



Title	フローサイトメトリーによる細菌の活性解析
Author(s)	田中, 康進
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40536">https://hdl.handle.net/11094/40536</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏 名	たなか やすのぶ 田 中 康 進
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 13802 号
学 位 授 与 年 月 日	平成10年3月25日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用薬学専攻
学 位 論 文 名	フローサイトメトリーによる細菌の活性解析
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 那 須 正 夫  (副査) 教 授 山 元 弘 教 授 田 中 慶 一 教 授 本 田 武 司

### 論 文 内 容 の 要 旨

自然環境中の細菌は生態系においてその恒常性の維持に重要な役割を果たすとともに、物質循環の主要な担い手として地球環境を創生し、またその修復に大きく貢献している。しかしながら生態系の持つ緩衝能力を越えた過度な経済活動は、地球環境に大きな負荷を与え、様々な環境問題を引き起こした。環境問題の解決のためには、まず生態系に関する十分な知見を得る必要があり、そのためには環境中の細菌についての理解が必須である。なかでもその現存量や生理状態に関する知見はもっとも基礎となるものである。

しかしながら自然界に存在する細菌の多くは生きてはいるが培養することができない (Viable But Non-Culturable: VBNC) 状態にあり、例えば河川水中の多数の細菌が寒天平板培地上にコロニーを形成しないにもかかわらず酵素活性や呼吸活性を有することが明らかとなっている。したがって VBNC の状態にある細菌を解析するにあたっては、培養操作に依存することなく、シングルセルレベルで取り扱う必要がある。細菌のシングルセルレベルでの解析には蛍光顕微鏡が一般的に用いられるが、多数の細胞の迅速な解析には困難を伴う。また特定の細菌を分離して、さらに詳細な検討を行うことは難しい。そこで本研究では、これらの問題点を克服するために、フローサイトメトリーを自然環境中の特定細菌の検出および活性評価に応用した。

まずフローサイトメトリーと蛍光抗体法を組み合わせ、迅速かつ簡便な特定細菌の検出系を開発した。さらにその検出限界についても検討したところ、標的とする細菌が  $10^3$  cells/ml 以上存在する場合に検出が可能であった。また  $10^4$  の細胞の解析に要する時間は5分以下であり、蛍光顕微鏡による観察よりも迅速さにおいて優れていた。したがって本法は食品や水などの日常的な衛生管理を迅速に行うために有用であると考えられた。

生態系における恒常性の維持や物質循環には活性を有する細菌がより深く関与していると考えられるため、活性を有する細菌を解析することにより生態系への理解が深まるものと期待される。そこで次に細胞内エステラーゼ活性に着目し、特定細菌の活性評価系を開発した。エステラーゼ活性の評価にあたっては、6-carboxyfluorescein diacetate (6 CFDA) と propidium iodide (PI) による二重染色法とセルソーティングにより、エステラーゼ活性の有無にもとづいて細菌を2つの画分に分離した。さらに得られた画分から、目的とする細菌を検出することにより、特定細菌のエステラーゼ活性を評価できた。

細菌の生理状態の解析には、エステラーゼ活性以外の指標についても検討が必要である。そこで細菌の生存の指標となる増殖能に着目し、Direct Viable Counting (DVC) 法とフローサイトメトリーによる特定細菌の増殖能の評価

系を開発した。今回開発したこれらの活性評価系により、環境と特定細菌の活性について詳細に解析できるようになると期待される。また環境中での病原細菌の分布および動態解析、また Bioremediation における特定細菌の活性評価など、幅広い分野への実用的な応用が可能であると考えられた。

VBNC の状態にある病原細菌においても、感染症の原因となる可能性が示されていることから、今回開発した解析系を用いて、河川水中の *Escherichia coli* O157 : H7 の現存量およびその生理状態について解析を行った。まず大阪府内を流れる寝屋川の2地点より河川水を採取し、*E. coli* O157 : H7 の現存量を求めたところ、 $10^3$  cells/ml から  $10^4$  cells/ml という比較的高い値であることがわかった。また河川水を培養した試料についても検討を行ったところ、増殖能を有する *E. coli* O157 : H7 が存在することも明らかとなった。現在、*E. coli* O157 による感染症の流行において、その培養による単離が困難であるため感染経路の特定に支障をきたしている。本研究により *E. coli* O157 : H7 の河川における常在性が明らかとなったことから、それらの河川水中での生理状態について詳細な解析が必要であると考えられた。

そこで大阪府内を流れる安威川より河川水を採取し、河川水中の *E. coli* O157 : H7 の生理活性の評価を行った。6 CFDA - PI 二重染色法とセルソーティングの組み合わせにより分離したエステラーゼ活性を有する細菌の画分には、*E. coli* O157 : H7 が存在したのに対し、エステラーゼ活性の無い細菌の画分からは検出されなかった。したがって河川水中に *E. coli* O157 : H7 がエステラーゼ活性を有する状態で存在することが明らかとなった。

また安威川の河川水中の *E. coli* O157 : H7 について、その増殖能を DVC 法により評価した。DVC 法による培養で増殖能を有する細菌の細胞サイズおよび核酸含量が増加することを確認し、増殖能を有する細菌と有しない細菌の画分それぞれから *E. coli* O157 : H7 の検出を行ったところ、前者の画分のみにその存在を認めた。したがって河川水中の *E. coli* O157 : H7 が増殖能を持ち、周辺環境の変化に伴って増殖を開始する可能性を有するものと考えられた。

以上の結果より、河川水中の *E. coli* O157 : H7 がエステラーゼ活性および増殖能を有することが明らかとなった。したがってこれら河川水中に存在する *E. coli* O157 : H7 のヒトへの感染性について、詳細な研究が必要であると考えられる。またその発生源や生存様式、動態についてのさらなる知見も重要である。病原細菌の環境中での生態に関する深い理解が、今後、感染症予防のための新たな道を拓くものと期待される。

## 論文審査の結果の要旨

自然環境中に存在する細菌は生態系の恒常性に重要な役割を果たしていることから、そのさらなる理解は環境問題の解決に大きく寄与するものと期待される。しかしながら環境中の細菌の多くは、通常の培養法では培養が困難な状態にあることが知られている。そこで申請者は培養を伴わないシングルセルレベルでの解析系としてフローサイトメトリーと蛍光抗体法に着目し、特定細菌の迅速かつ簡便な検出、および生理活性評価のための解析系を開発した。その結果、フローサイトメトリーは迅速かつ簡便な特定細菌の検出に有効であり、従来法である蛍光顕微鏡観察にはない利点を有することが明らかとなった。また蛍光活性染色法とセルソーティングを組み合わせることにより、細菌の細胞内エステラーゼ活性を指標とした生理活性評価を可能にし、さらに特定細菌の増殖能を Direct Viable Counting 法と蛍光抗体法により迅速かつ簡便に評価できることを示した。

以上の解析系により河川環境中の *Escherichia coli* O157 : H7 の現存量および生理状態について解析を行い、*E. coli* O157 : H7 が大阪府下の河川水中に常在していることを示した。また河川水中の *E. coli* O157 : H7 が、エステラーゼ活性および増殖能を有する状態で存在することを明らかにした。本研究は自然環境中の細菌の生理活性を評価するために必要な手法およびその応用例を提示するものであり、その成果は生態系のより深い理解や感染症の予防に新たな道を拓くものと期待される。したがって博士（薬学）の学位を授与するにふさわしいと考える。