

# 製造環境、室内環境の主要な微生物 (細菌と真菌)と生息場所

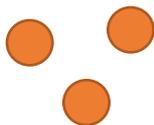
株式会社 コーガアイソトープ  
滅菌研究センター  
越川 富比古



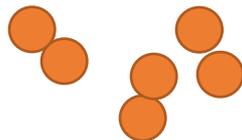
# 理解していただくための基礎知識

1. 菌の形態（顕微鏡観察での細胞の形）  
球菌、桿菌、螺旋菌、真菌（カビ・酵母）
2. グラム染色（細胞の構造を区別する方法）
3. 菌の増殖曲線（非芽胞形成菌、芽胞形成菌）
4. 芽胞形成菌の生活環  
芽胞の構造

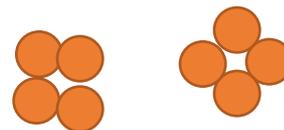
# 細菌の形態（球菌）



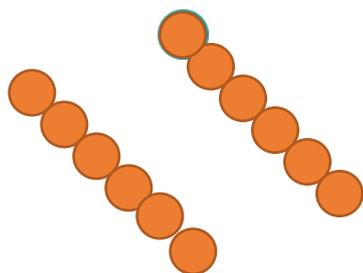
単球菌



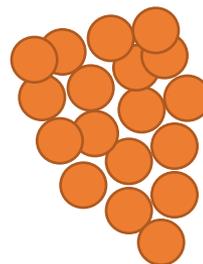
双球菌



四連球菌

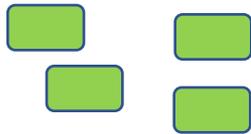


連鎖球菌

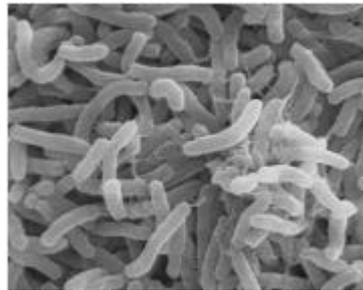


ブドウ球菌

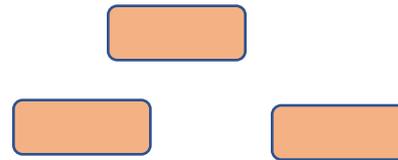
# 細菌の形態 (桿菌)



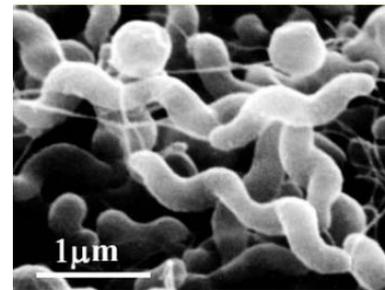
短桿菌



ラセン菌 (コレラ菌)



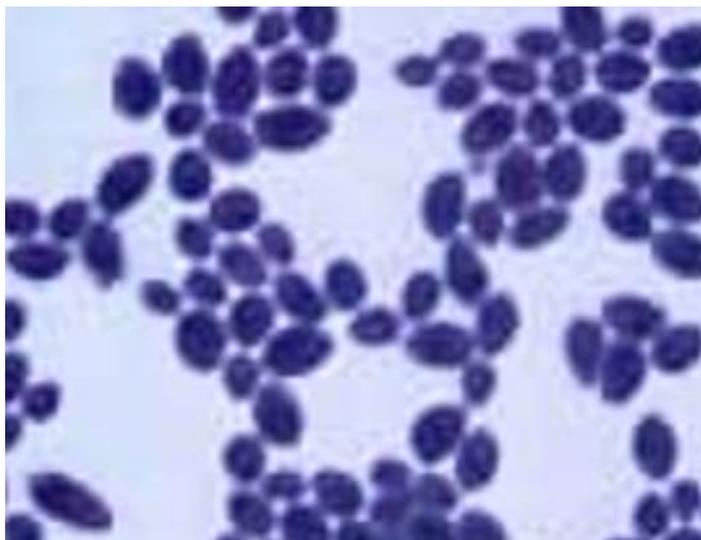
桿菌(棒状の菌)



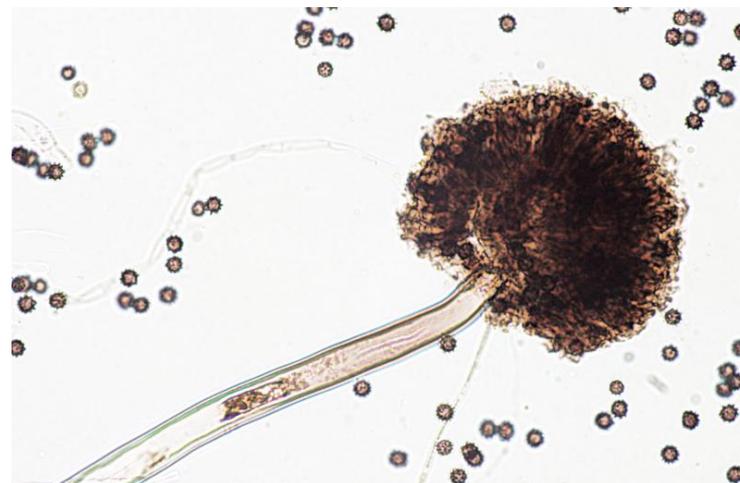
ラセン菌  
(カンピロバクター・ジェジュニ)

