



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	<a href="https://doi.org/10.18910/101950">https://doi.org/10.18910/101950</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

令和6年度(2024年度)博士論文

マイクロ流路デバイスを用いた食中毒原因菌の  
迅速オンサイトモニタリング方法の構築

徳永 佑亮



## 目次

略語一覧 .....	2
緒論 .....	3
本論	
第一章 食中毒原因菌のモニタリング方法の構築.....	7
第二章 低濃度域の食中毒原因菌のモニタリング方法の構築.....	24
第三章 複数種の食中毒原因菌のモニタリング方法の構築.....	41
結論 .....	59
謝辞 .....	61
参考文献 .....	62

## 略語一覽

BPW	•••••Buffered peptone water
BSA	•••••Bovine serum albumin
CFU	•••••Colony forming unit
CTC	•••••Cyanoditolyt tetrazolium chloride
<i>E. coli</i>	••••• <i>Escherichia coli</i>
EHEC	•••••Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i>
ELISA	•••••Enzyme-linked immunosorbent assay
FITC	•••••Fluorescein isothiocyanate
IMS	•••••Immunomagnetic separation
ISO	•••••International organization for standardization
PBS	•••••Phosphate-buffered saline
PCR	•••••Polymerase chain reaction
PDMS	•••••Polydimethylsiloxane
SMAC	•••••Sorbitol macconkey
VBNC	•••••Viable but non-culturable
VT	•••••Verotoxin

## 緒論

食中毒は、その原因となる病原体が食品とともに摂取され、ヒトの体内に定着及び増殖した場合や、その病原体が食品に定着して毒素を産生し、それが摂取された場合に発生する。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<sup>1)</sup>。これに加えて、食品市場のグローバル化による食品輸送の複雑化及び長期化や、世界的な気候変動による気温及び水温の上昇も食中毒発生リスクの増大に寄与している。World Health Organization (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<sup>2,3)</sup>。

現在、食中毒を引き起こす病原体が200種類以上確認されている<sup>4)</sup>。アメリカのCenters for Disease Control and Prevention (CDC: 疾病対策予防センター)では食中毒の原因となる主要な31種の病原体を定めており、これらが食中毒全体の90%を占めると推定されている<sup>5)</sup>。このうち、細菌由来の食中毒は約40%を占めており、カンピロバクター属菌、サルモネラ属菌や志賀毒素産生性大腸菌 O157をはじめとする15種の主要な食中毒原因菌が挙げられている。2011年にドイツを中心とした15ヶ国で発生した発芽野菜による志賀毒素産生性大腸菌 O104:H4 のアウトブレイクでは、54人の死亡者を含む計3,816人の症例が報告された<sup>6)</sup>。国内においては、2020年に埼玉県のレストランで作られた海藻サラダによる病原性大腸菌 O7:H4 のアウトブレイクで2,958人の患者が報告されており、2023年に和歌山県の仕出し屋が提供した料理によるサルモネラ属菌のアウトブレイクでは1人の死亡者を含む117人の患者が報告されている。

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、地域の仕出し弁当屋のような小規模の食品製造現場や屠畜場等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、検体の郵送期間も含めると結果判明まで1週間は必要になるため、後追い検査になってしまう。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<sup>7-9)</sup>。

食中毒原因菌の検出及び定量においては培養法、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase chain reaction: PCR) 法や酵素結合免疫吸着測定 (Enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) 法など、数多くの方法が開発されている。

培養法は最も古くから用いられている微生物を検出する方法であり、費用対効果も高い。食中毒原因菌毎に適した培地が開発されており、例えば *Escherichia coli* (*E. coli*) O157 がソルビトール非分解性であることを利用したソルビトール・マッコンキー (Sorbitol macconkey: SMAC) 寒天培地や発色培地を使用した CHROMagar 培地が開発されており、*E. coli* O157 とそれ以外の大腸菌などを簡単に色により区別できる。一方、最終的な結果を得るまでに時間を要する点が課題である<sup>10,11)</sup>。通常、寒天培地上に播種した細菌含有試験液から目視で確認できる大きさのコロニーが形成されるまで18~24時間を必要とする。また、食品中に混入している微量の食中毒原因菌を検出するために、増菌培養、分離培養、確認培養と何段階もの工程を経る必要がある場合は、さらに日数を要する。

培養に依存しない方法(非培養法)として、リアルタイム PCR 法をはじめとする核酸検出方法が使用されている。すでに O 抗原 6 種の腸管出血性大腸菌 (Enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC) を同時に定量できるようなマルチプレックスリアルタイム PCR 法が EHEC 検出におけるスクリーニング法として使用されている<sup>12)</sup>。

一般的にこの方法は高い検出感度と特異性を持っているが、DNA 抽出中のクロスコンタミネーションや PCR 阻害物質等により、反応が失敗することがある<sup>11)</sup>。

ELISA をはじめとする免疫測定法では使用する抗体の特異性や反応性に依存した結果を得ることができ、比較的高感度に検出することができる。DebRoy らの検討では、牛ひき肉中の志賀毒素に関するタンパク質を 10~50 pg/mL の検出下限値で検出できると報告されている<sup>13)</sup>。その他の免疫測定法としては、抗体をラテックス粒子に固相化し、抗原存在下でラテックス粒子を凝集させることで検出を行う方法<sup>14)</sup> や感度上昇のために ELISA における検出を酵素基質から蛍光色素へと変更した Enzyme-linked fluorescent assay (ELFA) 法も開発されている<sup>15)</sup>。

これらの非培養法は、機器の使用を伴うため実験室内での操作が必要であり、反応時間が長い、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: オンサイト) で簡便に食中毒原因菌の検出を行うことは難しい<sup>11)</sup>。

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。その特長として、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) 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) 閉鎖系デバイスによりバイオハザードのリスクを低減できる、4) 操作が簡単、5) システムが小型であるため携行可能なものを作製できる等が挙げられる。その有用性から、公衆衛生学分野<sup>16-18)</sup>、医療分野<sup>19,20)</sup> などでの応用が検討されている。

本研究では、食品由来夾雑成分が多く、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モニタリング方法の構築を行った。第一章では食中毒原因菌の検出へのマイクロ流路デバイスを用いた方法の適応を確認するために、レタス及び牛肉中の *E. coli* O157:H7 のモニタリング方法の構築を行った。その結果をもとに、第二章では低濃度域の食中毒原因菌の検出を目指して、



免疫磁気分離 (Immunomagnetic separation: IMS) 法とマイクロ流路デバイスを組み合わせて鶏肉中の *Salmonella* Typhimurium のモニタリング方法の構築を、第三章では複数種の食中毒原因菌の検出を目指して、レタス中の *E. coli* O157:H7 と *Salmonella* Typhimurium の同時モニタリング方法の構築を行った。

## 本論

### 第一章 食中毒原因菌のモニタリング方法の構築

*E. coli* は Kauffmann らによって血清型による分類<sup>21)</sup>が行われており、現在は、O 抗原(菌体表面層のリポ多糖を構成する糖鎖ユニット)184 種類<sup>22)</sup>、H 抗原(鞭毛の主要構成タンパク質)56 種<sup>23)</sup>に分類されている。そのほとんどは腸内に常在する非病原性の細菌であるが、*E. coli* O157:H7 は激しいけいれん、血性下痢、腎不全、嘔吐を引き起こす致死性のベロ毒素(Verotoxin: VT)を産生し、最も危険な食中毒原因菌のひとつと考えられている<sup>24)</sup>。*E. coli* O157:H7 は反芻動物のなかでも特に牛の腸内に保菌されている<sup>25)</sup>。牛ひき肉や未殺菌牛乳などの一般的に食中毒リスクが高いとされている食品への *E. coli* O157:H7 の汚染は、様々な EHEC が蔓延している動物の糞便への曝露を介して、家畜の屠殺や加工時に起こると考えられている<sup>25-28)</sup>。また、牛やその他の動物の糞尿を農作物の肥料として使用すると、農作物や周辺水域が汚染されることもある<sup>4)</sup>。レタスなどの生鮮食品への交差汚染(Cross-contamination)は、収穫後の洗浄工程や、食品加工中に手やまな板を介して起こることも知られている<sup>29,30)</sup>。

食材及び食品中の *E. coli* O157:H7 の検出及び同定は、食品中の細菌を増菌培地で培養し、PCR 法を用いて VT 遺伝子と O 抗原遺伝子のスクリーニング検査が行われる<sup>31)</sup>。スクリーニング結果が陽性の場合は、分離培養を行うため、同定まで3日以上を要する。そのため、迅速な検出方法の確立が求められている。

本章では、*E. coli* O157:H7 の迅速オンサイトモニタリング方法の構築のためにマイクロ流路デバイスを用いて検討を行った。食品には *E. coli* O157:H7 の一次汚染のモデルとして牛肉を使用した。さらに、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、マイクロ流路デバイスを用いた食品中の *E. coli* O157:H7 の定量を行った。

## 【実験材料と方法】

### 細菌試料

供試菌株として、*E. coli* O157:H7（VT 遺伝子欠損株、ATCC43888）を ATCC より購入した。本菌をソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地（ダイゴ、日本製薬）で 37°C、200 rpm で 12 時間以上振盪培養した。培養した *E. coli* O157:H7 は 6,000 ×g、3 分間遠心分離を行い、滅菌済みリン酸緩衝生理食塩水（Phosphate-buffered saline: PBS、富士フイルム和光純薬）に再懸濁した。後述する蛍光顕微鏡を用いて *E. coli* O157:H7 の定量を行った後に、適切な細菌濃度に調製し、以降の実験に使用した。

### フィルターろ過法を用いたレタス中の細菌の回収

レタスは大阪市内のスーパーマーケットで購入したものを使用した。レタス 5 g、緩衝ペプトン水（Buffered peptone water: BPW、Becton Dickinson）中に Tween20（最終濃度 0.02%、Serva）を添加した滅菌済み BPW-T 溶液 50 mL と細菌濃度を調製した *E. coli* O157:H7 を滅菌済みフィルター付きストマッカー袋（ストマフィルター NEO、セントラル科学貿易）内にて混合し、ホモジナイザー（Pro-media SH II M、ELMEX）を用いて 1 分間ホモジナイズした。ストマッカー袋のフィルターを通過した懸濁液は白色ポリカーボネートメンブレンフィルター（孔径 0.2 μm、直径 47 mm、東洋濾紙）を用いてろ過した。メンブレンフィルター上に捕集した細菌は 3 mL の PBS に懸濁し、試験液とした。

### 2 段階遠心分離法を用いた牛肉中の細菌の回収

牛肉は大阪市内のスーパーマーケットで購入したものを使用した。牛肉中の細菌の回収は先行研究の報告<sup>32)</sup>を改変して行った。牛肉 25 g、BPW-T 50 mL、細菌濃度を調製した *E. coli* O157:H7 を滅菌済みストマッカー袋に入れ 1 分間ホモジナイズした。ストマッカー袋のフィルターを通過した懸濁液を 50 mL のポリプロピレン（PP）製チ

チューブに集め、170 ×g、230 ×g、または 520 ×g で 10 分間遠心分離した。その後、上清を新しい 50 mL チューブに入れ、9,170 ×g で 10 分間遠心分離した。このペレットを 3 mL の PBS に懸濁し、試験液とした。

### 蛍光顕微鏡を用いた細菌の定量

ブロッキング溶液にはウシ血清アルブミン (Bovine serum albumin: BSA、富士フィルム和光純薬) を PBS に溶解させたもの (最終濃度 12%) を使用し、使用直前に孔径 0.2 μm のフィルターでろ過して微粒子を除去した。レタスもしくは牛肉から回収した試験液 450 μL を 150 μL のブロッキング溶液と混合し、室温暗所にて 15 分間インキュベートした。その後、2 μg の Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識 Anti-*E. coli* O157:H7 Ab (polyclonal, Bactrace, KPL) を加えて、室温で 15 分間染色した。染色した細菌を黒色ポリカーボネートメンブレンフィルター (孔径 0.2 μm、直径 25 mm、東洋濾紙) を用いてろ過した後に滅菌水で 2 回洗浄した。フィルターを風乾した後、無蛍光性イマージョンオイル (Olympus) で封入し、蛍光顕微鏡 (E-800、Nikon) を用いて、青色励起下 (Nikon B-2A cube; 励起フィルター EX 450-490、ダイクロイックミラー DM 505、吸収フィルター BA 520)、倍率 100 倍の対物レンズ (Nikon) で撮影を行い、得られた画像より染色した細菌の計数を行った。

### マイクロ流路デバイスの作製

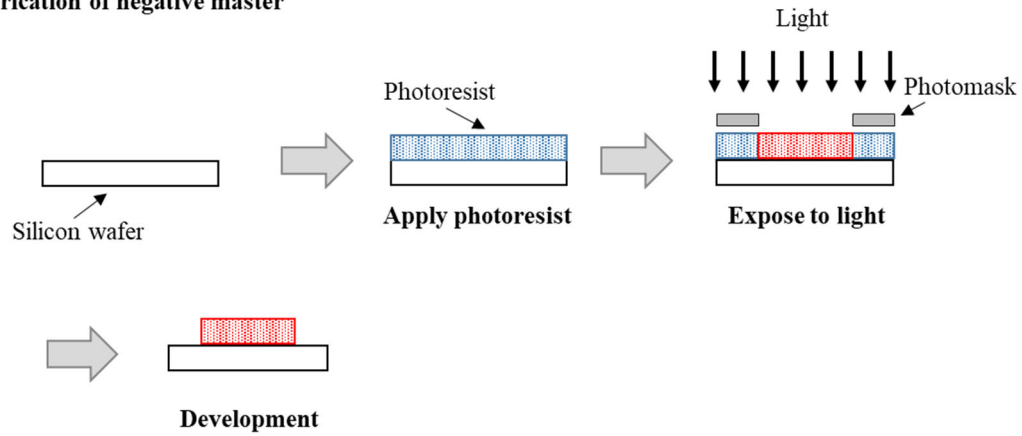
マイクロ流路デバイスの作製については、フォトリソグラフィ技術を用い、Figure 1 に示す方法で行った<sup>33,34</sup>。シリコンウエハー (片面ミラー・ダストフリー、直径 76 mm、厚さ 380 μm、セミテック) 上に 4.5 mL のネガティブフォトレジスト材 (SU-8-50、Microchem) を塗布し、スピンコーター上で 6,500~7,000 rpm で 30 秒間、8,000 rpm で 1 秒間回転させた。その後シリコンウエハーを、小型恒温チャンバー (ST-110、Espec)

を用いて 65°C、1 分間加熱した後に 95°C で加熱して SU-8-50 を硬化させた。マスクに使用するマイクロ流路パターンは透明のフィルムに印刷したもの(フィルムマスク、東京プロセスサービス)を使用した。マスクアライナー露光装置(M-1S、ミカサ)を用いてネガティブフォトリソ材をコートしたシリコンウエハーにマイクロ流路パターンを転写した。SU-8 developer(Microchem)を用いて現像した後に、イソプロパノール(富士フィルム和光純薬)を用いて 2 回洗浄を行い、乾燥させた。

Polydimethylsiloxane(PDMS) prepolymer と硬化剤(Silpot 184、東レ・ダウコーニング)を 10:1 の割合で混合し、十分に攪拌した後、真空下で脱気した。Prepolymer 混合物を、マイクロ流路パターンをプリントしたシリコンウエハー上に流し込み、130°C で 80 分間硬化させた。硬化後、シリコンウエハー上から PDMS レプリカをはがし、ペーパーポンチ(直径 2 mm)を用いて PDMS レプリカ上にアクセスポートを開けた。PDMS レプリカとカバーガラス(NEO カバーガラス、24 × 50 mm、松浪硝子工業)表面にプラズマリアクター(SEDE/V、メイワフォーシス)を用いてエッチング処理を行い、PDMS レプリカとカバーガラスを接着させた。内径 1 mm のシリコンチューブ(ARAM)を PDMS レプリカに取り付け、シリコンチューブとの接着面に Prepolymer 混合物を塗布して 120°C、40 分間加熱して再度硬化させた。非接触段差測定顕微鏡(DH2、ユニオン光学)を用いてマイクロ流路の深さを測定し、 $15 \pm 1 \mu\text{m}$  のものをマイクロ流路デバイスとして実験に使用した。

マイクロチャンネルの深さは 15  $\mu\text{m}$ 、幅は「Mixing zone」(幅 500  $\mu\text{m}$ )を除いて 100  $\mu\text{m}$  とした(Figure 2a)。

### 1. Fabrication of negative master



### 2. Fabrication of PDMS microfluidic device

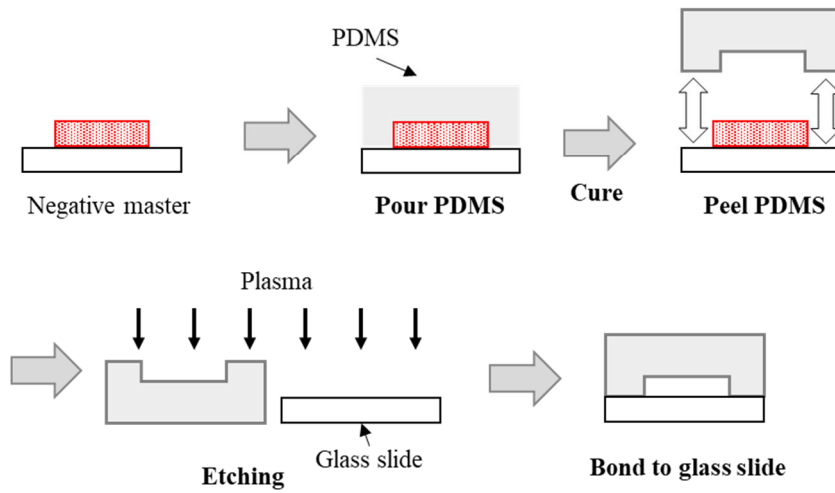


Figure 1. Fabrication scheme for PDMS microfluidic device by combining negative photoresist and soft lithography.

