

食品に含まれる微生物の簡易検出装置の開発

電子情報科	主任研究員	田 尻 健 志
食品・環境科	主任研究員	松 本 周 三
九州大学大学院	教 授	今 任 稔 彦
徳島大学大学院	教 授	原 口 雅 宣

食品の生産から流通、消費にいたる各局面で安全・安心のため微生物検査は重要であり、各社の製品特性に合わせた迅速・簡便で安価な検査方法の導入が必要とされている。本研究では微生物汚染を判定できるプローブの開発及び、高感度・迅速（リアルタイム）に検査できる光学システムを構築することで、培養法を不要とした自主検査用の簡易型検出装置の開発を進めている。本報では食品の衛生指標菌の一つである大腸菌群をターゲットに選び、使い捨て可能な検査方法を考案し、20分以内で判定できる検査装置（システム）を開発した。

1. 緒 言

食品の微生物検査は、厚生労働省が定める法定検査に加えて自主検査が実施されており、各社の製品特性に合わせた効率良いスクリーニング検査を進める必要がある。また、食品業界にとって食の安全に係る事故は企業理念、コンプライアンスに係ることになるため、衛生管理体制を強化しリスクを防止することは重要になっている。しかし、現在の微生物検査で主として利用される培養法は、食材中や食材表面などの細菌を培養して判定するため、結果が判明するまで最低でも2～10日を要している。また、スクリーニング検査に用いる迅速法も判定精度を上げるために培養法が併用され、精度と迅速性は不十分である。さらに、検査には専門的知識を有する専任の検査員が必要であり、検査の効率化や経費削減を進める企業にとっては、迅速・簡易・安価で正確な検査体制が求められている。

そこで本研究では、微生物を検出できるプローブの開発及び、高感度・迅速（リアルタイム）に検査できる光学技術を構築することで、培養法を不要とした自主検査用の簡易型検出装置（システム）の開発を進めている。プローブで使用する微小球センサーは、入射光を球内で周回させ感度を増強させることが可能であり、従来の技術に比べ検出感度を数十倍以上に増幅することが可能である。このため、微小球表面に局在した高感度の光（近接場光）を利用し、培養前の微生物を検出すれば、数十分から数時間で誰でも簡単に判定することが可能となる。また、マイクロサイズの微小球センサーを大量生産することで、通常の抗原抗体反応で利用されるプリズムセンサー（表面プラズモン共鳴センサー）よりも一個当たりのコストを下げる事が可能となる。

本報では、微生物汚染を判定するセンサー部に、抗体を固定化した直径 $10\mu\text{m}$ のポリスチレン微小球（以下、PS微小球）を組み込んだ顕微分光システムを開発した。また、システムの評価として、センサー部に大腸菌群が産生する分解酵素の β ガラクトシダーゼ（ β -galactosidase）を滴下し、散乱光スペクトルの変化を検証した。

2. 実験方法

2.1 単一微小球の検出システム

平成23年度までに、微小球の励起に油浸対物レンズを利用した近接場光（エバネセント）の励起システムを構築し、単一微小球の励起とその散乱光を検出するシステムの構築を行なった^{[1]、[2]}。最終年度となる平成24年度は検出精度を向上させるため、図1に示すように、PS微小球がある検出部をカバーガラス（厚み 0.17mm ）で封止し、測定中における水分の蒸発を抑えることで、経時変化による観測部の焦点のズレや散乱光強度のバラつきを抑えた。

最終的には図2に示すように単一のPS微小球に光を効率よく入射できる励起方法と、PS微小球からの散乱光を観測しながら計測できる散乱光検出方法を組み合わせた顕微分光システムを構築した。測定する単一のPS微小球はCCDカメラで確認しながら選別する。散乱光は対物レンズで集光した後、光ファイバーで導光し分光器でリアルタイムに検出した。



