

## 【研究報告】

## 蛍光色素Diamidino-2-phenylindole (DAPI)を用いた 口腔内細菌の可視化に関する基礎的研究

村林 宏<sup>1)</sup> 山本 美紀<sup>2)</sup> 澤井 幹樹<sup>2)</sup> 休波 茂子<sup>2)</sup> 大森 行雄<sup>1)</sup>

## 【要 旨】

本研究では、口腔内細菌の可視化を目的に核染色用の蛍光色素であるDiamidino-2-phenylindole (DAPI)を用いて口腔内細菌の蛍光染色を行った。検体中に含まれる口腔粘膜細胞や口腔内残渣を除去するために直径6  $\mu\text{m}$ の濾紙で濾過し、その中から10  $\mu\text{l}$ をガラススライド上で乾燥させ、DAPI液を細菌の上に滴下し、30分反応させた。その結果、蛍光顕微鏡下でDAPI染色により細菌のDNAが染まり、球状あるいは連鎖状の細菌のみを可視化することができた。また成人5人による起床時の口腔内細菌数を計測した結果、各個人の相対的な口腔内細菌数の違いが明確になった。従って今回、DAPI蛍光染色による細菌の可視化条件が決められ、検体中の細菌の存在、数や形態を簡便にかつ短時間に顕微鏡下で観察および計測することが可能となった。今後この細菌のDAPI蛍光染色法は、医療、看護領域における細菌研究に応用出来るものとする。

【キーワード】 Diamidino-2-phenylindole (DAPI)、蛍光色素、細菌、DNA、可視化

## 【緒 言】

Diamidino-2-phenylindole (DAPI)は染色体のDNAに結合し、紫外線によって蛍光を発する事から、これまでおもに細胞や微生物の核染色に用いられてきた<sup>1-3)</sup>。

一方、これまで人体や施設における細菌の存在やその数について調べた研究では、検体を適当な培地上で培養し、生成した細菌コロニー数によってその存在や相対的な細菌数を調べてきた<sup>4)</sup>。しかしながらこの方法では、検体内の生菌のみしか培養できないことや培地に適した一部の細菌しかコロニー形成しないなど、検体採取時の真の細菌数や菌の種類はそのまま反映していない。さらに細菌数についての研究では細菌の培地、細菌数の計測は煩雑で時間もかかることから、敬遠されがちである。特に医療、看護領域では、人体や医療現場での細菌の存在有無、細菌数、細菌の形態などが簡便にかつ迅速に判定することが求められている。

そこで本研究では検体採取時の細菌の存在や相対的な数を簡便かつ短時間に計測するために、細菌が常に多く存在するといわれる口腔内の細菌を採取し、核染

色用の蛍光色素であるDAPIを用いて可視化して、培養せずにそのまま細菌を蛍光顕微鏡で直接観察する方法を試み、確立したので報告する。

## 【材料と方法】

健康な成人5名(A:男性33歳、B:女性22歳、C:女性21歳、D:女性22歳、E:女性21歳)から口腔内の細菌を採取した。被験者には研究の趣旨と方法、プライバシーの保護について説明し、同意を得た上で研究をおこなった。採取方法は、起床時直ちに(6時~7時)水道水50 ccを口に含み、20秒間口腔内で混和し、その後に細菌増殖を止めるために殺菌剤(ホルマリン)入りの瓶に保存した。細菌採取後、検体を濾紙(定性濾紙No1、穴直径6  $\mu\text{m}$ 、ADVANTEC社、Tokyo)に通して検体中の大きな異物やはがれた粘膜細胞を取り除いた。濾紙の穴の直径については赤血球の大きさ(7-8  $\mu\text{m}$ )を指標として、それ以上の大きさの細胞が除去され、それ以下の数ミクロンの細菌のみが濾過によって濾紙を通過するように設定した。その濾過検

体から10  $\mu$ lを取り、スライドグラスに滴下し、室温にて乾燥させ、細菌をスライドグラス上に貼り付けた。その後、リン酸バッファー (PBS) 液でスライドグラスを数回洗浄し、PBSでDAPI液 (10  $\mu$ g/PBS, D-9542, SIGMA社, St.Louis, Mo, USA) を細菌の上に滴下し、30分反応させた。その後、スライドグラスを数回PBSで洗浄し、50 %グリセリン/PBS液にて封入しカバーグラスを載せ、蛍光顕微鏡で観察撮影した。なお、濾過の前後で検体中の相対的な細菌数の変動に大きな問題がないことも確認した。このDAPI濃度は、通常動物細胞の核が染色される適性濃度を選択した。またDAPI染色液の対照として固定されたマウス組織の凍結切片を作成して同時に染色を行ない、細胞の核が染色される事を確認した。細菌数の計測では、単位面積当たり (0.013 mm<sup>2</sup>) の細菌数を1サンプル当たり5回計測してその平均数  $\pm$  S.D.で表した。

