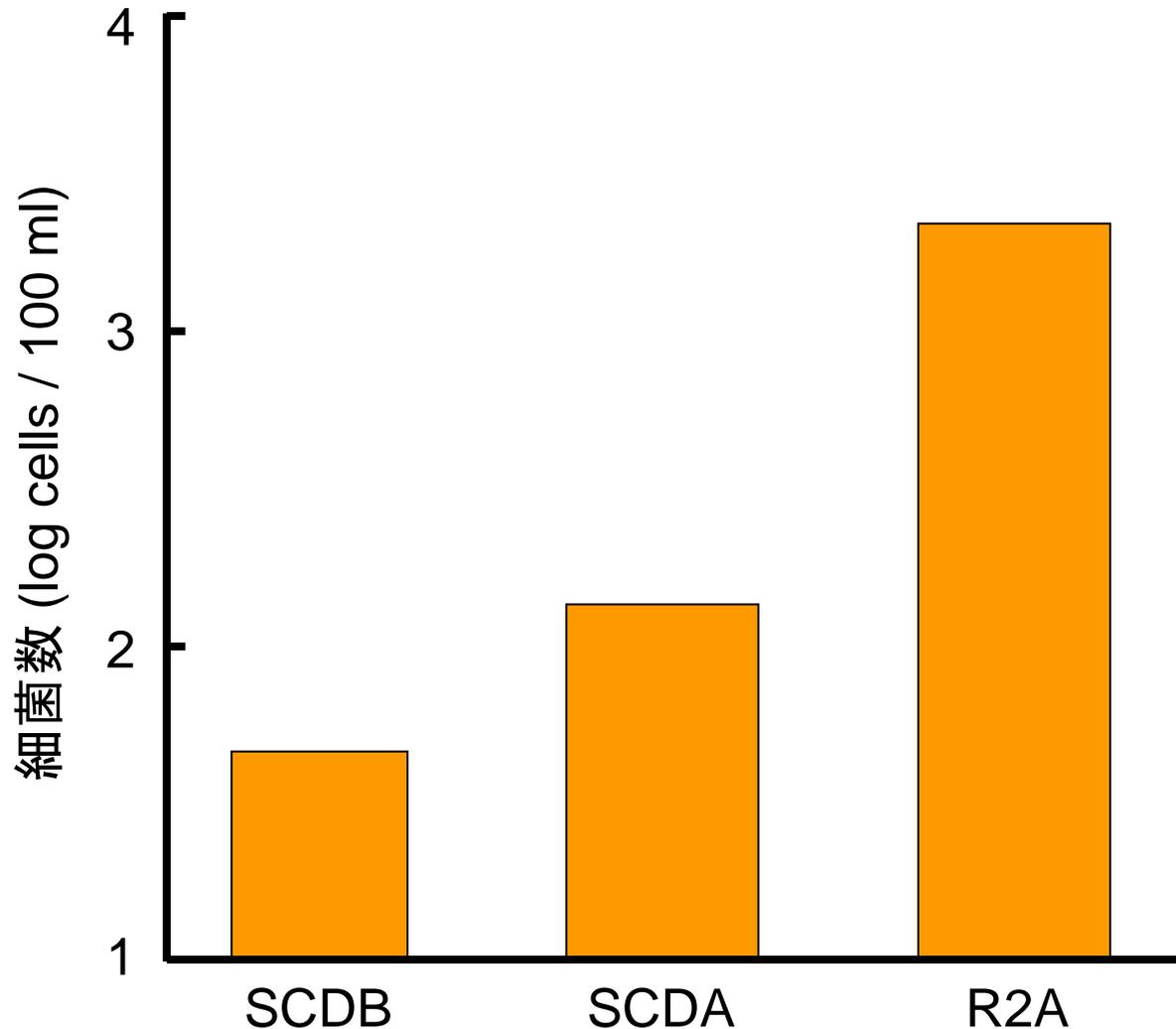


微生物試験とリアルタイムモニタリング

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

