

# Spore News

Volume 1, Number 4  
September, 2004



## The Importance of 16S rRNA Bacterial Spore Identification

### 16S rRNA 芽胞菌同定の重要性

芽胞菌の 16S rRNA 遺伝子解析は、SGM 社（現：MesaLabs 社）の品質管理プログラムの必須要素です。微生物同定の正確な方法の必要性は、微生物学研究室の優先事項であるべきです。臨床検査室での感染の原因物質の同定、研究室での微生物の同定、医療製品の滅菌プロセスに影響を与える可能性がある環境分離菌の同定、バイオリジカル・インジケータの胞子の同定で、16S rRNA 解析を実施する理由がいくつかあります。

遺伝子情報は、微生物のライフサイクルを通して保存されています。また、増殖・成長段階または生存の段階から独立しており、現在、細菌同定のための最も信頼できる方法です。広く受け入れられている遺伝子決定方法の一つとして、16S rRNA を使用することが知られています。この分析は、すべての細胞の自己複製が行われるリボソーム内に存在する RNA を使用します。遺伝子フィンガープリントまたは遺伝子配列は、500 塩基配列に対して、特定の遺伝子配列を標的とするプライマーを用いて検索します。このデータは、MicroSeq、Genbank、Ribosomal Database Project (RDP) などの遺伝子ライブラリーの 500 塩基配列データベースと比較されます。

この比較により、ライブラリデータベースとの「パーセント差」が得られ、異なる特定の塩基位置が同定されます。一番近いライブラリデータベースとの差が 1%未満の場合、サンプルはその種ということで保証されます。差が 1%より大きく 10%より小さい場合は、属レベルということで保証されます。1%より大きい差が見られる場合、500 塩基配列を他のデータベースライブラリと比較して、より近い一致が存在するかどうかを判定します。

これらの試験結果の例を表 1 に示します。サンプル KAM1 は、16S rRNA 500 塩基配列が MicroSeq 配列と整列したとき、0.46%の差異を有する *Bacillus stearothermophilus*（現在は *Geobacillus stearothermophilus* と称される）として同定されました。これは、配列中の 500 塩基のうち 4 塩基の違いです。

表 1. 芽胞菌サンプル（実際の判別レポート）

C code	sample	closest match	% difference	confidence level
N224MAT	C11209 KAM1 con	Bacillus stearothermophilus	0.46 %	Species
N224MAT	C11210 KAM2 con	Bacillus stearothermophilus	0.46 %	Species
N224MAT	C11211 KAM3 con	Bacillus stearothermophilus	0.46 %	Species
N224MAT	C11212 KAM4 con	Bacillus stearothermophilus	0.46 %	Species
N224MAT	C11213 KAM5 con	Bacillus stearothermophilus	0.46 %	Species
N224MAT	C11214 KAM6 con	Bacillus simplex	0.09 %	Species*

違いを表 2 に示します。これは、KAM1 試料とデータベースにおける最初の一致との間で異なる位置を示しています。不一致の位置は、上から下に垂直に読み取られ、配列は左から右へ水平に読み取られる。サンプルシーケンスに「G」が含まれ、データベースシーケンスに「R」が含まれています。ベース番号 74 で差異が発生しました。塩基番号 84 では、サンプルは「T」を含み、データベース配列は「C」を含んでいます。芽胞菌試料が「Y」を含み、データベース試料が「C」を含む塩基番号が、465 にあります。そして芽胞菌試料が「R」を含み、データベース試料が「G」を含む塩基番号が、485 にあります。配列の最後に生じる相違は、プロモーター付着異常に起因する可能性があります。配列の内部における塩基の違いは、実際の違いである可能性がより高いですこの場合、すべての差異は両方の試料の端近くにありました。

表 2. MicroSeq データベースの芽胞菌サンプル（KAM1）配列と *Geobacillus stearothermophilus* 配列の簡単なアラインメント

Concise Alignment - 500 bp	
	44
	7868
	4455
C11209 KAM1 con	GTYR
Bacillus stearothermophilus RCCG	

