

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：84407

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670062

研究課題名（和文）マイクロ流路 - FISH法による水環境中の病原細菌のon-siteモニタリング

研究課題名（英文）Rapid monitoring of harmful bacteria in aquatic environment by in liquid-fluorescence in situ hybridization

研究代表者

山口 進康（Yamaguchi, Nobuyasu）

大阪府立公衆衛生研究所・衛生化学部・総括研究員

研究者番号：20252702

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：水環境や飲食品中に存在する危害微生物を迅速かつ高精度に検出し、適切な対応を行うことにより、健康への被害を最小限に抑えることが可能となる。本研究では、危害微生物の特異的な検出法である蛍光 in situ ハイブリダイゼーション（FISH）法の操作の簡便化を目的として、「溶液中FISH法」を開発した。さらに、開発した溶液中FISH法とマイクロ流路システムを併用することにより、標的とする細菌数の変動を、煩雑な操作を行うことなく5時間以内にモニタリングできるようにした。本方法では用いる蛍光プローブを変えることにより、様々な危害微生物の検出が可能である。

研究成果の概要（英文）：Assessing microbiological quality assurance by monitoring bacteria in aquatic environment as well as food and drink is necessary for our healthy life, and the change in number of harmful bacteria should be determined as quickly as possible. Thus, “real-time” and “on-site” microbiological methods are required. In this study, we investigated “in liquid-fluorescence in situ hybridization” technique, which perform whole procedure in liquid to detect harmful microbes selectively without complex procedure. Target bacterial cells can be counted within 5 h by the combination of this new technique and our original counting system, microfluidic system.

研究分野：環境微生物学

キーワード：オンサイト・モニタリング 危害微生物 水環境 マイクロ流路デバイス 蛍光 in situ ハイブリダイゼーション

1. 研究開始当初の背景

先進国・途上国を問わず、水系感染症や食中毒が依然として大きな問題となっており、生活用水や飲食品等の衛生微生物学的安全性の確保がますます重要となっている。このために、迅速かつ簡便な危害微生物のモニタリング法、特に水環境や飲食品の衛生微生物学的評価をその場 (on-site) でリアルタイムに行うことのできる方法が求められている。

微生物の検出には培養法が広く用いられている。本方法は操作が簡便であるものの、結果を得るまでに数日から1週間以上を要する。さらに、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となっている。

そこで、培養に依存せずに危害微生物を検出するために、PCR法やLAMP法などの遺伝子増幅法が普及している。これらの方法は標的とする危害微生物だけが持つ遺伝子を検出対象とし、特異的に増幅するため、感度や精度が高いが、DNAの抽出や精製などの操作が煩雑である。

一方、蛍光染色法は遺伝子増幅法とは異なり、標的とする微生物の存在を目視で直接確認できるという特長を有し、結果も数分から数時間以内と迅速に得ることができる。蛍光染色による危害微生物の特異的な検出方法には蛍光抗体法があるが、検出対象とする細菌に特異的な抗体を作製しなければならない。しかしながら、抗体の作製が困難な微生物種も存在する。

蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (fluorescence in situ hybridization; FISH) 法は、菌体内に存在する rRNA を標的とし、蛍光標識したプローブ (蛍光プローブ) を用いて対象とする微生物を特異的に検出する方法である。プローブの配列は、検出対象とする微生物に応じて設計が可能であるため、FISH 法は様々な種類の危害微生物の検出に応用することができる。ただし、一般的な FISH 法では、ホルマリン等で固定した試料から固定液を除去した後、スライドガラスやフィルター上でハイブリダイズさせるため、操作の煩雑さが課題となっていた。

2. 研究の目的

これまで研究代表者は、細菌のモニタリング法として、マイクロ流路システムを用いた on-site モニタリングに関する研究を進めてきた。マイクロ流路システムでは、マイクロ流路デバイスに刻んだ微小流路に試料を流し、この微小流路中で蛍光染色を行うこと (on-chip 染色) により、試料中の微生物を半自動的に定量できるので、プレパレート作製等の煩雑な操作を省くことが可能である。さらに、マイクロ流路デバイスは閉鎖系であり、使用后すぐに滅菌できるため、測定時のバイオハザードのリスクを低減できる。

