

Title	水の衛生微生物管理を目的としたマイクロ流路システムの製作と応用
Author(s)	坂本, 智恵子
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46513
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	坂本 智恵子
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 20258 号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 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	水の衛生微生物管理を目的としたマイクロ流路システムの製作と応用
論文審査委員	(主査) 教授 那須 正夫 (副査) 教授 田中 慶一 教授 高木 達也 教授 本田 武司

論文内容の要旨

我々の社会は河川・湖沼・海洋など多様な水環境と密接な関わりを持っており、これらの水を農業用水や工業用水、生活用水、飲用水として大量に利用している。その一方で、水を介した細菌感染事例は跡を絶たず、水の衛生微生物管理は今日においても我々の安全・安心な生活を確保するための重要な課題となっている。水の衛生微生物管理を適切に行うためには、混在している細菌を迅速・簡便かつ高精度に検出・計数することが重要である。現在、水試料中の細菌の現存量を測定する方法として、1) 寒天平板培養法、2) 蛍光染色した細菌を蛍光顕微鏡下で計数する直接計数法、3) フローサイトメーターにより計数するフローサイトメトリーなどが用いられているが、それぞれ時間・労力・操作性の点で課題が残されている。

近年の微細加工技術の発展に伴い、化学・生化学分野をはじめ様々な分野における分析が数 cm 四方のマイクロチップ上で行うことが可能となっており、このマイクロチップ上の微小流路を用いて試料を解析する装置(マイクロ流路デバイス)が多数開発されてきている。マイクロ流路デバイスを用いた解析の特徴は、1) 迅速、2) 試料や試薬の消費量が少ない、3) チップが閉鎖系であるためバイオハザードの危険性が軽減される、4) 装置が小さく広い場所を必要としない、5) 複数の実験操作を同一のチップ上に集積させ並列化できる、などにある。そこで本研究では、水の適切な衛生微生物管理を目的とし、マイクロ流路デバイスを用いた細菌の計数システム(マイクロ流路システム)を製作した。そして、迅速・簡便かつ高精度な細菌数測定法としての有効性を評価した。

マイクロ流路システムを製作するにあたり、第一章では市販されているマイクロ流路デバイスを用いて細菌数計測における実用性を評価した。本デバイスを用いて標準菌株ならびに河川水中の細菌の現存量を測定した結果、マイクロ流路デバイスは従来法である蛍光顕微鏡計数より迅速かつ簡便に計数できることを示した。また、精度に関しては蛍光顕微鏡と同等であり、マイクロ流路デバイスは細菌の現存量測定における迅速・簡便化に有効であると考えられた。しかしながら、市販デバイスは細菌数の多い河川水には適用可能であったが、細菌数の少ない水では定量限界以下となり適用が困難であることが分かった。水の衛生微生物管理においては、飲用水など細菌数の比較的少ない水を対象とすることは必須であり、このような水に適用できる方法が必要であると考えた。

そこで第二章では定量限界を向上させたマイクロ流路システムを製作し、細菌数の少ない水に存在する細菌の現存量測定を試みた。マイクロ流路システムの製作にあたって、十字型の流路をもつマイクロチップを新たに作製した。細菌の計数においては、蛍光顕微鏡に設置したカラー CCD カメラを用いてマイクロチップの流路内を撮影し、一定

時間内に観察された細菌を計数した。標準菌株を用いて計数した結果、本システムの適用範囲は 10^4 – 10^6 cells ml⁻¹ であることが分かった。さらにナチュラルミネラルウォーターや水道水など飲用水中の細菌の現存量測定にも応用できることを示した。また、本システムの測定に要する時間は 10 分以内であり、染色操作を除く前処理を必要としないことから、迅速性および簡便性が高い計数方法であることを示した。さらに、マイクロチップの素材である PDMS は安価な材料であり、また大量生産が容易なことから、水の衛生微生物管理においては低コストかつ使い捨て可能なデバイスとして普及させることが容易になると考えられた。

衛生微生物管理においてマイクロ流路システムを一般化させるためには、実験操作の自動化が非常に重要になると考える。そこで第三章では、チップ内で染色操作を行うための集積型マイクロ流路デバイスを作製し、染色操作の自動化を試みた。標準菌株を試料として検討を行った結果、集積型マイクロ流路デバイスの流路内において染色が適切に行われており、本デバイスを用いることによりマイクロ流路システムにおける染色操作の自動化が可能となることを示した。染色の自動化により、採取した試料中の細菌をただちに計数することが可能となり、試料調製のための時間と労力を削減することにつながる。

1990 年代、Manz らによってマイクロ TAS (Total Analysis Systems) の概念が提唱された。マイクロ TAS とは様々なデバイスを一枚のマイクロチップに集積することにより、一連の解析を実現するシステムであり、マイクロ流路デバイスを用いた解析の最終目標である。マイクロデバイスは一つの解析システムが微小であるため、一枚のマイクロチップ上に集積化することが原理上可能である。そこで、本研究で製作したマイクロ流路システムに関しても、染色操作のみならず様々なデバイスと集積させることによりマイクロ TAS に発展させることが期待できる。また、分散、濃縮、混合など、前処理を行うためのマイクロデバイスも多数報告されてきている。本研究では分散や濃縮などの前処理を行わないシステムを製作したが、今後は目的に応じて上記の前処理方法を集積化させることも可能である。以上のことから、細菌数計測を目的としたマイクロ流路システムはさらに発展する可能性が高く、今後、水の衛生微生物管理を行う上で重要な手法になると期待できる。

論文審査の結果の要旨

淡水は我々の生存基盤であるとともに、産業の基盤である。しかしながら、途上国はもちろんのこと、先進国においても淡水中の微生物が原因となる問題は、依然として減少していない。例えば、ミネラルウォーターは製造が容易なことから、我が国の多くの地域で企業規模の大小を問わず製造・販売されているが、微生物管理の不十分な製品の流通が、食への不信感を深める原因の一つとなっている。そこで淡水中の細菌を迅速かつ高精度に検出・計数するための手法が切望されている。

本研究は、水の衛生微生物管理を目的として、数 cm 四方のチップ上の微小流路に試料を流し、細菌数を迅速・簡便かつ安全に測定する「マイクロ流路システム」を作製し、飲用水中の細菌数測定に応用したものである。まず市販のマイクロ流路デバイスを用いて、標準菌株および河川水を用いて細菌数計測における実用性を確認した。その結果をふまえて、マイクロ流路システムを新たに製作し、蛍光顕微鏡法で得られる結果と比較することにより、その実用性を考察した。製作したマイクロ流路システムは、 10^4 – 10^6 cells/mL の細菌数の試料に対して適用が可能であり、ナチュラルミネラルウォーターや浄水器を通した飲用水の細菌数を迅速に測定できることを示した。さらに、チップのデザインを改良することにより、試料中の細菌の染色を自動化できることを示した。

本研究は、水の衛生微生物管理手法の新たな方向性を示した先駆的な研究であり、その成果は今後ますます需要が増大する淡水資源の安全・安心を保証するための基盤となり得ることから、博士(薬学)の学位に値するものと判断する。