

P-125

ポスター発表

Auramine O-CTC 二重染色法による呼吸活性をもつ抗酸菌の迅速検出

○一條 知昭、和泉 陽子、山口 進康、那須 正夫

阪大院薬

Key words : nontuberculous mycobacteria, respiratory activity, acid fast bacilli staining, vitalstaining

【目的】非結核性抗酸菌症の患者数は 1990 年代以降、先進国を中心に世界中で増加している。非結核性抗酸菌 (Nontuberculous *Mycobacteria*; NTM) のヒトへの感染は水環境からの暴露によるものと考えられつつあるが、水環境中の非結核性抗酸菌を高精度に検出するための手法が限られているため、NTM の環境内動態は不明である。そこで本研究では、生理活性をもつ抗酸菌を迅速かつ定量的に検出し、NTM の環境内動態を明らかにするための手法として、抗酸菌染色と蛍光活性染色の併用法 (Auramine O-CTC 二重染色法) を検討した。【方法】非結核性抗酸菌 (*Mycobacterium abscessus*, *M. goodii*, *M. smegmatis*) を、細菌の呼吸活性の指示薬である CTC (5-cyano-2,3-dimethyltetrazolium chloride) で染色後、Auramine O (Scientific Device Lab.) で染色し、蛍光顕微鏡下 (青色励起光) で観察した。【結果および考察】Auramine O-CTC 二重染色においては、Auramine O 染色時に使用するアルコールによる CTC formazan の溶出、また Auramine O と CTC を併用する場合 FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) による Auramine O 由来の蛍光の消失が懸念された。そこで、非結核性抗酸菌を使用して Auramine O-CTC 染色条件の最適化を行った。次に、本手法の特異性を評価するため、*Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* を染色したところ、Auramine O 由来の蛍光は観察されず、CTC formazan 由来の蛍光のみを発していた。また、本手法により 90 分以内に結果を得ることが可能であった。すなわち、本染色法は呼吸活性を有する抗酸菌を迅速かつ定量的に検出する手法として有効であり、非結核性抗酸菌の環境内動態を理解する上で有効である。

* 本研究は科学研究費補助金・基盤研究 (A) 20249007 により行った。

ichijo@phs.osaka-u.ac.jp

P-126 の要旨は 2C-4 をご覧ください。

P-127

ポスター発表

実環境での土壌生態系影響評価技術の開発

○三ツ橋 恭平¹、茂野 俊也²、野村 暢彦¹、内山 裕夫¹、中島 敏明¹¹筑波大院生命環境、²つくば微研

Key words : Metagenomics, 16S rDNA, T-RFLP

近年、工業化が進むにつれて石油をはじめ、様々な化学物質が環境中に排出されることによる環境汚染が大きな問題となっている。現在、その環境修復に微生物を活用するため、バイオレメディエーションや、化学物質による土壌生態系への影響を評価する研究が進められている。その手法として、培養を介さずに抽出した DNA (メタゲノム) から環境中の微生物生態系全体を解析することが行われている。しかし、設定した擬似的環境条件下で得られた結果が、実環境中の生態系でも再現されることは稀である。一方で、実環境中で汚染物質を人為的に土壌に散布する際は、広大な土地が必要となり、環境への負荷も問題視される。本研究では、実環境中で化学物質や石油などが土壌生態系に与える影響を解析するために、多孔質構造素材で作成した鏝 (やじり) に試料を染み込ませ、土壌に埋設し、それを回収した。この方法により、環境へ負荷をかけず、実環境中の同じ条件下で、各試料が与える土壌生態系への影響を評価できると想定し、その鏝から抽出した DNA を対象に実環境中での土壌生態系への影響評価を目的とした。前回大会では、多孔質構造素材を用いることで、試料により時間は異なるが、鏝中の微生物叢が変化することを報告した。しかし、土壌と同様の微生物叢を形成するまで 2 カ月と長期間を要していた。そのため、日本の代表的な土壌 3 種類 (褐色森林土壌、黒ボク土壌、灰色低地土壌) に対して、埋設前に土壌懸濁液を揉み込む処理の有無によって、短期間で土壌同様の微生物叢を形成するか検討した。その結果、土壌懸濁液を揉み込むことで、土壌と同様の微生物叢を形成するまでの期間が飛躍的に短縮することが示唆された。

s0821106@u.tsukuba.ac.jp