

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：32690

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07825

研究課題名(和文) ラボディスクによる食品中の食中毒菌高感度検出法の開発

研究課題名(英文) development of sensitive detection method for the pathogenic bacteria in food using a labo-disc

研究代表者

久保 いづみ (Kubo, Izumi)

創価大学・理工学部・教授

研究者番号：40214986

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：食中毒菌であるサルモネラ菌の感染の広がりを防ぐために、迅速簡便な検出法が必要とされている。そこでこの菌を卵黄からサンプリングする方法として抗サルモネラ抗体修飾ビーズを使用した方法を検討した。直径約2 μmの磁気ビーズと、20 μmのポリスチレンビーズについて比較した。卵黄から磁気ビーズに結合させて抽出した菌をラボディスクのマイクロチャンバーに捕捉してここで、特異遺伝子inv AをPCRで増幅することにより5万～5千万 cells/mlの範囲で濃度依存的に検出することができた。またポリスチレンビーズを用いた場合は、明確な濃度依存関係は見られないが5000 cells/ml以上で検出可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食中毒菌の検出を培養による増菌を行わず、抗体固定化ビーズによる濃縮を利用し、このビーズをそのままマイクロチャンバーに導入して菌固有遺伝子を増幅する方法を確立することで、大幅な迅速化を図る点が本研究の特色である。培養法では実際に多種多様な菌が混在する食品試料では、増菌しやすい菌に培地中の栄養を奪われて、食中毒の原因菌が十分に増菌せず、検出できていない場合もあったと考えられる。本研究では抗体固定化ビーズでサルモネラ菌をビーズ上に濃縮でき、それによって、培養法より短時間での測定が可能なPCR法よりもさらに高感度に検出できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Salmonella enterica is one of the dangerous pathogens. Rapid detection methods are required to prevent its infection. In our laboratory, a microfluidic disc that enabled isolation of cells has been developed. It is possible to isolate S. enterica cells, amplify the specific invA gene by PCR, and detect it by fluorescence probe in the microchambers on the disc. In this study, we demonstrate the collection method of S. enterica from egg yolk that can remove egg yolk components, and the rapid detection of collected S. enterica by PCR on the microfluidic disc. The S. enterica cells were collected from egg yolk by using antibody-coated immunomagnetic beads. S. enterica collected using beads was detected by PCR on the disc of each microchamber. We could detect 50000 cells/ml or higher concentration of S. enterica within 6 hour. Effectiveness of the antibody modified plastic beads was investigated to detect S. enterica from egg yolk, too. With the plastic beads, 5000 cells/ml was detectable.

研究分野：分析化学

キーワード：抗体固定化ビーズ 抗サルモネラ抗体 卵黄 PCR ラボディスク

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

従来、食品中の食中毒菌の検査は主に培養法が用いられてきた。この方法は、試料液中に存在する菌を一定量まで増やすための増菌培養、菌種を選択するための分離培養、さらに菌種を確認するための確認培養などを継続的に行っていくことで、菌の存在の確認や同定を行う方法であるが、食品からの菌のサンプリングから、同定まで数日間を要する。食中毒患者の発生の際の感染源の食品の迅速な確定は、感染の広がりを防ぐために極めて重要であるが、従来の検査方法では長時間を要することが問題である。最近では、確認培養を行わず、増菌培養後の試料を用いて、菌種固有の遺伝子を **polymerase Chain Reaction(PCR)**により増幅して検出する PCR 法や、リアルタイム PCR 法なども行われるようになってきて同定までの時間は短縮されてきてはいるものの、サンプリングから同定まで 2,3 日はかかるのが現状である。最も早い方法でも 48 時間程度は要する。また、PCR には高価な反応試薬が必要で、多種類の食品からのサンプルについての確認を行うにはコストがかかる。このため、より迅速で高感度な、食中毒菌の食品試料からの検出法の開発が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、食品試料から従来行われてきた培養を行わず、迅速かつ高感度な食中毒菌検出をする方法を確立することが目的である。これを実現するために、まず、食中毒菌細胞を食品試料から抗体修飾ビーズを利用して、迅速、高効率に濃縮する。得られた食中毒菌を保持するビーズを、マイクロチャンバーアレイを設けたラボディスクに捕捉して、この菌固有の遺伝子をマイクロチャンバー内で増幅する。抗体修飾ビーズを用いて菌濃縮を選択的に行うことにより、培養法に比べ、短時間に高濃度の菌液を得ることができ、これをそのままラボディスクに捕捉して固有遺伝子の PCR 増幅により、菌を効率よく検出する方法を確立する。

