



nite


NBRC

バイオ基礎講座2023

技術編 4. 微生物の細胞数測定方法と 微生物カクテル開発への応用

2023年12月15日（金）

独立行政法人製品評価技術基盤機構（NITE）
バイオテクノロジーセンター（NBRC）
産業連携推進課 三浦 隆匡



1. **微生物の細胞数を測定する目的と方法**
2. **核酸量をベースとする新しい測定方法**
3. **新しいNBRC微生物カクテルについて**

微生物の細胞数を測定する目的

- **目的の事象を正しく理解する**
 - ・細胞数がどれくらいになるとその現象が起きるか/起きないか
 - ・環境ごとの微生物数の違い
- **実験を正確にコントロールする**
 - ・再現性
 - ・比較実験
- **製品の品質をコントロールする**
 - ・一定値以上/以下の含有量
 - ・複数種の微生物細胞のコントロール
- **衛生管理を行う**
 - ・一定の細胞数以下で管理
 - ・（特定の微生物種の検出）

測定方法を選択する上でそれぞれの測定方法の特徴を認識しておく必要がある

代表的な微生物の細胞数測定方法の概要

測定方法・測定装置		測定対象	原理	特徴
ダイレクトセルカウント	フローサイトメトリー	菌体 (生菌・死菌)	流路系を通過する微生物に一定波長のレーザー光を当て、前方散乱光・側方散乱光を検出し、また、レーザー光によって生じた蛍光を検出し、イベント数（菌数）を測定する	<ul style="list-style-type: none"> ・最も伝統的で基本となる方法 ・様々な形態・サイズ・分裂様式の微生物があり、微生物の凝集、自家発光、菌体外DNAの存在など、セルカウントを困難にする要因が含まれる ・蛍光試薬を使い分けることにより、総菌数、生菌数、死菌数を測定することができる
	顕微鏡		菌体を血球計算盤上でカウントする、また、蛍光染色した菌体をメンブレンフィルター上に捕集してカウントする	
	自動測定装置		蛍光染色した菌体をメンブレンフィルター上に捕集して測定器で自動カウントする	
核酸測定	リアルタイムPCR	核酸 (生菌・死菌)	サーマルサイクラーと分光蛍光光度計を一体化した装置を用いてPCRを行い、反応によって生じた蛍光シグナルが、ある一定の増幅DNA量(Threshold)まで達した時点のサイクルの差を求めることで、プレートに含まれるターゲット遺伝子のコピー数を測定する	<ul style="list-style-type: none"> ・微生物によりターゲット遺伝子のコピー数が異なる。環境サンプル等存在する微生物種が不明の場合には原理的に菌数に変換することは不可能（あくまでコピー数の測定） ・菌によってDNA抽出効率が異なる ・プロトコルを統一化することで再現性や精度は高くなる
生物発光法・蛍光法	ATPアッセイ	代謝活性 (生菌)	<ul style="list-style-type: none"> ・ATPをルシフェリンと酸素の存在下でルシフェラーゼを反応させることで発光させる。発光量を測定することでATP量を求める。 ・フラッシュとグローのアッセイ系があり、それぞれ適切な測定装置を使う必要がある 	<ul style="list-style-type: none"> ・微生物により代謝活性が異なり、微生物活性にも左右されるため、原理的に発光量を菌数に変換することは不可能 ・発光量がすぐに減衰ので測定値の誤差を生じやすい。多数の検体を同時に測定するには自動分注機能のあるルミノメーターが必要
	NADHアッセイ		NADHは電子メディエーターを介してテトラゾリウム塩（無色）をホルマザン（橙色）に還元する。吸光度を測定することで微生物の代謝活性を求めることができる	<ul style="list-style-type: none"> ・微生物により代謝活性が異なり、微生物活性にも左右されるため、原理的に発光量を菌数に変換することは不可能
生物活性測定	BOD測定		水中の有機物が好気性微生物により分解される過程で消費される水中の酸素量を測定する	<ul style="list-style-type: none"> ・微生物により代謝活性が異なり、微生物活性にも左右されるため、原理的に発光量を菌数に変換することは不可能
培養法	CFU法、MPN法等	増殖した菌 (生菌)	特定の培地・培養条件で増殖する菌数測定を行う。平板培地を用いた測定（CFU）と液体培地を用いた測定（MPN）がある	<ul style="list-style-type: none"> ・環境サンプルには使用した培地・培養条件で増殖しない菌が含まれるため正確な菌数を測定することは不可能 ・結果が得られるまで時間を要する ・安価で単純な操作

ダイレクトセルカウント（蛍光染色法）

細胞の個数を測定する＝原理的に最も基本的な手法

・総菌数を測定する場合

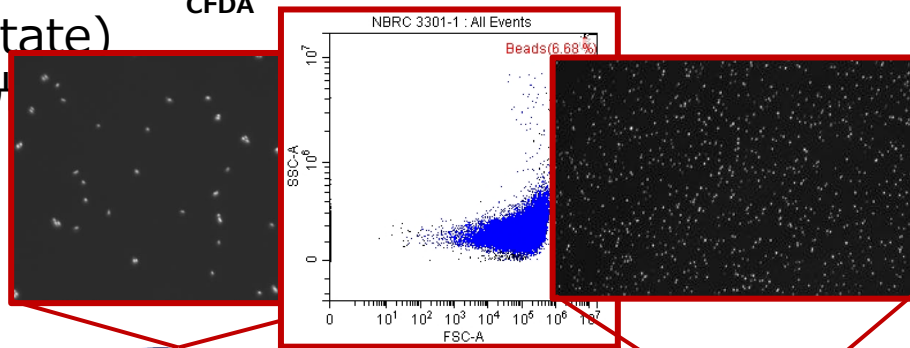
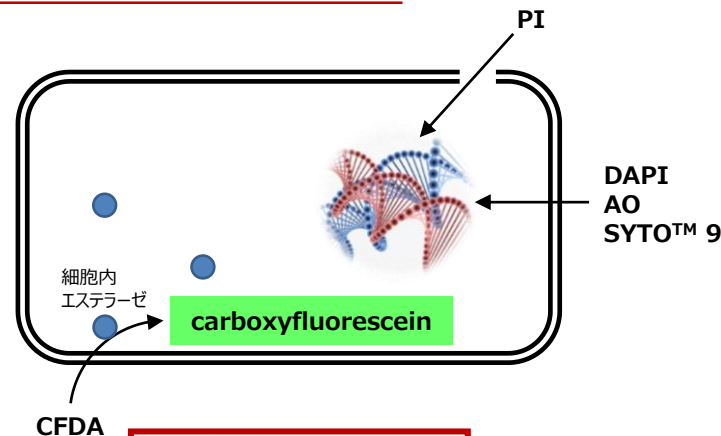
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)
AO (Acridine orange)
SYTO™ 9

