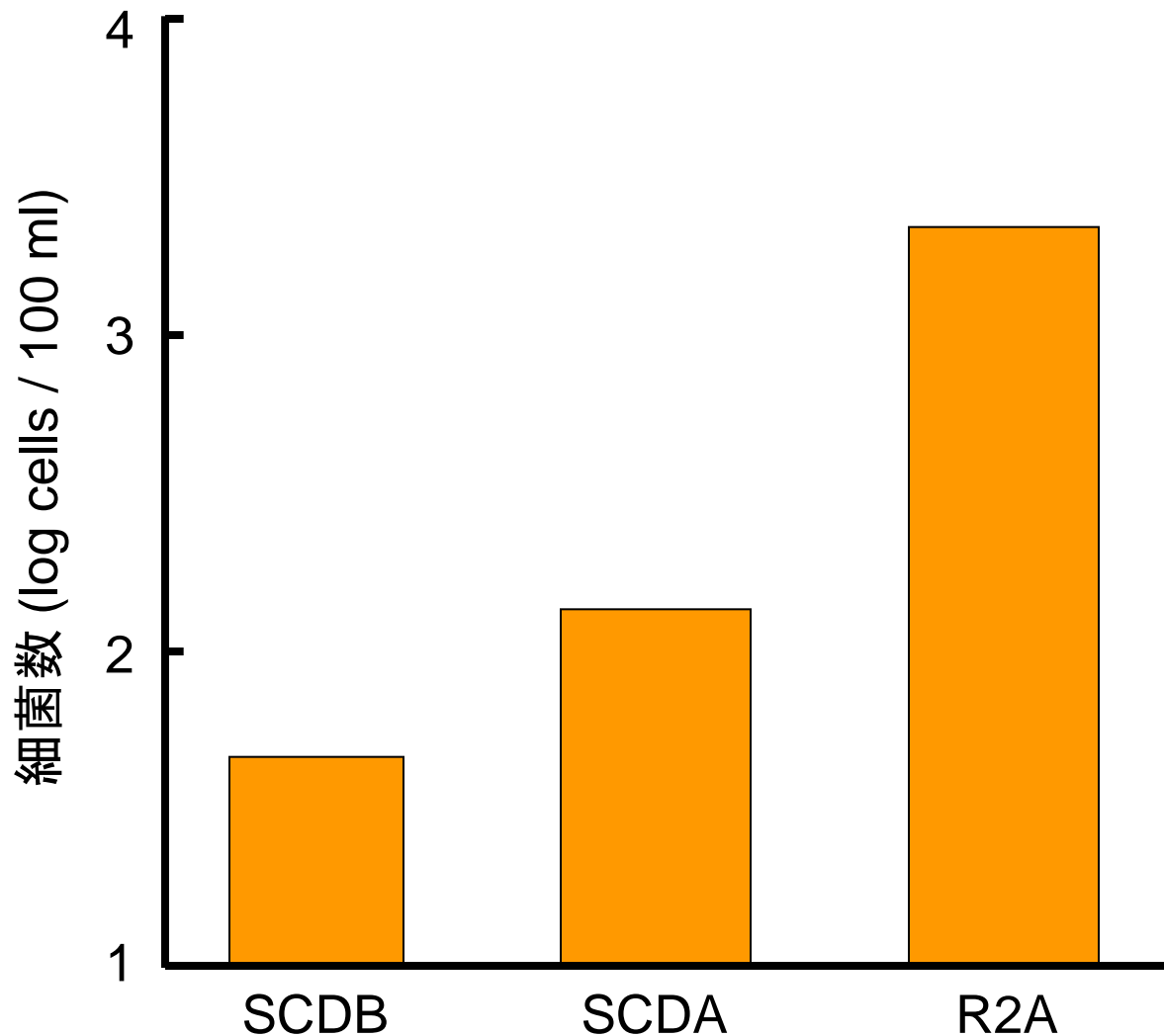


微生物試験とリアルタイムモニタリング

大阪大学大学院 薬学研究科
遺伝情報解析学分野（衛生化学）

山口 進康, 那須 正夫

培地の種類が変われば結果が変わる . . .



試料：医薬品製造用水（イオン交換水）；30°Cで2週間培養

培地の種類が変われば結果が変わる. . .

| 培地 | 検出種 | 優占種 | 検出率 |
|------|-----|-----------------------------|-------------|
| SCDB | 5 | <i>Stenotrophomonas</i> sp. | 39/46 (85%) |
| SCDA | 4 | <i>Xanthomonas</i> sp. | 36/46 (78%) |
| R2A | 8 | <i>Bradyrhizobium</i> sp. | 23/48 (48%) |