さらに蛍光プローブを用いて増幅産物を蛍光検出することで、迅速かつ高感度な食中毒菌検出を実現する。

3. 研究の方法

本研究計画では、研究対象の食中毒菌をサルモネラ菌にフォーカスした。食品試料から食中毒菌を含む細菌懸濁液を調製し、これを試料として、サルモネラ菌の固有遺伝子である *invA* 遺伝子を Hot Cell-direct PCR 法で、ラボディスク上での検出を行う。実際の食品試料中には、検出の標的とする菌以外にも通常、多種多様な一般細菌が存在している。このような菌懸濁液を試料として、サルモネラ菌のみを抗サルモネラ抗体固定化ビーズ（抗体固定化ビーズ）を利用して選択的に濃縮し、ラボディスク上で迅速に検出する。

本研究では磁気ビーズとポリスチレンビーズ（ポリビーズ）という 2 種類の抗体固定化ビーズを用い、比較した。いずれのビーズも表面に抗サルモネラ抗体を表面に修飾、固定化したものを用いた。

抗体固定化磁気ビーズ（免疫磁気ビーズ）は直径 $2\mu\text{m}$ で、サルモネラ菌と大きさはおおむね同じレベルであり、菌を結合した後、試料液との分離は磁石によって捕集した。

抗体固定化ポリビーズは直径 $20\mu\text{m}$ で、サルモネラ菌の 10 倍程度の直径があり、1 個のビーズに多数の菌を結合させられると予想される。菌を結合した後は、遠心により、試料液と分離する。いずれも、試料液との分離後、各ビーズで回収したサルモネラ菌と PCR 試薬（Cycleave®PCR *Salmonella* Detection kit, TaKaRa）の混合液 $1\mu\text{l}$ を細胞単離ディスクに注入した。ディスクを 3500rpm で 30 秒間回転させて送液し、ディスク上で PCR を行い、蛍光

プローブで PCR の増幅産物を蛍光顕微鏡で測定した。チャンバー中に *invA* 遺伝子が存在する場合、そのチャンバーの PCR 後の蛍光強度は増加する。したがって、PCR 前後に各チャンバーの蛍光強度を測定し、その蛍光強度比を算出することにより、*invA* を検出した。

4. 研究成果

(1) 抗体固定化磁気ビーズ（免疫磁気ビーズ）を使用した場合

まず、免疫磁気ビーズによる卵黄中のサルモネラ菌の回収を試みた。回収後、チューブ中でリアルタイム PCR を行った結果、ビーズで回収した卵黄中のサルモネラ菌の場合の蛍光強度比は、サルモネラ菌のみの場合とほぼ同等の値であった。よって、免疫磁気ビーズにより卵黄成分を除去した状態でサルモネラ菌を回収し、PCR により検出可能であることが示された。この際、免疫磁気ビーズ自体は PCR 反応に影響しないことが確認された。また、細胞単離ディスク上での PCR を行った結果、蛍光強度比が菌が存在することを示す閾値である 1.57 倍以上に増加したチャンバーを確認することができた (Fig.1)。サルモネラ菌の濃度を 5.0×10^4 - 5.0×10^7 cells/ml の範囲で、測定結果の濃度依存性を調べた。それぞれの濃度での同じ流路の各マイクロチャンバーの蛍光強度比の平均値を比較したところ、菌の濃度への依存性がみられた。また、閾値以上のチャンバー数と濃度の関係についても、 5.0×10^4 - 5.0×10^7 cells/ml においてサルモネラ菌の濃度に依存して増加した (Fig.2)。しかし、 5.0×10^4 - cells/ml では、蛍光強度が閾値以上のチャンバーは検出できなかった。

