

ポータブル・マイクロ流路システムによる水環境中の病原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

1. はじめに

琵琶湖・淀川流域は、水源として、また身近な親水空間として、近畿の住民にとってかけがえのないものである。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、ますますその人数が増え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^{1,2)}、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。その基盤となるのが、微生物モニタリングである。

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。培養法は簡便であり広く普及しているが、ここ 20 数年の環境微生物学分野における研究の進展により、自然環境中の細菌の 90%以上が通常の条件下では培養困難であることが明らかになっている³⁻⁵⁾。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。また、培養法で水環境中の細菌を検出するにあたっては、一般的に 1 週間以上を要するため、より迅速に結果を得るために、培養に依存しない手法による微生物モニタリングが重視されている。

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⁶⁻¹¹⁾、米国や欧州では公定書にも採用されようとしている。特に蛍光染色法は、試料に蛍光試薬を添加するだけの簡便な操作で数十分以内に結果を得ることができるという特長をもつ。蛍光染色した微生物の検出には、一般的に蛍光顕微鏡が用いられている。しかしながら、プレパラートの作製などの煩雑な操作が必要であり、また測定のために試料を研究室に持ち帰る必要がある。

そこで、マイクロ流路システムに着目した。本システムは幅・深さ数十マイクロメートルの微小な流路を刻んだ小型デバイス（マイクロ流路デバイス）を用いて微生物を検出するシステムであり、1) 結果を数時間以内に得ることができる、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) デバイスが低価格である、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、6) 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等の特長を有する。微生物検出のためのマイクロ流路デバイスについては、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¹²⁻¹⁴⁾を発展させ、水環境中の細菌数および病原微生物数測定のための微生物モニタリングシステムの構

築を進めた。特に、マイクロ流路デバイス上で微生物の蛍光染色を行う「on-chip 染色」を行うことにより、リアルタイム・オンサイト・微生物モニタリングに関する研究を進めた。

2. 材料と方法

2. 1 試料

2. 1. 1 標準菌株

供試菌株として、大腸菌 (*Escherichia coli* W3110 株) およびレジオネラ (*Legionella pneumophila* JCM 7571 株) を用いた。大腸菌は LB 培地で一晩、振とう培養した。レジオネラ試料は、本菌を WYO α 培地で約 1 週間培養した後、生じたコロニーを滅菌したリン酸緩衝液 (pH 7.2) に懸濁することにより調製した。

2. 1. 2 湖水

湖水は、琵琶湖 (外ヶ浜沖中央、安曇川沖中央、大津湖岸なぎさ公園) で採取した。琵琶湖中央部におけるサンプリングは、2013 年 5 月 7 日、9 月 2 日および 11 月 5 日に行った。大津湖岸なぎさ公園におけるサンプリングは、2013 年 9 月 25 日に行った (図 1)。細菌数の測定はサンプリング後、12 時間以内に行った。また大津湖岸なぎさ公園で採取した湖水の細菌数測定にあたっては、「水のめぐみ館 ウォーターステーション琵琶」の会議室にポータブル・マイクロ流路システムを持ち込み、現地で測定した (図 2)。



図 1 大津湖岸なぎさ公園におけるサンプリング



図 2 「水のめぐみ館 ウォーターステーション琵琶」での細菌数測定

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、WYO α 培地に塗抹し、37°C で 7 日間培養した後に生じた灰白色のコロニーを分離した。分離株を BCYE - 血液寒天培地に植菌後、BCYE 培地のみで発育したコロニーをレジオネラと判定した。

2. 2. 2 マイクロ流路デバイス

水環境中の細菌の検出には、図 3 に示した on-chip 染色用マイクロ流路デバイスを作製し、使用した (5 cm×2.5 cm)。流路の幅は混合部で 500 μm、検出部で 100 μm とし、深さは 15 μm とした。細菌数の測定にあたっては、Inlet A から試料を、Inlet B から蛍光試薬を導入し、Outlet の方向に流した。試料中の細菌を混合部において蛍光試薬により染色し、検出部で計数した。サンプル流を整えるために、Inlet C および Inlet D から脱イオン水を流し、シース液とした (図 4)。