SGM 社では、16S rRNA 解析から得られた結果は、種の確認には有益であるだけでなく、これらの結果は、ある芽胞菌から別のものへの遺伝的一貫性を検証するために使用されます。SGM 社は、細菌胞子の抵抗性は、胞子内に見出される遺伝情報と直接相関すると考えています。表 1 に示すように、SGM 社で作製された芽胞菌は、観察可能な遺伝的変動性を有していないことが実証されています。試料 KAM1~KAM5 は、*Geobacillus stearothermophilus* の 5 つの個別の芽胞菌であり、それぞれ 6 ヶ月間 同じパーセント差とベースの違いがあります。これは、SGM 社が一貫したバイオロジカル・インジケータを供給できるようにする多くのコントロールの 1 つです。

USP、ISO、EN によって確立された規制要件は、バイオロジカル・インジケータの製造業者に、認定された細胞バンクへのトレーサビリティをサポートすることを要求しています。これらの規則は、どの微生物が滅菌プロセスをモニタリングするためのバイオロジカル・インジケータに使用されるかを定義しています。これらの規制への適合証明は、GMP の基礎となります。

微生物を同定するために使用される機器は、広範囲のデータベースを必要とします。データベースは、基本的には中温細菌または環境分離株のために開発されています。最近では、この機器の製造業者に孢子形成および高温細菌（好熱細菌）が含まれ始めています。

多くの研究所では、生化学検査や微生物を同定するための脂肪酸分析などの表現型の方法が好まれています。いくつかの表現型の特徴はプラスミドによってもたらされ、プラスミドの損失または付加は表現型の形質の増加または消失をもたらすことが知られています。このような例の一つとして、*Bacillus atrophaeus* (ATCC No. 9372) があります。この種の最も顕著な表現型の特徴は、オレンジ色素を形成する能力です。グルコースを補充した寒天上で増殖させ、黒色色素をチロシン補充寒天上で増殖させます。当初 *Bacillus subtilis var niger* 株の *globigii* と命名されました。しかし、最近購入して培養した株は、これらの特徴を失ってしまっています。*Bacillus atrophaeus* のコロニーは、グルコースおよびチロシンを補充した寒天プレートの両方で白色として現れます。しかしながら、これらを遺伝的同定することにより、種同定が確認できます。

16S rRNA 分析を用いた遺伝的手法は、微生物同定のための最も信頼できるツールであることが証明されています。SGM 社（現：MesaLabs 社）の目標は、可能な限り一貫したバイオロジカル・インジケータをお客様に提供することです。この分析を使用して、SGM 社バイオロジカル・インジケータの作製に使用される全ての芽胞菌を確認しています。SGM 社の研究室では、バイオロジカル・インジケータで使用するために、多くの異なる種や菌株の孢子を培養しています。一般的な孢子形成には、蒸気および過酸化水素滅菌用途のモニタリングに使用される *Geobacillus stearothermophilus* ATCC No. 7953 および ATCC No. 12980 が含まれます。また、エチレンオキサイドおよび乾熱滅菌用途のための *Bacillus atrophaeus* ATCC No. 9372; 放射線滅菌のための *Bacillus pumilus* ATCC No. 27142; および低温蒸気殺菌用途のための *Bacillus smithii* (以前は *Bacillus coagulans*) ATCC No. 51232、*Bacillus subtilis*「5230」 ATCC No. 35021、*Clostridium sporogenes* が挙げられます。

**Spore News** を翻訳しております。原文は下記リンクでご確認できます。※日本語訳は原文解釈の参考としてご利用下さい。

<https://biologicalindicators.mesalabs.com/wp-content/uploads/sites/31/2014/07/Spore-News-Vol-1-No-4.pdf>

ご不明点、ご質問、製品のお問い合わせに関してはレーベン・ジャパン株式会社までお気軽にお問い合わせ下さい。

**レーベン・ジャパン株式会社** 埼玉県越谷市川柳町 3-110-8

TEL : 048-961-1781 FAX : 048-961-1782

メールでのお問い合わせ : [info@raven-japan.jp](mailto:info@raven-japan.jp)