16S rRNA遺伝子の部分配列を（position 933-1387）を解析

試料：医薬品製造用水（イオン交換水）；
30°Cで2週間培養後、コロニーを分離

環境中の細菌検出における培養法の課題

- ①水環境中の細菌の多くは、一般的な条件下ではコロニーを形成しにくい
- ②培養条件により、増殖可能な細菌種が変化



培養法のみでは細菌モニタリングは不十分

培養操作に依存することなく，
細菌をいかにしてとらえるのか？



細菌：「遺伝子情報および生理活性をもつ粒子」



細胞内成分や遺伝子（核酸）を指標として可視化

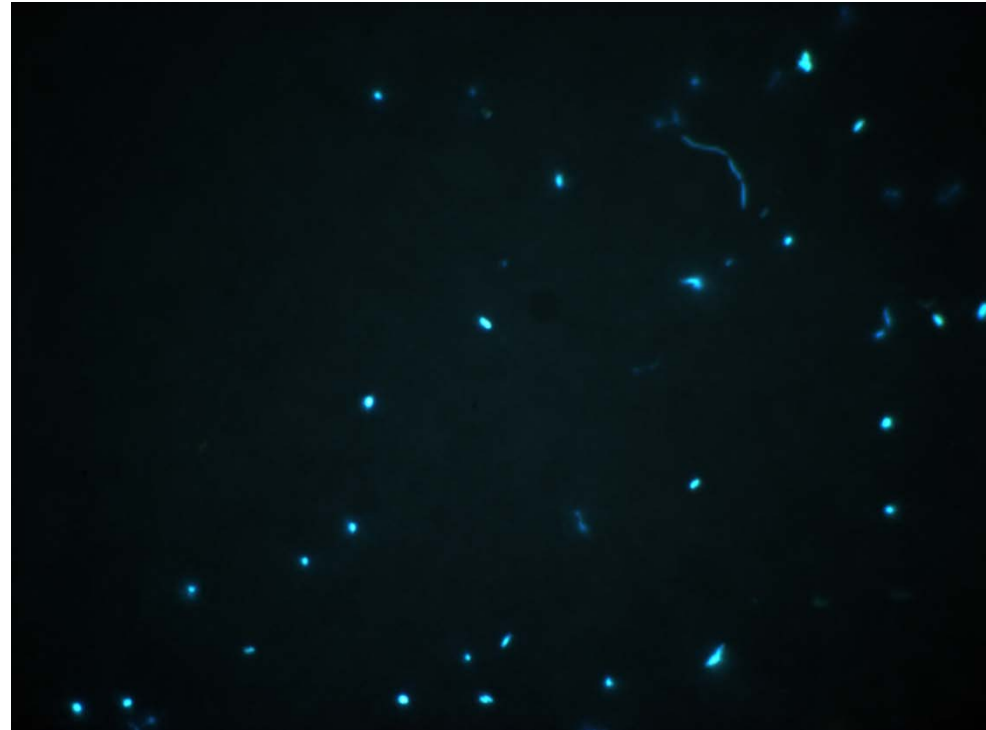
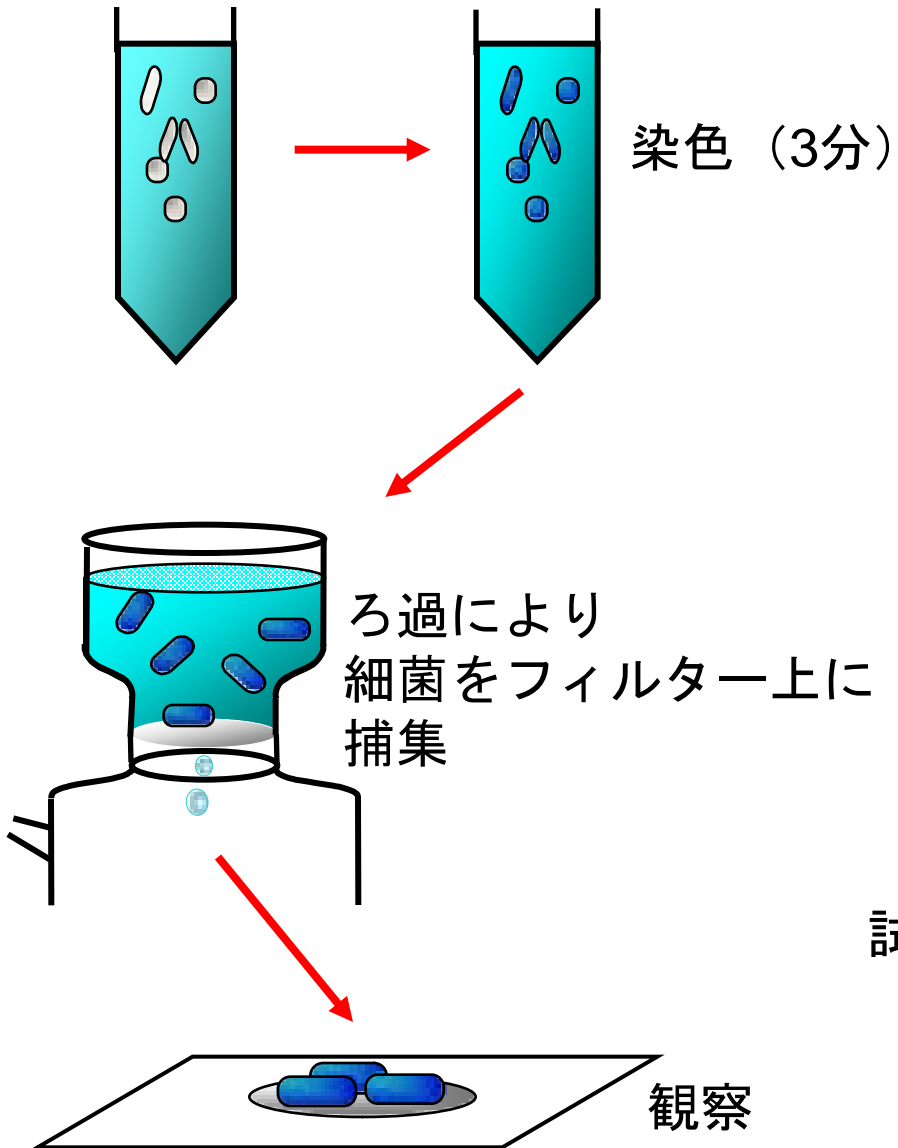
直接計数法による細菌の現存量測定

