

# 磁気ビーズとマイクロ流路デバイスを用いた食中毒原因菌のオンサイト モニタリングシステムの開発

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所 食品安全課  
徳永 佑亮

## 1. 研究の目的と背景

我が国において、食中毒が依然として大きな社会問題となっている。厚生労働省のデータでは、令和4年度に国内で発生した微生物に因る食中毒発生件数は258件、患者数は3,545名である。食中毒の発生予防のためには、国内の飲食店で提供されるような食品やスーパー等で販売されている食材について、微生物の検査・管理が必須である。

食中毒原因菌の検出・同定にあたり、多くの分野ではこれまで培養法を基本としてきた。培養法は信頼性が高く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。培養を経ずに食中毒原因菌を検出する方法としてはPCR法やLAMP法などの遺伝子増幅法が普及している(Zhao *et al.* 2014)。これらの方法は標的とする細菌だけが持つ遺伝子を検出対象とし、特異的に増幅させるため、感度や精度が高い。一方、DNAの抽出や精製などの操作が煩雑であり、結果を得るまでに半日を要する。

蛍光抗体染色法は、菌表面のタンパク質に特異的に結合できる抗体を利用して細菌の検出を行う。この方法は蛍光抗体を用いるため特異性が高く、数十分から1時間以内に結果を得ることができる。さらに、DNA抽出等の煩雑な操作が必要なく、簡便に実施することができる。

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流路を刻んだ樹脂製の小型デバイスである。その特長としては、結果を得るまでの時間が早い(数分から1時間以内)、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)、閉鎖系デバイスで使用后すぐ滅菌できるため、バイオハザードのリスクを低減できるといった点がある。

そこで我々は、マイクロ流路デバイスと蛍光抗体染色法を組み合わせた培養に依存しない細菌検出を試みている。蛍光抗体染色法に必要なプレパラート作成等の煩雑な操作を省くことが可能であり、数時間で細菌の検出が可能である。これまで、独自に開発したマイクロ流路デバイスを用いて、食品中の食中毒原因菌をターゲットとした現場(オンサイト)での検出法の開発を行っている(Tokunaga *et al.* 2021; Tokunaga & Yamaguchi 2020)。一方、

これまでの検討では1回の測定につき1種類の菌を検出・定量していた。汚染された食品では、実際に測定を行うまで汚染された菌種は不明であり、本方法のファーストスクリーニング法としての有用性を向上させるにあたり、複数種の菌の同時検出・定量が課題となっていた。

本研究課題では、独自に開発したマイクロ流路デバイスを用いてオンサイトで簡便・高精度かつ、一度に複数種の食中毒原因菌の検出を可能とする迅速モニタリング法の構築を図ることを目的とした。

## 2. 方法

### 2-1. 試料

*Escherichia coli* O157:H7 (腸管出血性大腸菌 O157, ベロ毒素産生遺伝子欠損株, ATCC43888)、*Salmonella* Typhimurium (サルモネラ属菌, ATCC14028) を使用した。必要に応じてこれらの標準菌株試料をリン酸緩衝液(PBS)で希釈し、研究に用いた。試薬は Thermo Fisher Scientific、Sigma-Aldrich、富士フィルム和光純薬より購入した。

### 2-2. 食品からの細菌回収方法

食品にはまな板等を介した二次汚染の多いサラダのモデルとしてレタスを使用した。

#### ① フィルター濾過と遠心分離を用いた方法

レタス 25 g、菌及び Tween 20 を 0.05% になるように添加した緩衝ペプトン水 (BPW-T) 50 mL をフィルター付きストマッカー用袋内にて混和し、ストマッキング処理を行った。低速遠心分離 (270 ×g, 10 分間) を行い、夾雑成分を沈降させたのちに、孔径 0.2 μm のメンブレンフィルターで菌を捕集して、PBS 中に懸濁させた。

#### ② 免疫磁気分離法を用いた方法

レタス 25 g、菌および BPW-T をストマッカー用袋内にて混和し、ストマッキング処理を行った。その後、低速遠心分離を行った後に、孔径 0.2 μm のメンブレンフィルター上に菌を捕集し PBS に懸濁させた。あらかじめ抗体 (Biotin 標識 Anti-*E. coli* O157:H7 抗体、Biotin 標識

