

蛍光染色による生菌数の迅速検出法の検討～Milliflex Quantum システムを用いて～

(医)昇陽会 阿佐谷すずき診療所

伊林由喜、山本乃之、大田亜葵子、成海八重子、三浦 明、鈴木 敦、宮下美恵、鈴木恵子、鈴木利昭

[目的]

透析施設が透析液の清浄化に取り組むことは必須であり、透析液の品質管理において微生物試験は重要な役割を担っている。しかし、通常の生菌培養法は、結果が判明するまでに約 7 日間の培養を要する。近年、結果が判明するまでの時間を短縮する迅速微生物検出法が注目されている。今回、メルク社製 Milliflex Quantum システム(以下、MQ システム)を使用した蛍光染色による生菌数の迅速検出法について検討したので報告する。

[システム概要]

MQシステムの外観を図1に示す。特徴としては、非破壊的な方法でいずれの同定技術によっても生菌の同定が可能であり、簡便なシステムで操作法が単純なためトレーニングがほとんど不要である。そして、公定法(培養法)と同様の結果が得られ、バリデーションまでの時間が短く(通常の約1/3)できるので、早期に検出することが可能である。

測定法は、コロニー形成の初期段階であるマイクロコロニーを計数する「マイクロコロニー法」を採用している。蛍光染色原理は、メンブラン上に保持された生育・培養可能な微生物中の酵素と特異的に反応する試薬を加えることで微生物の代謝活性が進み、酵素が切断され、細胞質中から蛍光色素が放出し、細胞内に蓄積し染色される(図2)。



図1 MQ システム概要

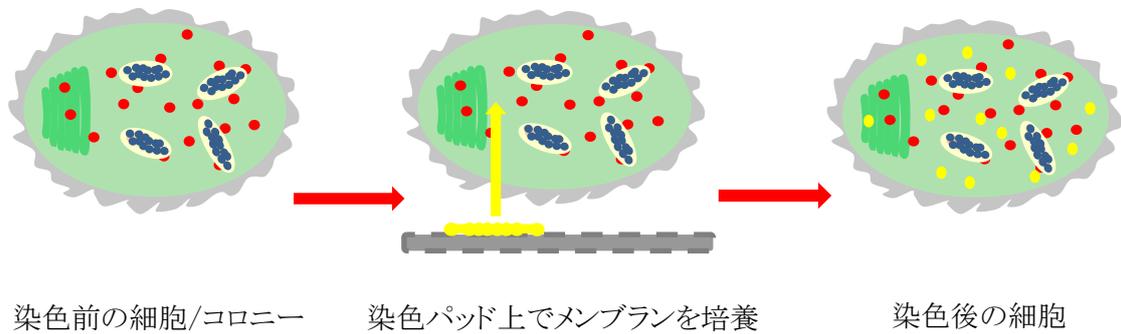


図2 蛍光染色の原理

[MQ システムの測定手順]

- ① ミリフレックスシステムによるメンブランフィルター法にて、検体を通常約 1/3 の日数で培養する(R2A 培地、30°C)。
- ② 培地とフィルターを分離し、ポンプに染色パッドを乗せ、蛍光試薬を 2cc 注入する。ポンプを用い分離したフィルターとパッドとを密着させる。
- ③ 20~30°C、15~30 分間培養後、専用リーダーにセットする。リーダー内で蛍光色素の励起波長を細胞に照射し発色させる。付属の CCD カメラで画像を撮影し、専用のアプリケーションをインストールした PC の画面上にてコロニーを計数する (図 3)。

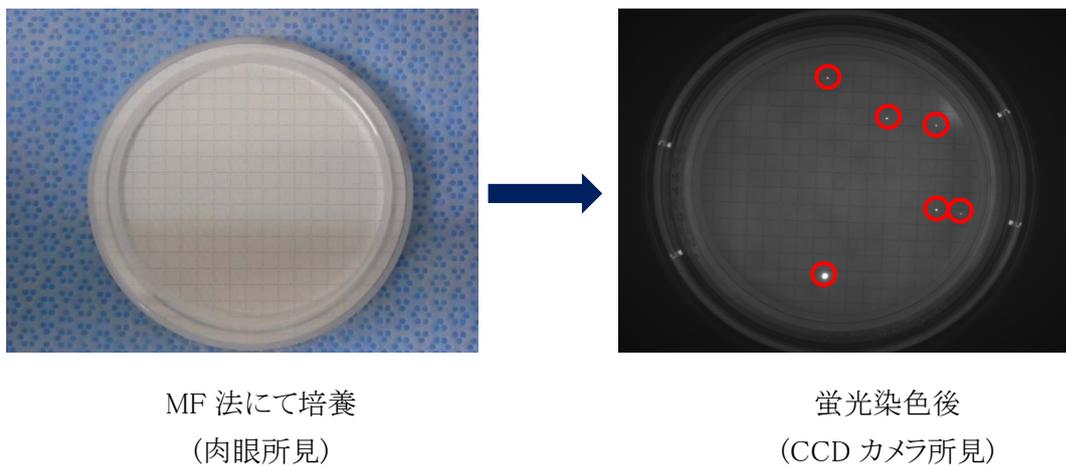


図3 測定結果の例(透析液)

[結果]

実際に当院の透析液とRO水の測定結果を表1に示す。透析液①は、72時間培養後の目視計数が0cfuであるのに対し、MQシステムのCCDカメラ画像による計数が3cfuであった。蛍光染色での解析後、さらに96時間の再培養後、すなわち初回培養から168時間後の目視計数が6cfuであった。同様に、透析液②では目視計数が0cfu、画像下計数が7cfu、再培養後の目視計数が8cfuであった。

RO水①は、72時間培養後の目視計数が0cfuであるのに対し、MQシステムのCCDカメラ画像による計数が0cfuであった。蛍光染色での解析後、さらに96時間の再培養後の目視計数が2cfuであった。同様に、RO水②では目視計数が3cfu、画像下計数が8cfu、再培養後の目視計数が9cfuであった。

72時間培養後を目視と蛍光染色した結果を比較したところ、目視では確認できなかったマイクロコロニーの存在を認めた。また、蛍光染色した72時間後と再培養後の結果とを比較したが大差はなかった。

	72hr		再培養(96hr) (初回培養から168hr)
	目視 _(cfu)	CCD _(cfu)	目視 _(cfu)
透析液① ※(50ml)	0	3	6
透析液② ※(50ml)	0	7	8
RO水① ※(50ml)	0	0	2
RO水② ※(50ml)	3	8	9

表1 測定結果

※サンプリング量

[考察]

従来の培養法では、目視で確認出来るコロニー形成まで約7日間の培養時間を要したが、MQシステムによる測定結果から透析液およびRO水中において目視で確認出来ないマイクロコロニーに対して、蛍光染色することで、従来の約1/3の培養時間で確認することが出来た。

以上により、MQシステムは増殖能力をもつ生菌に対し、迅速かつ高精度にマイクロコロニーを検出することができ、従来法と比較しても同精度かつ短時間での判定が可能と考えられたため、水質管理の評価において有効なツールであると考えられた。

さらに、MQ システムは蛍光染色から解析までの一連の操作が簡便であり、解析においてはCCDカメラ画像をPCに取り込み専用のアプリケーション上でコロニーを計数出来るので、操作者が変わっても安定した結果が得られると考えられた。

[結語]

MQ システムによる迅速微生物検出法は、生菌数を短時間で安定した結果が得られ、透析液およびRO水の水質管理において有用であると考えられた。