

# 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

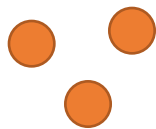
株式会社 コーガアイソトープ  
滅菌研究センター  
越川 富比古



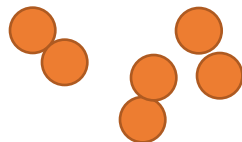
# 理解していただくための基礎知識

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

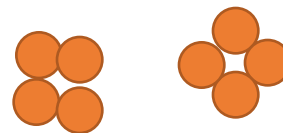
# 細菌の形態（球菌）



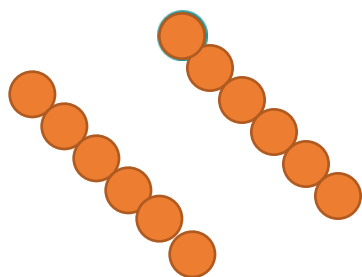
単球菌



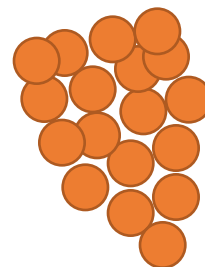
双球菌



四連球菌

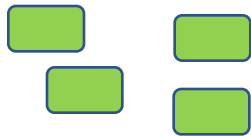


連鎖球菌



ブドウ球菌

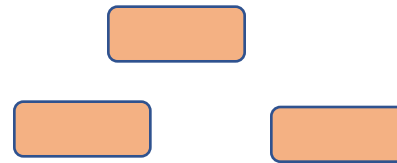
# 細菌の形態 (桿菌)



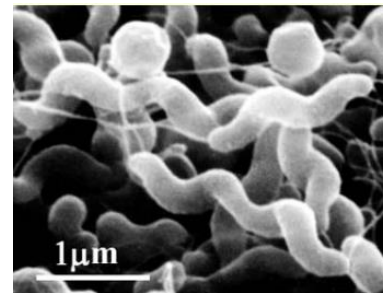
短桿菌



ラセン菌 (コレラ菌)



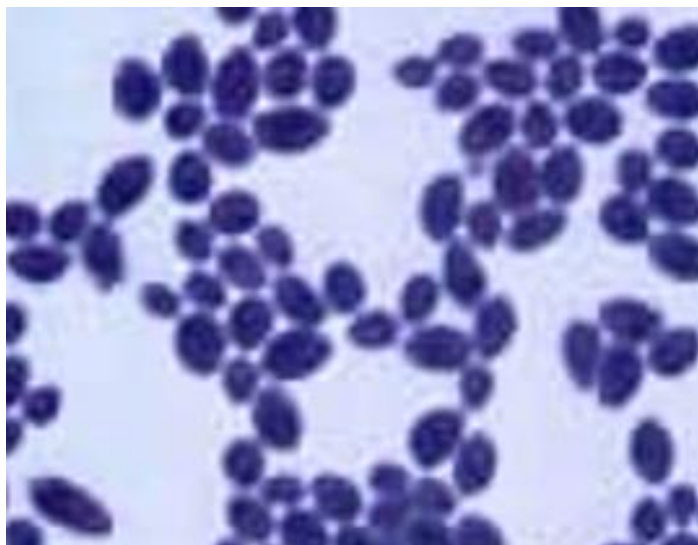
桿菌(棒状の菌)



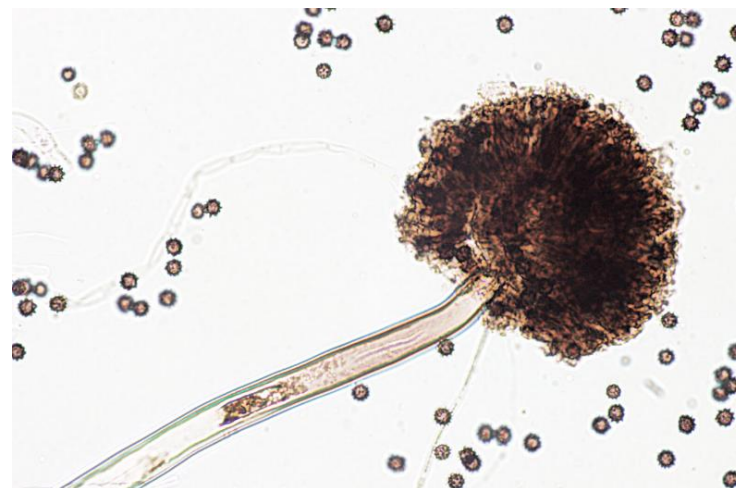
ラセン菌  
(カンピロバクター・ジェジュニ)