全菌数（総菌数）の測定

酵素活性をもつ細菌数の測定

分裂・増殖する細菌数の測定

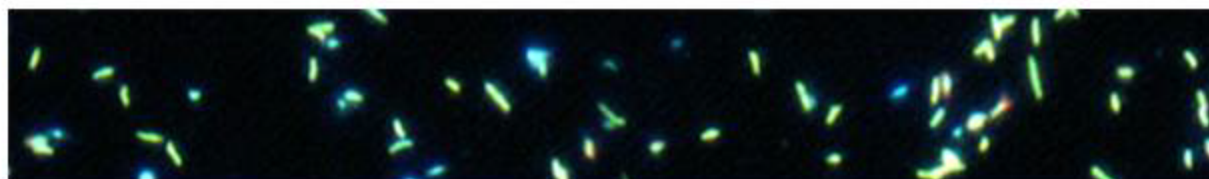
蛍光染色法による細菌数の迅速測定



試料：医薬品製造用水（イオン交換水）；
DAPIで染色

ナチュラルミネラルウォーター中の細菌

UV下で観察



一般的な水環境中に存在する微生物の大部分は
ヒトに無害



微生物が存在することが問題ではない；
過剰な量が存在する・病原細菌が存在することが問題



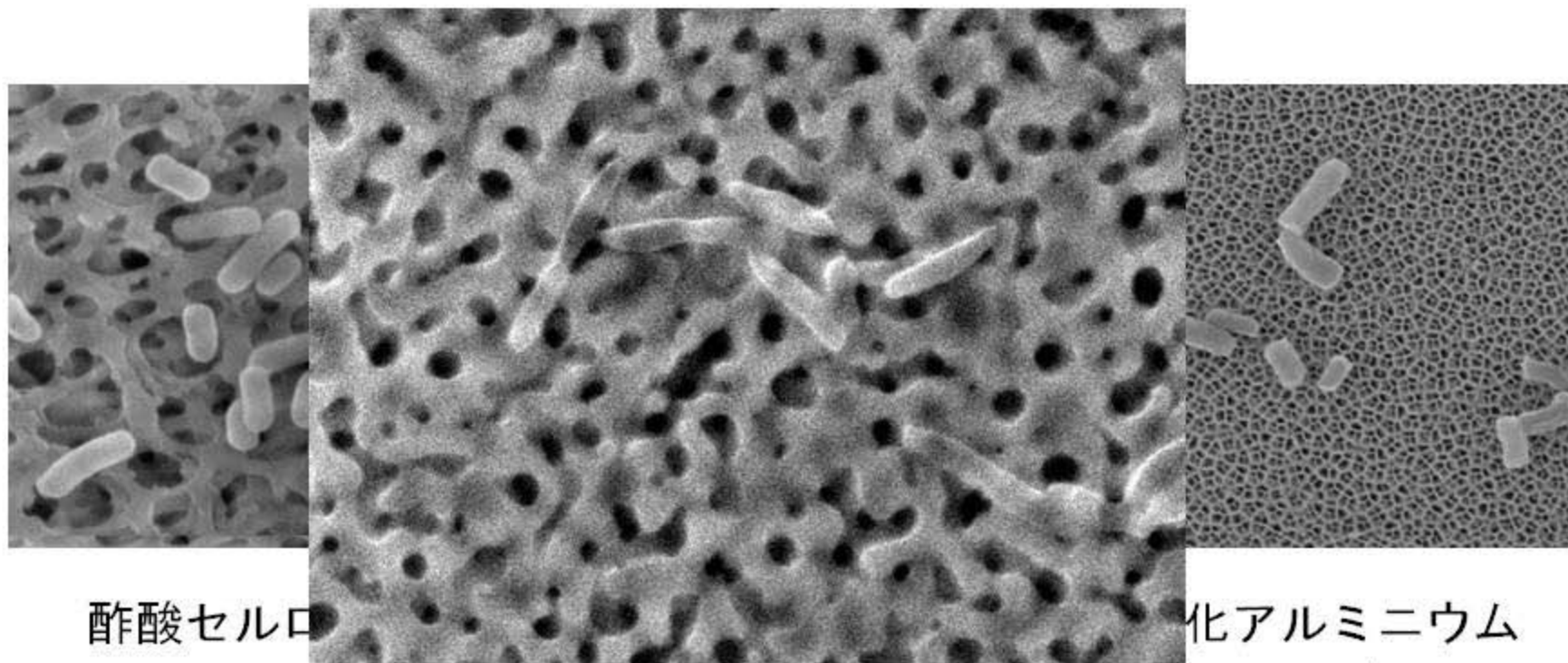
細菌は DAPI (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で染色