Anti-S. Typhimurium 抗体もしくは AF488 標識 Anti-S. Typhimurium 抗体) と結合させた磁気ビーズ (Dynabeads M-280 Streptavidin または Dynabeads M-280 Sheep anti-Rabbit IgG) を加えて、磁気ビーズ-菌複合体を形成させたのちに磁気分離を行った。磁気分離後、磁気ビーズと菌を遊離させて、菌のみを回収した。

### 2-3. 蛍光顕微鏡による細菌数測定

蛍光抗体 (FITC 標識 Anti-*E. coli* O157:H7 抗体と AF488 標識 Anti-S. Typhimurium 抗体) による染色後、試料中の細菌を孔径 0.2  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルター上に捕集し、蛍光を発する細菌を蛍光顕微鏡 (Nikon, E-800) の青色励起光下で観察した。10 視野中の細菌数を測定し、「試料 1 mL 中の細菌数 (cells/mL)  $\times$  1 視野あたりの細菌数の平均値 (cells)  $\times$  捕集面積 ( $\text{mm}^2$ ) / ろ過した試料量 (mL)  $\times$  鏡検面積 ( $\text{mm}^2$ )」として細菌数を算出した。

### 2-4. マイクロ流路デバイスの作製

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により作成した。マスク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 2 つ、シース液の注入口を 2 つ、排出口を 1 つ設けた。(Fig. 1)

### 2-5. 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とその概要を Fig. 2 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。①送液部 (シリンジポンプ)、②検出部 (光源、対物レンズ、CCD カメラ) および③制御解

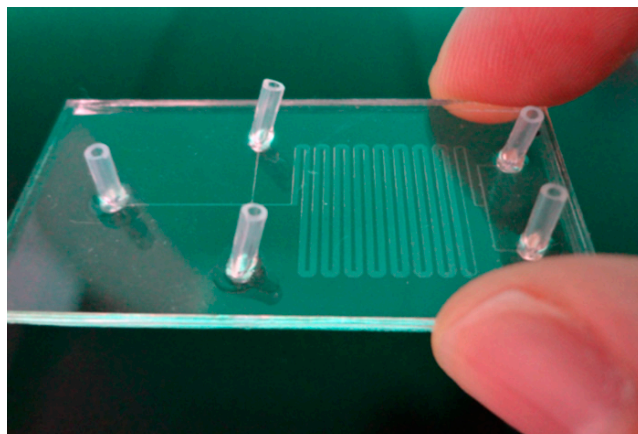


Fig. 1 作製したマイクロ流路デバイス  
デバイスの大きさ: 5 cm  $\times$  2.5 cm、材質: シリコン樹脂、カバーガラスとシリコンチューブ

析部 (パーソナル・コンピューター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、試料及び蛍光抗体溶液をガラスシリンジに充填してシステムにセットし、ガラスシリンジに連結させた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。注入されたサンプルと蛍光抗体は混合部を流れることにより自動で混合・染色が行われる (Fig. 3)。その後、検出部を流れる染色された細菌は CCD カメラを通してノート PC 上で確認することができる。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低速で流して 1 分間に流れた細菌数を測定し、これを 10 回繰り返し「試料 1 mL 中の細菌数 (cells/mL) = 1 分間に検出された細菌数の平均値 (cells) / 試料 (流速  $\times$  測定時間) (mL)」として細菌数を算出した。