# 真菌の構造(カビ・酵母)

**Candida albicans**  
カンジダ・アルビカンス

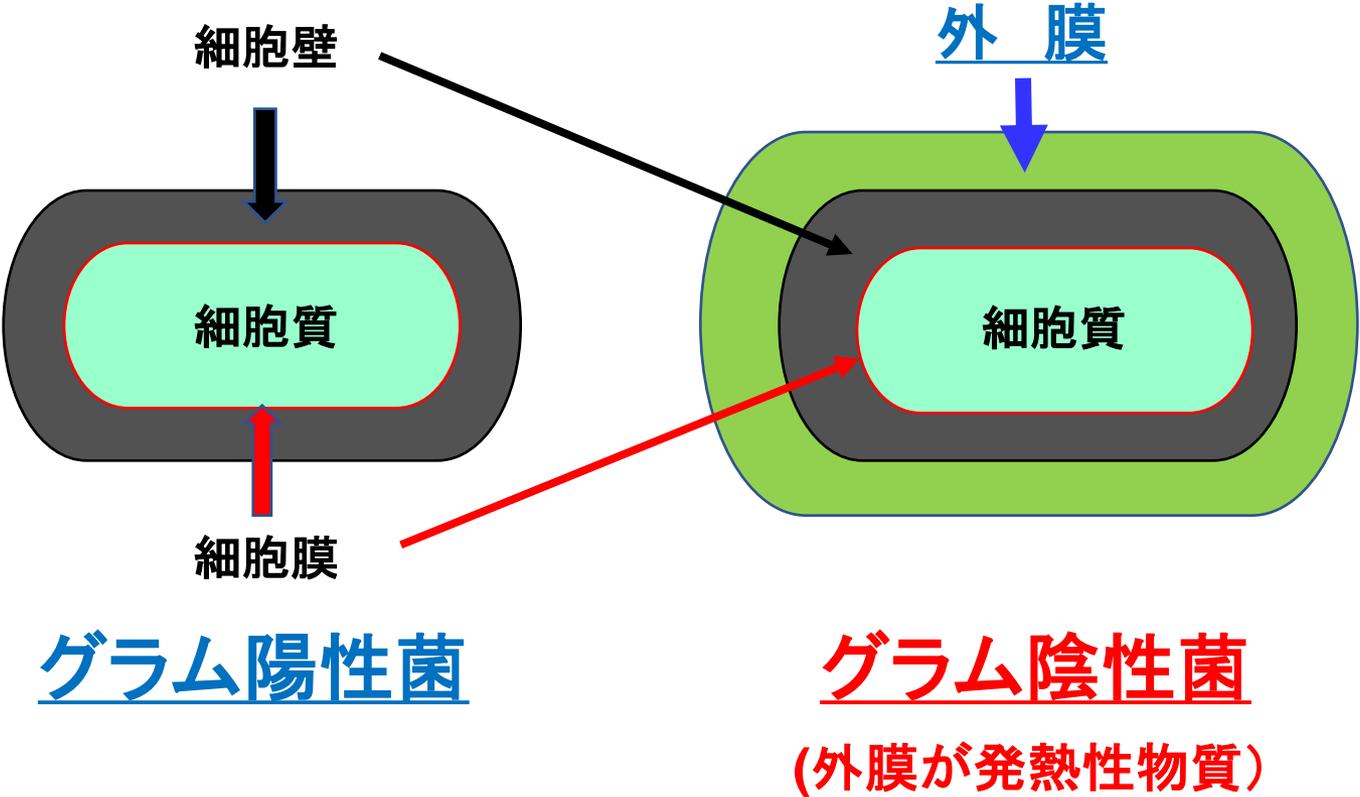


**Aspergillus niger**  
アスペルギルス ニガー



細菌に比べて、細胞の大きさが大きい

# 細胞の構造



# グラム染色の例



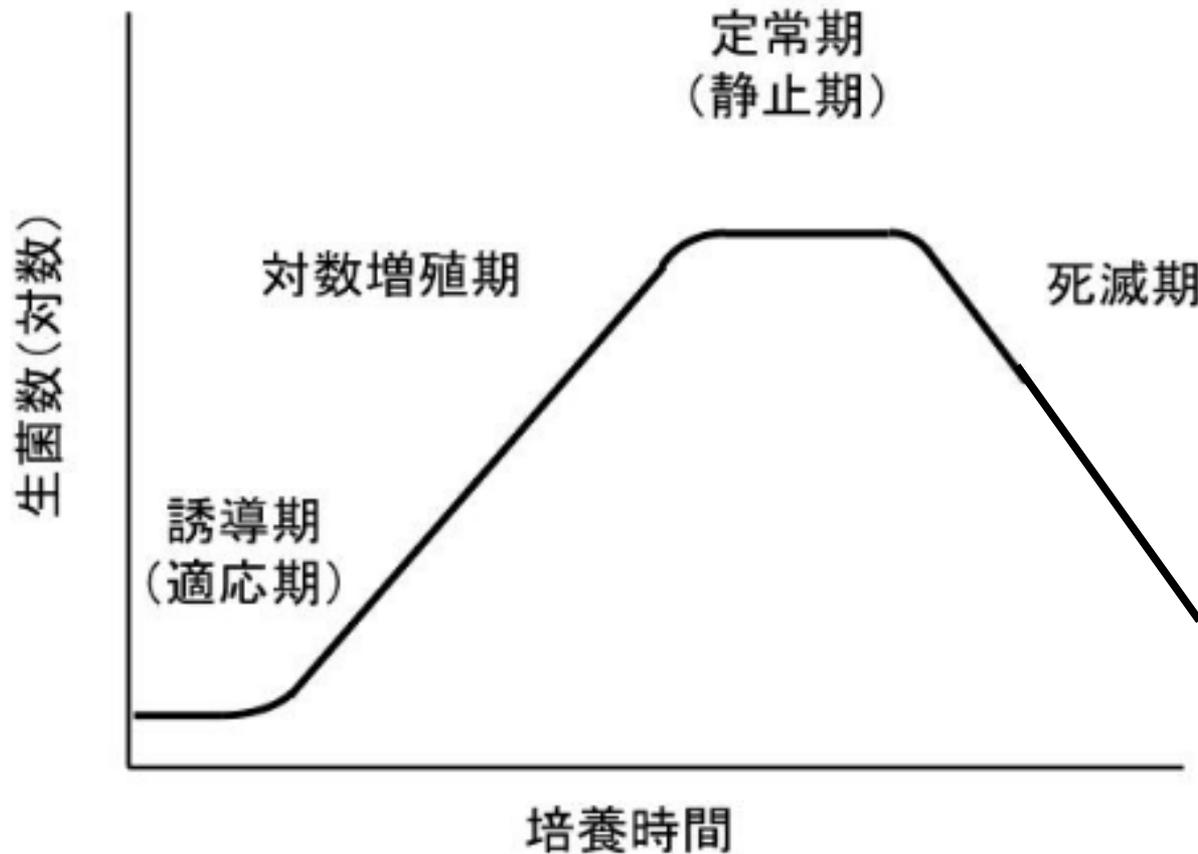
グラム陽性菌(桿菌)