そこで研究代表者は、これまでの研究成果をもとに、FISH の反応をマイクロ流路デバイ

ス上で行うことにより、水環境や飲食品中の危害微生物をその場で数時間以内に検出できる方法の開発を目指している。本研究ではその第一歩として、(1) 溶液中での FISH 反応系 (溶液中 FISH 法) の開発、および (2) マイクロ流路システムを用いた溶液中 FISH 試料中の危害微生物数の測定法の検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 供試菌株

Escherichia coli W3110 株、*Acinetobacter calcoaceticus* ATCC 23055 株、*Acinetobacter haemolyticus* ATCC 17906 株、*Acinetobacter junii* ATCC 17908 株、*Acinetobacter lwoffii* ATCC 15309 株、*Aeromonas caviae* JCM 1060 株、*Burkholderia cepacia* ATCC 25416 株および *Pseudomonas mendocina* ATCC 25411 株を 37°C で、*Acinetobacter johnsonii* ATCC 17909 株および *Vibrio vulnificus* ATCC 27562 株を 30°C で培養した。必要に応じて、これらの標準菌株試料を滅菌水で段階希釈し、研究に用いた。

(2) 溶液中 FISH 法

試料にホルムアルデヒド溶液を加え、等温下で固定した。その後、ハイブリダイゼーションバッファーとプローブを加えた。プローブは、大腸菌 (*E. coli*) に特異的な Cy3 標識 ES445 プローブ (5'-CTTTACTCCCTCCTCC C-3') および非特異的な結合を検出するためのネガティブ・コントロールである Cy3 標識 NON338 プローブ (5'-ACTCCTACGGGAGGC AGC-3') を用いた。また、ハイブリダイズさせた試料に 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を終濃度が 1 μg/mL となるように添加し、遮光下で 5 分間対比染色を行った。

(3) 蛍光顕微鏡による細菌数測定

DAPI による対比染色後の試料中の細菌を、孔径 0.2 μm のポリカーボネートフィルター上に捕集し、溶液中 FISH により蛍光を発する細菌を蛍光顕微鏡の緑色励起光下で、DAPI により染色した細菌を UV 励起光下で観察した。20 視野中の細菌数を測定し、「試料 1 mL 中の細菌数 (cells/mL) = 1 視野あたりの細菌数の平均値 (cells) × 捕集面積 (mm²) / 通過した試料量 (mL) × 鏡検面積 (mm²)」として細菌数を算出した。

(4) マイクロ流路デバイス

細菌数の測定にあたり、マイクロ流路デバイスをソフトリソグラフィーにより作製した (図 1)。マスクアライナーを用いてシリコンウェハー上に微小流路の鋳型を作製し、シリコン樹脂およびカバーガラスを用いてデバイスを作製した。本デバイスには試料の注入口を 1 つ、シース液の注入口を 2 つ、排出口を 1 つ設けた。デバイスの大きさは 25 mm × 50 mm、微小流路の幅は 100 μm、深さ

は 15 μm とした。

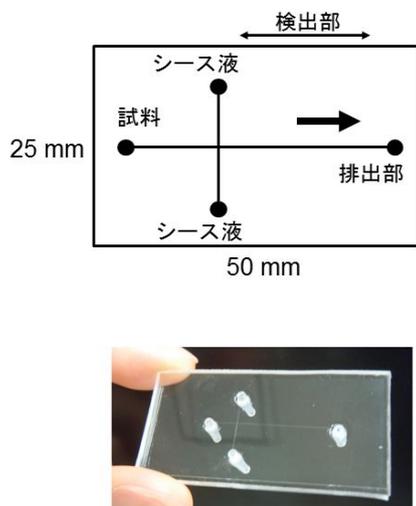


図 1 . マイクロ流路デバイス

(5) マイクロ流路システムによる細菌数測定

作製したマイクロ流路システムを図 2 に、その概要を図 3 に示した。マイクロ流路システムとは、マイクロ流路デバイスの微小流路中を流れる微生物を検出し、画像解析により計数する装置である。送液部(シリンジポンプ)、検出部(光源、対物レンズ、CCD カメラ)および制御解析部(パーソナル・コンピュータおよび画像解析ソフトウェア)から構成されている。