# 真菌の構造(カビ・酵母)

**Candida albicans**  
カンジダ・アルビカンス

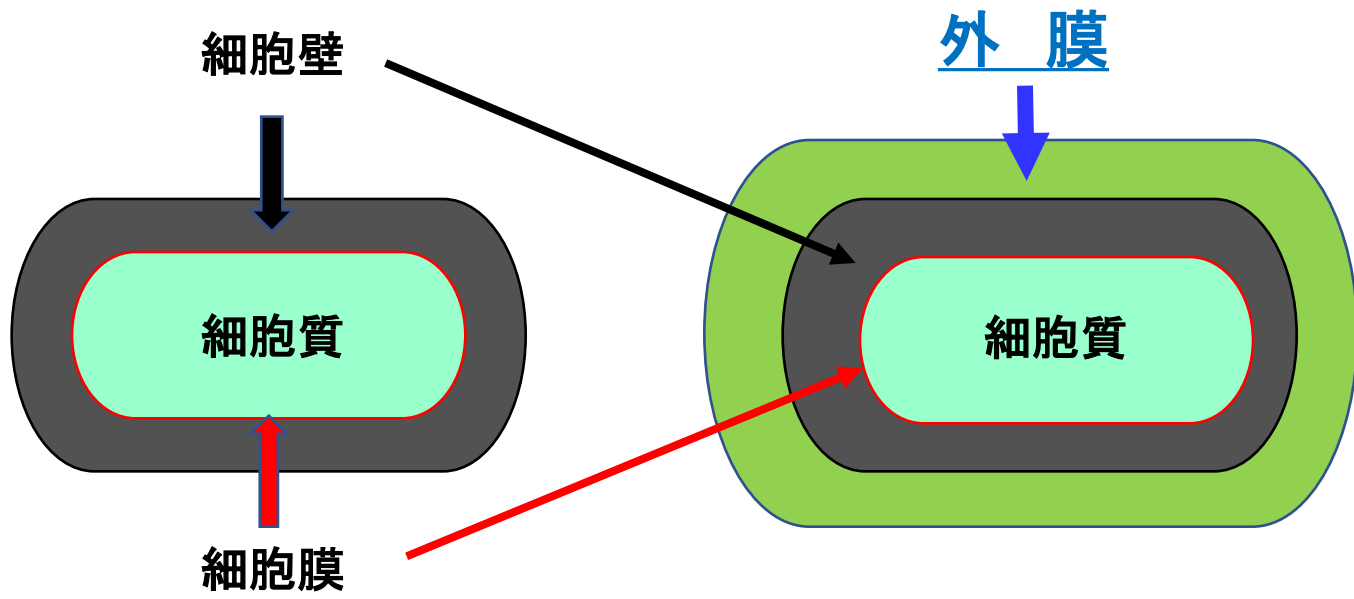


**Aspergillus niger**  
アスペルギルス ニガー



細菌に比べて、細胞の大きさが大きい

# 細胞の構造



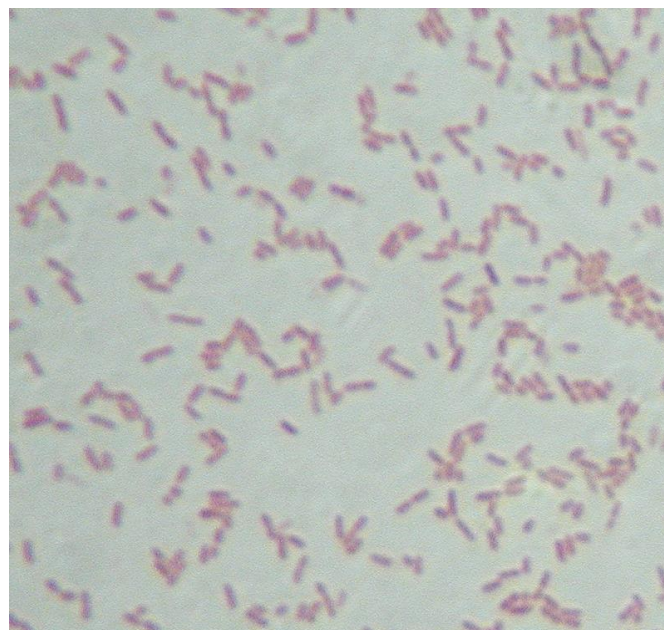
グラム陽性菌

グラム陰性菌  
(外膜が発熱性物質)

# グラム染色の例



グラム陽性菌(桿菌)

