源ならびに親水空間として我々の生活に深く関わっているにもかかわらず、その人為的な汚染が世界各地で深刻化している。河川の持つ自浄能力のいしずえとなっているのは生態系の根幹部を構成する微生物であるため、水資源のこれ以上の汚染を防ぐとともに環境を改善していくには、河川水中の細菌について理解を深める必要がある。しかしながら、先に述べたようにこれらの細菌の大部分は通常の方法では培養できないため、手法的な制約から現存量はもとより、その活性や属種はいまだ十分には明らかにはされていないのが現状である。そこで、蛍光活性染色法を検討するにあたって、まず河川水中の細菌を6CFDAおよびCTCにより染色し、最適染色条件を求めるとともに、その有用性を評価した。

次に、より迅速な活性解析系の作成を試みた。蛍光染色した細菌をシングルセルレベルで検出・計数する場合、一般的に蛍光顕微鏡が用いられるが、肉眼では数千個の細胞を観察するのは困難である。画像解析装置と組み合わせても、数万個の細胞を計数し、その蛍光シグナルを解析するには過度の労力と時間を要する。また活性を持つ細菌についてその同定を行ったり、さらには核酸やタンパク質を抽出して



解析を行う場合には、活性を持つ細菌を分取した上で以降の解析に用いる必要がある。そこで1分間に数万個の細胞を解析できるうえ、特定のシグナルを持つ細胞の分取が可能なフローサイトメーターに着目し、フローサイトメトリーと活性染色法を組み合わせた解析系を作成した。

特定細菌をシングルセルレベルで検出する手法としては、1990年以降、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 法<sup>29-31)</sup>が用いられつつある。本方法は蛍光プローブを用いて菌体内の属種特異的なrRNA配列を標的とするハイブリダイゼーションを行い、特定の細菌を検出する方法である。中でも蛍光染色剤で5'-末端をモノラベルしたプローブを用いるFISH法は操作が簡便であるため、微生物学分野において現在広く用いられている<sup>32-37)</sup>。しかしながら、本方法には対象とする細菌のrRNA含量が低い場合にその検出が難しくなるという問題点が残されている。したがって、環境中の細菌はrRNA含量が低いために、一般的なFISH法を用いて検出を行うのはいまだ困難である。そこで検出感度を上げるために新たな蛍光基質であるHNPP (2-hydroxy-3-naphthoic acid-2'-phenylanilide phosphate) およびFast Red TRに着目し、酵素反応により蛍光シグナルを増強するHNPP-Fast Red TR *in situ* ハイブリダイゼーション (HNPP-FISH) 法の開発を行った。

さらに、今回開発した蛍光活性染色法ならびにHNPP-FISH法を活性汚泥の解析に応用した。活性汚泥による污水や排水の生物学的処理法は、過剰なエネルギーを必要とせず処理能力が高いために、現在世界各地で広く用いられている。この活性汚泥による水処理を有効に行うためには、複合微生物系である活性汚泥を微生物学的側面から管理することが重要であるにもかかわらず、手法的な限界からいまだ活性汚泥はブラックボックスとして扱われているにすぎない。また活性汚泥はOECD法<sup>38)</sup>やMITI法<sup>39,40)</sup>などの化学物質生分解試験において、供試物質の自然環境中での生分解性を評価するための微生物源として用いられている。これらの生分解試験の信頼性や再現性の向上のためには、微生物源である活性汚泥の群集構造を理解しておく必要がある。そこで蛍光活性染色法を用いて活性汚泥中の細菌の活性を評価するとともに、HNPP-FISH法を用いて活性汚泥の細菌群集構造の解析を行った。

## 本論

### 第一章 蛍光活性染色法の染色条件の検討

活性を持つ細菌の検出・計数には従来、①寒天平板培地培養法<sup>41)</sup>、②MPN (Most probable number; 最確値) 法<sup>42)</sup>、③DVC (Direct viable count) 法<sup>43-45)</sup>、④シンチレーションカウント法<sup>46)</sup>、⑤マイクロオートラジオグラフィー法<sup>47, 48)</sup>、⑥ATP含量測定法<sup>49, 50)</sup>、⑦2-(p-iodophenyl)-3-p-(nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chloride (INT)<sup>51)</sup>染色法などが用いられてきた。

寒天平板培地培養法ならびにMPN法は特別な装置を必要とせず簡便に細菌数を測定できるので、微生物学分野では広く用いられている。しかしながら、これらの方法では培養に時間がかかるとともに、自然環境中に高い割合で存在する培養困難な細菌の検出が難しい。DVC法は試料中にナリディキシ酸などの抗菌剤を添加し細菌の分裂を阻害することによって、細菌細胞を伸長・肥大させ計数する方法である。分裂能を持つ細菌をシングルセルレベルで検出できるように環境微生物学分野で多用されているが、抗菌剤耐性菌が多く存在する試料ではその活性を過小評価してしまう。 [<sup>3</sup>H]-チミジンなどの放射性同位元素 (RI) でラベルした基質の資化能を検出・測定するシンチレーションカウント法やマイクロオートラジオグラフィー法は細菌の代謝能力を直接的に評価できるが、その実施にあたってはRIを使用できる施設が必要である。ATP含量測定法は操作が簡便で高感度であるため、食品分野などで生菌数の測定に用いられているが、菌体内のATPを抽出する必要があるため、個々の細菌の活性を評価する必要がある場合には適用できない。INT染色法は細菌の呼吸によって生じる紫色色素を光学顕微鏡下で検出する手法である。個々の細菌の持つ呼吸能を評価することが可能であるが、色素の生成が肉眼では確認しにくく、呼吸能を持つ細菌を過小計数してしまう問題点がある。以上のように各々の方法にはそれぞれ優れた点があり、研究目的に応じて使い分けられてきたが、同時にそれらの欠点を補う新たな手法の開発が望まれている。

蛍光染色法は操作が簡便かつ迅速であり、核酸やタンパク質などの細胞内成分を指標に特異的に検出することができるという特長を持つ。またTable 1に示したよう



に、同じ励起波長であっても染色対象ならびに蛍光波長が異なる蛍光染色剤があるため、細胞を多重染色することにより複数の情報を得ることが可能である。さらに蛍光染色法の普及にともない、より蛍光の強い、あるいは染色特異性の高い蛍光染色剤が次々に開発されてきており、微生物学においても積極的な利用が試みられている。そこで、蛍光活性染色法を検討するにあたり、細胞のエステラーゼ活性を評価できる6CFDAおよび呼吸能を評価できるCTCに着目した。

Table 1. Fluorescent dyes used in microbiology.

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)	490	520	タンパク質 ( $\alpha$ -アミノ基)	細胞内タンパク質の定量, 蛍光抗体の標識
Rhodamine 123	507	529	細胞膜	細胞膜の活性の評価
Acridine orange	490	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
Mithramycin	395	570	G-C領域	DNAの定量
4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)	358	461	A-T領域	DNAの定量
Hoechst 33258	352	461	A-T領域	DNAの定量
Hoechst 33342	350	461	A-T領域	DNAの定量
Ethidium bromide	545	605	二本鎖核酸	DNAの定量, 死細胞の検出
Propidium iodide	530	615	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
BOBO-1	462	481	DNA	DNAの定量
POPO-1	434	456	DNA	DNAの定量
TOTO-1	514	533	DNA	DNAの定量
YOYO-1	491	509	DNA	DNAの定量
TO-PRO-1	515	531	DNA	DNAの定量
SYBR Green I	497	520	DNA	DNAの定量, 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-acetoxymethyl ester(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)	488	602	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	568	610		FISH用プローブの標識
Cy3	550	570		FISH用プローブの標識
Cy5	649	670		FISH用プローブの標識
2-hydroxy-3-naphtic acid-2'-phenylamide phosphate(HNPP)	350,550	562		FISH用プローブの標識
5(6)-carboxyfluorescein-N-hydroxy succinimide ester (FLUOS)	494	518		FISH用プローブの標識
5(6)-carboxytetramethyl-rhodamine-N-hydroxysuccinimide-ester (CT)	546	576		FISH用プローブの標識

6CFDAは無蛍光性・無極性の蛍光染色剤であり、生細胞内に容易に浸透する性質を持つ。生細胞内に入った6CFDAはリパーゼ、アルカリフォスファターゼ、ヌクレアーゼなどのエステラーゼによって6-carboxyfluorescein (6CF) に加水分解される。この6CFは極性を持ち、生細胞内に蓄積されるため、試料を6CFDAで染色した場合、エステラーゼ活性を持つ細菌は波長488nm付近のB励起光によって緑色蛍光を発する。また、CTCは細菌の呼吸により赤色蛍光性のCTC-formazanに還元されるため、呼吸能を持つ細菌を蛍光顕微鏡下で容易に検出することができるという特長を持つ。したがって、これらの蛍光染色剤とDNA結合性の蛍光染色剤4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) <sup>52)</sup>とを組み合わせることで細菌を二重染色し、B励起と紫外線 (UV) 励起を切り替えることによって、蛍光顕微鏡下同一視野において活性を持つ細菌数と全菌数 (TDC) とを計測できる (Fig. 1)。本研究では環境の異なる地点から採取した河川水を試料として、6CFDA-DAPI二重染色法ならびにCTC-DAPI二重染色法の最適染色条件を検討するとともに、その微生物学分野における有用性を評価した。

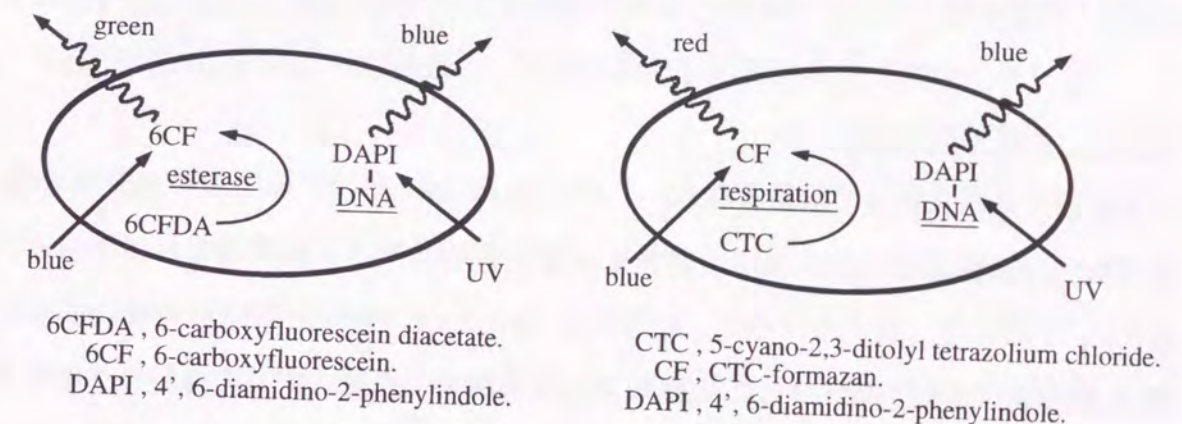


Fig. 1. Principle of 6CFDA-DAPI and CTC-DAPI double staining methods.

## 材料と方法

### 採水地点

試料水の採取はFig. 2に示した4地点で1994年9月から1995年2月にかけて計15回行った。箕面川は箕面山系を源とし、桑津の上流約1.5kmの地点で猪名川に合流する。滝上は箕面国定公園内に位置する溪流であり、家庭排水や工業廃水の流入は認められない。高山は滝上の上流に位置し、その環境は滝上と類似している。猪名



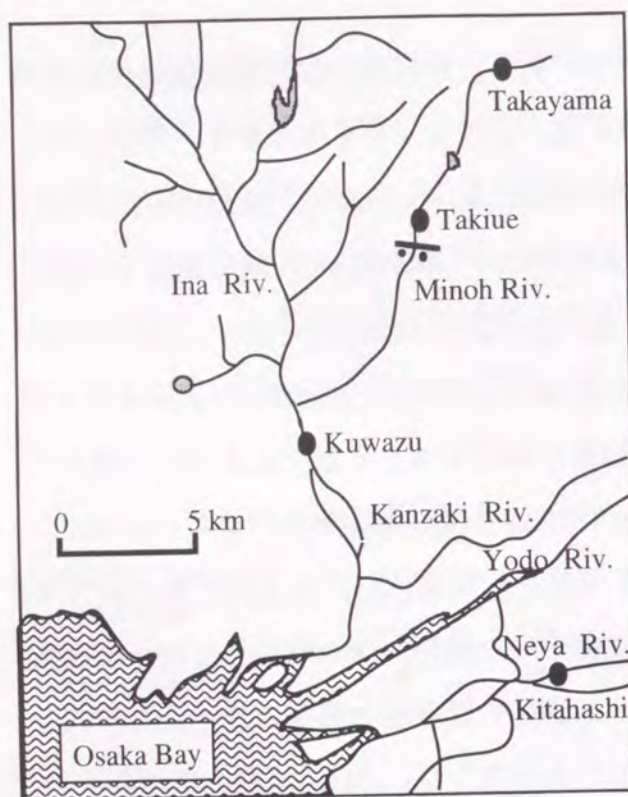


Fig. 2. Sampling stations.

川の桑津は大阪国際空港西側の工業地帯に位置し、川底の石には茶褐色のバイオフィルムが付着している。寝屋川の北橋は大阪ビジネスパーク内に位置し、付近には底泥の浚渫船がよく見かけられる。これまでの研究により、高山と滝上は有機物による汚染の進んでいない地点、桑津と北橋は汚染の進んでいる地点であることがわかっている<sup>53-56</sup>。河川水の採取時には気温、水温、pH、ECを採水現場で測定した。また全有機炭素 (TOC) 値は、TOC-500 (島津) により測定した。

#### コロニー形成菌数の測定

各試料を滅菌蒸留水で段階希釈し、その100 $\mu$ lをR2A寒天平板培地<sup>57)</sup> (酵母エキース, Difco Proteose Peptone No.3, カサミノ酸, グルコース, 可溶性デンプン 各0.5 g ; ピルビン酸ナトリウム,  $K_2HPO_4$  各0.3 g ;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05 g ; 寒天 15.0 g / 1 l) に塗抹した。25 $^{\circ}C$ で1週間培養した後、生じたコロニーを計数した。

#### 6CFDA-DAPI二重染色

河川水をその1/2量の染色用バッファー (0.3M phosphate buffer [pH8.5], 15% NaCl, 1.5mM EDTA) と混合し、6CFDA (Sigma; 10mg/ml アセトン溶液) とDAPI (Sigma; 10 $\mu$ g/ml水溶液) をそれぞれ終濃度150 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/mlとなるように添加した。遮光下室温で3分間染色した後、ろ過によって試料中の細菌をNuclepore black filter (Costar Scientific; 孔径 0.20 $\mu$ m) 上に捕集した。フィルターをスライドガラス上に乗せ、エマルジョンオイルで封入し、蛍光顕微鏡で観察した。

#### CTC-DAPI二重染色

河川水にCTC (Polysciences; 50mM 水溶液) とR2A液体培地をそれぞれ終濃度1.0mM, 10% (v/v) となるように添加した。試料を遮光下25 $^{\circ}C$ で30分間振とうした後、DAPI (Sigma; 10 $\mu$ g/ml水溶液) を終濃度1 $\mu$ g/mlとなるように加え、室温で3分間染色した。試料中の細菌を前述の6CFDA-DAPI二重染色法と同様にNuclepore black filter上に捕集し、プレパラートを作成後、蛍光顕微鏡で観察した。

#### 蛍光顕微鏡

試料の観察には蛍光顕微鏡BH2 (オリンパス) を用いた。6CFDAまたはCTCにより染色した細菌の観察には励起フィルター BP490+EY455, ダイクロイックミラー DM500, 吸収フィルター O515を用いた。DAPIにより染色した細菌の観察には励起フィルター UG1, ダイクロイックミラー DM400, 吸収フィルターL420を用いた。これらのフィルター設定を用いることにより、活性を持つ細菌は波長488nm付近のB励起光下、全菌数はUV励起光下で計数できる。各試料について細菌数が1視野あたり80個以上になるように調製し、1試料あたり30視野以上を計数した。

