

# 気中微生物リアルタイム検出技術とその応用

## Instantaneous Bioaerosol Detection Technology and Its Application

株式会社 山武

長谷川 倫男  
Norio Hasegawa

株式会社 山武

堀口 康子  
Yasuko Horiguchi

株式会社 山武

山崎 信介  
Shinsuke Yamasaki

BioVigilant Systems, Inc. J. P. Jiang

### キーワード

バイオエアロゾル, リアルタイム, 散乱光, 蛍光

米国BioVigilant Systems社\*が開発したリアルタイム細菌ディテクタ™は、空気中に浮遊する細菌細胞など、生物由来のバイオエアロゾルをリアルタイムに検出することができる。装置内に吸引した試料空気にレーザーを照射し、その中に存在する微粒子による散乱光を検出することで、エアロゾルを検出する。さらに、そのレーザー光で励起された細菌や生物由来粒子が発する蛍光を同時に検出することによって、それがバイオエアロゾルか否かを判定する。本稿では、このリアルタイム細菌ディテクタのバイオエアロゾル検出技術について紹介する。(\*:azbilグループのグループ会社)

BioVigilant Systems, Inc. (Tucson, AZ, USA) has developed Instantaneous Microbial Detection™. Instantaneous Microbial Detection™ is capable of realtime detection of bioaerosols, especially bacteria and fungi spores. The air is aspirated into the equipment and aerosols in the air are detected by laser induced light scattering. At the same time, if the aerosol particles are bioaerosols, Instantaneous Microbial Detection™ recognizes them by their auto-fluorescence excited by the laser. This paper describes the instantaneous bioaerosol detection technology.

## 1. はじめに

普段目には見えないが、空気中には多くの粒子が浮遊している。それらの粒子は液体であったり固体であったり、大きさや性状も様々である。これらの浮遊粒子は総称してエアロゾルと呼ばれる。エアロゾルは、気象や公害、健康への影響まで、様々なかたちで我々に関係している。そのため、その性状などの物理的な解析、自然現象、医学・衛生学の分野からの解析など様々な角度からエアロゾルに対する研究がなされている。

エアロゾルのうち、生物由来のものを、特にバイオエアロゾルと呼んでいる。昨今注目されているインフルエンザも、バイオエアロゾル化したインフルエンザウイルス粒子が空気感染の原因となっているし、カビによるアレルギー症もバイオエアロゾルとしてのカビ胞子によって引き起こされる。細菌感染も同様である。さらに、このような、粒子が生きている細胞そのものである場合以外であっても、バイオエアロゾルは我々に影響を及ぼしている。花粉などはその良い例である。このようにバイオエアロゾルは、生物由来の物

質であるがゆえに、生物である我々ヒトの健康に大きく影響する。そのため、感染症学や衛生学など、医学的な立場から多く研究されている。

2009年にazbilグループの一員となった米国BioVigilant Systems社は、このようなバイオエアロゾルを瞬時に検出する装置「リアルタイム細菌ディテクタ」(図1)の開発を行ってきた。ここではリアルタイム細菌ディテクタのバイオエアロゾル検出技術と、それが検出する微生物の性状について紹介する。

## 2. リアルタイム細菌ディテクタの光学的原理

### 2.1 背景

前述のようにバイオエアロゾルは、以前から健康被害をもたらすものとして研究対象となってきた。衛生学などの分野とともに、食品や医薬品の製造現場では、微生物による汚染を防ぐためにも、それを管理し空気清浄度を保つことが重要となっている。



図1 BioVigilant Systems社製リアルタイム細菌ディテクタ

目に見えないバイオエアロゾルの検出、特に細菌やカビの検出は、空気を吸引し、その中にある粒子をフィルターで濾し取るか、空気を液体中に通すことで含まれる粒子を液体に懸濁させる、あるいは粒子の質量を利用して捕集面に慣性衝突させることで捕集し、その後培養して目に見える量に増やすことを行うのが一般的である(図2)。