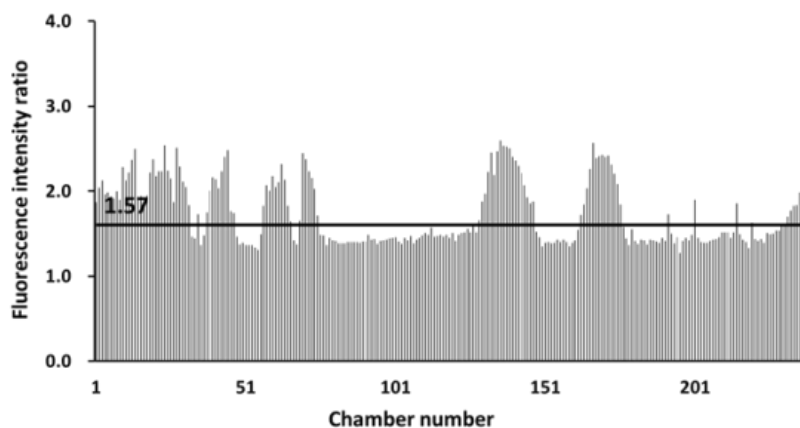


Fig.1 5.0×10^5 cells/ml のサルモネラ菌におけるチャンバー毎の蛍光強度比

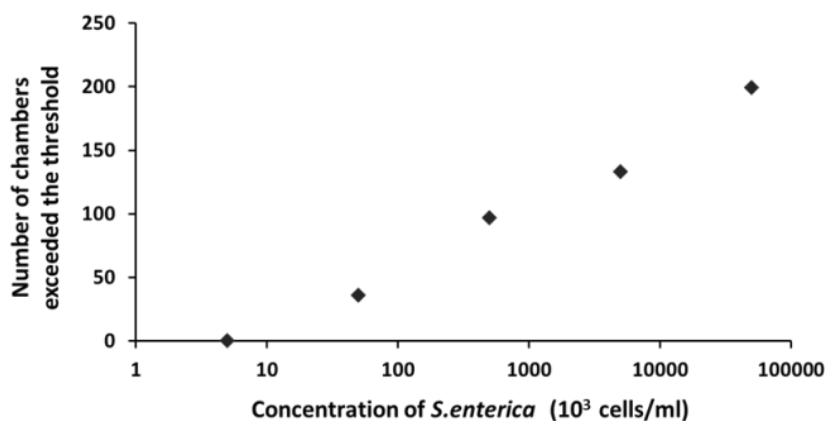


Fig.2 各濃度のサルモネラ菌における閾値以上のチャンバー数

また、これらの結果を得るには試料の回収から PCR の終了、測定結果の評価に 6 時間程度の時間がかかった。

しかし、免疫磁気ビーズを細胞単離ディスクに送液した際、ビーズが上流のチャンバーに溜まりやすく、ビーズを下流のチャンバーまで送液させることは困難であった。これは、免疫磁気ビーズの比重が水に比べ、非常に大きいためであると考えられた。また、ビーズによってサルモネラ菌を捕捉しているが、ビーズが捕捉されたチャンバーと PCR シグナルが上昇したチャンバーの対応は、ビーズが小さく、確認が容易ではなかった。

(2) 抗体固定化ポリビーズを使用した場合

免疫磁気ビーズを用いた場合、ビーズが上流域に留まってしまい、また、ビーズを捕捉したチャンバーとサルモネラ菌が存在すると判定されたチャンバーとの関係を明らかにすることが困難であったので、ビーズを細胞単離ディスクの上流から下流まで均一に送液させるため、比重が水に近く観察しやすいビーズとして直径が $20 \mu\text{m}$ の抗サルモネラ抗体固定化ポリビーズによる卵黄中のサルモネラ菌の回収を試みた。免疫磁気ビーズの場合と同様、チューブ中でリアルタイム PCR を行った結果、抗体固定化ポリビーズにより卵黄中のサルモネラ菌を回収し、PCR により検出可能であることが示された。この際、抗体固定化ポリビーズ自体は PCR 反応に影響しないことが確認された。また、細胞単離ディスク上での PCR を行った結果、蛍光強度比が閾値以上に増加したチャンバーを確認することができ、サルモネラ菌は検出可能であることが示された。さらに、抗体固定化ポリビーズを細胞単離ディスクに送液した際は、ビーズを下流まで送液させることができた。

しかし、閾値以上のチャンバー数のサルモネラ菌濃度依存性は確認することができなかった。また、 $5.0 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ のサルモネラ菌における閾値以上のチャンバー数は、免疫磁気ビーズを用いた場合は 97 チャンバーであるのに対し、抗体固定化ポリビーズを用いた場合は 37 チャンバーであり、少ない値を示した。しかし、 $5.0 \times 10^4 \text{ cells/ml}$ のサルモネラ菌における閾値以上のチャンバー数は 39 チャンバー、 $5.0 \times 10^3 \text{ cells/ml}$ のサルモネラ菌における閾値以上のチャンバー数は 39 チャンバーより多く明確な濃度依存関係がみられなかったが、免疫磁気ビーズよりも高感度にサルモネラ菌を検出できる可能性が示唆された。