#### 結果と考察

実験を始めるにあたり、北橋から採取した河川水を用いて、各二重染色法の最適染色条件を求めた。

細菌を蛍光染色するにあたっては、EDTAの添加がグラム陰性細菌の染色性を向上することが報告されている<sup>58)</sup>。そこで、6CFDA-DAPI二重染色におけるEDTAの効果を検討したところ、終濃度0.5mMのEDTAの添加により、全菌数に占めるエステラーゼ活性を持つ細菌数の割合 (6CFDA(+)/TDC) が上がることがわかった。次に6CFDAの至適濃度を検討した。6CFDAの濃度をそれぞれ5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 300 $\mu$ g/mlとなるように河川水に添加し、細菌細胞の発する緑色蛍光の強度を比較した。その結果、30 $\mu$ g/ml以下では蛍光が弱く、また褪色が起こったのに対し、150 $\mu$ g/ml以上で染色を行った場合は十分な蛍光が得られ、またバックグラウンドが低くなった。さらに染色時間を検討した結果、3分間から60分間では有意の差は得られず、したがって以降の6CFDA-DAPI二重染色では、染色用



バッファーに終濃度0.5mMとなるようにEDTAを添加し、6CFDA濃度を150 $\mu$ g/ml、染色時間を3分間とした。

同様にCTC-DAPI二重染色の最適条件を検討した。まず河川水にCTCをそれぞれ終濃度0.5mM、1.0mM、2.5mM、5mMとなるように添加し、細菌の発する蛍光強度を比較した。その結果、0.5mMでは細菌の発する赤色蛍光が弱く、呼吸能の評価が困難であった。また1.0mM以上では蛍光強度に大きな差は見られなかった。次に染色時間を5分、15分、30分、1時間、2時間、4時間とした場合について、全菌数に占める呼吸能を持つ細菌数の割合(CTC(+)/TDC)を求めた。その結果、染色時間が15分以下では細菌の発する蛍光が弱く、また4時間染色した場合は菌体の崩壊にともなう全菌数の減少が見られた。さらに、Rodriguezらにより試料水中の栄養源が少ない場合には細菌の呼吸能が測定しにくくなることが報告されている<sup>25)</sup>ため、試料水中へのR2A培地の添加を試みた。培地を終濃度0%、10%、20%、50%(v/v)となるように試料に添加してCTC染色を行った結果、培地を添加した場合は添加しない場合に比べてCTC(+)/TDC値が増加したものの、染色時間の延長にともない全菌数の増加が見られた。そこで、CTC-DAPI二重染色においては、R2A培地を試料水の10%(v/v)となるように加え、CTC濃度を1.0mMとして30分間振とう染色を行うこととした。

以上の染色条件で蛍光染色した河川細菌の蛍光顕微鏡像をFig. 3に示した。UV励起光下では全ての細菌がDAPI由来の青色蛍光(Fig. 3a, c)を発しているのに対し、B励起光下ではエステラーゼ活性を持つ細菌が緑色蛍光(Fig. 3b)、また呼吸能を持つ細菌が赤色蛍光(Fig. 3d)を発していた。なお、ホルマリン処理した河川水試料に対して同様に蛍光活性染色を行ったところ、UV励起光下でDAPI由来の蛍光は見られたものの、B励起光下では6CFDAあるいはCTC由来の蛍光は認められなかった。したがって、6CFDA-DAPI二重染色法およびCTC-DAPI二重染色法を用いることにより、それぞれエステラーゼ活性または呼吸能を持つ細菌を1時間以内に簡便かつ特異的に検出・計数できるようになった。

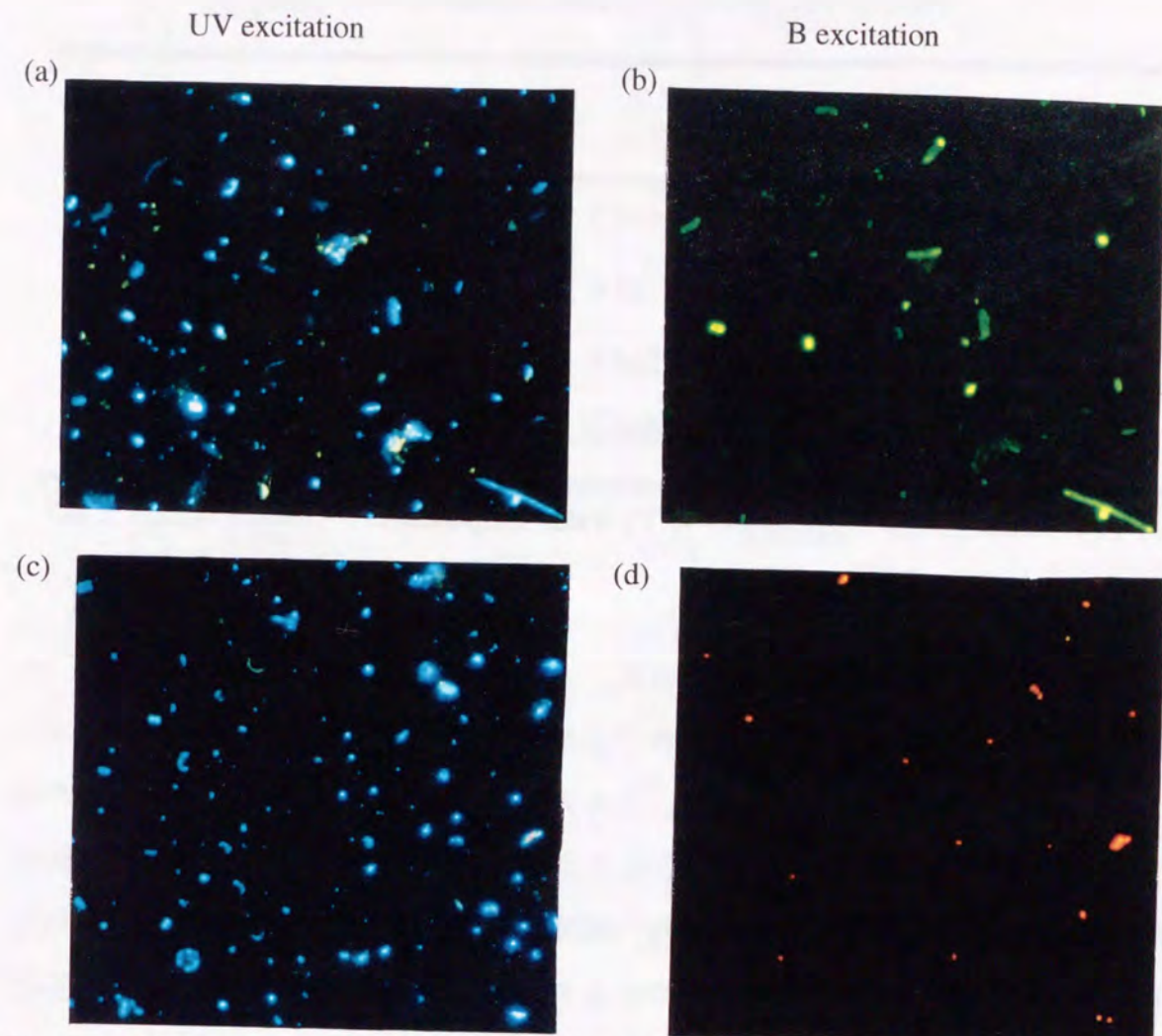


Fig. 3. Epifluorescence micrographs of double stained bacterial cells.  
(a) and (b), 6CFDA-DAPI double staining; (c) and (d), CTC-DAPI double staining.  
6CFDA, 150 $\mu$ g/ml; CTC, 1.0mM; DAPI, 1 $\mu$ g/ml.  
Sample, river water collected at Kitahashi.

次に、これらの二重染色法を用いて、環境の異なる地点から採取した河川水中の細菌の活性を解析した。採水時の気温、水温、河川水のpH、EC、TOC値をTable 2に示した。TOC値は高山、滝上で1~2 ppm、桑津、北橋では6~10ppmであった。したがって、高山や滝上に比べて桑津、北橋では有機物による汚染の進んでいることが確認できた。



Table 2. Physico-chemical characteristics of river water.

Sampling stations	A.T. (°C)	W.T. (°C)	pH	EC ( $\mu$ S/cm)	TOC (ppm)
Takayama (n=7)	10.0 $\pm$ 6.0*	9.6 $\pm$ 5.1	8.1 $\pm$ 0.3	136 $\pm$ 16	1.0 $\pm$ 0.6
Takiue (n=13)	13.5 $\pm$ 5.7	13.7 $\pm$ 5.6	8.0 $\pm$ 0.2	157 $\pm$ 14	1.8 $\pm$ 1.0
Kuwazu (n=8)	16.9 $\pm$ 7.0	18.5 $\pm$ 4.9	7.6 $\pm$ 0.2	503 $\pm$ 89	6.4 $\pm$ 3.9
Kitahashi (n=15)	14.6 $\pm$ 7.3	16.8 $\pm$ 5.3	7.5 $\pm$ 0.2	541 $\pm$ 157	6.7 $\pm$ 2.6

A.T., atmospheric temperature; W.T., water temperature. \* Values, Means  $\pm$  SD.

各河川水の全菌数、活性を持つ細菌数、コロニー形成菌数をFig. 4に示した。全菌数は高山、滝上に比べて桑津、北橋では多く、またいずれの地点においてもコロニー形成菌数、呼吸能を持つ細菌数、エステラーゼ活性を持つ細菌数、全菌数の順に計測値が高くなる傾向が見られた。したがって、従来用いられていた寒天平板培地培養法では、試料中の生理活性を持つ細菌数を過小評価していたことが確かめられた。さらに、河川水中の細菌がその生息する環境の汚染状況にかかわらず、生理活性を保持していることが明らかとなった。

水環境中の細菌数を測定する場合、寒天平板培地培養法は簡便ではあるものの結果を得るまでに時間がかかる、また全菌数直接計測法では生菌のみならず死菌も検出されるという問題点がある。蛍光活性染色法は1時間以内に生菌を検出できるため、環境微生物学分野のみならず、飲用水、医薬品製造用水や食品の微生物管理、医療機関や住環境中の生菌の検出にも利用可能であり、今後の積極的な利用が期待される。

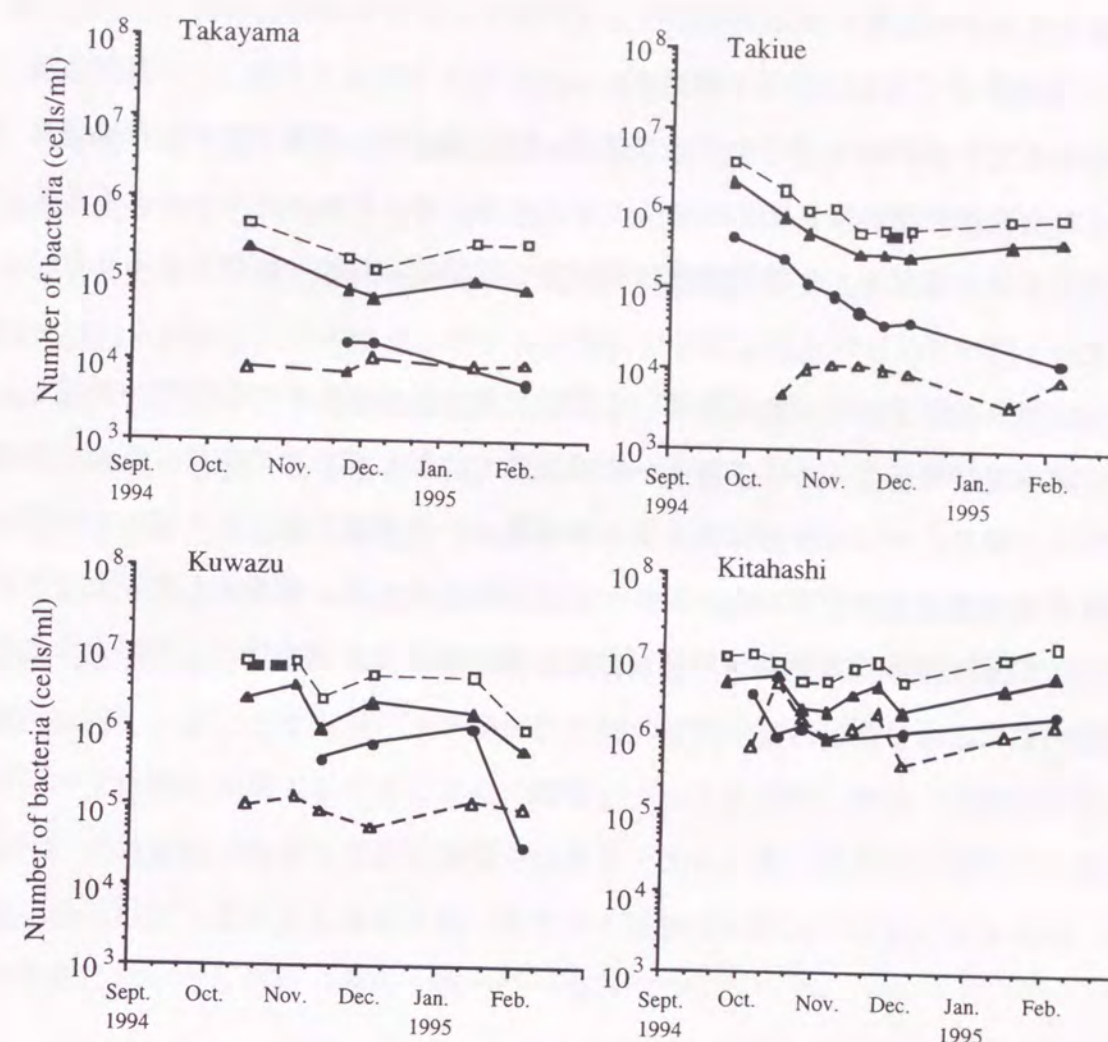


Fig. 4. Changes in number of bacteria at four sampling stations.

(□), total direct counts; (▲), number of esterase-active bacteria determined by 6CFDA staining; (●), number of respiring bacteria determined by CTC staining; (△), colony forming units.

#### 小括

環境中の生理活性を持つ細菌数を測定するための新たな手法として、蛍光活性染色法の開発を行った。蛍光染色剤として、細胞の持つエステラーゼ活性を評価できる6CFDAならびに呼吸能を評価できるCTCを用い、河川水を試料として最適染色条件を検討した。その結果、6CFDA-DAPI二重染色法では、試料水に終濃度0.5mMとなるようにEDTAを添加し、6CFDA濃度を150 $\mu$ g/ml、染色時間を3分間とした場合



に十分な蛍光が得られ、バックグラウンドが低くなることがわかった。また、CTC-DAPI二重染色法ではR2A培地を試料水の10%(v/v)となるように加え、CTC濃度を1.0mMとして30分間振とうすることにより、呼吸能を持つ細菌を特異的に染色できた。これらの蛍光活性染色法を用いることにより、それぞれエステラーゼ活性または呼吸能を持つ細菌を、1時間以内に簡便かつ特異的に検出・計数できるようになった。

次にこれらの蛍光活性染色法を用いて環境の異なる河川水中の細菌数を測定し、寒天平板培地培養法で求めたコロニー形成菌数と比較した。その結果、蛍光活性染色法により求めた河川水中の活性を持つ細菌数は、生菌数計測に広く用いられている寒天平板培地培養法で求めたコロニー形成菌数よりも高い値を示した。したがって、寒天平板培地法では試料中の生理活性を持つ細菌数を過小評価していたことが確かめられた。

## 第二章 フローサイトメトリーによる活性解析系の作成

蛍光活性染色法を河川水や湖沼水中の細菌の活性の評価のみならず、飲料水や無菌水の微生物管理に応用するためには、より短時間で多くの細胞を処理できる解析系が必要となる。蛍光顕微鏡を用いた場合、画像解析装置と組み合わせても、数万個の細胞を計数し、その蛍光シグナルを解析するには過度の労力と時間を要する。さらに、飲用水中の下痢原性細菌の検出など、細菌の持つ活性と同時に核酸配列等の他の情報が必要となる場合には、活性を持つ細菌を分取した上で以降の解析に用いることが有効である。そこでフローサイトメーターに着目した。

フローサイトメーターは流体系中を高速で流れる個々の細胞に励起光を照射し、得られる蛍光を分光して解析する装置である(Fig. 5)。最大の特徴は多数の試料を迅速に解析できることであり、1分間で数万個の細胞を解析可能である。またソーティング機能を利用することにより、特定のシグナルを持つ細胞の分取が可能となる<sup>59)</sup>。真核細胞の解析を目的に開発されてきたために微小な細菌の解析には応用が難しかったが、より蛍光強度の強い染色剤や高感度な機器の開発にともない、細菌の解析においても応用の段階を迎えつつある<sup>60-63)</sup>。

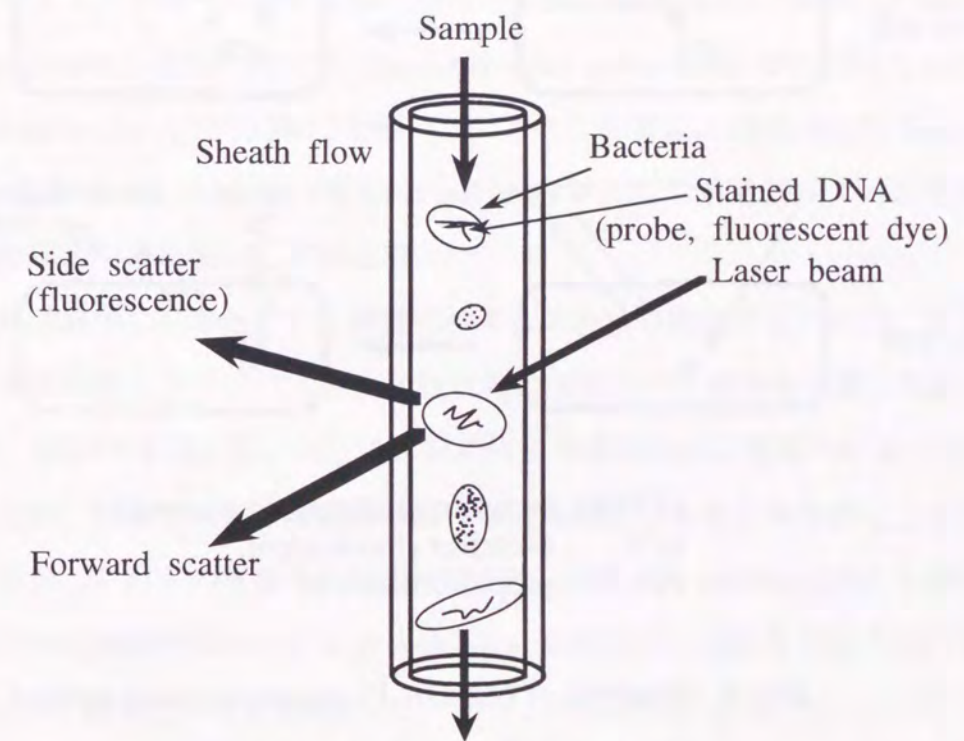


Fig. 5. Principle of flow cytometry.