試料 : evian ; ろ過量 : 40 mL

微生物検出に利用される蛍光染色剤

| 蛍光染色剤 | 励起 (nm) | 蛍光 (nm) | 染色対象 | 主な用途 |
|------------------|---------|----------|----------------------------|------------------------|
| FITC | 490 | 520 | タンパク質 (α -アミノ基) | 細胞内タンパクの定量, 蛍光抗体の標識 |
| Rhodamine 123 | 507 | 529 | 細胞膜 | 細胞膜の活性評価 |
| Acridine orange | 490 | 526, 650 | 一・二本鎖核酸 | 核酸染色, RNA/DNA比測定 |
| Chromomycin A3 | 450 | 570 | G-C領域 | DNA定量 |
| DAPI | 358 | 461 | A-T領域 | DNA定量 |
| Hoechst 33258 | 352 | 461 | A-T領域 | DNA定量 |
| Ethidium bromide | 545 | 605 | 二本鎖核酸 | DNA定量, 死細胞検出 |
| Propidium iodide | 530 | 615 | 二本鎖核酸 | DNA定量, 死細胞検出 |
| SYTOX Green | 502 | 523 | DNA | DNA定量, 死細胞検出 |
| SYBR Green I | 497 | 520 | DNA | DNA定量, ウイルスの計数 |
| CFDA | 495 | 520 | esterase | 生細胞の検出 |
| Calcein-AM | 490 | 515 | esterase | 生細胞の検出 |
| CTC | 488 | 602 | 呼吸 | 生細胞の検出 |
| TRITC | 542 | 572 | | FISH用プローブの標識 |
| Texas Red | 568 | 610 | | FISH用プローブの標識 |
| Cy3 | 550 | 570 | | FISH用プローブの標識 |
| Cy5 | 649 | 670 | | FISH用プローブの標識 |

