

# FISH 法によるカビ検出

山村 隼志\*<sup>1</sup> 大村 綾子\*<sup>2</sup>  
Yamamura Junji Oomura Ayako

カビの迅速検出・同定に蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 法が適用できることを報告した<sup>(1)(2)</sup>。FISH 法は、菌体内に蛍光色素標識した短い DNA 鎖 (DNA プローブと称す) を取り込ませ、蛍光顕微鏡で検出するものである。また、検出したい菌の遺伝子と特異的に結合できるように DNA プローブの塩基配列を設計することで属レベルの菌種同定も可能である。これまで FISH 法をカビ検出に適用した例は少なく、特定のカビの分布状況を調べる研究等に限られていたが、汚染、品質劣化等、さまざまな問題を引き起こすカビの検出に FISH 法を利用することで迅速な検査が可能となる。

本稿では、実環境中で採取した試料で FISH を行う際に問題となる、夾雑物由来の蛍光<sup>きょう</sup>について検討を行ったので報告する。

キーワード：蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション、FISH、カビ検査、迅速検出

## 1. はじめに

カビが引き起こす問題は、食品や住環境等の汚染による品質劣化だけでなく、アレルゲンとして健康への影響も懸念されている。

現在、カビ検査は培養・形態観察によるものが主流であるが、培養に時間がかかるため検査に数日から一週間程度を要し、迅速性という点において課題がある。また、形態観察による同定には豊富な知識と経験が求められる。

培養工程を経ずに微生物を検出する方法の一つに、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法 (以下、FISH 法) があり、細菌の検出方法として研究分野で多く用いられてきた。FISH 法は、菌体内に蛍光色素で標識した DNA プローブ (※1) を取り込ませ、蛍光顕微鏡で検出するものである。また、検出したい菌の遺伝子と特異的に結合できる

ように DNA プローブの塩基配列を設計することで、菌種の同定も可能である。図 1 に FISH 法の概要を示す。各工程は以下の通りである。

- ①固定：採取したカビの形態を保持するため、パラホルムアルデヒドによる固定処理を行う。
- ②ろ過：メンブレンフィルタに捕集、濃縮する。
- ③プローブ添加：DNA プローブの溶液にフィルタを浸し、菌体内のリボソーム RNA と結合させる (ハイブリダイゼーション)。
- ④洗浄：塩基配列が一致しない菌に取り込まれた DNA プローブを除去する。
- ⑤プレパラート作製：洗浄後、フィルタを乾燥させ蛍光観察用のプレパラートを作製する。
- ⑥観察：蛍光顕微鏡で観察を行う。青色の励起光によって蛍光色素が緑色蛍光を発するため、プローブが結合した菌体は光って見える。

\*1：計測事業部 化学環境部 課長

\*2：計測事業部 化学環境部

FISH法がカビの検出に適用できることを報告した<sup>(1)(2)</sup>が、環境中から採取した試料に含まれる夾雑物も蛍光を発する場合があるなど、正確な検査を行う上で課題も残っていた。本稿では、FISHで染色されたカビの蛍光と夾雑物が発する蛍光を識別可能とするため、蛍光観察において励起光および観察光の選択を担うミラーユニット（※2）について検討を行ったので報告する。

- ※1：DNAプローブ：カビの遺伝子と相補的な配列を持つ短い合成DNA。細胞内の核酸（リボソームRNA）と相補的な部分で結合する（ハイブリダイゼーション）。蛍光で検出するため、末端に蛍光色素を結合させる。
- ※2：ミラーユニット：蛍光色素に最適な波長の光（励起光）だけを透過するフィルタ、試料からの蛍光を選択的に透過するフィルタなどから構成されるユニット。

## 2. 実験方法

### 2.1 試料

寒天培養で調製した *Aspergillus niger*（黒コウジカビ）の胞子液に、屋内の棚等に積もった埃を混合したものを試料として用いた。埃の採取は、目視でカビが繁茂していない箇所を選択して行った。

### 2.2 FISH

カビと夾雑物の混合試料に対しパラホルムアルデヒド溶液で固定処理を行った。細胞内へのプローブの浸透性を良くするため、試料をガラスビーズと混合・攪拌した。真菌検出用としてEUK516<sup>(3)</sup>プローブを用いてFISHを行い、蛍光顕微鏡で観察を行った<sup>(2)</sup>。