しかし培養して目に見える量まで増殖させるには、通常よく検出される微生物でも1~3日かかり、生育の遅いものでは培養に1週間かかるものもある。そのため、サンプルを採取してから検出結果が出るまで、非常に時間がかかるという問題がある。そこで、フィルター上などに捕集したバイオエアロゾルを、培養を経ずに直接顕微鏡で観察する手法も行われているが<sup>(3)</sup>、バイオエアロゾル濃度が低いと顕微鏡下での検出が難しく、さらに観察には前処理が必要である。近年では、細胞の持つ遺伝子の本体であるDNAを検出する方法など、分子生物学的手法も開発されてきている。しかし、このような方法も検出に先立つ前処理が必要なため、実験室で行われる解析においては多くの成果を挙げてきたが、測定現場で処理をして検出することはできない。さらに、これらの方法による結果は、空気を吸引していた間だけのもので、恒常的にモニタリングできるものではない。したがって、バイオエアロゾルに対しては、その性状やヒトへの影響を調べる研究とともに、近年では、古くから行われてきた培養法に代わる迅速、簡便に検出する方法の研究が行われている<sup>(1), (2)</sup>。

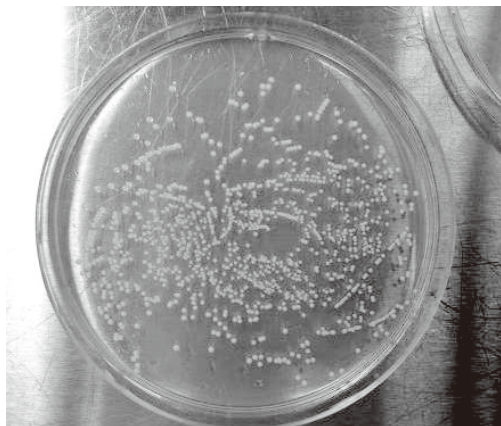


図2 培養により生育した細菌のコロニー

## 2.2 バイオエアロゾルの検出技術

リアルタイム細菌ディテクタはこのような背景のもと、バイオエアロゾルを瞬時に検出することを目的に開発されてきた。リアルタイム細菌ディテクタはバイオエアロゾルも含め、すべてのエアロゾルを検出するための光学系と、そのなかからバイオエアロゾルを判定するための光学系の、2種類の検出系を持つ。

エアロゾルの検出は、通常のレーザーパーティクルカウンターと同様に、粒子によるレーザー光の散乱で行う。レーザーの波長と粒子の大きさが同程度のときに起こるMie散乱による前方散乱を検出することで、エアロゾルの有無と大きさを判定する。光学系検出部分の構成を図3に示す<sup>(8)</sup>。ファンで吸引された空気は、図の④に導入される。その中にエアロゾルが存在すれば、光源①から発せられたレーザー光に当たり散乱光を生じる。粒子のまわりに生じる散乱光強度の分布のイメージを図4に示す。縦軸と横軸の交点に粒子が存在するとし、縦軸は上半分のみ示した。下に行くほど粒子が大きくなる。図の左側に光源を置いたとすると、粒子の大きさに従って散乱光強度の分布は複雑な形をとりながら変化していくが、図の右側への前方散乱が大きくなっていく。リアルタイム細菌ディテクタが検出対象とする大きさの粒子に由来する前方散乱光は、図3のレンズ②及び③によって粒子検出部⑥に集光される。検出されるエアロゾルの粒径範囲は0.5~15 $\mu\text{m}$ で、一般的に検出されるバイオエアロゾルの粒径範囲に合わせている。さらに、検出された前方散乱光の強度によって粒径が判定される。屈折率1.6のポリスチレンビーズで計算した、前方散乱光の強度と粒径の関係を図5に示す<sup>(8)</sup>。

