

# 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

大阪大学薬学研究科 山口 進康

## 1. はじめに

琵琶湖・淀川流域は、水源としてのみではなく、身近な親水空間として、近畿の住民の癒いの場となっている。近年のレジャー・ブーム、アウトドア・ブームとともに、湖岸や河川敷でパーティやウォーターアクティビティを楽しむ人も増えており、今後、さらにその重要性が高くなるものと考えられる。一方、海外では湖での遊泳中に病原性大腸菌 O157 に感染した報告もあり<sup>1,2)</sup>、親水空間における衛生微生物学的安全性の確保は、ますます重要となってきている。

微生物の検出にあたり、細菌学、また細菌数測定を必要とする多くの分野では約 100 年前に確立された「培養法」を基本としてきた。しかしながら、ここ 20 数年の環境微生物学分野の進展により、自然環境中の細菌の 90%以上が通常的手法では培養困難であることが、明らかになっている<sup>3-5)</sup>。すなわち、100 年に及ぶ細菌学の歴史が塗り替えられようとしている。

そこで本研究では、これまで独自に開発・検討してきた新規微生物検出法を応用し、琵琶湖や淀川流域の水環境について、高精度な衛生微生物学的評価を現地 (on-site) でリアルタイムに行うための検討を行った。

培養操作に依存しない微生物検出法は、環境微生物学分野をはじめとして広く用いられつつあり<sup>6-11)</sup>、米国や欧州では公定書にも採用されようとしている。しかし、フローサイトメーターなど解析のための装置が大型かつ高価などの理由により、その普及は限られている。マイクロ流路システムは、1) 結果を数時間以内で得ることができる、2) 測定に必要な試料や試薬の量が少ない (数十マイクロリットル)、3) 閉鎖系デバイスによりバイオハザードのリスクを低減できる、4) 操作が容易かつデータの再現性が高い、5) システムを小型化し携行可能にできる等の特徴を有することから、国内・国外を問わず、分析化学分野や生物学分野への応用が研究されている。微生物検出のためのデバイスについても、世界の様々な研究機関がその有用性に着目している。しかしながら、その設計にあたってはデザインや検出系に独創性が求められるため、世界的に萌芽状態にある。また、大腸菌などの標準株を用いた研究は盛んに進められているものの、環境中 (on-site) で使用できるシステムについては十分な精度をもつものが無い。

今回の研究では、これまでのマイクロ流路システムに関する研究<sup>12-14)</sup>をさらに発展させ、水環境中の病原性微生物数測定のためのリアルタイム・オンサイト・微生物モニタリングシステムの構築を進めた。モニタリングにあたっては、病原性大腸菌 O157 に加え、エアロゾルを介した感染が国内外で社会的な問題となっているレジオネラ (*Legionella*) を対象とした。

## 2. 材料と方法

### 2. 1 サンプルング

## 2. 1. 1 琵琶湖

琵琶湖における大腸菌およびレジオネラの現存量を測定するために、2012年10月1日に北湖（安曇川浜園地）および南湖（長安寺）、2012年11月5日に北湖（安曇川浜園地、安曇川沖中央、外ヶ浜沖中央、宇賀野）、2012年11月9日に南湖（鏡ヶ浜、粟津沖中央、柳ヶ崎沖中央、長安寺）、2013年2月4日に北湖（安曇川沖中央、外ヶ浜沖中央）、2013年2月8日に南湖（粟津沖中央、柳ヶ崎沖中央）で湖水を採取した（図1、図2）。

