

ポータブル・マイクロ流路システムを用いた湖沼・河川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ため、研究分野のみならず、産業分野（医薬品製造における微生物管理など）や臨床分野（病原微生物の迅速検出など）、さらには行政分野（再生医療製品の迅速微生物検査など）への応用が期待されている。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注目している。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: オンサイト）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、野外におけるポータブル・マイクロ流路システムの実証評価を行うとともに、琵琶湖・淀川流域におけるオンサイト・モニタリングを行った。

2. 材料と方法

2. 1 試料

湖沼水は、大阪府吹田市の犬飼池で採取した。河川水は、大阪府摂津市の淀川河川公園で採取した。



図 1 犬飼池でのオンサイト・モニタリング



図 2 淀川河川公園におけるサンプリング

蛍光顕微鏡を用いた細菌数の測定はサンプリング後、12時間以内に行った。

2. 2 微生物現存量の測定

2. 2. 1 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フトリソグラフィーにより作製し、使用した (5 cm×2.5 cm)。流路の幅は混合部で 500 μm または 100 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)。

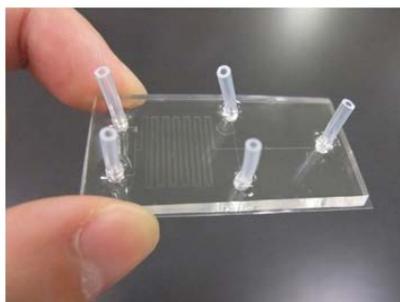
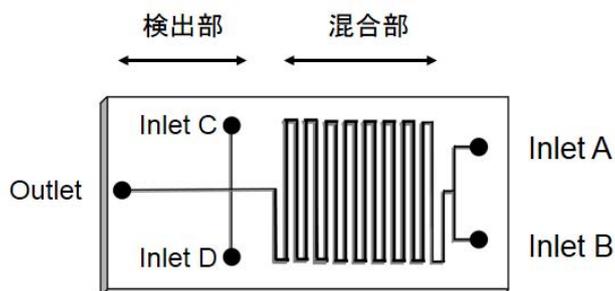


図3 on-chip 染色用マイクロ流路デバイス

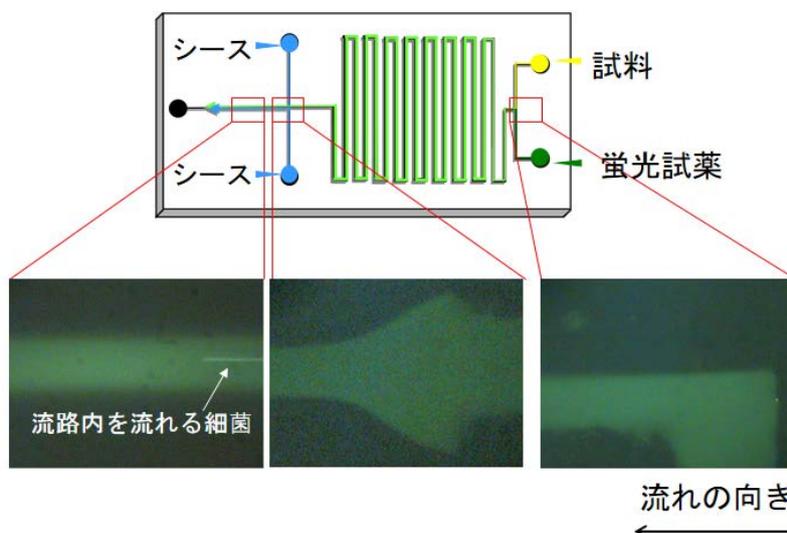


図4 マイクロ流路内を流れる細菌の検出画像

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。生きている細菌数（生菌数：エステラーゼ活性を持つ細菌数）の測定には、**carboxyfluorescein diacetate (CFDA)** を用いた。

2. 2. 2 蛍光顕微鏡

試料に蛍光試薬（全細菌数測定：SYBR Green II、生菌数測定：CFDA）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構成される。

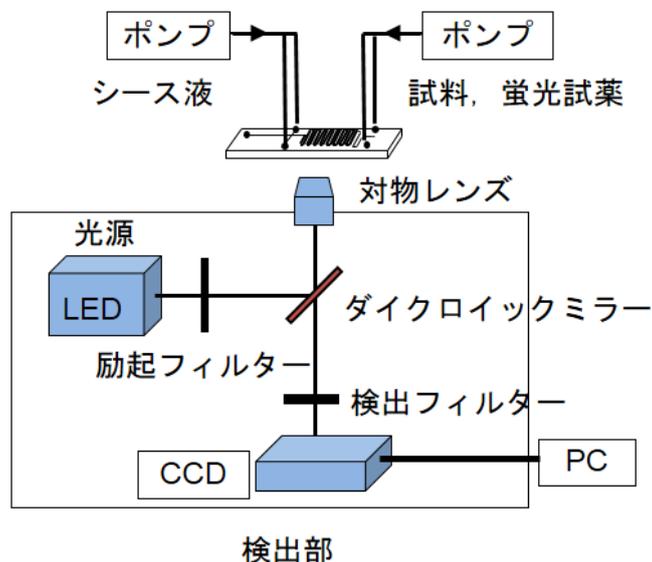


図 5 マイクロ流路システムの構成



図 6 ポータブル・マイクロ流路システム

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 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 6）。

3. 結果と考察

3. 1 マイクロ流路デバイスの流路デザインの最適化

水環境中の細菌数の測定にあたり、蛍光顕微鏡での測定値とマイクロ流路システムを用いて得られた測定値の間に差が見られたことから、マイクロ流路デバイスの流路デザインを検討した。