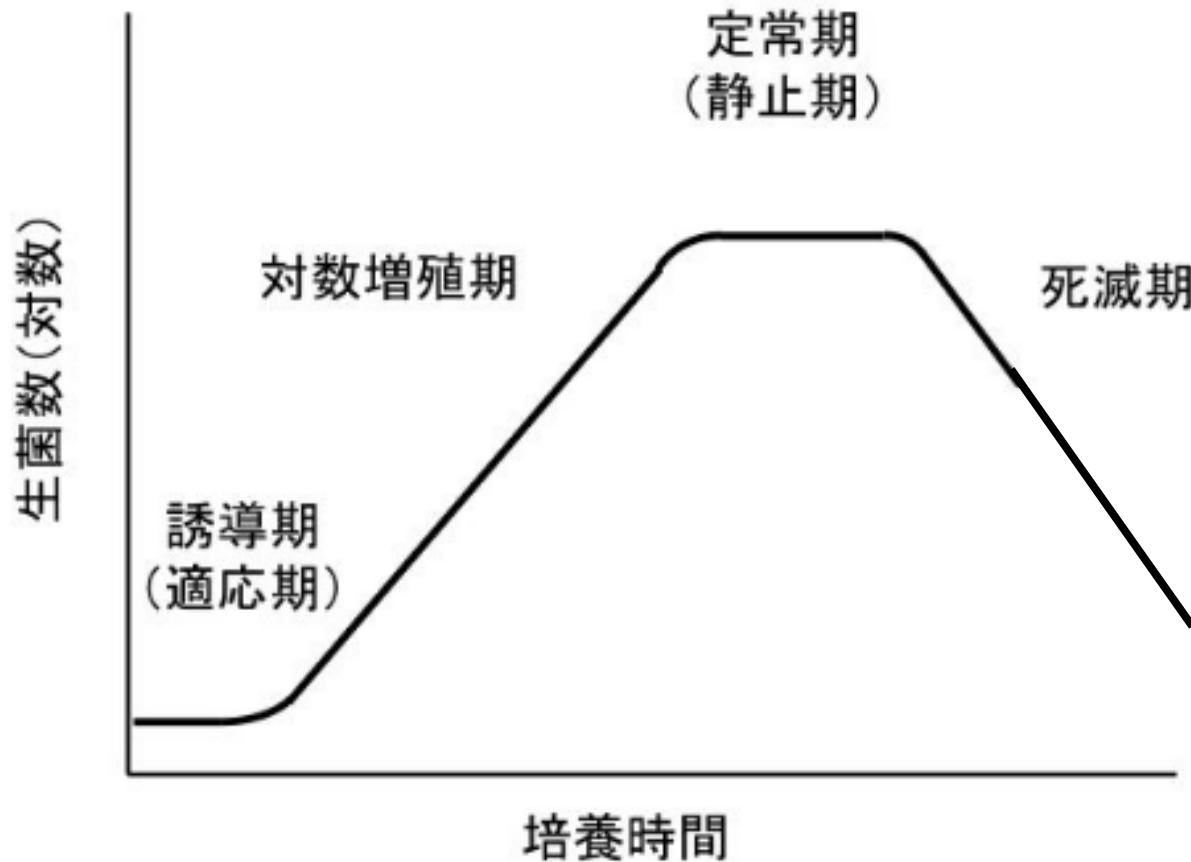


グラム陰性菌(桿菌)