### 2.3 ミラーユニット

今回用いたミラーユニットを表1に示す。

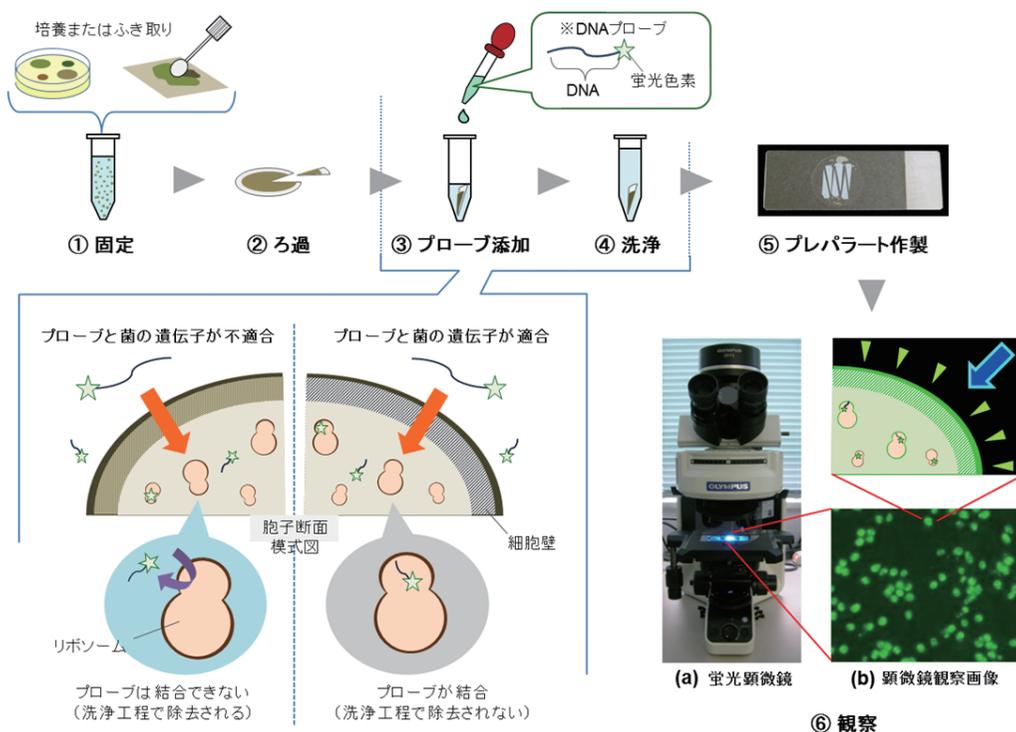


図1 FISH法によるカビ検出の概要

表1 ミラーユニット一覧

No.	型式	透過波長(nm)	励起波長(nm)
①	U-FBNA	510～550	470～495
②	U-FBW	510～	460～495
③	U-FBN	510～	470～495

※すべてオリンパス製

### 3. 結果

カビと夾雑物の混合試料で FISH を行い、同一試料を三つのミラーユニット（U-FBNA、U-FBN および U-FBW）を用いて観察した。U-FBNA では緑色以外の波長が吸収されるため、蛍光を発する粒子は夾雑物を含め全て緑色となった（図2）。一方、U-FBW や U-FBN では夾雑物は黄色となり、緑色に染色されたカビと識別しやすくなった（図3、図4）。

U-FBNA は FISH 法でも使用している緑色蛍光色素（FITC）に最適とされるミラーユニットであり、緑色より長波長の光を吸収するため緑色蛍光以外は観察されない。そのため、夾雑物から蛍光が発せられている場合、染色したカビと同様、緑色蛍光のみが観察される。その結果、特に形状が似ている夾雑物との判別が難しくなっている（図5、左側）。