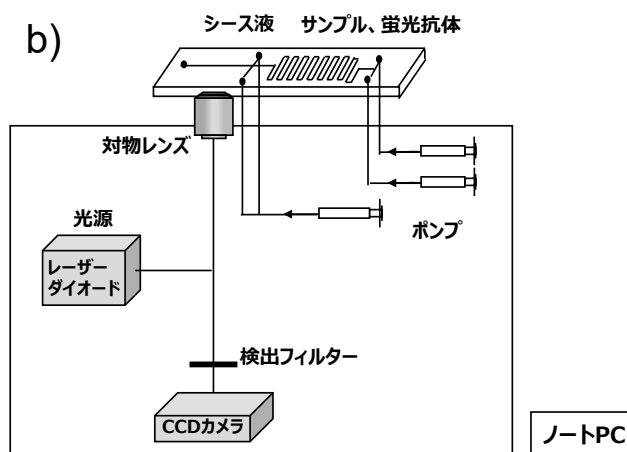
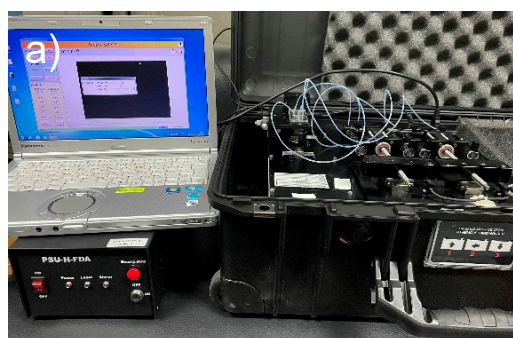


Fig. 2 作製したマイクロ流路システムとその構成

- a) マイクロ流路システムの外観写真 (マイクロ流路システム本体、解析用ノート PC 及び光源用電源)、  
b) マイクロ流路システムの構成 (サイズ: 54  $\times$  36  $\times$  23 cm; 重さ: 15 kg)

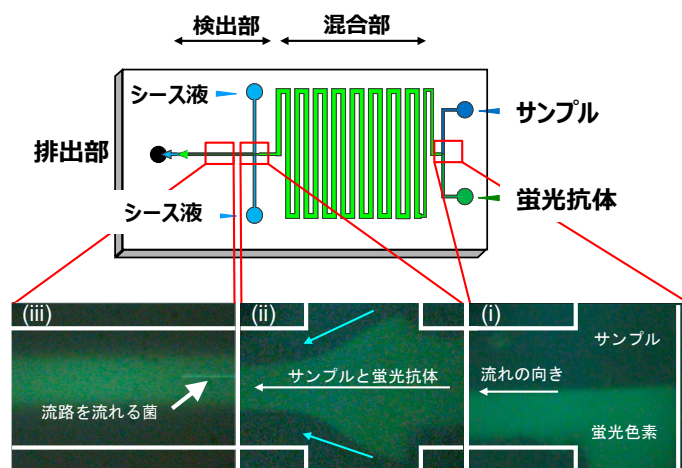


Fig. 3 マイクロ流路デバイスによる染色・検出の仕組み

マイクロ流路の幅：100  $\mu\text{m}$  (混合部以外)、500  $\mu\text{m}$  (混合部)。マイクロ流路の深さ：15  $\mu\text{m}$ 。

(i) サンプルと蛍光抗体が混ざり合う混合部、(ii) サンプルと蛍光抗体の混合液とシース液、

(iii) 検出部を流れる蛍光標識された菌

### 3. 研究結果

#### 3-1. 蛍光抗体を用いた2種の菌の同時染色

まずは、蛍光抗体を用いて染色した腸管出血性大腸菌 O157 とサルモネラ属菌を、同時に蛍光顕微鏡上で観察できるか検討を行った。その結果、染色時の抗体濃度を調整することで2種類の菌を同程度の蛍光強度で、蛍光顕微鏡上で観察することができた (Fig. 4)。

#### 3-2. 免疫磁気分離法を用いた2種の菌の回収

食品からの菌の回収には免疫磁気分離法を用いることで食品由来の夾雑成分を効率的に除去しつつ菌の回収を行うことができることを報告している (Tokunaga *et al.* 2021)。今回は磁気ビーズを用いて複数の菌を回収するにあたり、まずは Streptavidin 結合磁気ビーズを用いて検討を行った。Streptavidin 結合磁気ビーズに2種の菌に対する Biotin 標識抗体を結合させて抗体-磁気ビーズ複合体を作成した。この複合体を用いて2種の菌の回収を試みたところ、腸管出血性大腸菌 O157 の回収率と比較

