

# 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、昨年度に構築した微生物汚染の判定システムを小型化した卓上型検出装置を開発し、ポリスチレン微小球（直径10 $\mu$ m）の散乱光スペクトルを、Mie散乱理論により評価した。また、散乱光から取得する共振ピーク波長を高感度・高精度にするため、平面基板の凹溝上に微小球を配置する検出方法について検証した。

## 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、各社の衛生管理体制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、企業のブランドイメージの失墜につながるようになるため、衛生管理体制を強化し事故を防止することが重要となっている。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、食材から採取した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、迅速で正確な検査を低コストで実現できる方法が求められている。

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、ある条件下で微小球に光を入射すると、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<sup>[1]</sup>。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装置の開発を行う。

本報では、昨年度に構築した微生物汚染の判定システムを小型化した卓上型検出装置を開発し、ポリスチレン微小球（直径10 $\mu$ m）の散乱光スペクトルをMie散乱理論と実験の両面で検証した。また、散乱光から取得する共振ピーク波長を高感度・高精度にするため、平面基板の凹溝上に微小球を配置する検出方法を考案し検証した。

## 2. 実験方法

### 2.1 卓上型検出装置の構成

平成26年度では、油浸対物レンズの全反射・減衰配置により単一の微小球を励起し、散乱光を検出する微生物汚染の判定システムを構築した。また、抗体、さらに抗原が結合した微小球の表面状態を散乱光スペクトルにより検証した<sup>[2]</sup>。平成27年度は、構築した判定システムを基に、検査現場への持ち込み可能な卓上型の検出装置を開発した。

図1に示すように、検出装置はブレッドボード（W600mm×D450mm）上に、励起光源である白色光源（ENERGETIQ社製、LDLS白色光源EQ-99、 $\lambda=170\sim 2100\text{nm}$ ）と各光学部品素子を配置し、外乱光を遮蔽する暗箱（W370×D230×H300mm）内に微小球の観測部を設置した。白色光源からの励起光は、波長カットフィルタにより可視光領域のみを透過させ、偏光子（グラントムソンプリズム、GTPC-10-25AN）を90°回転す

ることで、ランダム偏光からTEとTMの偏光方向を選択した。また、暗箱の入光部にNDフィルタを設置し、励起光の光量調整と外乱光の入射を防止した。また、図2に示すように、微小球はCCD画像を確認しながら励起し、散乱光の検出時には暗箱内の前扉を閉じて測定する構造とした。