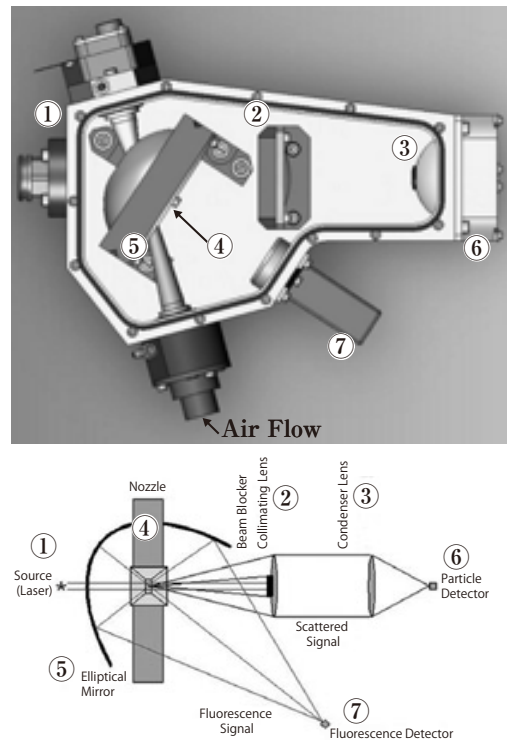


図3 リアルタイム細菌ディテクタの光学系部分のイラスト(上)とその模式図(下)<sup>(8)</sup>

- ①光源、②コリメートレンズ、③コンデンサーレンズ、④検出部、⑤集光ミラー、⑥粒子検出部、⑦蛍光検出部

一方、バイオエアロゾルの判定は、エアロゾルの蛍光の有無を検出することによって行う。

生物細胞の多くは自家蛍光を持つため、それを指標にして、非生物粒子、生物粒子の判定を行う。詳細は第3章で述べるが、生物細胞に存在して自家蛍光を持つものとして、アミノ酸の一種であるトリプトファン、代謝産物のNADH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide)、ビタミンであるリボフラビンが良く知られている。リアルタイム細菌ディテクタはおもに、このうちのNADH及びリボフラビン由来とされ

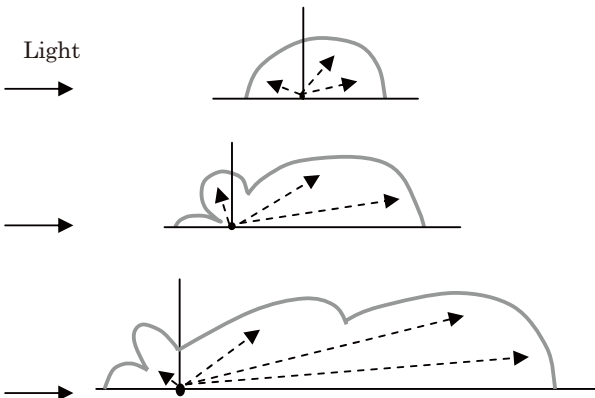


図4 粒子のまわりの散乱光分布のイメージ (軸の交点に粒子、左側に光源があるとし、下へ行くほど粒子径が大きくなるとした)

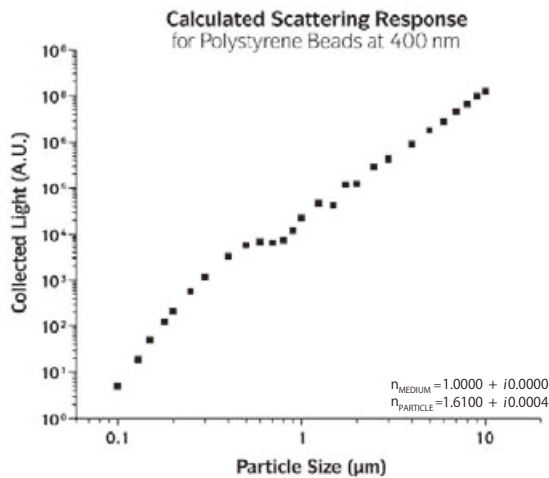


図5 前方散乱光強度と粒径の関係<sup>(8)</sup>

る蛍光を検出している<sup>(8)</sup>。例として、リボフラビンの励起波長と蛍光強度との関係を図6に示す<sup>(7), (8)</sup>。リアルタイム細菌ディテクタでは、粒子の検出及び自家蛍光物質の励起のためのレーザーは波長405nmのものが搭載されている<sup>(8)</sup>。

図3 ④の検出部に導かれたエアロゾルのうちバイオエアロゾルは、散乱光を生じさせると同時に、レーザーによって細胞内の蛍光物質が励起され、蛍光を発する。発した蛍光は、集光ミラー⑤によって蛍光検出部⑦に集光され検出される。これによって散乱光を生じさせたエアロゾルが、バイオエアロゾルであるかどうか判定される。

図7にリアルタイム細菌ディテクタでバイオエアロゾルを測定した例を示す。1m<sup>3</sup>の機密性の高いチャンバーを用意し、内部をHEPAフィルターユニットで清浄にしたのち、黄色ブド

ウ球菌*Staphylococcus aureus*を含む菌液を霧状に噴霧することでバイオエアロゾルを発生させた。リアルタイム細菌ディテクタでモニタリングすると同時に、ある時間におけるチャンバー内の空気をサンプリングし、それに含まれるバイオエアロゾルを培養した。リアルタイム細菌ディテクタによる計数結果と培養法による結果は、このとき良く相関していた。