して、サルモネラ属菌の回収率が低い傾向であった。そのため、磁気ビーズと抗体の複合体形成時の抗体濃度や時間等を検討したが、改善は難しかった。そのため、腸管出血性大腸菌 O157 には Streptavidin 結合磁気ビーズを、サルモネラ属菌には Anti-Rabbit IgG 結合磁気ビーズを用いて菌の回収を行った。その結果、2種の菌を同程度の回収率で回収できたことが蛍光顕微鏡を用いた計測結果から示された (Table 1, Fig. 5)。

#### 3-3. 免疫磁気分離法を用いたレタス中の2種の菌の回収

3-2. で構築した免疫磁気分離法が食品中の菌の回収でも応用できるか検討を行った。免疫磁気分離法によってどの程度のレタス由来夾雑成分が除去されているか確認するために、フィルター濾過と遠心分離法を用いて菌を回収する方法も行った。回収液を蛍光顕微鏡で観察して結果を比較すると、フィルター濾過と遠心分離を用いた方法では、レタス由来の夾雑成分が多く観察されていたのに対して、免疫磁気分離を行うことで夾雑成分のほとんどを除去できていた (Fig. 6)。

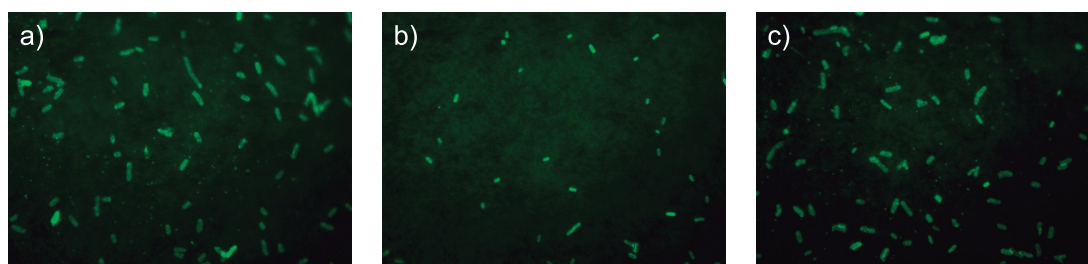
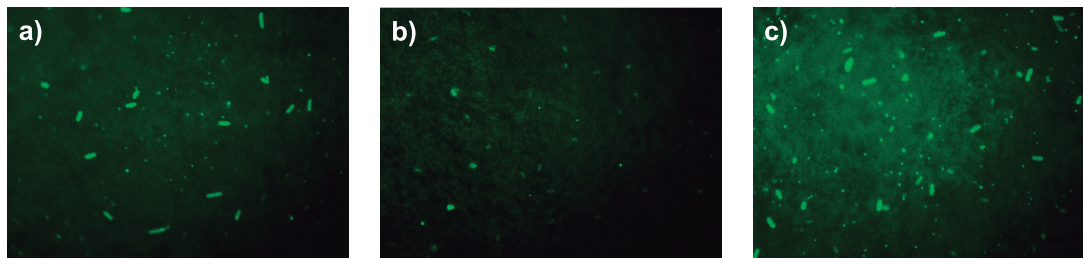


Fig. 4 腸管出血性大腸菌 O157:H7 と *S. Typhimurium* の蛍光抗体による同時染色

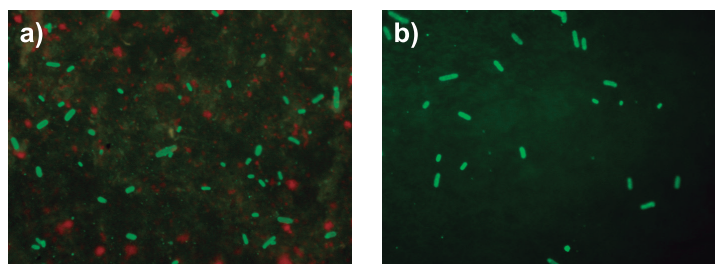
PBS 中に懸濁させた腸管出血性大腸菌 O157:H7 と *S. Typhimurium* を BSA で処理した後に a) FITC 標識 Anti-*E. coli* O157:H7 抗体のみ、b) AF488 標識 Anti-*S. Typhimurium* 抗体のみ、c) FITC 標識 Anti-*E. coli* O157:H7 抗体と AF488 標識 Anti-*S. Typhimurium* 抗体により染色を行った。その後、孔径 0.2  $\mu\text{m}$  フィルターで菌を捕集してスライドガラス上に貼り付け、蛍光顕微鏡上で観察を行った。

