

微小球共振光センサーを用いた微生物迅速検出装置の開発

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

食品産業において、食品の安心安全の観点から、微生物汚染を未然に防止する自主検査が要望され、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物質を検出できるセンサーチップを作製し、高感度・迅速（リアルタイム）に検査できる光学検査法と融合することで、汚染された食材を 20 分以内で判別する自主検査用の迅速装置の開発を進めている。本報では微生物汚染物質を高感度に判定できる微小球センサーの作製条件の確立と白色光源を使用した検出システムの構築、および、微生物汚染物質が吸着する前の微小球の光学モデルを考案した。

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。

そこで本研究では高感度で培養前の迅速な判定を実現するために抗原抗体反応を利用した微小球センサーチップの開発、および、このセンサーチップに付着した微生物汚染物質を判定する光学モデルと検出閾値を設定した光学判定システムの開発を進めている。

センサーチップで使用する微小球センサーは、微小球に光を入射するとある条件下で、微小球内を周回する電磁波モードが発生し、特定波長の入射光が強く散乱されることが分かっている^[1]。この周回する特有の電磁波モードは、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)と呼

ばれており、微小球表面状態（屈折率、コート厚み）に非常に敏感である。このため、本研究ではこれらの特性を利用することで、微小球表面に付着した汚染物質を高感度に判定できるセンサーチップと検出システムの開発を行う。

本報では、微生物汚染状況を高感度に判定できる微小球センサーとして、ポリスチレン微小球（直径10 μ m）を使用し、微小球表面に抗体を固定化する最適な作製条件を確立した。また、白色光源を使用した単一微小球の散乱光検出システムを構築し、微小球の光学モデルについても検証した。

2. 実験方法

2.1 微小球センサーの作製

微小球センサーは溶液中で使用するため、微小球と周辺媒質の屈折率差は小さくなる。そのため、検出する散乱光強度が微弱でピーク幅もブロードとなり、高い屈折率を持つ微小球を選定する必要がある。そこで、本研究では、水中（屈折率 $n=1.33$ ）でも散乱光ピークの発生が可能な屈折率 $n=1.59$ のポリスチレン微小球（以下、PS 微小球）を選定している^[2]。

また、ポリスチレン微小球の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の産生する分解酵素（ β -galactosidase）に対する抗体（Anti- β -galactosidase）を選択した。

図 1 に示すように、微小球への抗体の固定化は、カルボキシル基を修飾した PS 微小球が凝集しないよう

に攪拌しながら行い、共有結合によって固定化した。

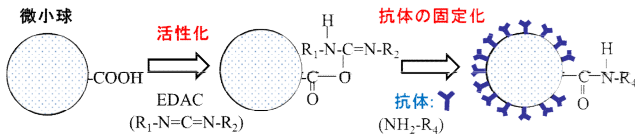


図1 PS 微小球と抗体の固定化

2.2 単一微小球の散乱光検出システム

平成 24 年度までに、単一の蛍光微小球を励起し、蛍光スペクトルを検出するシステムの構築を行なった。[3],[4]。しかし、蛍光微小球は時間とともに蛍光スペクトル強度が減衰し、さらに、微小球ごとに蛍光強度のバラつきが発生していた。そのため、これらの課題を解決するために、図 2 で示すように、白色光源 (ENERGETIQ 社製、LDLS 白色光源 EQ-99、 $\lambda=170\sim 2100\text{nm}$) を照射光源として使用し、時間経過によって減衰がない検出システムを構築した。

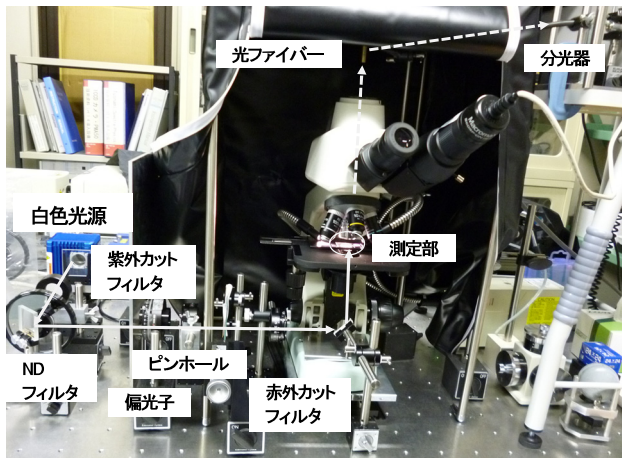


図2 白色光源による単一微小球の計測システム

また、抗体や検出感度に影響する余分な波長帯域(紫外帯域、赤外帯域)はカットフィルタで遮断し、励起用に用いる油浸対物レンズ (ニコン製) は、NA (Numerical Aperture)=1.25、倍率 100 倍、WD (Working Distance)=0.17mm を使用した。さらに、カバーガラスとの屈折率差を防ぐためマッチングオイル(屈折率 1.515)を使用し、励起光のスポット径が微小球以下になるように調整し、基板からのノイズを抑えるようにした。図 3 は図 2 の測定部における単一 PS 微小球への照射状態を示している。

