

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：84407

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K11688

研究課題名（和文）レジオネラ感染のリスク軽減に向けたon-siteモニタリング法の開発

研究課題名（英文）Development of on-site monitoring method for prevention of Legionella infection

研究代表者

山口 進康（Yamaguchi, Nobuyasu）

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・衛生化学部・課長

研究者番号：20252702

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：レジオネラ症予防の基盤となるレジオネラ属菌の検出にあたっては、通常の培養法では約2週間を要するため、より迅速に定量できる手法、特に現場（on-site）で実施可能な定量系が国内外で切望されている。そこで、独自に研究を進めているマイクロ流路デバイスおよび細菌数測定用ポータブル・システムを用いて、レジオネラ等の病原細菌をon-siteでモニタリングするための研究を進めた。まず細菌数測定用の画像解析アルゴリズムを検討し、それをもとに自動計数ソフトを作成した結果、測定精度が向上した。また、化学物質と免疫磁気ビーズを併用した濃縮法を検討した結果、回収率が高まり、検出感度を100倍向上させることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レジオネラ症は新興感染症であり、日本国内では入浴施設等において集団感染やレジオネラ肺炎による死亡例が散発している。海外では人の活発な移動に伴い、先進国・途上国を問わず、旅行者感染症として社会問題になっていることから、その予防が重要となっている。本研究の成果は、レジオネラをはじめとする危害微生物、特に培養が困難あるいは培養に長時間を要する微生物の定量を現場（on-site；オンサイト）で実施可能にするものであり、迅速かつ簡便に危害微生物をモニタリングできることから、環境衛生分野のみならず、様々な属種の微生物の管理を必要とする医薬品・食品製造、医療機関等の幅広い分野に応用可能である。

研究成果の概要（英文）：Since the detection of Legionella, which is the basis for prevention of Legionnaires' disease, requires approximately two weeks using the conventional culture method, a more rapid quantification method, especially an on-site quantification system, has been long awaited both in Japan and overseas. Therefore, we conducted a study for on-site monitoring of pathogenic bacteria such as Legionella using a microfluidic device and a portable system for bacterial counts, which we have been researching.

First, an image analysis algorithm for bacterial counting was studied, and then automatic counting software was created based on the algorithm, resulting in improved measurement accuracy. In addition, we investigated an original method using a combination of chemicals and immunomagnetic beads, which increased the recovery rate and improved the detection sensitivity by 100-fold.

研究分野：衛生環境微生物学

キーワード：オンサイト・モニタリング マイクロ流路デバイス ポータブル・システム 蛍光染色 危害微生物 感染予防

1. 研究開始当初の背景

レジオネラ症は、劇症型のレジオネラ肺炎と一過性のポンティアック熱に分類される呼吸器感染症である。感染症法では四類感染症(全数把握対象)に定められており、中高年齢者の他、慢性呼吸器疾患や糖尿病の患者、喫煙者や大量飲酒者において、レジオネラ肺炎の発症リスクが高くなることが報告されている。患者報告数は世界的に増加傾向にあり、米国では年間 20,000 人がレジオネラ肺炎に罹患していると推測されている。国内では 2010 年度は 751 名であったのに対し、2015 年度は 1,587 名と 5 年間で倍増している。なお、この報告数は届け出があったもののみであるため、実際の患者数はさらに多いものと推測されている。

国内では浴槽水が主な感染源となっており、2002 年には宮崎県の入浴施設で 295 名の患者が発生するとともに 7 名が死亡している。2017 年 3 月にも広島県の温泉で 58 名が感染し 1 名が死亡している。海外では旅行者感染症として社会問題になっており、冷却塔等から発生するエアロゾルの吸入が感染要因となっている。そのため、米国では疾病管理予防センター(CDC)、EU では欧州レジオネラ症サーベイランスネットワークが監視活動を続けている。

レジオネラ症の主な原因菌は *Legionella pneumophila* であり、自然界での現存量は少ないにもかかわらず、水を循環させる人工環境水の中では顕著に増加する。入浴設備や冷却塔、噴水等から発生するエアロゾルに起因するレジオネラ症のアウトブレイクの予防は、人々の日常生活や観光産業等の経済活動だけでなく、国際的な認知度が向上してきている日本の温泉文化の発展にも密接に関係し、また介護施設における高齢者の集団感染が懸念されていることから、社会的にも重要な課題となっている。