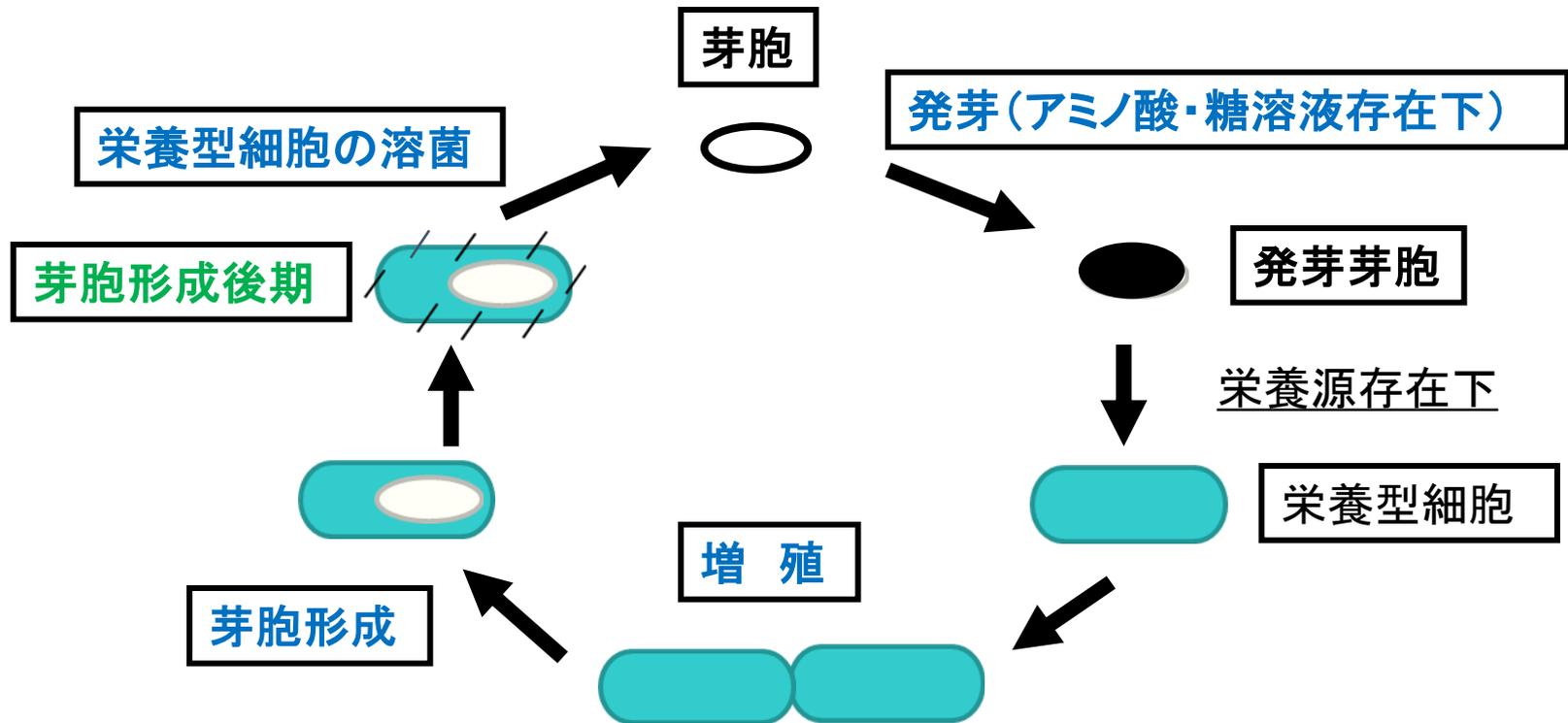
グラム陰性菌(桿菌)