本研究ではまずフローサイトメトリーと活性染色法を組み合わせた解析系を検討した。次に作成した系を用いて環境の異なる地点から採取した河川水を解析し、河川環境とそこに生息する細菌の活性との関係を考察した。

なお、エステラーゼ活性を持つ細菌の検出にあたっては6CFDA-PI (propidium iodide) 二重染色法<sup>23)</sup>を応用した。6CFDA-PI二重染色法の原理を以下に示した (Fig. 6)。活性を持つ細菌ではPIはその極性のために細胞内に浸透できないのに対し、無極性の6CFDAは細胞内に浸透し、細胞内のエステラーゼにより6CFに加水分解される。この6CFは細胞内に蓄積されるので、波長488nm付近のB励起光により細胞は6CF由来の緑色蛍光を発する。これに対し、活性を失った細菌ではPIが細胞内に浸透し、二本鎖核酸と結合する。また6CFDAは細胞内に入ってもエステラーゼ活性のない状態では6CFに分解されないのので、B励起光により細胞はPI由来の赤色蛍光を発する。したがって、本二重染色法により、発する蛍光色の違いからエステラーゼ活性を持つ細菌と持たない細菌を区別できる<sup>23)</sup>。

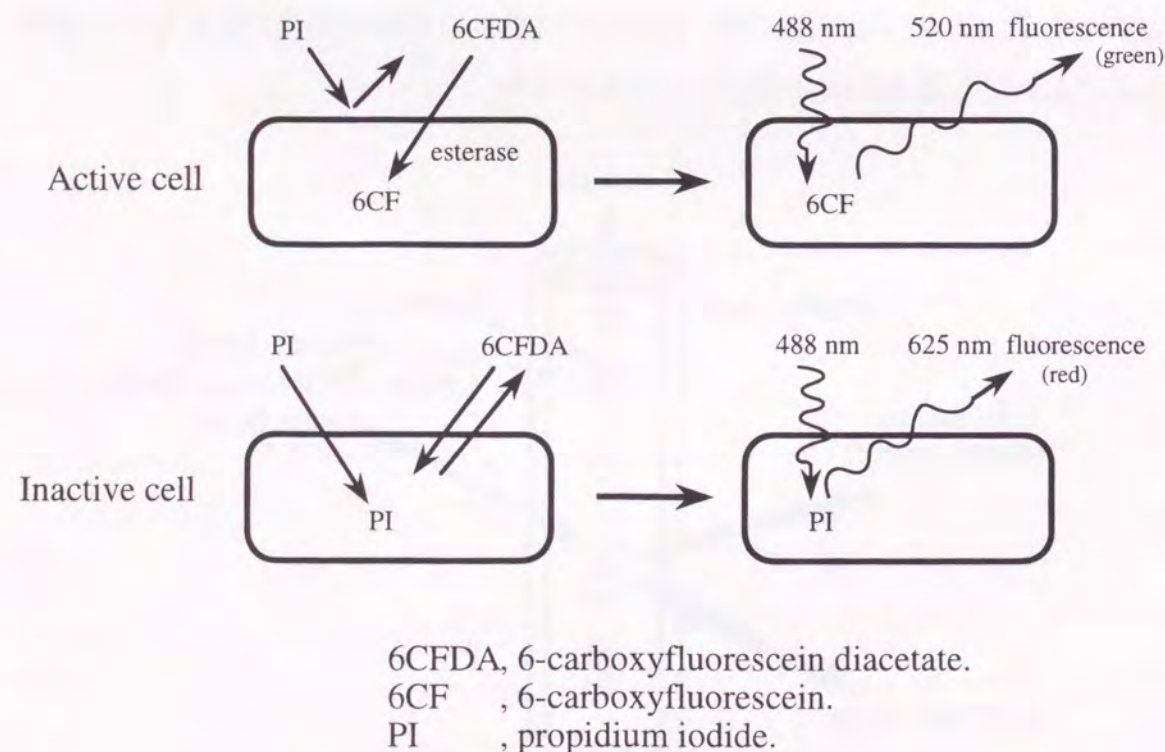


Fig. 6. Principle of 6CFDA-PI double staining method.

## 材料と方法

### 採水地点

河川水の採取は第一章と同じく、箕面川の高山と滝上、猪名川の桑津、寝屋川の北橋において、1994年10月から1995年9月にかけて計10回行った。

### 細菌数ならびに全有機炭素 (TOC) 値の測定

コロニー形成菌数 (CFU) の測定にあたっては、第一章と同様に、R2A培地に試料水を塗布し、25℃で1週間培養した後、培地表面に生じたコロニー数を計測した。

全菌数 (TDC) の測定にはDAPIを用いた。試料水にDAPIを終濃度1 µg/mlとなるように添加し、5分間染色した後、ろ過によって試料中の細菌をNuclepore black filter (Costar Scientific Co.; 孔径 0.20 µm) 上に捕集した。フィルターをスライドガラス上に乗せ、エマルジョンオイルで封入し、蛍光顕微鏡で観察した。試料の観察には第一章と同様、蛍光顕微鏡BH2 (オリンパス) を用いた。

全有機炭素 (TOC) 値は、TOC-500 (島津) により測定した。

### 細菌株

フローサイトメトリーの条件検討にあたっては、*Escherichia coli* K-12 W3110, *Pseudomonas putida* ATCC12633, *Staphylococcus epidermidis* IFO3762ならびに *Bacillus megaterium* ATCC12872を用いた。これらの菌株はLB培地 (1% Bacto tryptone, 0.5% Yeast extract, 1% NaCl [pH 7.0]) 中30℃で前培養後、対数増殖期および定常期まで本培養し、実験に用いた。

また自然環境中に分布している細菌に対する染色性を確認するために、箕面川上流の滝上から単離したT-3, T-7株、大阪市内の寝屋川の北橋から単離したK-1, K-5, K-7, K-10の6株を用いた。これらの河川単離株は0.05培地<sup>64)</sup>により25℃で前培養した後、同条件で対数増殖期あるいは定常期になるまで本培養したものを使用した。なお、これらの単離株の同定にはAPI 20NE (Bio Mérieux S.A.) を用いた。

実験に用いた細菌株については growth curveを作成し、以降の実験においては growth phaseを揃えたものを使用した。



### CTC染色

試料にCTC (Polysciences; 50mM 水溶液) を終濃度0.5mMとなるように添加し、遮光下25℃で30分間振とうさせた。染色後、直ちにフローサイトメーターで解析を行った。

### 6CFDA-PI二重染色

試料を染色用バッファー (終濃度 0.1M phosphate buffer [pH8.5], 5% NaCl, 0.5mM EDTA) と混合し、6CFDA (Sigma; 10mg/ml アセトン溶液) とPI (Sigma; 0.5mg/ml となるように0.1M Tris-0.1M NaCl-1M HCl溶液 [pH7.5]に溶解) をそれぞれ終濃度10 $\mu$ g/mlとなるように添加した。室温、遮光下で5分間染色した後、直ちにフローサイトメーターで解析した。

### 試料の固定

試料の固定は湯浴を用いて90℃、10分間の加熱処理により行った。熱固定後の試料の染色にあたっては30分以上放置し、室温まで冷ましたものを用いた。なお、熱固定後の細菌をDAPIで染色し蛍光顕微鏡により観察したところ、細菌数の減少ならびに形態の変化は認められなかった。

### フローサイトメトリー

フローサイトメーターはEPICS Elite (Coulter) を用いた。使用したレーザー光は波長488nm、出力15mW である。光軸調整は蛍光ビーズであるDNA Check (Coulter; 直径10 $\mu$ m) およびFluoresbrite (Polysciences; 直径1.66 $\mu$ m) を用いて行った。細菌と細菌以外の粒子を区別するためのディスクリミネーションには、波長488nmの側方散乱光を用いた。細菌細胞の解析には細菌の大きさを反映する前方散乱光ならびに各蛍光染色剤由来の蛍光を検出・測定した。6CF由来の蛍光の解析には525nmバンドパスフィルターを用い、PIおよびCTC-formazan由来の蛍光の解析には625nmのダイクロイックフィルターを使用した。各試料について1秒間あたり150から300細胞の流速で計35,000細胞を解析した。

活性を持つ細菌の解析にあたり、呼吸能を持つ細菌の解析には前方散乱光とCTC-

formazan由来の赤色蛍光を表すスキャッターグラムを、エステラーゼ活性を持つ細菌の解析には6CF由来の緑色蛍光とPI由来の赤色蛍光を表すスキャッターグラムを用いた。まず、熱固定した試料を解析し、各スキャッターグラム上で活性を失った細菌のシグナルが特異的に現れる部分を求め、ゲートを設定した。次に固定していない試料を解析し全菌数を求めると同時に、固定した試料により先に設定したゲートを用いて、全菌数に占める活性を持つ細菌数の割合を求めた。

### 結果と考察

フローサイトメトリーにあたって、まず*Escherichia coli* を用いて各染色条件、解析条件を検討した。はじめにCTC濃度を検討したところ、1.0mM以上ではCTC-formazan由来のシグナルを発する細菌数が多くなり、逆に全菌数が減少する傾向が見られた。結果としてCTC濃度を0.5mMとして30分間染色した場合に呼吸能を持つ細菌と持たない細菌を明確に区別できることがわかった (Fig. 7)。なお、呼吸能を持つ細菌を蛍光顕微鏡を用いて検出する場合には、CTC染色時に培地成分や電子授与体を添加することにより検出効率が高まることが報告されている<sup>25,27)</sup>。そこで様々な濃度の培地成分 (0.05培地, R2A培地) やメルドラブルー (9-dimethyl amino benzo- $\alpha$ -phenazoxonium chloride; ドーজন) を添加し、フローサイトメトリーにおける検出感度の向上を試みた。しかしながら、これらの添加によってノイズが増加し、検出感度は上がらなかった。培地成分やメルドラブルーは添加直前に孔径0.2 $\mu$ mのフィルターによって微小粒子を除いたものを使用している。したがって、今回ノイズが増加した原因は染色中にCTC-formazanの微小な結晶が非特異的に生じたためであると考えられた。

次に、6CFDA-PI二重染色法についても最適染色条件、解析条件を検討したところ、6CFDA, PIともに終濃度10 $\mu$ g/mlとなるように添加し、5分間染色した場合にエステラーゼ活性を持つ細菌は6CFDA由来の強い緑色蛍光を発し、またPI由来の赤色蛍光はほとんど発しなかった。逆に、活性を持たない細菌は強い赤色蛍光を発することがわかった (Fig. 8)。なお染色時間の延長にともない緑色蛍光のバックグラウンドが高くなったが、これは非特異的な6CFDAの加水分解が起こるためだと考えられた。また6CFDA濃度を過剰にした場合は、6CFDA由来のシグナルがPIの蛍光を検



出するためのチャンネルにもれ込んでしまうために、活性を持つ細菌と持たない細菌を区別しにくくなることがわかった。

いずれのフローサイトメトリーにおいても10,000個の細菌を解析するのに要した時間は1分以下であった。蛍光顕微鏡を用いた場合は10,000個の細菌の解析に2時間以上必要となることから、フローサイトメーターを利用することにより、蛍光顕微鏡と比較してより多くの試料を迅速に解析できることが確かめられた。

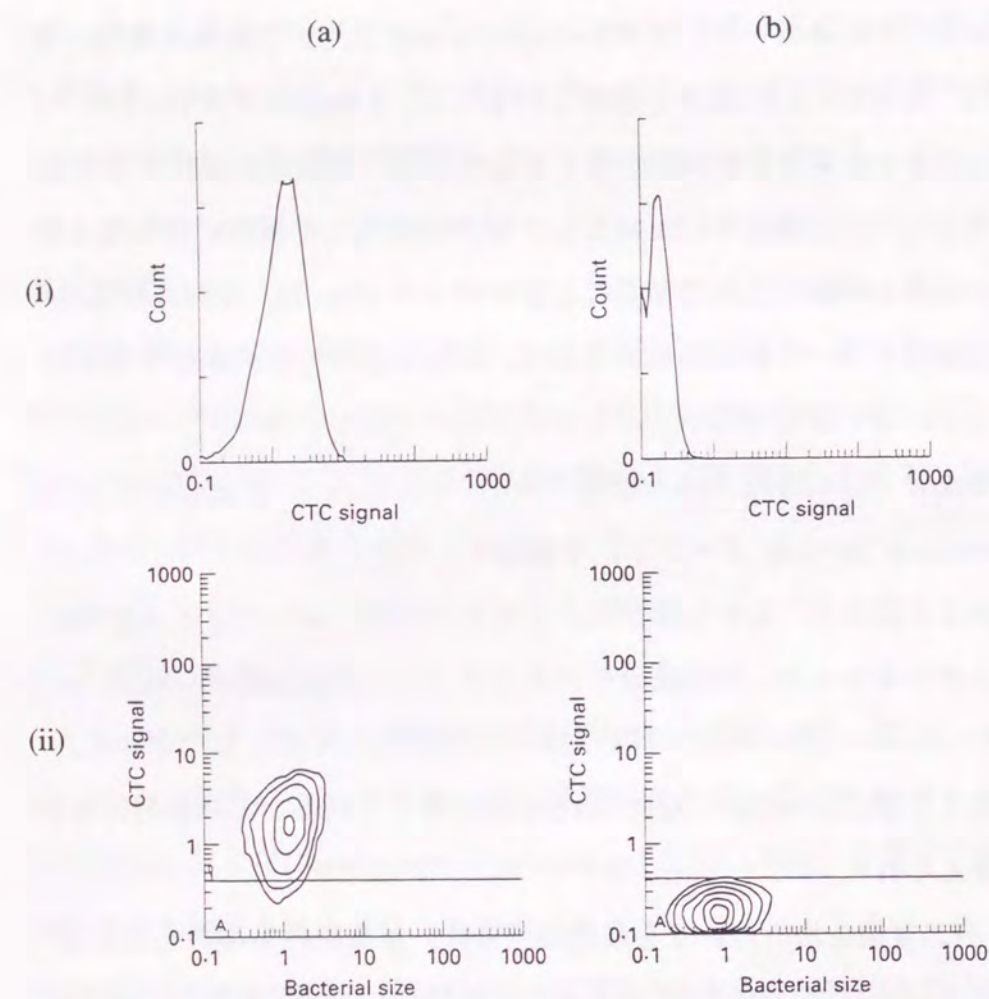


Fig. 7. Flow cytometric analysis of *E. coli* stained with CTC. *E. coli* in logarithmic phase (a) and heat-treated (b) were analyzed. Fluorescence intensity of CTC-formazan produced was measured (i) and analyzed two dimensionally (ii).