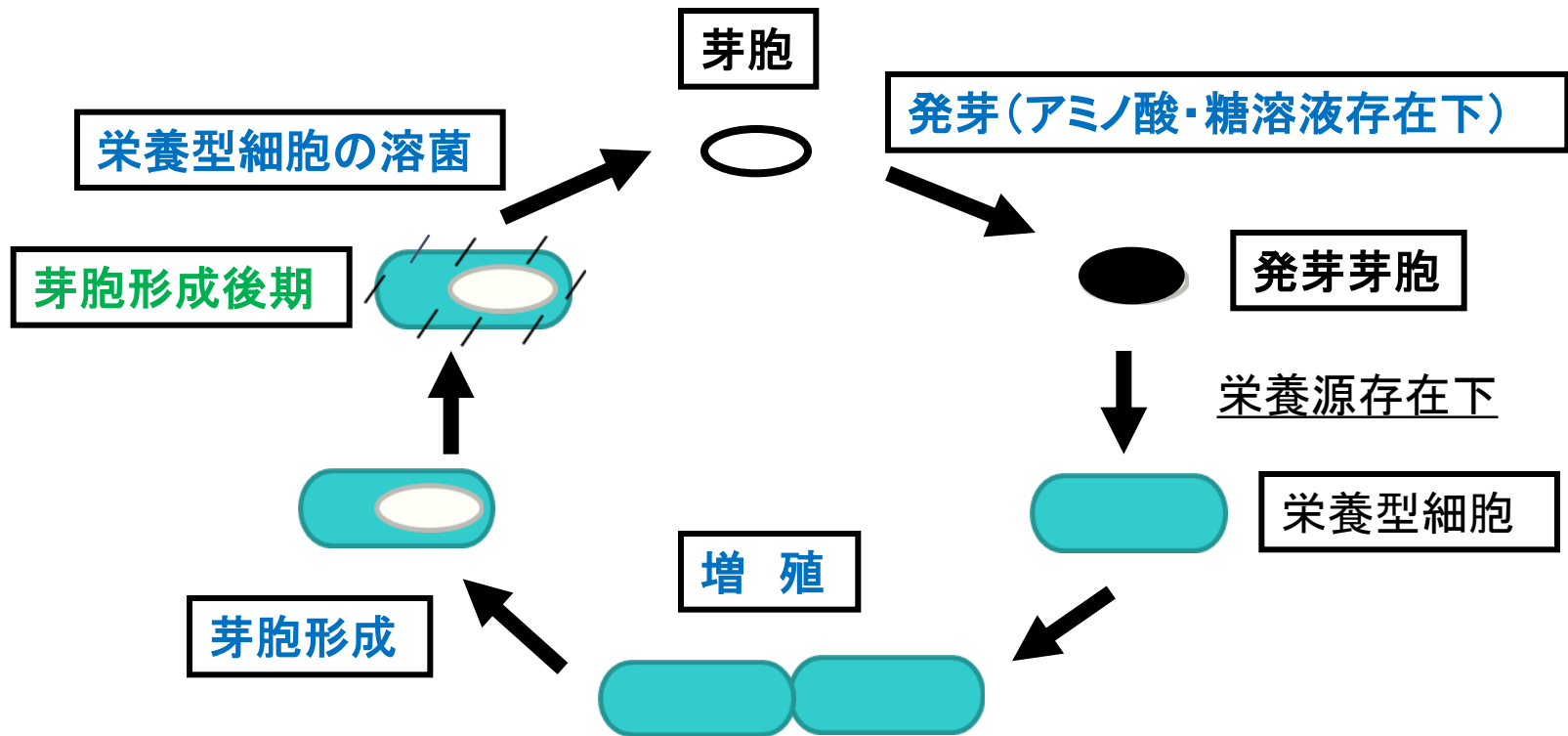
# 菌の増殖曲線（非芽胞形成菌）

液体培地で菌を培養した場合





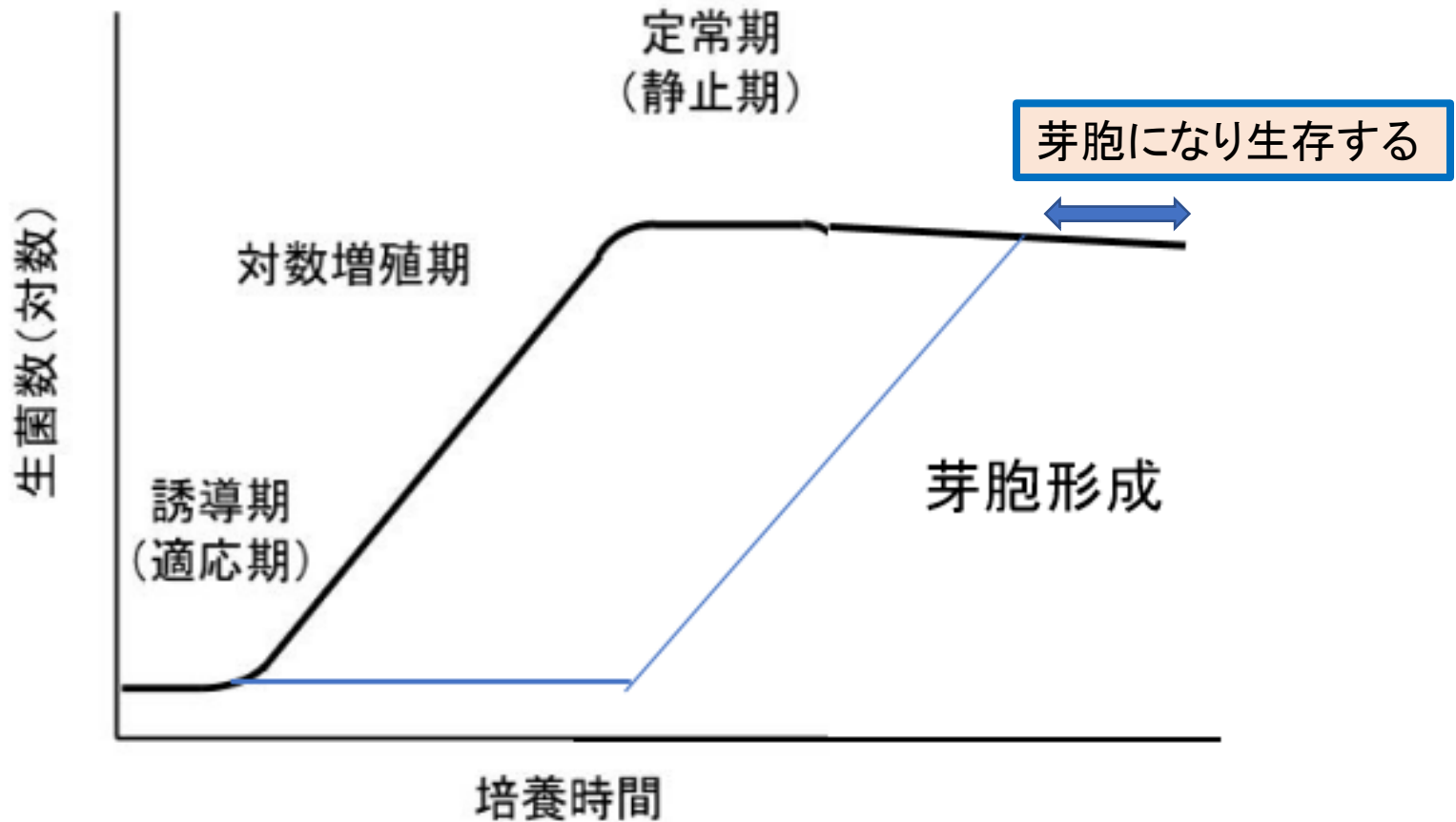
# 芽胞形成菌の生活環



- ・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

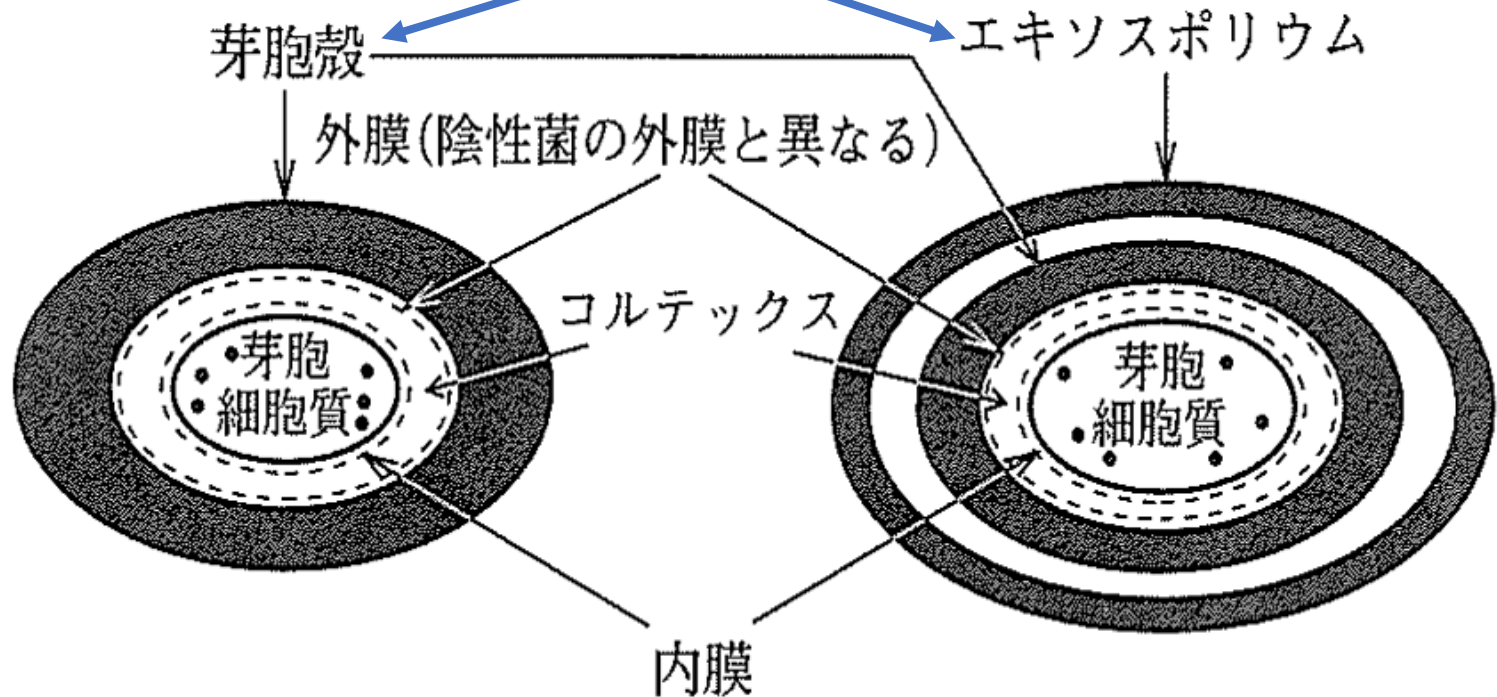
# 芽胞形成菌の増殖曲線

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