全細菌数の測定には、核酸結合性の蛍光試薬 SYBR Green II を用いた。*Legionella pneumophila* 数の測定にあたっては、抗 *L. pneumophila* 蛍光抗体を用いた。なお、前年度の検討結果をふまえ、市販の無標識の抗 *L. pneumophila* 抗体を独自に蛍光標識することにより、蛍光抗体を調製した。

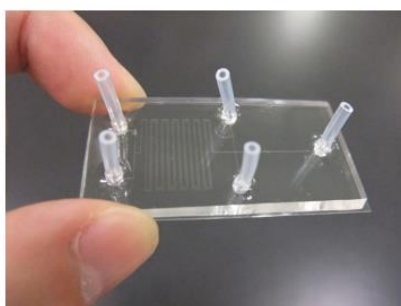
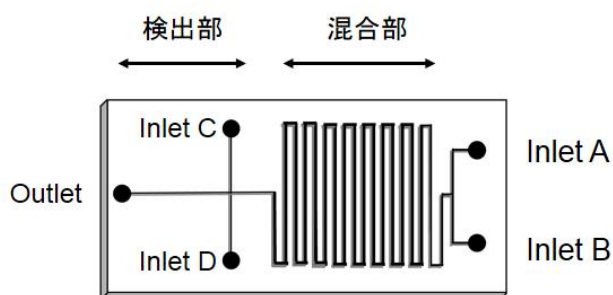


図 3 on-chip 染色用マイクロ流路デバイス

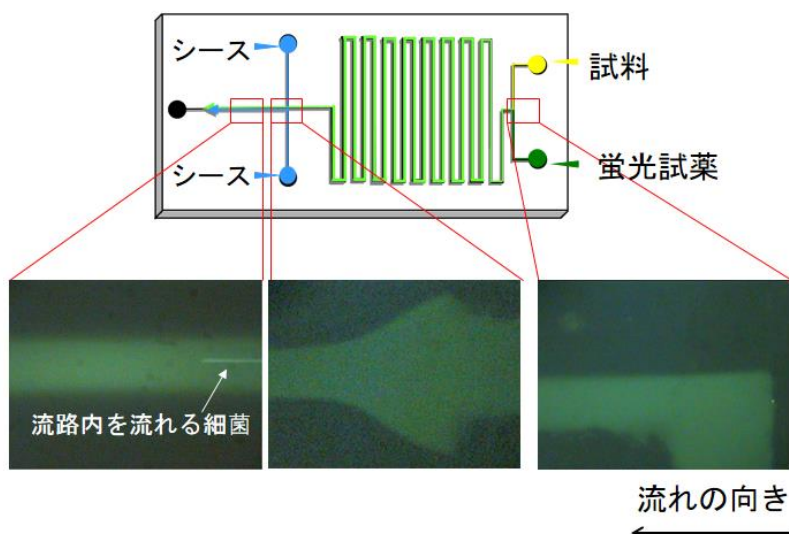


図 4 マイクロ流路内を流れる細菌の検出画像

2. 2. 3 蛍光顕微鏡

試料に蛍光試薬（全細菌数測定：SYBR Green II、*Legionella pneumophila* 数測定：抗 *L. pneumophila* 蛍光抗体）を添加し、蛍光染色を行った。染色された細菌をろ過によりポリカーボネートフィルター（孔径 $0.2\ \mu\text{m}$ ）上に捕集し、プレパラートを作製した。蛍光顕微鏡の青色励起光下、倍率 1,000 倍で計 20 視野以上を観察し、その平均値をもとに細菌数を算出した。

2. 3 ポータブル・マイクロ流路システム

図 5 に今回使用したマイクロ流路システムの構成を示した。本システムは、光源、送液部、検出部およびデータ解析部より成る。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、画像解析プログラムを用いて細菌数を測定する。システムのサイズは $36\text{ cm} \times 54\text{ cm} \times 23\text{ cm}$ 、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 6）。