・生菌数を測定する場合

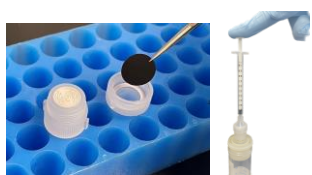
CFDA (5(6)-Carboxyfluorescein diacetate)
→グルタルアルデヒド添加でグラム陰性菌の蛍光

・死菌数を測定する場合

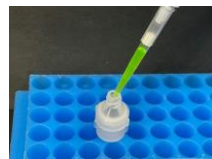
PI (Propidium Iodide)



作業手順例



1. サンプルをフィルタートラップ（必要なら）



2. 蛍光染色する（1と2は逆パターンも）



蛍光顕微鏡



フローサイトメーター

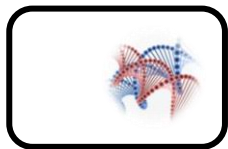


自動測定装置

3. レーザーで励起し、蛍光発光した細胞を測定

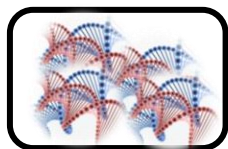
核酸測定（定量リアルタイムPCR）

・特徴：微生物細胞に含まれているゲノムDNA上のターゲット遺伝子数を測定



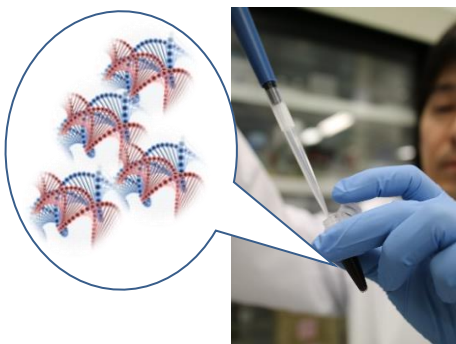
- 全ての微生物の細胞にはゲノムDNAが含まれている
- 細胞からゲノムDNAを抽出し、ターゲット遺伝子のコピー数を測定する
- PCRの応用なので微量なゲノムDNA量でも検出が可能

・注意点：得られる結果は単位あたりの遺伝子コピー数（コピー数＝細胞数ではない）

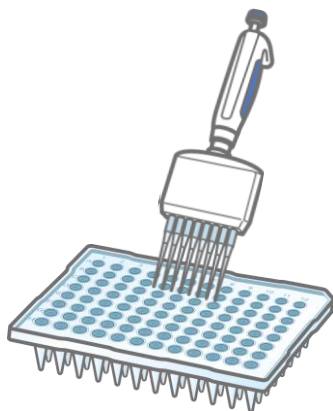


- 細胞の状態によっては1細胞中に多コピーのゲノムDNAが含まれる
- 微生物種によってターゲット遺伝子のコピー数が異なる（環境サンプルで注意）
- DNA抽出やリアルタイムPCRの効率が影響する