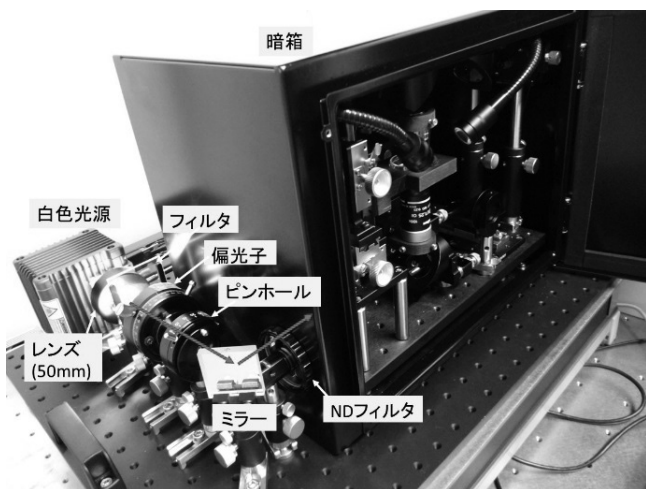


図1 卓上型検出装置の入光部

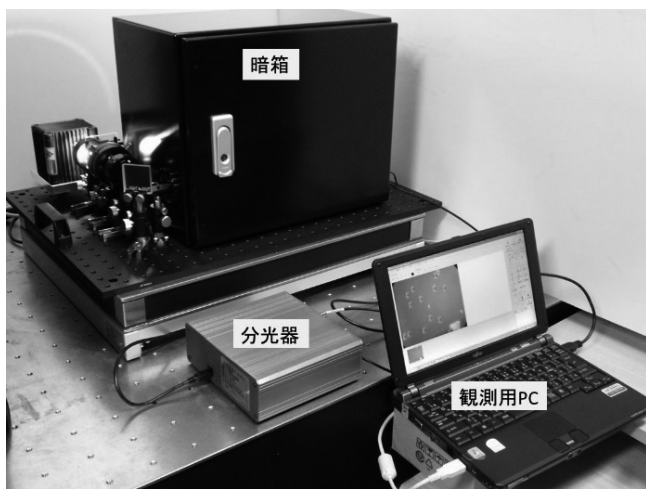


図2 微小球の観察および計測

図3に示すように、暗箱内では油浸対物レンズ(CFI 100×H、NA 1.25)を倒立型に設置し、XYZステージに設置したガラスベースディッシュの底面ガラスに全反射-減衰配置で入射した。カバーガラス上に配置した微小球は、エバネセント光により励起されWGモードの情報を含んだ散乱光を発生した。この散乱光を検出用する対物レンズ(CF IC EPI Plan SLWD 50×A、WD=13.8mm)は、XY方向に調整できるため、励起用の油浸対物レンズと光軸を調整した。検出用の対物レンズで受光した散乱光は、光ファイバーで導光させて

分光器で検出した。また、顕微鏡用USBデジタルカメラシステム(SCORP-ON-Direct USB、130万画素)を設置し、Y軸方向にミラーを移動することで、微小球の観察と計測を切替えた。

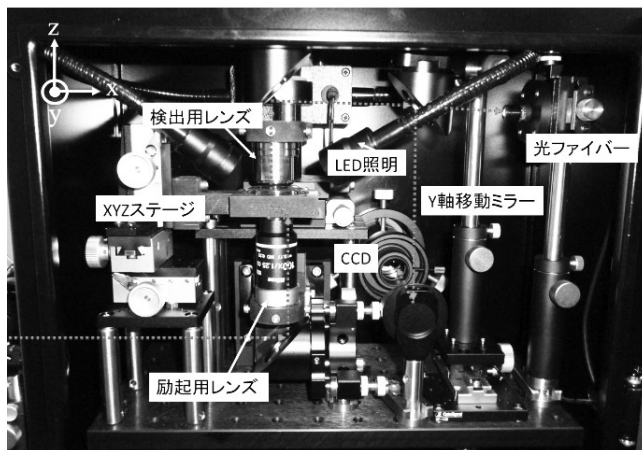


図3 暗箱内部の構造

## 2.2 卓上型検出装置の評価方法

図4に示すように、実験に使用したポリスチレン微小球(直径 $10\mu\text{m}$ 、屈折率1.59)は、周囲を純水( $100\mu\text{L}$ )で満たし、上部をカバーガラス(サイズ $24\times 24\text{mm}$ 、厚み $0.12\text{-}0.17\text{mm}$ )で封止した後、散乱光を検出した。集光した励起光を標的の微小球のみに作用させることで、基板表面の付着物質や溶液中の不純物質による迷光を抑えた検出ができた。本検出装置では、油浸対物レンズの後焦点面に平行光を入射し、微小球径以下に集光した。また、微小球にWGモードを励起し、散乱光にTE偏光とTM偏光に対応した周期的な共振ピーク波長を確認した。なお、昨年度に構築したシステムと同等の性能を有しているか評価するため、 $580\sim 610\text{nm}$ の散乱光を分光器(PMA50)で検出し、Mie散乱理論の散乱断面積により共振ピーク波長の位置を検証した。

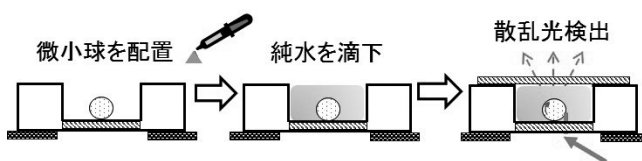


図4 微小球のWGモード評価

## 2.3 微小球共振光センサーの高感度・高精度化

微小球表面で抗原抗体反応が起こると、共振ピーク波長がスプリットし、S/N比とシフト量の精度が悪く



なる現象が確認された<sup>[3]</sup>。図5 (a)は微小球を励起するスポット位置を示している。図5 (b)はTE偏光のみで微小球を励起しているが、(3)の斜め方向入射になると、TE偏光とTM偏光に対応した共振ピーク波長が同時に検出された。微小球を周回するWGモードがXZ平面に対して約45°傾いているために、TE偏光とTM偏光が同時に励起されたと推測する。このため、抗原抗体反応が起ると、微小球を周回するWGモードの方向が変化することが考えられる。さらには、抗原抗体反応により接触面が増加することで、微小球を配置しているカバーガラス側へ光が放射され、共振ピーク波長の強度が減少することが考えられる。