細菌数の測定にあたっては、溶液中 FISH 試料をガラスシリンジに充填してシステムにセットし、チューブをマイクロ流路デバイスに挿入した。また、シース液をガラスシリンジに充填し、同様にデバイスに導入した。システムのシリンジポンプを用いてガラスシリンジを一定の速度で押すことにより、マイクロ流路デバイスに試料およびシース液を定速で流した。30 秒間に流れた細菌数を測定し、これを 20 回繰り返して、「試料 1 mL 中の細菌数 (cells/mL) = 30 秒間に検出された細菌数の平均値 (cells) / 試料量 (流速 \times 測定時間) (mL)」として細菌数を算出した。



図 2 . マイクロ流路システム

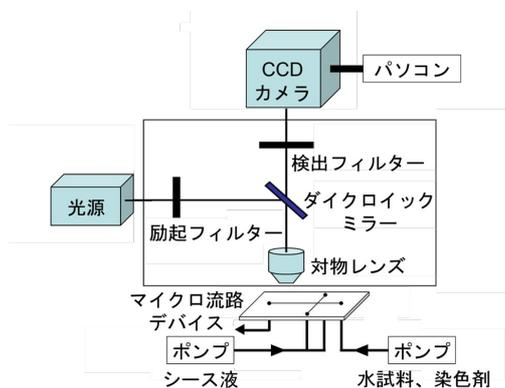


図 3 . マイクロ流路システムの概要

4 . 研究成果

(1) 溶液中 FISH 法における固定法の検討

FISH の反応を進めるにあたっては、「菌体の固定 \rightarrow 固定液の除去 \rightarrow 蛍光プローブの添加 \rightarrow ハイブリダイゼーション \rightarrow 洗浄による蛍光プローブの除去 \rightarrow 検出」等の一連の操作が必要である。特に FISH においては、蛍光プローブを菌体内に入れるために、菌体の固定操作が重要であるが、この固定液が以降の反応を阻害する。一方、固定液の除去は一般的に遠心による集菌と緩衝液への再懸濁により行われており、微小流路内でこれらの操作を行うのは困難である。そこで、固定液の除去を行わずにハイブリダイゼーションを進めるための検討を、大腸菌を用いて行った。

まず、固定液の濃度を上げた場合は、固定時間を短くすることができたが、FISH 反応が阻害された。そこで、固定液の濃度を下げたところ、FISH 反応が阻害されず、かつ、良好な蛍光シグナルを得ることができた。そこで、固定液の濃度を最適化した上で、固定の温度や時間についても最適化を行い、固定条件を決定した。

(2) 溶液中 FISH 法におけるハイブリダイゼーション条件の検討

大腸菌に特異的な ES445 プローブおよび非特異的な結合の有無を評価するためのネガティブ・コントロールである NON338 プローブを用いて、溶液中 FISH 法におけるハイブリダイゼーション条件を検討した。

ハイブリダイゼーション用バッファの組成(塩濃度および SDS 濃度)やハイブリダイゼーションの時間、添加する蛍光プローブの量を変えて反応をさせた後、各試料をフィルター上に捕集し、蛍光顕微鏡により観察したところ、ハイブリダイゼーション時間を 2 時間とした場合に、ES445 プローブでは Cy3 由来の蛍光を発したのに対し、NON338 プローブでは蛍光を発していなかった(図 4)。これらの結果をもとに、溶液中 FISH 法による大腸菌の特異的検出条件を決定した。

さらに、溶液中 FISH を行った試料の蛍光

顕微鏡像と DNA 結合性の蛍光染色剤 DAPI に対比染色した蛍光顕微鏡像を比較した結果、ES445 プローブを用いた溶液中 FISH により、ほぼすべての大腸菌を検出可能であることがわかった (図 4)。