2. 研究の目的

レジオネラ感染の予防においては、生活環境中におけるレジオネラ属菌の動態を把握し、的確に管理することが重要である。その基本となるのがレジオネラ属菌の検出・定量である。しかしながら、通常用いられている培養法では、結果を得るために約 2 週間を要することから、より迅速に定量できる手法が国内外で切望されている。また、定量的 PCR 法等の遺伝子を標的とする方法も利用されているが、核酸抽出等の煩雑な操作があることに加え、研究室外での実施が容易ではない。したがって、レジオネラ感染のリスクを軽減させるために、より迅速に定量できる手法、特に、入浴施設や介護施設等の現場・現地(on-site)で応用可能な定量系が必要とされている。

そこで本研究では、環境中の微生物の迅速検出に関するこれまでの研究成果を活用し、マイクロ流路デバイスを用いて、人工環境水中のレジオネラ数を on-site で数時間以内に測定できるようにし、感染リスクの低減に貢献することを目的とした。

マイクロ流路デバイスは幅・深さ数十マイクロメートルの微小な流路を刻んだ数 cm 四方の小型デバイスであり、その特長として 結果を数時間以内に得ることができる、測定に必要な試料や試薬が微量(数十マイクロリットル)、デバイスが自作可能で低価格、データの再現性が高いこと等が挙げられる。このような特長から、国内外を問わず、分析化学分野や生物科学分野への応用が研究されている。さらに、検出・定量システムを小型化し携行可能にできる、デバイスが閉鎖系かつ使用後すぐに滅菌できるためにバイオハザードのリスクを低減できる等の特長も有することから、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創意工夫が必要であり、衛生微生物学分野への応用は世界的に萌芽状態にある。また、大腸菌等の標準菌株を用いた研究は盛んに進められているものの、環境水や飲食品等の実試料に応用可能なデバイスが無く、研究・開発が望まれている。このような現状の下、本研究はマイクロ流路デバイスを用いて病原細菌の on-site モニタリングを可能にする点で独創的である。また、本方法の大きな特長として、微生物の存在をその場で目視により確認できることが挙げられる。通常の微生物数測定法では結果は数値のみで表されるのに対し、本方法では定量値に加えて、システムのノート PC のディスプレイ上に、微生物が微小流路内を流れる映像が表示される。これにより、視覚的に微生物の存在を認識できるため、他の方法よりも微生物量の多寡を把握しやすい。また、携行可能であるため、ポータブルバッテリーを利用することにより、電源が無い環境でも測定が可能である。したがって、先進国のみならず、東南アジアをはじめとする諸地域の水環境・水資源の衛生微生物学的な安全性の確保に大きく寄与する。さらに、検出対象に応じて適切な蛍光抗体や蛍光染色法を選択することにより、環境衛生分野のみならず、様々な属種の微生物の管理を必要とする医薬品・食品製造、医療機関等の幅広い分野での応用が期待できる。

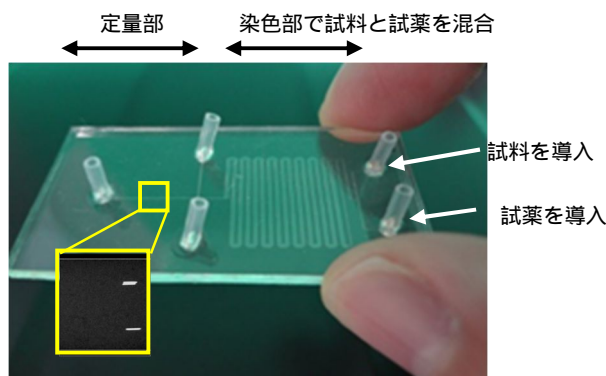
3. 研究の方法

試料として、培養した菌体をリン酸緩衝液に懸濁し、固定液で処理した。蛍光顕微鏡による細菌数の測定にあたっては、試料を蛍光染色後、孔径 0.2 マイクロメートルのフィルターでろ過し、蛍光染色された細菌をフィルター上に捕集した。プレパラートを作製し、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。

