

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2012

課題番号：21256002

 研究課題名（和文） オンサイト細菌モニタリングシステムによるアジアの水環境の高精度
衛生微生物学的評価

 研究課題名（英文） Real-time and on-site monitoring of bacterial cells in freshwater
environments by using a microfluidic system

研究代表者

那須 正夫（NASU MASAO）

大阪大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：90218040

研究成果の概要（和文）：本研究は、生活環境の安全・安心を保証するために、マイクロ流路デバイス（幅・深さ数十 μm の流路を刻んだ数 cm 四方の樹脂製チップ）を用いて、迅速・簡便かつ高精度な微生物モニタリングを行うためのシステムを構築し、水環境の衛生微生物学的評価を現地（on-site）で行なうことにより、感染症予防への貢献を目指したものである。本研究で作製したマイクロ流路システムは携行可能であり、屋外において数時間以内に細菌数を測定できることから、水環境中の細菌の real-time on-site モニタリングの実現につながるものである。

研究成果の概要（英文）：“Real-time” and “on-site” microbiological methods are required for prevention of waterborne diseases. We fabricated a portable microfluidic system (36 cm \times 54 cm \times 23 cm, 15 kg) for rapid monitoring of bacterial cells in freshwater at a density in the order of 10^4 - 10^6 /ml. A microfluidic device (size: 48 mm \times 23 mm) was designed and fabricated using polydimethylsiloxane (PDMS) and a thin glass sheet. *Escherichia coli* O157:H7 and *Legionella pneumophila* cells were spiked in purified freshwater (10^1 - 10^6 cells/ml). Low numbers of targeted cells were collected on a filter and then resuspended in purified freshwater for a 100 to 1,000-fold concentration. Fluorescent dye was used for nucleic acid stain and direct counting of total bacterial cells. Fluorescent antibody was used for specific detection of *E. coli* O157:H7 and *L. pneumophila* cells in the samples. The portable microfluidic system was used for the detection of fluorescently stained cells flowing in the microchannel, and number of the cells in each sample was determined using original image analysis software. Bacterial cells in the same samples were counted by fluorescence microscopy for comparison. The numbers of bacterial cells determined using the microfluidic system was highly correlated with the microscopic counts. We could count targeted cells in the samples within 2 hours with this microfluidic system. The microfluidic device and portable counting system fabricated in this study will contribute to the microbiological quality control of freshwater.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	10,500,000	3,150,000	13,650,000
2010年度	14,000,000	4,200,000	18,200,000
2011年度	12,500,000	3,750,000	16,250,000
総計	37,000,000	11,100,000	48,100,000

研究分野：環境微生物学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：水環境、on-site モニタリング、細菌、アジア、マイクロ流路デバイス

1. 研究開始当初の背景

人口増加にともなう、世界の水の使用量は増え続けており、水資源の効率的な利用は21世紀における人類の大きな課題である。水資源を効率的に利用するためには、水を循環させ使用することが有効である。しかしながら、循環式浴槽や冷却塔、噴水等の水を循環・再利用するシステムでは、その衛生微生物学的な管理を怠った場合に、レジオネラ等の病原微生物のアウトブレイクによる感染症発生のリスクが急増する。したがって、水の再利用や循環使用における微生物学的安全性の確保は、我々の健康と快適な暮らしを保証する上で、ますます重要となっている。

微生物の検出にあたり、病原微生物学をはじめ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%以上が通常的手法では培養困難であることが明らかになっている。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、蛍光染色法をはじめとする「培養に依存しない微生物検出法」の開発が進められている。蛍光染色法は数分～数時間で結果を得ることができることから、環境微生物学分野を中心に普及しつつある。

しかしながら、その測定にあたっては、高精度な機器にはメンテナンスが煩雑、操作に技能を有する等の課題があり、迅速、簡便かつ高精度に環境中の微生物を捉えるためのシステムが切望されている。

