マイクロ流路システムによる 水環境中の病原性微生物のリアルタイム・ オンサイト・モニタリング

> 大阪大学大学院薬学研究科 衛生・微生物学分野 山口 進康

琵琶湖・淀川流域:近畿の水源;

身近な親水空間=住民の癒いの場

レジャー・ブーム、アウトドア・ブーム → 湖岸や河川敷でウォーターアクティビティを楽しむ人も増加





-方、海外では湖での遊泳中に病原性大腸菌O157に感染した報告がある

W. E. Keene, et al.: A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella Sonnei*.

N. Engl. J. Med., **331**: 579-584 (1994)

D. Ackman, et al.: Swimming-associated haemorrhagic colitis due to *Escherichia coli*O157:H7 infection: evidence of prolonged contamination of a fresh water lake. *Epidemiol. Infect.*, **119:** 1-8 (1997)

 \downarrow

親水空間における衛生微生物学的安全性の確保はますます重要に

リアルタイム・オンサイト・微生物モニタリング

培養法:

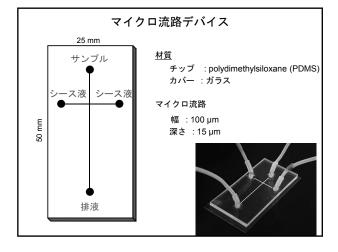
- 簡便=広く普及
- 結果を得るまでに数日を要する
- 環境中の微生物数を過小評価
- → 環境中の微生物を捉えるには培養に依存しない方法が重要

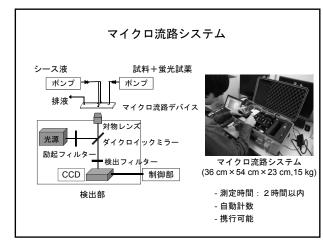
平板培養法

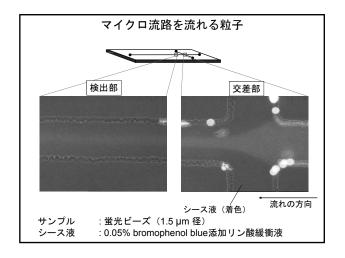
培養に依存しない新手法:

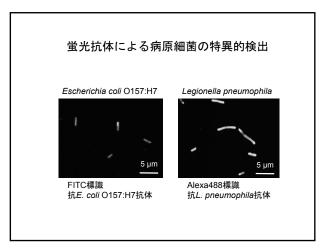
- 微生物を可視化(蛍光染色法等);
 - 遺伝子を解析(PCR、クローンライブラリー等)
- 数時間以内に結果を得ることが可能
- 画像解析や自動システムによる定量性の向上

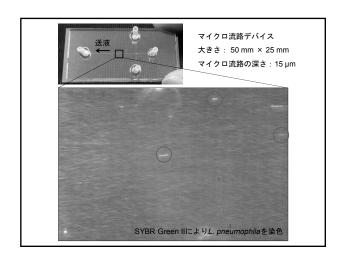


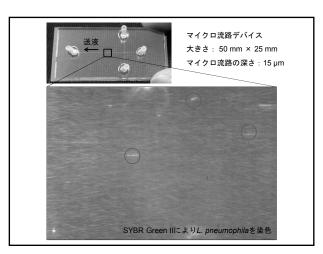


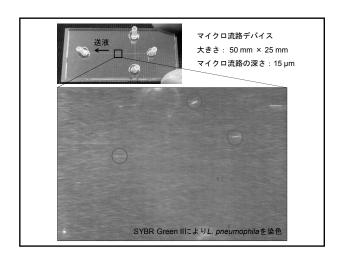


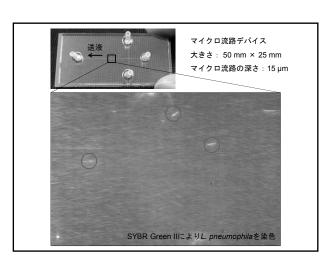


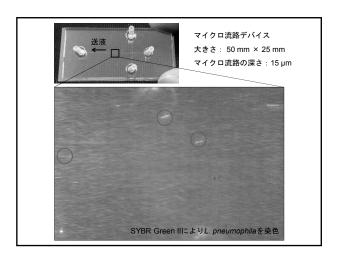














定量的PCRによる琵琶湖の大腸菌数 およびレジオネラ数の測定



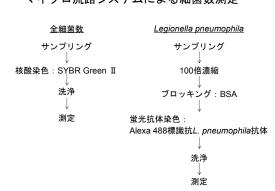
	北湖	南湖
大腸菌数	10 ¹ ~10 ³	10 ¹ ~10 ³
レジオネラ数	10 ¹ ~10 ²	10 ¹ ~10 ²
		cells/mL

* 大腸菌およびレジオネラの16S rRNAの 特異的な配列を増幅

→ 携行型マイクロ流路システムの定量限界が104 cells/mLであることを確認

=100~1,000倍濃縮することにより、大腸菌数やレジオネラ数の測定が可能と判断

マイクロ流路システムによる細菌数測定



マイクロ流路システムによる自然湧出泉および 河川水中のレジオネラ数の測定







湧出泉

泉水と河川水の合流部の水溜り

河川

	Total bacteria	Legionella pneumophila
湧出泉	<1.0 × 10 ⁴	<1.0 × 10 ²
水溜り	2.1×10^{5}	5.2×10^{2}
河川	4.0×10^{6}	<1.0 × 10 ²

cells/mL

(採水:2013年2月21日)

結論

- 1. 試料水の濃縮等を行うことにより、マイクロ流路システムを用いて水環境中の 全細菌数および病原細菌数を簡便に測定できることがわかった。
- 2. 測定に要する時間は、全細菌数測定で約1時間、病原細菌数の測定で約2時間 であり、培養法では数日を要することと比較して、ほぼリアルタイムに結果を 得ることが可能であった。
- 3. 今後、システムの堅牢性を確認し、必要に応じて電源部等の改良を行うことに より、野外で (on-site) 数時間以内に (real-time) 半自動的に細菌数を測定でき る、すなわち水環境中の細菌のリアルタイム・オンサイト・モニタリングが実現 するものと考えられる。