## 【結 果】

本研究では、サンプル採取後、サンプル液の濾過、乾燥、染色、封入、顕微鏡観察まで1時間から1.5時間ほどで完了した。起床直後のうがい液に含まれる口腔内細菌をDAPIで染色後、蛍光顕微鏡で観察した結果、メッシュ穴直径6  $\mu$ mの濾紙で検体を濾過しなかった場合は、検体中に存在する口腔残渣 (5-40  $\mu$ m) や粘膜細胞 (15-25  $\mu$ m) が多数見られ、DAPIに染色された大型の粘膜細胞の核や小型で球状、または連鎖状の細菌が認められた (図1)。一方、この濾紙で濾過した後の検体では小型の細菌のみ観察され、すべての細菌が蛍光を発するのが見られた。これらの細菌は大きさが直径0.8-1.0  $\mu$ mで、球状または連鎖状に見られ、単独あるいは集合して認められた (図2)。今回、成人5人の口腔内のDAPI蛍光陽性の細菌数を計測したところ単位面積当たりAは232 $\pm$ 87個、Bは165 $\pm$ 77個、Cは142 $\pm$ 42個、Dは44 $\pm$ 14個、Eは59 $\pm$ 30個であった (図3)。これらのうち、細菌数が最も多いAと最も少ないDでは約5.2倍の差があった。

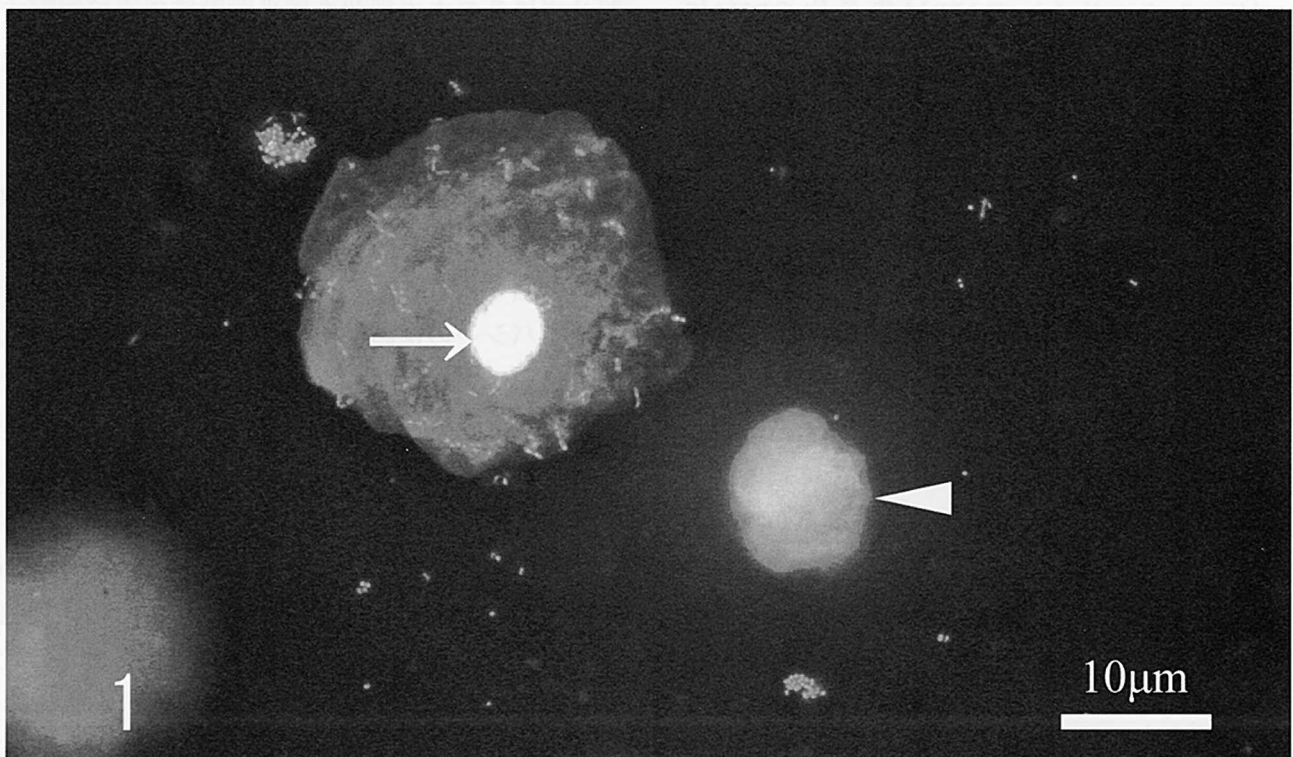


図1：濾過処理無しとうがい液のDAPI染色。口腔粘膜細胞 (大きい矢印) や残渣物 (小さい矢頭) が見られる。多数の小さな細菌 (小さい矢印)、粘膜細胞の丸い核 (大きい矢頭) がDAPIにより蛍光を発している。