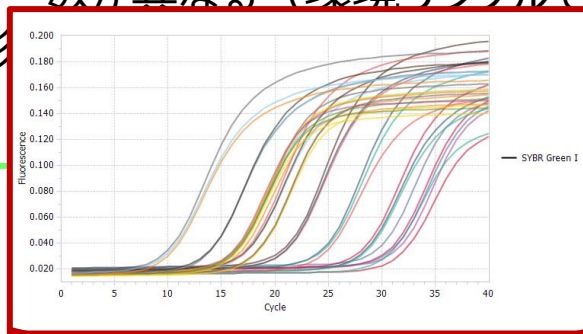
作業手順例



1. DNA抽出



2. 試薬の分注



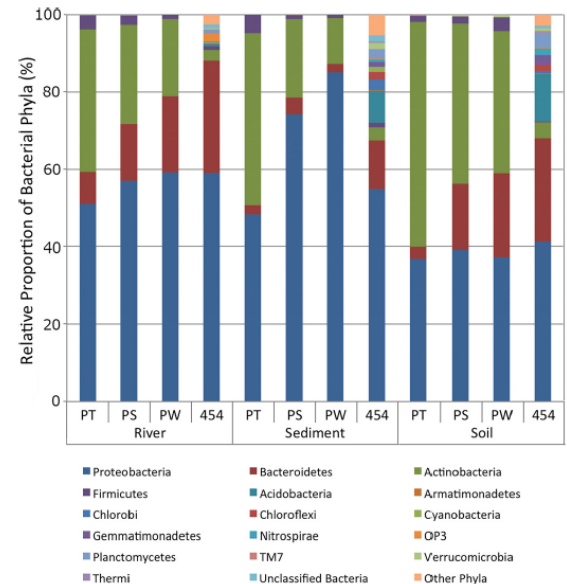
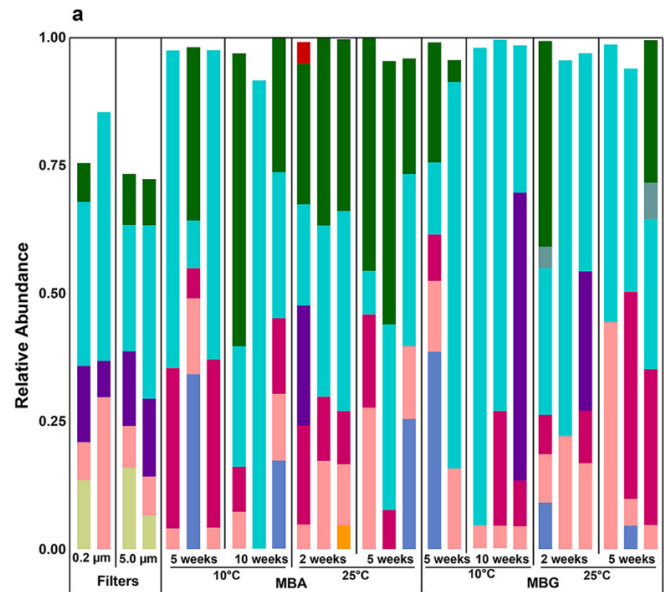
リアルタイムPCR装置

3.測定

CFUカウント

- 特徴：寒天培地上に生育したコロニー数を計測する（Colony Forming Unit : CFU）**
 - 安価で比較的簡便な方法
 - 生菌数を測定する方法として歴史的によく使われており認知度が高い
- 注意点：得られる結果はコロニーを形成する数（コロニー数 = 細胞数ではない）**
 - その微生物に最適な培養条件を用いる必要がある
 - VNC (Viable but Non-Culturable)状態の微生物は検出できない
 - 以下の図のように環境中の菌叢を反映していない（環境サンプルで注意）
 - 測定まで1日以上を必要とする

用いた寒天培地上で生育しやすい微生物が優先的に増殖する
→環境中の微生物数を反映しない



(Rygaard et al., Appl. Environ. Microbiol., 83 (9): e00243-17 (2017))

(Tanaka et al., Appl. Environ. Microbiol., 80 (24): 7659-7666 (2014))

代表的な測定方法の作業比較表

ターゲット(データ取得までの時間)	ダイレクトセルカウント (50分~4時間/サンプル)	核酸 (リアルタイムPCR) (3時間/サンプル)	CFUカウント (1日~)
前処理	濾紙や3~5 μ m孔フィルターによる前濾過 ↓ 1~2 min/sample 希釈 (必要なら)	濾紙を用いた前濾過 ↓ 1~2 min/sample	寒天培地の準備 ↓ 4 h/~40 plates 濾紙や3~5 μ m孔フィルターによる前濾過
集菌	↓ 5~10 min/sample フィルタートラップ	↓ フィルタートラップ または遠心による集菌	↓ 1~2 min/sample 希釈
準備	↓ 1~2 min/replicate 蛍光染色	↓ 1~2 min/replicate DNA抽出	↓ 5~10 min/sample プレートイング
測定手順	↓ 10~30 min/sample 手動で撮影とカウント(FMS) ^{*1} 自動測定 (FCM) ^{*2} 自動で撮影とカウント(ACCS) ^{*2} * ² 1~2 min/replicate	↓ 60 min/24 samples (depends on extraction kit) リアルタイムPCR 110 min/run	↓ 5~10 min/sample 培養 ↓ 1~ days コロニー数測定 5~10 min/sample

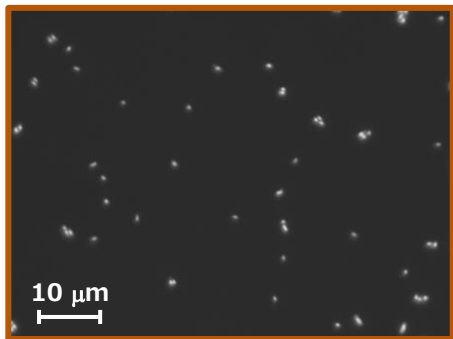
1. 微生物の細胞数を測定する目的と方法
- 2. 核酸量をベースとする新しい測定方法**
3. 新しいNBRC微生物カクテルについて

核酸量をベースとする新しい測定方法

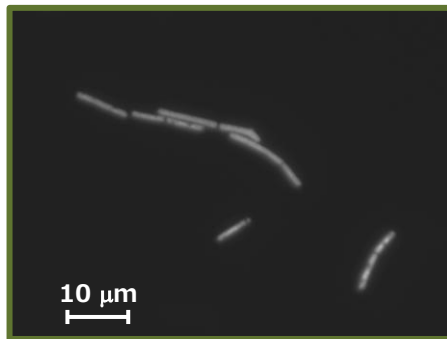
連鎖・凝集する微生物数を正確に測定することは難しい...

菌の蛍光顕微鏡観察像

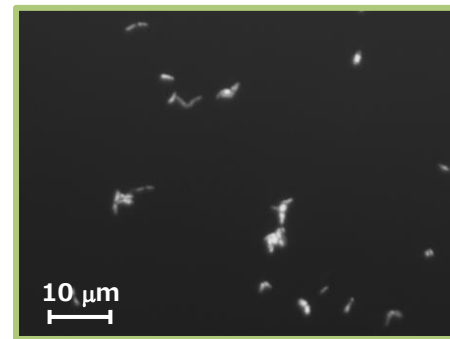
E. coli (離散)