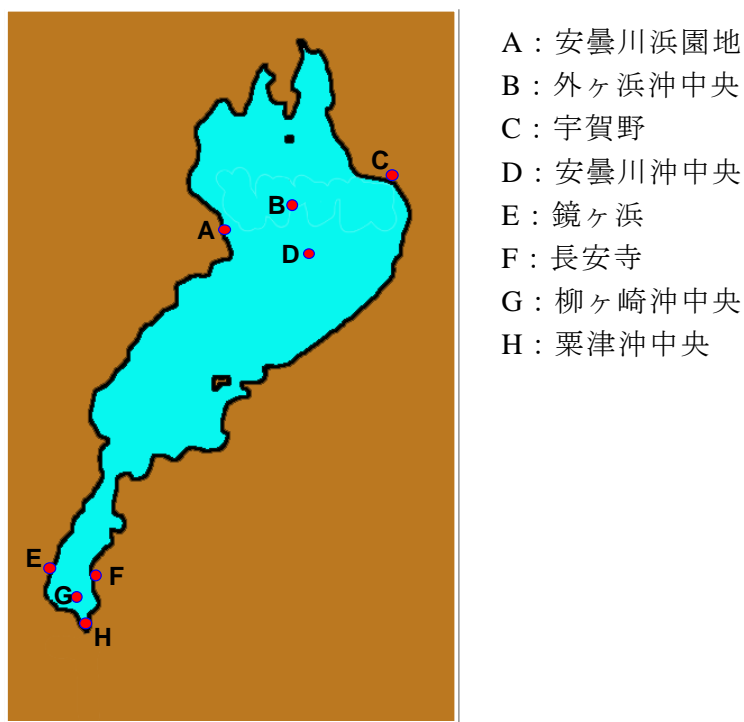


図1 琵琶湖におけるサンプリングポイント



図2 湖水のサンプリング（協力：琵琶湖河川事務所）

## 2. 1. 2 自然河川

マイクロ流路システムを用いた細菌現存量の測定が可能であることを確認するために、これまでの研究でレジオネラの存在が確認されている鹿児島県の自然湧出温泉および河川において、2013年2月21日にサンプリングを行い（図3）、現地の宿泊施設内において、マイクロ流路システムを用いて全細菌数および *Legionella pneumophila* 数を測定した。



自然湧出温泉



温泉水と河川水の合流部の水溜り



河川

図3 自然湧出温泉および河川水のサンプリング

## 2. 2 微生物現存量の測定

### 2. 2. 1 平板培養法

平板培養法による大腸菌数の測定にあたっては、クロモカルトコロIFORM寒天培地を用い、試料水を塗抹後、37℃で24時間培養し、生じた濃紫色のコロニーを計数した。

平板培養法によるレジオネラ数の測定にあたっては、「レジオネラ症防止指針」にしたがって試料水の前処理をした後、WYOα培地に塗抹し、37℃で7日間培養した後に生じた灰白色のコロニーを計数した（図4）。

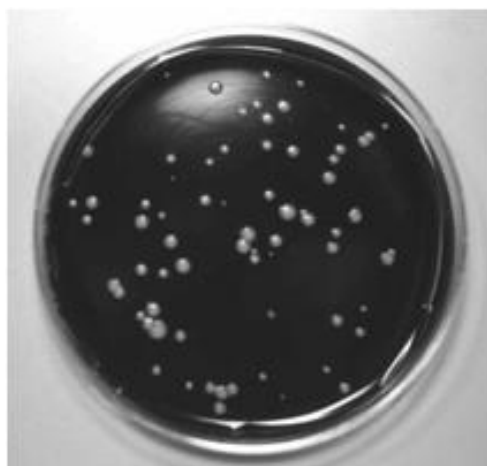


図 4 WYO $\alpha$  培地上に生じたレジオネラのコロニー

### 2. 2. 2 定量的 PCR 法

定量的 PCR 法による標的細菌数の測定にあたり、試料水中の細菌を 0.2  $\mu\text{m}$  孔のフィルター上に捕集した後、DNA を抽出した。大腸菌数およびレジオネラ数の測定のために、各細菌に特異的な 16S rRNA の配列を対象としたプライマーセットを用いた。

### 2. 3 マイクロ流路デバイス

水環境中の病原細菌の検出には、図 5 に示したマイクロ流路デバイスを作製し、使用した (5 cm $\times$ 2.5 cm)。流路の幅は 100  $\mu\text{m}$ 、深さは 15  $\mu\text{m}$  とした。細菌数の測定にあたっては、Inlet A から蛍光染色した細菌試料を導入し、Outlet の方向に流した。サンプル流を整えるために、Inlet B および Inlet C から脱イオン水を流し、シース液とした。

全細菌数は、試料水中の細菌を核酸結合性の蛍光染色剤 SYBR Green II で染色後、Inlet A からマイクロ流路に導入し、マイクロ流路システムで測定した。

*Legionella pneumophila* 数の測定にあたっては、試料水を 100 倍濃縮した後、ウシ血清アルブミンでブロッキングを行い、抗 *Legionella pneumophila* 蛍光抗体で染色後、Inlet A からマイクロ流路に導入した。