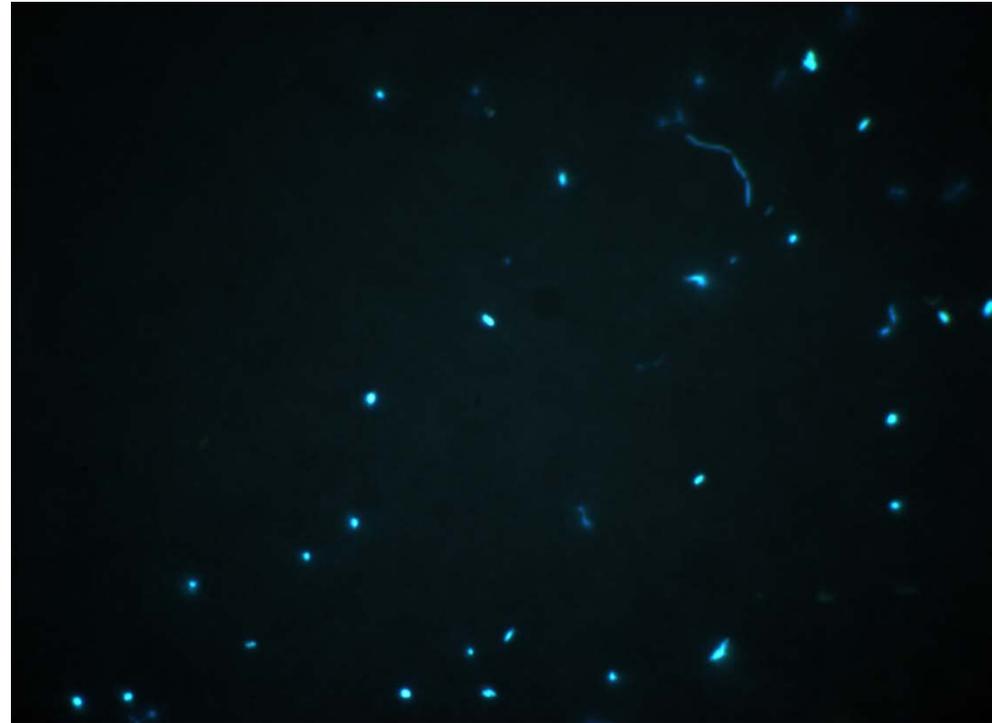
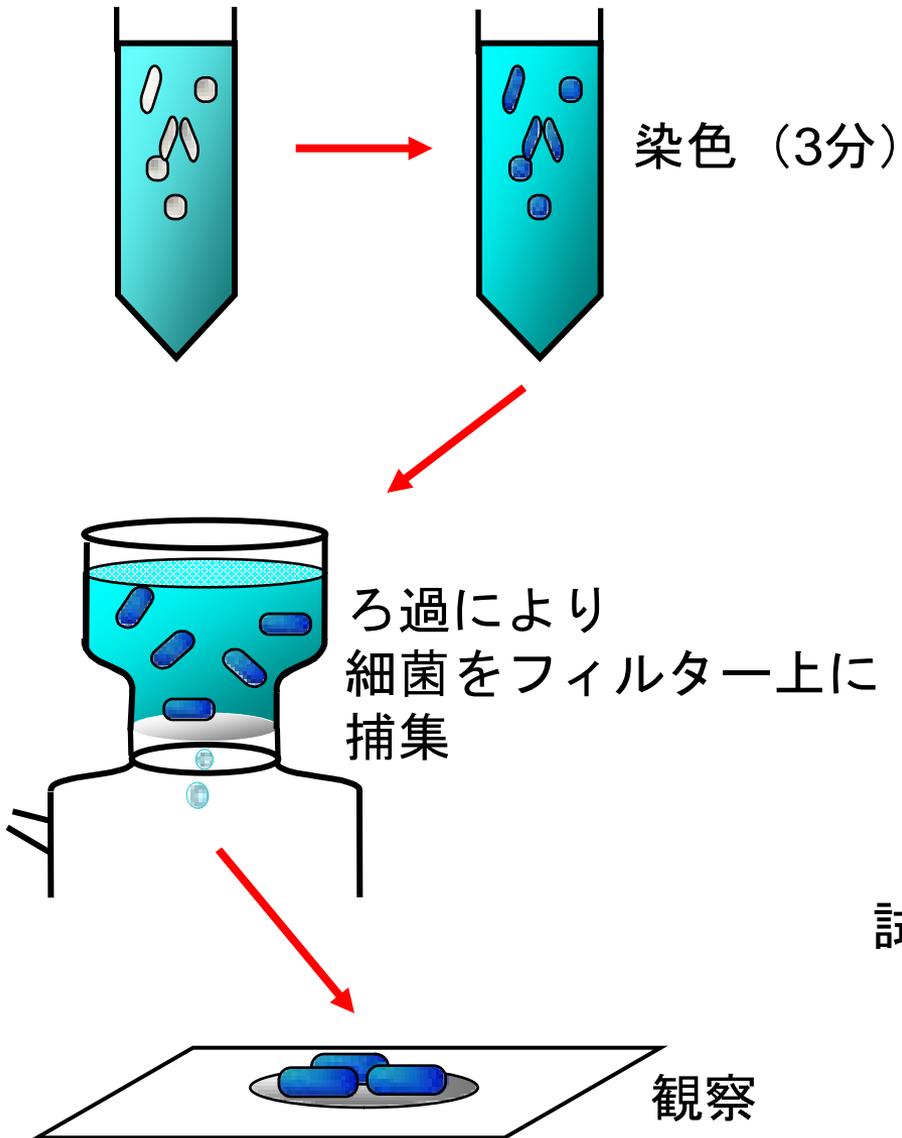
直接計数法による細菌の現存量測定