2. 研究の目的

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（各種の蛍光染色法やマイクロフローサイトメトリー）をon-site細菌モニタリングシステムに発展させ、水環境の高精度な衛生微生物学的評価を現地で行うことを目的とした。具体的には、微細加工技術によりマイクロ流路デバイス（幅・深さ数十 μm の流路を刻んだ数cm四方のシリコン樹脂製チップ）を作製し、試料と試薬の混合、反応、検出等の一連の処理をチップ上（on-chip）で行うことにより、自動化を試みた。また検出部も含めたon-siteで使用可能なシステムとして、ポータブル・システムの構築を進めた。さらに、作製したシステムを用いて、水環境中の病原細菌のモニタリングをon-siteで行い、環境水や生活用水の迅速な衛生微生物学的評価が可能であるかを検討した。

3. 研究の方法

(1) 試料

供試菌株として、*Escherichia coli* W3110 株、*E. coli* O157:H7 ATCC 43888 株および

Legionella pneumophila JCM 7571 株を用いた。

飲用水試料として、除菌・殺菌処理のされていないナチュラルミネラルウォーターおよび研究室の浄水器内の水を用いた。

水環境試料は鹿児島県下の自然湧出温泉と河川の合流部において、冷却塔水は大阪大学薬学研究科の屋上で採取した。

(2) 微生物現存量の測定

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、クロモカルトコリフォーム寒天培地を用い、試料水を塗抹後、37°C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、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計数した。

平板培養法による水環境中の生菌数の測定にあたっては、R2A寒天培地を用い、試料水を塗抹後、25°Cで1週間培養し、生じたコロニーを計数した。

② 蛍光顕微鏡法

試料中の細菌をポリカーボネートフィルター（孔径0.2 μm ）上に捕集し、DAPI（4',6-Diamidino-2-phenylindole）を終濃度1 $\mu\text{g/ml}$ となるように、またはSYBR Green IIを1/10,000濃度となるように添加し、約3分間染色を行った。観察にあたっては、蛍光顕微鏡のUV励起光下でDAPI染色試料を、青色励起光下でSYBR Green II染色試料を観察し、全細菌数を測定した。細菌数測定にあたっては、20視野以上を計数し、菌数の平均値が2以下の場合、または測定値が0の視野数が全視野数の1/4を超えた場合に、測定限界以下とした。

(3) マイクロ流路デバイス

マイクロ流路デバイスは、シリコン樹脂polydimethylsiloxane (PDMS) およびスライドガラスで作製した。ソフトリソグラフィにより、PDMSに微小流路を作製した。マイクロ流路デバイスのサイズは48 mm \times 23 mmとした。微小流路の幅は100 μm 、深さは15 μm とした。

(4) マイクロ流路システム

細菌数測定にあたっては、試料をマイクロシリンジ内に充填し、マイクロ流路デバイスとシリコンチューブでつないだ。シリンジポンプを用いてマイクロシリンジ内の試料をデバイスの微小流路に一定の速度で流した。

マイクロ流路デバイスをシステムのステージに固定し、流路内を対物レンズを用いて観察した。青色励起光下で微小流路を流れる細菌を CCD で検出し、独自に作成した画像解析ソフトウェアで計数した。

(5) マイクロ流路システムの定量精度の確認

培養した標準菌株を遠心操作により集め、中性リン酸緩衝液で2回洗浄した。洗浄した細菌を 10^1 から 10^6 cells/ml となるように無菌水で希釈し、DAPI または SYBR Green II で5分間染色した。*E. coli* O157:H7 および *L. pneumophila* の特異的染色には蛍光抗体を用い、室温で5~30分間染色を行った。蛍光染色した試料は、直ちに蛍光顕微鏡およびマイクロ流路デバイスを用いて観察し、細菌数を測定した。

on-chip 染色にあたっては、マイクロ流路デバイスに無染色試料と蛍光試薬を別々に導入し、マイクロ流路内で試料中の細菌を蛍光染色した。

4. 研究成果

(1) マイクロ流路デバイスの設計・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」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」の流路のデザインを設計し、PDMS およびスライドガラスを用いて作製した (図1)。