犬飼池で採取した試料を用いて検討を行った結果、混合部の流路幅を 1/5 にし、折り返しの回数を減らすことにより、定量性を上げることができた（表 1）。なお、検出部のデザインは変更しなかった。

表 1. マイクロ流路デバイスの流路デザインの最適化

	蛍光顕微鏡	従来のマイクロ流路デバイス	新規マイクロ流路デバイス
細菌数 (cells/ml)	3.1×10^6	8.6×10^5	2.5×10^6

3. 2 ポータブル・マイクロ流路システムを用いたオンサイトでの細菌数測定

上記のマイクロ流路デバイスの流路デザインの最適化の結果をふまえ、ポータブル・マイクロ流路システムを用いて、水環境におけるオンサイトでの細菌数測定を行った。なお、マイクロ流路システムを用いた特定の危害微生物数の測定にあたっては蛍光抗体染色が適していること、および、危害微生物数が少ない場合には濃縮により定量性を確保できることを前年度に報告している。そこで本年度のオンサイト・モニタリングにあたっては、全菌数および生菌数を測定対象とした。全菌数の増加は生きている細菌の現存量の増加を反映するため、水環境における細菌の動態を把握するのに重要な指標となる。また生菌数と全菌数を比較することにより消毒効果の判定などが可能となるため、生菌数は病原微生物対策も含めた水環境の管理に有用な指標となる。

野外での使用にあたり、昨年度に使用していた発電機では運搬、安全性（可燃性液体の使用）および騒音対策が課題となっていた。そこで、ポータブル・バッテリーを用いることに決定した（図 6）。予試験において電圧や連続使用時間に問題が無いことを確認した後、犬飼池においてオンサイトでの細菌数（生菌数および全菌数）測定を行った。同時に、研究室の蛍光顕微鏡で生菌数および全菌数を測定した（図 7）。

その結果、ポータブル・マイクロ流路システムを用いることにより、生菌数および全菌数をオンサイトで測定でき、得られる結果は蛍光顕微鏡で得られる値と同等であることを確認した。また、生菌数および全菌数を 1 時間以内に得られることがわかった。

次に、淀川河川公園において、ポータブル・マイクロ流路システムを用いたオンサ

イトでの細菌数測定を行ったところ、特に CFDA 染色において、定量性が低くなった。この原因としては、淀川は犬飼池に比べて水中の有機物が少ないため、細菌の大きさが小さく、CFDA 染色により得られる蛍光が弱いことが考えられた。今後、励起光源を改良し輝度を上げる、または検出に用いる CCD の感度を最適化することによって、貧栄養環境中の生菌数も測定可能になるものと考えられる。

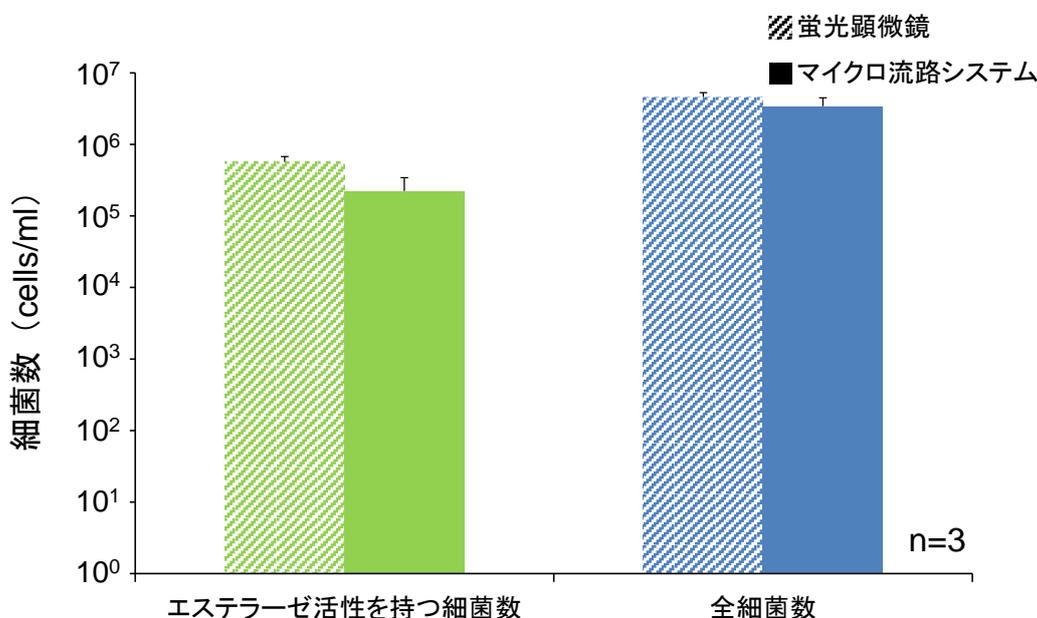


図7 犬飼池におけるオンサイト細菌数測定

4. まとめ

蛍光染色剤の濃度およびマイクロ流路デバイスのデザインの最適化により、on-chip 染色による活性を持つ細菌数測定および全細菌数測定を可能とした。また、ポータブル・マイクロ流路システムを用い、水環境中の活性を持つ細菌数測定および全細菌数測定をオンサイトで行うとともに、結果を1時間以内に得ることができた。

これらの結果より、ポータブル・マイクロ流路システムを用いた水環境中の細菌数（全菌数、生菌数、危害微生物数）のリアルタイム・オンサイト・モニタリングが可能であることを確認した。

5. 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)