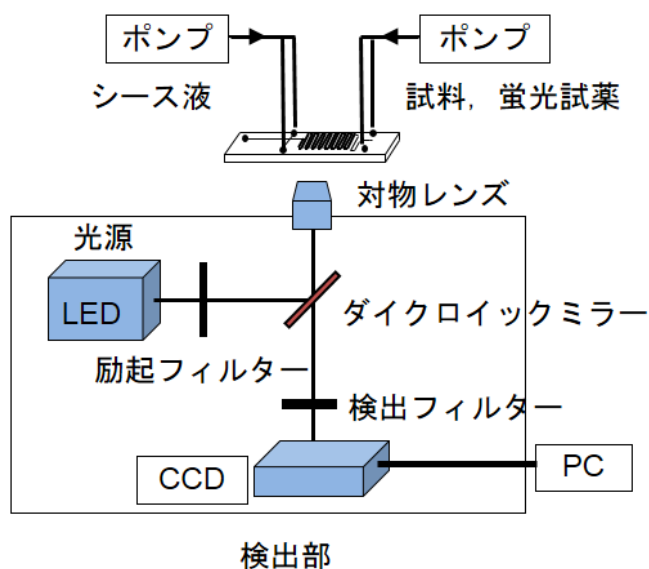


図 5 マイクロ流路システムの構成

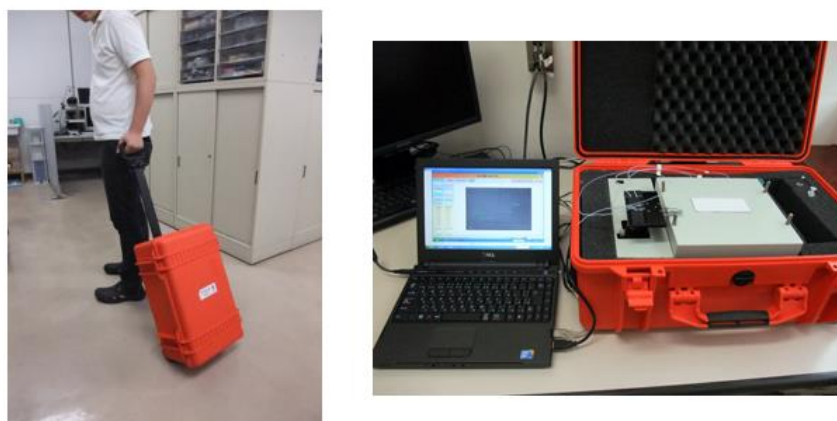


図 6 ポータブル・マイクロ流路システム

3. 結果と考察

3. 1 on-chip 核酸染色による湖水中の細菌数測定

大津湖岸なぎさ公園で採取した湖水を試料とし、核酸結合性蛍光染色剤 SYBR Green II を用いた on-chip 染色により、細菌数を測定した。同試料について、蛍光顕微鏡により細菌数を測定し、ポータブル・マイクロ流路システムにより得られた測定結果と比較したところ、両者はほぼ同じ値であった（図 7）。ポータブル・マイクロ流路システムを用いた細菌数の測定に要した時間は約 1 時間であったことから、本システムを用いることにより淡水環境中の細菌数を迅速に測定できることがわかった。

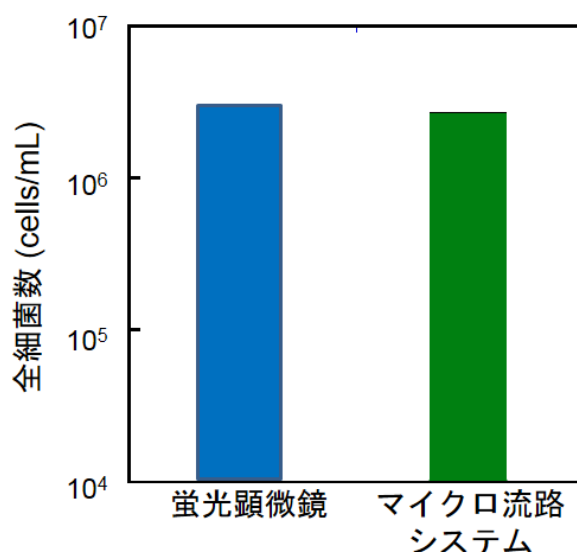


図 7 ポータブル・マイクロ流路システム（on-chip 核酸染色）による湖水中の細菌数測定

3. 2 on-chip 蛍光抗体染色による危害微生物数の測定

ポータブル・マイクロ流路システムにより病原微生物を特異的に検出するにあたり、検出対象を *Legionella pneumophila* とした。本菌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伴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>）。本菌を培養法により検出するには 10 日以上を要するため、レジオネラ症のアウトブレイクを防ぐために、迅速なモニタリング法が切望されている。