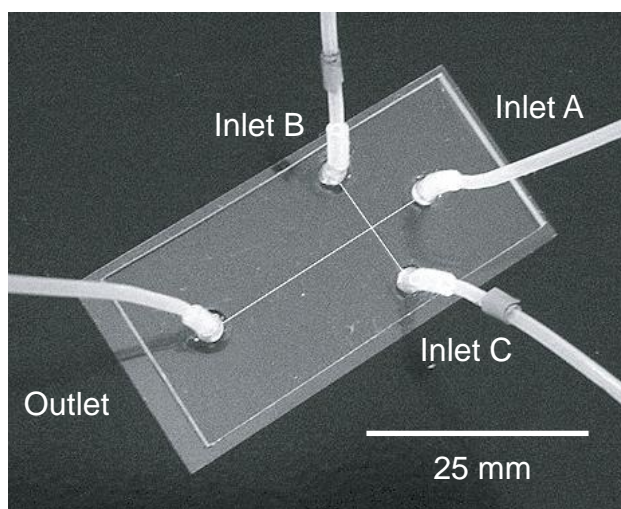


図 5 マイクロ流路デバイス

## 2. 4 マイクロ流路システム

図 6 に今回使用したマイクロ流路システムの概要を示した。本システムは、光源および検出部、送液部およびデータ解析部より構成している。マイクロ流路内を流れる細菌を波長 488 nm の青色光により励起し、CCD により蛍光を検出した後（図 7）、画像解析プログラムを用いて細菌数を自動測定する。システムのサイズは 36 cm × 54 cm × 23 cm、重量は 15 kg であり、スーツケースに収まるサイズであることから、携行可能であることを特長とする（図 8）。

