

Amnis™ CellStream™ フローサイトメーター による微小細菌の検出と生存率の高感度測定

Christine E. Probst¹, Alex Chalmers², Kathleen Souza²

¹Luminex Corporation, Seattle, Washington.

²MilliporeSigma, The Life Science business of Merck KGaA, Darmstadt, Germany operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

はじめに

細菌の計数と生存率のモニタリングは、浄水場、食品・飲料製造、殺虫・消毒剤の開発、医薬品の品質管理等の様々な領域で重要です¹。細菌は、増殖培地を用いたコロニー形成によって測定されることが一般的ですが、この方法は測定に時間を要し(数日必要)、培養可能な細菌にしか適用できません²。一方、フローサイトメトリーは、細菌の培養可否にかかわらずサンプル中のバクテリアを測定でき、かつ、その迅速な解析能力(数分以内)と、コンタミネーションが生じた際の緊急対応やコストを抑えた対応が可能な点で、従来法に代わる手法として提案されていました³。このアプリケーションノートでは、Amnis™ CellStream™ フローサイトメーターを用いて、モデル細菌種である大腸菌 (*Escherichia coli*: *E. coli*) とシュドモナス デミニユータ (*Brevundimonas diminuta*: *B. diminuta*) の生菌と死菌を定量した結果をご紹介します。*B. diminuta*は、約0.3x 1µmほどの培養可能な最小細菌の1つで、CellStream フローサイトメーターによる最小細菌の検出感度を確認するために使用されました。

材料と方法

E. coli (ATCC 49696™) は、寒天培地(トリプティックソイブロス: TSB)を用いて37°Cで24時間培養して増殖したものを準備しました。*B. diminuta* (ATCC 19146™)は、細菌捕捉性能試験における滅菌ろ過膜の品質試験ASTM F838-15ae1に基づき、2段階の培養で増殖したものを準備しました⁴。この方法では、微小細菌と非凝集細胞が共に捕集されます。まず、*B. diminuta*をTSBで30°Cで24時間培養し、次に生理食塩水に溶かした乳糖ブロス(SLB)で24時間継代培養しました。培養した*E. coli*と*B. diminuta*をそれぞれCellStream フローサイトメーターで分析したところ、これらは定常期にありました。コロニー形成単位(CFU)で測定すると、開始時の*E. coli*と*B. diminuta*の平均濃度は、 2.7×10^9 /mLと 2.5×10^8 /mLでした。

つづいて、56°Cで90分の熱処理によって死滅したコントロール用の細菌を準備し、熱処理した細菌と熱処理無しの細菌を一定の比率で混合後、CellStream フローサイトメーターを用いて生存率を測定しました。CellStreamによる測定値の希釈直線性は、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)に懸濁した未処理(生菌)の細菌の線形希釈を参照して評価しました。フローサイトメトリーを実施するにあたり、細胞透過性SYTO 9 核酸染色試薬を含むLIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability and Counting Kit (ThermoFisher Scientific)を用いて全細菌を蛍光染色しました。本試薬には、細胞膜不透過性のヨウ化プロピジウム(PI)核酸染色試薬も含まれるため、膜が損傷している死菌も同時に検出できます⁵。まず、SYTO 9ストック溶液5 µL、PIストック溶液5 µL、標準微粒子ビーズ溶液36.7 µL、PBS 3.3 mLを混合後、15分間インキュベーションして蛍光染色カクテルを調製しました。つづいてCellStream フローサイトメーターに標準搭載されている96ウェルプレートのアートサンプラーを閾値を設定せずに低速モードで使用し、サンプル10 µLを取得しました。前方散乱光(FSC)は25%、側方散乱光(SSC)は1%、励起レーザー488nmは100%の出力で設定し、CellStreamの解析ソフトウェアを使用して分析しました。



結果

CellStream フローサイトメーターを用いてデータを取得後、細菌を定量し、**図1**に示すゲーティング戦略で生存率を評価しました。まず、前方散乱光 (FSC) と側方散乱光 (SSC) の二変量解析により、散乱光の値が小さい細菌 ('FSC/SSC low') と、濃度キャリブレーション用の標準微粒子ビーズを各々ゲーティングしました (**図1.A**)。つづいて、FSC/SSC lowの集団から核酸染色SYTO 9の陽性細菌 (SYTO 9+) をヒストグラムを用いて選択しました (**図1.B**)。そして、個々の細菌を分析するためにSYTO 9の蛍光強度とAspect ratioの二変量解析を用いてSYTO 9陽性集団に対してダブルット除去を行いました (**図1.C**)。Aspect ratioは、CCDカメラで測定されたイベントのwidth値をheight値で除した値であり、単一の丸い細菌はAspect ratioが1に近い細胞であるため他の細胞と識別することができます。シングレット集団の生存率をSYTO 9とPIの二変量解析をもとに評価し、'live' and 'dead'ゲートをかけて生菌と死菌を区別します (**図1.D**)。