まず、on-chip 蛍光抗体染色により *L. pneumophila* JCM 7571 株を標識し、ポータブル・マイクロ流路システムにおける定量限界を確認した。その結果、定量限界は 10^4 cells/mL であることがわかった（図 8）。一般的に、水環境における *L. pneumophila* 数は 10^3 cells/mL 以下であることが多い。そこで前年度の結果をふまえ、*L. pneumophila* 数が $10^1 \sim 10^3$ cells/mL である試料を 1,000 倍濃縮後、on-chip 蛍光抗体染色を行い、ポータブル・マイクロ流路システムを用いて測定した。その結果、濃縮を行うことにより、*L.*

pneumophila 数が 10^1 cells/mL の試料においても高い精度で測定できることがわかった (表 1)。

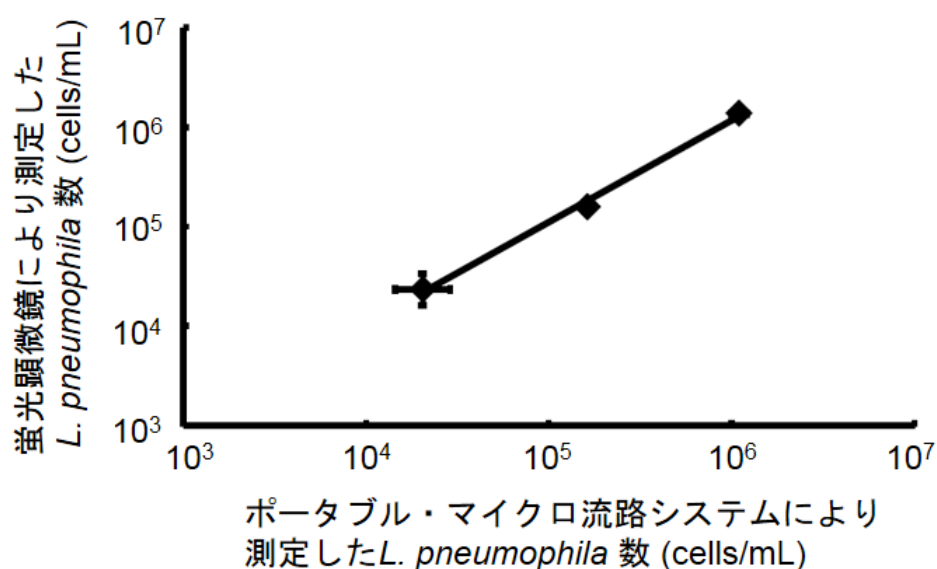


図 8 ポータブル・マイクロ流路システム (on-chip 蛍光抗体染色) による
レジオネラ数測定

表 1 1,000 倍濃縮によるポータブル・マイクロ流路システム (on-chip 蛍光抗体染色)
のレジオネラ数定量限界の向上

元試料における <i>L. pneumophila</i> 数	蛍光顕微鏡による 測定値	ポータブル・マイクロ流路 システムによる測定値
1.4×10^3	1.1×10^6	1.2×10^6
2.1×10^2	1.1×10^5	1.3×10^5
2.3×10^1	2.3×10^4	1.7×10^4

(cells/mL)

4. まとめ

on-chip 染色用マイクロ流路デバイスを用いることにより蛍光染色操作を自動化できるとともに、ポータブル・マイクロ流路システムを用いて水環境中の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。

現在、ポータブル・マイクロ流路システムを用いた野外での細菌数測定を計画して

おり、これらのフィールド・ワークの成果をふまえて研究を発展させることにより、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。大津湖岸なぎさ公園で採取した湖水の細菌数測定にあたっては、「水のめぐみ館 ウォーターステーション琵琶」の会議室をお貸しいただいた。

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. R. Araya, K. Tani, T. Takagi, N. Yamaguchi and M. Nasu. Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent in situ hybridization and DGGE analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **43**: 111-119 (2003)
5. N. Yamaguchi, T. Nishiguchi, F. Utrarachkij, O. Suthienkul and M. Nasu. 16S ribosomal RNA gene-based phylogenetic analysis of abundant bacteria in river, canal and potable water in Bangkok, Thailand. *Biol. Pharm. Bull.*, **36**: 872-876 (2013)
6. N. Yamaguchi, S. Inaoka, K. Tani, T. Kenzaka and M. 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 and 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)