メンブレンフィルター



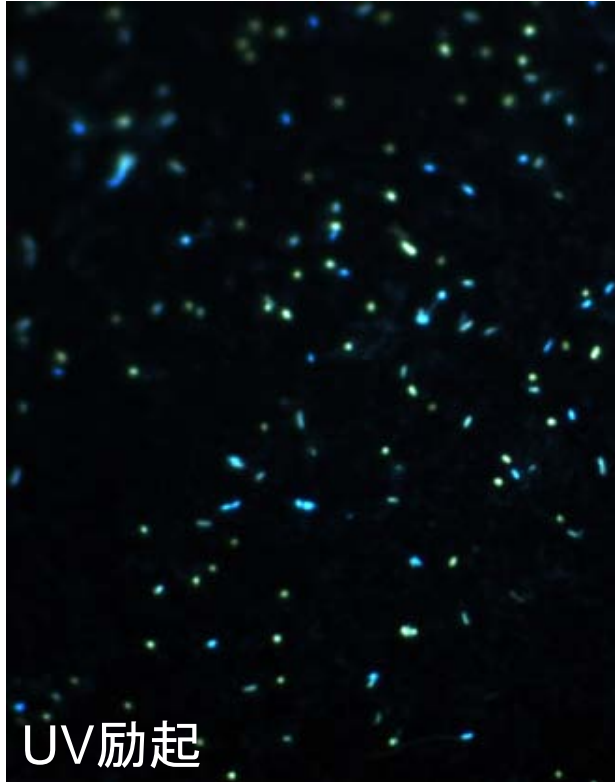
酢酸セルロース

酸化アルミニウム

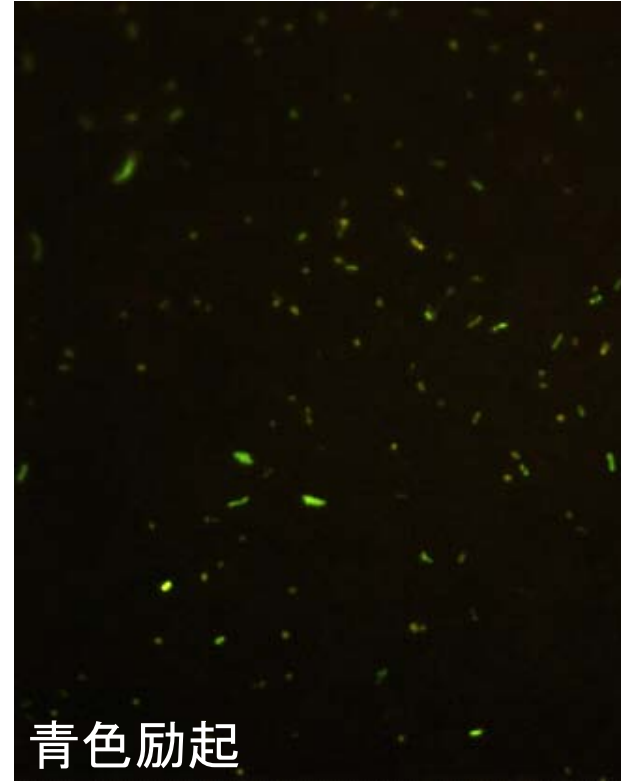
平滑な表面が必要

蛍光活性染色法による生きている細菌と死菌の区別

全細菌



エステラーゼ活性をもつ細菌

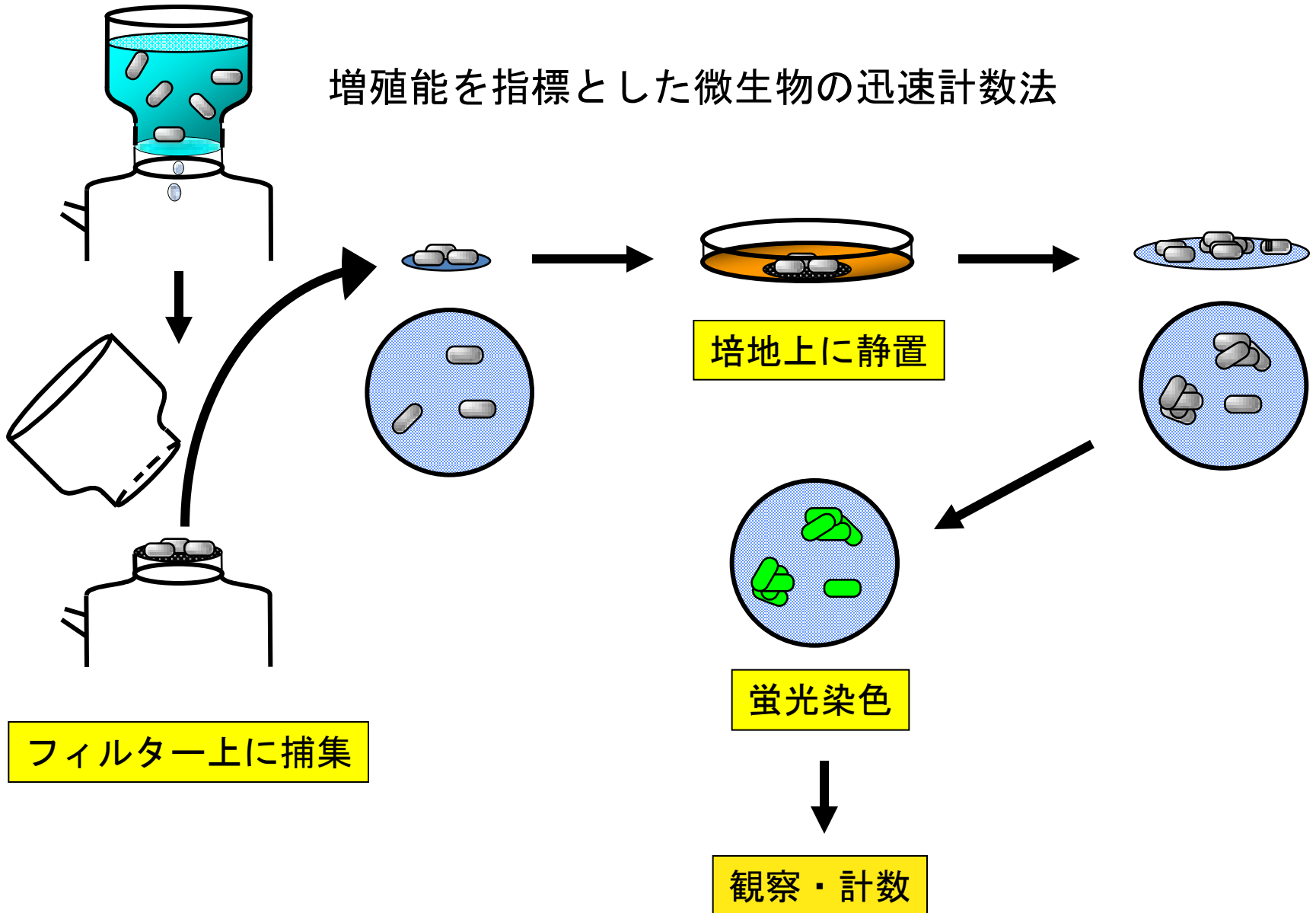


DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole
CFDA: 6-carboxyfluorescein diacetate