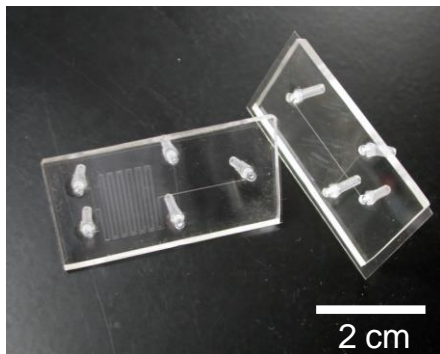


図1. 作製したマイクロ流路デバイス。
(左: 染色・計数用マイクロ流路デバイス、
右: 計数用マイクロ流路デバイス)

(2) マイクロ流路システムの作製

マイクロ流路内を流れる細菌を高精度に計数するために、まず蛍光顕微鏡をベースとしたプロトタイプのマイクロ流路システムを作製した (図2)。送液にはシリンジポンプを、光源には水銀ランプを用いた。

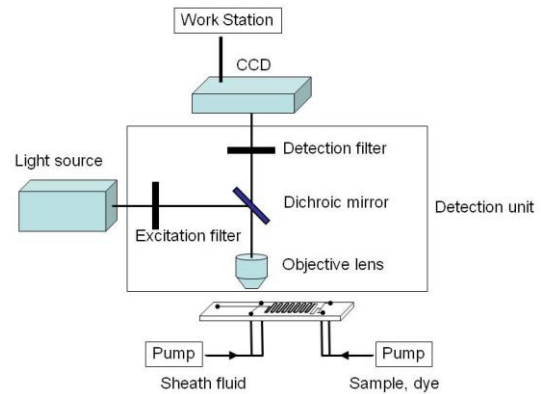


図2. マイクロ流路システム。

その評価結果をもとに、携行可能なポータブル・マイクロ流路システムを作製した (36 cm × 54 cm × 23 cm、重量 15 kg ; 図3)。光源には半導体レーザーを用いた。



図3. 作製したポータブル・マイクロ流路システム。

(3) マイクロ流路システムの細菌数測定精度の確認

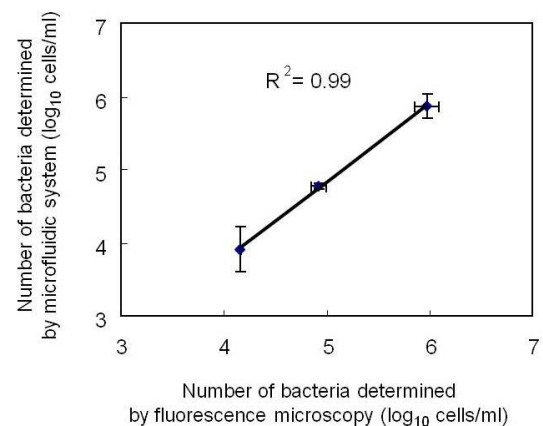


図4. マイクロ流路システムの定量性。

作製したマイクロ流路システムの定量範囲を標準菌株を用いて評価した結果、 10^4 ~ 10^6 cells/ml の試料において、蛍光顕微鏡と同

等の計数精度を有することを確認した（図4）。また、細菌量の少ない試料に対しては、その濃縮を行うことにより、 $10^1 \sim 10^3$ cells/mlの試料においても高い精度で計数できることを確認した。

(4) 試料濃縮法の検討

on-site で試料の濃縮を行うために、シリンジを用いた濃縮法を作成した。

(5) on-chip 染色による飲用水中の細菌数測定

飲用水（ナチュラルミネラルウォーターおよび浄水器内の水）中の細菌数について、「染色・計数用マイクロ流路デバイス」を用いたマイクロ流路システムで測定し、蛍光顕微鏡で得られた計数値と比較した。その結果、得られた値はほぼ同等であり、マイクロ流路システムを用いた飲用水中の細菌の on-chip 染色および細菌数のモニタリングが可能であることがわかった（表1）。

表1. マイクロ流路システムおよび蛍光顕微鏡で求めた飲用水中の細菌数 (n=5).