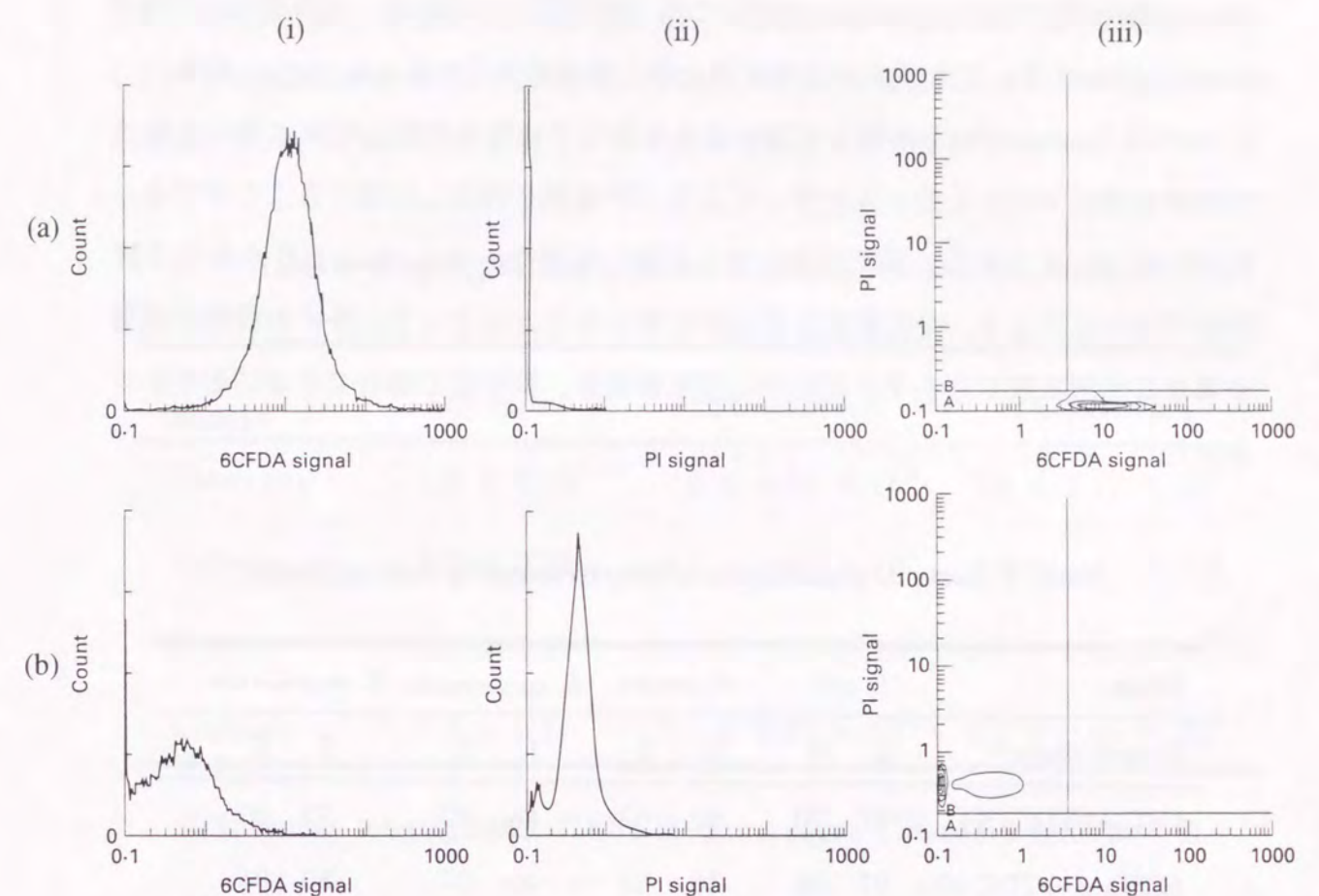


Fig. 8. Flow cytometric analysis of *E. coli* stained with 6CFDA and PI. *E. coli* in logarithmic phase (a) and heat-treated (b) were analyzed. Fluorescence intensity of 6-carboxy fluorescein (i) and propidium iodide (ii) was measured. Two dimensional analysis was also performed (iii).

蛍光染色剤は一般的に染色対象とする細菌の属種や生理状態によってその染色性が変化する。例えば、6CFDAの未修飾体であるfluorescein diacetate (FDA) はグラム陽性細菌に対する染色性は高いが、グラム陰性細菌はほとんど染まらない。したがって、蛍光活性染色法を用いて実際の環境試料を解析していくにあたっては、細菌種やgrowth phaseの変化にともなう6CFDA、CTCの染色性の差異を明らかにしておく必要がある。そこで対数増殖期または定常期まで培養した10種の細菌をフローサイトメトリーにより解析し、6CFDAならびにCTCの染色性を確認した。使用菌株は*Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus megaterium*ならびに河川より単離したグラム陰性菌6株 (T-3, K-1, K-5, K-7,



*Pseudomonas*属; K-10, *Aeromonas*属; T-7, 同定不可)である。その結果, 菌種や growth phaseによってシグナル強度は異なり, 菌体の大きい*B. megaterium*では *E. coli*や*S. epidermidis*と比較して強い蛍光を発していたものの, 実験に用いたすべての細菌株についてそのエステラーゼ活性, 呼吸能を検出し評価することができた (Table 3)。すなわち, 解析対象とする細菌の属種やgrowth phaseにかかわらず解析ができたことより, 今回検討した条件を用いることによって, 多くの種類の細菌が異なる生理状態で存在する試料中の細菌群集を, 数分間で解析できることがわかった。

Table 3. Bacterial physiological activity measured by flow cytometry.

Strain	<i>E. coli</i>		<i>P. putida</i>		<i>S. epidermidis</i>		<i>B. megaterium</i>	
Growth phase*	L	S	L	S	L	S	L	S
CTC(+)/TDC (%)	85	70	60	62	86	80	73	60
6CFDA(+)/TDC (%)	97	93	86	88	99	97	80	96

Strain	K-1	K-5	K-7	T-3	T-7	K-10
Growth phase*	L	L	L	S	S	S
CTC(+)/TDC (%)	70	60	70	81	44	84
6CFDA(+)/TDC (%)	93	78	98	98	80	86

CTC(+), respiring; 6CFDA(+), esterase-active; TDC, total direct count.

\* : L, logarithmic phase ; S, stationary phase.

K-1, K-5, K-7, T-3, *Pseudomonas* sp.; T-7, not identified; K-10, *Aeromonas* sp.

All values are mean (n=2).

以上の検討を行った上で, 本解析系を用いて環境の異なる河川水中に生息する細菌の活性を評価した。採水データをTable 4に示した。第一章で示した結果と同様に TOC値は高山, 滝上よりも桑津, 北橋の方が高く, コロニー形成菌数は高山で

$7.6 \times 10^3$  cells/ml, 滝上で  $9.0 \times 10^3$  cells/ml, 桑津で  $9.2 \times 10^4$  cells/ml, 北橋で  $1.0 \times 10^6$  cells/mlであった。したがって高山, 滝上は有機物による汚染が進んでいない地点, 桑津, 北橋は汚染が進んでいる地点であることが確認された。

Table 4. Total organic carbon and bacterial number in four river water.

Sampling stations	TOC (ppm)	CFU (cells/ml)	TDC (cells/ml)
Takayama	$1.0 \pm 0.50^*$	$7.6 \pm 0.90 \times 10^3$	$2.8 \pm 0.77 \times 10^5$
Takiue	$1.8 \pm 0.36$	$9.0 \pm 0.80 \times 10^3$	$8.6 \pm 1.4 \times 10^5$
Kuwazu	$6.1 \pm 0.67$	$9.2 \pm 1.3 \times 10^4$	$4.9 \pm 0.74 \times 10^6$
Kitahashi	$7.1 \pm 0.71$	$1.0 \pm 0.26 \times 10^6$	$5.7 \pm 0.65 \times 10^6$

CFU, colony forming units; TDC, total direct count; \*, standard error (n=10).

各河川水中の全菌数に占めるコロニー形成細菌数の割合 (CFU/TDC), 呼吸能を持つ細菌数の割合 (CTC(+)/TDC), エステラーゼ活性を持つ細菌数の割合 (6CFDA(+)/TDC)をTable 5に示した。採水期間を通してCFU/TDC値は高山, 滝上, 桑津で2%, 北橋で15%であった。CTC(+)/TDC値は高山, 滝上, 桑津で10~15%, 北橋で30%であり, 呼吸能を持ちながらも培養法では検出できない細菌が高い割合で存在することが確かめられた。6CFDA(+)/TDC値は高山, 滝上で50%, 桑津, 北橋で70~85%であった。すなわち, 河川水中において一般的な寒天平板培地培養法により計数可能な細菌の割合は全菌数の2~15%であるのに対し, 蛍光活性染色法を用いて計数できる細菌の割合は全菌数の10~85%と大きな値であった。河川水中で呼吸を行い酵素活性を発現している細菌は, 有機物質を代謝し生命活動を営んでいるものと考えられる。今回得られた結果より, 従来法ではその活性を評価できなかった河川水中の培養困難な細菌の多くが, 呼吸能や酵素活性を保持しており, 生態系において恒常性の維持や物質循環などに深く関与している可能性が示された。



また細菌はその環境適応性と短い世代交代時間から環境の変化に対して迅速に反応する<sup>65-68)</sup>。したがって環境中の細菌の現存量や活性、群集構造を詳細に解析することにより、その環境の評価および環境の変化の早期予測が可能になるものと考えられる。今回フローサイトメトリーにより得られた全菌数に占めるエステラーゼ活性を持つ細菌数の割合は貧栄養域と汚染域で大きく異なり、河川の汚染度と相関性が見られた。したがって、この割合が河川の有機物汚染に対する環境指標として使用できる可能性が示された。今後はさらに多くの地点について同様の解析を行い基礎データを集積することによって、河川環境と微生物の生理活性の関係をより定量的に解析でき、指標生物としての有用性について考察できるようになるものと期待される。

Table 5. Bacterial physiological activity in river water determined by flow cytometry.

Sampling stations	CFU/TDC (%)	CTC(+)/TDC (%)	6CFDA(+)/TDC (%)
Takayama	2.1 ± 0.49 *	10 ± 3.5	51 ± 5.1
Takiue	1.4 ± 0.24	16 ± 2.3	48 ± 1.3
Kuwazu	2.1 ± 0.48	15 ± 2.5	72 ± 4.2
Kitahashi	15 ± 2.9	28 ± 2.0	86 ± 2.3

CFU, colony forming unit; TDC, total direct count; CTC (+), number of respiring bacteria; 6CFDA(+), number of esterase-active bacteria; \*, standard error (n=10).

#### 小括

微生物の活性のより迅速な解析を目的として、先に検討を行った蛍光活性染色法とフローサイトメトリーとを組み合わせ、標準株、河川単離株ならびに環境の異なる地点から採取した河川水中の細菌の呼吸能、エステラーゼ活性を評価した。細菌の呼吸能の評価にはCTCを、エステラーゼ活性の評価には6CFDA-PI二重染色法を用いた。その結果、本解析系を用いることにより、対象とする細菌の属種やgrowth

phaseにかかわらず、1分間に10,000個以上の細菌の活性を評価できた。蛍光顕微鏡を用いた場合、10,000個の細菌の活性の評価には2時間以上必要となる。したがって、蛍光顕微鏡と比較してより短時間で多くの細菌の活性を評価できるようになった。

次に、環境の異なる河川水中の細菌について解析したところ、寒天平板培地培養法により求めた各試料水のコロニー形成菌数は、特に汚染の進んだ地点を除いては2%以下であった。フローサイトメトリーにより求めた呼吸能を持つ細菌数は全菌数の10%から15%であり、特に汚染の進んだ地点で30%であった。エステラーゼ活性を持つ細菌数は汚染の進んでいない地点では全菌数の約50%、汚染の進んだ地点では全菌数の70%から85%であった。したがって、蛍光顕微鏡による解析結果と同じく河川環境中の培養困難な細菌の多くが呼吸能、酵素活性を保持していることが確かめられた。すなわち、従来法ではその活性を評価できなかった河川水中の培養困難な細菌の多くが、呼吸能や酵素活性を保持しており、生態系において恒常性の維持や物質循環などに深く関与している可能性が示された。

さらに、フローサイトメトリーにより得られた結果では全菌数に占めるエステラーゼ活性を持つ細菌の割合と試料採取地点の有機物濃度に相関性が見られ、この割合が河川の有機物汚染度の生物学的指標として利用できる可能性が示された。本方法は短時間のうちに多検体を解析できるので、今後はさらに多くの地点について同様の解析を行い、基礎データを集積することによって、河川環境と細菌の生理活性の関係をより定量的に解析できるようになるものと期待される。



### 第三章 HNPP-Fast Red TR in situ ハイブリダイゼーション (HNPP-FISH) 法の開発

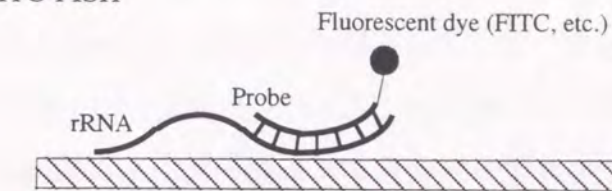
環境中の細菌を解析するにあたっては、その活性の評価を行うとともに特定の細菌を検出することも重要である。臨床分野では感染症の診断と有効な治療のために、体液や排泄物から特定の病原細菌を検出する必要がある。食中毒問題においては発生を未然に防ぎ、被害を最小限に食い止めるために、感染源と感染経路の迅速な解明が重要である。さらに、細菌を指標生物として環境評価に用いるには、どのような環境にどのような細菌が生息するのかを定性的かつ定量的に求める必要があるため、個々の細菌の属種に関する情報が必要となる。

特定細菌をシングルセルレベルで検出する手法として1990年以降、蛍光in situ ハイブリダイゼーション (FISH) 法が用いられつつある<sup>29-31)</sup>。FISH法は蛍光染色剤で5'-末端をラベルしたオリゴヌクレオチドプローブを用いて細菌細胞内のrRNA配列を標的とするハイブリダイゼーションを行い、特定の細菌を検出する方法である。rRNAはリボゾームを構成するRNAであり、界 (kingdom)、科 (family)、属 (genus)、種 (species) 等のレベルで共通な配列をその中に含んでいる<sup>69)</sup>。したがって、目的に応じた配列をプローブとして利用することによって、科や属に関する遺伝情報をもとにした特定細菌の検出が可能になる。

環境微生物学分野においては、fluorescein isothiocyanate (FITC) などの蛍光染色剤で5'-末端をモノラベルしたプローブを用いるFISH法が、その操作の簡便性から現在広く用いられている<sup>32-37)</sup>。しかしながら、本方法には対象とする細菌のrRNA含量が低い場合にはその検出が難しくなるという問題がある。貧栄養環境中の細菌はrRNA含量が低いために、一般的に用いられているFITC-FISH法は貧栄養環境中の特定細菌の検出には感度が不十分である。そこで新たな蛍光基質であるHNPP (2-hydroxy-3-naphthoic acid-2'-phenylanilide phosphate) ならびにFast Red TR<sup>70)</sup>に着目し、より高感度なFISH法としてHNPP-Fast Red TR in situ ハイブリダイゼーション (HNPP-FISH) 法を検討した。

HNPP-FISH法ではまずジゴキシゲニンで5'-末端をラベルしたプローブを用いてin situ ハイブリダイゼーションを行う。次にアルカリフォスファターゼを結合させた

#### FITC-FISH



#### HNPP-FISH

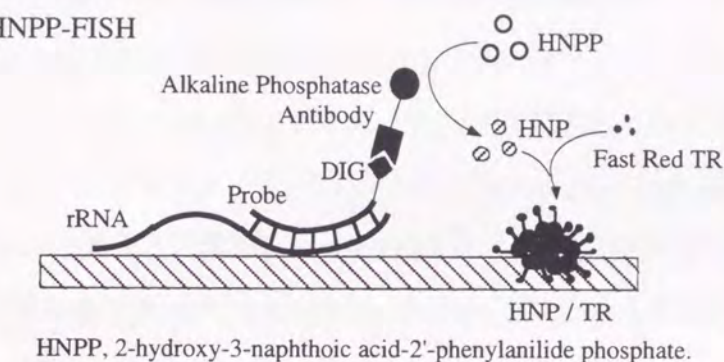


Fig. 9. Principle of FITC-FISH and HNPP-FISH.