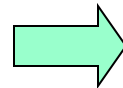


# バイオバーデンの同定手順

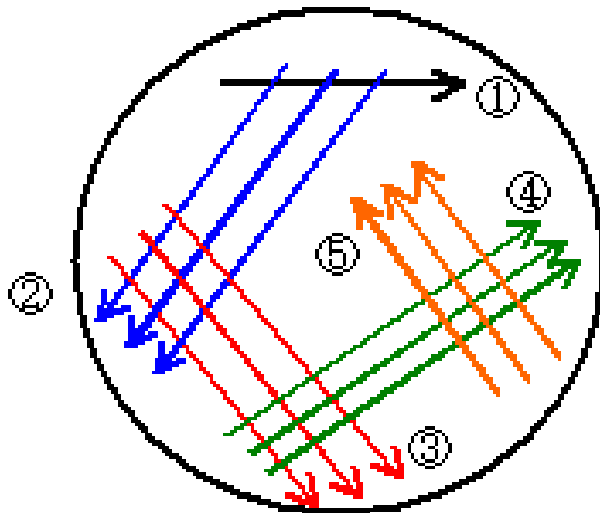
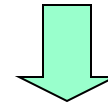
- 1) バイオバーデンの単離
- 2) グラム染色
- 3)
  - ・ BBLクリスタル同定キット → 24時間以上
  - ・ MALDI TOF MS (菌のタンパク質)による同定、あるいは遺伝子同定  
↓ 30分から10時間以内
- 4) バイオバーデンの同定結果が判明