図1 PS微小球の検出部

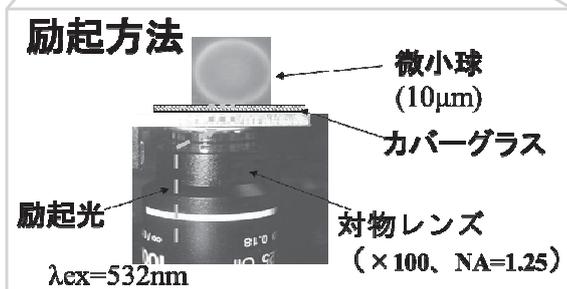
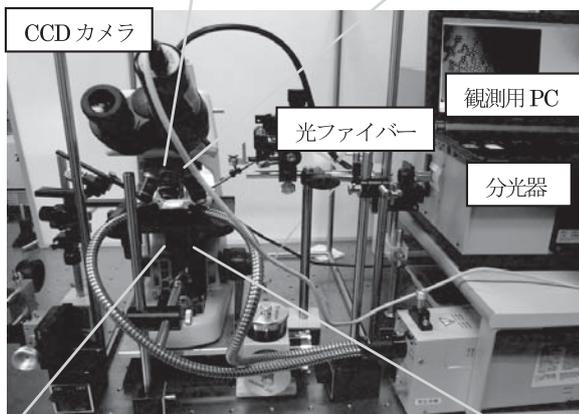
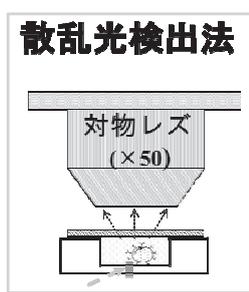


図2 単一微小球の計測システム

2.2 蛍光PS微小球センサー

図3に示すように微小球に光を入射すると、ある条件下で球を周回する電磁波モードが発生し、入射光が強く散乱されることが分かっている^[3]。本測定ではこ

の周回する電磁波モードであるウィスパーリング・ギャラリー・モード(Whispering Gallery Mode、以下WGモード)の変化を検出することでPS微小球の表面状態を検証する。また、汚染物質の吸着判定として、PS微小球の表面上に抗体を固定化し、抗原抗体反応による変化を確認した。

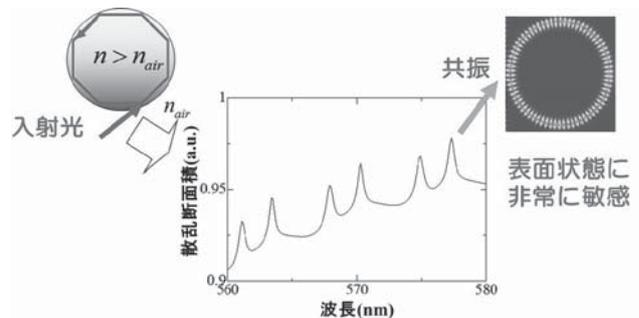


図3 WGモード

実験で使用したPS微小球は、直径 $10\mu\text{m}$ の色素がドープされた蛍光微小球である。552nmの波長で励起すると580nmを中心波長とした蛍光を発する。また、PS微小球表面に固定化する抗体は食品企業の自主管理で検査頻度の高い大腸菌群に絞り、大腸菌群が産生する分解酵素の β ガラクトシダーゼ(β -galactosidase)に対する抗体(Anti- β -galactosidase)を選択している^[2]^[4]。

2.3 酵素(β -galactosidase)吸着の評価方法

図3に示すようにPS微小球にWGモードが励起されると、ある特定波長に鋭い共鳴ピーク信号が確認される。WGモードはPS微小球の球径や表面の屈折率情報を非常に高感度に検知することが可能である。そこで、図4に示すように、抗体(Anti- β -galactosidase)を固定化したPS微小球に酵素(β -galactosidase)を吸着させ、WGモードの共鳴ピーク信号の変化を検出することで、吸着する酵素(β -galactosidase)の判定が可能か検証を行った。

本実験では、波長532nmのTM偏光でPS微小球を励起し、560~580nmの蛍光波長帯域からWGモードのピーク信号を検出している。単球と光の相互作用の理論解析には、Mie散乱理論から算出した散乱断面積を用いた。また、図5に示すように抗体を固定化したPS微小球は図1の検出部に滴下する。その後、0~1mg/mlに濃度調整した酵素溶液(β -galactosidase)をPS微小球へ滴下し、散乱光のスペクトルを検出した。