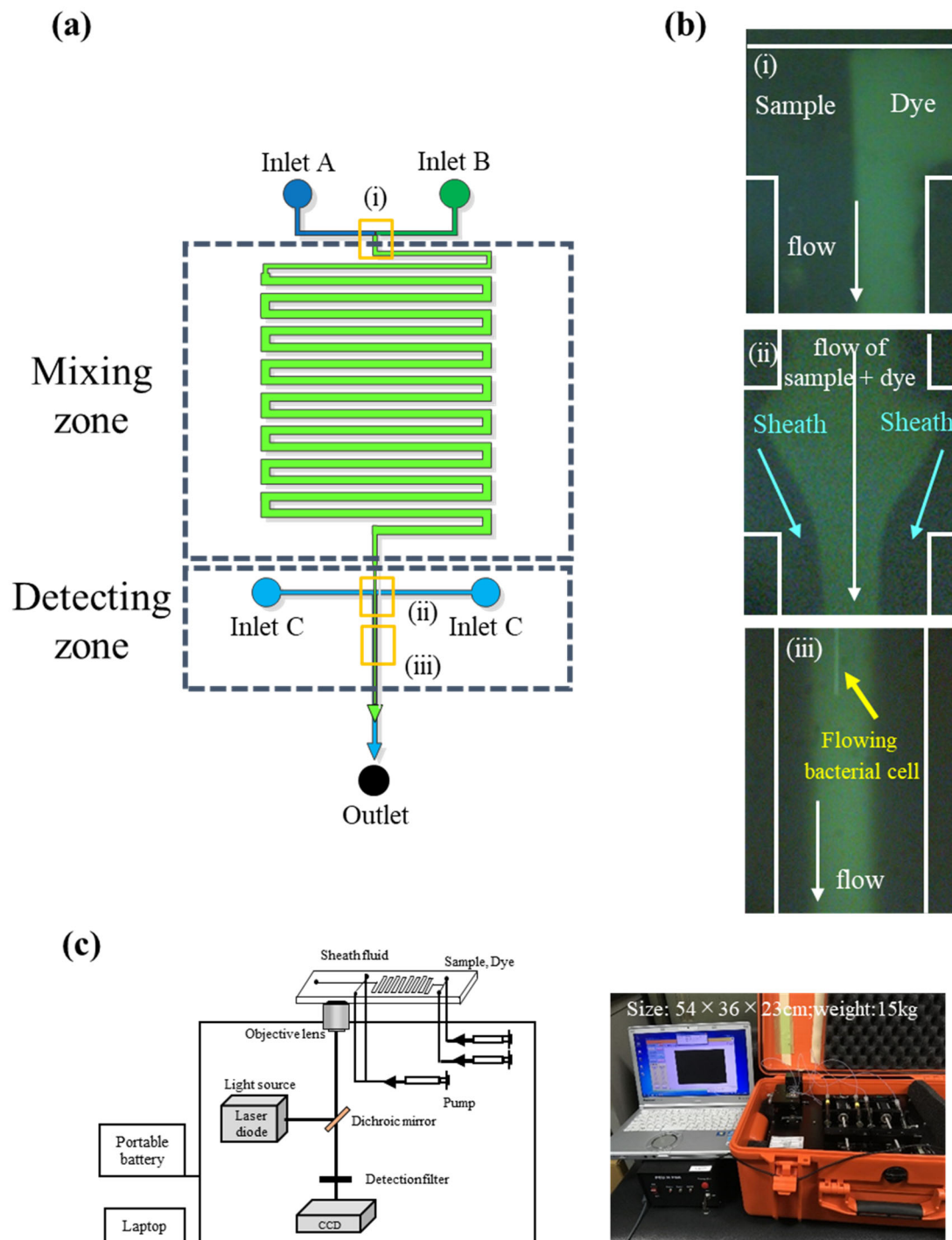


Figure 2. Microfluidic platform for rapid and continuous detection of foodborne pathogens. (a) The width of the channel is  $100\ \mu\text{m}$ , with the exception of the mixing zone ( $500\ \mu\text{m}$ ). The depth of the channel is  $15\ \mu\text{m}$ . The sample, fluorescent dye, and sheath fluid were injected at inlets A, B, and C, respectively. (b) Images of on-chip staining and counting of bacterial cells. (i) Samples and fluorescent dye solutions flow

separately and are mixed in the “mixing zone” of the microchannel. (ii) Alignment of sample flow by the sheath fluid. (iii) The flow of bacterial cells in the “detecting zone” of the microchannel. (c) Scheme and photograph of the microfluidic system for rapid bacterial detection.



### マイクロ流路システムを用いた細菌の定量

フィルターろ過法や 2 段階遠心分離法を用いて回収した細菌試験液を、BSA 濃度が 6%になるようにブロッキング液と 1:1 の割合で混合した。シース液には注射用水(大塚製薬工場)を用いた。次に、ブロッキングした細菌試験液 (Figure 2a Inlet A)、蛍光抗体 (20  $\mu\text{g/mL}$  の FITC 標識 Anti-*E. coli* O157:H7 Ab、Figure 2a Inlet B)、及びシース液 (Figure 2a Inlet C) を 100  $\mu\text{L}$  のガラスシリンジ (1710LT、Hamilton) に充填し、マイクロ流路システムに内蔵しているシリンジポンプを用いて、テフロンチューブを介してマイクロ流路デバイスに注入した (Figure 2c)。細菌試験液と蛍光抗体の流速は 0.025  $\mu\text{L}/\text{分}$ 、シース液の流速は 0.005  $\mu\text{L}/\text{分}$  で測定を行った。マイクロ流路内を流れる染色された細菌を、ダイオードレーザー (波長: 473 nm、出力: 400 mW) による青色励起光下で励起させた。蛍光抗体のシグナルを選択的に検出するために、落射蛍光顕微鏡用のフィルターブロック (Olympus U-MNB2 キューブ、ダイクロイックミラー 520IF と吸収フィルター 500 で構成) をマイクロ流路システム内に取り付けた。対物レンズ (UPlanApo 40 $\times$ 、開口数 0.85、Olympus) を通して、CCD カメラ (WAT-902H2、ワテック) を用いて 1 サンプルあたり 10~15 分間マイクロ流路デバイス内の Detecting Zone (Figure 2b-iii) を撮影した。画像解析ソフトウェア (地方独立行政法人 大阪産業技術研究所 齋藤守博士より供与) を用いて、ビデオ中の流れた細菌を処理し、カウントした。各細菌試験液中の *E. coli* O157:H7 濃度は、1 分間に Detecting Zone を流れた細菌数をマイクロ流路デバイスに注入した細菌試験液の流速で除して算出した。

### 統計解析

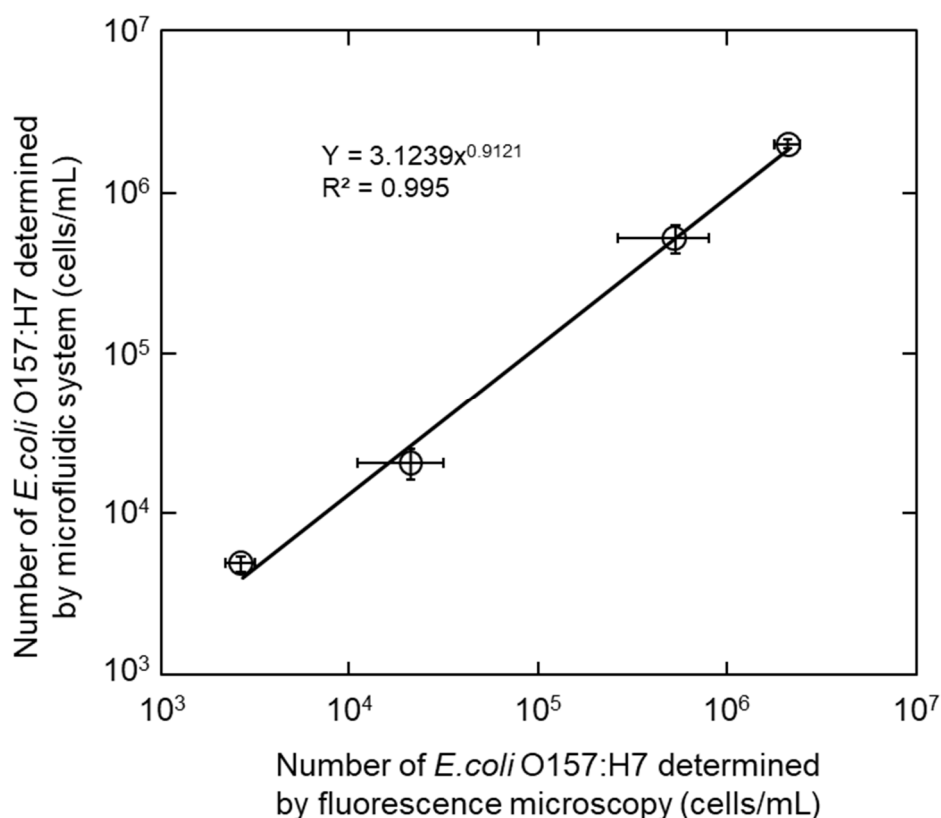
すべてのデータは、少なくとも 3 つの独立した実験結果の平均値  $\pm$  標準偏差 (Standard deviation) として表示した。各実験グループ間の統計的有意性は、Student's *t*-test を用いて分析し、有意性の基準として  $p < 0.05$  を用いた。

## 【結果】

### マイクロ流路デバイスを用いた *E. coli* O157:H7 の定量

我々はマイクロ流路デバイスを用いた細菌検出システムの開発を行っており、マイクロ流路内で微生物の蛍光染色や検出を行う on-chip 染色型マイクロ流路デバイスを開発している<sup>35)</sup>。このデバイスは、Inlet A より蛍光抗体を、Inlet B より細菌試験液を送液することで、Figure 2b- i では分かれていた溶液同士が Mixing zone において混合及び染色されて、Detecting zone の Figure 2b- iii で蛍光を発する細菌を検出できる。また、Figure 2-c に示すようにシリンジポンプを含めた測定系全体がスーツケースサイズのため携帯可能であり、ポータブルバッテリーを使用することで研究室外でも場所を選ばずにオンサイトで測定を完結できる。

マイクロ流路デバイスを用いて食品中の *E. coli* O157:H7 の回収及び定量に関する検討を行う前に、食品由来夾雑成分を含まない培養直後の *E. coli* O157:H7 を用いて定量範囲を確認した。マイクロ流路デバイスを用いて得られた *E. coli* O157:H7 の定量値と蛍光顕微鏡を用いて得られた *E. coli* O157:H7 の定量値には高い相関性があり ( $R^2 = 0.995$ )、 $2.6 \times 10^3 \sim 2.2 \times 10^6$  cells/mL の範囲内において、2 つの方法で定量した結果は同等であった (Figure 3)。細菌濃度が低い  $10^5$  cells/mL 以下においては孔径  $0.2 \mu\text{m}$  フィルターでのろ過を行い、適切な濃度まで濃縮を行うことで定量可能であった。



**Figure 3. Correlation between microfluidic counts and conventional fluorescence microscopic counts of *Escherichia coli* O157:H7.**

Diluted *E. coli* O157:H7 suspension was stained with fluorescein isothiocyanate-labeled anti-*E. coli* antibody and counted using a microfluidic device or fluorescence microscopy. Samples containing 10<sup>3</sup> cells/mL of *E. coli* O157:H7 were concentrated 1000-fold by filtration before counting, samples with 10<sup>4</sup> cells/mL of *E. coli* O157:H7 were concentrated 100-fold, and samples with 10<sup>5</sup> cells/mL of *E. coli* O157:H7 were concentrated 10-fold. Samples containing 10<sup>6</sup> cells/mL of *E. coli* O157:H7 were counted without being concentrated. Error bars indicate the standard deviation ( $n = 3$ ).

### レタス及び牛肉中の *E. coli* O157:H7 の回収と定量

本章で用いる食品には *E. coli* O157:H7 による一次汚染のモデルとして牛肉を、また板や洗浄液を介した二次汚染のモデルとしてレタスを用いた。マイクロ流路デバイスを用いて食中毒原因菌の定量を行うためには、流路の目詰まりや食品由来夾雑成分の自家蛍光による誤検出を防ぐために、マイクロ流路デバイス内への食品由来夾雑成分の混入を低減させる必要がある。本章では、*E. coli* O157:H7 を食品に添加した後に、フィルターろ過法もしくは 2 段階遠心分離法を用いて食品由来夾雑成分の除去を行い、回収率を評価した。

レタスを用いた検討では、添加した *E. coli* O157:H7 を孔径 0.2  $\mu\text{m}$  のフィルターを用いて回収及び濃縮した後に FITC 標識抗体で染色し、蛍光顕微鏡を用いて定量した。レタス 5 g に  $9.6 \times 10^6$  cells の *E. coli* O157:H7 を添加したところ、回収率は  $84 \pm 10\%$  であった (Table 1)。また、蛍光顕微鏡画像では抗体の食品由来夾雑成分への非特異的結合は観察されず、測定の影響となるような蛍光を発する食品由来夾雑成分を除去できていることが分かった (Figure 4a)。

**Table 1. Recovery ratio of *Escherichia coli* O157:H7 inoculated into lettuce or beef samples.**

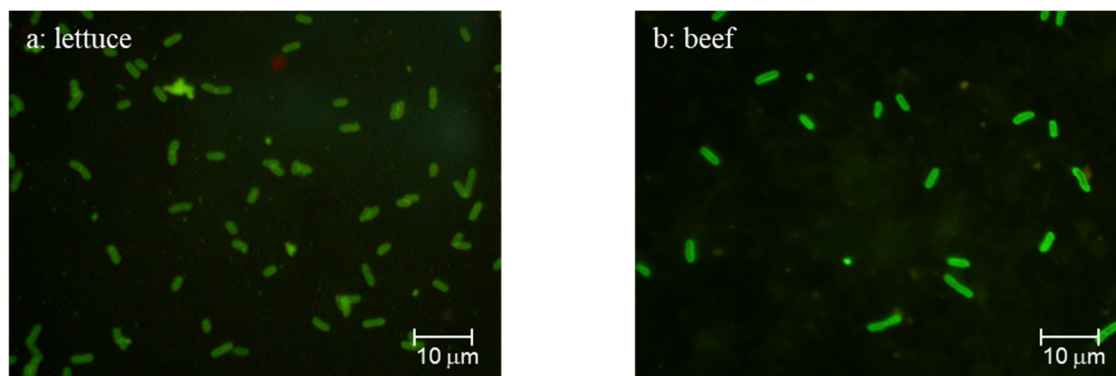
Food sample	Number of spiked cells	Number of collected cells	Recovery ratio (%)
Lettuce	$9.6 (\pm 1.2) \times 10^6$	$8.0 (\pm 1.1) \times 10^6$	$84 (\pm 10)$
Beef	$3.0 (\pm 0.2) \times 10^6$	$2.7 (\pm 0.4) \times 10^6$	$90 (\pm 7.3)$

Results are the mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 4$ ).