試料：ナチュラルミネラルウォーター

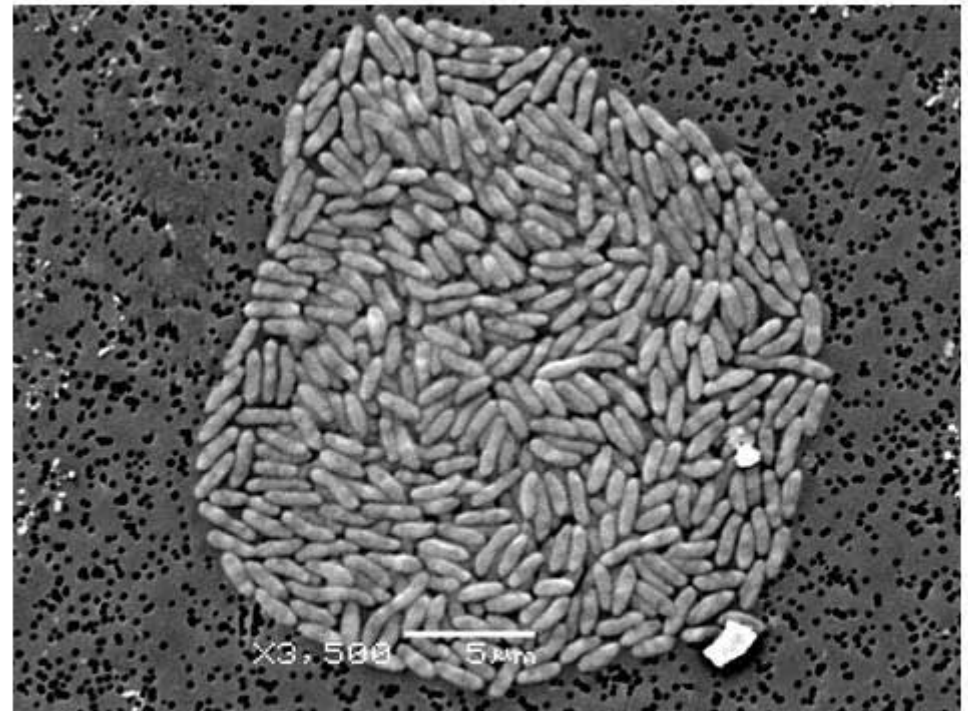
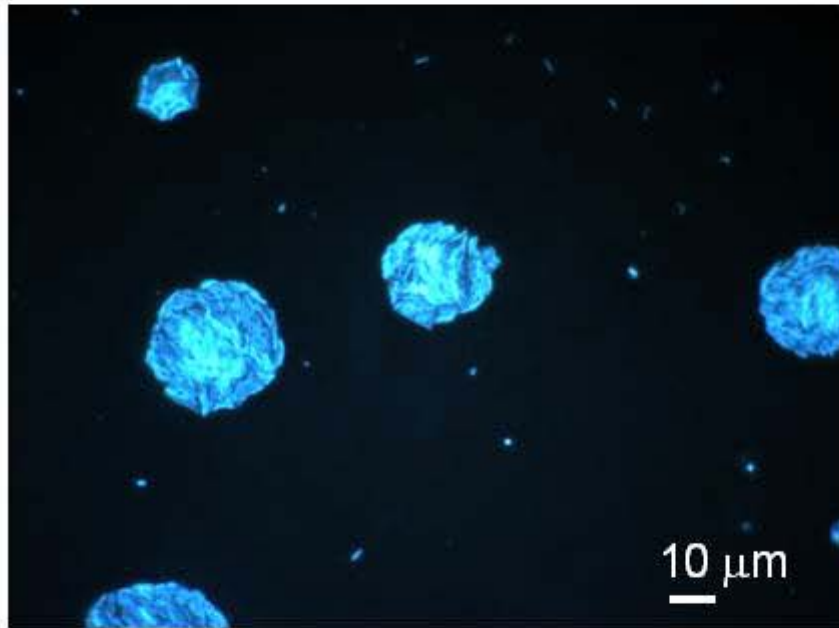
マイクロコロニー法

