



Title	マイクロ流路デバイスを用いた食中毒原因菌の迅速オンラインサイトモニタリング方法の構築
Author(s)	徳永, 佑亮
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/101950
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏名(徳永佑亮)	
論文題名	マイクロ流路デバイスを用いた食中毒原因菌の迅速オンラインモニタリング方法の構築
論文内容の要旨	
<p>近年は生食や生鮮食品などを摂取する消費志向の高まりによって食中毒の発生が増加している。WHO（世界保健機関）によると、毎年世界中で6億人が汚染された食品を喫食して罹患し、42万人の死者が発生していると推定されており、食の安全は世界共通の課題となっている。このうち、サルモネラ属菌や腸管出血性大腸菌（<i>E. coli</i>）O157を中心とする15種の主要な細菌由来の食中毒は約30～40%を占めると推定されており、国内および国外において千人規模の細菌由来の大規模食中毒が発生している。</p> <p>細菌由来の食中毒の予防のためには、調理に使用する食材や喫食する前の食品の微生物学的衛生管理が重要である。一方で、小規模の食品製造現場のような自主的に細菌検査を行うような設備がない施設においては、検査を行うためには検査会社へ外注が必要になり、結果判明まで1週間は必要になる。さらに、避難所等の災害現場においては食中毒が発生しやすいにもかかわらず、微生物学的衛生管理が難しく、電源や場所等のリソースも限られている場合が多い。そのため、必要な時に必要な場所で細菌検査を実施できる、小型で携行可能な測定装置を使用した、迅速に食中毒原因菌を検出できる方法の構築が必要となっている。食中毒原因菌の検出及び定量においては培養法、リアルタイムPCR法やELISA法など数多くの方法が開発されている。これらの方法は、機器の使用を伴うため実験室内での操作が必要であり、結果を得るまでの時間が長い、煩雑な手作業が必要である等の課題があるため、実験室外、即ち現場（On-site：オンライン）で簡便に食中毒原因菌の検出を行うことは難しい。</p> <p>マイクロ流路デバイスは、樹脂やガラスなどを材質とする基盤上にマイクロスケールの流路を彫り込み、その中を溶液が流れ、混合及び分流することが可能なチップ型のデバイスである。細菌の検出におけるマイクロ流路デバイスの特長として、1) 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）、2) 操作が簡単で結果を得られるまでの時間が短い（数分から1時間以内）、3) 測定システムには小型で携行可能なものを作製できる等が挙げられる。そこで本研究では、食品由来夾雜成分が多く、マイクロ流路デバイスでの検出が難しい食中毒原因菌を対象としてマイクロ流路デバイスを用いた迅速オンラインモニタリング方法の構築を行った。</p> <p>まずは、食品中の細菌を回収する方法にフィルターろ過法や2段階遠心分離法を用いて、もっとも危険な食中毒原因菌の一つとして考えられている<i>E. coli</i> O157:H7の迅速オンラインモニタリング方法の構築を行った。食品には<i>E. coli</i> O157:H7の一次汚染のモデルとして牛肉を使用し、まな板等を介した二次汚染のモデルとしてレタスを使用した。培養直後の<i>E. coli</i> O157:H7を用いてマイクロ流路デバイスでの定量範囲を確認したところ、約10^3～10^6 cells/mLの範囲において定量可能であった。食品中に<i>E. coli</i> O157:H7を添加し、マイクロ流路デバイスを用いて定量を行ったところ、レタスを対象とする場合は、フィルターろ過法を用いることで8.7×10^5 cells/gの<i>E. coli</i> O157:H7を、牛肉を対象とする場合は、2段階遠心分離法を用いることで1.1×10^5 cells/gの<i>E. coli</i> O157:H7を約1時間で定量可能であった。また、食品中に含まれる一般細菌叢によるマイクロ流路デバイスを用いた測定系への影響は確認されなかった。</p> <p>フィルターろ過法や2段階遠心分離法は、食品中細菌の回収から測定までを短時間に完結させることが可能である一方、非特異的な回収方法であるため、食品由来夾雜成分と食中毒原因菌との分離を完全に行うことができなかった。一部の食中毒原因菌では少量の摂取菌数においても食中毒が成立するため、低濃度域の細菌を定量する際に実施する濃縮操作により、食品由来夾雜成分も濃縮されてしまい、マイクロ流路デバイスによる定量の妨げとなる可能性がある。そのため、回収した細菌を濃縮できるようなレベルにまで食品由来夾雜成分を除去できる方法が必要である。そこで抗体を用いた抗原抗体反応を利用した免疫磁気分離（IMS）法を用いることで食品由来夾雜成分を除去できるか検討を行った。少量の摂取菌数で食中毒が成立する菌として<i>Salmonella Typhimurium</i>を使用し、食材には<i>Salmonella</i>属菌での食中毒が多い鶏肉を用いた。IMSを用いた方法では添加した<i>Salmonella Typhimurium</i>の約70%を回収することができたが、鶏肉由来の夾雜成分を完全に除去できなかった。細菌の固定及び無毒化を目的と</p>	

してホルムアルデヒド処理を行ったところ、夾雜成分を除去しやすくする効果が得られた。そのため、IMSとホルムアルデヒド処理を併用したところ、回収率を維持したまま鶏肉由来夾雜成分のほとんどを除去できていることが分かった。これは、ホルムアルデヒド処理により筋細胞や脂肪分といった鶏肉由来の夾雜成分もしくは細菌が架橋構造形成による構造変化もしくは表面の正電荷を中和することで、夾雜成分と細菌もしくはIMSに用いる磁気ビーズとの付着性が減少したためIMSでの夾雜成分の除去が容易になったと考えられる。この方法を用いることで回収した*Salmonella Typhimurium*を濃縮することができたため、夾雜成分の影響を受けずにマイクロ流路デバイスを用いて約 $10^3\sim 10^6$ cells/gの範囲において*Salmonella Typhimurium*を精度よく定量できた。