図1

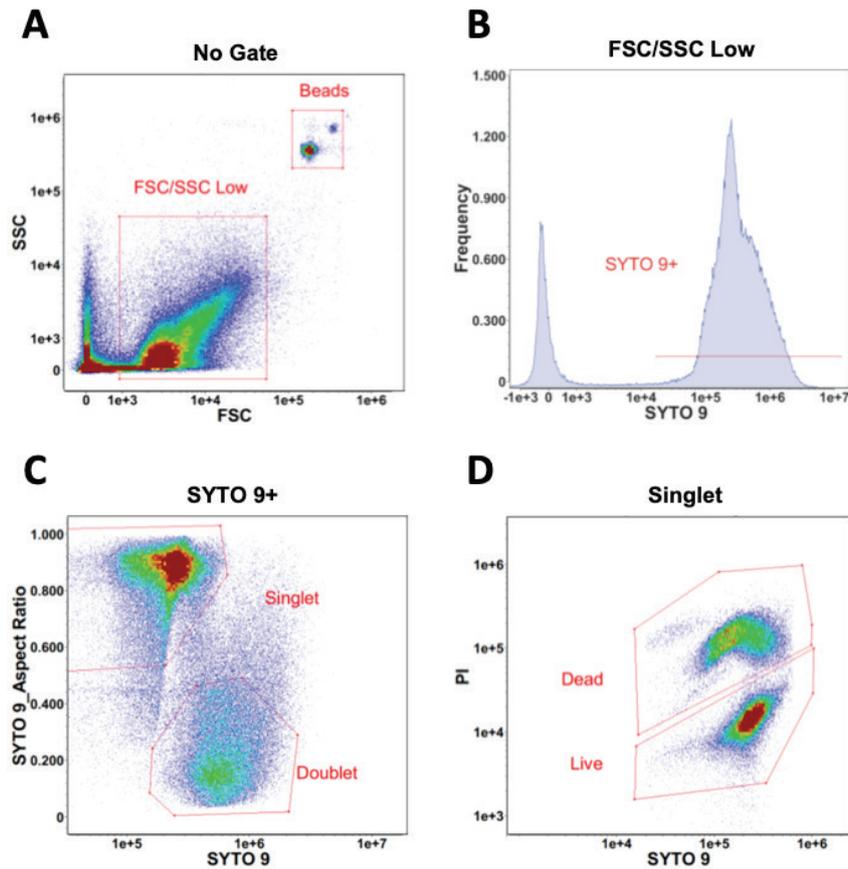


図1. 細菌の計数および生存率のゲーティングの結果です。はじめにFSC/SSC値が小さい細菌と標準微粒子ビーズをゲーティングしました (**A**)。つづいて、核酸染色試薬SYTO 9を用いて全細菌を選択し (**B**)、Aspect ratioの値をもとにダブルット除去を行いました (**C**)。生死判別はSYTO 9とPIによる蛍光強度 (**D**) を用いて行いました。

生菌と熱処理で死滅させた大腸菌をそれぞれ100:0(A)、75:25(B)、50:50(C)、25:75(D)、0:100(E)の比率でスパイクして混合し、細菌の生存率を評価しました(図2.D)。生菌、死菌のゲート内のイベントの割合はスパイク比とほぼ一致し、細菌の生死判別の正確性を確認できました。