いることにより、蛍光シグナルを増強することができる (Fig. 9)。本研究ではこのHNPP-FISH法を用いて細菌を検出するための条件を検討するとともに、一般的に用いられているFITC-FISH法との検出感度の比較を行った。

### 材料と方法

#### 細菌株

実験には *Aeromonas hydrophila* GIFU3173, *Aeromonas sobria* GIFU11325, *Pseudomonas putida* RIMD1626003, *Vibrio campbellii* GIFU10636, *Vibrio parahaemolyticus* RIMD2210001, *Vibrio vulnificus* GIFU10458を用いた。各菌株をLB培地を用いて25℃で対数増殖中期、対数増殖後期ならびに定常期になるまで振とう培養した。

#### 細菌細胞の固定

培養した細菌をPBS (137mM NaCl, 2.68mM KCl, 8.10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.47mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [pH7.2-7.5]) に再懸濁後、12%パラホルムアルデヒド溶液 (PBSに溶解; 用時調製) を終濃度3%(w/v)となるように加え、4℃で16時間固定した。固定細胞

抗ジゴキシゲニン抗体を加えてプローブと結合させる。ここに蛍光基質であるHNPPを添加するとHNPPがHNPに脱リン酸化され、さらにFast Red TRを添加することによって蛍光物質HNP/TRを生成させる。この反応ではアルカリフォスファターゼに活性がある限りHNP/TRが細胞内に沈着する。したがって、このような酵素反応を利用した系を用



はPBSで洗浄し、PBSと等量のエタノールを添加し、 $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した<sup>71)</sup>。

### プローブ

GenBank (release 84.0) に収録されていたデータを用いて独自に設計した *Vibrio*-*Aeromonas* 属に特異的なVAプローブ (5'-ACGACGCACTTTTGGGATTCGCTCACTATCGCAAG-3')を用いた。

### 蛍光 in situ ハイブリダイゼーション

FITCにより蛍光ラベルしたプローブを用いた蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FITC-FISH) は、Amannらの報告をもとに行った<sup>30)</sup>。マイクロチューブ中に固定細胞 (約 $1.5\sim 3.0\times 10^6$  cells) とハイブリダイゼーションバッファー (0.9M NaCl, 0.1%(w/v) sodium dodecyl sulfate [SDS], 20mM Tris-HCl [pH 8.0], probe 200ng) を最終量が50 $\mu\text{l}$ となるように混合し、 $60^{\circ}\text{C}$ で5時間インキュベートした。なおFITCは褪色しやすいため、インキュベートは暗所で行った。インキュベート終了後、バッファー (0.9M NaCl, 20mM Tris-HCl [pH 8.0]) を1ml添加し、ハイブリダイゼーションを止めた。終濃度1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のDAPIを用いて15分間、室温で対比染色を行った後、ろ過によって試料中の細菌をNuclepore black filter (Costar Scientific; 孔径 0.20 $\mu\text{m}$ ) 上に捕集した。フィルターをスライドガラス上に乗せ、エマルジョンオイルで封入し、蛍光顕微鏡BH2 (オリンパス) で観察した。

### HNPP-Fast Red TR in situ ハイブリダイゼーション (HNPP-FISH)

ゼラチンコーティング (0.1% gelatin, 0.01%  $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2$ ) したスライドガラスに固定細胞を10~30 $\mu\text{l}$  滴下し、乾燥させた後、50%, 80%, 100%エタノールに順に各3分間浸すことにより脱水を行った。次に塩化リゾチーム溶液 (0.5mg/ml in 100mM Tris-HCl [pH 8.2], 50mM EDTA) を30 $\mu\text{l}$  滴下して $4^{\circ}\text{C}$ で15分間処理した。ろ過滅菌水で軽く洗浄し、再び50%, 80%, 100%エタノールで脱水を行った後、digoxigeninで標識したオリゴヌクレオチドプローブ200ngを含むハイブリダイゼーションバッファー (0.9M NaCl, 5mM EDTA, 0.1%(w/v) SDS, 20mM Tris-HCl [pH 7.5], 45% formamide) を20 $\mu\text{l}$  滴下し、 $37^{\circ}\text{C}$ で1時間ハイブリダイズさせた。

反応後、ろ過滅菌水で軽く洗浄し、ブロッキング液 (10mg/ml blocking reagent [Boehringer], 100mM Tris-HCl [pH 7.5], 150mM NaCl) を30 $\mu\text{l}$ 滴下して室温で30分間ブロッキング処理を行った。次にアルカリフォスファターゼ結合Anti-digoxigenin Fab fragments (Boehringer) をブロッキング液で150倍希釈した反応液を30 $\mu\text{l}$ 滴下し、室温で45分間反応させた。反応後、バッファー1 (100mM Tris-HCl [pH 7.5], 150mM NaCl, 0.05% Tween20), バッファー2 (100mM Tris-HCl [pH 8.0], 100mM NaCl, 10mM  $\text{MgCl}_2$ ) でそれぞれ室温10分間、2回洗浄後、HNPP-Fast Red TR (アイシンコスモス) 反応液 (HNPPが100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Fast Red TRが250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるようにバッファー2に溶解) を30 $\mu\text{l}$  滴下し、室温で30分から90分間反応させた。ろ過滅菌水で洗浄した後、DAPIにより対比染色を行い、MacIlavaine buffer (53.2mM citric acid, 93.6mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  [pH 4.5]) 10 $\mu\text{l}$  で封入し、蛍光顕微鏡BH2で観察・計数を行った。なお、HNP/TR由来の蛍光の観察には励起フィルター BP490+EY455, ダイクロイックミラー DM500, 吸収フィルター O515を用いた。DAPIにより染色した細菌の観察には励起フィルター UG1, ダイクロイックミラー DM400, 吸収フィルターL420を用いた。

### 結果と考察

HNPP-FISH法では分子量約17万の抗体を使用する。この抗体を菌体内に浸透させるためには細胞の前処理が必要となる。そこで、細胞壁の透過性を上げるために、リゾチーム処理を検討した。すなわち、HNPP-FISH法で *Aer. hydrophila* を検出するにあたり、それぞれ0, 0.001, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0mg/mlとなるようにリゾチームを加え、 $4^{\circ}\text{C}$ で15分間処理した後、HNPP-FISHを行った。その結果、リゾチームを添加しなかった場合はHNP/TRの蛍光はほとんど見られなかった。リゾチーム濃度0.01mg/mlから1.0mg/mlでは検出に十分な蛍光が見られ、5.0mg/mlではさらに強い蛍光が見られた (Fig. 10)。しかしながら、1.0mg/ml以上のリゾチームで処理した場合は溶菌が見られたため、菌体の前処理に用いるリゾチーム濃度は0.5mg/mlとした。



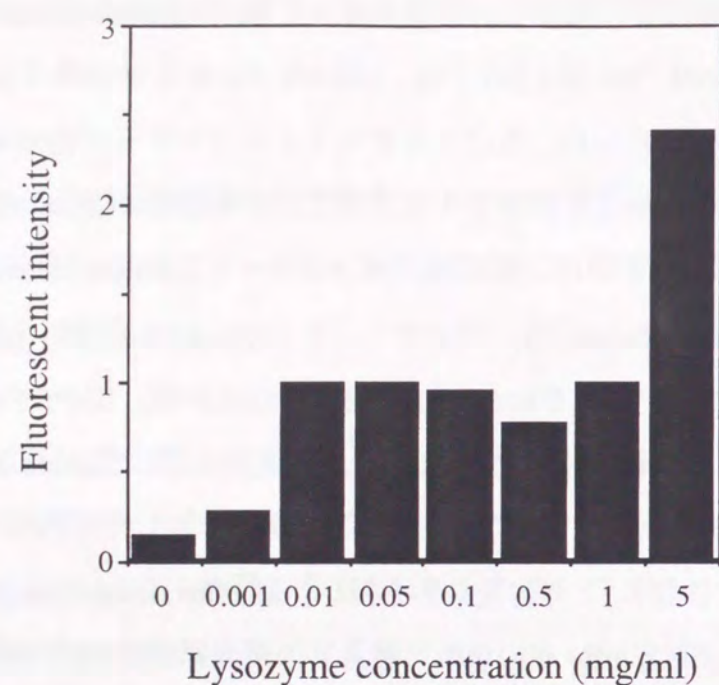


Fig. 10. Optimization of lysozyme treatment.

FISH法を用いて特定の細菌を検出するにあたっては、ハイブリダイゼーションの時間が重要となる。そこで次にハイブリダイゼーションの時間を検討した。すなわち、HNPP-FISH法で*Aer. hydrophila*を検出するにあたり、ハイブリダイゼーションの時間を10分、30分、1時間、2時間、3時間、5時間、7時間、9時間、11時間、13時間と変化させ、*Aer. hydrophila*の蛍光強度を測定した。その結果、ハイブリダイゼーションの時間を30分以上にした場合に十分な強度の蛍光が見られたが (Fig. 11)、ハイブリダイゼーションの時間が7時間以上になるとバックグラウンドが高くなり、細菌の観察が困難になった。そこで、HNPP-FISHにおけるハイブリダイゼーションの時間を1時間とした。

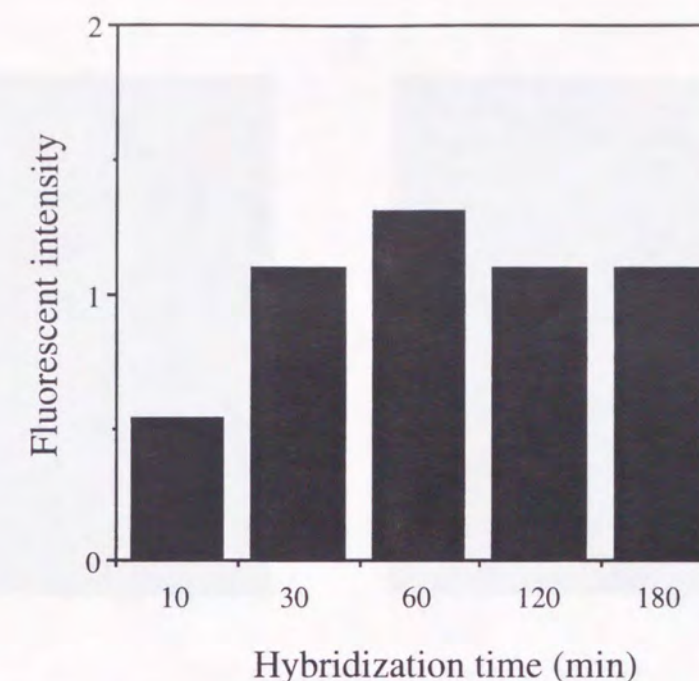


Fig. 11. Optimization of hybridization time.

以上、HNPP-FISH法の条件検討を行った上で、*Aer. hydrophila*と*Ps. putida*を試料として、FITCで5'末端をモノラベルしたプローブを用いたFISH (FITC-FISH) ならびにHNPP-FISHを行い、DAPIで対比染色した後、結果を比較した。

FITC-FISHの結果をFig. 12に示した。UV励起光下ではDAPI由来の蛍光を発する*Aer. hydrophila*と*Ps. putida*の両方が観察できるのに対し、B励起光下ではプローブとハイブリダイズする*Aer. hydrophila*のみが特異的に緑色のシグナルを発していた。しかしながら、FITCの蛍光は1分以内で褪色し、詳細な観察が難しかった。

次に同じ試料にHNPP-FISHを行った結果をFig. 13に示した。FITC-FISHの結果と同様、UV励起光下では両方の細菌が観察できるのに対し、B励起光下では*Aer. hydrophila*のみが特異的にシグナルを発していた。このHNP/TR由来の赤色蛍光は褪色がなく、強い蛍光を発した。



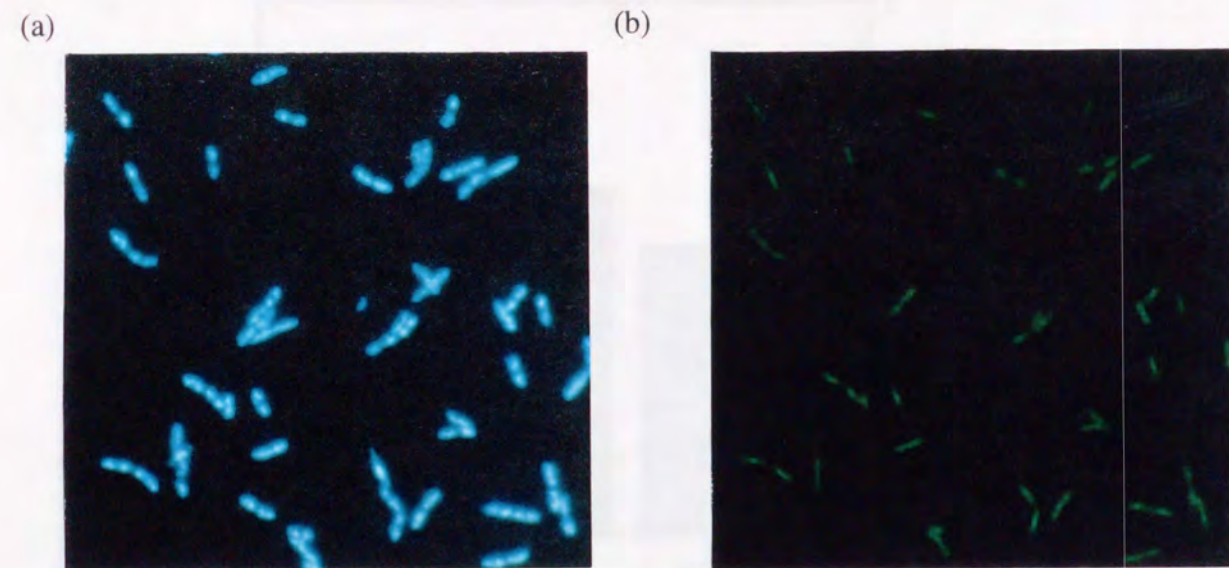


Fig. 12. Fluorescent in situ hybridization with mono-FITC-labeled oligonucleotide probes. *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas putida* were hybridized with the *Vibrio-Aeromonas* specific probe (FITC-labeled). (a) UV excitation (exposure time, 2 s); (b) B excitation (exposure time, 15 s).

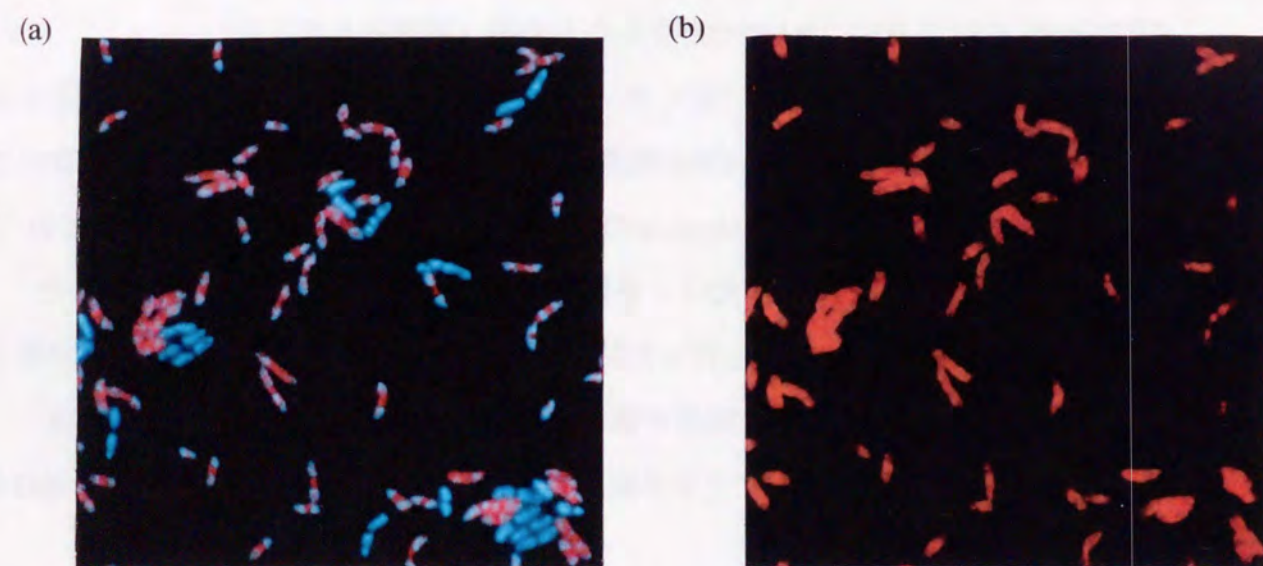


Fig. 13. Specific identification of target bacterial cells with HNPP-Fast Red TR in situ hybridization. *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas putida* were hybridized with the *Vibrio-Aeromonas* specific probe (digoxigenin-labeled). (a) UV excitation (exposure time, 2 s); (b) B excitation (exposure time, 5 s).