**Table 1** 免疫磁気分離法を用いた腸管出血性大腸菌 O157:H7 とサルモネラ属菌の回収率

		<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. Typhimurium</i>
Number of spiked cells		$1.0 \times 10^7$	$1.0 \times 10^7$
Number of collected cells	Recovered cells	$7.0 (\pm 1.0) \times 10^6$	$6.9 (\pm 1.2) \times 10^6$
	Recovery ratio (%)	70(±1.0)	69 (± 1.2)

**Fig. 5** 免疫磁気分離法を用いて回収した腸管出血性大腸菌 O157:H7 と *S. Typhimurium*

腸管出血性大腸菌 O157:H7 と *S. Typhimurium* を BPW-T 中に懸濁させて、低速遠心分離した後に孔径 0.2 μm フィルター上に捕集した。捕集したフィルターを PBS 中に再懸濁させて、抗体と結合した免疫磁気ビーズと混合して磁気分離を行った。菌と磁気ビーズを分離させたのちに a) FITC 標識 Anti-*E. coli* O157:H7 抗体のみ、b) AF488 標識 Anti-*S. Typhimurium* 抗体のみ、c) FITC 標識 Anti-*E. coli* O157:H7 抗体と AF488 標識 Anti-*S. Typhimurium* 抗体により染色を行った。その後、孔径 0.2 μm フィルターで菌を捕集してスライドガラス上に貼り付け、蛍光顕微鏡上で観察を行った。

**Fig. 6** レタス中より回収した腸管出血性大腸菌 O157:H7 と *S. Typhimurium*

腸管出血性大腸菌 O157:H7 と *S. Typhimurium* を BPW-T 中に懸濁させて、低速遠心分離した後に孔径 0.2 μm フィルター上に捕集した。捕集したフィルターを PBS 中に再懸濁させて、抗体と結合した免疫磁気ビーズと混合して磁気分離を行った。菌と磁気ビーズを分離させたのちに、a) 免疫磁気分離を行わなかったもの、b) 免疫磁気分離を行ったものそれぞれに、FITC 標識 Anti-*E. coli* O157:H7 抗体と AF488 標識 Anti-*S. Typhimurium* 抗体を用いて染色を行った。その後、孔径 0.2 μm フィルターで菌を捕集してスライドガラス上に貼り付け、蛍光顕微鏡上で観察を行った。

また、2 種の菌の添加比率を 1 : 1、1 : 4、4 : 1 と変化させて菌の回収を試みた所、2 種の菌の間に大きな回収率の差はなく、回収率は約 70% 前後と効率よく 2 種の菌を回収できていることが分かった (Table 2)。この結果より、免疫磁気分離法を用いることでレタス由来の夾雑成分を除去しつつ、菌が異なる存在比率においても効率よく菌を回収できた。

### 3-4. 免疫磁気分離法を用いてレタス中から回収した 2 種の菌のマイクロ流路デバイスでの測定

免疫磁気分離法を用いてレタス中から回収した 2 種の菌をマイクロ流路デバイスで測定した所、蛍光顕微鏡を用いて測定した値と大きな差はなく、レタス由来夾雑成分の測定系への影響は少なかった (Table 3)。また、2 種の菌の存在比率が異なる状況においても同様に効率よく測定できた。