L. delbrueckii (連鎖)



C. acnes (凝集)



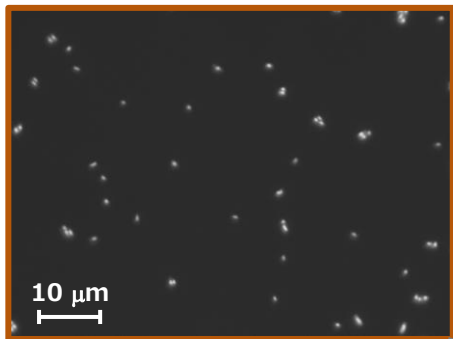
	蛍光顕微鏡 (MS)	フローサイトメーター (FCM)
18株(N=3)あたりの測定時間	約54時間	約6時間
作業者間誤差	大きい	小さい
操作性	難しい	易しい
計測のキモ	作業者のテクニックに左右される	菌株の特徴に左右される
作業記録の保存 (トレーサビリティ)	△	○
計測が難しい微生物の計測 (連鎖する、凝集する etc.)	ある程度対応可能	不正確

核酸量をベースとする新しい測定方法

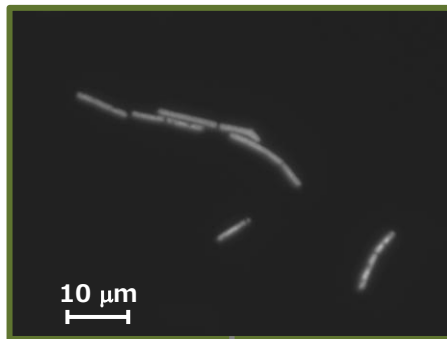
連鎖・凝集する微生物数を正確に測定することは難しい...

菌の蛍光顕微鏡観察像

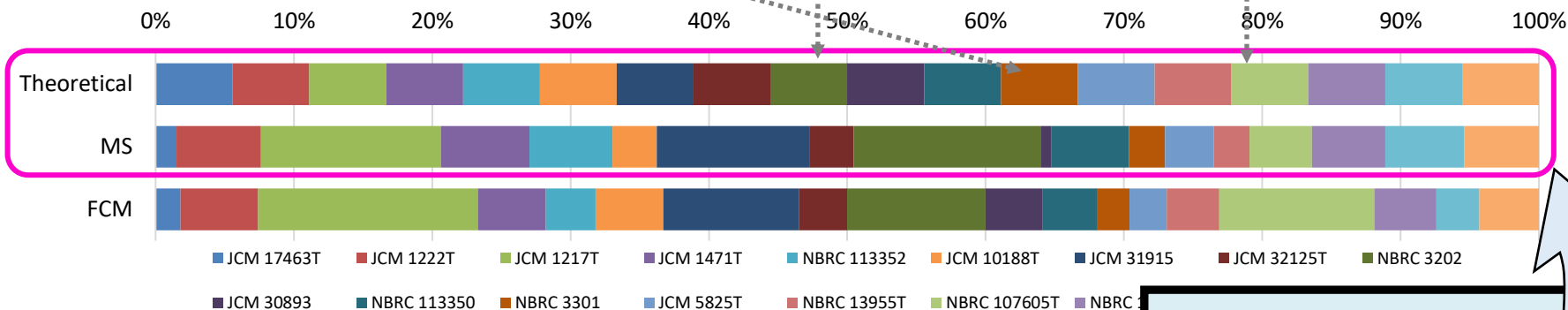
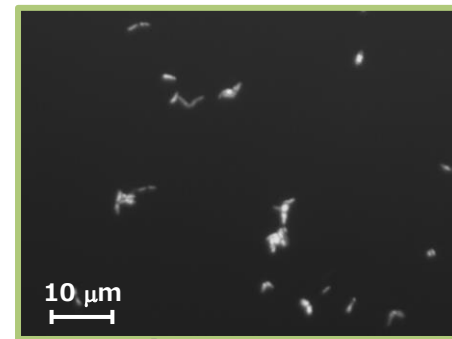
E. coli (離散)



L. delbrueckii (連鎖)



C. acnes (凝集)



Droplet digital PCRによる混合割合の評価

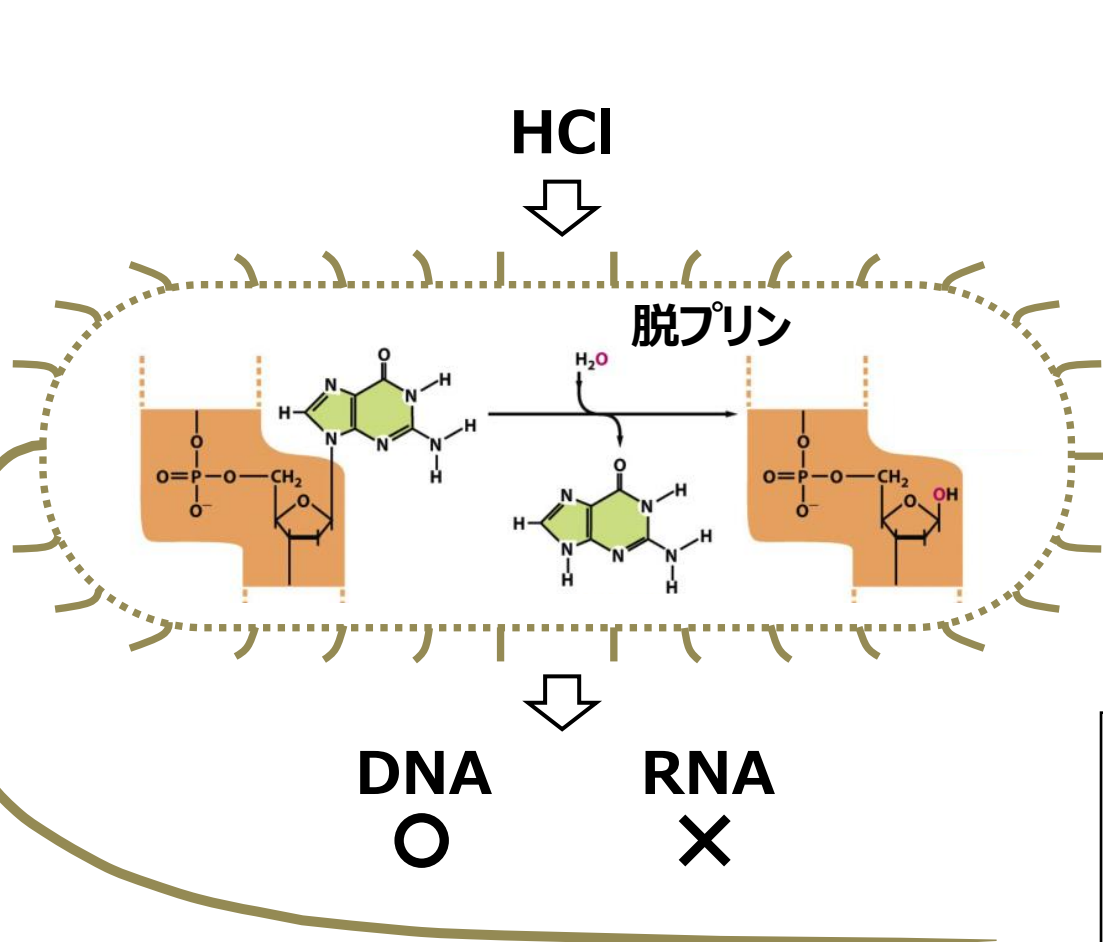
MSやFCMで細胞数を測定して混合した場合、参考値にはほど遠い、..