$5.0 \times 10^3 \text{ cells/ml}$ のサルモネラ菌における閾値以上のチャンバーが十分な数確認されたことから、この濃度におけるビーズの分布と閾値以上のチャンバー数との関連を解析した。

ポリスチレンビーズは直径が $20 \mu\text{m}$ と磁気ビーズより大きいため、マイクロチャンバー内に捕捉されていることを顕微鏡写真で確認することができたので、ビーズが捕捉されたチャンバーについて PCR 後蛍光強度比が閾値以上になっているか調べたところ、99% のチャンバーで閾値以上の値となっており、サルモネラ菌を結合させたビーズが捕捉されていることが示された。一方ビーズが捕捉されていないチャンバーでも蛍光強度比が閾値以上になっているチャンバーが多く認められた。そこで、ビーズの分布と蛍光強度比が閾値以上となったチャンバーの場所を比較した。流路を入り口から前半、中程、後半の 3 領域に均等に区別し、どの領域にビーズが多く分布するか、また、閾値以上のチャンバーが多く分布するかを比較した。その結果、ビーズは中程および後半に分布していた (Fig. 3.)。

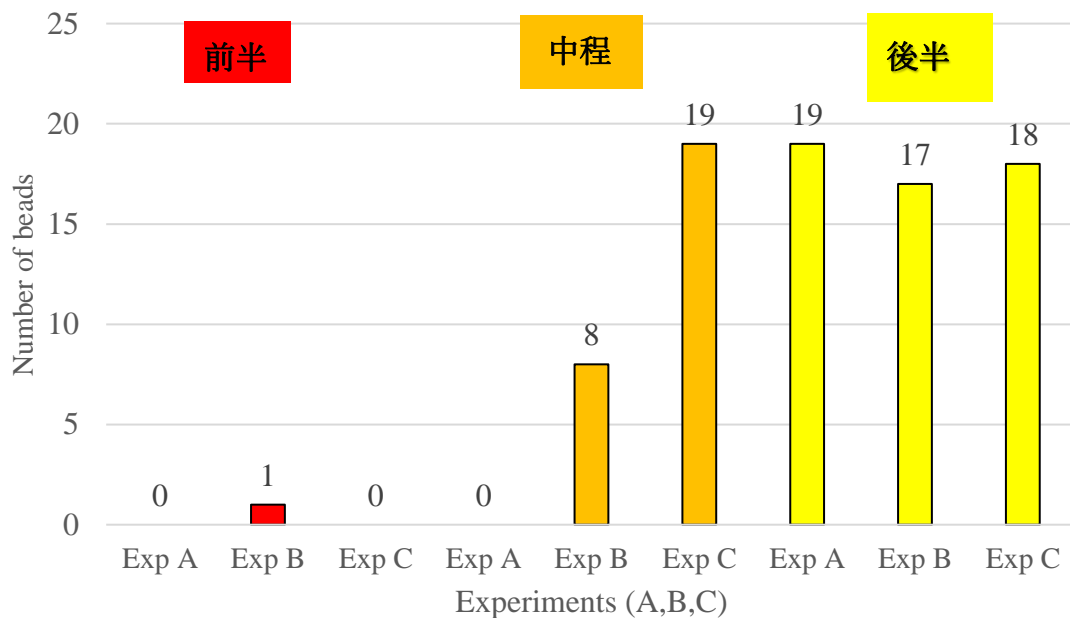


Fig 3. 各流路の場所によるビーズの分布

また、流路前半では RFI が閾値以下のチャンバーが多く、閾値以上の蛍光強度比のチャンバーは中程と後半に多く存在していた (Table1)。

Table 1 流路の位置の違いにおけるビーズの捕獲数と RFI

流路の場所		ビーズ数	RFI の 平均値	閾値 RFI と の差
前半	Exp A	0	1.46	0.06
	Exp B	1	1.18	-0.22
	Exp C	0	1.25	-0.15
中程	Exp A	0	1.93	0.53
	Exp B	8	2.45	1.05
	Exp C	19	2.66	1.26
後半	Exp A	19	1.73	0.33
	Exp B	17	2.57	1.17
	Exp C	18	2.53	1.13