牛肉はレタスと比較して脂肪分などの食品由来夾雑成分が多いため、フィルターろ過を行うと目詰まりを起こしてしまう。そのため、2 段階の遠心分離を行うことで牛肉から

*E. coli* O157:H7 の回収を試みた。まずは、細菌を沈殿させずに大きな食品由来夾雑成分を除去させるための低速遠心分離時の速度を検討した。牛肉 25 g に  $3.0 \times 10^6$  cells の *E. coli* O157:H7 添加し、低速遠心分離(170、230、または 520 ×g)を行った後に、高速遠心分離(9,170 ×g)を行った。それぞれの遠心分離条件における *E. coli* O157:H7 の回収率は 91%(170 ×g)、78%(230 ×g)、77%(520 ×g)であった( $n=1$ )。最も回収率の高かった条件を採用し、以降の検討では低速遠心分離時の速度には 170 ×g を用いて実験を行った。その結果、牛肉においても 2 段階遠心分離法を用いることで  $90 \pm 7.3\%$  と高い効率で *E. coli* O157:H7 を回収できた(Table 1)。また、蛍光顕微鏡画像では、測定妨げとなるような食品由来夾雑成分の非特異的な染色は観察されなかった(Figure 4b)。

これらの結果より、フィルターろ過法もしくは 2 段階遠心分離法を用いることでレタス及び牛肉中の *E. coli* O157:H7 を高効率に回収できることが分かった。

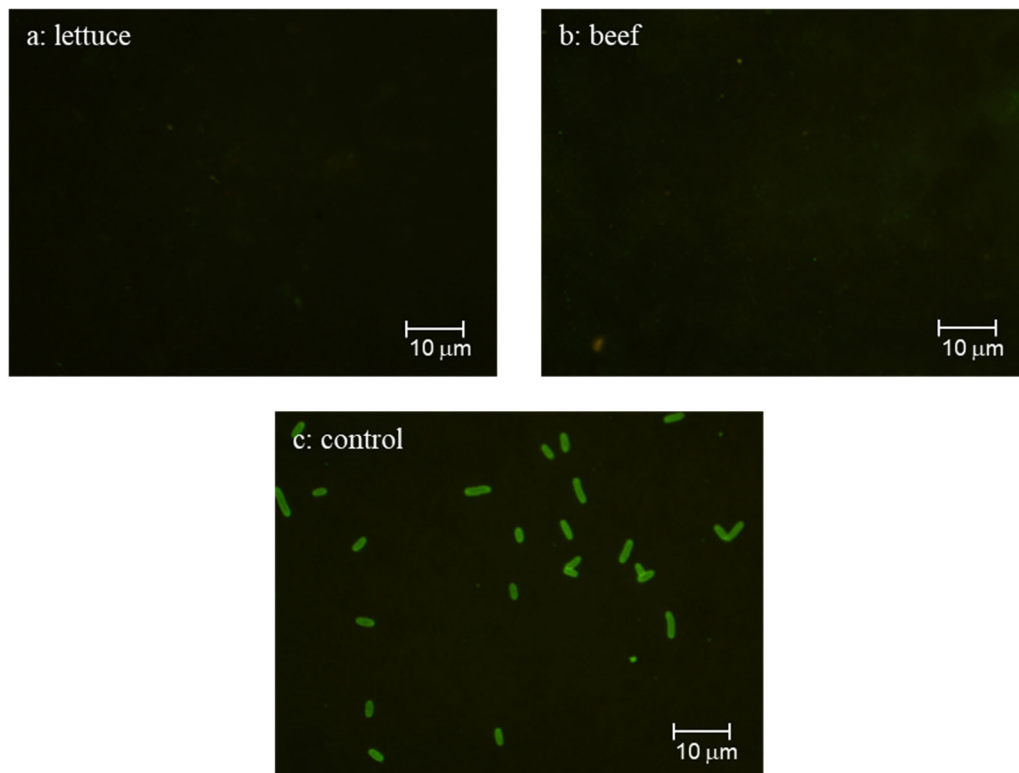


**Figure 4. Fluorescence images of *E. coli* O157:H7 cells collected from spiked lettuce and beef samples.**

*E. coli* O157:H7 cells spiked into lettuce (a) or beef (b) were collected using a 0.2-μm-pore-sized filter or by centrifugation. The collected cells were stained with *E. coli* O157:H7-specific fluorescein isothiocyanate-labeled antibodies and enumerated by fluorescence microscopy.

### レタス及び牛肉中の *E. coli* O157:H7 回収時におけるバックグラウンド細菌叢の影響

フィルターろ過法や 2 段階遠心分離法による細菌の回収及び濃縮は *E. coli* O157:H7 特異的なものではないため、一般細菌等のバックグラウンドの微生物叢も濃縮してしまう。そのため、対象外の細菌が発する自家蛍光や使用する蛍光抗体の非特異的な結合等が検出に影響を与える可能性がある。そこで、*E. coli* O157:H7 を添加しない条件でレタス及び牛肉から回収操作を行ったところ、蛍光抗体を用いた顕微鏡観察では、レタス及び牛肉から自家蛍光を発する微生物叢や蛍光抗体の非特異的な結合はないことが確認できた (Figure 5)。



**Figure 5. Influence of background microbiota in food samples concentrated by filtration and centrifugation.**

Fresh lettuce (a) or beef (b) was mixed with buffered peptone water supplemented with 0.02% Tween 20. The suspensions were concentrated by filtration or centrifugation. These supernatants or cultured *E. coli* O157:H7 (c) were resuspended in phosphate-buffered saline and stained with *E. coli* O157:H7-specific fluorescein isothiocyanate-labeled antibody, and then observed under blue excitation.

### マイクロ流路デバイスを用いたレタス及び牛肉の *E. coli* O157:H7 の定量

これまで検討した回収方法を、実際にマイクロ流路デバイスを用いて評価を行った。フィルターろ過法もしくは 2 段階遠心分離法を用いてレタス及び牛肉より回収した *E. coli* O157:H7 をマイクロ流路デバイスで定量し、蛍光顕微鏡より得られた定量値と比較した。その結果、マイクロ流路デバイスを用いて計測した定量値と蛍光顕微鏡を用いて計測した定量値に有意な差はなかった ( $p > 0.05$ , Table 2)。従って、マイクロ流路デバイスを用いてレタス及び牛肉中の *E. coli* O157:H7 を効率よく回収及び定量できることが分かった。

**Table 2. Numbers of *Escherichia coli* O157:H7 cells in lettuce or beef samples determined by fluorescence microscopy and using the microfluidic system.**

Food sample	Microscopic count (cells/g)	Microfluidic count (cells/g)
Lettuce	$7.3 (\pm 1.2) \times 10^5$	$8.7 (\pm 2.0) \times 10^5$
Beef	$1.1 (\pm 0.2) \times 10^5$	$1.1 (\pm 0.6) \times 10^5$

Results are the mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ).

また、*E. coli* O157:H7 を添加していないレタス及び牛肉から同様に回収操作を行い、マイクロ流路デバイスを用いて計測したところ、細菌と認識するようなシグナルは検出されなかった (Data not shown)。これにより、バックグラウンドの微生物叢がマイクロ流路デバイスを用いた検出に影響を及ぼさず、今回の検出が *E. coli* O157:H7 に特異的であることが分かった。

## 【考察】

本章では、レタス及び牛肉に添加した *E. coli* O157:H7 をフィルターろ過法もしくは 2 段階遠心分離法により回収し、マイクロ流路デバイスを用いて定量を行った。食品中の *E. coli* O157:H7 の回収は 30 分、マイクロ流路デバイスを用いた定量は 30 分で実施できたため、計 1 時間以内に食品中の *E. coli* O157:H7 の定量を行うことができた。通常、食品中の *E. coli* O157:H7 の検査には主に培養法を中心とした方法が用いられている。食品中の EHEC の検出において、国際的には International organization for standardization (ISO) が作成した ISO/TS 13136:2012 (Microbiology of food and animal feed — Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens — Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups) が用いられており、国内では ISO 法を元に作成された方法<sup>12)</sup> が用いられている。この方法は mEC 培地を用いて 22 ± 2 時間増菌培養を行った後に DNA 抽出を行い、リアルタイム PCR 法を用いた VT 遺伝子検出試験及び O 抗原遺伝子検出試験を行う。その後、陽性検体に対して分離培養や血清型別試験等を行う。そのため、判定までには 48 時間以上を必要とする。我々の方法は約 1 時間以内という極めて短時間で *E. coli* O157:H7 の定量を行う方法であるため、上記の一般的に用いられている検出方法の前に行う *E. coli* O157:H7 の混入の有無を判別するためのスクリーニング法として有用な方法であることが分かった。

本章では、食品試料中の細菌の回収には、フィルターろ過法または 2 段階遠心分離法を用いて行った。フィルターろ過は細菌の回収や濃縮に有用な方法<sup>36,37)</sup> であり、先行研究<sup>38)</sup> においては冷却塔水中の大きな夾雑成分を孔径 3 µm のフィルターを用いて取り除いた後に、孔径 0.2 µm のフィルターを用いて *Legionella pneumophila* を回収するのに用いた。今回、比較的食品由来夾雑成分の少ないレタスを用いた検討に



においては、孔径 0.2  $\mu\text{m}$  のフィルターを用いて容易に細菌を回収及び濃縮することができた。一方、比較的食品由来夾雑成分の多い牛肉を用いた検討では、孔径 3  $\mu\text{m}$  のフィルターを用いたろ過後に孔径 0.2  $\mu\text{m}$  のフィルターを用いて *E. coli* O157:H7 を回収する場合においても、牛肉由来の夾雑成分によってフィルターがすぐに目詰まりを起こしてしまい、フィルターろ過に 2 時間以上を要する場合もあったため、牛肉中の食中毒原因菌の回収にフィルターろ過法の適応が困難であった。そこで、遠心分離を用いた方法は牛ひき肉<sup>39)</sup> や調理済みサラダ<sup>40)</sup> でも用いられていることから、本章での牛肉中の *E. coli* O157:H7 の回収への適応を検討した。低速 (170  $\times g$ ) で遠心分離を行うことで大きな夾雑成分を除去し、高速 (9,170  $\times g$ ) で遠心分離を行うことで細菌を回収したところ、牛肉中の細菌を効率よく回収し、定量することができた。フィルターろ過法や 2 段階遠心分離法は、細菌に対する抗体の特異性を利用した IMS 法のような方法と比較して、特異性はないが、細菌をロスする工程が少ないため高い回収率で簡便に細菌を回収できる。そのため、微生物種に関係なく様々な食品から食中毒原因菌を含む細菌を分離する必要がある状況での使用に適している。

なお、本研究で使用したホモジナイザーは 17 kg だが装置自体は小型なため、自動車等を用いることで、装置の運搬が困難な場所であっても測定を行うことができる。それが難しい場合には、封をしたストマッカー袋を袋ごとよく手もみ混和させることで、食品表面に付着している食中毒原因菌を回収できると考えられる。

本検出システムの原理は、抗原抗体反応に基づいて対象とする細菌を蛍光抗体で標識及び染色を行い、その蛍光を検出することで対象とする細菌の有無を判断できる。蛍光を検出するためには励起光を当てた後に蛍光を捕捉する必要があるため、通常は蛍光顕微鏡や蛍光プレートリーダー、フローサイトメーターが必要となる。本検出システムではマイクロ流路デバイス中を流れる細菌が発する蛍光を検出するために必要なレーザー、蛍光フィルターや CCD カメラを内蔵したポータブル細菌計数システムを

構築しており、マイクロ流路デバイス内を流れる染色された細菌を直接カウントしている。本研究以外にも、マイクロ流路デバイスを用いた食品中の細菌検出方法に関する報告がされており、Wang らは、豚肉中の *Salmonella Typhimurium* を CdSe/ZnS 量子ドットで標識した抗体を用いてマイクロ流路デバイス上で検出を行っているが、豚肉の処理に 12 時間以上を要している<sup>41)</sup>。また、Düven らは牛乳中の *E. coli* と *Staphylococcus aureus* の定量をマイクロ流路デバイス上で行っているが LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit を使用した非特異的な検出であった<sup>42)</sup>。従って、今回検討した方法がこれらの方法と比較して短時間、特異的という観点から優れていることが分かった。

## 第二章 低濃度域の食中毒原因菌のモニタリング方法の構築

黄色ブドウ球菌のように、食品中で増殖した結果産生される有害な毒素を食品とともに喫食することにより食中毒を引き起こすような細菌では、食中毒症状発症に  $10^6$  CFU 以上の摂取細菌数が必要とされている<sup>43)</sup>。一方で、食品とともに摂取された細菌が腸管内で増殖した結果産生する有害な毒素により発症する *E. coli* O157:H7 や、腸管内で増殖した細菌本体が腸管内で感染を引き起こすサルモネラ属菌やカンピロバクター属菌は比較して少量の摂取菌数においても食中毒が成立することが分かっている<sup>44)</sup>。第一章で用いた食中毒原因菌の回収方法は、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、低濃度域の細菌を定量する際は濃縮操作によって食品由来夾雑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ため、少量の食中毒原因菌が混入した場合のモニタリングが困難になることが考えられた。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雑成分を除去できる方法が必要である。また、第一章で使用した2段階遠心分離法は、高速遠心分離を行う場合に 50 mL の抽出液を用いるため、持ち運びが難しい大型の遠心分離機が必要である。そのため、大型の機器を使用しない、オンサイトで実施可能な細菌の回収方法が必要であると考えた。

サルモネラ属菌は、食中毒原因菌として最も一般的な病原体のひとつであり、先述のとおり、比較的少量の摂取菌数において食中毒が発生する。サルモネラ属菌の感染により起こるサルモネラ症は世界中で年間約 9,380 万人の食中毒患者と 15.5 万人の死者を出している<sup>2,45)</sup>。*Salmonella* Typhimurium はサルモネラ属菌の中で最もよく報告される血清型のひとつであり、発展途上国のみならず、先進国での食中毒のアウトブレイクを引き起こしている<sup>46)</sup>。*Salmonella* Typhimurium による食中毒は主に加熱が不十分な肉やひき肉、乳製品、特に生卵の摂取と関連しており、感染すると発熱、吐き気、嘔吐、頭痛、下痢、衰弱を引き起こす<sup>23,47)</sup>。

本章では、鶏肉中の *Salmonella Typhimurium* を特異的に回収するために IMS を使用し、食品由来夾雑成分を完全に除去するために固定剤を併用した。回収した *Salmonella Typhimurium* を、マイクロ流路デバイスを用いて定量を行い、本方法の低濃度域の細菌に汚染された食品に対する実用性を評価した。

## 【実験材料と方法】

### 細菌試料

供試菌株として、*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium, ATCC14028) を ATCC より購入した。本菌をトリプチカーゼ・ソイ・ブロス(Becton Dickinson)で、37°C、200 rpm で 12 時間以上振盪培養した。培養した *Salmonella* Typhimurium は 6,000 ×g、3 分間遠心分離を行い、滅菌済み PBS に再懸濁した。その後、蛍光顕微鏡を用いた *Salmonella* Typhimurium の定量を行った後に、PBS を用いて適切な細菌濃度に調製し、以降の実験に使用した。