マイクロ流路デバイス (5 cm × 2.5 cm) はシリコン樹脂 (ポリジメチルシロキサン: PDMS) を用いてソフトリソグラフィーにより作製した。具体的には、スピンドーターでシリコンウェハー上に紫外線硬化樹脂 (フォトレジスト) を均一に塗り広げた後、65 °C で 2 分、さらに 95 °C で 3 分加熱することにより、フォトレジストを固化した。次に、マスクアライナーを用いてフォトマスク (クロムマスク) 上に描いたマイクロ流路のパターンをフォトレジストに転写した後、有機溶剤により現像し、さらに超純水で数回洗浄することにより、不要なパターンを除去した。マイクロ流路のパターンが転写されたシリコンウェハー上に金属製の枠を置き、枠内に PDMS を注いだ。その後、120 °C で 40 分加熱し、PDMS を固化させた。固化した PDMS をシリコンウェハーから剥がした後、プラズマエッチングによりカバーガラスを接着し、マイクロ流路デバイスを作製した。マイクロ流路の幅は 100 ~ 500 マイクロメートル、深さは 15 マイクロメートルとした。マイクロ流路を流れる細菌の検出・計数には、自作したポータブル・システム (54 × 36 × 23 cm ; 重量 15 kg) を用いた。

試料及び蛍光抗体をマイクロ流路デバイスに導入後、試料中の細菌をマイクロ流路の染色部において蛍光抗体により染色し (on-chip 染色)、マイクロ流路の定量部を流れる細菌をポータブル・システムの CCD を用いて撮像した。

細菌数測定用ソフトウェアの作成には、MATLAB R2019b を用いた。本ソフトウェアにより得られた自動計数値の精度の確認は、映像の目視計数により得られた値との比較により行った。



on-chip 染色用マイクロ流路デバイス (5 cm × 2.5 cm)

4. 研究成果

まず、独自に作製したポータブル・マイクロ流路システムを用いて水環境中の *L. pneumophila* 数を高精度に測定するために、細菌数測定用の画像解析アルゴリズムを検討した。すなわち、マイクロ流路を流れる細菌の確率的特徴モデルに基づき、目視では見逃されやすい断片的で微かな細菌画像も確実に検出できるようにアルゴリズムを設計し、これをもとに自動計数ソフトウェアを作成した。本ソフトウェアの定量精度を確認したところ、蛍光顕微鏡による直接計数法と同等であった。すなわち、従来はポータブル・システムで検出が困難であった微弱な蛍光を発する細菌も検出できるようになり、測定精度が向上した。

次に、従来の試料調製法では現存量の少ない細菌を検出するために、遠心による濃縮を行っていた。本方法は十分な回収率があるものの、遠心分離機が必要であり、on-site での実施に課題があった。そこで、on-site で実施可能、かつ、試料中の標的とする細菌の回収率を上げることが可能な方法の検討を行った。その結果、化学物質と免疫磁気ビーズを併用した濃縮法により回収率が高まり、検出感度を 100 倍向上させることができた。

これらの成果をもとに、研究に協力をいただいている浴場施設でのサンプリングを計画したが、国内での新型コロナウイルス感染症の流行により、サンプリングができなくなった。

そこで、浴槽水中の *L. pneumophila* のモニタリングを行うために、モデル系を用いた研究を進めた。本モデル系は循環式浴槽を模したものであり、水槽、循環ポンプ、ヒーター及びろ過器モデル (礫層) から構成した。ただし、本モデル系では以前にレジオネラ症患者が発生した浴場施設で使用していたろ過装置内から得た礫を使用しており、使用に伴うエアロゾルの発生によるレジオネラ属菌への曝露に注意が必要であった。

また、検討を進めている on-site モニタリング法を一般化するための検討を進めた。現状ではポータブル・システムの光源として高出力の半導体レーザーを用いており、青色励起光しか用いることができなかった。そこで、マルチカラー解析をふまえて緑色励起光を使用できるよう、光源を検討した。さらに、現在のポータブル・システムはスーツケース・サイズであり、ケースにキャスターが付いていることから携行が可能であるが、より携行しやすくするために、アタッシュケース・サイズに小型化するための考察を行った。特定の属種の細菌の特異的な検出にあたっては、蛍光抗体を用いているが、蛍光抗体の調製が難しい細菌種をモニタリング対象とするために、核酸を用いた特異的な標識法を検討した。これらの検討結果をふまえて、河川水中の全菌数及び生菌数を on-site で測定するための方法を開発し、論文で発表した。また、野菜や食肉中の腸管出血性大腸菌 O157 数やサルモネラ数をポータブル・システムを用いて測定するための方法を作成し、論文で発表した。さらに、複数種の病原細菌をマイクロ流路デバイスを用いて同時に定量するための方法を検討し、論文を投稿した。

