


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所  
衛生・微生物学分野  
山口 進康

水環境の微生物学的安全保証


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

海外では遊泳中に大腸菌O157に  
感染した報告がされている  
↓  
水環境の微生物学的安全保証：  
微生物モニタリングが重要



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～1週間を要する  
- 環境中の微生物数を過小評価



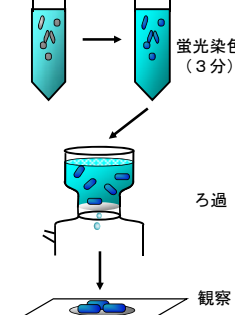
平板培養法

→ 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

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, T-RFLP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



蛍光染色法による微生物の迅速検出



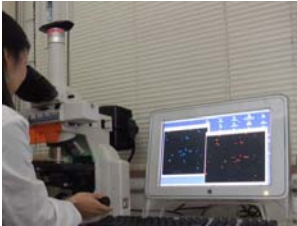
全細菌 (DAPI\*により染色) (CFDA\*\*により染色)  
生きている細菌 (CFDA\*\*により染色)

蛍光染色 (3分)  
ろ過  
観察

試料：河川水

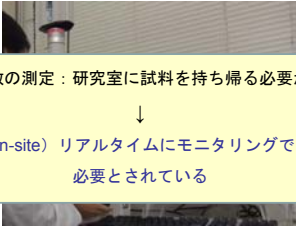
\* 4', 6-diamidino-2-phenylindole  
\*\* carboxyfluorescein diacetate

蛍光染色法：高精度かつ迅速  
↓  
環境微生物学分野を中心に広く使われつつある  
↓しかしながら...  
蛍光顕微鏡：操作が煩雑

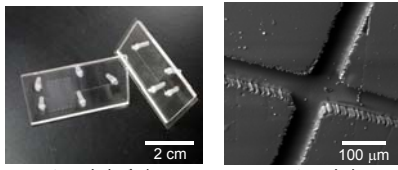


蛍光染色法：高精度かつ迅速  
↓  
環境微生物学分野を中心に広く使われつつある  
↓しかしながら...  
蛍光顕微鏡：操作が煩雑

微生物数の測定：研究室に試料を持ち帰る必要がある  
↓  
その場で (on-site) リアルタイムにモニタリングできる手法が  
必要とされている



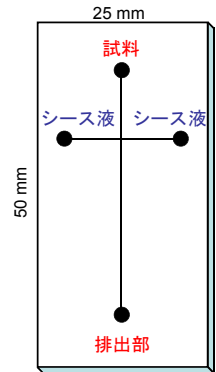
### マイクロ流路デバイス



マイクロ流路デバイス      マイクロ流路

- 迅速（数時間以内に結果を得ることが可能）
- 試薬や試料の使用量が少ない（100 μl以下）
- 低価格
- 操作の自動化や解析システムの小型化をしやすい
- 使用後すぐに滅菌可能（=バイオハザードのリスクを低減できる）

### 昨年度に検討したマイクロ流路デバイス

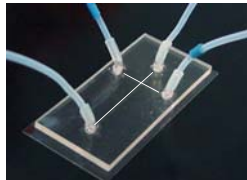


25 mm  
50 mm

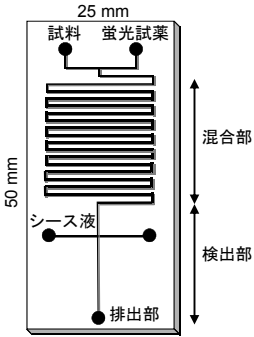
試料  
シース液      シース液  
排出部

材質  
チップ : polydimethylsiloxane (PDMS)  
カバー : ガラス

マイクロ流路  
幅 : 100 μm  
深さ : 15 μm



### On-chip染色のためのマイクロ流路デバイス

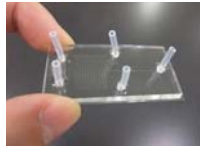


25 mm  
50 mm

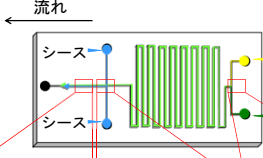
試料 蛍光試薬  
シース液  
混合部  
検出部  
排出部

・材料  
- PDMS (polydimethylsiloxane)  
- カバーガラス


・マイクロ流路  
- 深さ : 15 μm  
- 幅 : 500 μm (混合部)  
100 μm (検出部)



### On-chip染色による大腸菌の検出

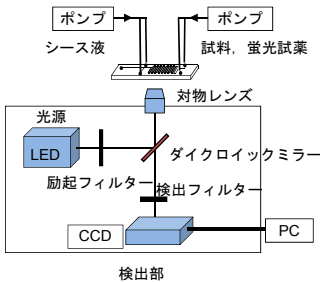


流れ  
シース液      シース液  
試料  
蛍光試薬



試料 : *E. coli* W3110  
蛍光試薬 : SYBR Green (菌体内の核酸を染色)

