

Title	蛍光活性染色法による環境中の微生物の活性評価
Author(s)	山口, 進康
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3155734">https://doi.org/10.11501/3155734</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	山 口 進 康
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 8 5 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 11 年 6 月 14 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 名	蛍光活性染色法による環境中の微生物の活性評価
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 那 須 正 夫 (副査) 教 授 真 弓 忠 範 教 授 宮 本 和 久 教 授 西 原 力

## 論 文 内 容 の 要 旨

19世紀中頃以来百数十年にわたり、微生物学は人類にとって深刻な問題である疾病の解決、また身近な問題である発酵や腐敗現象の解明を主な目的として発展してきた。そして、様々な抗生物質や殺菌消毒剤の発見・開発により、多くの感染症は克服されたかに見えた。しかしながら、抗生物質耐性菌による院内感染症や新興・再興感染症が現在、全世界の人々を脅かしている。のみならず、食生活や生活様式の変化にともない、食品保健分野や住環境において微生物に起因する新たな問題が台頭している。このような問題を未然に防ぎ、被害を最小限に食い止めるためには、原因となる微生物の正確かつ迅速な検出とその環境中における動態の解明が欠かせない。

また、湖沼や河川などの水資源の汚染は生態系の持つ緩衝能力を越えた有機物質、化学物質の放出が大きな原因であるため、水資源のこれ以上の汚染を防ぎ環境を改善していくには、自然が持つ自浄能力のいしづえとなっている環境中の微生物についての理解を深めていく必要がある。

しかしながら、環境中の細菌の多くはこれまでの細菌学で開発されてきた方法では培養が困難であり、培養に依存した方法のみではその十分な解析ができない。そのため微生物学分野では、培養することなく細菌の活性を評価するための新たな手法、また自然環境中の特定の細菌を高感度に検出するための新しい手法の開発が切望されている。

本研究では生理活性を持つ微生物を迅速かつ簡便にシングルセルレベルで検出する手法として蛍光活性染色法を開発し、その微生物学分野への応用を行った。また、新たな蛍光基質である HNPP (2-hydroxy-3-naphthoic acid-2'-phenylanilide phosphate) ならびに Fast Red TR に着目し、特定細菌のより高感度な検出法として HNPP-Fast Red TR in situ ハイブリダイゼーション (HNPP-FISH) 法を検討した。

活性を持つ細菌の検出にあたっては、生細胞内に普遍的に存在する酵素であるエステラーゼの活性、ならびに細菌の持つ呼吸能に着目した。すなわち、細菌の持つエステラーゼ活性の評価には、エステラーゼによって蛍光物質 6-carboxyfluorescein に加水分解される 6-carboxyfluorescein diacetate (6CFDA) を用いた。また呼吸能を持つ細菌の検出には、細胞の電子伝達系において蛍光物質 CTC-formazan に還元される 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC) を用いた。その結果、試料中の生理活性を持つ細菌を 1 時間以内に特異的に検出・計数できるようになり、従

来の培養法では数日要していた生菌の検出をはるかに短時間で行うことが可能になった。さらに、蛍光活性染色法を用いて河川水中の細菌の活性を評価した結果、従来の寒天平板培地培養法では試料水中の生理活性を持つ細菌数を過小評価していたこと、および河川水中の細菌の多くが酵素活性や呼吸能を保持していることがわかった。したがって、一般的な手法では培養が困難である自然環境中の細菌が、その活性をもとに生態系の恒常性の維持や物質循環に深く関与している可能性が示された。

次に、細菌の生理活性をより迅速に解析するために、蛍光活性染色法のフローサイトメトリーへの応用を行った。その結果、1分間に10,000個以上の細菌の解析が可能となり、より短時間で多くの細菌の活性を評価できるようになった。したがって、試料中の生菌の検出にあたり、多検体をより迅速に処理することが可能になった。さらに、本方法を用いて環境の異なる地点から採取した河川水中の細菌を解析したところ、全菌数に占めるエステラーゼ活性を持つ細菌の割合と試料採取地点の有機物濃度に相関性が見られ、この割合が河川の有機物汚染度の生物学的指標として利用できる可能性が示された。

また、特定細菌のより高感度な検出法として、酵素反応により蛍光シグナルを増幅できる HNPP-FISH 法を検討した。その結果、従来の FISH 法に比べて8倍以上蛍光強度を上げることができるようになり、自然環境中の微小な細菌、rRNA 含量の低い細菌をその遺伝情報をもとに特異的に検出できるようになった。

さらに、今回の研究において検討した蛍光染色法を、汚水や排水の処理、また化学物質の生分解試験において微生物源として用いられている活性汚泥の微生物学的評価に応用した。すなわち、蛍光活性染色法を用いて活性汚泥中の細菌の活性を評価するとともに、HNPP-FISH 法を用いて活性汚泥の細菌群集構造の解析を行った。その結果、培養困難な活性汚泥の細菌の多くが高い生理活性を保持していることがわかった。また HNPP-FISH 法を用いることによって、都市下水処理場の活性汚泥では細菌群集構造の50%、標準活性汚泥では40%を解析することができた。今後手法を改良することによって、さらに高い割合で活性汚泥の細菌群集構造を解析できるようになり、これまで難しかった活性汚泥の微生物学的側面からの管理が可能になるものと考えられた。

今回の研究で検討を行った蛍光活性染色法は迅速・簡便に生菌を検出することができる。また HNPP-FISH 法は、従来の方法よりもさらに高感度な特定細菌の検出が可能である。したがって、これまでの微生物学的手法では対処が難しかった医療や食品保健分野、住環境における微生物に起因する問題の解決に大きく寄与するものと期待される。

## 論文審査の結果の要旨

環境中には従来法では培養の難しい微生物が数多く生息することが明らかになり、これら VBNC (viable but not culturable) 状態にある細菌の検出、また活性の迅速かつ簡便な評価法の開発が課題となっている。

そこで申請者は、菌体内エステラーゼを指標に、微生物の生理活性をシングルセルレベルで評価できる蛍光活性染色法に着目し、その環境微生物学分野への応用を検討した。その結果、これまでは数時間から数日要した生菌数測定が1時間以内に短縮できた。さらに、蛍光活性染色した細菌をフローサイトメトリーを用いて解析する系を確立したことにより、10,000個以上の細菌の生理活性を1分間で評価できるようになり、多検体の迅速処理への道を開いた。また、従来の蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法よりも高感度な HNPP-Fast Red TR in situ ハイブリダイゼーション法による細菌の検出を試み、その蛍光強度の8倍以上の増強を実現した結果、自然環境中の微小な細菌、また活性が弱く rRNA 量の少ない細菌をもその rRNA 配列をもとに特異的に検出できることを示した。

以上、蛍光活性染色法ならびに HNPP-Fast Red TR in situ ハイブリダイゼーション法は、生理活性を持つ細菌の迅速かつ簡便な検出、特定細菌の高感度な検出を可能にするものであり、その応用は環境分野にとどまらず、医療、保健、食品等、幅広い分野で期待され、博士(薬学)の学位を授与するにふさわしいと考える。