# 菌の増殖曲線（非芽胞形成菌）

液体培地で菌を培養した場合



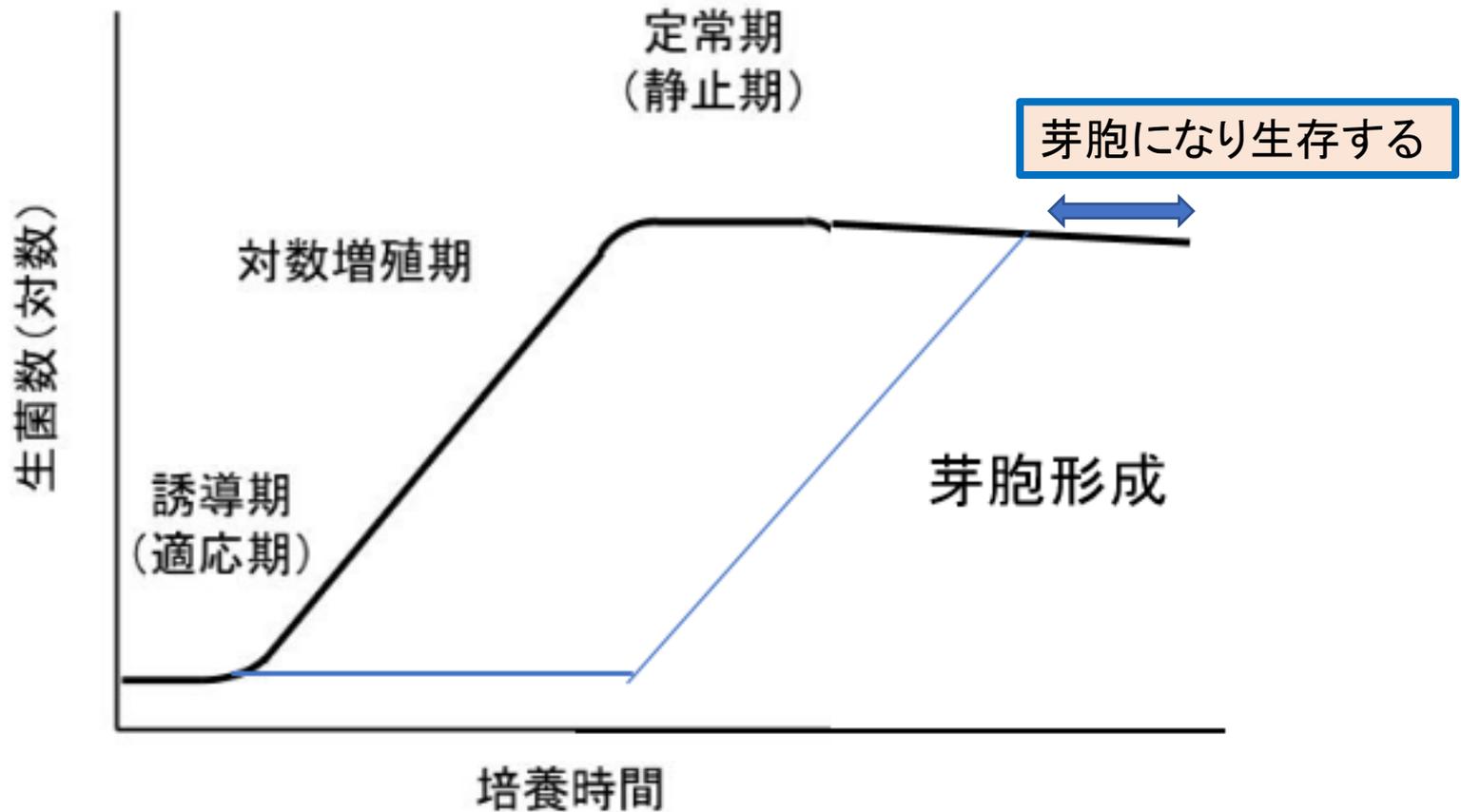
# 芽胞形成菌の生活環



- ・芽胞は熱、化学薬品(ガスも含む)、紫外線、放射線に対して抵抗性を示す
- ・芽胞は休眠状態であるので、何千年も生存することができる

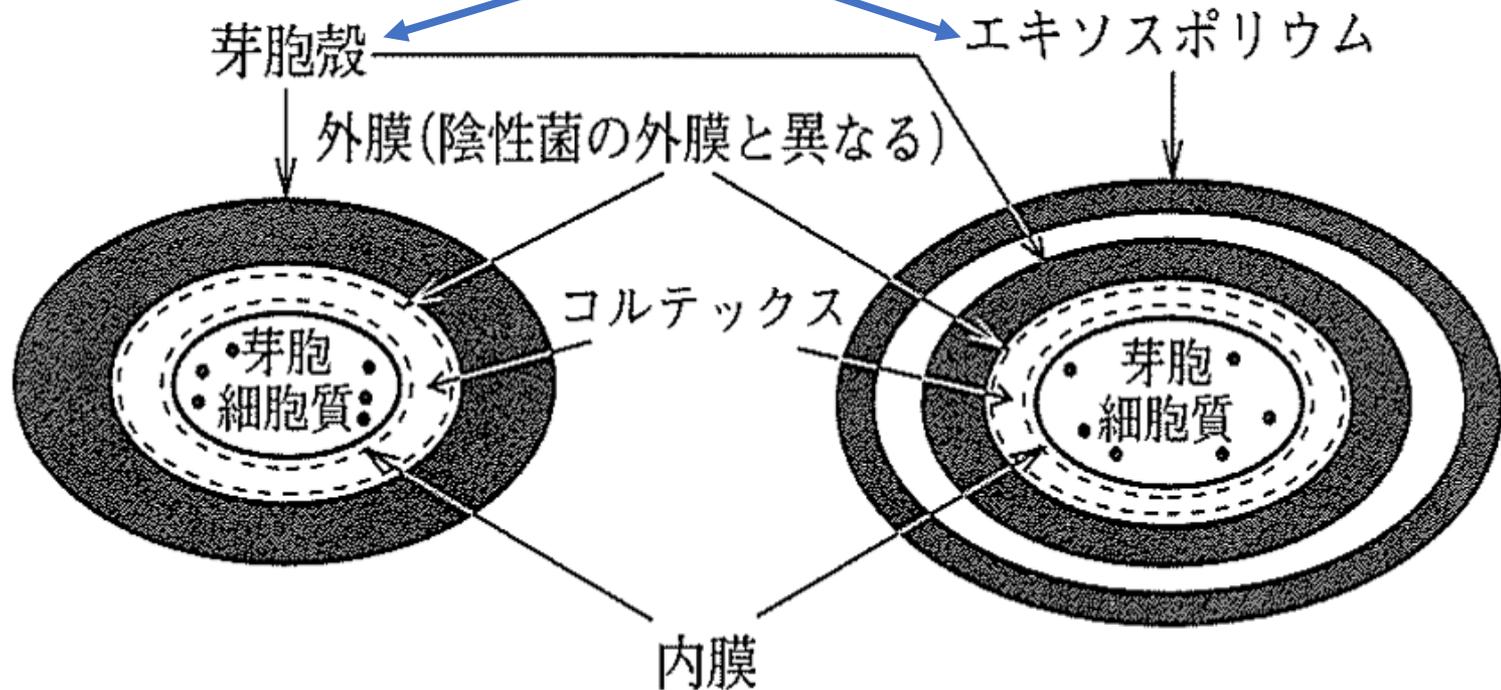
# 芽胞形成菌の増殖曲線

芽胞形成菌を液体培地で培養した場合



# 芽胞の構造

芽胞の表層は疎水性である



# 生息場所による菌の分類

# 1.水系の細菌

## 1) 特 徴

- ・海や河川及び湿った環境に生息する
- ・新鮮食品の腐敗・変敗上重要な菌群である
- ・好気性～通性嫌気性(酸素があれば利用、酸素なしでも増殖する)の特徴を持つ