### 食品試験液の調製

鶏肉は大阪市内のスーパーマーケットから購入したものを使用した。鶏肉 25 g、50 mL の BPW-T、及び細菌濃度を調製した *Salmonella* Typhimurium をストマッカー袋に入れ、ホモジナイザーで 1 分間ホモジナイズした。ストマッカー袋のフィルターを通過した懸濁液を 50 mL チューブに集め、170 ×g で 10 分間遠心分離した。上清を新しい 50 mL チューブに入れ、白色ポリカーボネートメンブレンフィルター(孔径 0.2 μm、直径 47 mm)でろ過した。メンブレンフィルター上の細菌は 3 mL の PBS に再懸濁し、IMS に用いた。

ホルムアルデヒド処理を行うものについては、IMS を行う直前の菌液 3 mL を等量の 5% ホルマリン中性緩衝液(富士フイルム和光純薬)と混合し、15 分間インキュベートした。

2 段階遠心分離法では、ストマッカー袋のフィルターを通過した懸濁液 50 mL を 50 mL チューブに集めて、170 ×g で 10 分間遠心分離した。上清を 9,170 ×g で 10 分間遠心分離し、ペレットを 3 mL の PBS に再懸濁した。

### IMS 法を用いた細菌の回収

IMS には Anti-Rabbit IgG 抗体で表面をコートした磁気ビーズ (Dynabeads M-280 Sheep anti-Rabbit IgG, Thermo Fisher Scientific) を用いた。磁気ビーズ ( $3 \times 10^7$  個) をマグネット (Dynamag-2, Thermo Fisher Scientific) を用いて、1 mL の 0.1% BSA/PBS で 2 回洗浄し、600  $\mu$ L に懸濁した。洗浄した磁気ビーズに 3  $\mu$ g の AlexaFluor 488 標識 Anti-*Salmonella* Typhimurium Ab (polyclonal, Rabbit IgG, Bioss Antibodies) を加えて混合し、10°C で 30 分間穏やかに回転させながら抗体を磁気ビーズに結合させた。その後、1 mL の 0.1% BSA/PBS で 2 回洗浄した磁気ビーズを回収した *Salmonella* Typhimurium 懸濁液に加え、穏やかに回転させながら 10°C で 1 時間以上インキュベートした。マグネットを用いて磁気ビーズに結合した *Salmonella* Typhimurium を 1 mL の 0.1% BSA/PBS で 3 回洗浄した。最後の 0.1% BSA/PBS を除去した後に、0.1 M クエン酸溶液を 75  $\mu$ L 加えてボルテックスし、室温で 2 分間インキュベートした。その後マグネット上で 2 分間静置し、最初の溶出液を新しい 1.5 mL チューブに入れ、磁気ビーズを再び 0.1M クエン酸溶液で処理した。2 回目の溶出液を、1 回目の溶出液と合わせて、PBS を用いて 600  $\mu$ L までメスアップした。

低濃度域の細菌液の測定のために濃縮を行う場合は、IMS の溶出液を 9,170  $\times$ g、3 分間遠心分離し、ペレットを合わせて PBS に再懸濁させた。

### 蛍光顕微鏡を用いた細菌の定量

第一章に準じて行った。

*Salmonella* Typhimurium の染色には 3  $\mu$ g の AlexaFluor 488 標識 Anti-*Salmonella* Typhimurium Ab を用いた。

### マイクロ流路デバイスの作製

第一章に準じて行った。

### マイクロ流路システムを用いた細菌の定量

第一章に準じて行った。

*Salmonella* Typhimurium の染色には 20  $\mu\text{g/mL}$  の AlexaFluor 488 標識 Anti-*Salmonella* Typhimurium Ab を用いた。

### 統計解析

第一章に準じて行った。

## 【結果】

### 磁気ビーズを用いた鶏肉中の *Salmonella* Typhimurium の回収と定量

本章では、食中毒原因菌の回収方法に、抗原抗体反応を利用して対象とする細菌のみを食品由来夾雑成分から特異的に分離できる IMS 法の利用を検討した。対象とする食材と食中毒原因菌には、食品由来夾雑成分が多く含まれるもので食中毒が多く発生している細菌の組み合わせが今回のモデルとして適当と考え、鶏肉と *Salmonella* Typhimurium を選択した。

まずは、IMS 法を用いて鶏肉から *Salmonella* Typhimurium の回収を行い、蛍光顕微鏡を用いて定量を行った。さらに、2 段階遠心分離法を用いた方法の定量値と比較した。IMS 法の回収率は  $70 \pm 9\%$  であり、2 段階遠心分離法の回収率 ( $69 \pm 3\%$ ) と有意な差はなかった ( $p > 0.05$ , Table 3)。

**Table 3. Recovery ratio of *Salmonella* Typhimurium inoculated in chicken collected by immunomagnetic separation method or two step centrifugation method determined by fluorescence microscopy.**

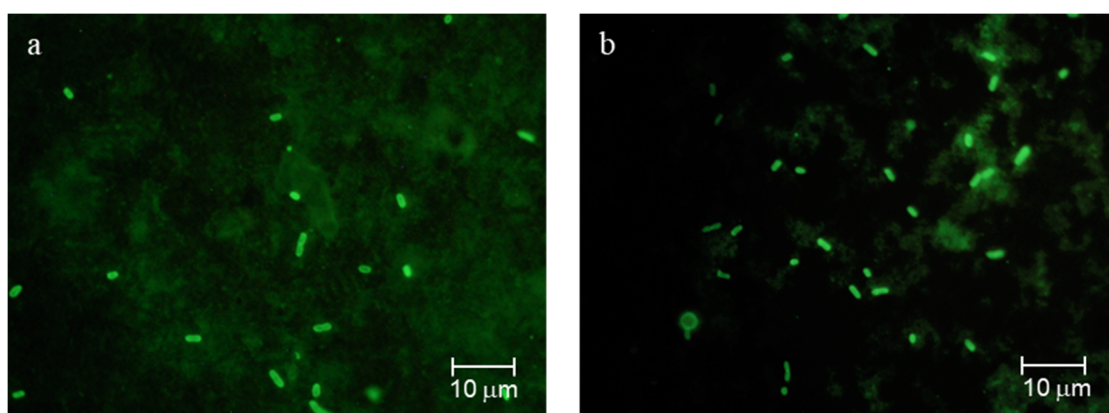
	Immunomagnetic separation	Two step centrifugation
Number of spiked cells	$4.6 \times 10^6$	$4.6 \times 10^6$
Number of collected cells	$3.3 (\pm 1.0) \times 10^6$	$3.1 (\pm 0.3) \times 10^6$
Recovery Ratio (%)	$70 (\pm 9)$	$69 (\pm 3)$

Results are the mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 4$ ).

また、食品由来夾雑成分の混入について評価したところ、IMS 法を用いた回収は、2 段階遠心分離法を用いた回収と比較して、食品由来夾雑成分(バックグラウンドで弱く蛍光を発している部分)が少ないことが蛍光顕微鏡画像より分かった (Figure 6)。

以上より、IMS 法を用いることで鶏肉中の *Salmonella* Typhimurium を、夾雑成分を除去しつつ効率よく回収できることが分かった。





**Figure 6. Fluorescence images of *Salmonella* Typhimurium cells spiked into a chicken sample and then collected using immunomagnetic separation or two-step centrifugation.**

*Salmonella* Typhimurium cells spiked into chicken samples were collected using the two-step centrifugation method (a) or the immunomagnetic separation method (b). The collected cells were stained with *Salmonella* Typhimurium-specific AlexaFluor 488-labeled antibodies and enumerated by fluorescence microscopy.

### ホルムアルデヒド処理と IMS 法を組み合わせた *Salmonella Typhimurium* の回収

ホルムアルデヒドは細胞を固定する際に一般的に使用される固定化剤である。本研究においては、ホルムアルデヒド処理を行うことで食中毒原因菌を固定及び無毒化し、バイオハザードのリスクを低減できるというメリットがある。そのため、鶏肉中の細菌を回収する際にホルムアルデヒドを用いた固定処理を行ったところ、IMS だけでは除去が難しかった夾雑成分を除去しやすくする効果が得られた。そのため、ホルムアルデヒド処理による夾雑成分除去効果を確認するとともに IMS を用いた細菌の回収に及ぼす影響を評価した。

ホルムアルデヒド処理後に IMS を実施する方法 (IMS-F 法) を行い回収した試験液と、IMS 法のみを行い回収した試験液を蛍光顕微鏡及びマイクロ流路デバイスを用いて測定し、結果を比較した。IMS 後の試験液は、いずれの方法で回収したものにおいても透明であり、目視レベルでの鶏肉由来夾雑成分の除去に差は見られなかった (Figure 7)。蛍光顕微鏡画像を比較すると、IMS-F 法を用いて回収した細菌液は IMS 法のものと比較して鶏肉由来夾雑成分とみられる蛍光が確認できず、鶏肉由来夾雑成分が完全に除去されていることが分かった (Figure 8)。蛍光顕微鏡を用いて測定した IMS-F 法及び IMS 法における回収率を比較すると、約 77% と同等であった (Table 4)。また、IMS-F 法及び IMS 法を用いて回収した細菌液をマイクロ流路デバイスで測定を用いて測定したところ、蛍光顕微鏡を用いて測定した定量値と有意な差はなかった ( $p > 0.05$ , Table 4)。

IMS-F 法による細菌の回収や濃縮では、対象とする *Salmonella Typhimurium* に加えてバックグラウンドの微生物叢が濃縮され、検出に影響を及ぼす可能性がある。*Salmonella Typhimurium* を添加していない鶏肉から IMS-F 法を用いて回収操作を実施し、蛍光顕微鏡を用いて評価したところ、Anti-*Salmonella Typhimurium* Ab に非特異的に結合して回収及び検出された細菌は確認できなかった (Figure 9)。また、マイク

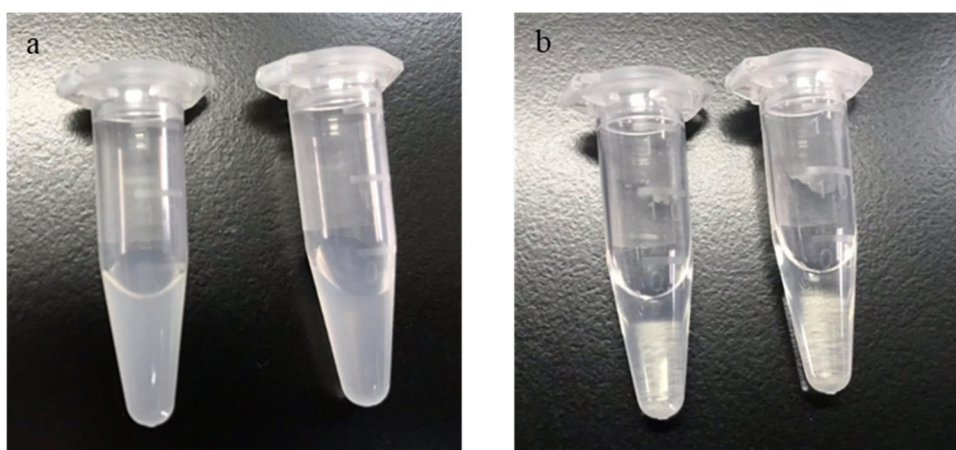
口流路デバイスを用いて評価したところ、細菌と認識されるようなシグナルは検出されなかった (Data not shown)。

**Table 4. Recovery ratios of *Salmonella* Typhimurium inoculated in chicken samples and collected by the immunomagnetic separation method or immunomagnetic separation method after formaldehyde treatment and then determined by fluorescence microscopy or using a microfluidic device.**

		Immunomagnetic separation method	Immunomagnetic separation method after formaldehyde treatment
Number of spiked cells		$9.0 \times 10^6$	$1.0 \times 10^7$
Number of collected cells	Microscope count (cells)	$6.9 (\pm 0.3) \times 10^6$	$8.0 (\pm 0.5) \times 10^6$
	Recovery ratio (%)	77 ( $\pm$ 9)	77 ( $\pm$ 5)
	Microfluidic count (cells)	$6.0 (\pm 0.8) \times 10^6$	$6.5 (\pm 0.9) \times 10^6$
	Recovery ratio (%)	67 ( $\pm$ 9)	63 ( $\pm$ 9)

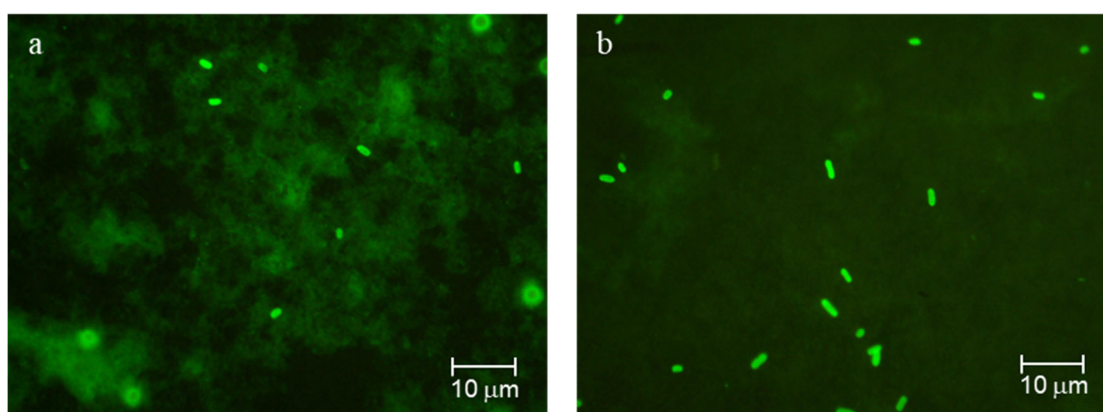
Results are the mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 4$ ).

以上より、IMS とホルムアルデヒド処理を併用することで、鶏肉由来夾雑成分を完全に除去しつつ、*Salmonella* Typhimurium を効率よく回収できることが分かった。



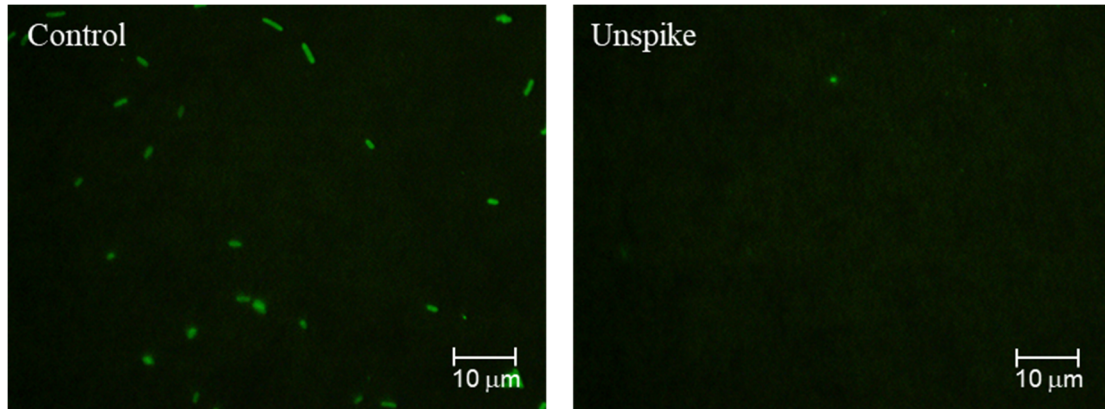
**Figure 7. Comparison of collected cell suspensions from chicken samples before and after formaldehyde treatment and/or immunomagnetic separation.**

*Salmonella* Typhimurium cells spiked in chicken samples were collected by the immunomagnetic separation method (tubes on the right in panels a and b) or immunomagnetic separation after formaldehyde treatment (tubes on the left in panels a and b). (a) Collected cell suspension before formaldehyde treatment or immunomagnetic separation. (b) Collected cell suspension after immunomagnetic separation.