食中毒原因菌による汚染度の高いものと低いものとの接触により広がる交差汚染は、生鮮食品に関連するアウトブレイクの要因のひとつとして考えられている。交差汚染における汚染源には生卵や生肉、生魚など多数の食品が汚染源になることが考えられるため、複数種の細菌を同時に検出できる方法の構築が必要となる。そこで、交差汚染のモデルとして用いたレタスに添加した2種の細菌 (*E. coli* O157:H7及び*Salmonella Typhimurium*) を同時に回収し、マイクロ流路デバイスを用いて定量を行った。2種類の磁気ビーズを用いてIMSを行うことでレタス中の*E. coli* O157:H7及び*Salmonella Typhimurium*を効率よく回収でき、約 $10^2\sim 10^5$ cells/gの範囲でマイクロ流路デバイスを用いて精度良く定量できた。また、レタス中に添加した*E. coli* O157:H7を約 10^1 cells/gまでマイクロ流路デバイスを用いて検出可能であり、リアルタイムPCR法や培養法と同等の検出感度を持つことが分かった。従って、マイクロ流路デバイスを用いた方法は従来の培養法やリアルタイムPCR法ではない、オンラインで測定を完結できるといった特長を持つ新たな食中毒原因菌の検出方法として有用であることが示唆された。

以上より、本研究ではオンラインで細菌を検出可能なマイクロ流路デバイスに着目し、食中毒原因菌のスクリーニング法として適応可能な新しい迅速オンラインモニタリング方法を構築することに成功した。この方法は国内のみならず、機器が十分には整備されていない途上国等においても実施可能な方法であるため、食品の衛生微生物学的衛生管理を通して世界中の食の安全の確保に貢献できるものと期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

	氏　名　（徳永佑亮）	
	(職)	氏　名
論文審査担当者	主　查　　招へい教授	山口　進康
	副　查　　教授	中川　晋作
	副　查　　教授	井上　豪

論文審査の結果の要旨

我が国では衛生水準が向上しているにもかかわらず、飲食品の大量生産化と広域の流通にともなう食中毒の規模の拡大が問題となっている。また、途上国では不衛生な飲食品の摂食により、依然として多くの子どもの命が失われている。食中毒の予防には、飲食品の衛生微生物学的評価を可能な限りリアルタイムに行なうことが有効である。本研究では、迅速・高精度な蛍光染色法とその場（オンライン）で簡便に標的微生物を定量可能なマイクロ流路システム（マイクロ流路デバイスを用いた細胞定量システム）を用いた、新たな食中毒菌モニタリング法を構築した。

まず、マイクロ流路システムを用いた食中毒菌定量の可能性を明らかにするために、レタス及び牛肉中の腸管出血性大腸菌O157:H7のモニタリング法を検討した。その結果、纖維質の多いレタスを対象とする場合はフィルターロ過法、脂肪やたんぱく質を多く含む牛肉を対象とする場合は2段階遠心分離法を用いることにより、 10^5 cells/gの腸管出血性大腸菌O157:H7を1時間で定量可能にした。

一方、フィルターロ過法や2段階遠心分離法は非特異的な回収方法であるため、低濃度の食中毒菌を定量する際はこれらの方によって濃縮された食品由来の夾雜成分がマイクロ流路デバイスによる定量の妨げとなり、少量の食中毒菌が混入した食品ではモニタリングが困難になることが考えられた。そこで次に、食品由来の夾雜成分の多い鶏肉を原因とする食中毒における主要な細菌である*Salmonella Typhimurium*を対象として、低濃度の食中毒菌をモニタリングするための方法を検討した。その結果、鶏肉からの*Salmonella Typhimurium*の回収方法に免疫磁気分離（IMS）とホルムアルデヒド処理を併用することで、食品由来の夾雜成分を高効率で除去でき、 $10^3 \sim 10^6$ cells/gの範囲において高精度に定量できた。また、病原細菌の固定剤として一般的に使用されているホルムアルデヒドを用いることで、IMSのみでは除去が困難であった鶏肉由来の夾雜成分のほとんどを除去できることを示した。

食品製造の現場においては、まな板等の調理器具を介した複数種の食中毒菌による食品の汚染が問題となっている。そこで夾雜成分の多い食品中の低濃度の食中毒菌のモニタリング法を構築した上で、複数種の食中毒菌をモニタリングするための方法を検討した。複数種の食中毒菌により汚染されやすい食品としてレタスを対象とし、複数種の免疫磁気ビーズを併用することで食品由来の夾雜成分の除去を行うことができ、複数種の食中毒菌（腸管出血性大腸菌O157:H7及び*Salmonella Typhimurium*）を3時間以内に同時に定量することを可能にした。また、培養法やリアルタイムPCR法との検出感度の比較を行ったところ、マイクロ流路システムを用いた方法はそれらの方法と同等以上の検出感度を持つことを明らかにし、食中毒菌の迅速スクリーニング法として有望であることを示した。

以上より、本研究は国内外の公衆衛生上の大きな問題の一つである食中毒の予防に大きく貢献するものであることから、博士（薬学）の学位論文に値するものと認める。