さらに本HNPP-FISH法の蛍光増強性を評価するために、対数増殖後期の *Aeromonas* 属の菌株2種ならびに *Vibrio* 属の菌株3種に対してFITC-FISHならびにHNPP-FISHを行い、その蛍光強度を比較した。その結果、HNPP-FISHを用いることにより、FITC-FISHよりも *Aer. sobria* では1.9倍、*Aer. hydrophila* では3.3倍、*V. parahaemolyticus* では5.5倍、*V. campbellii* では4.5倍、*V. vulnificus* では4.6倍蛍光強度が上がった (Fig. 14)。

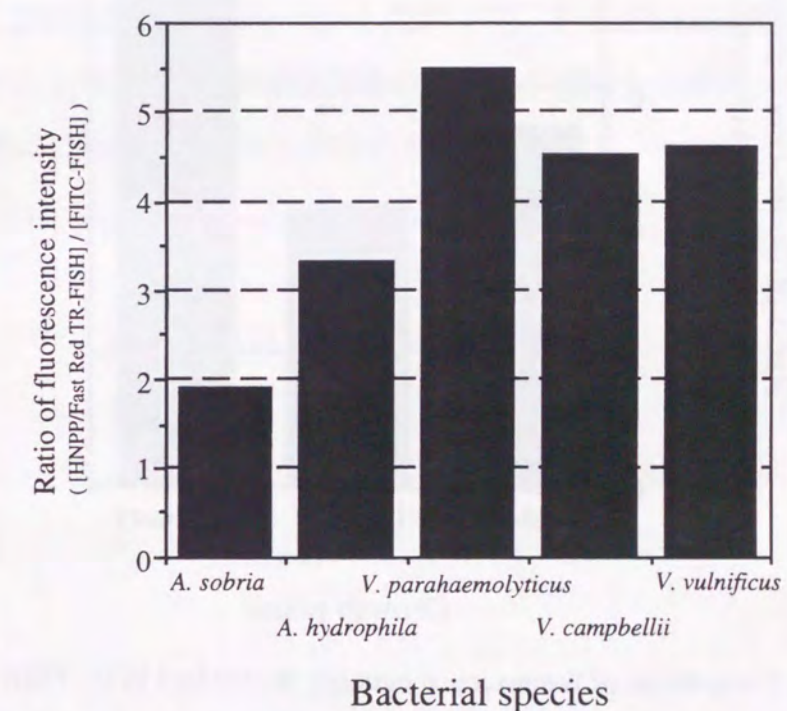


Fig. 14. Comparison of fluorescence intensity in standard FITC-FISH and in HNPP-FISH of various *Aeromonas* and *Vibrio* species.

FISHにおいては、ハイブリダイズするプローブの量が検出対象となる細菌のrRNA含量により変化すること<sup>29)</sup>、また細菌細胞内のrRNA含量は細菌のgrowth phaseによって大きく変化することが報告されている<sup>72)</sup>。そこで、growth phaseの異なる *Aer. hydrophila* に対してFITC-FISHならびにHNPP-FISHを行い、その蛍光強度を比較した。その結果、HNPP-FISHを用いることにより、FITC-FISHよりも対数増殖中期では5.5倍、対数増殖後期では4倍、定常期では8倍以上蛍光強度が上がるということがわかった (Fig. 15)。したがって、本HNPP-FISH法は現在広く用いられているFITC-



FISH法よりも高感度であり、環境中の微小な細菌、またrRNA含量の低い細菌に対しても、科や属を対象とした特異的な検出に有効であることがわかった。

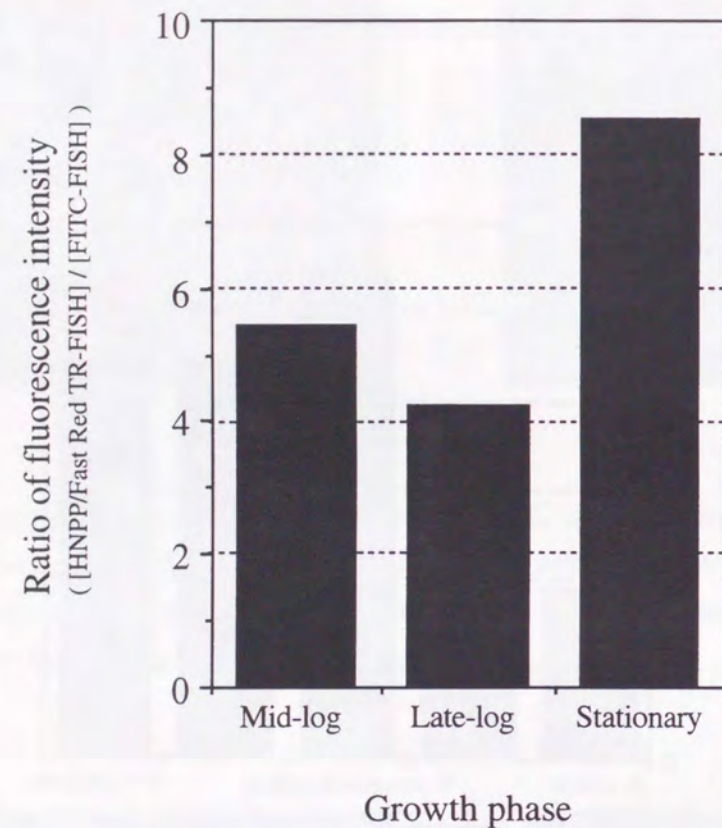


Fig. 15. Comparison of fluorescence intensity in standard FITC-FISH and in HNPP-FISH of *Aeromonas hydrophila* in different growth phases.

#### 小括

より高感度な特定細菌の検出法として、酵素反応により蛍光シグナルを増幅する HNPP-FISH法を検討した。

本HNPP-FISH法では抗体を菌体内に浸透させる必要があるため、細胞壁の処理条件を検討した。その結果、0.5mg/mlのリゾチームを用い、4℃で15分間処理した場合に十分な蛍光シグナルの得られることがわかった。また、ハイブリダイゼーションの時間についても検討した結果、1時間が最適であることがわかった。

HNPP-FISH法の条件を検討した上で、*Vibrio*属ならびに*Aeromonas*属の細菌5株に

対してFITC-FISHならびにHNPP-FISHを行い、その蛍光強度を比較した。その結果、HNPP-FISH法を用いることにより、FITC-FISH法よりも2～6倍蛍光強度が上がることをわかった。また、HNPP-FISH法では蛍光の褪色が無く、蛍光顕微鏡下での詳細な観察が可能であった。さらに、rRNA含量の低い細菌に対する本手法の検出感度を評価するために、growth phaseの異なる細菌を試料として、FITC-FISHならびにHNPP-FISHを行い、その蛍光強度を比較した。その結果、HNPP-FISH法では従来のFITC-FISH法に比べて、対数増殖中期では5.5倍、対数増殖後期では4倍、定常期では8倍以上蛍光強度が上がった。したがって、本HNPP-FISH法は一般的に用いられているFITC-FISH法よりも高感度であり、環境中の微小な細菌、またrRNA含量の低い細菌の検出に有効であることがわかった。



## 第四章 蛍光染色法の活性汚泥解析への応用

活性汚泥を用いた下水や排水の生物学的処理法は、過剰なエネルギーを必要とせず処理能力が高いために、現在世界各地で広く用いられている。しかしながら、活性汚泥中の細菌の多くは培養法では検出が難しく<sup>33,34)</sup>、顕微鏡観察では優先種として確認できる糸状菌が培養法では全く検出できない等の例も報告されている<sup>73)</sup>。活性汚泥の有機物処理能力と細菌群集構造の関係を明らかにすることにより、活性汚泥の微生物学的側面からの管理、さらには効率的な水処理が可能となるにもかかわらず、手法的な制約からいまだ活性汚泥はブラックボックスとして扱われているにすぎない。

また活性汚泥はOECD法<sup>38)</sup>やSCAS法<sup>74)</sup>、MITI法<sup>39,40)</sup>などの化学物質生分解試験において、供試物質の自然環境中での生分解性を評価するための微生物源として用いられている。これらの生分解試験の信頼性や再現性の向上のためには、微生物源である活性汚泥の群集構造を理解しておく必要がある。

そこでこれまでの研究で検討した蛍光染色法を、活性汚泥の微生物学的評価に応用した。すなわち、蛍光活性染色法を用いて活性汚泥中の細菌の活性を評価するとともに、HNPP-FISH法を用いて活性汚泥の細菌群集構造の解析を行った。

### 材料と方法

#### 活性汚泥

下水処理場の活性汚泥として、合流式都市型下水処理場である南吹田下水処理場（大阪府吹田市；処理能力50,000m<sup>3</sup>/日）の返送汚泥を1996年11月および1997年1月に採取した。本下水処理場は最初沈殿池、曝気層（15,000m<sup>3</sup>；ステップエアレーション法；水理学的滞留時間 7時間）、最終沈殿池（7,500m<sup>3</sup>）から構成されている。汚泥日齢は2.5日で、BOD-SS負荷は0.3 kg/SSkg/日である。

化学物質生分解試験法であるMITI法で微生物源として用いられる標準活性汚泥は1995年10月ならびに1996年7月に財団法人化学品検査協会より配布されたものを使用した。この標準活性汚泥は日本各地計10ヶ所の下水処理場や湖沼、河川から得た活性汚泥や表層水を混合して調製されており、その配布に先立って0.1%合成下水

(0.1%(w/v) glucose, peptone, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [pH 7.0±1.0]) を用いて1カ月間馴化されている<sup>39,40)</sup>。標準活性汚泥の馴化にあたっては、その回分培養時に「曝気の停止 → 30分間静置 → 全量の1/3の上清を除去 → 新しい培地の添加と曝気の再開」の一連の操作を1日1回繰り返している<sup>39,40)</sup>。したがって、上清部と沈殿部では細菌群集構造が異なる可能性があるため、曝気を止めた後30分静置して上清部と沈殿部に分け、各々について実験を行った。

#### 活性汚泥の分散

下水処理場活性汚泥ならびに標準活性汚泥上清部では希釈を行わずにバス型超音波処理機 (JUS-S01; JEOL) を用いて125W, 400kHzで1分間処理し、分散させた。標準活性汚泥沈殿部は0.1%合成下水で10倍希釈した後、同超音波処理機を用い125W, 400kHzで5分間処理した。

#### 細菌数計測

コロニー形成菌数の計測にはR2A培地を用い、前述と同様25℃で1週間培養することにより測定した。

全菌数ならびにエステラーゼ活性を持つ細菌数は第一章の6CFDA-DAPI二重染色法により測定した。

#### オリゴヌクレオチドプローブ

今回実験に用いたプローブの配列をTable 6に示した。検出対象とする細菌はそれぞれP(I) : *Pseudomonas* (rRNA group I), VA : *Vibrio-Aeromonas* グループ, FC : *Flavobacterium-Cytophaga* グループ, BPA : *Burkholderia-Comamonas-Alcaligenes* グループ, Ac : *Acinetobacter* 属である。これらのプローブはGenBank (release 84.0) に登録された配列をもとに設計したものであり、その特異性は標準株を用いて確認している<sup>75)</sup>。また、真正細菌の検出にはEUB338<sup>71)</sup>を、negative controlとしてはNON<sup>76)</sup>を用いた。プローブの5'末端はfluorescein isothiocyanate (FITC) またはジゴキシゲニンでラベルし、蛍光 in situ ハイブリダイゼーションに用いた。



Table 6. Probe sequences and target sites for in situ hybridization.

Probe	Target	Oligonucleotide sequence	Location
P(I)	<i>Pseudomonas</i> (rRNA group I)	5'-ATTTC AGCCT ACCAC CTAA-3'	1467-1486 <sup>a</sup>
VA	<i>Vibrio - Aeromonas</i>	5'-ACGAC GCACT TTTTG GGATT CGCTC ACTAT CGCAA G-3'	1262-1297 <sup>b</sup>
FC	<i>Flavobacterium - Cytophaga</i>	5'-AGGTA CCCCC AGCTT CCATG GCT-3'	1408-1434 <sup>b</sup>
BPA	<i>Burkholderia</i> - <i>Comamonas</i> - authentic <i>Alcaligenes</i>	5'-GTGTG CCGGT TCTCT TTCGA GCAC-3'	1022-1044 <sup>b</sup>
Ac	<i>Acinetobacter</i>	5'-GCGCC ACTAA AGCCT CAAAG GCC-3'	836-858 <sup>b</sup>
EUB338	domain <i>Bacteria</i>	5'-GCTGC CTCCC GTAGG AGT-3'	338-355 <sup>b</sup>
NON	Negative control	5'-ACTCC TACGG GAGGC AGC-3'	

<sup>a</sup>Homologous position on *E.coli* 23S rRNA.<sup>b</sup>Homologous position on *E.coli* 16S rRNA.

## 細胞固定

試料中の細菌は、第三章と同様の方法でパラホルムアルデヒドにより固定した。

## 蛍光 in situ ハイブリダイゼーション

FITCラベルしたプローブを用いた蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FITC-FISH) は第三章と同様にして行った。

HNPP-FISHは第三章に述べた方法を改良して行った。ゼラチンコーティング (0.1% gelatin, 0.01% KCr(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) したスライドグラスに試料を10~30μl 滴下し、乾燥させた後、50%, 80%, 100%エタノールに順に各3分間浸すことにより脱水を行った。次に塩化リゾチーム溶液 (0.5mg/ml in 100mM Tris-HCl [pH8.2], 50mM EDTA) を30μl 滴下して4℃で15分間処理した後、ろ過滅菌水で軽く洗浄し、再び50%, 80%, 100%エタノールで脱水を行った。proteinase K (0.1μg/ml in 10mM Tris-HCl [pH7.5], 1mM EDTA) を30μl 滴下し室温で3分間処理後、ろ過滅菌水で軽く洗浄し、再び50, 80, 100%エタノールで脱水を行った。次に、digoxigeninで

標識したオリゴヌクレオチドプローブ200ngを含むハイブリダイゼーションバッファー (0.9M NaCl, 5mM EDTA, 0.1%(w/v) SDS, 20mM Tris-HCl [pH7.5], formamide: EUB338とFCプローブは30%; AcとBPAプローブは40%; P(I) とVAプローブは45%) を20μl 滴下し、37℃で1時間ハイブリダイズさせた。反応後、37℃, 室温, 4℃の各ろ過滅菌水で軽く洗浄し、ブロッキング液 (30μg/mlとなるように Bovine AlbuminをPBSに溶解) を30μl滴下して室温で30分間ブロッキング処理を行った。次にブロッキング液を15μl 除いた後、アルカリフォスファターゼ結合 Anti-digoxigenin Fab fragments (Boehringer) をブロッキング液で60倍希釈しTween 20 を1%となるように加えた液を15μl滴下して混合し、室温で45分間反応させた。反応後バッファー 1 (100mM Tris-HCl [pH7.5], 150mM NaCl, 0.05% Tween20), バッファー 2 (100mM Tris-HCl [pH8.0], 100mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>) でそれぞれ室温下10分間, 2回洗浄後, HNPP-Fast Red TR (Aisin Cosmos) 反応液 (HNPPを100 μg/ml, Fast Red TRを250μg/mlとなるようにバッファー 2 に溶解) を30μl 滴下し, 室温で30分間反応させた。このHNPP-Fast Red TR反応を4回繰り返した後, ろ過滅菌水で軽く洗浄した。第三章と同様にしてDAPIによりカウンター染色を行い, MacIlavaine buffer (53.2mM citric acid, 93.6mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> [pH4.5]) 10μl で封入し, 蛍光顕微鏡BH2 (オリンパス) で観察・計数を行った。

## 結果と考察

活性汚泥の細菌数計測や細菌群集構造解析にあたっては、まず微生物の凝集体 (フロック) を分散させる必要がある。そこで、超音波処理による分散条件の検討を標準活性汚泥を用いて行った。

Fig. 16は合成下水で10倍希釈した標準活性汚泥沈殿部について、125W, 400kHzでの超音波処理時間と細菌数の関係を表した結果である。超音波処理1分以下ではフロックが多く、全菌数 (TDC) ならびにエステラーゼ活性を持つ細菌数 (6CFDA (+)) を蛍光顕微鏡下で計測することは困難であった。超音波処理3分でフロックはかなり消失し、5分以上で完全に消失した。またコロニー形成細菌数 (CFU), 全菌数, エステラーゼ活性を持つ細菌数ともに超音波処理を5分以上に延長しても変化しなかった。したがって、標準活性汚泥沈殿部については合成下水で10倍希釈し、



125W, 400kHzで5分間超音波処理することとした。また、下水処理場活性汚泥ならびに標準活性汚泥上清部では希釈を行わずに125W, 400kHzで1分間超音波処理することによりフロックは完全に分散した。したがって、以降の実験にはこれらの条件で分散させた活性汚泥を用いた。

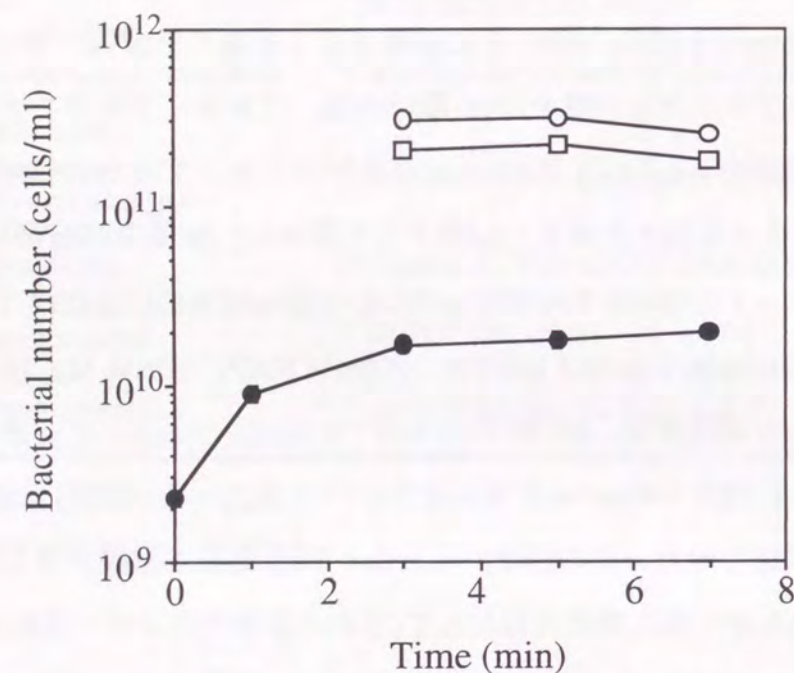


Fig. 16. Bacterial number after sonication for dispersion of activated sludge. (○), total bacterial number determined by DAPI-staining; (□), number of esterase-active bacteria determined by 6CFDA-staining; (●), number of colony forming bacteria on R2A medium.