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



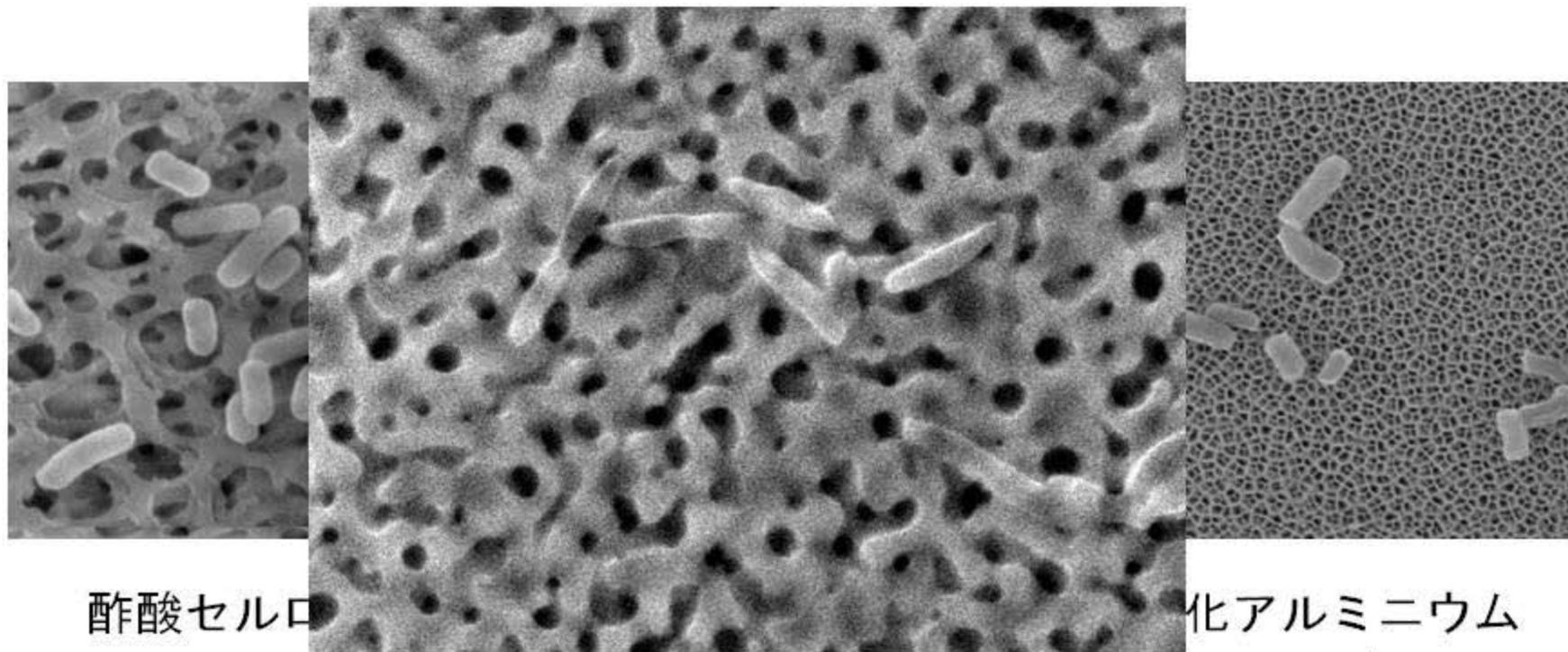
細菌は DAPI (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で染色