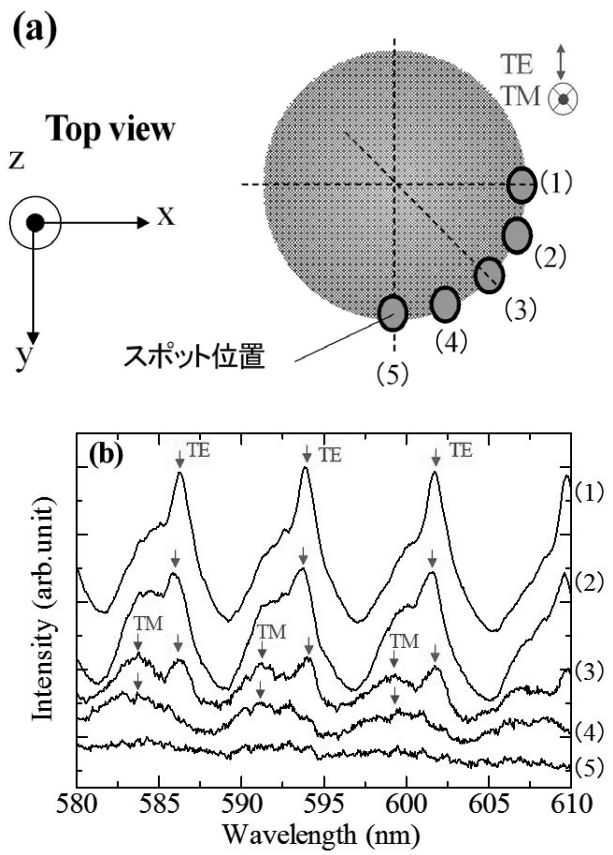


図5 共振ピーク波長のスプリット

そこで、図6に示すように、微小球とカバーガラスとの接触面を無くすため、マニピュレータシステムにハードメタルツール(先端径5 $\mu$ m)を設置し、カバーガラスに球径の半分程度の凹溝形状の溝を切削した。次に、図7に示すように、シングル電極(先端径10 $\mu$ m)に取り換え、切削した凹溝上に微小球を移動した。図8は、凹溝上に微小球を配置した模式図であるが、WGモードの軌道が基板と接触しなくなり、抗原抗体反応後の標的物質の増加による影響を抑えることがで

きる。なお、凹溝上に配置した微小球は切削方向(-X方向)にエバネセント光を作用させ、共振ピーク波長のスプリット現象や強度減少について検証した。検出部に滴下した分解酵素( $\beta$ -Galactosidase)溶液の量は100 $\mu$ L、濃度は10 $\mu$ g/mLで15分間反応させた。