図2：濾過処理後のうがい液のDAPI染色。口腔粘膜細胞や残渣物が見られず、明るい点状の細菌のみがDAPI蛍光を示している。

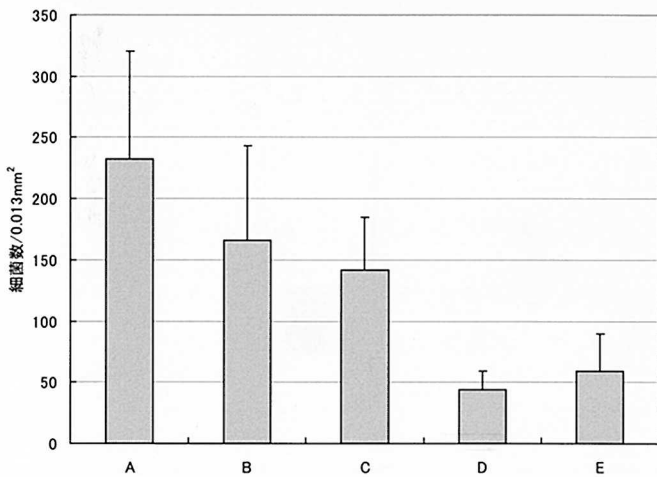


図3：起床時に採取したうがい液中の細菌数。細菌数に明確な個人差が見られる。

**【考 察】**

本研究では、口腔内の細菌を核染色用の蛍光色素であるDAPIで染色し蛍光顕微鏡を使って細菌のみを観察する事が出来た。このことは、細菌を可視化するときのDAPIの適性濃度、口腔内残渣や粘膜細胞などをフ

ィルターで除去して細菌のみにする条件が決定されたことを示している。さらには検体中のすべての細菌において細菌DNAの蛍光が見られ、その形状や相対的な口腔内細菌数を的確に表現する事ができた。このDAPIは2本鎖DNAのアデニン-チミン間に結合し、紫外線によって蛍光を発する事が知られている<sup>1)</sup>。また、細菌では一般の動物細胞と異なり、細胞内に核がなくDNAが細胞質内に散在することが知られている<sup>5)</sup>。そのために細菌では細胞質内全体がDAPI蛍光で光っているものと思われる。当初、このDAPIは死細胞のみを染色することで知られてきたが、後に生細胞も染める事がわかってきた<sup>2)</sup>。そのため今回の検体採取時における口腔内細菌の場合も、生細菌と死細菌が混在していると思われるが、全てこのDAPIで染色され、相対的な細菌数が計測できたものと考えられる。また今回、成人5人の口腔内細菌を調べた結果、各個人の細菌数の差が明確に観察できたこと、細菌数が最も多いAと最も少ないDでは約5.2倍の差があった。従って今回のDAPIを使って細菌を直接蛍光染色する方法は細菌の

存在と相対的な数を簡便にかつ迅速（顕微鏡観察までに1時間から1.5時間）に判定できる有効な方法である。従来の方法では培養だけで数日を要していたことから、迅速な対応が求められる医療、看護の分野で細菌の存在有無の判定や細菌の増減に関する細菌研究に応用できるものとする。今回の口腔内細菌の観察では、多くが球状ないしは連鎖状をしていたことから球菌や連鎖球菌と思われる。実際、口腔内細菌叢はレンサ球菌が多くを占めることはよく知られている<sup>6,7)</sup>。今後はさらに各細菌に対する免疫抗体を使って細菌の種類の設定も同時に行なえるように検討したい。

#### 【まとめ】

本研究では、蛍光色素であるDiamidino-2-phenylindole (DAPI)を用いて口腔内細菌の蛍光染色を行った。その結果、蛍光顕微鏡下でDAPI染色により細菌のDNAが染まり、球状あるいは連鎖状の細菌を可視化することができた。また成人5人による起床時の口腔内細菌数を計測した結果、各個人の相対的な口腔内細菌数の違いが明確になった。従って今回、DAPI蛍光染色による細菌の可視化条件が決められ、検体中の細菌の存在、数や形態を簡便にかつ短時間に顕微鏡下で観察および計測することが可能となった。今後この細菌のDAPI蛍光染色法は、医療、看護領域における細菌研究に応用出来るものとする。

#### 【引用文献】

- 1) Schnedl W, Mikelsaar AV, Breitenbach M, Dann O: DIPI and DAPI: Fluorescence banding with only negligible fading. Hum. Genet. 36:167-172, 1977.
- 2) Laurence J, Mitra D, Steiner M, Staiano-Coico L, Jaffe E: Plasma from patients with idiopathic and human immunodeficiency virus-associated thrombotic thrombocytopenic purpura induces apoptosis in microvascular endothelial cells. Blood 87:3245-3254, 1996.
- 3) Baniecki ML, Wirth DF, Clardy J: High-throughput Plasmodium falciparum growth assay for malaria drug discovery. Antimicrob Agents Chemother 51:716-723, 2007.

- 4) 天児和暢、南嶋洋一：戸田新細菌学、pp955-986、南山堂、東京、1997.
- 5) 天児和暢、南嶋洋一：戸田新細菌学、pp30-31、南山堂、東京、1997.
- 6) 天児和暢、南嶋洋一：戸田新細菌学、pp179-181、南山堂、東京、1997.
- 7) 東 匡伸、小熊恵二：シンプル微生物学、pp227-231南江堂、東京、2001.