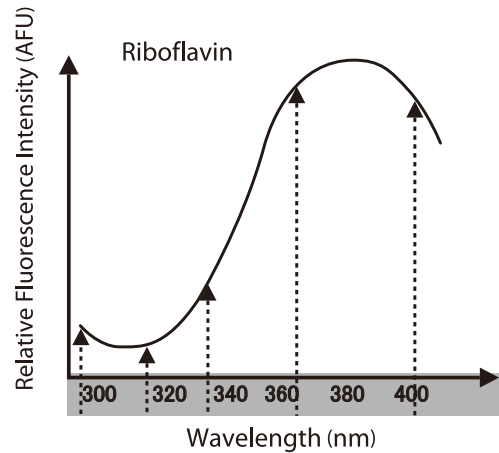


図6 リボフラビンの励起吸収スペクトル<sup>(7), (8)</sup>

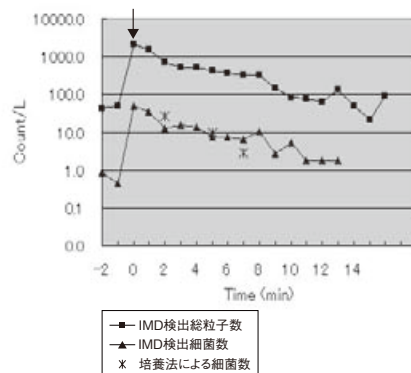


図7 リアルタイム細菌ディテクタによる細菌の検出(0min (矢印)で噴霧を開始)

### 2.3 新たな微生物迅速測定法としての利用

リアルタイム細菌ディテクタのおもなアプリケーションは、製薬工場の製造ラインにおける微生物モニタリングである。注射剤や点眼剤などのいわゆる無菌医薬品は、「厚生労働省・無菌操作法による無菌医薬品の製造に関する指針」に従って製造されている。この中で、製造環境を監視するものとして、0.5μm以上の大きさの浮遊粒子及び細菌・真菌の微生物が挙げられている。

環境監視測定の頻度については、指針の中で参考として挙げられている。グレードA及びBの環境では、浮遊粒子については無菌作業中、浮遊微生物については作業シフトごととなっている。つまり、浮遊粒子については従来型のレーザーパーティクルカウンターで作業中リアルタイムに監視できるが、浮遊微生物についてはリアルタイムモニタリングする手法がこれまでなかったため、作業が停止したタイミングで空気をサンプリングし、培養法などの検査に供する。また、製造エリアの無菌試験においては、培養時間が24時間～7



日間に設定されており、結果が出るまでに相当の時間を要する。その間、製品は出荷できない。

リアルタイム細菌ディテクタはレーザーパーティクルカウンターと同様にリアルタイムで浮遊粒子を測定しつつ、そのなかの浮遊微生物つまりバイオエアロゾルを検出できる。これによって製造環境を常時モニタリングし、その清浄度を担保できれば、最終製品の品質検査の代替とし、従来の、製造後の検査に時間がかかるなどの問題の解決を図ることができる。また、リアルタイムであることで、菌による汚染が発生した場合、そのときの作業内容などから何が原因であったか分析しやすくなり、対策を立て易くなる。

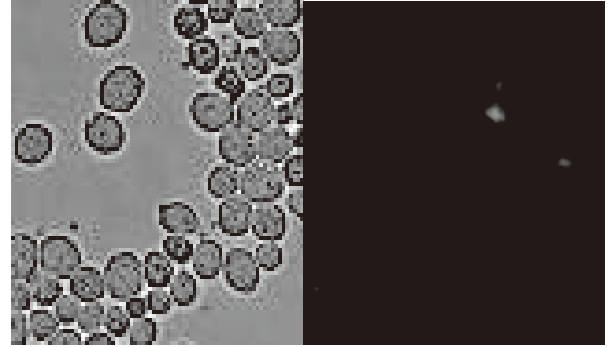


図9 酵母の顕微鏡写真(左)とその自家蛍光(右)

### 3. 生物学的視点からの検出原理

#### 3.1 微生物の自家蛍光

第2章ではリアルタイム細菌ディテクタの細菌検出技術について装置の面から述べたが、この章ではその検出原理の元となる微生物の知見について、もう少し詳しく紹介する。

バイオエアロゾルのうち微生物であるものは、ウイルス、細菌、カビ孢子・酵母が挙げられ、その大きさは、0.01~数十 $\mu\text{m}$ にわたる(図8)。リアルタイム細菌ディテクタの検出対象となっている細菌、カビ孢子は0.2 $\mu\text{m}$ 以上になるので、エアロゾルとしては大きな部類に入る。したがって、散乱光の原理に基づいた微生物粒子の検出が可能となっている。