※ 細胞混合液からのDNA抽出はJMBCのSOPを利用
<https://jmbc.life/sop/index.html>

核酸量をベースとする新しい測定方法

de Bruin and Birnboim, BMC microbiology, 2016, 16:197

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いたDNA抽出不要の細菌DNAのアデニンの定量



Cell



0.2N HCl for DNA depurination
@ 60 °C 60 min



0.1N NaOH for
RNA monomerization
@ 100 °C 10 min



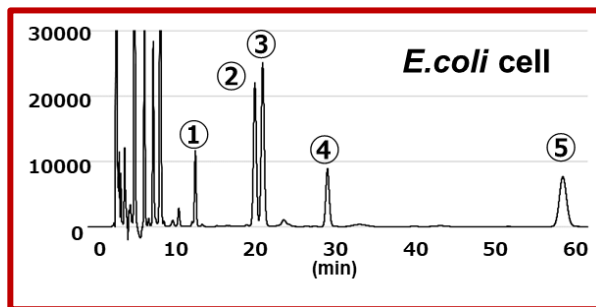
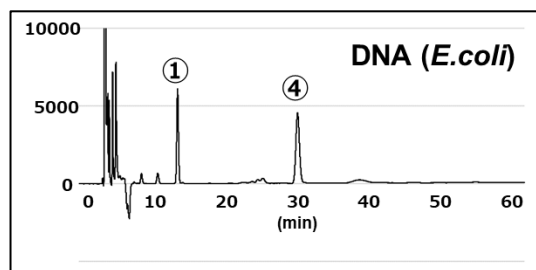
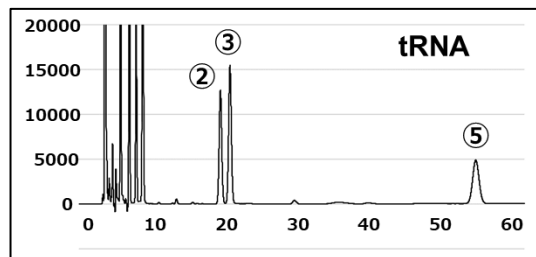
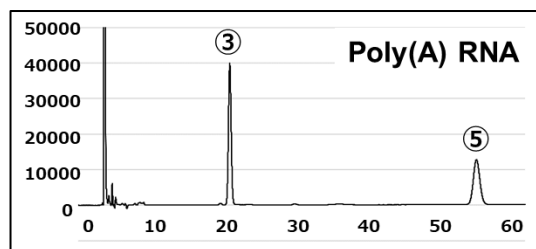
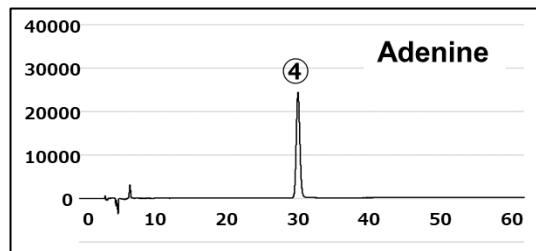
0.1N HCl for neutralization



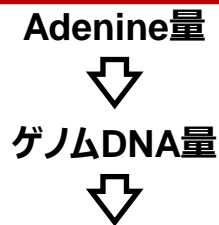
HPLC sample

- ODSカラム（C18カラム）
- イソクラティック溶離
30 mM Ammonium Acetate,
10 mM NaH₂PO₄, 1 mM CyDTA,
2 % Methanol, pH6.3
- 検出波長260 nm

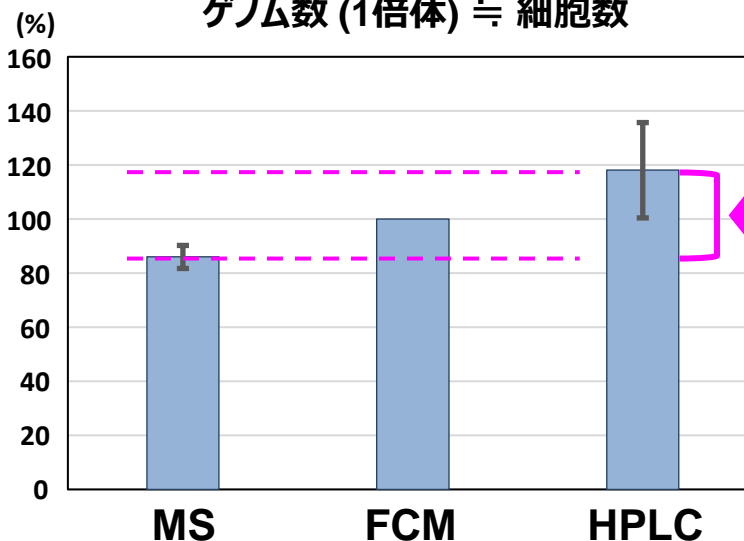
核酸量をベースとする新しい測定方法



- ① guanine
- ② guanosine phosphate
- ③ adenosine 3'-phosphate
- ④ adenine
- ⑤ adenosine 2'-phosphate