本研究で検討したモニタリング法は濃縮法も含めて屋外で実施可能であり、結果を得るまでに要する時間は約 90 分と迅速である。また、今回作成した画像解析ソフトウェアは、オリジナル画像と画像処理後の細菌抽出画像を並べて表示していることから、自動計数の精度を視覚的に把握しやすく、画像や映像による細菌数測定の経験が無くても、容易に利用可能である。

今後、実試料における評価を続けることにより、ポータブル・マイクロ流路システムを用いた危害微生物の on-site モニタリング法の実用性を実証できると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yusuke Tokunaga, Yuki Wakabayashi, Shinya Yonogi, Mamoru Saito, Nobuyasu Yamaguchi	4. 巻 56
2. 論文標題 Microfluidic rapid quantification of Salmonella enterica serovar Typhimurium collected from chicken meat using immunomagnetic separation after formaldehyde treatment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int. J. Food Sci. Technol.	6. 最初と最後の頁 5402-5408
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ijfs.15251	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nobuyasu Yamaguchi, Yudai Fujii.	4. 巻 43
2. 論文標題 Rapid on-site monitoring of bacteria in freshwater environments using a portable microfluidic counting system	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biol. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 87-92
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b19-00549	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yusuke Tokunaga, Nobuyasu Yamaguchi.	4. 巻 40
2. 論文標題 Rapid quantification of Escherichia coli O157:H7 in lettuce and beef using an on-chip staining microfluidic device	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Food Safety	6. 最初と最後の頁 e12851
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jfs.12851	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nobuyasu Yamaguchi, Satoko Goto.	4. 巻 230
2. 論文標題 Rapid quantification of Escherichia coli in potable water by fluorescence in situ hybridization performed in liquid (liq-FISH) and a microfluidic system	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Water, Air, & Soil Pollution	6. 最初と最後の頁 285
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11270-019-4342-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 徳永 佑亮, 若林 友騎, 余野木 伸哉, 山口 進康
2. 発表標題 免疫磁気分離法とマイクロ流路デバイスを用いた鶏肉中の食中毒原因菌の迅速モニタリング法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山口 進康, 徳永 佑亮, 齋藤 守
2. 発表標題 ポータブル・マイクロ流路システムを用いた冷却塔水中のレジオネラの迅速on-siteモニタリング
3. 学会等名 第49回建築物環境衛生管理全国大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口 進康, 徳永 佑亮, 齋藤 守
2. 発表標題 ポータブル・マイクロ流路システムを用いた冷却塔水中のレジオネラの迅速・高精度モニタリング
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口 進康, 徳永 佑亮, 後藤 聡子, 藤井 雄大, 阪野 文哉, 枝川 亜希子
2. 発表標題 マイクロ流路システムを用いた水環境中のLegionella pneumophilaの迅速on-siteモニタリング
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 徳永 佑亮, 若林 友騎, 余野木 伸哉, 山口 進康
2. 発表標題 マイクロ流路デバイスを用いた鶏肉中のサルモネラ属菌の迅速モニタリング
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口 進康, 徳永 佑亮, 後藤 聡子, 藤井 雄大, 阪野 文哉, 枝川 亜希子
2. 発表標題 マイクロ流路システムを用いた水環境中のLegionella pneumophilaの迅速on-siteモニタリング
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口 進康, 徳永 佑亮, 齋藤 守
2. 発表標題 ポータブル・システムを用いたレジオネラの迅速on-siteモニタリング
3. 学会等名 九州微生物研究フォーラム2023
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 山口進康	4. 発行年 2019年
2. 出版社 テクノシステム	5. 総ページ数 557
3. 書名 最新の抗菌・防臭・空気質制御技術	

1. 著者名 N. Yamaguchi	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Humana Press	5. 総ページ数 278
3. 書名 Foodborne Bacterial Pathogens - Methods and Protocols	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>ミクロの微生物をその場で「見る」《どこでも誰でもできる微生物検査法の研究開発》 http://www.iph.osaka.jp/s012/050/010/030/040/20180323143032.html 宇宙居住と微生物検査《宇宙生活における水の衛生微生物学的な安全確保》 http://www.iph.osaka.jp/s012/050/010/030/060/20200721151050.html 蛍光染色法を用いた水環境中の微生物数の迅速測定《微生物を可視化する》 https://www.iph.osaka.jp/s012/070/20211012152858.html</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	徳永 佑亮 (Tokunaga Yusuke)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------