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



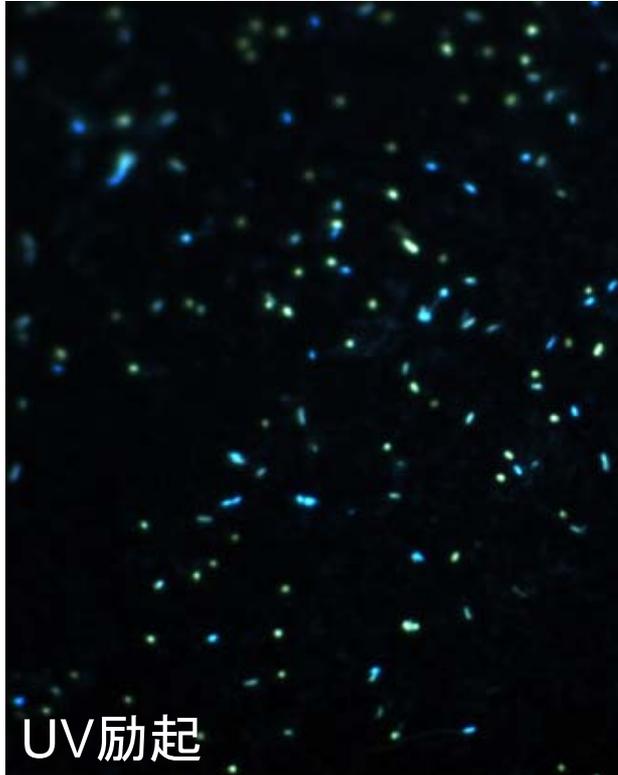
酢酸セルロース

化アルミニウム

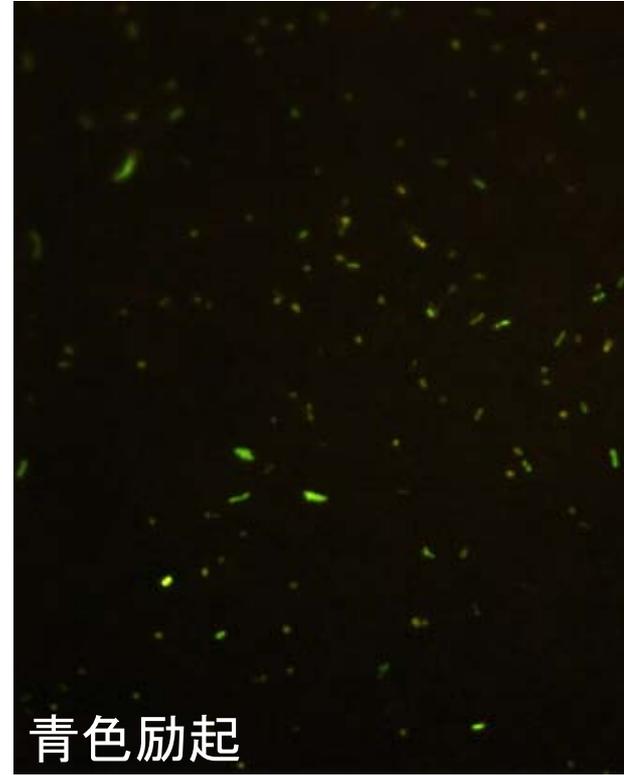
平滑な表面が必要