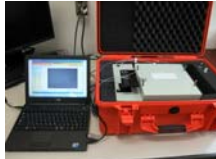
### リアルタイム・オンサイトモニタリングのためのポータブル・マイクロ流路システム



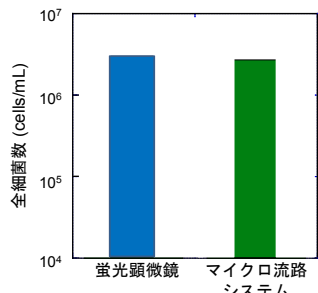
ポンプ      ポンプ  
シース液      試料, 蛍光試薬

光源 LED  
励起フィルタ      ダイクロイックミラー  
対物レンズ  
検出フィルタ  
CCD      PC  
検出部

ポータブル・システム  
(36 cm × 54 cm × 23 cm, 15 kg)



### ポータブル・マイクロ流路システムによる湖沼水中の細菌数測定



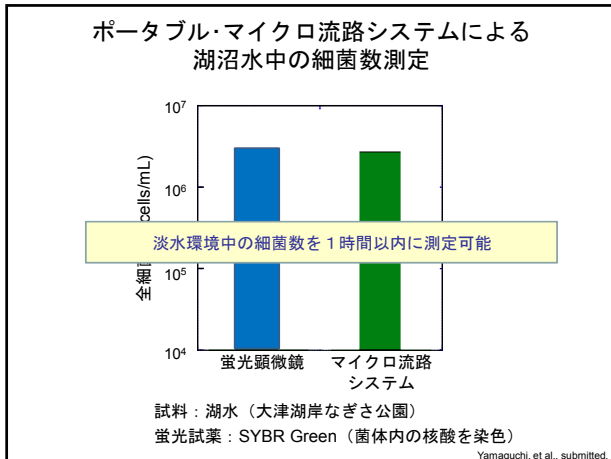
全細菌数 (cells/mL)

10<sup>7</sup>  
10<sup>6</sup>  
10<sup>5</sup>  
10<sup>4</sup>

蛍光顕微鏡      マイクロ流路システム

試料 : 湖水 (大津湖岸なぎさ公園)  
蛍光試薬 : SYBR Green (菌体内の核酸を染色)

Yamauchi, et al., submitted.



### Legionella pneumophilaとレジオネラ症

**Legionella pneumophila**

レジオネラ症の原因細菌  
 （レジオネラ肺炎、ポンティアック熱）

水環境中に生息（アメーバ内で増殖）

エアロゾルにより感染

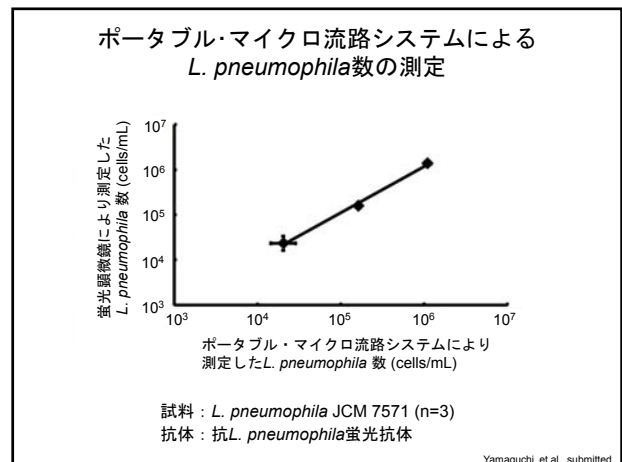
培養法による検出には10日間を要する  
 → アウトブレイクを防ぐためには迅速な検出が重要

### 危害微生物の特異的検出

**核酸染色**  
 標的：菌体内の核酸（DNAまたはRNA）  
 試料中のすべての細菌を検出

**蛍光抗体染色**  
 標的：菌体表面の抗原  
 抗体と反応する細菌のみを検出

蛍光抗体による*L. pneumophila*の特異的検出



### ポータブル・マイクロ流路システムによる微量の*L. pneumophila*数の測定

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
$1.4 \times 10^3$	$1.1 \times 10^6$	$1.2 \times 10^6$
$2.1 \times 10^2$	$1.1 \times 10^5$	$1.3 \times 10^5$
$2.3 \times 10^1$	$2.3 \times 10^4$	$1.7 \times 10^4$

(cells/mL)

試料：*L. pneumophila* JCM 7571（1,000倍濃縮；n=3）  
 抗体：抗*L. pneumophila*蛍光抗体

Yamauchi, et al., submitted.

- ### まとめ
- ポータブル・マイクロ流路システムを用いて、マイクロ流路デバイス上で蛍光染色（on-chip染色）した細菌を検出できることを確認した。
  - 本システムとon-chip核酸染色法を用いることにより、水環境中の細菌数を1時間以内に測定できた。
  - 本システムとon-chip蛍光抗体染色法を用いることにより、標的とする危害微生物数を2時間以内に測定できた。
  - on-chip染色用マイクロ流路デバイスとポータブル・マイクロ流路システムを用いることにより、水環境中の微生物のリアルタイム・オンサイトモニタリングが実現するものと考えられる。