Sample	Microfluidic system	Fluorescence microscopy
Tap water 1	$1.1 (\pm 0.33) \times 10^5$	$1.5 (\pm 0.23) \times 10^5$
Tap water 2	$3.7 (\pm 1.1) \times 10^5$	$5.1 (\pm 1.2) \times 10^5$
Natural mineral water	$2.4 (\pm 0.31) \times 10^6$	$3.0 (\pm 0.42) \times 10^6$

単位：cells/ml

(6) ポータブル・マイクロ流路システムを用いた冷却塔水のレジオネラのモニタリング

ポータブル・マイクロ流路システムを用いた細菌モニタリングの実用性を評価するために、タイ国科学技術省・Department of Science Service 所属の Kanya Muangkaew 氏との共同研究として、冷却塔水中のレジオネラ数を測定した（表2）。その結果、マイクロ流路システムで得られた値は蛍光顕微鏡で得られた値と同等であり、また、平板培養法では検出できないレジオネラのモニタリングも可能であることがわかった。

表2. ポータブル・マイクロ流路システムおよび蛍光顕微鏡、平板培養法で求めた冷却塔水中のレジオネラ数。

Sample	Microfluidic system	Fluorescence microscopy	Plate counting
1	3.6×10^4	3.6×10^4	1.0×10^3
2	3.4×10^4	2.5×10^4	7.0×10^2
3	4.7×10^4	2.6×10^4	4.7×10^2

単位：cells or CFU/liter

(7) ポータブル・マイクロ流路システムを用いた水環境中のレジオネラの real-time on-site

モニタリング

水環境を対象としてポータブル・マイクロ流路システムを用いた現地（on-site）での細菌数測定の可能性を評価するために、鹿児島県下でレジオネラの on-site モニタリングを行い、その現存量を測定した。さらに同じ試料について、蛍光顕微鏡を用いて測定し、マイクロ流路システムで得られた結果との同一性を評価した（表3）。その結果、本システムによる水環境中の病原細菌の real-time on-site モニタリングが可能であることを確認した（表3）。

表3. ポータブル・マイクロ流路システムによる水環境（自然湧出温泉と河川の合流部）中のレジオネラ数の on-site モニタリング。

Method	Number of <i>Legionella</i> (cells/ml)
Microfluidic system	5.2×10^2
Fluorescence microscopy	1.0×10^2

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計11件）

(1) Nobuyasu Yamaguchi, Takahiro Nishiguchi, Fuangfa Utrarachkij, Orasa Suthienkul, Masao 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) 査読有

https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/36/5/36_b13-00012/_pdf

(2) Nobuyasu Yamaguchi, Syuhei Matsukawa, Yoko Shintome, Tomoaki Ichijo, Masao Nasu. Microchip-based terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) for on-site analysis of bacterial communities in freshwater. Biol. Pharm. Bull., 印刷中. 査読有

(3) Nobuyasu Yamaguchi, Akiko Kitaguchi, Masao Nasu. Selective enumeration of viable Enterobacteriaceae and active *Pseudomonas* spp. in milk within 7h by multicolor fluorescence in situ hybridization following microcolony formation. J. Biosci. Bioeng. 113: 746-750 (2012) 査読有

DOI:10.1016/j.jbiosc.2012.01.009

(4) Rong Zhang, Tomoaki Ichijo, Yan-Yan Hu, Hong-Wei Zhou, Nobuyasu Yamaguchi, Masao Nasu, Gong-Xiang Chen. A ten years (2000-2009) surveillance of resistant Enterobacteriaceae in Zhejiang Province, China.