# 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

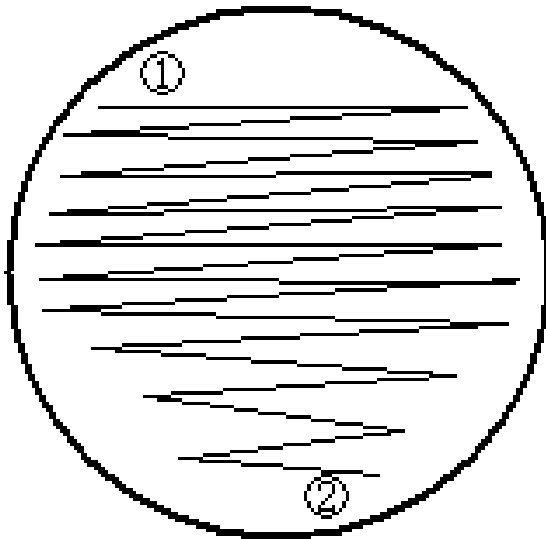


画線の仕方手順

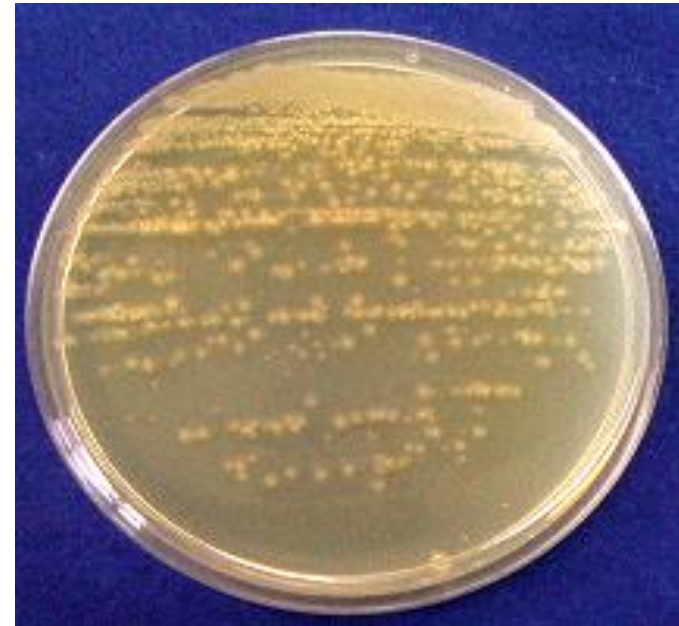


画線分離培養したコロニー

# バイオバーデンの単離(画線分離培養)



画線の仕方手順



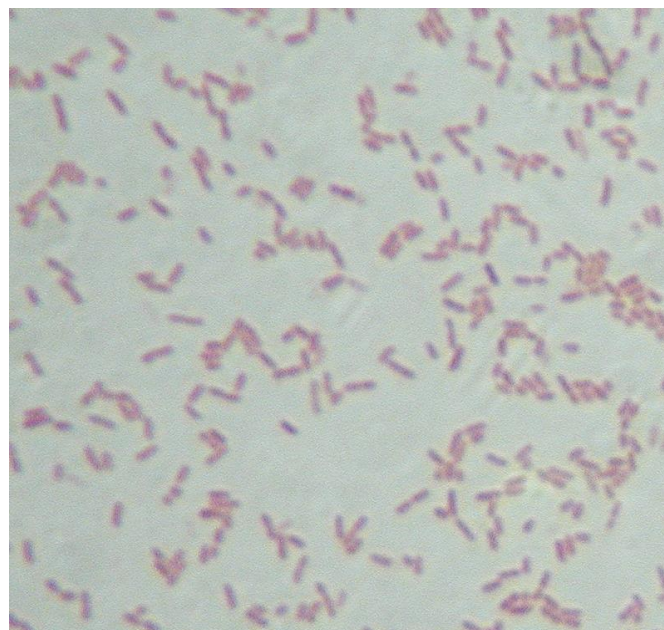
画線分離培養したコロニー

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。)