ゲノム数 (1倍体) \div 細胞数

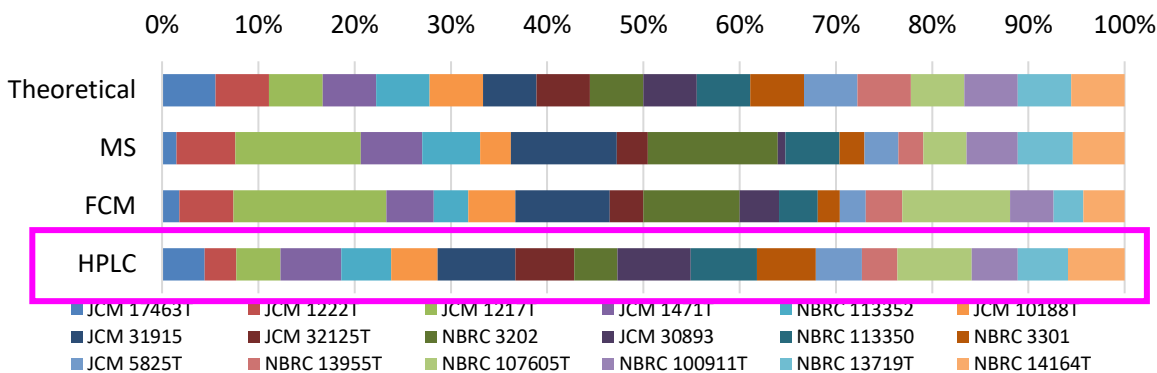


- *E. coli*の細胞数はMSで比較的正確に測定できる。
- HPLCとMSとの差は細胞内のゲノムコピー数の差と考えられる。
- **メタゲノムのようにDNAベースで解析する手法を評価するには最適**

FCMによる細胞数 (100%) と他の手法の数の比較

核酸量をベースとする新しい測定方法

	蛍光顕微鏡 (MS)	フローサイトメーター (FCM)	HPLC
18株(N=3)あたりの測定時間	約54時間	約6時間	約2時間+O/N測定
作業員間誤差	大きい	小さい	小さい
操作性	難しい	易しい	易しい
計測のキモ	作業員のテクニックに左右される	菌株の特徴に左右される	ゲノム情報が必要
作業記録の保存 (トレーサビリティ)	△	○	○
計測が難しい微生物の計測 (凝集する、連鎖する etc.)	ある程度対応可能	不正確	対応可能

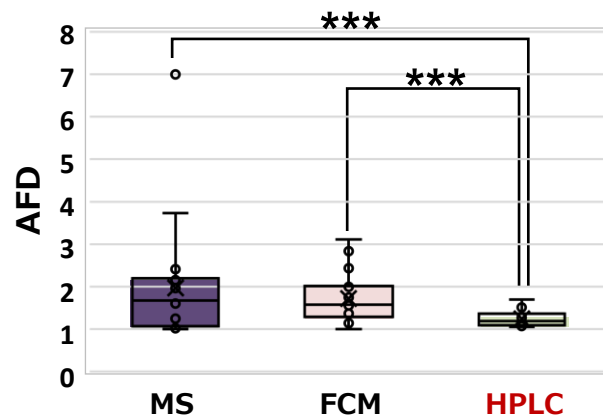


Droplet digital PCRによる混合割合の評価

参考値に対するバラツキは抑えられ、再現性もよい (CV ≤ 20%)