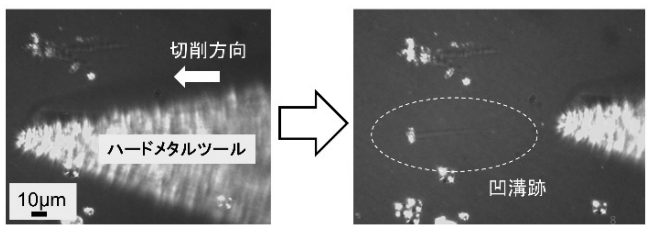


図6 凹溝形状の切削

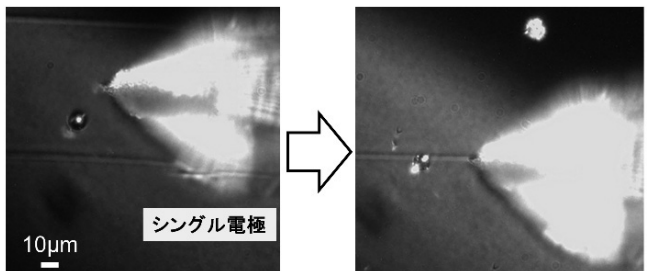


図7 凹溝への微小球の移動

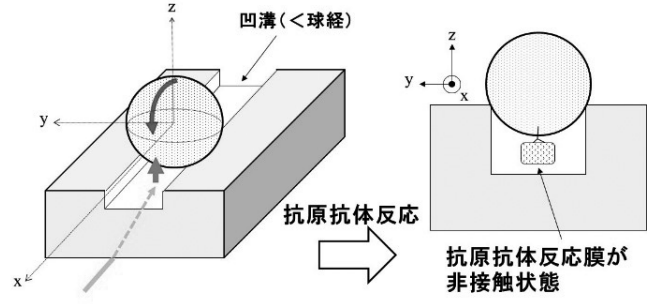


図8 凹溝上における微小球の表面状態

### 3 結果と考察

#### 3.1 卓上型検出装置の性能評価

図9は、白色光源を励起用の油浸対物レンズで集光した状態を示すが、スポット径が微小球の直径以下に集光していることを確認できた。標的の微小球のみから散乱光を検出できるため、S/N比率が向上し、明瞭なWGMのピーク波形を検出することが可能となった。

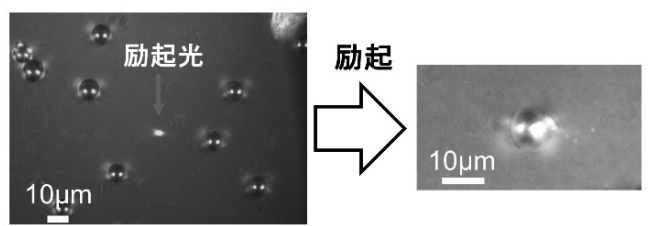


図9 微小球の励起状態

図10 (a)と(b)は、実験で取得した散乱光スペクトル、および、Mie理論による散乱断面積を示している。これらの縦軸強度は、ピーク波長の最大値によってそれぞれ規格化した。図10 (a)に示すように、TE偏光とTM偏光に対応した共振ピーク波長が検出され、各共振ピーク波長の間隔は7~8nmと確認できた。また、TE偏光の共振ピーク波長は、TM偏光の共振ピーク波長より2~3nm長波長側に確認できた。次に、図10 (b)に示すように、散乱断面積のピーク波長を図10 (a)の実験値で取得した共振ピーク波長にフィッティングさせると、微小球の直径( $d$ )は $10.04 \mu\text{m}$ 、微小球の屈折率( $n_s$ )は1.59、周囲媒体(純水)の屈折率( $n_{\text{water}}$ )は1.33となり、ポリスチレン微小球の仕様と一致した。このため、図10 (a)で取得した周期的な散乱光ピーク波長は、ポリスチレン微小球を周回するWGモードであり、本検出装置が昨年度に構築したシステム<sup>[2]</sup>と同等の性能を有することを確認できた。