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

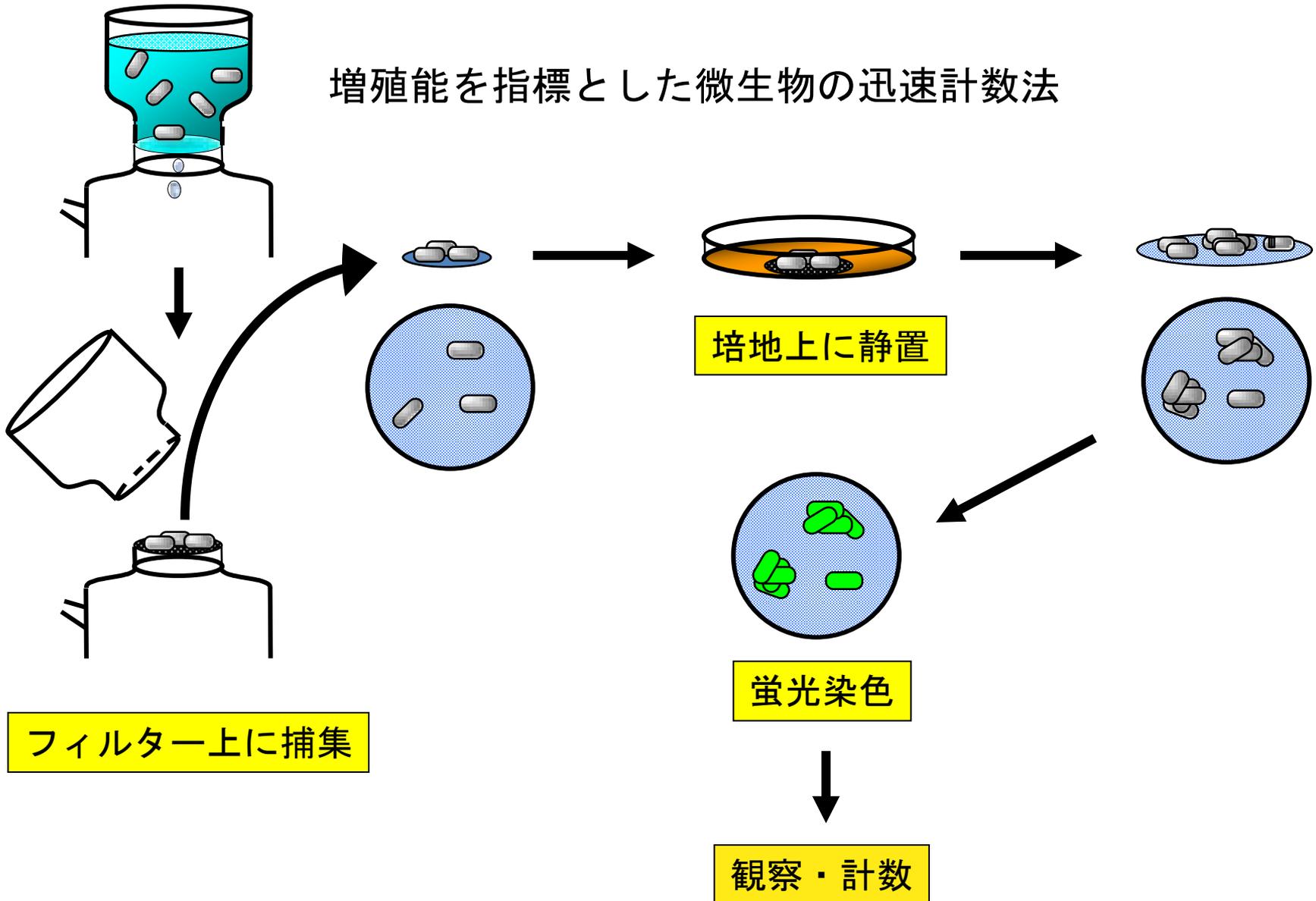


DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole
CFDA: 6-carboxyfluorescein diacetate