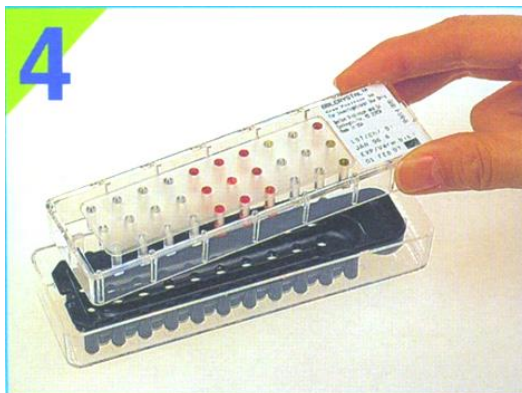
2



3



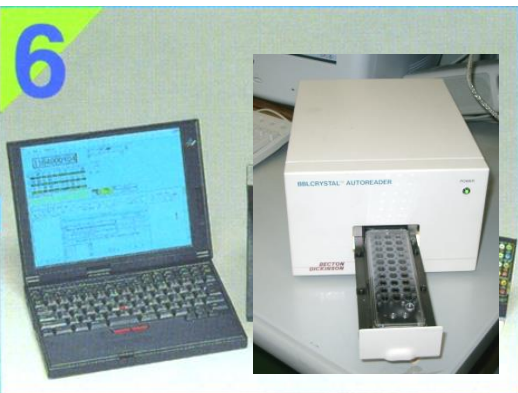
4



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 software interface. At the top, the title bar reads "BBLCRYSTAL Computer Code Book for Windows 産業用 Version 6.0". Below the title bar, there are menu options: 終了 (End), 編集 (Edit), 機能設定 (Function Settings), ウィンドウ (Window), and the date 5/18/2010. A grid of biochemical tests is shown with results for various substrates (A-J) across rows 1-4. The results are: Row 1: A (+), B (+), C (+), D (+), E (+), F (+), G (-), H (+), I (+), J (+); Row 2: A (+), B (+), C (+), D (-), E (-), F (-), G (-), H (+), I (+), J (+); Row 3: A (+), B (+), C (+), D (-), E (-), F (-), G (-), H (+), I (+), J (+); Row 4: A (+), B (+), C (+), D (-), E (-), F (-), G (-), H (+), I (+), J (+). The "同定結果" (Identification Results) section lists: 1. Bacillus cereus, 2. Bacillus, 3. Bacillus. The "判定詳細" (Identification Details) section shows "Biotype validity 2,681" and "Confidence value > 0.9999". A detailed view window for "Bacillus cereus" shows microscopic images of vegetative cells and spore-forming cells in different stages, with labels like "栄養型細胞" (Vegetative cells) and "芽胞形成期細胞 (膨化しないタイプ)" (Spore-forming cells, non-swelling type).