このことは、1個のビーズに複数の菌が結合し、何等かの原因で流路中で菌がビーズから離脱してビーズのないチャンバーに入り、そのチャンバーでも蛍光強度比が閾値以上となったことを示唆している。従って、直径の大きいビーズを使用することで、菌がビーズに濃縮されたが、それによって、濃度依存関係には正確さが見られなくなったものの、菌を多数確認することができ、低濃度の試料中のサルモネラ菌の検出には直径の大きい、抗体固定化ポリビーズが有効であることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1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 I. Kubo and H. Hashimoto	4. 巻 34
2. 論文標題 Detection of Salmonella Enterica Utilizing A Microfluidic Disc for Cell Entrapment	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemical sensors	6. 最初と最後の頁 46-48
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 I. Kubo	4. 巻 33
2. 論文標題 Rapid Detection of Salmonella Enterica in Chicken Meat Utilizing A Microfluidic Disc	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Chemical Sensors	6. 最初と最後の頁 112-114
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Izumi Kubo , Mitsutoshi Kajiya, Narumi Aramaki, Shunsuke Furutan	4. 巻 20
2. 論文標題 Detection of Salmonella enterica in egg yolk by PCR on a microfluidic disc device using immunomagnetic beads	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sensors	6. 最初と最後の頁 1060-1072
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/s20041060	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 Izumi Kubo	4. 巻 36
2. 論文標題 BIOSENSING UTILIZING CD-SHAPED MICROFLUIDIC DEVICE	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Sensors	6. 最初と最後の頁 79-81
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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15件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 9件）

1. 発表者名 久保 いづみ・鍛冶屋 光俊・荒牧 成美
2. 発表標題 マイクロ流路を用いたHot cell-direct PCR法による食品中のサルモネラ菌迅速検出
3. 学会等名 日本分析化学会第67年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 久保 いづみ, 橋本弘実
2. 発表標題 細胞捕捉用マイクロ流路上での免疫染色によるサルモネラ菌の検出
3. 学会等名 日本食品衛生学会第114回学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Izumi Kubo
2. 発表標題 Rapid detection of Salmonella enterica in food on a microfluidic device
3. 学会等名 3rd International Conference on Agriculture and Food Science (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Izumi Kubo
2. 発表標題 Discrimination of Microbes based on Hot cell-direct PCR on a microfluidic device
3. 学会等名 Bio4Apps 2018/2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Izumi Kubo, Shunsuke Furutani
2. 発表標題 Gene detection in isolated single cells on a microfluidic device
3. 学会等名 9th International Conference on Molecular electronics and Bioelectronics (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 久保 いつみ, 新井 一幸
2. 発表標題 Hot Cell-direct PCR法による食中毒菌Bacillus cereusの検出
3. 学会等名 第11回バイオ化学関連シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 久保 いつみ, 鍛冶屋光俊
2. 発表標題 マイクロ流路ディスクを用いた食肉中のサルモネラ菌迅速検出
3. 学会等名 第62回 化学センサ研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Izumi Kubo
2. 発表標題 Nano material for electrochemical sensing of Insulin
3. 学会等名 FFSCI on Nanoscience (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Izumi Kubo, and Taiga Eguchi
2. 発表標題 Electrochemical Insulin Sensor Utilizing a DNA Aptamer Immobilized Electrode
3. 学会等名 12th Asian Conference on Chemical Sensors (ACCS 2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Izumi Kubo
2. 発表標題 Rapid detection of pathogenic bacteria on a microfluidic disc
3. 学会等名 Lab on a Chip & Microfluidics Asia 2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Izumi Kubo
2. 発表標題 Gene detection based on hot cell-direct PCR of the gene in isolated single cells on a microfluidic device
3. 学会等名 EMN Angkor meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 久保いづみ・鍛冶屋 光俊・荒牧 成美
2. 発表標題 CD型マイクロ流路を用いた食品中のサルモネラ菌迅速検出
3. 学会等名 生物工学会第71回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保いづみ
2. 発表標題 CD型マイクロ流路デバイスによるバイオセンシング
3. 学会等名 化学センサ研究会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Izumi Kubo, N. Aramaki, M. Kajiya
2. 発表標題 Rapid sensing device of Salmonella enterica in food based on hot-cell direct PCR
3. 学会等名 13th ACCS 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Izumi Kubo
2. 発表標題 Detection of Microbe cells on Microfluidic Disc Device
3. 学会等名 Bio4APPS2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Izumi Kubo and Shunsuke Furutani	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 11
3. 書名 Compact Disc-type biosensor devices and their applications "CHEMICAL, GAS, AND BIOSENSORS FOR INTERNET OF THINGS AND RELATED APPLICATIONS"	

〔産業財産権〕

〔その他〕

創価大学 久保研究室 科研費
<http://home.soka.ac.jp/~kubo/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----