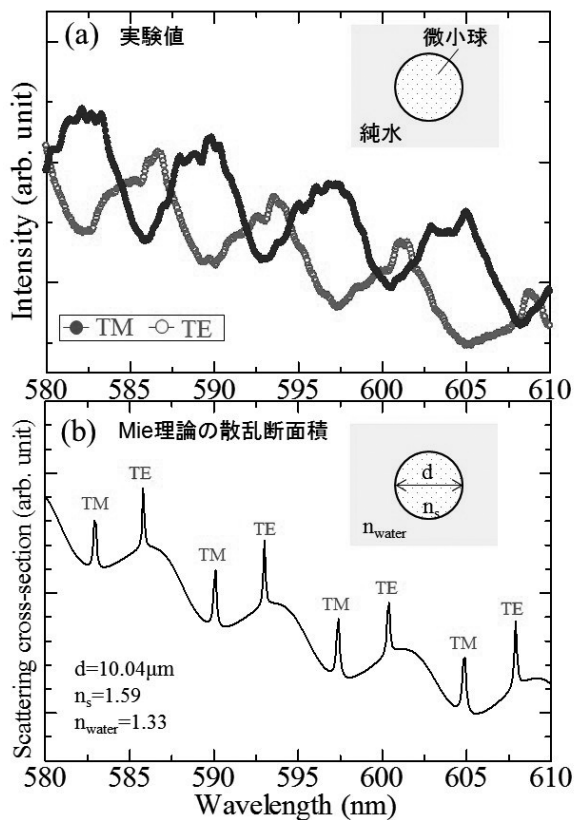


図10 微小球の共振ピーク波長

なお、本検出装置の仕様では、共振ピーク波長のシフト量を1nmの波長分解能で検出しており、判定時間は8分、検出下限濃度は $5 \mu\text{g/mL}$ となった。この検出下限濃度を守川らの酵素蛍光法<sup>[4][5]</sup>により、大腸菌群の個数に変換すると $10^6\text{CFU/mL}$ と推定できた。さらに

は、分光器の波長分解能を1nm以下で検出することで、 $10^5\text{CFU/mL}$ 以下の判定も可能となり、食品衛生法で規定する微生物の自主検査に対応できると考えられる。

### 3.2 凹溝上の微小球共振光センサーの評価

図11に示すように、凹溝上に配置した微小球に切削方向(-X方向)へのエバネセント光を作用させたところ、散乱光は発生しないため、凹溝が鏡面状態に切削できていることを確認できた。

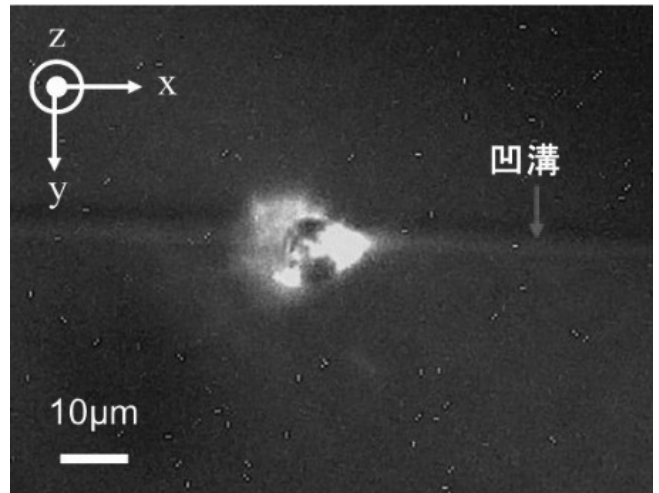


図11 凹溝上における微小球の励起

図12 (a)と(b)は、実験で取得した抗原抗体反応後の散乱光スペクトル、および、Mie理論による散乱断面積を示している。図12 (a)の基板の上に配置した微小球をTE偏光で励起すると、TE偏光の他にTM偏光に対応した共振ピーク波長も同時に検出された。一方、凹溝上に配置した微小球は、励起した偏光の共振ピーク波長のみが検出され、さらには、共振ピーク波長の強度が2倍程度になることを確認できた。これらは、微小球の表面が基板と接触しないために、球表面を周回するWGモードの方向が変化せず、放射損失も抑えていることが考えられる。

次に、図12 (b)に示すように、散乱断面積のピーク波長を図12 (a)の実験値で取得した共振ピーク波長にフィッティングさせると、微小球の直径( $d$ )は $10.04 \mu\text{m}$ 、微小球の屈折率( $n_s$ )は1.59、周囲媒体(純水)の屈折率( $n_{\text{water}}$ )は1.33となり、ポリスチレン微小球の仕様と一致した。さらには、抗体と抗原の厚みは30nm、屈折率は1.50と算出でき、これらの数値は抗体と抗原が結合した大きさと屈折率にほぼ一致した<sup>[6]~[11]</sup>。