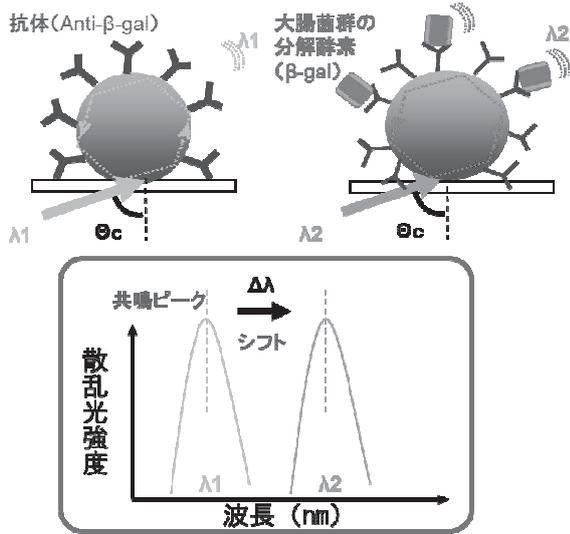


図4 WGモードシフトによる判定

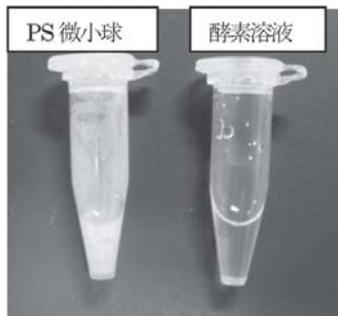


図5 抗体を固定化したPS微小球と酵素溶液

3. 結果と考察

3.1 PS微小球の観測

図6はカバーガラスで封止した時の純水中のPS微小球の測定の様子を示したものである。暗視野照明により純水中におけるPS微小球の観測が可能となった。また、図1で示したカバーガラスの封止によりPS微小球への励起光量を弱くしても検出が可能となり、PS微小球が発する蛍光時間を延ばすことができた。

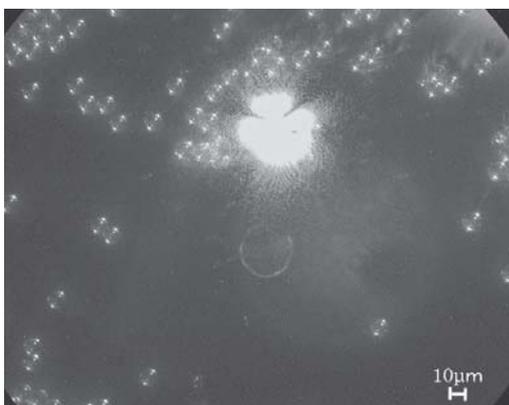


図6 PS微小球の測定

3.2 酵素濃度によるWGモードの評価

図7は、2.1で構築した単一微小球の検出システムにより、純水中におけるPS微小球の散乱光を検出したスペクトルである。抗体のみが固定化している図7(a)では、蛍光の波長帯域(560~615nm)の中に周期的な共鳴ピーク信号を確認することができ、単一のPS微小球からWGモードを検出できていることが分かる。また、空気中のPS微小球の散乱光スペクトルと比較すると、共鳴ピークが長波長側へシフトしているのを確認した。このシフト変化が起きる時間は15~20分程度であった。さらに、濃度が異なる酵素溶液(β-galactosidase)を滴下し、抗原抗体反応後のスペクトルを検出したところ、酵素濃度が高くなるに従い共鳴ピーク信号が長波長側へシフトしているのを確認した。