増殖能を指標とした微生物の迅速計数法



マイクロコロニー法

増殖能を指標とした微生物の迅速計数法

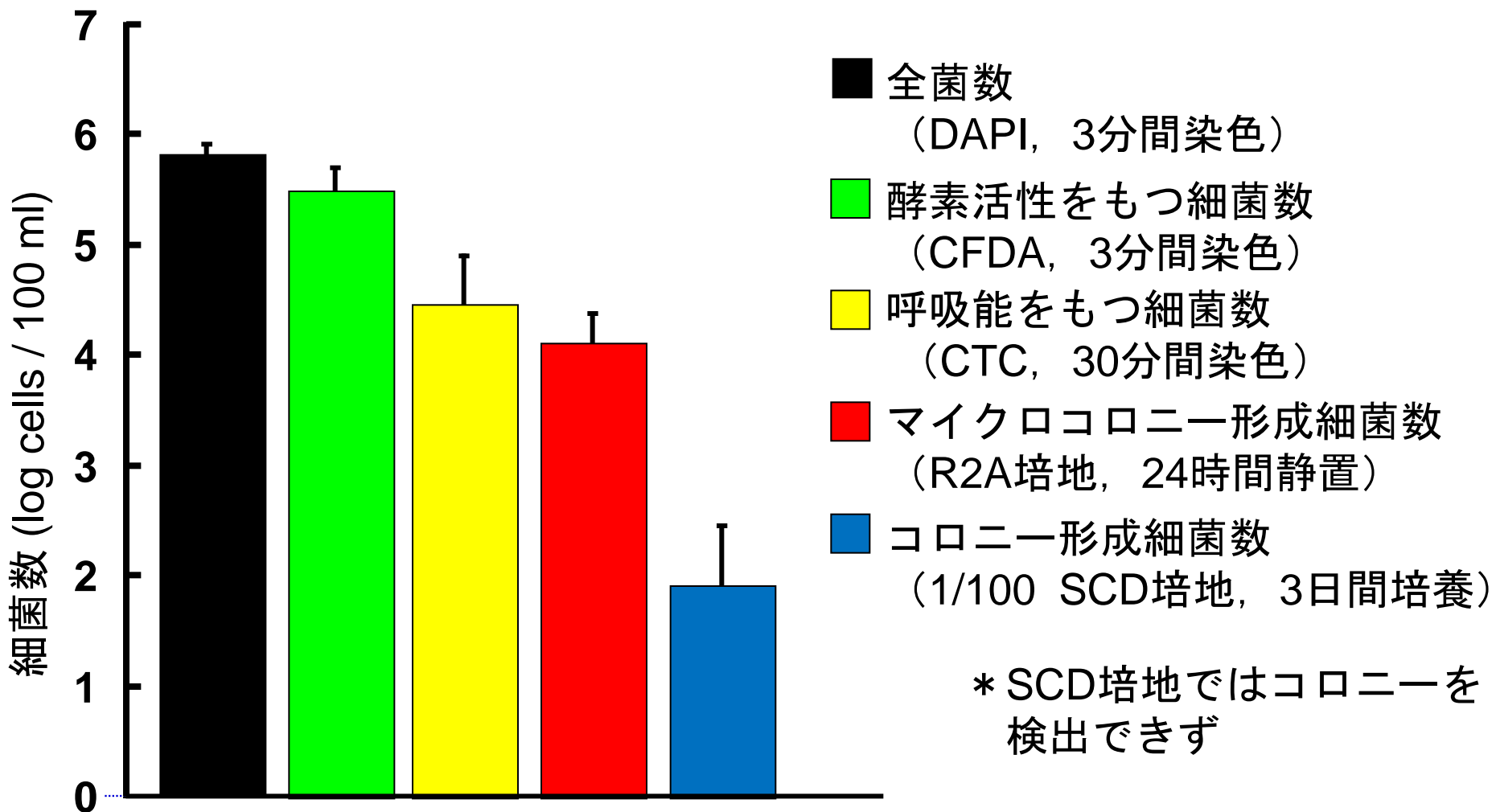


サンプル : evian

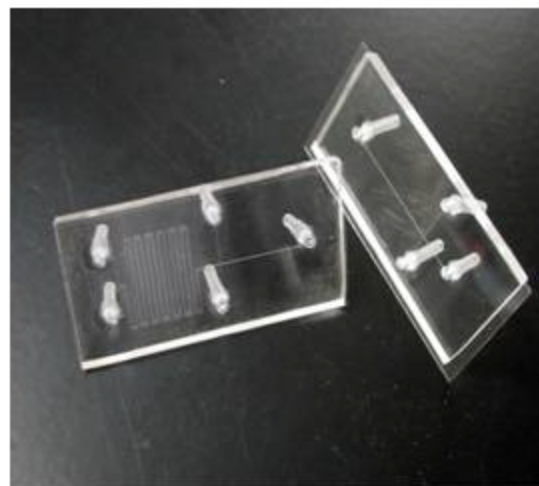
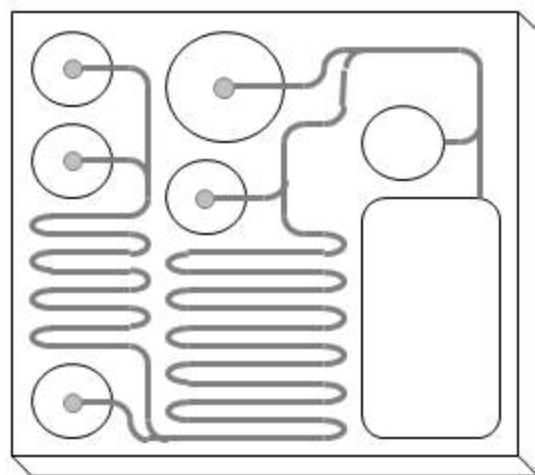
培養時間 : 24時間 (R2A培地)