ゲノム微生物学の時代の新しい微生物量の定量方法



1. 微生物の細胞数を測定する目的と方法
2. 核酸量をベースとする新しい測定方法
3. **新しいNBRC微生物カクテルについて**

【現在開発中】 皮膚常在微生物カクテル

皮膚とは？

- 体の表面全体に広がる組織（器官）
- 外環境との境界面
- 環境が極めて多様（乾燥、湿潤、油性）

特有の
微生物叢
を育む

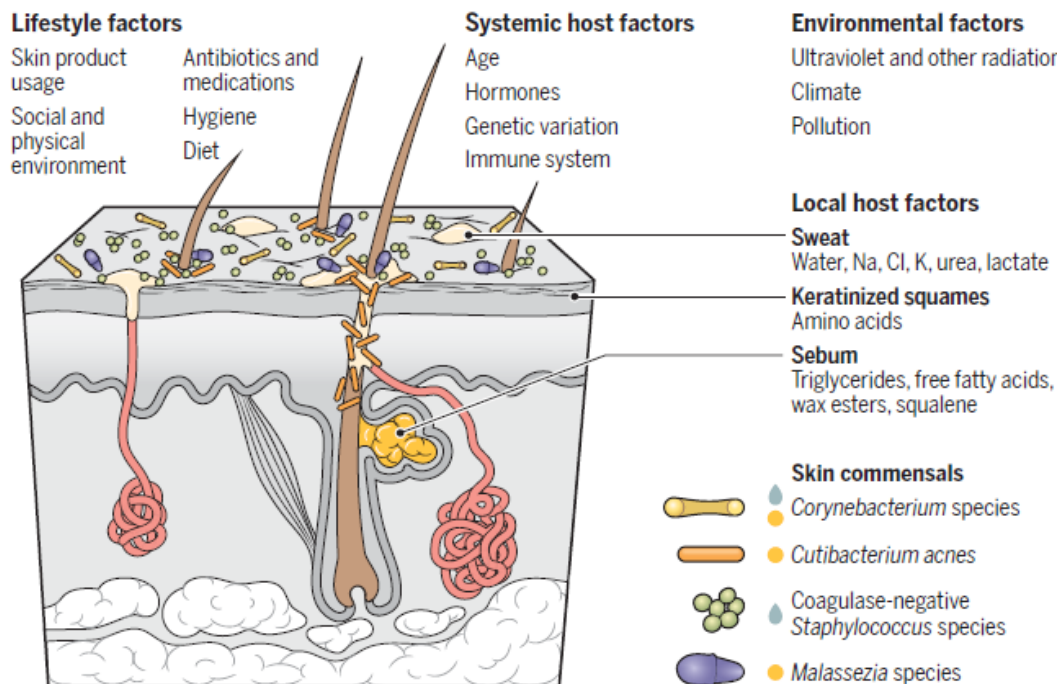
皮膚の微生物叢のはたらき

- 皮膚の保護
- 健康（美容）
- 病気

（アレルギー、ニキビ、水虫、
疣贅、頭垢、脱毛）



皮膚マイクロバイーム研究の
価値/将来性は極めて高い



Science, 2022, 376, 940-

皮膚常在微生物カクテルを開発するうえでの課題

- ・真菌がいる（細胞数測定が極めて困難）
- ・菌密度が低い
（ $10^5 > \text{cells/cm}^2 \Leftrightarrow 10^7\text{-}10^{12} \text{ cells/g}$; 腸管）

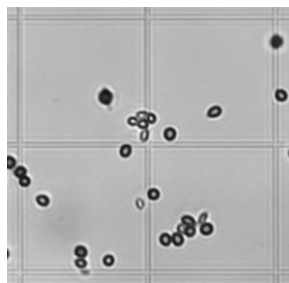
【現在開発中】 皮膚常在微生物カクテル

Domain	Phylum	Species	NBRC No.	BSL	Gram Type
Bacteria	Actinomycetota	<i>Corynebacterium pseudogenitalium</i>	113660	1	positive
		<i>Corynebacterium striatum</i>	15291 ^T	1*	positive
		<i>Cutibacterium acnes</i> subsp. <i>acnes</i>	113869	1*	positive
	Bacillota	<i>Anaerococcus nagyae</i>	113824	1*	positive
		<i>Fingoldia magna</i>	113804	1*	positive
		<i>Staphylococcus capitis</i>	115779	1*	positive
		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	113846	1*	positive
		<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i>	113928	1*	positive
		<i>Streptococcus salivarius</i>	13956	1*	positive
		<i>Acinetobacter radioresistens</i>	102413 ^T	1*	negative
	Pseudomonadota	<i>Escherichia coli</i>	3301	1	negative
		<i>Moraxella osloensis</i>	115781	1*	negative
		<i>Pseudomonas putida</i>	14164 ^T	1*	negative
		<i>Roseomonas mucosa</i>	115778	1*	negative
		Eukaryote	Ascomycota	<i>Aspergillus japonicus</i>	4062
<i>Candida tropicalis</i>	1404			1	
<i>Trichophyton rubrum</i>	9185			1	
Basidiomycota	<i>Malassezia globosa</i>		101597	1	