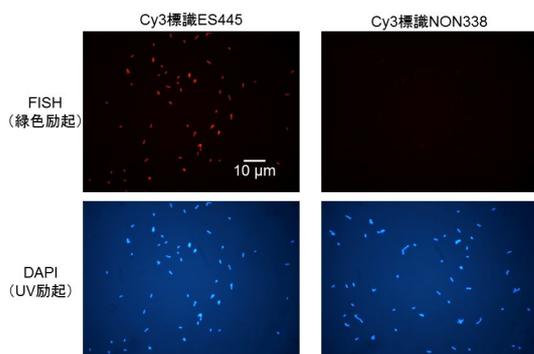


図 4 . 溶液中 FISH 法における非特異的反応の有無の確認

(3) 溶液中 FISH 法の特異性の確認

開発した溶液中 FISH 法の特異性を確認するために、ES445 プローブに対し相補的な rRNA 配列を持たない *V. vulnificus* を用いて、ES445 プローブによる溶液中 FISH を行った後、フィルター上に捕集後、蛍光顕微鏡により観察した。その結果、大腸菌はプローブ由来の蛍光を発したが、*V. vulnificus* では蛍光を発しなかった (図 5)。さらに、大腸菌とは異なる種類で水環境に生息する 8 種類の細菌 (*Ac. calcoaceticus*, *Ac. haemolyticus*, *Ac. johnsonii*, *Ac. junii*, *Ac. lwoffii*, *Aer. caviae*, *Bur. cepacia* および *Ps. mendocina*) に対して溶液中 FISH を行ったところ、大腸菌以外の細菌は蛍光シグナルを発しておらず、標的とする細菌以外に対する非特異的なハイブリダイゼーションは起こっていないことを確認した。

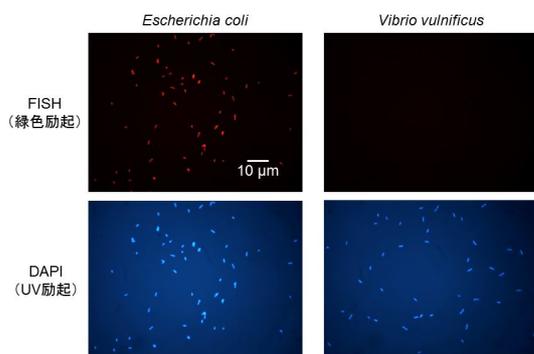


図 5 . 溶液中 FISH 法による大腸菌の特異的検出

(4) マイクロ流路システムを用いた溶液中 FISH 試料中の細菌数の測定

通常 FISH 法では、スライドガラスやフィルター上に捕集した細菌を観察・計数するため、プレパラート作製や蛍光顕微鏡の操作

の煩雑さも解決すべき課題となっている。そこで、溶液中 FISH を行った試料について、マイクロ流路システムを用いて、ろ過することなく細菌数を測定するための検討を行った。

まず、 $10^5 \sim 10^7$ cells/mL の大腸菌を含む試料について、ES445 プローブによる溶液中 FISH を行った後、マイクロ流路システムにより液中の大腸菌数を測定したところ、フィルター上に捕集した試料の蛍光顕微鏡による測定値と相関性が見られた (図 6 ; $r^2=0.98$)。さらに、水環境中では検出対象とする危害微生物の現存量が少ない場合もあり、より菌数の少ない試料に対しても、測定を実施できる必要性が考えられた。そこで、手法の定量性に影響を与えない濃縮法を検討した結果、ろ過濃縮を行うことにより、 $10^2 \sim 10^4$ cells/mL の試料に対しても、マイクロ流路システムを用いて細菌数を蛍光顕微鏡と同等の精度で測定できることを確認した ($r^2=0.96$)。

なお、溶液中 FISH 反応の開始からマイクロ流路システムによる測定値を得るまでに要した時間は約 5 時間であった。

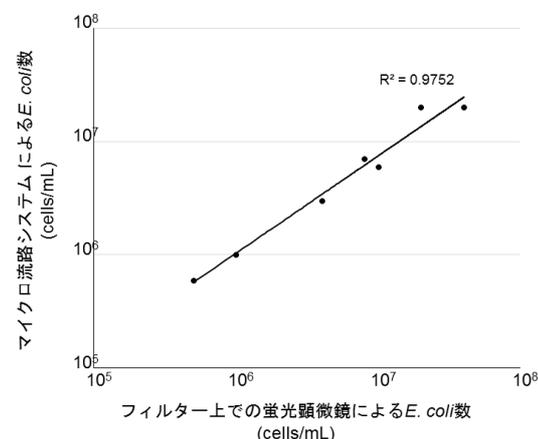


図 6 . マイクロ流路システムを用いた溶液中 FISH 試料中の細菌数測定の精度

(5) 総括

水環境や飲食品中に存在する危害微生物を迅速かつ高精度に検出し、適切な対応を行うことにより、健康への被害を最小限に抑えることが可能となる。本研究では、危害微生物の特異的な検出法である FISH 法を溶液系で行う「溶液中 FISH 法」を開発した。さらに、開発した溶液中 FISH 法とマイクロ流路システムを併用することにより、標的とする細菌数の変動を、煩雑な操作を行うことなく 5 時間以内にモニタリングできるようにした。なお本研究では大腸菌を検出対象としたが、用いる蛍光プローブの種類を変えることにより、様々な危害微生物の検出が可能である。