## 2) 増殖最適温度

- ・低温 (20～30℃)

## 3) 主な菌の種類(属) → グラム陰性菌が多い

- ・ *Pseudomonas*属(緑膿菌)    ・ *Acinetobacter*属
- ・ *Moraxella*属    ・ *Flavobacterium*属(黄色色素産生)
- ・ *Alcaligenes*属(アルカリ産生菌)    ・ *Aeromonas*属
- ・ *Vibrio*属(腸炎ビブリオ、コレラ菌)

# 2. 土壌の細菌

## 1) 特 徴

- ・ 土壌または土壌の混在する環境に常在して生息する

## 2) 増殖最適温度

- ・ 低温 (20~30℃)

## 3) 主な菌の種類(属) → グラム陽性菌が多い

- ・ *Nocardia*属(放線菌)    ・ *Mycobacterium*属(結核菌)
- ・ *Cytophaga*属(黄色色素産生)
- ・ *Streptomyces*属(放線菌)    ・ *Actinomyces*属(放線菌)
- ・ *Corynebacterium*属    ・ 芽胞形成菌 (中温から高温)

# 3. 動物・ヒトの細菌

## 1) 特 徴

- ・動物体に寄生・常在するタイプで、多くは人・動物に対して病原性を示す
- ・通性嫌気性の特徴を持つ

## 2) 増殖最適温度

- ・中温 (35~40℃)

## 3) 主な菌の種類(属)

- ・ *Shigella*属(腸内細菌科、赤痢菌)    ・ *Micrococcus*(体表に常在)
- ・ *Salmonella*属(腸内細菌科、サルモネラ菌)    ・ *Listeria*属(リステリア菌)
- ・ *Esherichia*属(腸内細菌科、大腸菌)    ・ *Enterococcus*属(腸球菌)
- ・ *Staphylococcus*属(体表に常在、黄色ブドウ球菌)
- ・ *Corynebacterium*属(ジフテリア菌)    ・ *Erysipelothorix*(豚丹毒菌)
- ・ *Streptococcus*属(溶血性連鎖球菌)

# 4.植物の細菌

## 1) 特 徴

- ・ 植物体に寄生・付着するタイプで、多くは植物に対して病原性を示す

## 2) 増殖最適温度

- ・ 低温 (20~30℃)

## 3) 主な菌の種類(属)

- ・ *Erwinia*属(腸内細菌科)    ・ *Agrobacterium*属
- ・ *Xantomonas*属(黄色色素産生菌)

# 5.乾燥した環境の細菌

## 1) 特 徴

- ・乾燥した環境(空中など)に常在するタイプで、耐乾燥性、耐熱性を示す。芽胞を形成する種類が含まれる

## 2) 増殖最適温度

- ・低温～高温 (20～60℃)

## 3) 主な菌の種類(属)

- ・ *Bacillus*属(芽胞形成、炭疽菌、セレウス菌)
- ・ *Staphylococcus*属(体表に常在、黄色ブドウ球菌)
- ・ *Micrococcus*属(体表に常在)
- ・ *Streptococcus*属(溶血性連鎖球菌)

# 6.嫌気環境の細菌

## 1) 特 徴

- ・ 乾や瓶詰めなど、酸素のない嫌気環境で増殖するタイプで、芽胞を形成する種類が含まれる。耐熱性、耐薬品性等、強い抵抗性を示す

## 2) 増殖最適温度

- ・ 低温～高温（20～60℃）

## 3) 主な菌の種類(属)

- ・ *Clostridium*属(芽胞を形成、破傷風菌、ボツリヌス菌、ウェルシュ菌)

# 1. 湿気の高い環境の真菌・酵母

## 1) 特 徴

- ・ 湿気・水分が多い場所に存在する(水の使用、結露水の発生、上記の放出、漏水・雨漏りなど)
- ・ 空調機内部などの空気の流れが集中し、かつ湿度の高い場所に存在する

## 2) 増殖最適温度

- ・ 中温 (20～35℃) 、 (20～30℃)

## 3) 主な菌の種類(属)

- ・ *Cladosporium*属(クロカビ)    ・ *Fusarium*属(アカカビ)
- ・ *Alternaria*属(ススカビ) ・ *Trichoderma*属(ツチアオカビ)
- ・ *Aureobasidium*属(黒色酵母様菌)
- ・ *Rhodotorula*属(赤色酵母)

## 2. 乾燥した環境の真菌・酵母

### 1) 特 徴

- ・ 粉塵がたまりやすい場所、空気がよどむ場所に存在する
- ・ 空調機内部などの空気の流れが集中し、かつ乾燥した場所に存在する

### 2) 増殖最適温度

- ・ 中温～高温

(20～50℃) (コウジカビ、日和見真菌症)

- ・ 中温 (20～35℃) ➡ *Penicillium* 属 (アオカビ)

*Eurotium* 属 (カワキコウジカビ)

*Wallemia* 属 (アズキイロカビ)

- ・ 中温 (25～37℃) ➡ *Cryptococcus* 属 (酵母、日和見真菌症)

### 3) 主な菌の種類(属)

➡ *Aspergillus* 属

# 菌の同定

- ・放射線滅菌での菌の同定は、放射線抵抗性を評価する指標となる
- ・バイオバーデン構成菌の解析
- ・製造工程検出菌とバイオバーデン構成菌を比較して、汚染源の特定
- ・菌の性質を把握して、菌数を減らす除菌方法への対応

# 微生物の同定方法

同定の手順はBergey's Manual of Systematic Bacteriologyが基本 (形態・生化学的特徴)

