



Title	蛍光多重活性染色法による生菌自動計数システムの開発
Author(s)	小川, 優洋
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43359
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	小川倫洋
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第16969号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科生命情報環境科学専攻
学位論文名	蛍光多重活性染色法による生菌自動計数システムの開発
論文審査委員	(主査) 教授 那須正夫 (副査) 教授 高木達也 教授 西原力 教授 宮本和久

論文内容の要旨

細菌の現存量の迅速な測定および生理活性の評価は、微生物学の幅広い分野において非常に重要である。細菌数を迅速に測定する手法として、蛍光顕微鏡直接計数法が一般化しつつある。また複数種の染色剤を用いる蛍光多重染色法により、細菌の現存量、生理活性や属種に関する情報を同時に得られるようになった。しかし同一視野を異なる励起光下で繰り返し観察しなければならないため蛍光顕微鏡の取り扱いに熟練する必要があり、しかも計数に時間と労力を必要とする。さらに観察者は主観に基づき細菌を計数するため、結果には個人差が生じやすい。したがって、多重染色に用いた個々の染色剤由来の蛍光を別々にとらえ、迅速、簡便に解析できる手法が必要である。そこで本研究では同一視野の励起波長が異なる蛍光顕微鏡像を一度に解析できるシステムを開発し、生菌や特定細菌を迅速、簡便かつ正確に同時定量できるようにした。なお蛍光顕微鏡像として、カラーCCDカメラを装着した蛍光顕微鏡(対物レンズ倍率40倍)で撮影したUV励起光像およびB励起またはG励起光像(すべて24ビット[RGB各色256階調、0が暗、255が明]BMP形式)を用いた。また蛍光染色剤として二本鎖DNAに結合してUV励起光下で青色蛍光を発する4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)、呼吸活性を標的としB励起およびG励起光下で赤色蛍光を発する5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride(CTC)、およびE.coli O157:H7を標的としB励起光下で緑色蛍光を発するFITC標識抗体を用いた。

蛍光顕微鏡画像を解析し生菌やE.coli O157:H7を正確に計数するにあたっては、まず蛍光を発する粒子を検出し、夾雑物を除去したのちに生菌や特定細菌を区別する必要がある。そこで、まず明るさの情報に基づき画像中の蛍光を発する粒子の座標を決定した。次に、粒子の大きさおよび色情報に基づき細菌と試料中の夾雑物を区別した。面積と短径についてはそれぞれ $15\text{ }\mu\text{m}^2$ 、 $3\text{ }\mu\text{m}$ 、色情報については緑色蛍光強度を青色蛍光強度で割った値が1.16を基準とし、これら3つのうちいずれか1つでも基準を超えたものをすべて夾雑物とした。そしてCTCの蛍光強度に基づき細菌の生理活性を評価し、FITC標識抗E.coli O157:H7抗体の蛍光強度に基づき特定細菌を検出した。これらの検出基準は、それぞれ赤色輝度が50、緑色輝度が30を基準とした。すなわち、蛍光強度が検出基準以上で、かつUV励起光下の同一位置でDAPI由来の蛍光を観察できた細菌はそれぞれ生菌およびE.coli O157:H7である。この基準を設定することで、CTC染色された生理活性を有する細菌やFITC標識蛍光抗体により抗体と結合する特定細菌を正確に計数できるようにした。

またCTC-FITC標識抗体-DAPI三重染色によるE.coli O157:H7の生理活性の評価にあたり、個々の試薬に由来す

る蛍光強度を別々に測定する機能を開発した。FITC の蛍光には緑色輝度の60%の赤色輝度が含まれている。そこで粒子の赤色輝度全体より FITC 由来の赤色輝度を引くことで CTC および FITC に由来する蛍光強度を正確に求めることを可能とした。これを画像解析システムに組み込むことで、蛍光多重活性染色された生菌と *E. coli* O157:H7 をそれぞれの蛍光強度に基づき区別して迅速、簡便かつ正確に計数できるようにした。

次に本システムを河川水および乳製品中の微生物計数に応用した。河川水試料については、日本およびタイの 7 地点で採取し、CTC および DAPI で生菌および全細菌を染色した。また乳製品試料については、*E. coli* O157:H7 と *E. coli* K-12 それぞれの生菌および死菌を添加した高温殺菌牛乳を用いた。乳製品中のたんぱく質や脂質による蛍光への影響を防止するために、酵素と界面活性剤処理で除去したのちに CTC、FITC 標識抗体および DAPI で生菌、*E. coli* O157:H7 および全細菌を染色した。これらの試料中の微生物を画像解析システムと目視で計数し比較したところ、両手法の結果は 1 : 1 の関係にあり本システムと目視の結果は極めて一致した。河川水中の生菌の目視計数には熟練した観察者でも 1 試料あたり 15 分、牛乳中の蛍光多重染色された生菌と *E. coli* O157:H7 の目視計数には 30 分要するのに対し、本システムでは計数時間は数分であり、しかも観察者の計数基準の差を排除できた。今後は多様な試料調製法や蛍光染色法と組み合わせることにより、河川水や牛乳試料のみならず幅広い分野における微生物の迅速な定量への応用が期待できる。またユーザーインターフェースを改良することで、簡単な操作で微生物を計数できるようになると考えられる。

論文審査の結果の要旨

細菌現存量の迅速な測定は細菌学の幅広い分野において重要であり、蛍光顕微鏡を用いる直接計数法は、有力な手法のひとつである。しかしながら、細菌の計数は目視観察により行うため、観察者は蛍光顕微鏡観察に熟練しなければならず、その操作に時間および労力を要することがその普及の妨げとなっている。また計数にあたって観察者はそれぞれの主觀に基づき細菌と夾雜物を区別し計数するため、観察者ごとに結果が異なるという問題があることから、客観的な結果を得られる計数法の開発が切望されている。

本研究で開発したシステムは、蛍光顕微鏡像より蛍光染色された細菌を認識し、その大きさおよび色成分を自動的に解析することにより、菌数を自動的に計数するためのものである。これにより、細菌計数における観測者間の誤差を排除し、客観的な計数結果を得ることができるようにになった。さらに、本システムを蛍光活性染色試料や蛍光抗体染色試料の解析に適応することにより、これまで困難であった生菌や特定細菌の迅速かつ客観的、さらに精度の高い計数が可能となった。

本論文は、細菌の新しい計数法を開発したものであり、その成果は細菌学の基礎および応用分野の進歩に貢献することから、博士（薬学）の学位に値するものと判断する。