Microb. Ecol. Health Dis., 23: 11609-11618 (2012) 査読有
DOI: 10.3402/mehd.v23i0.11609

(5) Rong Zhang, Tomoaki Ichijo, Yong-Lu Huang, Jia-Chang Cai, Hong-Wei Zhou, Nobuyasu Yamaguchi, Masao Nasu, Gong-Xiang Chen. High prevalence of *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* genes in both water-borne environmental bacteria and clinical isolates of *Citrobacter freundii* in China. Microbes Environ., 27: 158-163 (2012) 査読有
DOI:10.1264/jsme2.ME11308

(6) Takashi Baba, Naoko Inoue, Nobuyasu Yamaguchi, Masao Nasu. Rapid enumeration of active *Legionella pneumophila* in freshwater environments by the microcolony method combined with direct fluorescent antibody staining. Microbes Environ., 27: 324-326 (2012) 査読有
DOI:10.1264/jsme2.ME11324

(7) Nobuyasu Yamaguchi, Masashi Torii, Yuko Uebayashi, Masao 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) 査読有
DOI:10.1128/AEM.01765-10

(8) Nobuyasu Yamaguchi, Kouichi Tanaka, Takashi Baba, Norihide Amano, Masao Nasu. Rapid enumeration of low numbers of moulds in tea based drinks using an automated system. Int. J. Food Microbiol., 145: 365-369(2011) 査読有
DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.012

(9) Nobuyasu Yamaguchi, Makoto Sasada, Masao 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) 査読有
DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.012

(10) Nobuyasu Yamaguchi, Yasuo Motoyama, Mami Matsumoto, Tomoaki Ichijo, Hideto Nagumo, Noboru Kagami, Yoshihiko Tani, Masahiro Satake, Masao Nasu. *Staphylococcus epidermidis* forms floating micro-colonies in platelet concentrates at the early stage of contamination. J. Health Sci., 55:726-731 (2009) 査読有
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jhs/55/5/55_5_726/_pdf

(11) Nobuyasu Yamaguchi, Masafumi Ikeda, Masao Nasu. Rapid on-chip flow cytometric detection of *Listeria monocytogenes* in milk. J. Health Sci., 55:851-856 (2009) 査読有
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jhs/55/5/55_5_851/_pdf

[学会発表] (計 2 2 件)

(1) 山口 進康, 他. 冷却塔水中の *Legionella pneumophila* のマイクロ流路システムによる迅速モニタリング. 日本薬学会第 132 年会(札幌) (2012 年 3 月 31 日)

(2) 山口 進康, 他. 冷却塔水中のレジオネラのマイクロ流路システムによる on-site モニタリング. 第 85 回日本細菌学会総会(長崎) (2012 年 3 月 29 日)

(3) 山口 進康, 他. マイクロ流路システムによる冷却塔水中の *Legionella pneumophila* のオンサイトモニタリング. フォーラム 2012 : 衛生薬学・環境トキシコロジー (名古屋) (2012 年 10 月 26 日)

(4) 山口 進康, 他. マイクロ流路システムによる水環境中の *Legionella pneumophila* の迅速モニタリング. 日本微生物生態学会第 28 回大会(豊橋) (2012 年 9 月 21 日)

(5) N. Yamaguchi, et al. Rapid monitoring of *Legionella pneumophila* in cooling tower water with a microfluidic system. ASM 2012 General Meeting (サンフランシスコ, アメリカ) (2012 年 6 月 18 日)

(6) 山口 進康, 他. 冷却塔水中の *Legionella pneumophila* のマイクロ流路システムによるモニタリング. フォーラム 2011 : 衛生薬学・環境トキシコロジー (金沢) (2011 年 10 月 28 日)

(7) 山口 進康, 他. 冷却塔水中のレジオネラのマイクロ流路システムによる迅速モニタリング. 第 61 回日本薬学会近畿支部大会(神戸) (2011 年 10 月 22 日)

(8) 山口 進康, 他. マイクロ流路システムによる水環境中の *Legionella pneumophila* の迅速検出. 日本微生物生態学会第 27 回大会(京都) (2011 年 10 月 9 日)

(9) 山口 進康, 他. マイクロ流路システムによる水環境中の細菌の迅速モニタリング. 日本宇宙生物科学学会第 25 回大会(横浜) (2011 年 9 月 30 日)