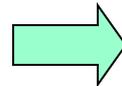
- ① グラム陽性菌・陰性菌に対しての簡易同定キット  
菌の生化学的特徴を基に同定する  
例) BD BBLCRYSTAL 産業用
  - ② 遺伝子同定  
16S rRNA遺伝子配列を基に菌を同定する
  - ③ MALDI-TOF MSを用いた同定  
菌の構成タンパク質を基に菌を同定する
- ②と③の同定法は24時間以内に結果が得られる

# バイオバーデンの同定手順

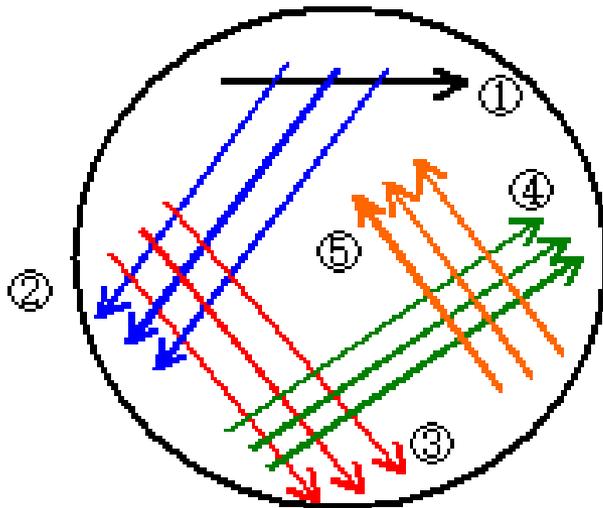
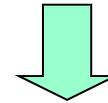
- 1) バイオバーデンの単離
- 2) グラム染色
- 3)
  - ・ BBLクリスタル同定キット → 24時間以上
  - ・ MALDI TOF MS (菌のタンパク質)による同定、あるいは遺伝子同定  
↓ 30分から10時間以内
- 4) バイオバーデンの同定結果が判明

# バイオバーデンの分離(画線分離培養)

釣菌(シャーレから菌を取る)



新しい培地に植菌し培養

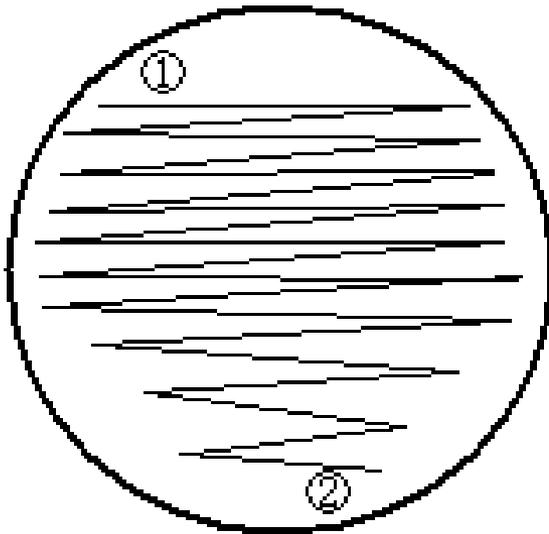


画線の仕方手順

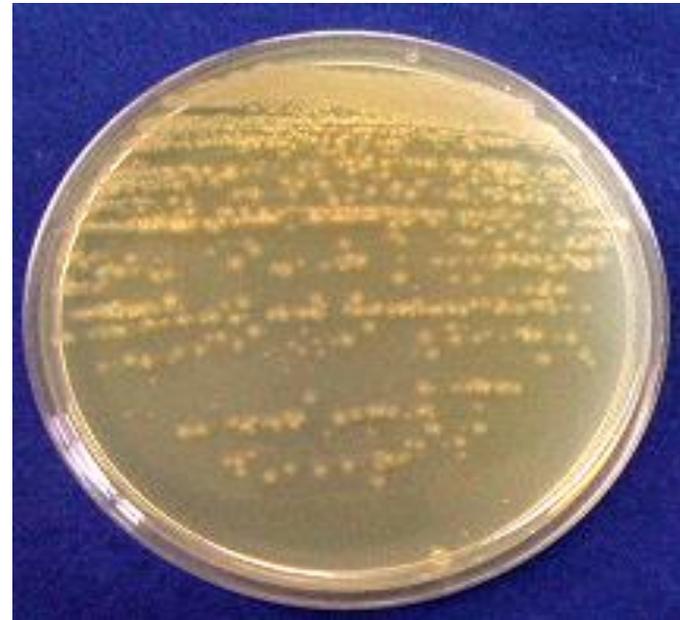


画線分離培養したコロニー

# バイオバーデンの単離(画線分離培養)



画線の仕方の手順



画線分離培養したコロニー

培養後、独立したコロニーを釣菌して、純培養する

# グラム染色の例



グラム陽性菌(桿菌)



グラム陰性菌(桿菌)

# BBLクリスタル同定システムによる菌種の同定

1

BBL CRYSTAL 専用プロスで菌液を調整する。  
(GPはマクファーランド#0.5に、RGPは#2.0に調整する。)

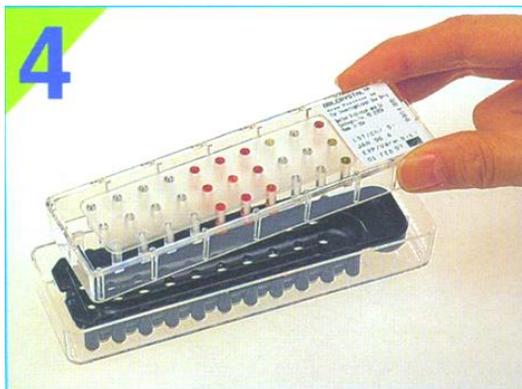
2



3



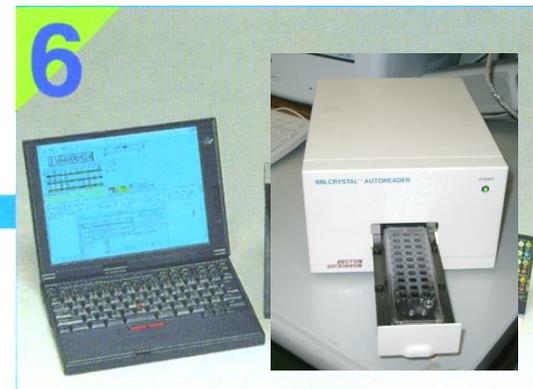
4



5

パネルを逆さにし、35~37℃で培養する。  
(GPは18~24時間、RGPは4時間。)