下水処理場より採取した活性汚泥ならびに標準活性汚泥を寒天平板培地培養法、蛍光活性染色法、HNPP-FISH法で解析した結果をそれぞれTable 7, Table 8およびFig. 17, Fig. 18に示した。標準活性汚泥中にはUV励起下で黄色に光り、HNPP-FISHにおいてEUBプローブとハイブリしないグラム陽性の双球菌 (Fig. 19) が高い割合で存在したため、これらを別に計数し、結果をHNPP-FISHの結果と合わせた。なお、Wagnerらは5'末端を蛍光染色剤でモノラベルしたプローブを用いたFISH法を用いてドイツの都市下水処理場曝気層より採取した活性汚泥を解析し、全菌数の78±10%を真正細菌に特異的なEUB338プローブにより検出できたことを報告して

いる<sup>35)</sup>。そこで南吹田下水処理場から採取した活性汚泥にEUB338をプローブとしてWagnerらと同様にFITC-FISHを行ったところ、全菌数の70%以上の細菌が検出できた。しかしながら標準活性汚泥をFITC-FISHにより解析したところ、EUBプローブを用いて検出できた細菌は全菌数の5%以下であり、標準活性汚泥の解析にはFITC-FISH法の応用が難しいことがわかった。したがって、活性汚泥の微生物群集構造の解析にあたってはHNPP-FISH法を用いることとした。

Table 7. Bacterial number in activated sludge from Minami-Suita wastewater treatment plant.

Sampling date	CFU	6CFDA(+)	TDC
20 Nov. 1996	$3.3 \times 10^8$	$5.6 \times 10^9$	$7.0 \times 10^9$
29 Jan. 1997	$5.5 \times 10^8$	$1.3 \times 10^9$	$2.3 \times 10^9$

unit, cells/ml.

Table 8. Bacterial number in standard activated sludge.

Sampling date		CFU	6CFDA(+)	TDC
19 Oct. 1995	Supernatant	$3.1 \times 10^7$	$1.8 \times 10^8$	$5.5 \times 10^8$
	Floc	$1.8 \times 10^9$	$1.8 \times 10^{10}$	$3.0 \times 10^{10}$
19 Jul. 1996	Supernatant	$6.0 \times 10^7$	$1.2 \times 10^9$	$2.0 \times 10^9$
	Floc	$4.8 \times 10^{10}$	$1.7 \times 10^{11}$	$3.0 \times 10^{11}$

unit, cells/ml.



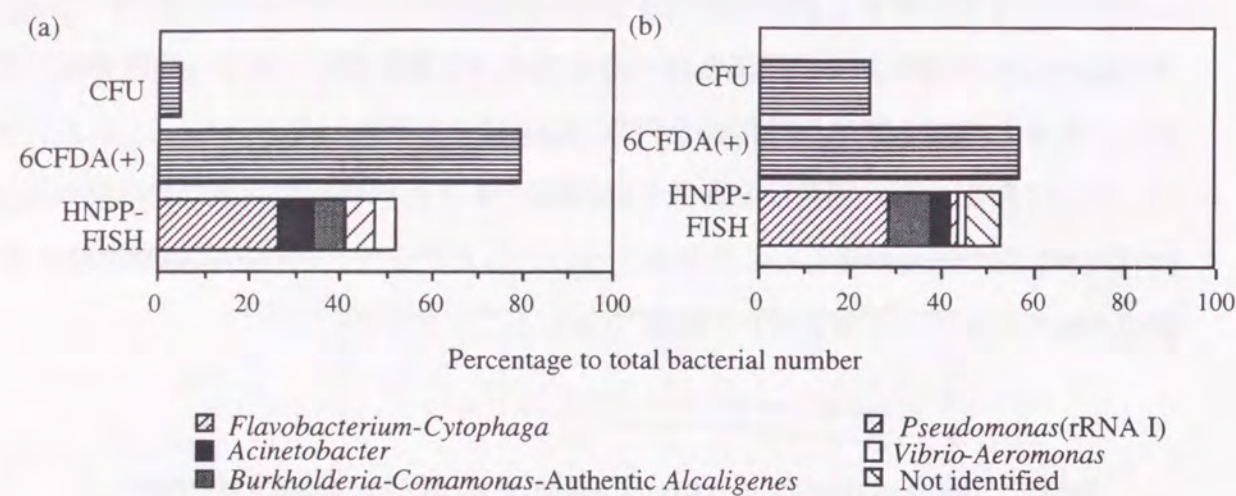


Fig. 17. The ratios of the number of colony forming and esterase-active bacteria to total bacterial number, and community structures in activated sludge samples obtained from Minami-Suita wastewater treatment plant. Samples were collected on 20 November, 1996 (a) and 29 January, 1997 (b). CFU, colony forming unit; 6CFDA(+), esterase-active bacteria.

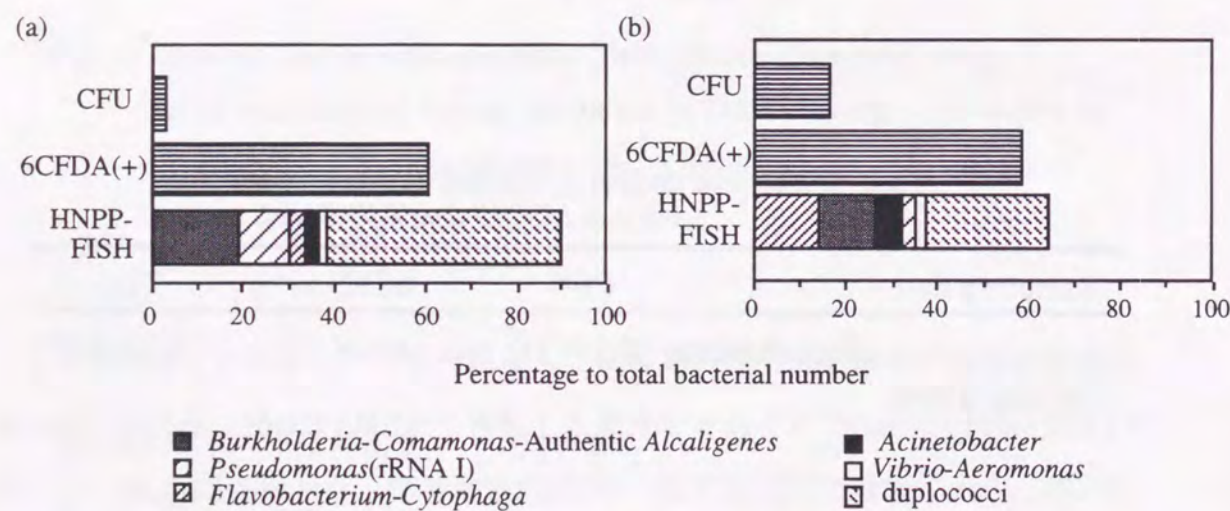


Fig. 18. The ratios of the number of colony forming and esterase-active bacteria to total bacterial number, and community structures in standard activated sludge. The standard activated sludge was delivered on July 19, 1996. (a), supernatant; (b), floc of the sludge. CFU, colony forming unit; 6CFDA(+), esterase-active bacteria.

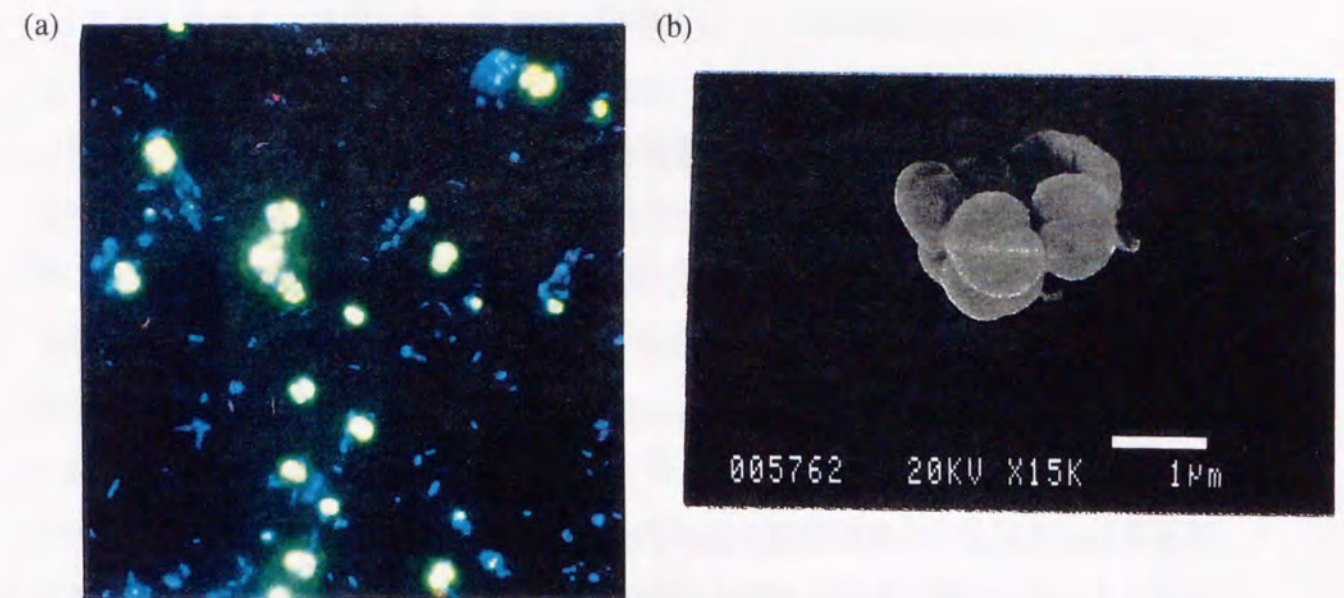


Fig. 19. Specific coccoid cells in standard activated sludge. (a), epifluorescence micrograph; (b), scanning electron micrograph.

いずれの活性汚泥においてもエステラーゼ活性を示した細菌数は全菌数の60%から80%であり、コロニー形成菌数の2.4~20倍の値であった (Table 7, 8; Fig. 17, 18). この結果より、活性汚泥中の細菌は活性を持ちながらも培養法では検出しにくいことが確かめられた。したがって、蛍光活性染色法が活性汚泥中の活性を持つ細菌の検出にも有効であるとともに、活性汚泥においても培養法での検出が難しい細菌の多くが生理活性を保持していることが確かめられた。

またHNPP-FISH法を用いることにより、都市下水処理場の活性汚泥では細菌群集構造の50%、標準活性汚泥では40%を解析することがわかった (Fig. 17, 18). 下水処理場の活性汚泥中には*Flavobacterium*, *Cytophaga*に属する細菌が全菌数の26~28%と高い割合を占めていた。標準活性汚泥の上清部では*Burkholderia-Comamonas-authentic Alcaligenes*グループ (全菌数の19%) ならびに*Pseudomonas rRNAI*型の細菌 (全菌数の11%) が、沈殿部では*Flavobacterium-Cytophaga*グループの細菌 (全菌数の14%) ならびに*Burkholderia-Comamonas-Alcaligenes*グループ (全菌数の12%) が高い割合を占めていることがわかった。双球菌は標準活性汚泥の上清部で全菌数の51%、沈殿部で全菌数の27%と高い割合で存在した。

なお、いずれの活性汚泥中にもHNPP-FISH法では検出できない細菌が存在した。



この理由としては①菌体のrRNA含量がHNPP-FISH法の検出限界以下であったこと、②細胞壁の透過性が低いためにHNPP-FISHの際にプローブや抗体が菌体内に入らなかったこと、③用いたプローブが不適切であったこと、などが挙げられる。しかしながら下水処理場の活性汚泥において、FITC-FISH法ではEUBプローブを用いて全菌数の70%以上を検出できたのに対し、HNPP-FISH法ではその値が50%と減少したことから、細菌細胞壁の透過性がHNPP-FISH法における検出効率を下げている可能性が高い。今回用いたリゾチームとproteinase Kによる処理法では*Moraxella*属や*Staphylococcus*属の細菌を検出できないことがわかっている。今後菌体の処理法を改良することによって、さらに高い割合で活性汚泥の細菌群集構造を解析できるようになり、これまで難しかった活性汚泥の微生物学的側面からの管理が可能になるものと考えられた。

#### 小括

蛍光活性染色法ならびにHNPP-FISH法を用いて、都市下水処理場より採取した活性汚泥ならびに化学物質の生分解試験であるMITI法で微生物源として用いられている標準活性汚泥の細菌群集構造解析を行った。

6CFDA-DAPI二重染色法によって求めたエステラーゼ活性を持つ細菌数はいずれの活性汚泥においても全菌数の60%から80%であり、全菌数に占めるコロニー形成細菌数の割合を大きく越えていた。したがって、培養困難な活性汚泥の細菌の多くが生理活性を保持していることがわかった。

またHNPP-FISH法を用いることにより、都市下水処理場の活性汚泥では細菌群集構造の50%、標準活性汚泥では40%を解析できた。下水処理場の活性汚泥における優占種は*Flavobacterium*、*Cytophaga*に属する細菌であり、全菌数の26~28%であった。標準活性汚泥の上清部では*Burkholderia*-*Comamonas*-authentic *Alcaligenes*グループならびに*Pseudomonas* rRNAI型の細菌が、沈殿部では*Flavobacterium*-*Cytophaga*グループならびに*Burkholderia*-*Comamonas*-*Alcaligenes*グループの細菌が高い割合を占めていることがわかった。なお、標準活性汚泥では特徴的な形態と蛍光特性を持つ双球菌が高い割合で存在したため、この双球菌の計数値とHNPP-FISH法の結果を合わせることによって、標準活性汚泥の細菌群集構造を高い割合で解析できた。

#### 総括

細菌をはじめとする微生物は人間にとって最も身近な生物であり、疾病の原因あるいは常在菌として我々の健康に、また発酵や腐敗作用により我々の食生活に深く関与している。同時に、自然環境中の細菌は生態系の恒常性の維持や物質循環に大きな役割を果たしている。これまでの人類の歴史は微生物との共存ならびに戦いの繰り返しであったと言っても過言ではない。