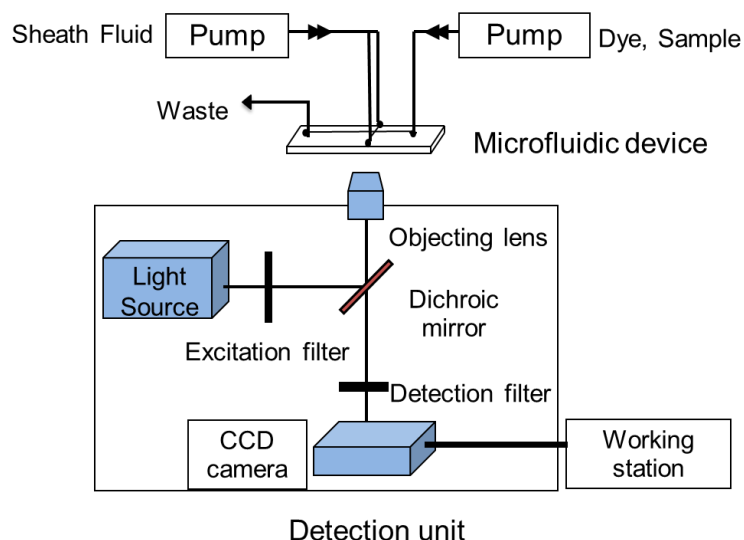


図 6 マイクロ流路システムの構成図

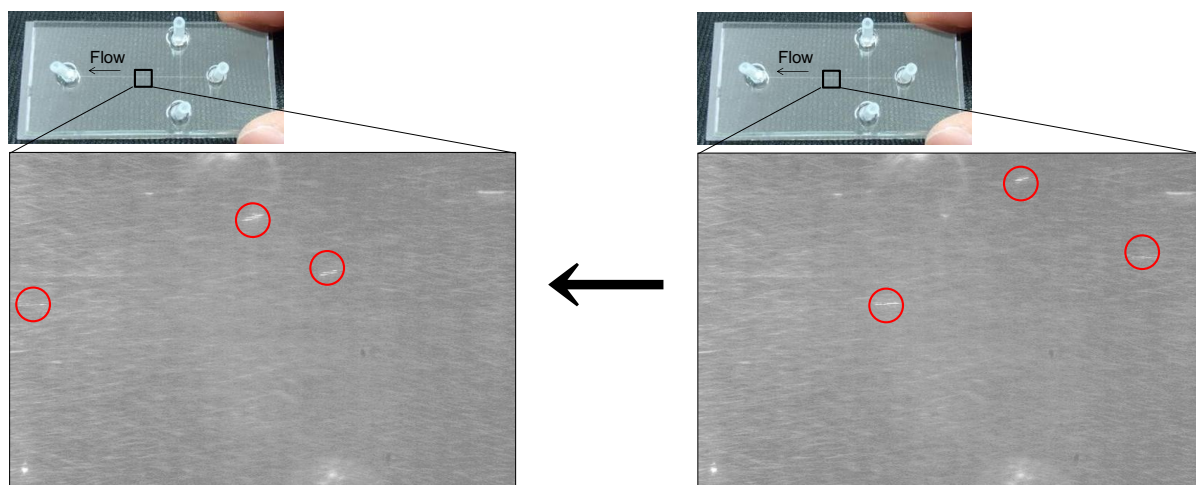


図 7 マイクロ流路内を流れる細菌の検出像（マイクロ流路内を細菌が右から左に流れている）

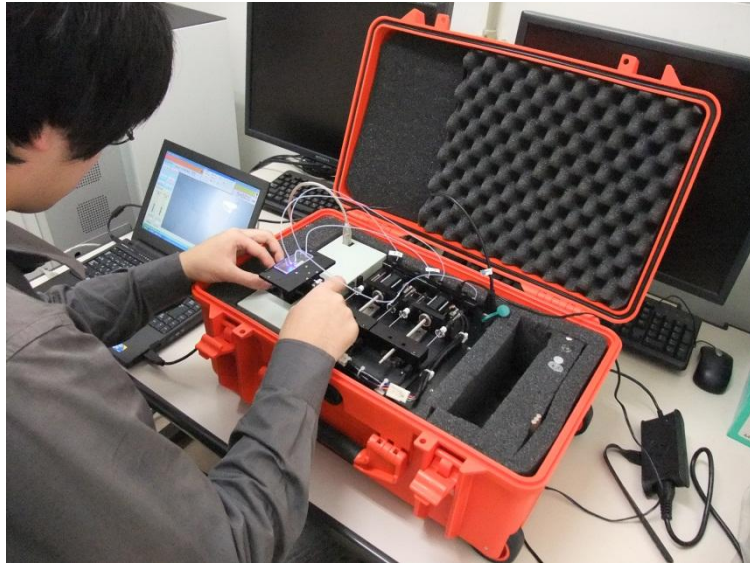


図 8 独自に作製したマイクロ流路システム

### 3. 結果と考察

#### 3. 1 マイクロ流路デバイスの作製

マイクロ流路システムを用いた細菌モニタリングにあたり、あらかじめ蛍光染色した細菌を高精度に計数するための「計数用マイクロ流路デバイス（図 5）」および 1 枚のデバイス上で細菌の蛍光染色と検出が同時に可能な「染色・計数用マイクロ流路デバイス」を作製した。今回の研究では、流速の調整等をより行いやすい「計数用マイクロ流路デバイス」を用いて、マイクロ流路システムの評価を行った。

#### 3. 2 蛍光抗体による病原微生物の特異的検出

蛍光抗体による病原微生物の特異的検出にあたり、検出対象を病原性大腸菌（腸管出血性大腸菌 O157）および *Legionella pneumophila* とした。先述のとおり、腸管出血性大腸菌 O157 は海外において、遊泳中の感染事例があることから、親水空間におけるモニタリングが重要である。*L. pneumophila* はエアロゾルを介してレジオネラ症（レジオネラ肺炎、ポンティアック熱）を引き起こす細菌であり、1976 年に米国で「在郷軍人病」の原因細菌として発見された。欧州では圏内の交通の発展にともなって旅行者感染症として問題になっており、そのサーベイランスが積極的に行われている（European Legionnaires' Disease Surveillance Network [ELDSNet]: <http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/ELDSNet/Pages/Index.aspx>）。

そこで蛍光顕微鏡を用いて、これらの病原細菌を選択的に捉えるための蛍光染色法・標識法を検討した。特に、蛍光抗体法はマイクロ流路内で反応を進めやすいことがこれまでの研究で明らかとなっているため、蛍光抗体の選定を行った。その結果、病原性大腸菌（腸管出血性大腸菌 O157）の特異的な検出には、FITC で蛍光標識された市販の抗 *E. coli* O157:H7 抗体が適していた（図 9）。また、*L. pneumophila* の特異的な検出のために数種の抗体を検討した結果、市販の FITC 標識蛍光抗体よりも、市販の無標識の抗 *L. pneumophila* 抗体を独自に蛍光標識して調製した蛍光抗体が適していることがわかった（図 10）。