**Table 2** 免疫磁気分離法を用いたレタス中の 2 種の菌の回収率

ratio	Number of spiked cells		Number of collected cells		Recovery Ratio (%)	
	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. Typhimurium</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. Typhimurium</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. Typhimurium</i>
1:1	$1.0 \times 10^7$	$1.0 \times 10^7$	$7.5 (\pm 1.0) \times 10^6$	$6.1 (\pm 1.1) \times 10^6$	75 (±10)	61 (± 11)
1:4	$1.0 \times 10^7$	$4.0 \times 10^7$	$8.1 (\pm 0.7) \times 10^6$	$3.1 (\pm 0.1) \times 10^7$	80 (±7.4)	77 (± 2.7)
4:1	$4.0 \times 10^7$	$1.0 \times 10^7$	$3.1 (\pm 0.1) \times 10^7$	$8.4 (\pm 0.1) \times 10^6$	78 (±3.6)	83 (± 6.7)

**Table 3** レタスより回収した2種の菌のマイクロ流路デバイスを用いた定量

ratio	Microscopic count	Microfluidic count
1:1	$1.4 (\pm 0.2) \times 10^7$	$1.6 (\pm 0.2) \times 10^7$
1:4	$3.9 (\pm 0.2) \times 10^7$	$4.3 (\pm 0.2) \times 10^7$
4:1	$3.9 (\pm 0.1) \times 10^7$	$4.1 (\pm 0.2) \times 10^7$

#### 4. 結論・考察

本研究では、免疫磁気分離法を用いることで、腸管出血性大腸菌 O157 とサルモネラ属菌をレタス中から同時に効率よく回収できた。また回収液をマイクロ流路デバイスで測定したところ、夾雑成分の測定系への影響は少ない状態で、異なる存在比率においても両菌を精度よく定量できた。これらの結果より、食中毒原因菌の検出におけるファーストスクリーニング法として本方法が有用であることが示された。

また、抗体のターゲットを変える、または抗体の組み合わせを変えることにより、自由に対象とする菌を決定できるため、今回対象とした腸管出血性大腸菌 O157 やサルモネラ属菌以外の食中毒原因菌に応用できるものと考えられる。

#### 5. 今後の課題

本研究に用いたマイクロ流路システムにおいては、単色の励起・蛍光フィルターとモノクロカメラを使用している。そのため、2種の菌を定量する場合、2種の菌数の合計値で定量を行っている。どちらの菌がどの程度含まれているかを知るためには、マイクロ流路デバイスに用いる抗体を1種類にして測定しなければならない。そのため、抗体溶液の切り替えをせずに、複数種の菌の個々の菌数を知る場合は、フィルターの切り替え機能の搭載やカラーカメラ化等の改良が必要である。

今回は2種類の食中毒原因菌を用いて検討を行ったが、一度に定量できる菌種を増やしていくには、マイクロ流路デバイスや免疫磁気分離法に使用する抗体や磁気ビーズの種類を増やしていく必要がある。一方で、6種類の菌と結

合・染色できる蛍光アプタマー (Song *et al.* 2017) 等が開発されているため、そのような最新の蛍光標識技術を取り入れることにより、本方法のさらなる応用範囲の拡大が見込まれる。

#### 6. 謝辞

本研究を遂行するにあたって、研究助成を賜りました公益財団法人東洋食品研究所、ならびに関係者の方々に厚く御礼を申し上げます。

#### 7. 参考文献

- Song, M. Y. *et al.*, 2017, Broadly reactive aptamers targeting bacteria belonging to different genera using a sequential toggle cell-SELEX. *Sci. Rep.*, **7**(1), 43641. DOI: 10.1038/srep43641.
- Tokunaga, Y.; Yamaguchi N., 2020, Rapid quantification of *Escherichia coli* O157:H7 in lettuce and beef using an on-chip staining microfluidic device. *J. Food Saf.*, **40**(6), e12851. DOI: 10.1111/jfs.12851.
- Tokunaga, Y. *et al.*, 2021, Microfluidic rapid quantification of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium collected from chicken meat using immunomagnetic separation after formaldehyde treatment. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **56**(10), p. 5402-5408. DOI: 10.1111/ijfs.15251.
- Zhao, X. *et al.*, 2014, Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens. *J. Microbiol. Biotechnol.* **24**(3), p. 297-312. DOI: 10.4014/jmb.1310.10013.