このため、凹溝上へ微小球を配置する本計測手法は、共振ピーク波長のシフト変化を高感度・高精度に評価

し、微量な標的物質への検査に利用できることがわかる。

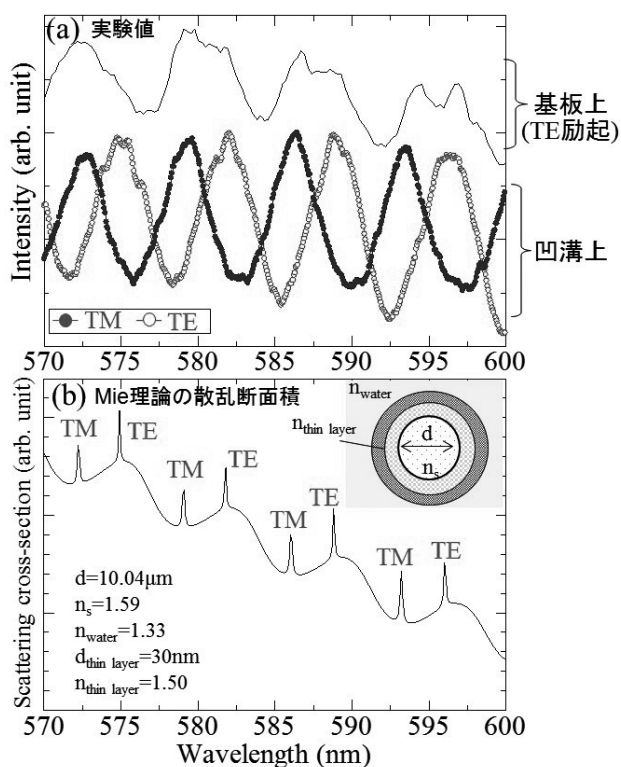


図12 凹溝上に配置した微小球のWGモード

#### 4. 結 言

微小球共振センサーを利用した卓上型検出装置を開発し、溶液中で微小球を周回するWGモードを確認することができた。微小球の散乱光から取得した共振ピーク波長は、Mie散乱理論の散乱断面積と一致し、微小球表面への汚染物質の吸着判定評価が可能であることがわかった。波長分解能を1nmで検出している現状の本検査装置の仕様では、大腸菌群の産生する分解酵素( $\beta$ -Galactosidase)を8分で判定し、検出下限濃度は $5\mu\text{g/mL}$ となる。分光器の波長分解能を高めることで、食品衛生法で定める $10^5\text{CFU/mL}$ 以下の微生物の迅速判定が可能であることがわかった。また、共振ピーク波長を高感度・高精度に検出する手法として、凹溝上に微小球を配置することで、抗原抗体反応後の共振ピーク波長のスプリットと放射損失を抑えることができた。今後、検査装置の実用・事業化を図るためには、標的となる検査対象物から夾雑物を取り除き、シフト量の再現性を高めていく必要がある。また、微小球共振センサー技術を活用することで、環境・健康・医療分野への応用展開も図っていく。

#### 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, 今任稔彦, 原口雅宣, 長崎県工業技術センター研究報告, No44, pp. 24-27 (2015)
- [3] T. Tajiri, S. Matsumoto, T. Imato, T. Okamoto, and M. Haraguchi, IEEE Sensors 2014 Conference Proceedings, pp. 641-644 (2014)
- [4] 守川彰, 古川誠司, 酵素蛍光法を用いた大腸菌群数計測装置の開発, 環境システム計測制御学会誌, 9 (2), pp. 127-132 (2004)
- [5] 守川彰, 上山智嗣, 古川誠司, 河相好孝, 石田稔郎, 大腸菌群数計測装置を用いた高効率オゾン消毒システムの開発, 水環境学会誌, 30, 3, pp. 139-144 (2007)
- [6] T. Tajiri, S. Matsumoto, T. Imato, T. Okamoto, and M. Haraguchi, Anal. Sci., 30, 799-804 (2014)
- [7] X. Fan, I. M. White, S. I. Shopova, H. Zhu, J. D. Suter, and Y. Sun, Anal. Chim. Acta, 620, 8 (2008)
- [8] J. Voros, Biophys. J., 87, 553 (2004)
- [9] L. F. Pease III, J. T. Elliott, D. Tsai, M. R. Zachariah, and M. J. Tarlov, Biotechnol. Bioeng., 101, 1214 (2008)
- [10] Y. H. Tan, M. Liu, B. Nolting, J. G. Go, J. G. Hague, and G. Y. Liu, ACS Nano, 2, 2374 (2008)
- [11] 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)