今回の研究では、従来の「菌体の固定 固定液の除去 蛍光プローブの添加 ハイブリダイゼーション 洗浄」と煩雑であった FISH 法のプロトコールを、「菌体の固

定 蛍光プローブの添加 ハイブリダイゼーション」と簡便化し、すべての反応を溶液中で行うことを可能とした。これは微小流路内で溶液中 FISH の反応を行う「on-chip FISH 法」の開発につながるものである。また、FISH 試料中の細菌数測定において、これまでの「ろ過によるフィルター上への菌体の捕集 プレパラート作製 蛍光顕微鏡による観察」等の操作を、マイクロ流路システムを用いることにより簡便化した。

今後、on-chip FISH 法を開発するとともに、携行可能なマイクロ流路システム（ポータブル・マイクロ流路システム）を用いた微生物数測定法を検討することにより、水環境や飲食品中の有害微生物をその場で数時間以内に検出できるようになると考えられる。

<引用文献>

N. Yamaguchi, M. Torii, Y. Uebayashi, 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).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

N. Yamaguchi, Y. Tokunaga, S. Goto, Y. Fujii, F. Banno, A. Edagawa. Rapid on-site monitoring of *Legionella pneumophila* in cooling tower water using a portable microfluidic system. Scientific Reports, 査読有, 7: 3092 (2017). doi: 10.1038/s41598-017-03293-9 <http://www.nature.com/articles/s41598-017-03293-9>

〔学会発表〕(計7件)

N. Yamaguchi, Y. Fujii, T. Tanizawa, F. Banno, M. Nasu. On-site and real-time monitoring for bacterial cells in freshwater with microfluidic system. American Society for Microbiology 2014 General Meeting. 2014. 5. 17 - 20, Boston Convention and Exhibition Center (Boston, USA)

N. Yamaguchi, Y. Fujii, T. Tanizawa, F. Banno, M. Nasu. Real-time and on-site monitoring of bacterial cells in aquatic environments by portable microfluidic system. 15th International Symposium on Microbial Ecology. 2014. 8. 24 - 29, COEX Convention Center (Seoul, Korea)

山口 進康, 藤井 雄大, 那須 正夫. 宇宙居住環境における on-site 微生物モニタリングを目指したマイクロ流路システムの開発. フォーラム 2014: 衛生薬学・環境トキシコロジー. 2014. 9.19 - 20, つくば国際会議場(茨城)

山口 進康, 藤井 雄大, 那須 正夫. 宇宙居住環境における on-site 微生物モニタリングを目指したマイクロ流路システムの開発. 環境微生物系合同大会 2014. 2014. 10. 21 - 24, アクトシティ浜松コンgresセンター(静岡)

山口 進康, 後藤 聡子, 那須 正夫. 溶液中 FISH 法の開発およびマイクロ流路システムを用いた有害細菌の特異的検出. フォーラム 2015: 衛生薬学・環境トキシコロジー. 2015. 9. 17 - 18, 神戸学院大学(兵庫)

山口 進康, 後藤 聡子, 那須 正夫. 溶液中 FISH 法の開発およびマイクロ流路システムを用いた有害細菌の特異的検出. 日本薬学会第 136 年会. 2016. 3. 27 - 29, パシフィコ横浜(神奈川)

N. Yamaguchi, S. Goto, M. Nasu. Development of liq-FISH method and selective detection of harmful bacteria with microfluidic system. 16th International Symposium on Microbial Ecology. 2016. 8. 21 - 26, Palais des Congres de Montreal (Montreal, Canada)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 進康 (YAMAGUCHI Nobuyasu)
大阪府立公衆衛生研究所・衛生化学部・
総括研究員
研究者番号: 20252702

(2) 研究分担者

一條 知昭 (20513899)
大阪大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号: 20513899