

氏名	檜村 友隆		
博士の専攻分野の名称	博士（保健科学）		
学位授与の日付	2013年9月27日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
学位論文題目	水環境中に存在する細菌の新規リアルタイムモニタリングシステム		
論文審査員	主査	教授	園田 徹
	副査	教授	近藤 照義
	副査	教授	吉武 重徳

論文内容の要旨

【はじめに】

現在、透析液製造工程中での微生物学的制御が注目・重要視されている。人工透析治療は、絶えず供給される透析液がその管理ターゲットであり、注射剤などのロット管理とは異なり、いかに迅速にその不具合を検出するかが非常に重要である。しかしながら、細菌検出手法の代表ともいべき培養法は、環境微生物の場合、結果を得るまでに約7日間を要し、決して高精度・高感度な細菌検出法とはいえない。そのため、結果を即座にフィードバックすることができず、安全面に課題が残る。

さらに、環境中に生息する細菌の殆どは通常の培養法による検出が困難であることが知られている。通常の培養で検出可能な細菌は地球上に存在する全細菌の1%にも満たないとされ、培養できない細菌は場合によっては「存在しないもの」として扱われていることになる。今では、圧倒的多数の細菌は「生きているが培養できないもしくは培養困難である(VBNC: Viable but non-culturable)」状態にあるとされ、培養できる状態の細菌のほうがむしろ自然界の例外中の例外であると考えられている。

そこで、迅速・高精度をキーワードに、蛍光染色法を中心に培養操作に依存しない細菌検出法について検討を重ねてきた。その結果、透析液製造工程中には、培養法で検出される細菌の数十倍から数万倍の細菌が生息していることが確認された。しかしながら、既存の迅速・高精度細菌検出法はどの手法をとっても、サンプリングや染色などの前処理操作を除外することができず、透析液など水環境中に存在する細菌をリアルタイムにモニタリングできるシステムは未だ存在しない。人工透析分野をはじめとして、細菌のリアルタイムモニタリングが可能になることによって安全性が向上する分野は計り知れない。

そこで、サンプリング・前処理操作を必要としない細菌のリアルタイムモニタリング装置の開発を行った。

【細菌のリアルタイムモニタリング装置の開発】

1. 装置原理

検出原理は、装置に微粒子を検出するための光学系および生物粒子（細菌）を検出するための光学系の2種類の検出系を搭載し、流水下の試料にレーザーを照射することによって得られる散乱光と、レーザーにより細菌の細胞内リボフラビンを励起させて得られる自家蛍光を検出する。これらの光をダイクロイックミラーを用いて散乱光検出部と蛍光検出部へ分光し、A/D変換を経て計数する。今回開発した装置は、リボフラビンの励起波長と励起力を考慮し、波長405nm、最大出力250mWのUVレーザーを採用した。

2. 散乱光および細菌自家蛍光の検出

散乱光の検出方法は、一般的な液中パーティクルカウンターと同様、光散乱式を用いた。

自家蛍光を持つ細胞は、それぞれに対応した波長で励起させると蛍光を放つ性質があり、生物細胞の多くは自家蛍光を持つことが古くから知られている。生細胞中で自家蛍光を持つものとして、トリプトファン、還元型 Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NADH)、リボフラビン等が知られている。本装置では、細胞内でのエネルギー代謝に関わるリボフラビンに照準を合わせて設計を行った。

3. 検出信号の処理とプログラミング

散乱光をレンズで集光し、光電変換素子によって電気信号へ変換する。こうして得られた電気信号は幅を持ったパルス状の波形となり、パルスの個数を計数することで粒子の個数を知ることができる。また、散乱光強度は粒子径によって変わるため、電気パルスの波高値から粒子の大きさまでも判別することができる。その粒子が生物粒子である場合、リボフラビン励起による蛍光パルスも同時に発生する。

散乱光、自家蛍光パルスともに電気パルスの波高値が設定したスレッショールド値を超えた際に、信号のAD変換を行う。AD変換された信号を Visual Basic により作成したプログラム上で計算、表示させるよう設計した。

【対象・方法および結果】

1. 標準粒子および蛍光粒子を用いた装置の性能評価試験

ガラスビーカーに粒子を含まない超純水を用意し、それぞれの中に標準粒子 (0.254 μm)、および蛍光粒子 (Green、0.20 μm) を混濁させた後、希釈系列を作製した。試料を定速シリンジポンプを用いて流速 10ml/min で装置に導入し、標準粒子数および蛍光粒子数を評価した。