図2

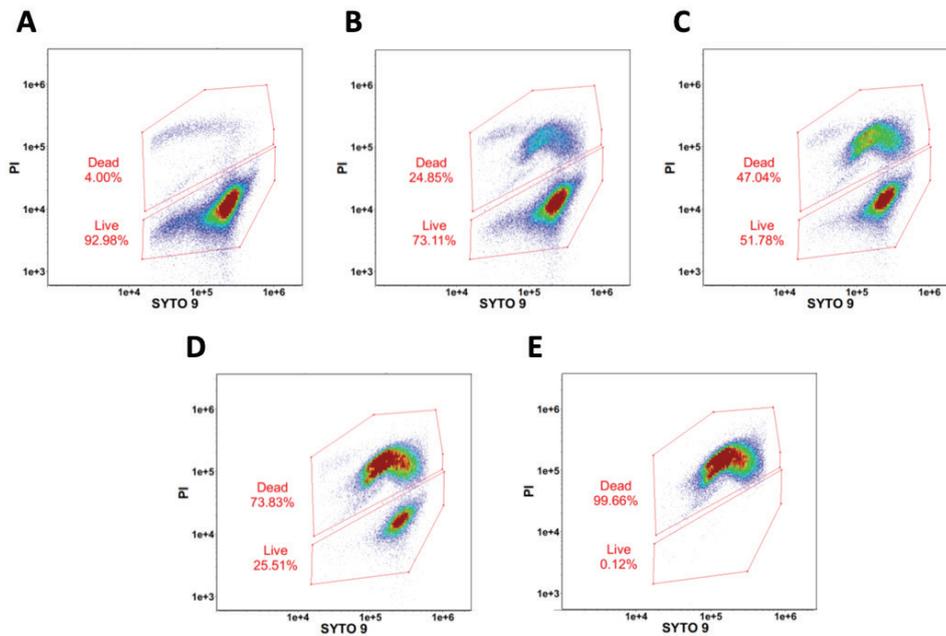


図2. *E.coli*にスパイクした生菌と死菌の生存比率分析;100:0(A)、75:25(B)、50:50(C)、25:75(D)、0:100(E)

ダブルット集団からシングルット集団を分離する能力を評価しました(図3)。*E.coli*の希釈率を1:1,000(A)と1:100(B)、*B. diminuta*の希釈率を1:1,000(C)と1:100(D)とし、蛍光強度とAspect ratioの二変量解析をしたところ、ダブルット集団とシングルット集団を分離でき、予想どおりにダブルットの頻度が細菌濃度の上昇とともに増加したことを示しています。

図3

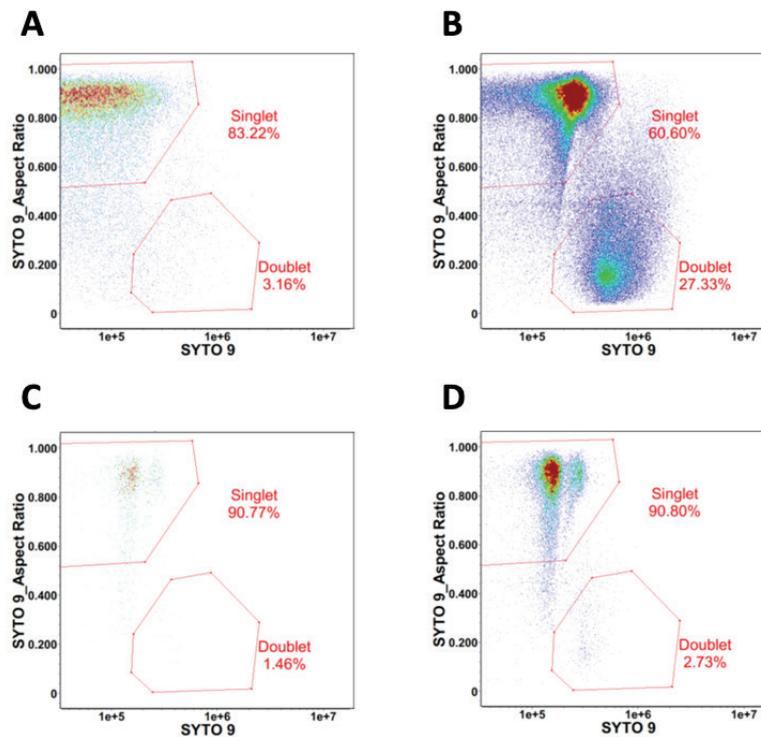


図3. ゲーティングによる細菌のダブルット除去:*E.coli*を1:1,000(A)と1:100(B)で希釈した場合と、*B. diminuta*を1:1,000(C)と1:100(D)で希釈した場合の結果を示しています。

E. coli (A) および *B. diminuta* (B) について、ビーズを用いた測定結果をもとに補正した各細菌の生菌の測定ダイナミックレンジを図4に示します。CellStream を使用して測定した細菌の補正濃度は、TSA寒天プレートを使用して測定されたCFUカウントと概ね一致し (*E. coli*は84%、*B. diminuta*は77%)、4ディケイド以上の範囲にわたり直線性を得ることができました ($R^2 = 1.00$)。