【現在開発中】 皮膚常在微生物カクテル

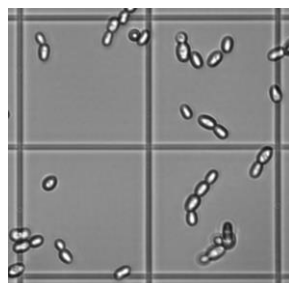
・細胞数測定が容易な例

NBRC 4062
Aspergillus japonicus



孢子

NBRC 1404
Candida tropicalis

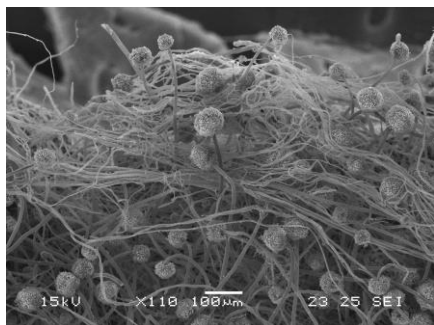


分散性のよい細胞

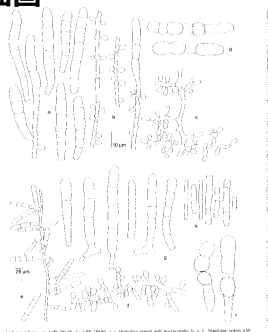
➡ 顕微鏡、フローサイトメトリーでの測定である程度正確に測定可

・細胞数測定が困難な例

NBRC 9455
Aspergillus brasiliensis

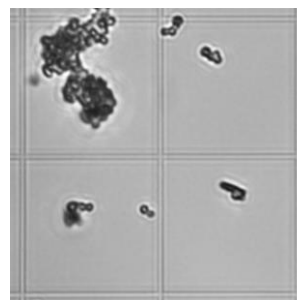


Trichophyton rubrum
の描画



出典 : Atlas of clinical fungi 2nd edition,
Amer Society for Microbiology

NBRC 101597
Malassezia globosa



➡ 顕微鏡、フローサイトメトリーでの測定は困難で不正確

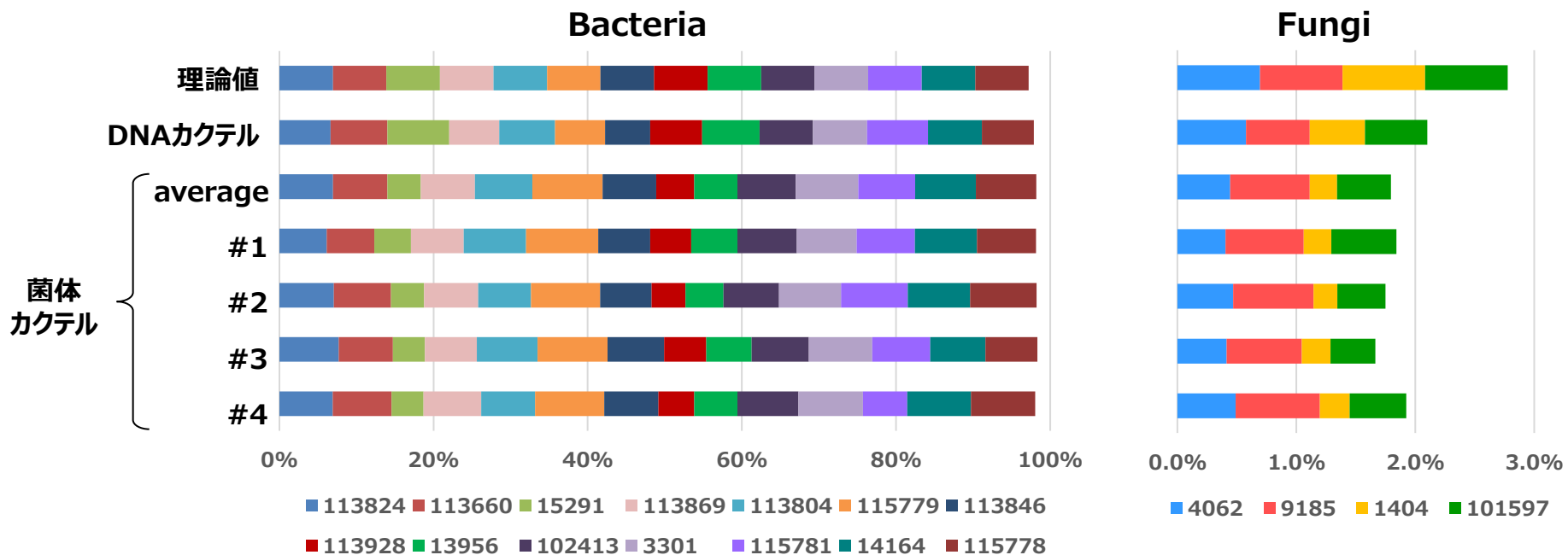
孢子以外の組織（細胞）は形態が均一ではなく
サイズもまちまち

細菌と同様に凝集が激しい

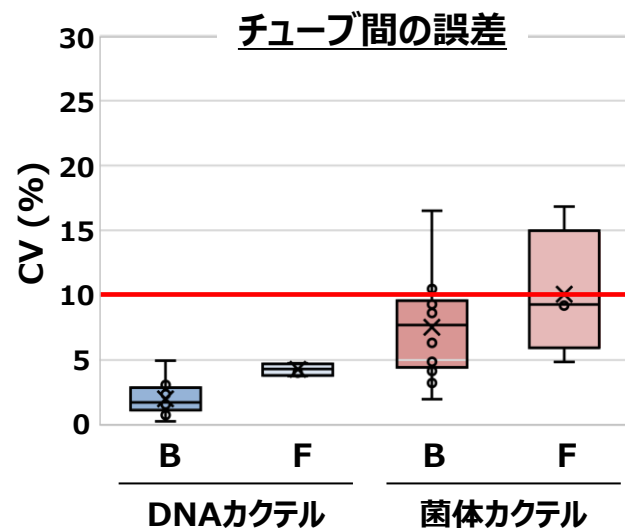
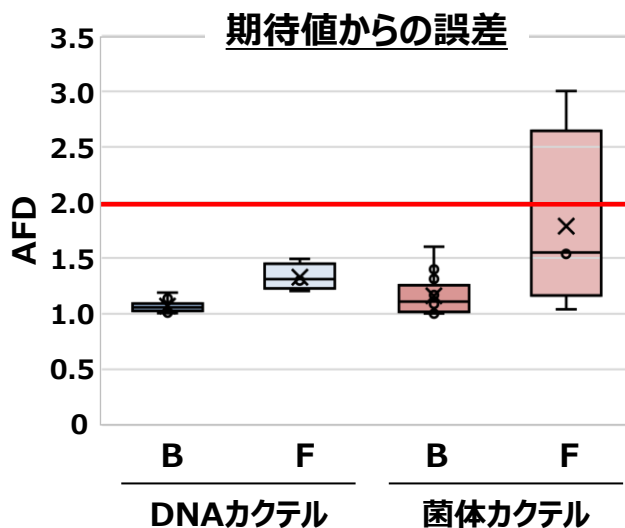
皮膚常在微生物カクテルの開発にあたり、HPLC法を適用できないか検討中

【現在開発中】 皮膚常在微生物カクテル

プロトタイプ的各菌の構成比率



- 細菌は比較的狙い通りに混合できている
- 真菌に対応できるようHPLC法に改良を加えて開発中
- 真菌の混合が上手くできていないのか、DNA抽出が正しくできていないのか？
- 使用に耐える品質はどれくらいか？



ご清聴ありがとうございました

ご不明な点がありましたらお気軽にご連絡ください。

〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8
独立行政法人製品評価技術基盤機構（NITE）
バイオテクノロジーセンター（NBRC）

(お問い合わせはこちら)
産業連携推進課

E-mail: bio-sangyo-inquiry@nite.go.jp

TEL: 0438-20-5764

URL:

<https://www.nite.go.jp/nbrc/industry/microbiome/index.html>