

ポータブル・マイクロ流路システムを用いた湖沼・河川環境中の病原微生物のリアルタイム・オンサイト・モニタリング

大阪大学大学院薬学研究科
衛生・微生物学分野
山口 進康

水環境の微生物学的安全保証

レジャー・ブーム, アウトドア・ブーム

→ 湖岸や河川敷でウォーターアクティビティを楽しむ人も増加

海外では遊泳中に大腸菌O157に感染した報告がされている

水環境の微生物学的安全保証：微生物モニタリングが重要



微生物モニタリング

培養法：

- 簡便=広く普及
- 結果を得るまでに数日~1週間を要する
- 環境中の微生物数を過小評価



平板培養法

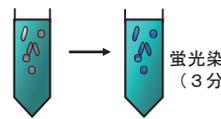
→ 環境中の微生物を捉えるには培養に依存しない方法が重要

培養に依存しない新手法：

- 微生物を可視化（蛍光染色法等）；
- 遺伝子を解析（PCR, T-RFLP等）
- 数時間以内に結果を得ることが可能
- 画像解析や自動システムによる定量性の向上



蛍光染色法による微生物の迅速検出

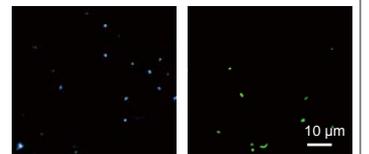


蛍光染色
(3分)

ろ過

観察

全細菌 (DAPIにより染色) (CFDA**により染色)



試料：河川水

* 4', 6-diamidino-2-phenylindole
** carboxyfluorescein diacetate

蛍光染色法：高精度かつ迅速

↓
環境微生物学分野を中心に広く使われつつある

↓しかしながら...

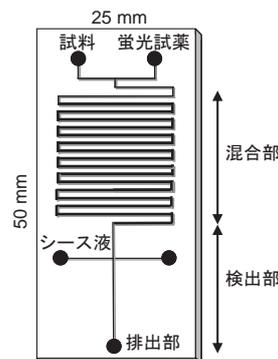
蛍光顕微鏡：操作が煩雑



微生物数の測定：研究室に試料を持ち帰る必要がある

↓
その場で (on-site) リアルタイムにモニタリングできる手法が必要とされている

on-chip染色用に作製したマイクロ流路デバイス

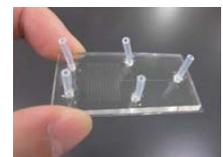


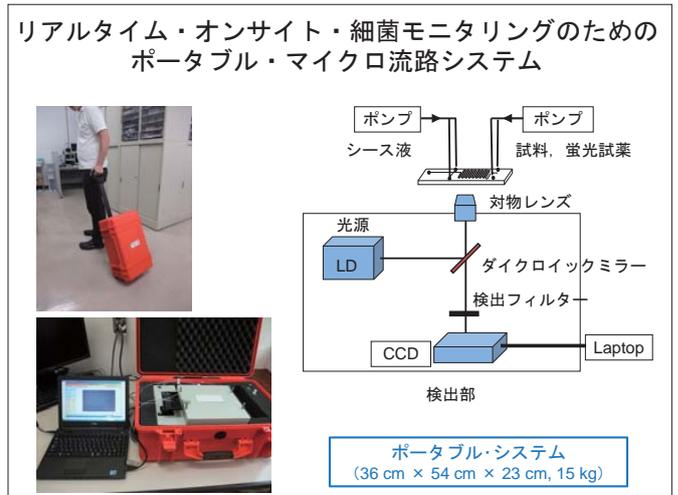
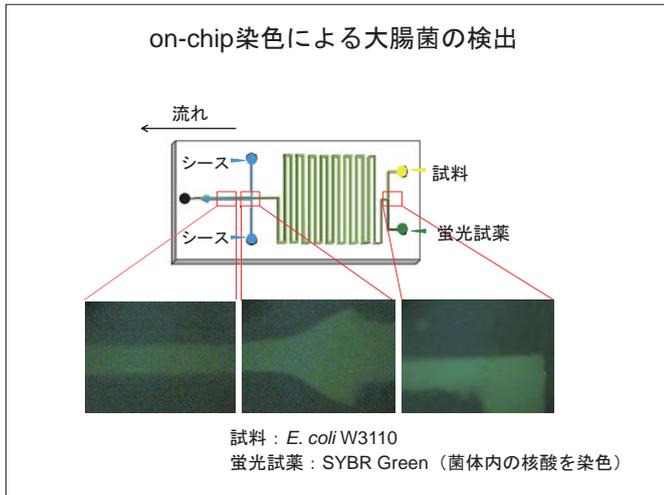
・材料

- PDMS (polydimethylsiloxane)
- カバーガラス

・マイクロ流路

- 深さ：15 μm
- 幅：500 μm (混合部)
100 μm (検出部)



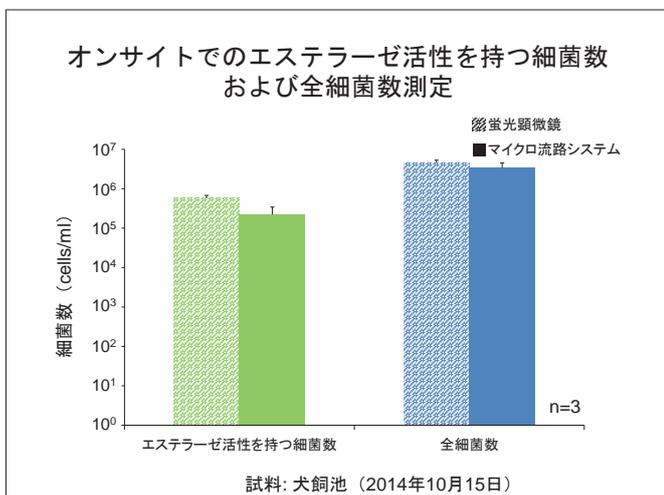


モニタリング対象

危害微生物
 蛍光抗体の利用により検出可能であることを確認 (昨年度に報告)

エステラーゼ活性を持つ細菌 (CFDA)
 細菌の酵素 (エステラーゼ) を利用し、活性を評価する

全細菌 (SYBR Green)
 細菌の核酸を染色する



まとめ

1. 蛍光活性染色剤の濃度およびマイクロ流路デバイスのデザインの最適化により、on-chip染色による活性を持つ細菌数測定および全細菌数測定を可能とした。
2. ポータブル・マイクロ流路システムを用い、水環境中の活性を持つ細菌数測定および全細菌数測定を、オンサイトで行った。また、結果を1時間以内に得ることができた。
3. ポータブル・マイクロ流路システムを用いた水環境中の細菌のリアルタイム・オンサイトモニタリングが可能であることを確認した。