一方、細菌の自家蛍光は古くから知られている(図9)。医学・生物学分野で最大の論文データベースで検索すると、細菌の自家蛍光を論じているもっとも古い報告として1962年のものがヒットする<sup>(4)</sup>。さらに他の論文も辿ると、1950年代には呼吸鎖、NADHと蛍光についての報告があり、1949年には細菌の自家蛍光とリボフラビンの関連を言及した報告がある<sup>(5)</sup>。このことから、研究者の間では、20世紀前半にはその性質が認められていたと思われる。

近年、分子生物学の分野で、生体分子を蛍光分子で標識して検出する手法が盛んに行われている。蛍光顕微鏡が普及し、細胞内の微小な器官や極微量の成分、細胞の働きを蛍光標識あるいは蛍光染色することで検出することが可能になった。ところがこのような手法が盛んになったことで、検出系の開発は、細胞の自家蛍光をノイズとして遮断する方向に進んできた。リアルタイム細菌ディテクタは、逆にこの自家蛍光をうまく利用した画期的な技術を採用していると言える。

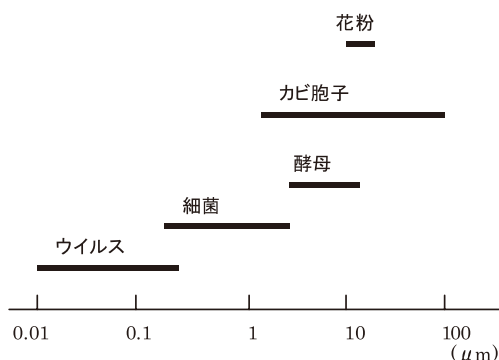


図8 微生物の大きさ

#### 3.2 微生物の代謝

それでは、このような自家蛍光のもととなる物質は、細胞内で何を担っているのか？

細菌、カビは自分で栄養を得て増殖することができる。増殖するにはエネルギーが必要だが、細菌、カビのみならず生物の細胞が増殖するため、あるいは生きるためのエネルギーを得る代謝は、大雑把に言えば、ガソリンエンジンに例えることができる。ガソリンエンジンでは、ガソリンという炭化水素を酸素で燃やすことによって、おもに二酸化炭素と水を排出しながら運動エネルギー、熱エネルギーを得る。このとき、反応を引き起こすのは点火プラグである。一方、生物の細胞では栄養源としてのブドウ糖など炭水化物を、呼吸で得た酸素を使って燃やすことで、二酸化炭素と水を排出しながら、生命活動のための化学エネルギーを得る。このとき反応を引き起こすのは、点火プラグの代わりに酵素蛋白質である。この反応が、生物が行っているいわゆる酸素呼吸で、細菌からヒトまで多くの生物で基本的に共通である。

炭水化物を酸素で燃やす、つまり酸化するということは、酸素の側から見れば、水に還元されるということである。酸素を水に還元するための還元力を提供するのがNADHであり、その還元力を酸素に伝える経路の一部を構成するのが、細胞内でリボフラビンが変化して形を変えたFMN (Flavin Mono nucleotide)である。リアルタイム細菌ディテクタは、これらの分子に由来するとされる細胞の自家蛍光を指標として、生物由来粒子を識別している。

還元力であるNADHは、栄養素として取り込んだブドウ糖を分解する複数の反応過程で作られられる。この代謝経路が止まるとNADHの供給は止まり、残っているNADHも速やかに酸化型の $\text{NAD}^+$ へと変化する。したがってNADHが存在するかどうかは、細胞の代謝活性の指標としてよく利用される。

ちなみにウイルスは核酸と蛋白質の殻だけの単純な構造で、こうした代謝反応は行わず、また単独では増殖しない点で細菌細胞とは異なる。このような、生命反応である代謝を行わない粒子は、リアルタイム細菌ディテクタの検出対象とはしていない。

### 3.3 VBNCの検出可能性

前述した培養による微生物の増殖能を指標とした検出では、理論的には生きて増殖できる微生物は検出することができる。しかし、実際には生きていても増殖しない細胞が存在する。VBNCあるいはVNC (Viable but Nonculturable)と呼ばれる細胞の状態がそれである。代謝活性を測定すると、たしかに活性は確認できるのだが、培養すると増殖してこない。そのような細胞の状態は以前から知られていたが、ある種の病原菌が、VBNC状態においても病原性を発現する可能性が指摘され、感染症学の分野で重視されている<sup>(6)</sup>。