図4

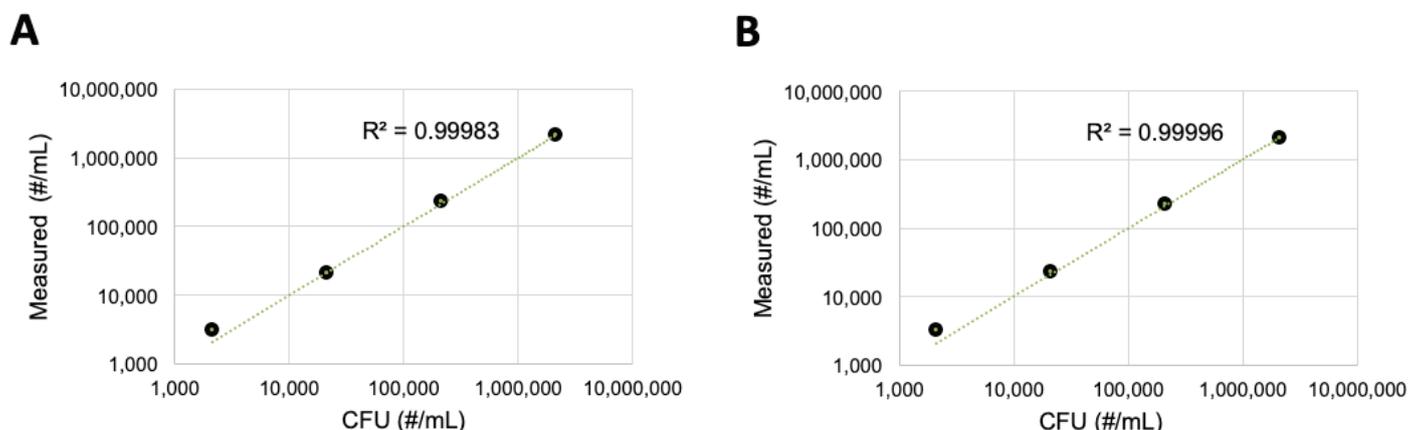


図4. *E. coli* (A) と *B. diminuta* (B) の測定ダイナミックレンジの線形性

まとめ

今回は *E. coli* と *B. diminuta* のサンプルについて、Amnis CellStream フローサイトメーターを用いて細菌数と生存率を評価しました。細菌の中でも特にサイズが小さい *B. diminuta* においても CellStream システムは個々の細菌の検出を可能にし、一般的な培養法で測定した細菌数とほぼ同等の結果を取得でき、測定ダイナミックレンジも4ディケイド以上の範囲で保たれました。さらに、CellStream システムを用いると、生菌と死菌、シングルレット集団とダブルレット集団の区別も可能であることが判りました。CellStream フローサイトメーターによる微小細菌の高感度な検出、正確な計数、表現型解析、結果を数分以内に取得できる利便性をふまえると、今回得られた結果は、CellStream システムが様々な産業領域の微生物測定において有効なプラットフォームになることを示唆しています。

引用文献

1. Nebe-von-Caron G, et al. Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *J Microbiol Methods* 2000; 42: 97-114.
2. Díaz M et al. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochem Eng J* 2010; 48: 385-407.
3. Van Nevel S et al. Flow cytometric bacterial cell counts challenge conventional heterotrophic plate counts for routine microbiological drinking water monitoring. *Water Res* 2017; 113: 191-206.
4. American Society for Testing and Material. Standard Test Method for Determining Bacterial Retention of Membrane Filters Utilized for Liquid Filtration. *ASTM Standards on Materials and Environmental Microbiology* 2015; Designation F838-15ae1.
5. Berney M et al. Assessment and Interpretation of Bacterial Viability by Using the Live/Dead BacLight Kit in Combination with Flow Cytometry. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73(10): 3292-3230.

Amnis™ CellStream™ フローサイトメーターについての詳細は、Luminexのウェブサイトでご確認ください。

<https://www.luminexcorp.com/ja/cellstream-flow-cytometers/>

Luminex
complexity simplified.

ルミネックス・ジャパン株式会社

〒106-0041 東京都港区麻布台 1-7-2 神谷町麻布台ビル
www.luminexcorp.com/ja

テクニカルサポートお問い合わせ窓口
Tel: 03.5545.7444 (受付時間 9:00 ~ 18:00)
Email: supportjapan@luminexcorp.com

©2019-2020 Luminex Corporation. All rights reserved.
AmnisとCellStreamは、米国および他の国々で登録されたルミネックス・コーポレーションの商標または登録商標です。ATCC 49696とATCC 19146は、ATCCの商標です。LIVE/DEADとBacLightは、Thermo Fisher Scientificの商標です。本製品は研究用機器です。体外診断には使用できません。研究用試薬と併せてお使いください。諸般の理由により、予告なく仕様を変更する場合がございますのであらかじめご了承ください。