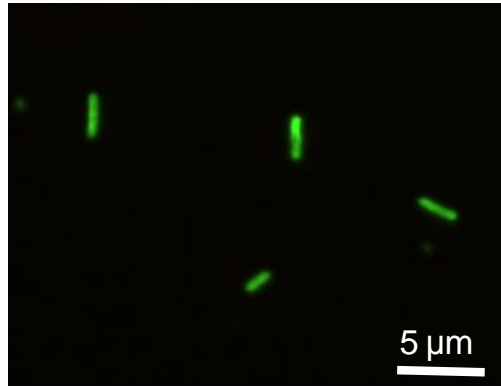


図 9 蛍光抗体による腸管出血性大腸菌 O157 の特異的検出

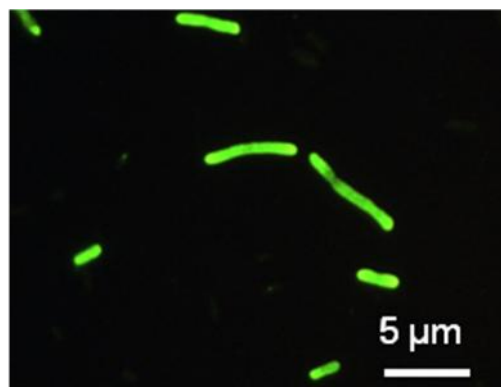


図 10 蛍光抗体による *Legionella pneumophila* の特異的検出

### 3. 3 琵琶湖における大腸菌数およびレジオネラ数の調査

図 1 に示した各地点でサンプリングを行い、琵琶湖湖水中の大腸菌およびレジオネラの現存量を平板培養法および定量的 PCR 法により測定した。その結果、平板培養法ではいずれの地点、時期においてもレジオネラは検出されなかった。大腸菌数は 2012 年 11 月の安曇川沖（北湖）および外ヶ浜沖（北湖）で 0 CFU/mL、安曇川浜園地（北湖）で  $2 \times 10^3$  CFU/mL、宇賀野（北湖）で  $5 \times 10^3$  CFU/mL、栗津沖（南湖）で  $9 \times 10^1$  CFU/mL、柳ヶ崎沖（南湖）で  $1 \times 10^2$  CFU/mL、鏡ヶ浜（南湖）で  $2 \times 10^2$  CFU/mL、長安寺（南湖）で  $2 \times 10^2$  CFU/mL であったのに対し、2013 年 2 月はいずれの地点においても大腸菌数は 0 CFU/mL であった。定量的 PCR により求めたレジオネラ数は北湖と南湖のいずれの地点においても  $10^1 \sim 10^2$  cells/mL、大腸菌数は  $10^1 \sim 10^3$  cells/mL であった。

### 3. 4 マイクロ流路システムを用いたオンサイト・モニタリング

#### 3. 4. 1. マイクロ流路システムによる病原細菌のモニタリング条件の決定

腸管出血性大腸菌 O157 (*E. coli* O157:H7 ATCC43888 株) を用いて、マイクロ流路デバイス上での蛍光抗体染色条件を検討し、抗体濃度を  $4 \mu\text{g/mL}$  と決定した。また、マイクロ流路システムの検出限界が  $10^4$  cells/mL であることを確認した。3.3 で得られた結果と併せて考察した結果、試料水を 100~1,000 倍濃縮することにより、湖水中の大腸菌数やレジオネラ数をマイクロ流路システムで測定できるものと考えられた。

### 3. 4. 2. 自然河川における *Legionella pneumophila* 数の測定

マイクロ流路システムを用いた細菌現存量の測定が可能であることを確認するために、これまでの研究でレジオネラの存在が確認されている鹿児島県の自然湧出温泉および河川においてサンプリングを行い、現地の宿泊施設内で、マイクロ流路システムを用いて *L. pneumophila* 数を測定した。*L. pneumophila* 数の測定にあたっては、3. 4. 1の結果をもとに試料水を 100 倍濃縮した。また、細菌モニタリングにおいては、病原細菌数と同時に全細菌数の変動についても明らかにすることが重要であるため、全細菌数についてもマイクロ流路システムを用いて測定を行った。

その結果、表 1 に示すように、全細菌数は自然湧出温泉（水温 50℃以上）では  $10^4$  cells/mL 以下であったのに対し、温泉水と河川水の合流部の水溜り（水温 30℃）および河川（水温 15℃以下）では  $10^5 \sim 10^6$  cells/mL であった。*L. pneumophila* 数は自然湧出温泉および河川では  $10^2$  cells/mL 以下であったのに対し、温泉水と河川水の合流部の水溜りでは  $5 \times 10^2$  cells/mL であった。この水溜りでは水流が無く、水温が 30℃以上であることからレジオネラが定着しやすい環境であると考えられた。