染色剤 : DAPI (1 μg/ml)

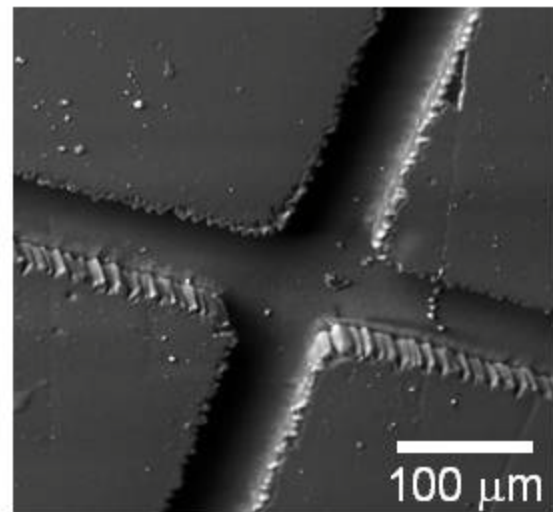
医薬品製造用水（イオン交換水）中の細菌数



マイクロ流路デバイスによる細菌数の測定



マイクロ流路デバイス

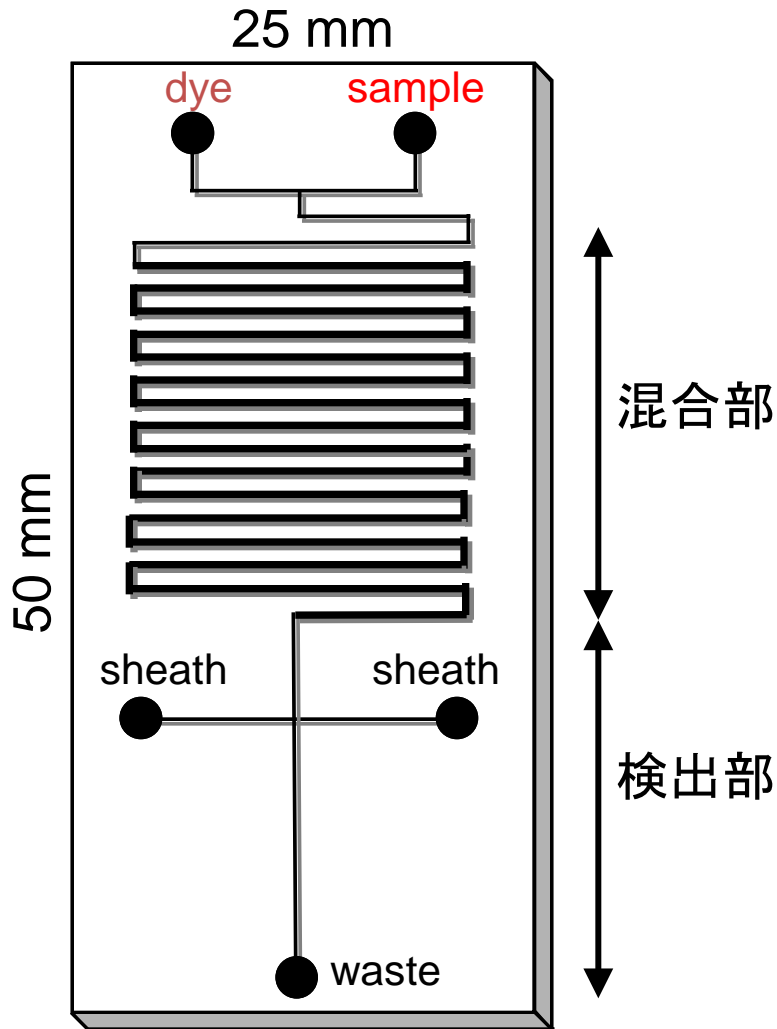


マイクロ流路

- 迅速な解析 (< 60分/1 サンプル)
- サンプル, 試薬の消費量が少ない (< 100 μl)
- 比較的安価であり, 携帯性が優れている
- 自動化が可能 (流路内での反応, コンピュータでの解析)
- バイオハザードのリスクを低減

On-siteかつリアルタイムの細菌モニタリングが可能に

On-chip染色・計数用マイクロ流路デバイス



材質

デバイス : polydimethylsiloxane (PDMS)

カバー : ガラス

流路

幅 : 100 μm (検出部)

500 μm (混合部)

深さ : 20 μm

On-chip染色・計数用マイクロ流路システムによる 飲用水中の細菌の検出