19世紀中頃以来百数十年にわたり、微生物学は人類にとって深刻な問題である疾病の解決、また身近な問題である発酵や腐敗現象の解明を主な目的として発展してきた。そして、様々な抗生物質や殺菌消毒剤の発見・開発により、多くの感染症は克服されたかに見えた。しかしながら、抗生物質耐性菌による院内感染症や新興・再興感染症が現在、全世界の人々を脅かしている。のみならず、食生活や生活様式の変化にともない、食品分野や住環境において微生物に起因する新たな問題が台頭している。このような問題を未然に防ぎ、被害を最小限に食い止めるためには、原因となる微生物の正確かつ迅速な検出とその環境中における動態の解明が欠かせない。

また、湖沼や河川などの水資源の汚染は生態系の持つ緩衝能力を越えた有機物質、化学物質の放出が大きな原因であるため、水資源のこれ以上の汚染を防ぎ環境を改善していくには、自然が持つ自浄能力のいしずえとなっている環境中の微生物についての理解を深めていく必要がある。

しかしながら、環境中の細菌の多くはこれまでの細菌学で開発されてきた方法では培養が困難であり、培養に依存した方法のみではその十分な解析ができない。そのため微生物学分野では、培養することなく細菌の活性を評価するための新たな手法、また自然環境中の特定の細菌を高感度に検出するための新しい手法の開発が切望されている。

そこで、本研究では生理活性を持つ細胞を迅速かつ簡便にシングルセルレベルで検出する手法として蛍光活性染色法を開発し、その微生物学分野への応用を行った。細菌の持つエステラーゼ活性を評価するにあたっては、生細胞内のエステラーゼによって蛍光物質6-carboxyfluoresceinに加水分解される6CFDAを用いた。また呼



吸能を持つ細菌を検出するために、細胞の電子伝達系において蛍光物質CTC-formazanに還元されるCTCを用いた。その結果、1時間以内に試料中の生理活性を持つ細菌を特異的に検出・計数できるようになり、従来の培養法では数日要していた生菌の検出をはるかに短時間で行うことが可能になった。さらに蛍光活性染色法を用いて河川水中の細菌の活性を評価した結果、従来の寒天平板培地培養法では試料水中の生理活性を持つ細菌数を過小評価していたこと、および河川水中の細菌の多くが酵素活性や呼吸能を保持していることがわかった。したがって、一般的な手法では培養が困難である自然環境中の細菌が、その活性をもとに生態系の恒常性の維持や物質循環に深く関与している可能性が示された。

次に、細菌の生理活性をより迅速に評価するために、蛍光活性染色法のフローサイトメトリーへの応用を行った。その結果、1分間に10,000個以上の細菌の解析が可能となり、より短時間で多くの細菌の活性を評価できるようになった。したがって、試料中の生菌の検出にあたり、多検体をより迅速に処理することが可能になった。さらに、本方法を用いて環境の異なる地点から採取した河川水中の細菌を解析したところ、全菌数に占めるエステラーゼ活性を持つ細菌の割合と試料採取地点の有機物濃度に相関性が見られ、この割合が河川の有機物汚染度の生物学的指標として利用できる可能性が示された。

また、新たな蛍光基質であるHNPPならびにFast Red TRに着目し、特定細菌のより高感度な検出法として、HNPP-Fast Red TR in situ ハイブリダイゼーション(HNPP-FISH)法を開発した。その結果、従来のFISH法に比べて8倍以上蛍光強度を上げることができるようになり、自然環境中の微小な細菌、rRNA含量の低い細菌をその遺伝情報をもとに特異的に検出できるようになった。

さらに、今回の研究において検討した蛍光染色法を、污水や排水の処理、また化学物質の生分解試験において微生物源として用いられている活性汚泥の微生物学的評価に応用した。すなわち、蛍光活性染色法を用いて活性汚泥中の細菌の活性を評価するとともに、HNPP-FISH法を用いて活性汚泥の細菌群集構造の解析を行った。その結果、培養困難な活性汚泥の細菌の多くが生理活性を保持していることがわかった。またHNPP-FISH法を用いることによって、都市下水処理場の活性汚泥では細菌群集構造の50%、標準活性汚泥では40%を解析することができた。今後手法を

改良することによって、さらに高い割合で活性汚泥の細菌群集構造を解析できるようになり、これまで難しかった活性汚泥の微生物学的側面からの管理が可能になるものと考えられた。

今回の研究で検討を行った蛍光活性染色法は迅速・簡便に生菌を検出することができる。またHNPP-FISH法は、従来の方法よりもさらに高感度な特定細菌の検出が可能である。したがって、これまでの微生物学的手法では対処が難しかった医療や食品分野、住環境における微生物に起因する問題の解決に大きく寄与するものと期待される。



## 結論

1. 蛍光染色剤6CFDAならびにCTCを用いて、生理活性を持つ細菌をシングルセルレベルで検出するための蛍光活性染色法を開発した。その結果、6CFDA-DAPI二重染色法およびCTC-DAPI二重染色法を用いることにより、それぞれエステラーゼ活性または呼吸能を持つ細菌を1時間以内に特異的に検出・計数できるようになった。
2. フローサイトメトリーによる細菌の活性解析系を作成した。その結果、10,000個以上の細菌の活性を1分間で評価できるようになった。すなわち、より短時間で多くの細菌の活性を評価することを可能にした。
3. 蛍光活性染色法を用いて河川水中の細菌を解析したところ、その多くが酵素活性や呼吸能を持っていることがわかり、従来の寒天平板培地培養法では試料水中の生理活性を持つ細菌数を過小評価していたことがわかった。
4. HNPP-FISH法を用いることにより、現在広く用いられているFITC-FISH法よりも最大8倍以上蛍光強度を上げることができた。したがって環境中の微小な細菌、またrRNA含量の低い細菌の検出への道が拓けた。
5. 蛍光活性染色法を用いて活性汚泥の解析を行った結果、培養困難な活性汚泥の細菌の多くが高い生理活性を保持していることがわかった。またHNPP-FISH法を用いることによって、都市下水処理場の活性汚泥では細菌群集構造の50%、標準活性汚泥では40%を解析することができた。
6. 蛍光活性染色法は操作が迅速かつ簡便であるため、自然環境中の細菌の活性評価のみならず、飲用水や食品の衛生微生物学的管理、医療機関や住環境中の生菌の検出に有効であると考えられた。

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、終始暖かい御指導と御鞭撻を賜りました、大阪大学大学院薬学研究科教授・恩師 那須正夫先生に篤く御礼申し上げます。

また、本研究にあたり貴重な御指導、御助言を賜りました、大阪大学名誉教授、近藤雅臣先生に深く感謝の意を表します。

研究途上、数々のご助言をいただきました大阪大学大学院薬学研究科講師、谷佳津治先生に深謝いたします。

また、本研究にご協力をいただきました大阪大学薬学部衛生化学講座、大阪大学大学院薬学研究科遺伝情報解析学分野の諸氏に御礼申し上げます。

最後に、常日頃から暖かい励ましと経済的ご援助をいただきました家族に心より感謝いたします。



## 参考文献

- 1) WHO. The World Health Report 1996. World Health Organization (1996).
- 2) (財) 厚生統計協会, 国民衛生の動向 1998年度版, p.55-56, p.407.  
(財) 厚生統計協会 (1998).
- 3) (財) 厚生統計協会, 国民衛生の動向 1998年度版, p.303. (財) 厚生統計協会 (1998).
- 4) 菅原文子. 防菌防黴 25: 719-725 (1997).
- 5) 勝井則明. 防菌防黴 19: 79-87 (1991).
- 6) 勝井則明, 加藤信行, 浅田祥司, 喜多英二. 防菌防黴 25: 139-143 (1997).
- 7) 薮内英子. 環境感染 11: 221-227 (1996).
- 8) Hobbie, J. E., R. J. Daley, and S. Jasper. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 1225-1228 (1977).
- 9) Colwell, R. R., P. R. Brayton, D. J. Grimes, D. B. Roszak, S. A. Huq, and L. M. Palmer. *Bio/Technol.* 3: 817-820 (1985).
- 10) 木暮一啓. 海洋科学 20: 32-37 (1988).
- 11) Oliver, J. D. p.239-272. In Kjelleberg, S. (ed.), *Starvation in Bacteria*. New York, Plenum Press (1993).
- 12) 山口進康, 那須正夫. 用水と廃水 39: 308-315 (1997).
- 13) 清水潮, 駒形和男, 田中芳一, 仲西寿男, 那須正夫, 藤井建夫 (編), 食品危害微生物ハンドブック, p.10-13. サイエンスフォーラム (1998).
- 14) 染谷孝. 日本生態学会誌 47: 59-62 (1997).
- 15) 清水潮, 駒形和男, 田中芳一, 仲西寿男, 那須正夫, 藤井建夫 (編), 食品危害微生物ハンドブック, p.20-21. サイエンスフォーラム (1998).
- 16) Rahman, I., M. Shahamat, P. A. Kirchman, E. Russek-Cohen, R. R. Colwell. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3573-3578 (1994).
- 17) Oliver, J. D., R. Bockian. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2620-2623 (1995).
- 18) Rahman, I., M. Shahamat, M. A. Chowdhury, R. R. Colwell. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 115-120 (1996).

- 19) Weichart, D., S. Kjelleberg. *Microbiol.* 142: 845-853 (1996).
- 20) Steinert, M., L. Emody, R. Amann, J. Hacker. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2047-2053 (1997).
- 21) Thomas, J. A., R. N. Buchsbaum, A. Zimniak, and E. Racker. *Biochemistry* 18: 2210-2218 (1979).
- 22) Dive, C., H. Cox, J. V. Watson, and P. Workman. *Mol. Cell. Probes* 2: 131-145 (1988).
- 23) 山口進康, 那須正夫, 崔承泰, 近藤雅臣. 防菌防黴 22: 65-68 (1994).
- 24) Seidler, E. *Prog. Histochem. Cytochem.* 24: 46-63 (1990).
- 25) Rodriguez, G. G., D. Phipps, K. Ishiguro, and H. F. Ridgway. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1801-1808 (1992).
- 26) Schaule, G., H. C. Flemming, and H. F. Ridgway. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3850-3857 (1993).
- 27) Winding, A., S. J. Binnerup, and J. Sørensen. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2869-2875 (1994).
- 28) Yu, F. P., and G. A. Mcfeters. *J. Microbiol. Meth.* 20: 1-10 (1994).
- 29) DeLong, E. F., G. S. Wickham, and N. R. Pace. *Science* 243: 1360-1363 (1989).
- 30) Amann, R. I., B. J. Binder, R. J. Olson, S. W. Chisholm, R. Devereux, and D. A. Stahl. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1919-1925 (1990).
- 31) Amann, R. I., W. Ludwig, K. H. Schleifer. *Microbial. Rev.* 59: 143-169 (1995).
- 32) Amann, R. I., J. Stromley, R. Devereux, R. Key, D. A. Stahl. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 614-623 (1992).
- 33) Wagner, M., R. Amann, H. Lemmer, and K.-H. Schleifer. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1520-1525 (1993).
- 34) Manz, W., M. Wagner, R. Amann, and K.-H. Schleifer. *Water Res.* 28: 1715-1723 (1994).
- 35) Wagner, M., R. Erhart, W. Manz, R. Amann, H. Lemmer, D. Wedi, and K.-H. Schleifer. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 792-800 (1994).
- 36) Lim, E. L., D. A. Caron, E. F. DeLong. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1416-1423



- (1996).
- 37) Harmsen, H. J., H. M. Kengen, A. D. Akkermans, A. J. Stams, W. M. de-Vos. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1656-1663 (1996).
  - 38) OECD Environment Directorate. p.301E. In OECD Environment Directorate (ed.), OECD guidelines for testing of chemicals. OECD publications, France (1981).
  - 39) OECD Environment Directorate. p.301C. In OECD Environment Directorate (ed.), OECD guidelines for testing of chemicals. OECD publications, France (1981).
  - 40) OECD Environment Directorate. p.302C. In OECD Environment Directorate (ed.), OECD guidelines for testing of chemicals. OECD publications, France (1981).
  - 41) 門田元, 多賀信夫 (編), 海洋微生物研究法, p.44-46. 学会出版センター (1985).
  - 42) 門田元, 多賀信夫 (編), 海洋微生物研究法, p.46. 学会出版センター (1985).
  - 43) Kogure, K., U. Shimidu, and N. Taga. *Can. J. Microbiol.* 25: 415-420 (1979).
  - 44) Kogure, K., U. Shimidu, and N. Taga. *Can. J. Microbiol.* 26: 318-323 (1980).
  - 45) Joux, F., and P. LeBaron. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3643-3647 (1997).
  - 46) Li, M. K. W., P. M. Dickie, W. G. Harrison, and B. D. Irwin. *Deep Sea Res.* 40: 307-327 (1993).
  - 47) Meyer-Reil, L.-A. *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 506-512 (1978).
  - 48) Tabor, P. S., and R. A. Neihof. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 945-953 (1982).
  - 49) Hysert, D. W., F. Kovacs, and N. Morrison. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 34: 145-150 (1976).
  - 50) Siro, M. R., H. Romer, and T. Govern. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 15: 258-264 (1982).
  - 51) Zimmermann, R., R. Iturriaga, and J. Becker-Brick. *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 926-935 (1978).
  - 52) Porter, K. G., and Y. S. Feig. *Limnol. Oceanogr.* 25: 943-948 (1980).
  - 53) 宮地寿明, 那須正夫, H. I. El-Belbashi, 田窪芳博, 近藤雅臣. 環境科学会誌 4: 283-287 (1991).
  - 54) 那須正夫, 山口進康, 牧野和夫, 田窪芳博, 近藤雅臣. 日本微生物生態学会報

- 7: 1-7 (1992).
- 55) Tani, K., J. M. Chen, N. Yamaguchi, and M. Nasu., *Microbes and Environments*, 11: 11-17 (1996).
- 56) Yamaguchi, N., H. Ohmori, N. Welikala, and M. Nasu. *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, 43: 209-214 (1997).
- 57) Reasoner, D. J., and E. E. Geldreich. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 1-7 (1985).
- 58) Chrzanowski, T. H., R. D. Crotty, J. G. Hubbard, and R. P. Welch. *Microb. Ecol.* 10: 179-185 (1984).
- 59) Wallner, G., B. Fuchs, S. Spring, W. Beisker, R. Amann. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4223-4231 (1997).
- 60) 那須正夫, 山口進康, 宮本和久, 近藤雅臣. 環境科学会誌 6: 321-328 (1993).
- 61) Davey, H. M., and D. B. Kell. *Microbiol. Rev.* 60: 641-696 (1996).
- 62) Tanaka, Y., M. Yoshimitsu, N. Yamaguchi, K. Tani, and M. Nasu. *Microbes and Environments* 13: 77-83 (1998).
- 63) 見坂武彦, 山口進康, 那須正夫. 防菌防黴, in press.
- 64) 芳倉太郎, 小田国雄, 飯田才一. 日水誌 47: 183-189 (1981).
- 65) Peele, E. R., L. Singleton, J. W. Deming, B. Cavari, and R. R. Colwell. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 873-879 (1981).
- 66) Nasu, M., S. Song, N. Yamaguchi, A. Shimazu, and M. Kondo. *Fresenius Envir. Bull.* 2: 7-12 (1993).
- 67) Welikala, N., N. Yamaguchi, T. Kenzaka, K. Tani, and M. Nasu. *Biocontrol Science* 2: 79-86 (1997).
- 68) Tani, K., M. Masuhara, N. Welikala, N. Yamaguchi, and M. Nasu. *J. Appl. Microbiol.* 84: 859-864 (1998).
- 69) Woese, C. R. *Microbiol. Rev.* 51: 221-271 (1987).
- 70) Kagiya, N., K. Yoshida, T. Hamabata, N. Juni, T. Awasaki, S. Fujita, M. Momiyama, M. C. Yoshida, and S. H. Hori. *Acta. Histochem. Cytochem.* 26: 441-445 (1993).
- 71) Amann, R. I., L. Krumholz, and D. A. Stahl. *J. Bacteriol.* 172: 762-770 (1990).



- 72) Schaechter, M., O. Maaloe, and N. O. Kjeldgard. *J. Gen. Microbiol.* 19: 592-606 (1958).
- 73) Soddell, J. A., and R. J. Seviour. *J. Appl. Bacteriol.* 69: 145-176 (1990).
- 74) OECD Environment Directorate. p.302A. In OECD Environment Directorate (ed.), OECD guidelines for testing of chemicals. OECD publications, France (1981).
- 75) Kenzaka, T., N. Yamaguchi, K. Tani, and M. Nasu. *Microbiology* 144: 2085-2093 (1998).
- 76) Wallner, G., R. Amann, and W. Beisker. *Cytometry* 14: 136-143 (1993).