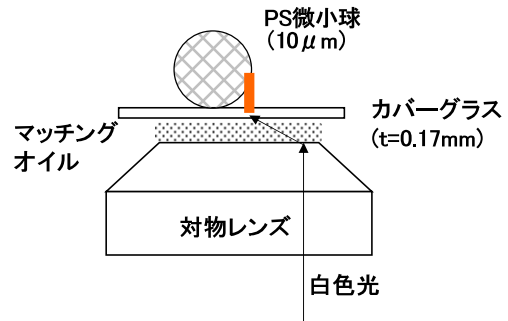
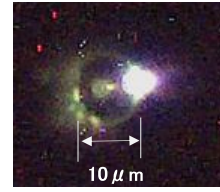


図3 単一微小球への照射状態

3 結果と考察

3.1 微小球センサーの評価

分光光度計(島津製作所製、UV-1200)の波長 280nm を使用し、固定化した抗体量を吸光度測定値より算出したところ、81.6 $\mu\text{g}/40\mu\text{l}$ の抗体の投入量に対して、1 時間後では 25.8 $\mu\text{g}/40\mu\text{l}$ (約 32%)、17 時間後では 40.2 $\mu\text{g}/40\mu\text{l}$ (約 49%) が固定化していることが分かった。

3.2 単一微小球からの散乱光スペクトル

図 4(a) は、2.2 で構築した単一微小球の検出システムで検出した純水中における PS 微小球の散乱光を検出したスペクトルである。570~610nm の波長帯域の中に TE 偏光と TM 偏光に対応した周期的な共鳴ピークを確認することができ、単一の PS 微小球からの WG モードを検出していることが分かる。また、空気中よりも純水中の PS 微小球の散乱光スペクトルは、共鳴ピークが長波長側へシフトすることが確認できた。

次に、図 4(b) 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、純水中の微小球の光学モデルの検証を行った。微小球の球径と屈折率をそれぞれ 10.04 μm と 1.59、水の屈折率を 1.33 としてフィッティングした結果、実験で検出した散乱光スペクトルピークとほぼ一致していることが分かった。

この微小球の光学モデルは、抗体膜厚、および、抗原抗体膜厚を評価するための基準モデルとなる。さらに、抗体や酵素が付着したスペクトルをフィッティン

グして多層構造の光学モデルに拡張することで、汚染物質として検出する分解酵素 (β -galactosidase) を迅速に判定することが可能となる。

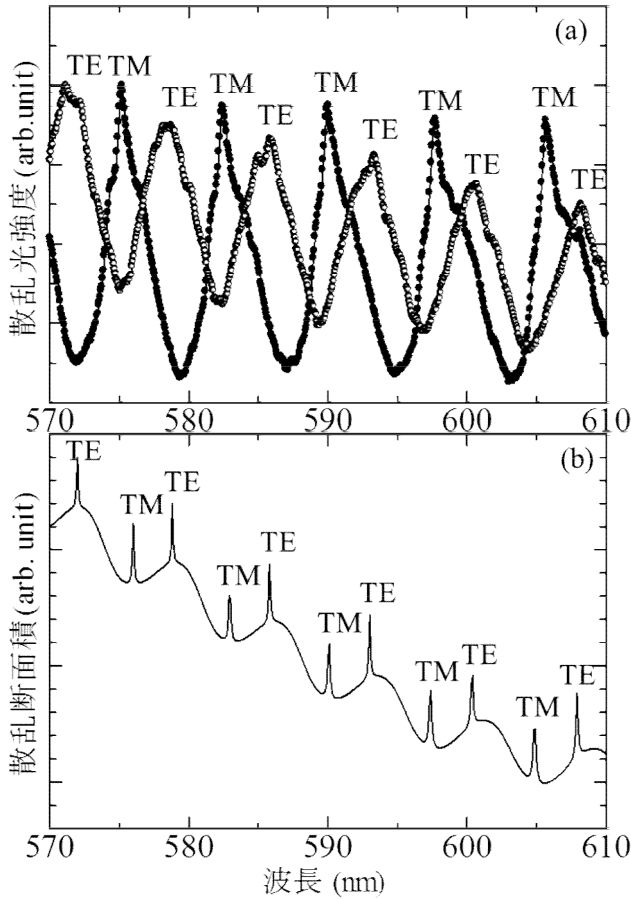


図4 水中における散乱光スペクトル

4. 結 言

微生物汚染を検出する微小球センサーとして大腸菌群の産生する分解酵素 (β -galactosidase) に対する抗体 (Anti- β -galactosidase) の最適な固定化条件を決定した。また、単一微小球の照射に白色光源を使用することで、時間経過に依存しない、散乱光検出システムを構築し、基準となる微小球の光学モデル (微小球径 $10.04\mu\text{m}$ 、微小球の屈折率 1.59、水の屈折率 1.33) を設定した。平成 26 年度は、作製した微小球センサーにより分解酵素 (β -galactosidase) の検出を行い、濃度による検出限界、および、検出時間の検証を進める予定である。

参考文献

- [1] 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).
- [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, No40, pp.27-29 (2011).
- [3] 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, No42, pp.19-23 (2013).
- [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).