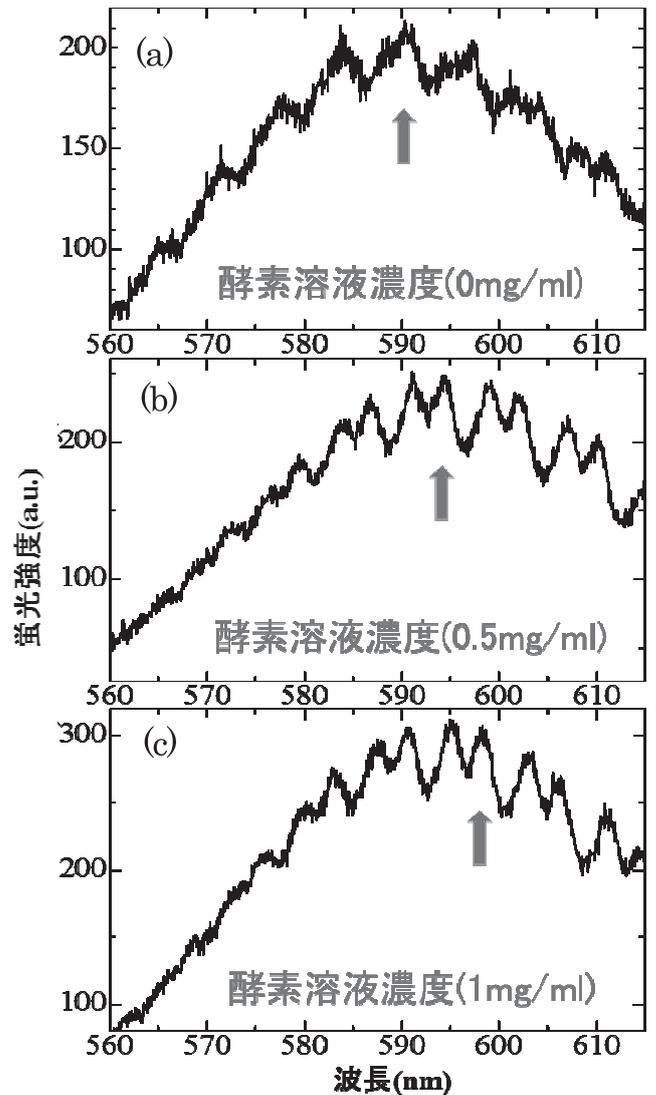


図7 PS微小球の散乱光スペクトル変化

そこで、図8に示すように、Mie散乱理論の散乱断面積のフィッティングにより、抗原抗体層の厚みと屈折率の評価を行い、共鳴ピークシフトが抗原抗体反応に起因するものか検証を行った。

図8(a)は直径10 μm のPS微小球の屈折率を1.55、水の屈折率を1.33としてフィッティングした結果、抗体層の屈折率は1.50と見積もることができた。溶液中におけるPS微小球の屈折率はHimmelhausら^[5]の報告より1.50となっている。また、タンパク質の屈折率はFanら^[6]の報告では1.50、Voros^[7]の報告からは1.35~1.6となるため、本実験で算出した値とほぼ一致していることが分かった。

図8(b)(c)は抗原抗体層の厚みをフィッティングした時のスペクトルであるが、この結果より、抗原抗体層の厚みは30~70nmとなり、屈折率の値は1.50となることが推定された。抗体と酵素の屈折率が同じ値となったため、WGモードのピーク信号のシフトはPS微小球の直径の増加に起因していることが考えられる。

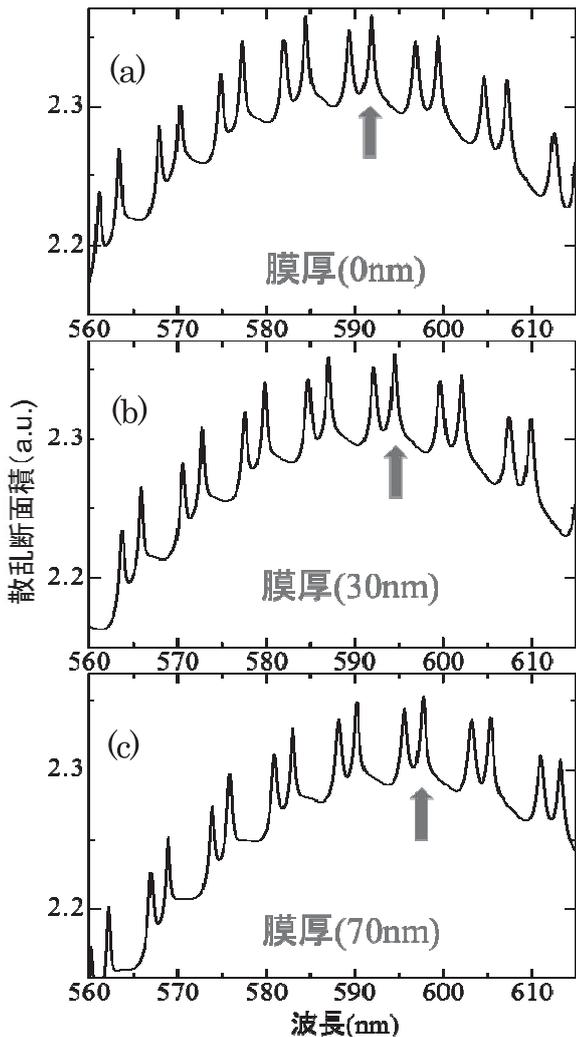


図8 散乱断面積によるシフト計算

3.3 WGモードの splitted 信号の評価

図7(b)(c)に示すように酵素溶液(β -galactosidase)を滴下し、PS微小球上で抗原抗体反応が起きると、共鳴ピークが splitted する新たなモードが発生していることを確認した。一方、図9のように抗体が固定化してないPS微小球では酵素溶液(β -galactosidase)を滴下しても、共鳴ピーク信号に splitted が起きず、新たなモードが発生しないことを確認した。