試料：ナチュラルミネラルウォーター

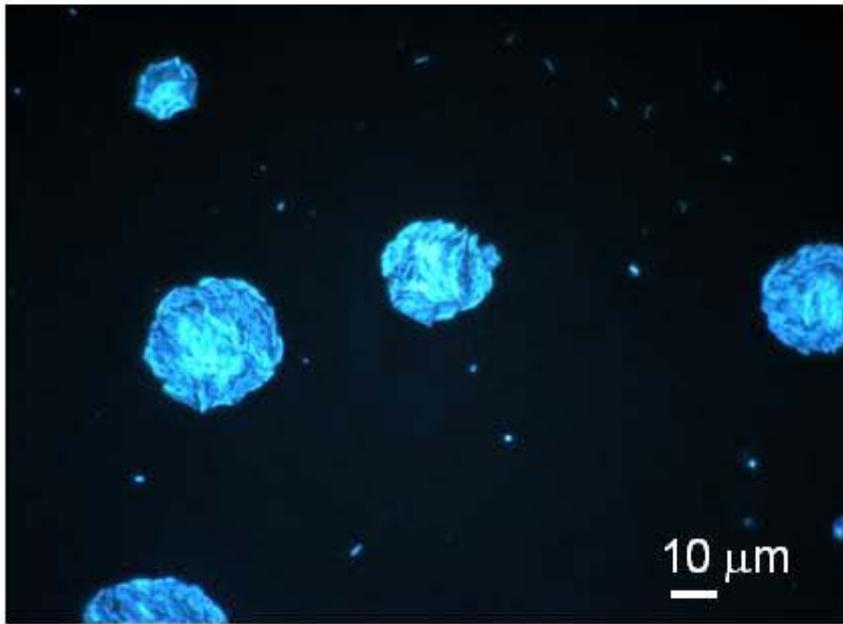
マイクロコロニー法

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