**Figure 8. Effect of formaldehyde treatment before immunomagnetic separation.**

*Salmonella* Typhimurium cells spiked into chicken samples were collected using the immunomagnetic separation method (a) or the immunomagnetic separation method after formaldehyde treatment (b). The collected cells were stained with *Salmonella* Typhimurium-specific AlexaFluor 488-labeled antibodies and enumerated by fluorescence microscopy.



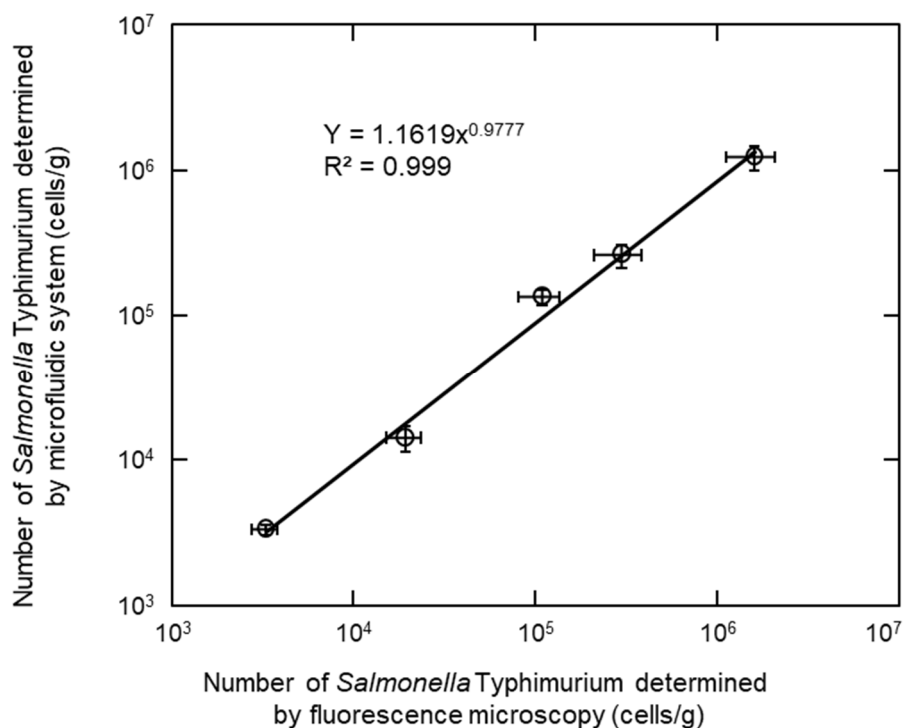
**Figure 9. Influence of background microbiota in the chicken sample concentrated by immunomagnetic separation after formaldehyde treatment.**

The chicken sample was mixed with buffered peptone water supplemented with 0.02% Tween 20. The bacterial cells in the suspensions were collected by immunomagnetic separation after formaldehyde treatment. The collected cells or *Salmonella* Typhimurium (used as control cells) were resuspended in phosphate-buffered saline, stained with *Salmonella* Typhimurium-specific AlexaFluor 488-labeled antibodies, and observed by fluorescence microscopy.

### マイクロ流路デバイスを用いた鶏肉中の *Salmonella Typhimurium* の定量範囲

マイクロ流路デバイスを用いた細菌数計測において、目的とする細菌濃度を算出する際は、1 分間にマイクロ流路デバイス中の「Detecting zone」を流れた細菌数を、マイクロ流路デバイスに注入する細菌試験液の流速で除して算出する。そのため、細菌試験液をマイクロ流路デバイスに注入する際の流速を上昇させることでマイクロ流路デバイス中を流れる細菌数が増加するため、定量下限値の低下や測定時間の短縮というメリットがあるが、マイクロ流路デバイス中を流れる細菌の速度が上がるため、細菌を見落としてしまう可能性があり、細菌試験液中の細菌数の過小評価につながる。より低濃度の細菌を定量できるようにするため、同じ細菌試験液を異なる流速 (0.025、0.005、0.1 mL/min) でマイクロ流路デバイス中に注入することで、マイクロ流路デバイスを用いた食中毒原因菌の定量における適切な流速を確認した。その結果、流速が 0.025 mL/min の場合の細菌濃度は  $4.0 \times 10^6$  cells/mL、0.05 mL/min の場合は  $4.4 \times 10^6$  cells/mL、0.1 mL/min の場合は  $1.9 \times 10^6$  cells/mL であった ( $n = 1$ )。0.1 mL/min 以上の流速においては細菌濃度の過小評価が起きる可能性が高いと考え、以降の実験ではマイクロ流路デバイスに注入する細菌試験液と蛍光抗体の流速は 0.05 mL/min で測定を行った。

マイクロ流路デバイスがどの程度の定量範囲を持っているのか調べるために、鶏肉に添加する *Salmonella Typhimurium* を減少させて回収を行い、マイクロ流路デバイスと蛍光顕微鏡を用いて定量を行った。なお、本検討においては添加した細菌数に応じて最大 67 倍濃縮もしくは最大 10 倍希釈を行い測定した。その結果、マイクロ流路デバイスを用いて得られた定量値は、蛍光顕微鏡で得られた定量値と高い相関性がみられた ( $R^2 = 0.999$ , Figure 10)。また、濃縮や希釈を行うことで、 $3.3 \times 10^3$  cells/g ～  $1.2 \times 10^6$  cells/g の範囲において精度よく定量できることが分かった。



**Figure 10. Comparison of microfluidic counts and conventional fluorescence microscopy counts of *Salmonella Typhimurium* cells spiked into and collected from chicken samples.**

Serially diluted *Salmonella Typhimurium* cells spiked into chicken samples were collected using the immunomagnetic separation method after formaldehyde treatment. The collected cells were concentrated or diluted to an appropriate concentration before enumerating. The collected cells were stained with *Salmonella Typhimurium*-specific AlexaFluor 488-labeled antibodies and enumerated by fluorescence microscopy and a microfluidic system.

## 【考察】

本章ではホルムアルデヒド処理及び IMS を併用した IMS-F 法を用いて、鶏肉から *Salmonella* Typhimurium の回収を行った。第一章で用いたフィルターろ過法や2段階遠心分離法は非特異的に細菌を回収する方法であるのに対して、IMS は抗原抗体反応に基づいているため不要な食品由来夾雑成分を除去し、対象とする細菌を特異的に回収できる方法であるため、大量の試料から少量の細菌を回収及び濃縮できる。IMS 法に用いる磁気ビーズについてはサイズや結合している表面分子など様々なタイプのものが市販化されており、DNA の精製<sup>48)</sup> や細胞分離<sup>49)</sup> など様々な場面で利用されている。また、牛ひき肉<sup>50)</sup> や牛乳<sup>51)</sup> 中の食中毒原因菌の回収にも使用されている報告がある。すでに *E. coli* O157、O26、O111、O45、O103、O121、O145、O165 に対する免疫磁気ビーズが国内で市販されており、国内の EHEC 検出の公定法<sup>12)</sup> に採用されている。O 群の免疫血清(ウサギ血清)も市販されているため、自家調製も可能である。IMS 法は抗体を変えることで検出対象とする食中毒原因菌を容易に変えられる方法であるため、本論文で使用した *E. coli* O157:H7 や *Salmonella* Typhimurium 以外にもすでに抗体が確立されている *Campylobacter jejuni* や *Listeria monocytogenes* などにも簡単に応用できる。

本章では IMS を行う前にホルムアルデヒド処理を行うことで IMS における鶏肉由来の夾雑成分の除去効率を上昇させることができた。鶏肉由来の夾雑成分としては筋肉細胞や皮下脂肪由来の脂肪分が考えられる。IMS のみでは夾雑成分が完全に除去できなかったのは、夾雑成分が細菌もしくは磁気ビーズ表面に非特異的に付着してしまったため、IMS のみでは除去できずに蛍光顕微鏡で観察されたと考えられる。ホルムアルデヒド(化学式:HCHO)は細胞の固定に使用される一般的な固定化剤であり、タンパク質中のリジン、アルギニンやシステインといったアミノ酸と反応し、メチロール基を形成することが分かっている<sup>52)</sup>。本研究においてはホルムアルデヒドが夾雑成分もし



くは細菌外膜上のリジンと結合することで表面の正電荷が中和され、静電相互作用をはじめとする非特異的相互作用が弱まったため、IMS での除去が容易になったと考えられる。本論文では夾雑成分の除去補助剤としてホルムアルデヒドしか検討していないが、ほかにも固定剤として使用されるグルタルアルデヒドやアセトン及びメタノールなども使用できる可能性があるが、抗体が結合する抗原のタンパク質構造も変化させてしまう可能性があるため注意が必要である。本章で実施した鶏肉などの夾雑成分に筋肉細胞や脂肪分を多く含むような肉類においては本アプローチが効果的と考えられる。

本検出システムはポータブルバッテリーを使用することでオンサイトでの測定を可能としており、先行研究<sup>38,53)</sup>においては、実際に温泉が湧き出る場所や池などで対象とする細菌の検出を行ってきた。IMS-F 法等で使用した装置はいずれも小型で持ち出し可能な装置や電源を必要としない装置(手回し遠心分離機など)に置き換え可能である。また、本体から直接給電可能な電気自動車を用いることで、測定システム及び測定に必要な装置の運搬が困難な現場であっても測定を完結することができる。そのため、IMS-F 法とマイクロ流路デバイスを組み合わせた検出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、オンサイトで実施可能であると考えられる。

本章においては、マイクロ流路デバイスを用いて鶏肉中の *Salmonella* Typhimurium (定量下限値:  $3.3 \times 10^3$  cells/g)を定量することができ、前章での牛肉中の *E. coli* O157:H7 の検出結果( $1.1 \times 10^5$  cells/g)よりも低濃度の細菌を定量できるようになった。この値は一般的なリアルタイム PCR 法を用いた細菌検出の際の定量下限値( $10^2$ - $10^4$  cells/g)<sup>54)</sup>と同程度であった。Kim らによる磁気ビーズとマイクロ流路デバイスを用いた研究では、鶏肉抽出液中の  $10^3$  Colony forming unit (CFU)/mL の *Salmonella* Typhimurium を検出していた<sup>55)</sup>。また、Guo らによる免疫磁気ナノスフィアとマイクロ流路デバイスを使用した研究では、牛乳中の  $5.4 \times 10^3$  CFU/mL の *Salmonella*

Typhimurium を検出していた<sup>56)</sup>。Guo らは培養能を持った *Salmonella* Typhimurium に蛍光標識を行い、その蛍光強度を測定していた一方で、我々の方法は染色した *Salmonella* Typhimurium を直接カウントするため、検出原理が異なる。そのため、直接の比較はできないが、我々の方法は Kim らと Guo らが報告している方法と同等の定量下限値(検出感度)を持っていることが分かった。

*E. coli* O157:H7<sup>57-59)</sup> や *Salmonella* Typhimurium<sup>60,61)</sup> を含めた 50 種以上の細菌において、長期間における低温保存や飢餓状態といったストレスにより培養不能な (Viable but non-culturable: VBNC) 状態になることが知られている<sup>62,63)</sup>。これは、細菌が本来持つ生存戦略の一環と考えられており、通常の寒天平板培地上や液体培地中では増殖できないが、何らかの生理代謝活性を有している。これらの細菌は低温状態からの温度上昇や豊富な栄養素を添加することで、VBNC 状態から通常の培養可能な状態へと復帰することが明らかとなっている。これまでに VBNC 状態の *E. coli* O157:H7 にメチオニン、グルタミン、スレオニン、セリン、アスパラギンを補給することで効果的に蘇生が促進され<sup>64)</sup>、カタラーゼやピルビン酸ナトリウムなどの抗酸化物質によっても蘇生が促進されること<sup>65,66)</sup> が分かっている。また、VBNC 状態の *Campylobacter jejuni* においてはマウスの腸管を複数回通過させることで蘇生され、毒性も回復することも報告されている<sup>67)</sup>。そのため、VBNC 状態の食中毒原因菌は公衆衛生上の脅威になることが示唆されている。これらの細胞の検出方法には、Propidium monoazide (PMA)-qPCR や Cyanoditolyl tetrazolium chloride (CTC)- 4,6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) などの生菌染色法が用いられる一方で、蛍光抗体による検出は目的とする細胞膜上のたんぱく質の有無に依存するため、生菌、死菌及び VBNC 状態の食中毒原因菌に結合することが分かっている。実際に我々は *E. coli* O157:H7 を 70 日間低温・低栄養状態にして VBNC 状態へと誘導させたものに対して蛍光抗体の結合を確認している (Data not shown)。本検出システムは蛍光抗体をベースとした

検出システムのため、生菌や VBNC 状態の食中毒原因菌を検出できるメリットもある一方で、死菌も検出する。死菌の検出は、食品汚染の履歴を検出し、食品汚染のリスクとして評価できるため、食中毒原因菌による汚染を検知するための first screening 法においてはメリットとなる。さらに、蛍光抗体での検出と合わせて、生菌染色に用いられる Carboxyfluorescein diacetate (CFDA、エステラーゼ活性を指標に染色)や CTC (呼吸活性を指標に染色)を検出する染色試薬を組み合わせることで、VBNC 状態の細菌の存在を評価するための方法も開発可能となる。

### 第三章 複数種の食中毒原因菌のモニタリング方法の構築

より新鮮で健康的な食生活を求める消費傾向の高まりにより、世界的に生鮮カット野菜などの食品の生産量が増加しているとともに、それら生鮮食品が食中毒の発生源となることも同様に増加している<sup>3,68)</sup>。食中毒原因菌による汚染度の高いものが低いものと接触すること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となる食品には生卵や生肉、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。

本章では、第一章と第二章で使用した *E. coli* O157:H7 及び *Salmonella* Typhimurium を用いて、レタスに添加した2種の細菌を同時に回収し、マイクロ流路デバイスを用いて定量を行った。また、マイクロ流路デバイスを用いた検出方法と培養法やリアルタイム PCR 法と検出感度の比較を行った。

## 【実験材料と方法】

### 細菌試料

供試菌株として、*E. coli* O157:H7 (ATCC43888) 及び *Salmonella* Typhimurium (ATCC14028) を用いた。

*E. coli* O157:H7 及び *Salmonella* Typhimurium においてはそれぞれ第一章と第二章に準ずる方法で、培養、洗浄及び細菌濃度の計数を行った。洗浄後はそれぞれ PBS を用いて適切な細菌濃度に調製し、以降の実験に使用した。

### 食品試験液の調製

レタスは大阪市内のスーパーマーケットから購入したものを使用した。レタス 25 g、50 mL の BPW-T と細菌濃度を調製した *E. coli* O157:H7 と *Salmonella* Typhimurium を、ストマッカー袋に入れ、ホモジナイザーで 1 分間ホモジナイズした。以降の操作は第二章に準ずる方法で行った。鶏肉と比較してレタスは夾雑成分が少ないため、本章では IMS 前のホルムアルデヒド処理は行わずに実験を行った。

### IMS 法を用いた細菌の回収

*E. coli* O157:H7 に対する IMS には Biotin 標識 Anti-*E. coli* O157:H7 Ab (polyclonal、Bactrace、KPL) と Streptavidin をコートした磁気ビーズ (Dynabeads M-280 Streptavidin、Thermo Fisher Scientific) を、*Salmonella* Typhimurium に対しては AlexaFluor 488 標識 Anti-*Salmonella* Typhimurium Ab と Anti-Rabbit IgG 抗体でコートした磁気ビーズを使用した。

Streptavidin をコートした磁気ビーズ ( $3 \times 10^7$  個) には 6  $\mu\text{g}$  の Biotin 標識 Anti-*E. coli* O157:H7 Ab を、Anti-Rabbit IgG 抗体でコートした磁気ビーズ ( $3 \times 10^7$  個) には 3  $\mu\text{g}$  の AlexaFluor 488 標識 Anti-*Salmonella* Typhimurium Ab を加えて混合し、10°C で

30 分間穏やかに回転させた。レタスより回収した *E. coli* O157:H7 と *Salmonella* Typhimurium 混合試験液に洗浄した各磁気ビーズを同時に加え、穏やかに回転させながら 10°C で 1 時間以上インキュベートした。以降の操作は第二章に準ずる方法で行った。