6



# BBLクリスタル同定システムによる同定結果の例

The screenshot displays the BBLCRYSTAL Computer Code Book for Windows (Version 6.0) interface. At the top, a grid of biochemical test results is shown for various substrates (A-J) across multiple tubes (1-4). The results are indicated by symbols: a plus sign in a circle for positive and a minus sign in a circle for negative. For example, FTR+, FAR+, and FGN- are highlighted in red. Below the grid, the identification results are listed as:

同定結果	判定詳細	Biotype validity	Confidence value
1 Bacillus cereus		2.681	> 0.9999
2 Bacillus			
3 Bacillus			

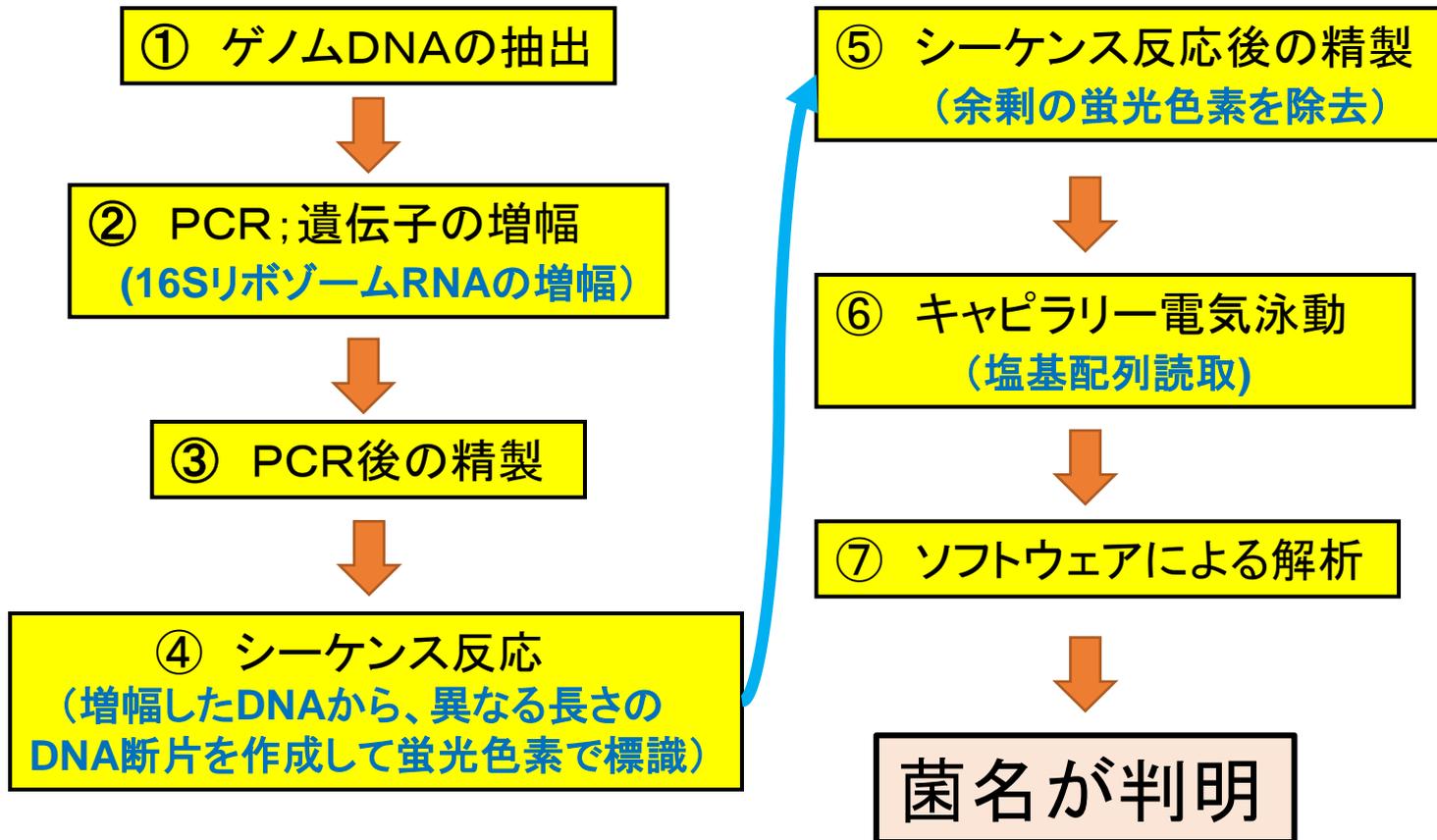
An inset window titled "Bacillus cereus" provides a detailed view of the organism's morphology, showing six microscopic images under the heading "生活環での形態" (Morphology in the life cycle). The images are labeled as follows:

- 栄養型細胞 (Nutrient type cells)
- 芽胞形成期細胞 (芽胞形成しないタイプ) (Spore formation stage cells, non-sporulating type)
- 芽胞 (シリンダー型) (Spores, cylindrical type)
- 栄養型細胞 (Nutrient type cells)
- 芽胞形成期細胞 (芽胞形成しないタイプ) (Spore formation stage cells, non-sporulating type)
- 芽胞 (シリンダー型) (Spores, cylindrical type)

Annotations on the screenshot include:

- "写真掲載有りの表示" (Indication of photo availability) pointing to the grid.
- "写真閲覧ボタン" (Photo viewing button) pointing to the "写真" (Photo) button in the right sidebar.
- "画像枚数表示" (Image count display) pointing to the "画像数(1/2)" label in the inset window.
- "画像表示カーソル" (Image display cursor) pointing to the mouse cursor over the first image in the inset window.