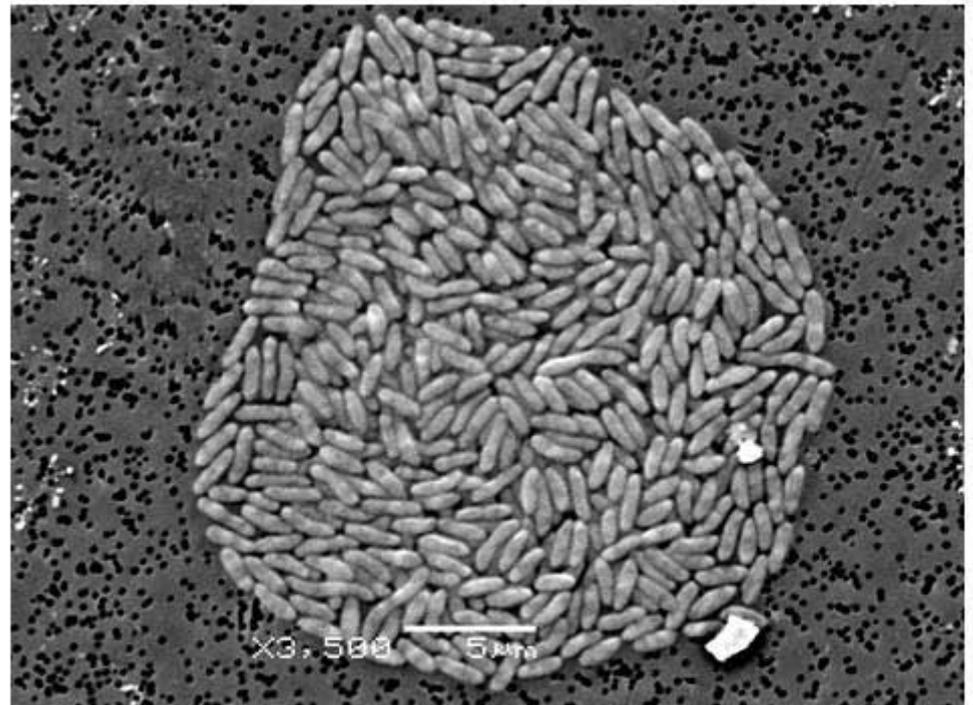
増殖能を指標とした微生物の迅速計数法



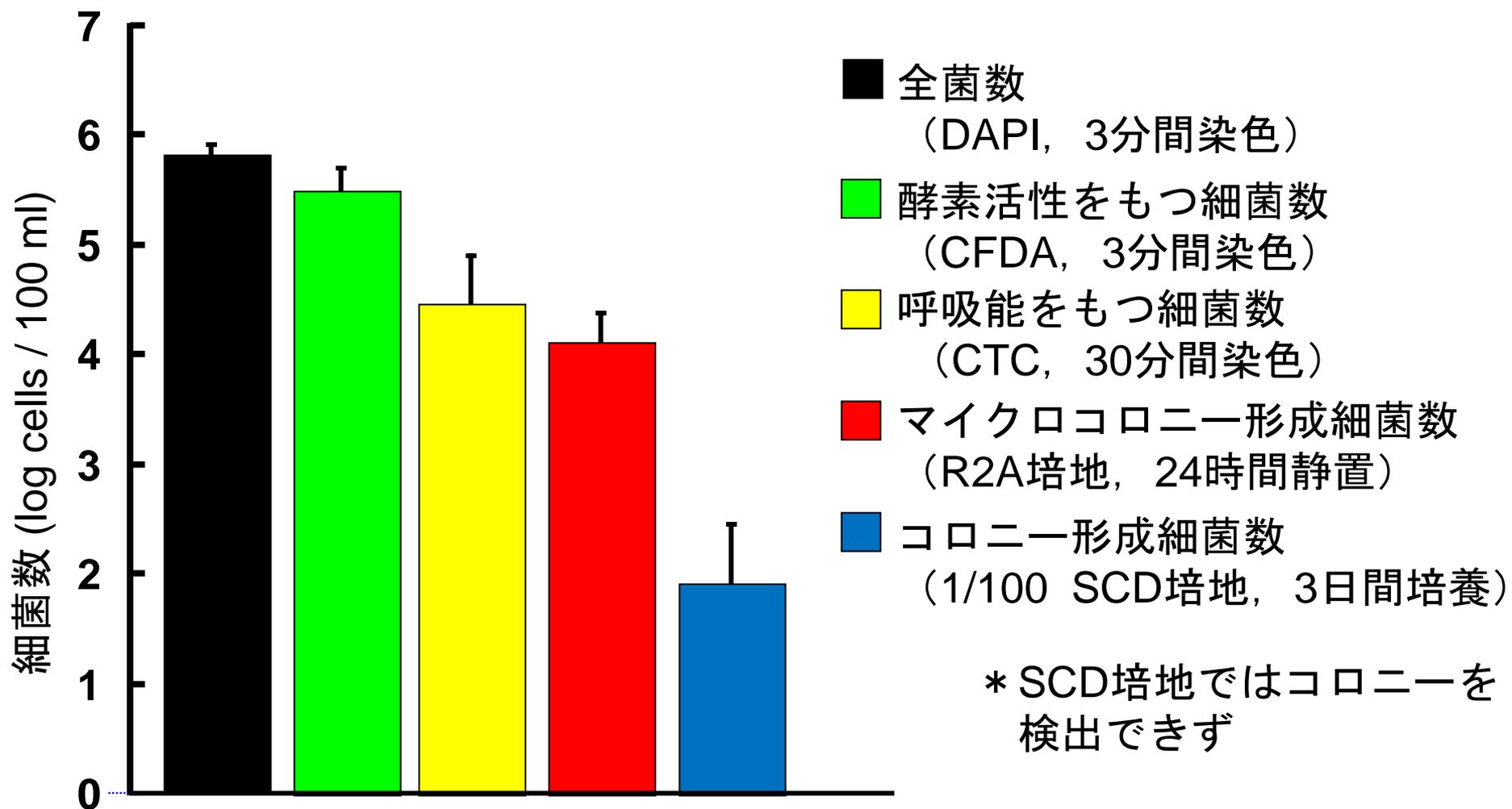
サンプル : evian

培養時間 : 24時間 (R2A培地)