結果、蛍光を発しない標準粒子懸濁試料を測定した場合、蛍光粒子と判定されるものはほとんど無く、ほぼすべてが散乱光のみを発していると判定された。一方、蛍光粒子混濁試料では、ほぼすべてが蛍光を発していると判定された。よって、本装置は蛍光粒子と非蛍光粒子を極めて高精度に分離できることが確認された。また、希釈系列において良好な相関関係が認められた。

2. スパイク試験

供試菌株は標準菌株 (*Escherichia coli* (以下、*E. coli*) (NBRC 3301)、*Staphylococcus aureus* (以下、*S. aureus*) (NBRC 13276)、*Methylobacterium extorquens* (以下、*M. extorquens*) (NBRC 15911)、*Pseudomonas fluorescens* (以下、*P. fluorescens*) (NBRC 15842) の4菌種を用いた。

E. coli、*S. aureus* は SCDA 培地 (SCDA medium) (NIKKEN BIOMEDICAL LABORATORY INC.) に塗抹し、35°C で 24 時間培養した後、それぞれのコロニーを釣菌して 10⁷cfu/mL の濃度になるように生理食塩液中に混濁させた。

M. extorquens、*P. fluorescens* は R2A 培地 (R2A medium) (NIPPON BECTON DICKINSON COMPANY, LTD.) に塗抹し、25°C で 168 時間培養した後、それぞれのコロニーを釣菌して 10⁶cfu/mL の濃度になるように滅菌精製水中に混濁し、25°C で 3 日間静置して飢餓状態にした。

結果、各々の菌液を 10~10³ 個/10ml レベルの濃度に調整した溶液測定では、試作機により計数した蛍光粒子数と培養細菌数との間に良好な相関がみられた (*E. coli*: $y=0.819x+10.923$, $r=0.994$. *S. aureus*: $y=0.755x+4.481$, $r=0.994$. *M. extorquens*: $y=1.456x-2.768$, $r=0.95$. *P. fluorescens*: $y=0.687x+5.858$, $r=0.813$.)。これにより、流水中を浮遊する細菌にレーザー照射を行うことで放出される蛍光を、当該装置が十分に検出可能であることが示された。

3. 環境試料による試験

ガラスビーカーに水道水を入れ、培養細菌数および蛍光顕微鏡下直接計数法 (蛍光染色法) にて計数した細菌数と比較した。

結果、培養細菌数に比べ 1000 倍近い値を示し、蛍光染色法とは近似値を示した。すなわち、VBNC 状態にある細菌を含め検出できることが確認された。

さらに、1~3 すべての検討において同時再現性試験を施行したところ、極めてバラツキが小さいことが確認された。

【おわりに】

細菌の自家蛍光を利用した細菌リアルタイムモニタリング装置の性能は、非常に優れていることが実証実験を通じて確認された。この水環境中に存在する細菌を高精度にリアルタイムモニタリングできる装置は、現在のところ世界初であり唯一無二である。現在、透析液製造工程を含むさまざまな分野への応用展開を図っており、本研究成果は、細菌を高精度かつ迅速に検出する技術を必要とする分野において変革をもたらし、新たな時代を築くものと考えている。

論文審査結果の要旨

1. 論文の内容

紫外線レーザーを光源に用いた蛍光検出機能により、粒子の散乱光と生物粒子内の自家蛍光物質が発生する蛍光を捉え、非生物粒子と生物粒子の判別、および計数ができる。本研究の新規性は、空気中の細菌をこの原理で検出する検討はすでに行われているが、水環境中に存在する細菌を高制度かつ迅速にリアルタイムに検出する装置を世界で初めて開発したことである。汚染度が高い場合は、透析を一時中断するなどの迅速な対応ができる。さらに、液中の生物粒子計数の分野（例えば、食品・飲料水・医療水などのスクリーニング用途など）での応用の可能性がある。

2. 評価

博士課程論文としての新規性に関しては、研究の着想、研究対象の選択、研究方法の選択は正しく、研究の意義は十分に認められる。将来的な応用の可能性も大きい。

学位論文としての妥当性は、論文全体の構成、内容と論旨の一貫性は保たれており、論文検索の妥当性は認められ、氏名・所属・論題・英文抄録・文献の記述に問題はなく、データ処理は適正に行われ、考察は客観的であり、キーワードは適正である。

3. 口頭発表（公聴会）ならびに口頭試問に評価

時間内に発表を終え、図表は見やすく、論文要旨は的確に表現され、研究方法の選択は正しく、質問に対して回答は適切であった。

4. 審査結果

本論文は九州保健福祉大学保健科学研究科博士課程の学位論文にふさわしいと判断する。