このため、共鳴ピークの splitted はPS微小球の表面上で酵素(β -galactosidase)と反応した時に発生するモードであることが考えられる。PS微小球表面上で酵素(β -galactosidase)が結合するとPS微小球の半径が Δr 増加し、周回するWGモードの光路長が Δl 増加し、共鳴する波長も $\Delta \lambda$ 増加すると仮定する。抗原抗体反応後の splitted 幅(2.4~3.3nm)より、光路長の増加(Δl)を算出したところ、約200~270nmと推定された。また、 $\Delta r = \Delta l / 2\pi$ の関係式より、PS微小球の半径の増加(Δr)を算出すると約30~40nmとなった。酵素(β -Galactosidase)のサイズは構造によっても異なるが、Skalovaら^[8]が分析した報告では、直径が30~60nmとなっている。このため、本実験から算出した値とほぼ一致していることが分かり、共鳴ピーク信号の splitted は酵素サイズに起因していることが考えられる。また、この結果より splitted 信号を確認することでPS微小球の表面に吸着した酵素(β -Galactosidase)を容易に判定できることが分かった。

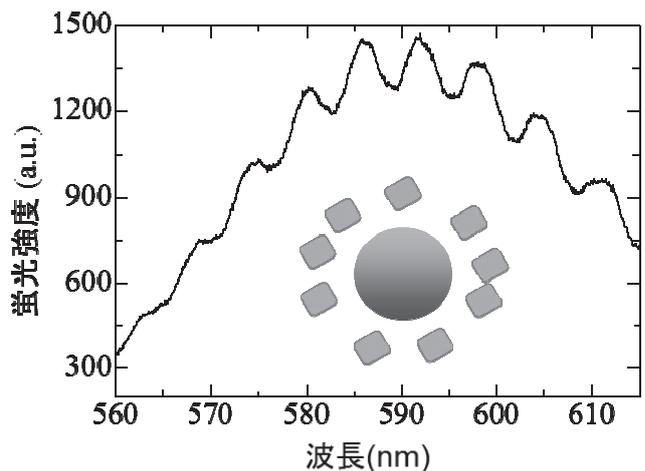


図9 抗体が固定化してない散乱光スペクトル

4. 結言

微生物汚染(大腸菌群)を判定するプローブとして、抗体を固定化したPS微小球プローブを組み込んだ顕微分光装置(システム)を作製した。大腸菌群が産生す

る分解酵素の β ガラクトシダーゼ(β -galactosidase)と抗原抗体反応させたところ、PS微小球からのWGモードの散乱光スペクトルの変化を20分以内で確認することができた。また、酵素濃度を変えたWGモードのスペクトルシフト量より、抗原抗体層の厚みは30~70nm、屈折率は1.50と推定された。さらに、抗体を固定化したPS微小球のみ、スペクトルピーク部にスプリットモードが発生し、このモードがPS微小球表面上の酵素吸着に起因していることを確認できた。今後はこの開発した検査手法を応用することで、小型で安価なバイオセンサー装置の完成を目指していく。

参考文献

- [1] 田尻健志, 松本周三, 原口雅宣, 今任稔彦, 長崎県工業技術センター研究報告, No40, pp.27-29(2011)
- [2] 田尻健志, 松本周三, 原口雅宣, 今任稔彦, 長崎県工業技術センター研究報告, No41, pp.31-33(2012)
- [3] 福井萬壽夫, 大津元一, 光ナノテクノロジーの基礎, オーム社, (2003)
- [4] T.Tajiri, S.Matsumoto, T.Imato, T.Okamoto, and M.Haraguchi: Ext.Abstr, Seventh International Conference on Molecular Electronics and Bioelectronics (M&BE7), p221 (2013).
- [5] M.Himmelhaus, S.Krishnamoorthy, and A.Francois: Sensors 10 6257 (2010).
- [6] X.Fan, I.M.White, S.I.Shopova, H.Zhu, J.D.Suter, and Y.Sun: Anal. Chim. Acta 620 8 (2008).
- [7] J.Voros: Bio. Journal 87 553 (2004)
- [8] T.Skalova, J.Dohnalek, V.Spiwok, P.Lipovova, E.Vondrackova, H.Petrokova, J.Duskova, H.Strnad, B.Kralova, and J.Hasek: J. Mol. Biol. 353 282 (2005).