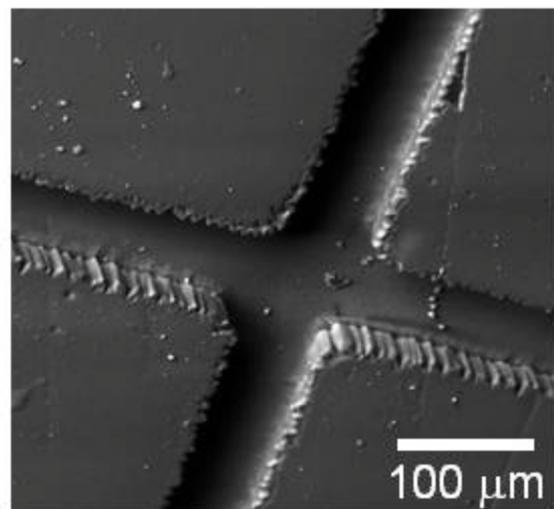
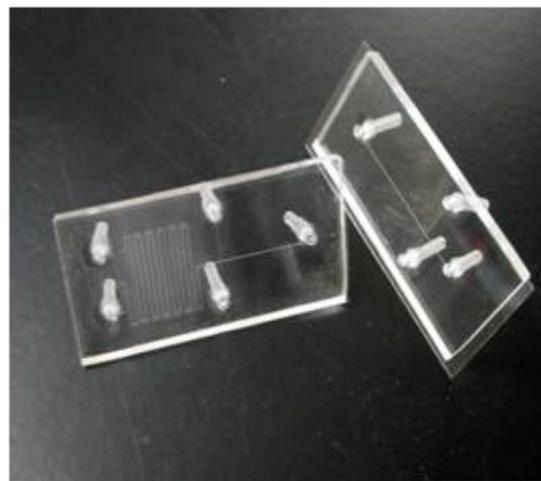
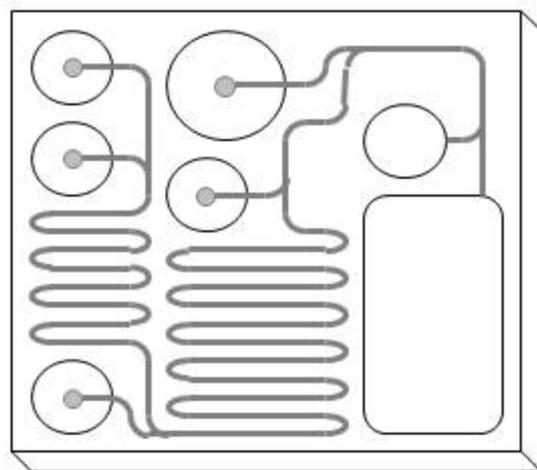
染色剤 : DAPI (1 μg/ml)



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



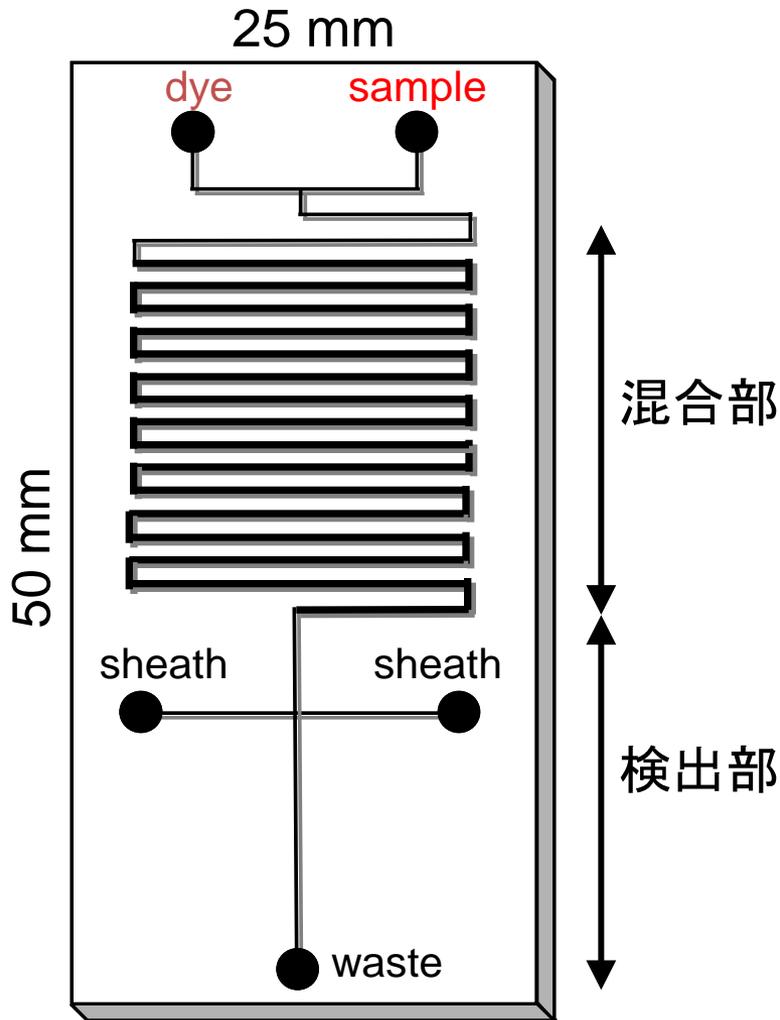
マイクロ流路デバイス

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