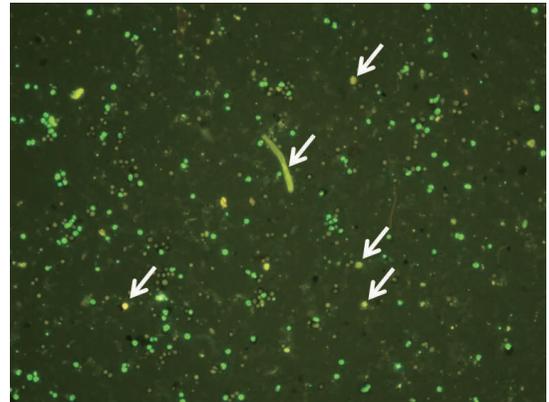


図3 U-FBN（観察波長域 510nm ～）  
図2 と同一視野

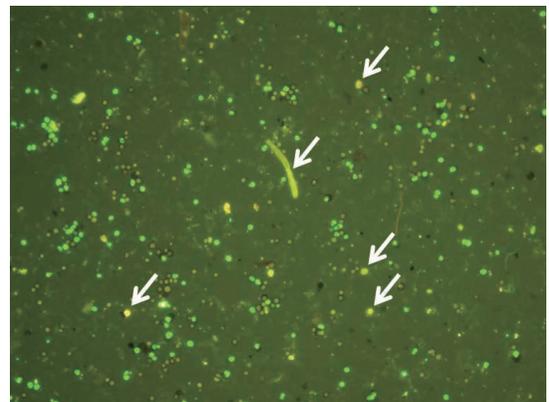


図4 U-FBW（観察波長域 510nm ～）  
図2 と同一視野  
U-FBW は U-FBN より励起光の波長領域が広く、全体が明るくなる。

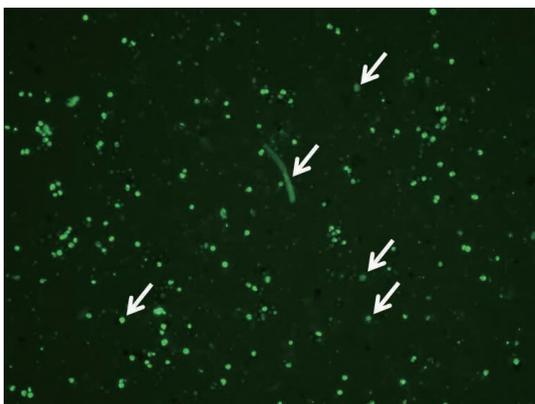


図2 U-FBNA（観察波長域 510 ～ 550nm）  
矢印は夾雑物の一例

一方、U-FBN または U-FBW のように緑色より長波長の光も透過・観察できるミラーユニットを用いた場合、夾雑物に相当する粒子は黄色に見えるため識別が容易になる。カビからは FITC の発する強い緑色光が観察されるが、染色されていない夾雑物からは緑色より長波長の蛍光も発せられ

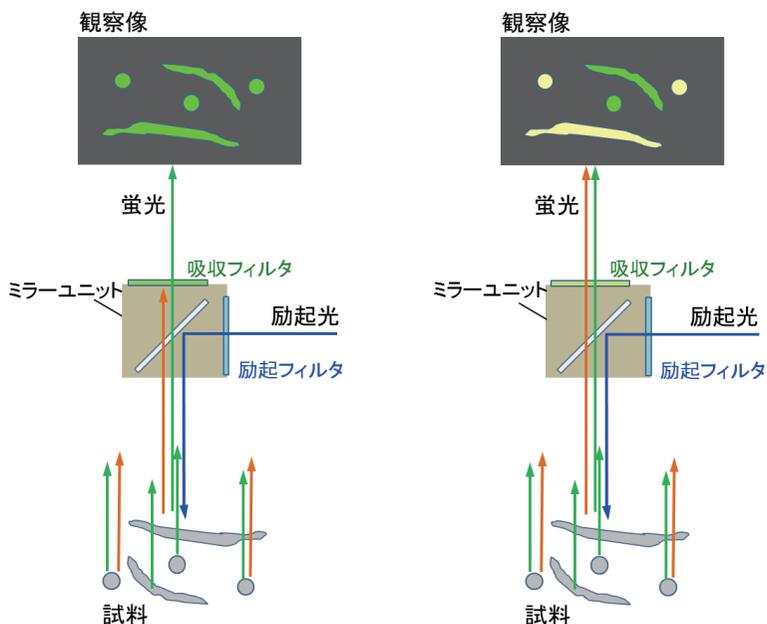


図5 ミラーユニット（吸収フィルタ）の違いによる蛍光観察像の変化（イメージ図）  
 (左) U-FBNA：吸収フィルタで緑色光以外は吸収される。  
 (右) U-FBW または U-FBN：緑色光より長波長の光も透過する。

ており、黄色に近い色になると考えられる（図5、右側）。

#### 4. おわりに

観察できる蛍光の波長域が異なるミラーユニットの使用により、色素由来の蛍光と夾雑物由来の蛍光の識別が容易になることが確認できた。より正確な検査を可能とするためには、試料に混入する可能性のあるさまざまな物質だけでなく、より多くのカビについても蛍光の有無・色などの特性を把握し、適切なミラーユニットを選択する必要がある。

#### 5. 参考文献

- (1) 山村隼志、古泉綾子、石井浩介：蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション（FISH）法によるカビの迅速検出、防菌防黴、39、No.9、2011
- (2) 山村隼志、古泉綾子、石井浩介：FISH 法のカビ検出への適用、IIC REVIEW、No.45、2011/04
- (3) Rudolf I. Amann, Brian J. Binder, Robert J. Olson, Sallie W. Chisholm, Richard Devereux, David A. Stahl, Combination of 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes with Flow Cytometry for Analyzing Mixed Microbial Populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1990, pp.1919-1925



計測事業部  
 化学環境部  
 課長  
**山村 隼志**  
 TEL. 045-791-3516  
 FAX. 045-791-3541



計測事業部  
 化学環境部  
**大村 綾子**  
 TEL. 045-791-3516  
 FAX. 045-791-3541