### 蛍光顕微鏡を用いた細菌の定量

第一章に準じて行った。

*E. coli* O157:H7 の染色には 2 µg の FITC 標識 Anti-*E. coli* O157:H7 Ab を、*Salmonella* Typhimurium の染色には 3 µg の AlexaFluor 488 標識 Anti-*Salmonella* Typhimurium Ab を用いた。

### マイクロ流路デバイスの作製

第一章に準じて行った。

### マイクロ流路システムを用いた細菌の定量

第二章に準じて行った。

レタスより回収した *E. coli* O157:H7 及び *Salmonella* Typhimurium を同時に検出するために、蛍光抗体には、20 µg/mL の FITC 標識 Anti-*E. coli* O157:H7 Ab と 20 µg/mL の AlexaFluor 488 標識 Anti-*Salmonella* Typhimurium Ab を含有する混合液を調製し、実験に使用した。

低濃度域の細菌の測定を行う場合は、IMS の溶出液を 4～67 倍の間で適切な濃度になるように濃縮操作を行った後に測定を行った。

### 培養法を用いた細菌の検出

セフィキシム(0.05 mg/mL)及び亜テルル酸カリウム(2.5 mg/L)を添加した SMAC 寒天培地(CT-SMAC 培地、日水製薬)上に、PBS を用いて段階希釈したホモジナイズ後の *E. coli* O157:H7 含有懸濁液 100  $\mu$ L を塗布した。寒天培地を 37°C で 24 時間培養し、寒天培地上の *E. coli* O157:H7(透明なコロニー)の確認を行った。

### リアルタイム PCR 法を用いた細菌の検出

ホモジナイズ後の *E. coli* O157:H7 含有懸濁液 1 mL を、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)用いて、最終溶出量 400  $\mu$ L で DNA 抽出を行った。抽出した DNA の濃度と純度は、Multiskan SkyHigh spectrometer(Thermo Fisher Scientific)を用いて測定した。フォワードプライマーとして 5'-TTTCA CACTT ATTGG ATGGT CTCAA-3' (*rfbE*-F)、リバープライマーとして 5'-CGATG AGTTT ATCTG CAAGG TGAT-3' (*rfbE*-R)、プローブとして 5'-6-FAM-AGGAC CGCAG AGGAA AGAGA GGAAT TAAGG-5-TAMRA-3' (*rfbE*-P) をリアルタイム PCR に用いた。これらのプライマー及びプローブは *E. coli* O157:H7 の O 抗原内の *rfbE* 遺伝子をターゲットとしている<sup>69,70</sup>。

リアルタイム PCR 反応液は全量を 10  $\mu$ L とし、抽出した DNA 1  $\mu$ L、20  $\mu$ M の *rfbE*-F 及び *rfbE*-R プライマー各 0.12  $\mu$ L(最終濃度 240 nM)、5  $\mu$ M の *rfbE*-P プローブ 0.12  $\mu$ L(最終濃度 60 nM)、FastStart Universal Probe Master(ROX、ロシュ・ダイアグノスティックス)5  $\mu$ L、RNase and DNase free water 3.64  $\mu$ L とした。反応は、LightCycler 96 システム(ロシュ・ダイアグノスティックス)を用い、条件は 95°C で 2 分間、続いて 95°C で 15 秒間と 60°C で 1 分間のサイクルを 40 回繰り返した。

### 統計解析

第二章に準ずる方法で行った。

検出感度実験に関しては 2 つの独立した試験実験を基に評価を行った。リアルタイム PCR のデータは LightCycler96 SW 1.1 ソフトウェアを用いて解析した。



## 【結果】

### IMS 法を用いた *E. coli* O157:H7 及び *Salmonella* Typhimurium の回収

本章では、*E. coli* O157:H7 または *Salmonella* Typhimurium に特異的な抗体をそれぞれ結合させた 2 種類の磁気ビーズを用いて、2 種の細菌の回収を行った。磁気ビーズ同士の凝集などの影響を調査するため、食品を添加せずに 2 種の細菌が同時に回収できるか確認した。それぞれの細菌の回収率は、 $70 \pm 10\%$  (*E. coli* O157:H7)、 $69 \pm 12\%$  (*Salmonella* Typhimurium) であり、2 種類の磁気ビーズ使用に伴う凝集等の影響はなく、高効率に *E. coli* O157:H7 及び *Salmonella* Typhimurium を同時に回収できることが分かった (Table 5)。

**Table 5. Numbers and recovery of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium cells collected by immunomagnetic separation and then determined by fluorescence microscopy**

	<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 recovered cells	$7.0 (\pm 1.0) \times 10^6$	$6.9 (\pm 1.2) \times 10^6$
Recovery (%)	$70 (\pm 10)$	$69 (\pm 12)$

Results shown are means  $\pm$  standard deviations ( $n = 4$ ).

### IMS 法を用いたレタス中の *E. coli* O157:H7 及び *Salmonella* Typhimurium の回収

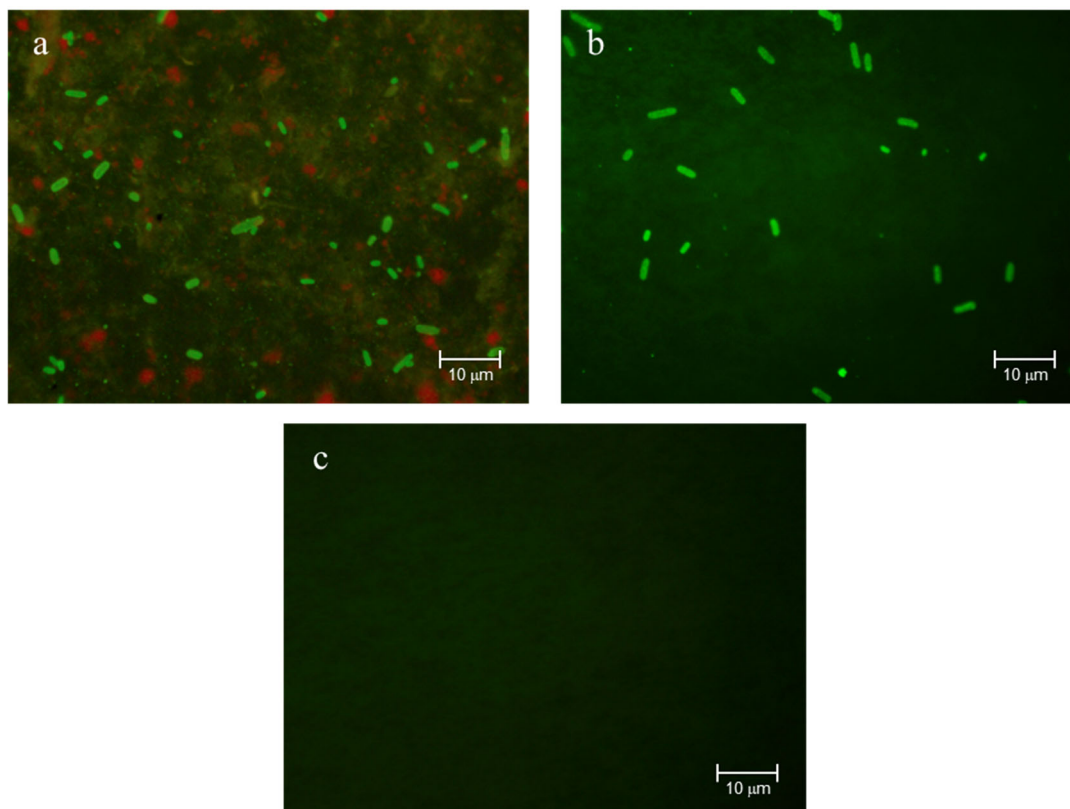
本章では、複数種の食中毒原因菌に汚染された生鮮食品のモデルとしてレタスを選択した。*E. coli* O157:H7 及び *Salmonella* Typhimurium をレタスに単独または同時に添加し、IMS 法を用いて細菌を回収した後に蛍光顕微鏡で回収率を算出した。2 種の菌を同時に添加する際は異なる比率にて添加を行った。*E. coli* O157:H7 及び *Salmonella* Typhimurium を単独でレタスに添加した場合の回収率は、それぞれ  $78 \pm 6.0\%$  (*E. coli* O157:H7) 及び  $84 \pm 5.6\%$  (*Salmonella* Typhimurium) であった (Table 6)。異なる添加比 (*E. coli* O157:H7 : *Salmonella* Typhimurium) における回収率は、添加比 1:1 では  $75 \pm 10\%$  (*E. coli* O157:H7) 及び  $61 \pm 11\%$  (*Salmonella* Typhimurium)、添加比 1:4 では、 $80 \pm 7.4\%$  (*E. coli* O157:H7) 及び  $77 \pm 2.7\%$  (*Salmonella* Typhimurium)、添加比 4:1 では  $78 \pm 3.6\%$  (*E. coli* O157:H7) 及び  $83 \pm 6.7\%$  (*Salmonella* Typhimurium) であった。IMS 前後の蛍光顕微鏡画像を比較すると、IMS 法を用いることでレタス由来の食品夾雑成分が効果的に除去されていることが分かった (Figure 11a、b)。また、細菌を添加しない場合においても蛍光顕微鏡画像上は非特異的な染色は確認されなかったことから、IMS 法を用いた回収時における微生物叢の影響や抗体の非特異的結合に伴う一般細菌の検出は認められなかった (Figure 11c)。以上より、IMS 法を用いることでレタスに添加した *E. coli* O157:H7 及び *Salmonella* Typhimurium を効率よく回収できることが分かった。

**Table 6. Numbers and recovery of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium cells inoculated into lettuce samples at different ratios, collected by immunomagnetic separation, and then determined by fluorescence microscopy**

Spiking ratio*	Number of spiked cells		Number of collected cells		Recovery (%)	
	<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 : 0	$1.0 \times 10^7$	-	$8.0 (\pm 0.6) \times 10^6$	-	$78 (\pm 6.0)$	-
1 : 1	$1.0 \times 10^7$	$1.0 \times 10^7$	$7.5 (\pm 1.0) \times 10^6$	$6.1 (\pm 1.1) \times 10^6$	$75 (\pm 10)$	$61 (\pm 11)$
1 : 4	$1.0 \times 10^7$	$4.0 \times 10^7$	$8.1 (\pm 0.7) \times 10^6$	$3.1 (\pm 0.1) \times 10^7$	$80 (\pm 7.4)$	$77 (\pm 2.7)$
4 : 1	$4.0 \times 10^7$	$1.0 \times 10^7$	$3.1 (\pm 0.1) \times 10^7$	$8.4 (\pm 0.1) \times 10^6$	$78 (\pm 3.6)$	$83 (\pm 6.7)$
0 : 1	-	$1.0 \times 10^7$	-	$8.4 (\pm 0.6) \times 10^6$	-	$84 (\pm 5.6)$

\*Ratio *E. coli* O157:H7 to *Salmonella* Typhimurium.

Results are means  $\pm$  standard deviations ( $n = 4$ ).



**Fig. 11. Fluorescence images of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium spiked into lettuce samples and then collected using immunomagnetic separation.**

*E. coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium spiked into lettuce samples were collected using centrifugation and filtration (a). In addition, these cells were purified using the immunomagnetic separation method (b). Lettuce samples without bacterial spiking (c) were treated by centrifugation, filtration, and immunomagnetic separation. Collected cells were stained with *E. coli* O157:H7-specific fluorescein isothiocyanate-labeled antibodies and *Salmonella* Typhimurium-specific AlexaFluor 488-labeled antibodies and observed by fluorescence microscope.

## マイクロ流路デバイスを用いたレタス中の *E. coli* O157:H7 及び *Salmonella*

### Typhimurium の定量

レタスに添加した *E. coli* O157:H7 及び *Salmonella* Typhimurium を、IMS 法を用いて回収し、マイクロ流路デバイスで定量を行った。その結果を蛍光顕微鏡法による定量値と比較した。マイクロ流路デバイスを用いた定量においては、*E. coli* O157:H7 及び *Salmonella* Typhimurium を同時に添加した場合、同色の蛍光色素を使用し検出を行っていることから、2 種類の細菌を区別できないため、2 種類の細菌を合算した定量値で結果を示した。蛍光顕微鏡の結果においても同様に 2 種類の細菌を合算した定量値で結果を示した。マイクロ流路デバイス及び蛍光顕微鏡より得られた *E. coli* O157:H7 及び *Salmonella* Typhimurium の定量値は、どの添加比においても有意な差はなく精度よく定量できていた ( $p > 0.05$ , Table 7)。

**Table 7. Numbers of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium cells in lettuce samples collected using immunomagnetic separation and determined by fluorescence microscopy and the microfluidic system**

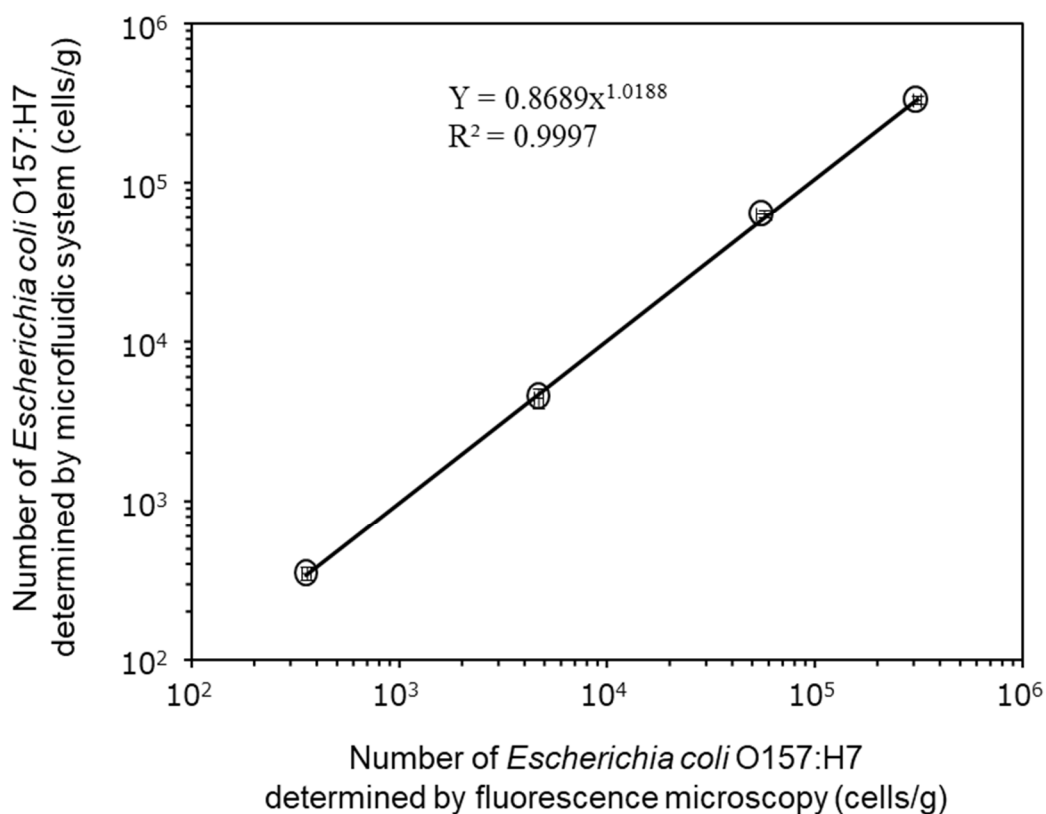
Spiking ratio*	Microscopic count (cells)	Microfluidic count (cells)
1 : 1	$1.4 (\pm 0.2) \times 10^7$	$1.6 (\pm 0.2) \times 10^7$
1 : 4	$3.9 (\pm 0.2) \times 10^7$	$4.3 (\pm 0.2) \times 10^7$
4 : 1	$3.9 (\pm 0.1) \times 10^7$	$4.1 (\pm 0.2) \times 10^7$

\*Ratio *E. coli* O157:H7 to *Salmonella* Typhimurium.  
Results are means  $\pm$  standard deviations ( $n = 4$ ).