# 遺伝子同定の手順



# 遺伝子配列による同定（塩基配列）

[検体名] KI-110303

[塩基配列データ] 解析塩基数：701bp

```
GAGCGAACGCTGGCGGCATGCTTAACACATGCAAGTCGCACGGGCAGCAATGTCAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAGGAA  
CGTGTCCCTGAGGTGGGGGACAACCCCGGGAACTGGGGCTAATACCGCATATGGGCTGAGGCCAAAGCCGAGAGGGCGCCTTTG  
GAGCGGCCTGCGTCCGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGCCTGCGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAG  
CCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAG  
CAATGCCGCGTGGGTGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAAGCCCTTCGACGGGGACGATGATGACGGTACCCGTAGAAGAAGCCC  
CGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCC  
GCGGCCCAAGTCAGGCGTGAAATTCCTGGGCTCAACCTGGGGACTGCGCTTGATACTGGGTTGCTTGAGGATGGAAGAGGCTCG  
TGAATTCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCGAGCTGGTCCATTACTGACG  
CTGAGGCGCGACAGCGTGGGGAGCAAACA
```

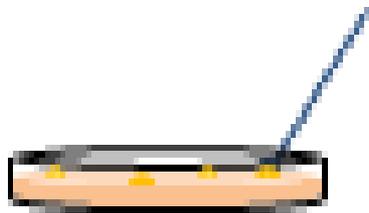
[上記配列を使用した BLAST 検索結果より推定した菌種名（上位データ）]

Roseomonas mucosa : ロゼオモナス・ミュコーサ

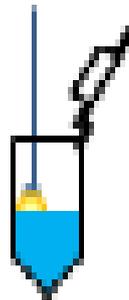
Roseomonas gilardii : ロゼオモナス・ジラーディイ

Roseomonas terpenica : ロゼオモナス・terpenica

# マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 による微生物同定 (MALDI TOF MS)



菌を釣菌

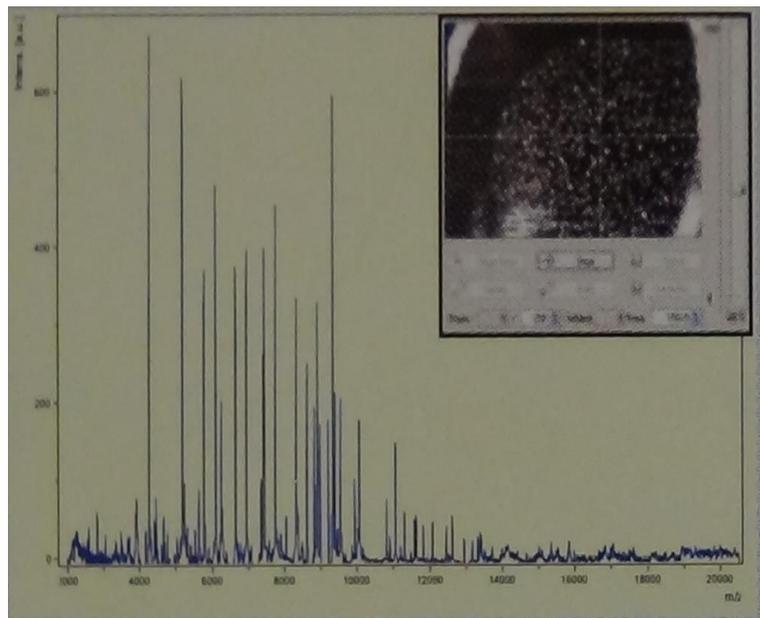


タンパク質を抽出

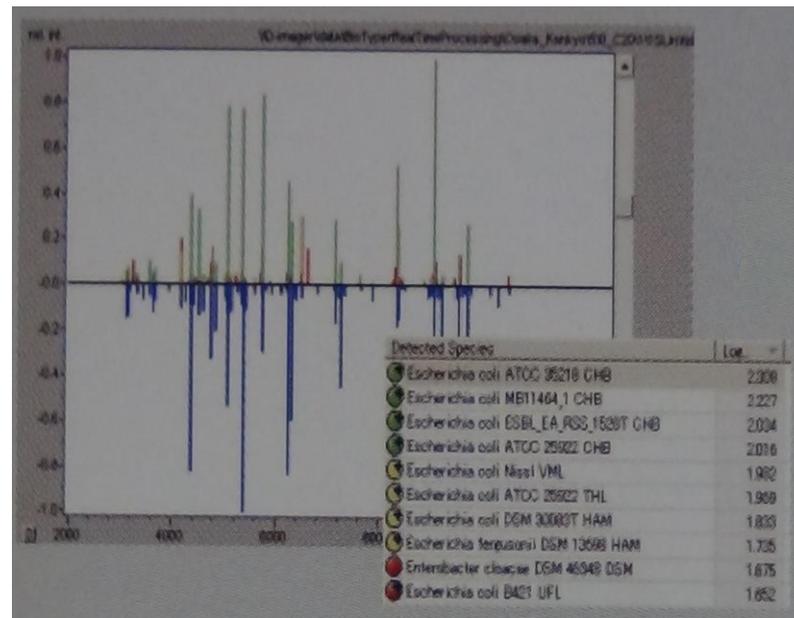


MALDI Biotyper  
測定

# MALDI TOF MSの同定

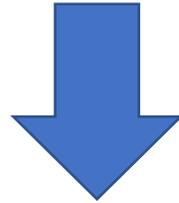


マススペクトルを取得

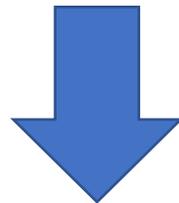


ライブラリーとパターンマッチングし、同定

同定結果が判明したら



菌の性質を調べて、情報を得る



バイオバーデンの汚染経路の推定

# 製品への菌の付着経路