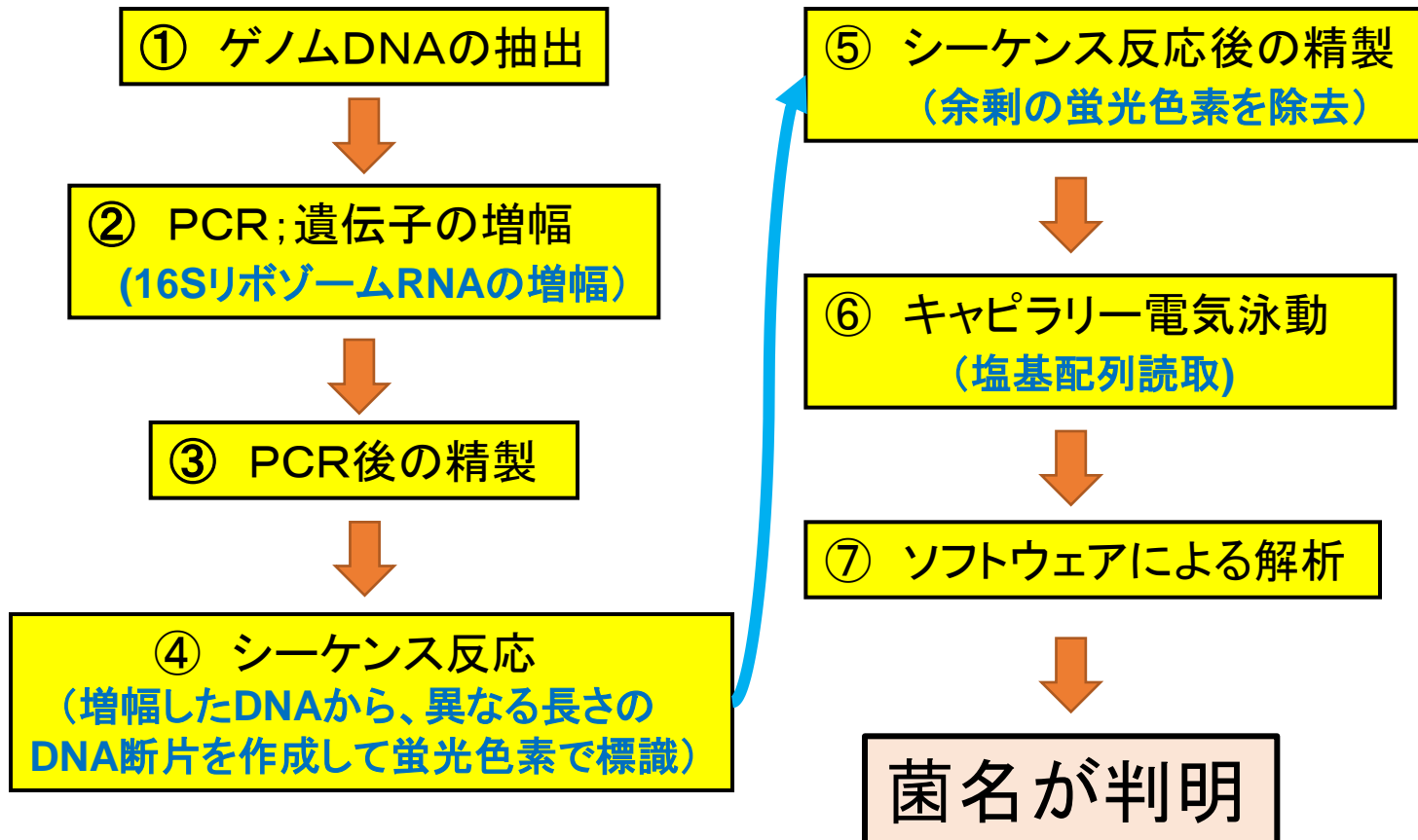
写真掲載有りの表示

写真閲覧ボタン

画像枚数表示

画像表示カーソル

# 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  
CGTGTCTGAGGTGGGGGACAACCCCGGAACTGGGGCTAATACCGCATATGGGCTGAGGCCAAAGCCGAGAGGGCGCCTTTG  
GAGCGGCCTGCGTCCGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGCCTGCGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAG  
CCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAG  
CAATGCCGCGTGGGTGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAAGCCCTTCGACGGGGACGATGATGACGGTACCCGTAGAAGAAGCCC  
CGGCTAATTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGCGGTAGGCG  
GCGGCCCAAGTCAGGCGTGAAATTCCTGGGCTCAACCTGGGACTGCGCTTGATACTGGGTTGCTTGAGGATGGAAGAGGCTCG  
TGAATTCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCGAGCTGGTCCATTACTGACG  
CTGAGGCGCGACAGCGTGGGGAGCAAACA
```

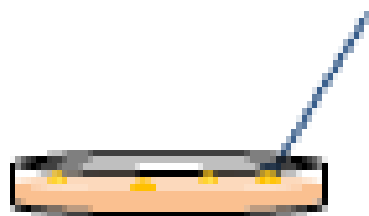
[上記配列を使用した BLAST 検索結果より推定した菌種名（上位データ）]

Roseomonas mucosa : ロゼオモナス・ミュコーサ

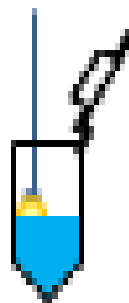
Roseomonas gilardii : ロゼオモナス・ジラーディイ

Roseomonas terpenica : ロゼオモナス・terpenica

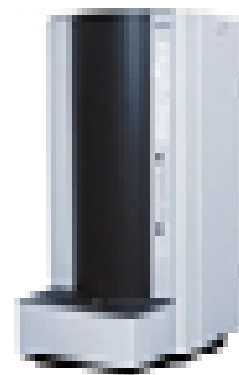
# マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 による微生物同定 (MALDI TOF MS)



菌を釣菌

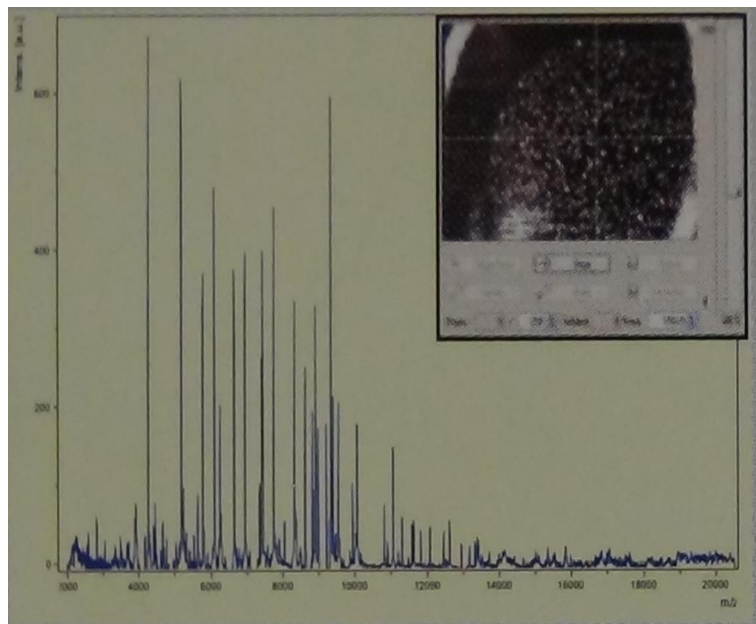


タンパク質を抽出

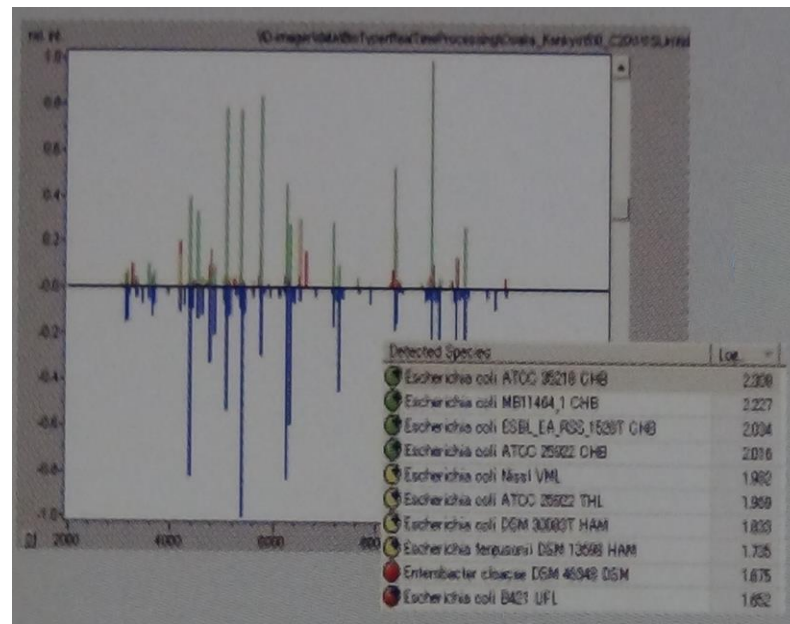


MALDI Biotyper  
測定

# 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