次に、*E. coli* O157:H7 及び *Salmonella* Typhimurium を  $10^2 \sim 10^5$  cells/g の間で添加する細菌数を  $10^1$  ずつ減少させて定量範囲を確認した。添加する細菌を減少させた場合には、適宜 4~67 倍まで濃縮を行った。定量範囲の確認においては、添加する細菌数が少なくなるとマイクロ流路デバイス中を 1 分間に流れる細菌数が少なくなった

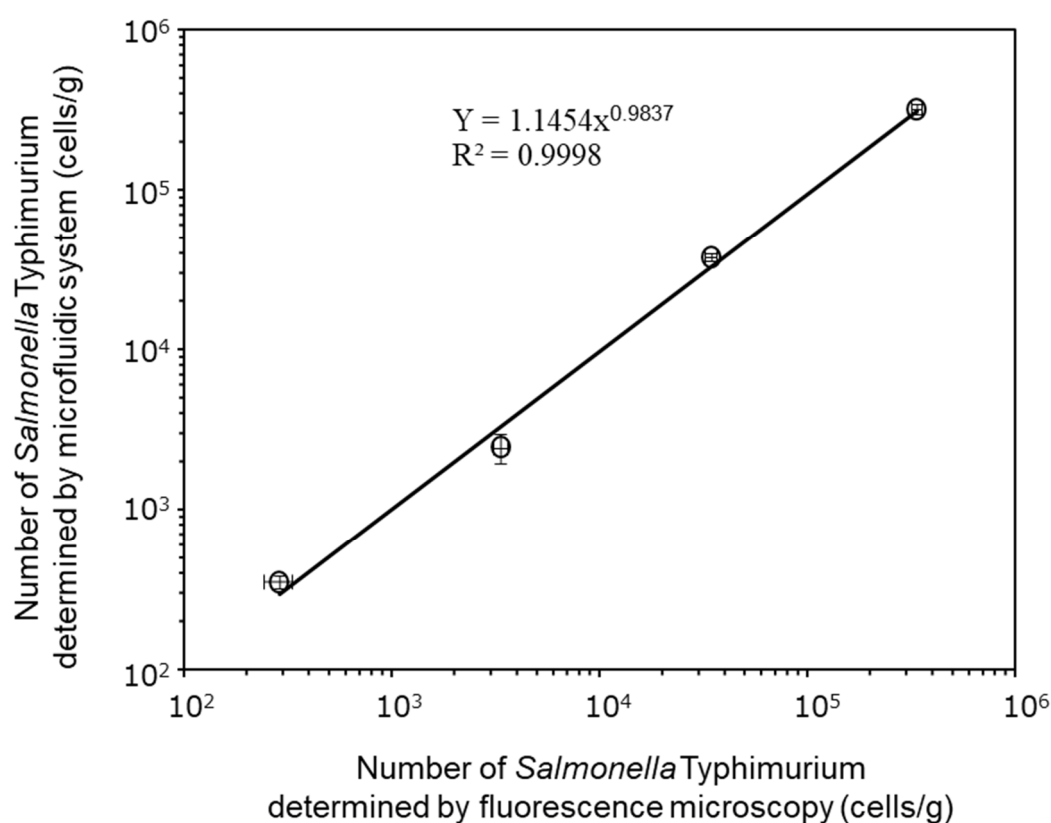
め、定量性を担保するために、マイクロ流路デバイス中を 1 分間に流れる細菌数が 10 cells 以下の場合を定量の範囲外とした。この検討においては各細菌の定量範囲を確認することを目的としているため、*E. coli* O157:H7 と *Salmonella* Typhimurium を同時に添加せずにそれぞれの細菌種毎に独立した実験を行った。マイクロ流路デバイスでの定量値を蛍光顕微鏡での定量値と比較したところ、*E. coli* O157:H7 及び *Salmonella* Typhimurium 共に約  $10^2 \sim 10^5$  cells/g の範囲で高い相関関係 (*E. coli* O157:H7 においては  $R^2 = 0.9997$ 、*Salmonella* Typhimurium においては  $R^2 = 0.9998$ ) があり、精度よく定量できた (Figure 12、13)。

以上より、マイクロ流路デバイスを用いることで IMS 法を用いて回収したレタス中の *E. coli* O157:H7 及び *Salmonella* Typhimurium を精度よく定量できることが分かった。



**Fig. 12. Comparison of microfluidic and conventional fluorescence microscopy counts of *Escherichia coli* O157:H7 spiked into and collected from lettuce samples.**

Serially diluted *E. coli* O157:H7 spiked into lettuce samples was collected using the immunomagnetic separation method. The cells were stained with *E. coli* O157:H7-specific fluorescein isothiocyanate-labeled antibody and enumerated by fluorescence microscope or using the microfluidic system. The collected cells were concentrated 4~67-fold (depending on the spiking level) before enumeration.



**Fig. 13. Comparison of microfluidic and conventional fluorescence microscope counts of *Salmonella Typhimurium* spiked into and collected from lettuce samples.**

Serially diluted *Salmonella Typhimurium* spiked into lettuce samples was collected using the immunomagnetic separation method. The cells were stained with *Salmonella Typhimurium*-specific AlexaFluor 488-labeled antibody and enumerated by fluorescence microscope or using the microfluidic system. The collected cells were concentrated 4~67-fold (depending on the spiking level) before enumeration.



### マイクロ流路デバイスを用いた方法と培養法及びリアルタイム PCR 法との比較

マイクロ流路デバイスにおける検出感度を、すでに国内における食品中の *E. coli* O157:H7 検出の公定法<sup>12)</sup>として採用されている培養法とリアルタイム PCR 法と比較した。 $4 \times 10^0 \sim 4 \times 10^5$  cells/g の細菌をレタスに添加して、それぞれの方法で検出を行った ( $n = 2$ )。なお、本項目においては、3 つの検出方法の検出感度の比較を目的としているため、対象とする細菌を *E. coli* O157:H7 のみに限定して検討を行った。また、マイクロ流路デバイスを用いた検出においては、マイクロ流路デバイス中を 1 分間に流れる細菌数が 1 cells 以上の場合を検出したと判定した。マイクロ流路デバイスを用いて検出を行った場合、レタスに  $4 \times 10^1$  cells/g になるように添加した *E. coli* O157:H7 を検出できた。(Table 8)。リアルタイム PCR 法では、レタスに  $4 \times 10^2$  cells/g になるように添加した *E. coli* O157:H7 を検出できた。培養法では、レタスに  $4 \times 10^2$  cells/g になるように添加した *E. coli* O157:H7 を検出できた ( $4 \times 10^1$  *E. coli* O157:H7 cells/g では  $n = 2$  の実験で検出と不検出がそれぞれ 1 件ずつだった)。これらの結果から、IMS 法とマイクロ流路デバイスを併用した食中毒原因菌の検出は、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。

**Table 8. Comparison of conventional and microfluidic methods for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 inoculated into lettuce**

Number of spiked cells (cells/g)	Real-time PCR method	Plate culture method	Microfluidic method
$4 \times 10^5$	+	+	+
$4 \times 10^4$	+	+	+
$4 \times 10^3$	+	+	+
$4 \times 10^2$	+	+	+
$4 \times 10^1$	—	±	+
$4 \times 10^0$	—	—	—

Detection results: +, *E. coli* O157:H7 detected; ±, different results for individual experiments; —, *E. coli* O157:H7 not detected ( $n = 2$ ).

## 【考察】

本章で用いた食中毒原因菌の回収方法である IMS 法は第二章で使用した IMS-F 法におけるホルムアルデヒド処理を行わないため、一般的な増菌培養を行わずに食品試料から 3 時間程度で食中毒原因菌の検出を行うことができた。また、第二章と同様に持ち運びが難しい大型の機器を使用しないため、オンサイトでの実施が可能であると考えられる。

マイクロ流路デバイスを用いた食中毒原因菌の検出感度を既存の方法である培養法とリアルタイム PCR 法と比較したところ、ほぼ同等の検出感度を持っていることが分かった (Table 8)。検出感度以外にも検査にかかる時間やコスト (今回使用した試薬や方法を基に算出) 等を比較したものを Table 9 に示した。培養法は他の方法と比較して、コストは低いが特異性も低いものもあり、コロニーを形成するためには 18 時間以上を必要とすることから結果を得るまでに時間がかかる。マイクロ流路デバイスを用いた方法は検出感度、時間、特異性の観点からはリアルタイム PCR 法と遜色ない方法である。コストの観点から比較を行うと、マイクロ流路デバイスを用いた方法における 1 検体当たり測定コスト (4000 円前後) はリアルタイム PCR 法 (700 円前後) よりも高いが、マイクロ流路デバイスを用いた方法は研究開発段階であるため普及が進むことでよりコストを抑えた測定が可能になると考えられる。また、マイクロ流路デバイスを用いた方法は装置が 100 万円以下で導入できると考えられるため、リアルタイム PCR に必要な装置 (100~500 万円) より導入コストが低い。リアルタイム PCR 装置自体はポータブルタイプのものがタカラバイオ社より発売されているが DNA 抽出操作はコンタミの危険性があるためオンサイトでの実施は難しく、マイクロ流路デバイスを用いた方法がオンサイトでの測定が可能という観点からは優れていると考えられる。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 法にはない、オンサイトで測定

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。

**Table 9. Comparison of conventional and microfluidic methods**

	Real-time PCR method	Plate culture method	Microfluidic method
Detection sensitivity (cells/g)	$10^2$	$10^1$ - $10^2$	$10^1$
Time	～6 hours	18～24 hours	3 hours
Instrument cost	High	Low	Middle
Measurement cost	Middle	Low	High
Specificity	High	Low	High
Place	In laboratory	In laboratory	On site

本章では、対象とする複数種の食中毒原因菌が  $4 \times 10^1$  cells/g 以上の濃度の場合にマイクロ流路デバイスを用いて検出できた (Table 8)。 *E. coli* O157:H7 における過去のアウトブレイク事例では平均  $10^3$  CFU 程度の細菌数で感染が起きている<sup>43)</sup>。細菌を表す単位が CFU と cells で実質的に異なるため直接の比較はできないが、20 g の食品を喫食した場合はマイクロ流路デバイスでの定量下限値としては 800 cells になるため、実際にアウトブレイクを起こすような *E. coli* O157:H7 をマイクロ流路デバイスを用いた検出方法により捕捉できると考えられる。また国内における食品中の EHEC の検出に関する厚生労働省の通知<sup>12)</sup> では、リアルタイム PCR 法等を用いた増菌培養後の VT 遺伝子及び O 抗原遺伝子の検出において  $10^4$  CFU/mL 以上の検出感度を持っている場合、スクリーニングの代替方法として用いることができると記載されている。これまでの結果より、 $10^4$  CFU/mL という細菌濃度はマイクロ流路デバイス用いて目的の細菌を十分に検出できると考えられるため、マイクロ流路デバイスを用いた検出方法

は本来目的としていた食中毒検査のファーストスクリーニング法としての使用以外にも、増菌培養後のリアルタイム PCR 法等の代替方法としての使用が期待できる。

本研究では、マイクロ流路デバイス内を 1 分間に流れる細菌が 10 個以上の結果を「定量結果」として、1 個～10 細胞の時は「検出結果」としている。これは、1 分間に流れる細菌が 10 個以下の場合は流れる細菌数が 1 個変動した場合の定量値へ与える影響が大きく、結果の信頼性が低いと考えられるためである。また、レタスに添加する細菌数が低濃度 (約  $10^2 \sim 10^4$  cells/g) の場合、マイクロ流路デバイス中を流れる細菌数を増加させるために、IMS 後に予備遠心分離 (4～67 倍濃縮) を行うことで定量可能であり、約  $10^1$  cells/g を添加した場合においても検出することができた。

本研究で用いたマイクロ流路デバイスを用いた検出システムは、蛍光抗体で標識した食中毒原因菌の青色励起光下で発した蛍光シグナルを検出している。この方法は、対象とする細菌が複数種の場合においても同色の励起光により蛍光を発する色素で標識することで、複数種の食中毒原因菌を短時間にまとめて検出して、現場での汚染の有無を判断する場合には非常に有効である。一方で、対象とする細菌の種類を増やす場合は使用する抗体を増やすことが必要で、検出系全体のコスト増につながり、抗体が開発されていない食中毒原因菌は対象とすることができない。近年、抗体に代わる検出系としてアプタマーが注目されている。アプタマーとはタンパク質などの特定の分子に対して結合能を示す一本鎖核酸 (一本鎖 DNA もしくは一本鎖 RNA) であり、がん細胞<sup>71)</sup>、ウイルス<sup>72)</sup> や細菌<sup>73)</sup> など様々な標的分子に特異的に結合するアプタマーが開発されている。アプタマーは抗体と比較して短時間で目的とする分子を得ることができ、核酸であるため長期保存も可能であるといった特長を持っている。最近の研究では、特殊なアプタマー作成方法である Toggle cell-SELEX (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment) 法を用いて 3 種の細菌<sup>74)</sup> や 6 種<sup>75)</sup> の細菌に対する交差反応性を持った DNA アプタマーが開発されているため、主要な

食中毒原因菌に対する交差反応性を持ったアプタマーを抗体の代わりに使用することで、より良い検出システムの構築に近づくと考えられる。

## 結論

本研究では、マイクロ流路デバイスを用いて食中毒原因菌の迅速オンサイトモニタリング方法の構築に取り組んだ。

第一章では、マイクロ流路デバイスを用いたレタス及び牛肉中の *E. coli* O157:H7 のモニタリング方法を構築した。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  $8.7 \times 10^5$  cells/g の *E. coli* 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  $1.1 \times 10^5$  cells/g の *E. coli* O157:H7 を 1 時間で定量可能であった。一方、フィルターろ過法や 2 段階遠心分離法は非特異的な回収方法であるため、低濃度域の細菌を定量する際は濃縮操作によって食品由来の夾雑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ため、少量の食中毒原因菌が混入した場合のモニタリングが困難になることが考えられた。この結果を踏まえて、第二章ではより低濃度の細菌を定量できる方法、第三章では複数種の細菌を定量できる方法の構築を図った。

第二章では、比較的食品由来夾雑成分の多い鶏肉を対象として低濃度域の *Salmonella* Typhimurium のモニタリング方法を構築した。*Salmonella* Typhimurium の回収方法に IMS とホルムアルデヒド処理を併用することで完全に食品由来夾雑成分を除去することができ、 $3.3 \times 10^3$  cells/g ～  $1.2 \times 10^6$  cells/g の範囲において精度よく定量できた。また、固定剤として使用され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雑成分のほとんどを IMS で除去できることを初めて示した。

第三章では複数種の食中毒原因菌に汚染された生鮮食品のモデルとして選択したレタスを対象として、複数種の食中毒原因菌のモニタリング方法を構築した。複数の磁気ビーズを組み合わせることで食品由来夾雑成分の除去を行い、複数種の食中毒原因菌を同時に定量することができた。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、マイクロ流路デバイス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た。

以上より、本研究ではオンサイトで細菌を検出可能なマイクロ流路デバイスに着目し、食中毒原因菌のファーストスクリーニング法として適応可能な新しい迅速オンサイトモニタリング方法を構築することに成功した。

## 謝辞

本稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました、地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品化学課 課長兼、大阪大学大学院薬学研究科衛生分析学分野 招へい教授 山口進康先生に甚大なる謝意を表します。

本研究に御協力、御助言を頂きました地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所微生物部細菌課 余野木伸哉博士と若林友騎博士に深謝いたします。

本研究を遂行するにあたり御協力を頂きました地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所衛生化学部食品安全課の皆様には感謝いたします。

マイクロ流路システムの構築にあたり、微生物計数ソフトの開発にご協力頂いた地方独立行政法人大阪産業技術研究所 齋藤守博士に心より御礼申し上げます。

本稿をまとめるにあたり、貴重なご指導、ご鞭撻を賜りました大阪大学大学院薬学研究科生体構造機能分析学分野 教授 井上豪先生、大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野 教授 中川晋作先生に心より御礼申し上げます。