このような状態の細胞は、従来の培養法では検出できなかったが、3.2で述べたような代謝をしている限り細胞は自家蛍光を持つことが考えられ、リアルタイム細菌ディテクタによって検出できることが期待されている。

## 4. おわりに

ヒトゲノムが解読された当時、ヒトの遺伝子はおおよそ31,000個と思われた。しかし、その後の研究によって、これまで無意味だと思われていた因子も細胞の働きに大きく関わっていることが分かった。生物個体として見ればきれいに均衡が保たれていても、その中身は非常に複雑で混沌とした状態である。ヒトよりずっと単純な細菌においても、数千の遺伝子が明らかになっており、細胞を維持する仕組みは、さらに多くの因子が入り乱れて複雑なものと考えられる。バイオテクノロジーでは、この中から目的に応じて、利用できる特徴的な性質を取り出すための知見を蓄積することが重要である。リアルタイム細菌ディテクタは比較的単純な構造でありながら、生物細胞が持っている自家蛍光という性質をうまく利用して、検出している。

近年、医薬品製造の現場では、工程内で品質を管理し、最終製品試験の代替とすることで出荷までの時間を短縮する「リアルタイムリリース」が1つの関心事となっている。リアルタイム細菌ディテクタによって製造環境を常時モニタリングできれば、最終製品試験における従来の培養法による時間を省くことができるという期待があり、リアルタイムリリースを実現する強力なツールとなると思われる。それによって従来行われていた管理手法に代わる、新たなコンセプトを提唱できる可能性が期待されている。

### 謝辞

細菌の噴霧試験にあたり、(財)北里環境科学研究センター奥田舜治先生、菊野理津子先生、岡上晃氏に御指導ならびに実験実務への多大な御協力を賜りましたことを、厚く御礼申し上げます。

### 参考文献

- (1) Renald G. Pinnick, Steven C Hill, Paul Nachman, J. David Pendleton, Gilbert L. Fernandez, Michael W. Mayo and Joohn G. Bruno: Fluorescence Particle Counter for Detecting Airborne Bacteria and Other Biological Particles, *Aerosol Sci. Technol.*, Vol.23, pp.653-664 (1995).
- (2) F. L. Reyers, T. H. Jeys, N. R. Newbury, C. A. Primmerman, G. S. Rowe and A. Sanchez: Bio-Aerosol Fluorescence Sensor, *Field Anal. Chem. Technol.*, Vol.3(4-5), pp.240-248 (1999).
- (3) 石松維世, 福田和正, 石田尾徹, 谷口初美, 保利 一: 職場における微生物のリスク評価のためのバイオエアロゾル捕集方法及び検出方法, *産業衛生学雑誌*, Vol.48, pp.1-6(2006)
- (4) L.S. Agroskin, and N.A. Pomoshchnikova: Studies on the excitation spectra of auto-fluorescence of microorganisms, *Biofizika*, Vol.7, pp.292-297 (1962).
- (5) Otto A. Bessey, Oliver H. Lowry, Ruth H. Love: The Fluorometric Measurement of The Nucleotide of Riboflavin and Their Concentration in Tissues, *J Biol. Chem.*, Vol.180, pp.755-769 (1949).
- (6) Ishrat Rahman, M. Shahamat, M. A. R. Chowdhury, R. R. Colwell: Potential Virulence of Viable but Nonculturable *Shigella dysenteriae* Type 1, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.62(1), pp.115-120 (1996).
- (7) J. K. Li, E. C. Asali, A. E. Humphrey: Monitoring Cell Concentration and Activity by Multiple Excitation Fluorometry, *Biotechnol. Prog.*, Vol.7, pp.21-27 (1991).
- (8) J.P. Jiang: Instantaneous Microbial Detection Using Optical Spectroscopy, In Michael Miller (ed.), *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods*, Chapter 5, PDA Press (2005).

### 商標

「Instantaneous Microbial Detection™」はBioVigilant Systems社の商標です。

「リアルタイム細菌ディテクタ」は株式会社 山武の商標です。

### 著者所属

長谷川 倫男	研究開発本部
山崎 信介	研究開発本部
堀口 康子	研究開発本部
J. P. Jiang	Chief Technical Officer, BioVigilant Systems, Inc.