表 1 マイクロ流路システムにより求めた全細菌数および *L. pneumophila* 数

	Total bacteria	<i>Legionella pneumophila</i>
1	$<1.0 \times 10^4$	$<1.0 \times 10^2$
2	$2.1 \times 10^5$	$5.2 \times 10^2$
3	$4.0 \times 10^6$	$<1.0 \times 10^2$

cells/ml

1. 自然湧出温泉      2. 温泉水と河川水の合流部の水溜り      3. 河川

## 4. まとめ

今回の研究により、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。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。

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。

## 5. 謝辞

琵琶湖におけるサンプリングにあたっては、琵琶湖河川事務所・河川環境課の藤田正晴氏にご協力いただき、水質調査船「湖水守」に乗船して行った。

## 6. 参考文献



1. W. E. Keene, J. M. McAnulty, F. C. Hoesly, L. P. Williams, Jr., K. Hedberg, G. L. Oxman, T. J. Barrett, M. A. Pfaller and D. W. Fleming. A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella Sonnei*. *N. Engl. J. Med.*, **331**: 579-584 (1994)
2. D. Ackman, S. Marks, P. Mack, M. Caldwell, T. Root and G. Birkhead. 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)
3. N. Yamaguchi and M. Nasu. Flow cytometric analysis of bacterial respiratory and enzymatic activity in the natural aquatic environment. *J. Appl. Microbiol.*, **83**: 43-52 (1997)
4. M. Kawai, J. Yamagishi, N. Yamaguchi, K. Tani and M. Nasu. Bacterial population dynamics and community structure in a pharmaceutical manufacturing water supply system by real-time PCR and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Appl. Microbiol.*, **97**: 1123-1131 (2004)
5. N. Yamaguchi, T. Baba, S. Nakagawa, A. Saito and M. Nasu. Rapid monitoring of bacteria in dialysis fluids by fluorescent vital staining and microcolony methods. *Nephrol. Dial. Transplant.*, **22**: 612-616 (2007)
6. N. Yamaguchi, S. Inaoka, K. Tani, T. Kenzaka and Masao Nasu. Detection of specific bacterial cells with 2-hydroxy-3-naphthoic acid-2'-phenylanilide phosphate and Fast Red TR in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 275-278 (1996)
7. N. Yamaguchi, T. Ichijo, M. Ogawa, K. Tani and M. Nasu. Multicolor excitation direct counting of bacteria by fluorescence microscopy with the automated digital image analysis software BACS II. *Bioimages*, **12**: 1-7 (2004)
8. N. Yamaguchi, X. Wang, T. Someya and M. Nasu. Rapid and automated enumeration of viable bacteria in compost using a micro-colony auto counting system. *J. Microbiol. Methods.*, **71**: 1-6 (2007)
9. Y. Motoyama, N. Yamaguchi, M. Matsumoto, N. Kagami, Y. Tani, M. Satake, M. Nasu. Rapid and sensitive detection of viable bacteria in contaminated platelet concentrates using a newly developed bio-imaging system. *Transfusion*, **48**: 2364-2369 (2008)
10. N. Yamaguchi, M. Sasada and M. Nasu. Rapid detection of starved *Escherichia coli* with respiratory activity in potable water by signal-amplified in situ hybridization. following formazan reduction. *Microbes Environ.*, **24**: 286-290 (2009)
11. N. Yamaguchi, K. Tanaka, T. Baba, N. Amano and M. Nasu. Rapid enumeration of low numbers of moulds in tea based drinks using an automated system. *Int. J. Food Microbiol.*, **145**: 365-369 (2011)
12. N. Yamaguchi, C. Sakamoto and M. Nasu. Rapid and simple quantification of bacterial cells using a microfluidic device. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**: 1117-1121 (2005)
13. N. Yamaguchi, C. Sakamoto, M. Yamada, H. Nagase, M. Seki and M. Nasu. Rapid quantification of bacterial cells in potable water using a simplified microfluidic device. *J. Microbiol. Methods*, **68**: 643-647 (2007)
14. N. Yamaguchi, M. Torii, Y. Uebayashi and M. Nasu. Rapid, semiautomated quantification of bacterial cells in freshwater by using a microfluidic device for on-chip staining and counting. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**: 1536-1539 (2011)