最後に、研究に専念できる環境及び時間を与えてくださり、終始温かく見守って下さった家族に心から感謝の意を捧げます。



## 参考文献

- 1) Rešetar D, Pavelić SK, Josić D. Foodomics for investigations of food toxins. *Curr. Opin. Food Sci.*, **4**, 86-91 (2015).
- 2) World Health Organization. (2024). URL: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>. (accessed 01/11/2024)
- 3) Carstens CK, Salazar JK, Darkoh C. Multistate outbreaks of foodborne illness in the United States associated with fresh produce from 2010 to 2017. *Front. Microbiol.*, **10**, 02667 (2019).
- 4) Bintsis T. Foodborne pathogens. *AIMS Microbiol.*, **3**, 529-563 (2017).
- 5) Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, Jones JL, Griffin PM. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerg. Infect. Dis.*, **17**, 7-15 (2011).
- 6) Frank C, Werber D, Cramer JP, Askar M, Faber M, an der Heiden M, Bernard H, Fruth A, Prager R, Spode A, Wadl M, Zoufaly A, Jordan S, Kemper MJ, Follin P, Muller L, King LA, Rosner B, Buchholz U, Stark K, Krause G, Team HUSI. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *N. Engl. J. Med.*, **365**, 1771-1780 (2011).
- 7) Law JW, Ab Mutalib NS, Chan KG, Lee LH. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Front. Microbiol.*, **5**, 770 (2014).
- 8) Han X, Liu Y, Yin J, Yue M, Mu Y. Microfluidic devices for multiplexed detection of foodborne pathogens. *Food Res. Int.*, **143**, 110246 (2021).
- 9) Wang Y, Salazar JK. Culture-independent rapid detection methods for bacterial pathogens and toxins in food matrices. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **15**, 183-205 (2016).
- 10) Zhao X, Lin CW, Wang J, Oh DH. Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 297-312 (2014).
- 11) Priyanka B, Patil RK, Dwarakanath S. A review on detection methods used for foodborne pathogens. *Indian J. Med. Res.*, **144**, 327-338 (2016).
- 12) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長. 腸管出血性大腸菌 O26、O103、O111、O121、O145 及び O157 の検査法について, 平成 26 年 11 月 20 日, 食安監発 1120 第 1 号 (2014).
- 13) DebRoy C, He X, Kong Q, Patfield S, Skinner C, Rasooly R. A new immunoassay for detecting all subtypes of Shiga toxins produced by Shiga toxin-producing *E. coli* in ground beef. *PLoS One*, **11**, e0148092 (2016).

- 14) Medina MB, Shelver WL, Fratamico PM, Fortis L, Tillman G, Narang N, Cray WC, Jr., Esteban E, Debroy A. Latex agglutination assays for detection of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups O26, O45, O103, O111, O121, and O145. *J. Food Prot.*, **75**, 819-826 (2012).
- 15) Rozand C, Feng PC. Specificity analysis of a novel phage-derived ligand in an enzyme-linked fluorescent assay for the detection of *Escherichia coli* O157:H7. *J. Food Prot.*, **72**, 1078-1081 (2009).
- 16) Qin N, Zhao P, Ho EA, Xin G, Ren CL. Microfluidic technology for antibacterial resistance study and antibiotic susceptibility testing: review and perspective. *ACS Sens.*, **6**, 3-21 (2021).
- 17) Liao YH, Muthuramalingam K, Tung KH, Chuan HH, Liang KY, Hsu CP, Cheng CM. Portable device for quick detection of viable bacteria in water. *Micromachines*, **11**, 1079 (2020).
- 18) Shi L, Li Y, Jia C, Shan J, Wang S, Liu S, Sun J, Zhang D, Ji Y, Wang J. An overview of fluorescent microfluidics into revealing the mystery of food safety analysis: mechanisms and recent applications. *Trends Food Sci. Technol.*, **138**, 100-115 (2023).
- 19) Hartanto H, Wu M, Lam ML, Chen TH. Microfluidic immunoassay for detection of serological antibodies: a potential tool for rapid evaluation of immunity against SARS-CoV-2. *Biomicrofluidics*, **14**, 061507 (2020).
- 20) Vidlarova M, Rehulkova A, Stejskal P, Prokopova A, Slavik H, Hajduch M, Srovnal J. Recent advances in methods for circulating tumor cell detection. *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 3902 (2023).
- 21) Kauffmann F. The serology of the *coli* group. *J. Immunol.*, **57**, 71-100 (1947).
- 22) Liu B, Furevi A, Perepelov AV, Guo X, Cao H, Wang Q, Reeves PR, Knirel YA, Wang L, Widmalm G. Structure and genetics of *Escherichia coli* O antigens. *FEMS Microbiol. Rev.*, **44**, 655-683 (2020).
- 23) Heredia N, Garcia S. Animals as sources of food-borne pathogens: a review. *Anim. Nutr.*, **4**, 250-255 (2018).
- 24) Kant K, Shahbazi MA, Dave VP, Ngo TA, Chidambara VA, Than LQ, Bang DD, Wolff A. Microfluidic devices for sample preparation and rapid detection of foodborne pathogens. *Biotechnol. Adv.*, **36**, 1003-1024 (2018).
- 25) Karmali MA, Gannon V, Sargeant JM. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Vet. Microbiol.*, **140**, 360-370 (2010).
- 26) Duffy G, Burgess CM, Bolton DJ. A review of factors that affect transmission and survival of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in the European farm to fork beef chain. *Meat Sci.*, **97**, 375-383 (2014).

- 27) Gill A, Gill CO. Non-O157 verotoxigenic *Escherichia coli* and beef: a Canadian perspective. *Can. J. Vet. Res.*, **74**, 161-169 (2010).
- 28) Mathusa EC, Chen Y, Enache E, Hontz L. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. *J. Food Prot.*, **73**, 1721-1736 (2010).
- 29) Wachtel MR, McEvoy JL, Luo Y, Williams-Campbell AM, Solomon MB. Cross-contamination of lettuce (*Lactuca sativa* L.) with *Escherichia coli* O157:H7 via contaminated ground beef. *J. Food Prot.*, **66**, 1176-1183 (2003).
- 30) Liu Y, Mustapha A. Detection of viable *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef by propidium monoazide real-time PCR. *Int. J. Food Microbiol.*, **170**, 48-54 (2014).
- 31) McMahon TC, Blais BW, Wong A, Carrillo CD. Multiplexed single intact cell droplet digital PCR (MuSIC ddPCR) method for specific detection of enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) in food enrichment cultures. *Front. Microbiol.*, **8**, 332 (2017).
- 32) Yamaguchi N, Sasada M, Yamanaka M, Nasu M. Rapid detection of respiring *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice, milk, and ground beef by flow cytometry. *Cytometry A*, **54**, 27-35 (2003).
- 33) Xia Y, Whitesides GM. Soft Lithography. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **37**, 550-575 (1998).
- 34) Kim G, Lim J, Mo C. Applications of microfluidics in the agro-food sector: a review. *J. Biosyst. Eng.*, **41**, 116-125 (2016).
- 35) Yamaguchi N, Torii M, Uebayashi Y, Nasu M. 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).
- 36) Burgula Y, Khali D, Kim S, Krishnan SS, Cousin MA, Gore JP, Reuhs BL, Mauer LJ. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium using filtration followed by Fourier-transform infrared spectroscopy. *J. Food Prot.*, **69**, 1777-1784 (2006).
- 37) Murakami T. Filter-based pathogen enrichment technology for detection of multiple viable foodborne pathogens in 1 day. *J. Food Prot.*, **75**, 1603-1610 (2012).
- 38) Yamaguchi N, Tokunaga Y, Goto S, Fujii Y, Banno F, Edagawa A. Rapid on-site monitoring of *Legionella pneumophila* in cooling tower water using a portable microfluidic system. *Sci. Rep.*, **7**, 3092 (2017).
- 39) Cui S, Schroeder CM, Zhang DY, Meng J. Rapid sample preparation method for PCR-based detection of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *J. Appl. Microbiol.*, **95**, 129-134 (2003).
- 40) Isonhood J, Drake M, Jaykus LA. Upstream sample processing facilitates PCR detection of *Listeria monocytogenes* in mayonnaise-based ready-to-eat (RTE) salads.

- Food Microbiol.*, **23**, 584-590 (2006).
- 41) Wang R, Ni Y, Xu Y, Jiang Y, Dong C, Chuan N. Immuno-capture and in situ detection of *Salmonella* Typhimurium on a novel microfluidic chip. *Anal. Chim. Acta*, **853**, 710-717 (2015).
  - 42) Duven G, Cetin B, Kurtuldu H, Gunduz GT, Tavman S, Kisla D. A portable microfluidic platform for rapid determination of microbial load and somatic cell count in milk. *Biomed. Microdevices*, **21**, 49 (2019).
  - 43) Todd EC, Greig JD, Bartleson CA, Michaels BS. Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 4. Infective doses and pathogen carriage. *J. Food Prot.*, **71**, 2339-2373 (2008).
  - 44) Hara-Kudo Y, Takatori K. Contamination level and ingestion dose of foodborne pathogens associated with infections. *Epidemiol. Infect.*, **139**, 1505-1510 (2011).
  - 45) Eng S-K, Pusparajah P, Ab Mutalib N-S, Ser H-L, Chan K-G, Lee L-H. *Salmonella*: a review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Front. Life Sci.*, **8**, 284-293 (2015).
  - 46) Mohammed M. Phage typing or CRISPR typing for epidemiological surveillance of *Salmonella* Typhimurium? *BMC Res. Notes*, **10**, 578 (2017).
  - 47) Dos Santos AMP, Ferrari RG, Conte-Junior CA. Virulence factors in *Salmonella* Typhimurium: the sagacity of a bacterium. *Curr. Microbiol.*, **76**, 762-773 (2019).
  - 48) Rudi K, Larsen F, Jakobsen KS. Detection of toxin-producing cyanobacteria by use of paramagnetic beads for cell concentration and DNA purification. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 34-37 (1998).
  - 49) Frenea-Robin M, Marchalot J. Basic principles and recent advances in magnetic cell separation. *Magnetochemistry*, **8**, 11 (2022).
  - 50) Lizhou Xu ZTC, Ronghui Wang, Hong Wang, Michael F. Slavik, Andrew Wang, Yanbin Li. A fluorescent aptasensor coupled with nanobead-based immunomagnetic separation for simultaneous detection of four foodborne pathogenic bacteria. *Trans. ASABE*, 891-906 (2015).
  - 51) Lim M-C, Park JY, Park K, Ok G, Jang H-J, Choi S-W. An automated system for separation and concentration of food-borne pathogens using immunomagnetic separation. *Food Control*, **73**, 1541-1547 (2017).
  - 52) Thavarajah R, Mudimbaimannar VK, Elizabeth J, Rao UK, Ranganathan K. Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. *J. Oral Maxillofac. Pathol.*, **16**, 400-405 (2012).
  - 53) Yamaguchi N, Fujii Y. Rapid on-site monitoring of bacteria in freshwater environments using a portable microfluidic counting system. *Biol. Pharm. Bull.*, **43**,

- 87-92 (2020).
- 54) Kralik P, Ricchi M. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. *Front. Microbiol.*, **8**, 108 (2017).
  - 55) Kim G, Moon JH, Moh CY, Lim JG. A microfluidic nano-biosensor for the detection of pathogenic *Salmonella*. *Biosens. Bioelectron.*, **67**, 243-247 (2015).
  - 56) Guo PL, Tang M, Hong SL, Yu X, Pang DW, Zhang ZL. Combination of dynamic magnetophoretic separation and stationary magnetic trap for highly sensitive and selective detection of *Salmonella* Typhimurium in complex matrix. *Biosens. Bioelectron.*, **74**, 628-636 (2015).
  - 57) Han L, Wang K, Ma L, Delaquis P, Bach S, Feng J, Lu X. Viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in fresh produce: rapid determination by loop-mediated isothermal amplification coupled with a propidium monoazide treatment. *Appl. Environ. Microbiol.*, **86**, e02566-19 (2020).
  - 58) Wei C, Zhao X. Induction of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 by low temperature and its resuscitation. *Front. Microbiol.*, **9**, 2728 (2018).
  - 59) Zhong J, Zhao X. Detection of viable but non-culturable *Escherichia coli* O157:H7 by PCR in combination with propidium monoazide. *J Biotech*, **8**, 28 (2018).
  - 60) Oliver JD, Dagher M, Linden K. Induction of *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium into the viable but nonculturable state following chlorination of wastewater. *J. Water Health*, **3**, 249-257 (2005).
  - 61) Morishige Y, Fujimori K, Amano F. Differential resuscitative effect of pyruvate and its analogues on VBNC (viable but non-culturable) *Salmonella*. *Microbes Environ.*, **28**, 180-186 (2013).
  - 62) Dong K, Pan H, Yang D, Rao L, Zhao L, Wang Y, Liao X. Induction, detection, formation, and resuscitation of viable but non-culturable state microorganisms. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **19**, 149-183 (2020).
  - 63) Zhao X, Zhong J, Wei C, Lin CW, Ding T. Current perspectives on viable but non-culturable state in foodborne pathogens. *Front. Microbiol.*, **8**, 580 (2017).
  - 64) Pinto D, Almeida V, Almeida Santos M, Chambel L. Resuscitation of *Escherichia coli* VBNC cells depends on a variety of environmental or chemical stimuli. *J. Appl. Microbiol.*, **110**, 1601-1611 (2011).
  - 65) Morishige Y, Koike A, Tamura-Ueyama A, Amano F. Induction of viable but nonculturable *Salmonella* in exponentially grown cells by exposure to a low-humidity environment and their resuscitation by catalase. *J. Food Prot.*, **80**, 288-294 (2017).
  - 66) Liao H, Jiang L, Zhang R. Induction of a viable but non-culturable state in *Salmonella* Typhimurium by thermosonication and factors affecting resuscitation. *FEMS*

- Microbiol. Lett.*, **365**, fnx246 (2018).
- 67) Saha SK, Saha S, Sanyal SC. Recovery of injured *Campylobacter jejuni* cells after animal passage. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 3388-3389 (1991).
  - 68) Sheng L, Zhu MJ. Practical in-storage interventions to control foodborne pathogens on fresh produce. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **20**, 4584-4611 (2021).
  - 69) Jenkins C, Lawson AJ, Cheasty T, Willshaw GA. Assessment of a real-time PCR for the detection and characterization of verocytotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.*, **61**, 1082-1085 (2012).
  - 70) Savoye F, Feng P, Rozand C, Bouvier M, Gleizal A, Thevenot D. Comparative evaluation of a phage protein ligand assay with real-time PCR and a reference method for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in raw ground beef and trimmings. *J. Food Prot.*, **74**, 6-12 (2011).
  - 71) Kang WJ, Chae JR, Cho YL, Lee JD, Kim S. Multiplex imaging of single tumor cells using quantum-dot-conjugated aptamers. *Small*, **5**, 2519-2522 (2009).
  - 72) Nguyen VT, Seo HB, Kim BC, Kim SK, Song CS, Gu MB. Highly sensitive sandwich-type SPR based detection of whole H5Nx viruses using a pair of aptamers. *Biosens. Bioelectron.*, **86**, 293-300 (2016).
  - 73) Kim YS, Song MY, Jurng J, Kim BC. Isolation and characterization of DNA aptamers against *Escherichia coli* using a bacterial cell-systematic evolution of ligands by exponential enrichment approach. *Anal. Biochem.*, **436**, 22-28 (2013).
  - 74) Kusumawati A, Mustopa AZ, Wibawan IWT, Setiyono A, Sudarwanto MB. A sequential toggle cell-SELEX DNA aptamer for targeting *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, and *Escherichia coli* bacteria. *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, **20**, 95 (2022).
  - 75) Song MY, Nguyen D, Hong SW, Kim BC. Broadly reactive aptamers targeting bacteria belonging to different genera using a sequential toggle cell-SELEX. *Sci. Rep.*, **7**, 43641 (2017).