(10) 山口 進康, 他. 水環境中のレジオネラ

のオンラインモニタリング. 日本温泉科学会第 64 回大会 (有馬) (2011 年 9 月 8 日)

(11) N. Yamaguchi, et al. Abundance of *Legionella pneumophila* in cooling tower water determined by using a microfluidic device. IUMS2011 (札幌) (2011 年 9 月 8 日)

(12) N. Yamaguchi, et al. Automated staining and counting of bacterial cells in freshwater environments by using a microfluidic device. Water Convention 2011. (シンガポール) (2011 年 7 月 5 日)

(13) N. Yamaguchi, et al. Rapid enumeration of *Legionella pneumophila* in cooling tower water by using a microfluidic system. ASM 2011 General Meeting (ニューオーリンズ, アメリカ) (2011 年 5 月 23 日)

(14) N. Yamaguchi, et al. Rapid monitoring of bacterial cells in freshwater by using a microfluidic system. 7th International Microbial Space Workshop (クレルモン・フェラン, フランス) (2011 年 5 月 19 日)

(15) 山口 進康, 他. マイクロ流路システムを用いた水環境中の細菌の迅速モニタリング. 日本薬学会第 131 年会 (静岡) (2011 年 3 月 30 日)

(16) N. Yamaguchi, et al. Rapid monitoring of *Legionella pneumophila* in aquatic environment by using a microfluidic device. ISME-13 (シアトル, アメリカ) (2010 年 8 月 26 日)

(17) N. Yamaguchi, et al. Rapid enumeration of *Legionella pneumophila* in aquatic environment by using a microfluidic device. ASM 2010 General Meeting (サンディエゴ, アメリカ) (2010 年 5 月 25 日)

(18) 山口 進康, 他. マイクロ流路システムを用いた水環境中の *Legionella pneumophila* の迅速モニタリング. 日本薬学会第 130 年会 (岡山) (2010 年 3 月 30 日)

(19) 山口 進康, 他. 冷却塔水中のレジオネラのマイクロ流路デバイスによる迅速モニタリング. 第 83 回日本細菌学会総会 (横浜) (2010 年 3 月 29 日)

(20) 山口 進康, 他. マイクロ流路デバイスを用いた水環境中のレジオネラの迅速検出. 日本微生物生態学会第 25 回大会 (広島) (2009 年 11 月 22 日)

(21) 山口 進康, 他. マイクロ流路デバイスを用いた水環境中のレジオネラの迅速モニタリング. フォーラム 2009: 衛生薬学・環境トキシコロジー (沖縄) (2009 年 11 月 5 日)

(22) N. Yamaguchi, et al. Rapid detection of *Legionella pneumophila* in aquatic environment by using a microfluidic device. *Legionella* 2009 (パリ, フランス) (2009 年 10 月 16 日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

那須 正夫 (NASU MASAO)
大阪大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号: 90218040

(2) 研究分担者

谷 佳津治 (TANI KATSUJI)
大阪大谷大学・薬学部・教授
研究者番号: 50217113

川井 真好 (KAWAI MAKU)
姫路獨協大学・薬学部・准教授
研究者番号: 40533922

山口 進康 (YAMAGUCHI NOBUYASU)
大阪大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号: 20252702

馬場 貴志 (BABA TAKASHI)
大阪大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号: 20423121

(3) 連携研究者

川端 善一郎 (KAWABATA ZEN' ICHIRO)
総合地球環境学研究所・研究部・教授
研究者番号: 80108456

岩本 朋忠 (IWAMOTO TOMOTADA)
神戸市環境保健研究所・微生物部・副部長
研究者番号: 70416402

一條 知昭 (ICHIJO TOMOAKI)
大阪大学・大学院薬学研究科・特任研究員
研究者番号: 20513899

(4) 研究協力者

陳功祥
中国・浙江大学医学部・教授

Lai Thuy Hien

ベトナム・科学技術アカデミー・准教授

Kanya Muangkaew

タイ・科学技術省・研究員