

# 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 研 究 員 松 本 周 三  
徳島大学大学院 教 授 原 口 雅 宣  
九州大学大学院 教 授 今 任 稔 彦  
(協力機関) 環境保健研究センター

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、自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。

本報では微生物を迅速・高感度に検出できるプローブ構造を検証し、そのプローブを効率良く励起できる近接場光励起システムを構築したので報告する。

## 1. 緒 言

食品の微生物検査は、厚生労働省で定める法定検査に加えて自主検査が実施されており、自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要す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10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10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。

本報では微生物を迅速・高感度に検出できるプローブの構造を検証し、そのプローブを効率良く励起できる近接場光励起システムを構築したので報告する。

## 2. 研究内容と結果

### 2.1 WGモードとプローブ構造の検討

単球と光の相互作用をマクスウェル電磁気学に基づいて理論解析したミー理論（Mie theory）では、ある条件下で球を周回する電磁波モードが発生し、その時には入射光は強く散乱されることが分かっている<sup>1)</sup>。この周回する電磁波モードはウィスパリング・ギャラリー・モード（Whispering Gallery Mode、以下WGモード）と呼ばれている。球の光散乱強度はRicatti-bessel関数からなる振幅関数 $a_n$ 、 $b_n$ を用いた散乱断面積の式(1)より、WGモードの励起により増大することが分かる。

$$\text{散乱断面積} = \frac{\lambda^2}{2\pi} \sum_{n=1}^{\infty} (2n+1) (|a_n|^2 + |b_n|^2) \cdots (1)$$

この散乱断面積を利用し、空気中における直径10  $\mu\text{m}$ 、 $\text{SiO}_2$  球（屈折率 $n=1.40$ ）の計算例を図1に示す。

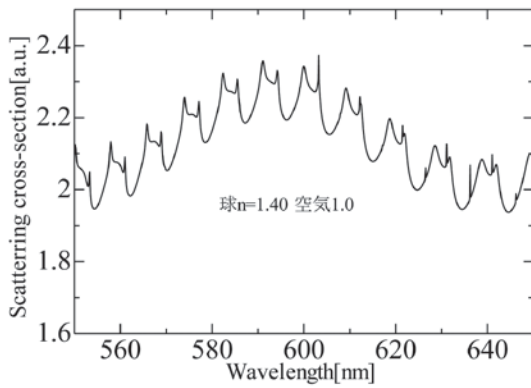


図1 散乱断面積の計算例

図1に示すように、入射光の波長がWGモードの角周波数に近づくと共鳴現象により散乱光ピークが発生していることが分かる。また、球内の電界強度を計算した結果、図2に示すように散乱光ピークには偏光特性があることが分かる。

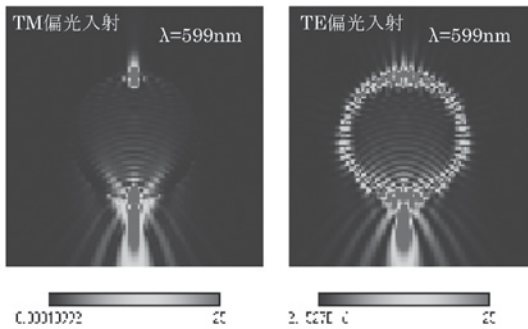


図2 微小球内における電界強度

この共鳴ピークは球の表面状態（屈折率、コート厚み）に強く依存<sup>2)</sup>するために、共鳴ピークのシフトを確認することで、球表面への付着物を高感度に検出することが可能である。次に媒質中における球の屈折率を選定するためWGモードの検証を行なった。図3に示すように、水中（屈折率  $n = 1.33$ ）で散乱光ピークを発生させるには、球の屈折率  $n$  が1.6以上必要になることが分かり、屈折率1.6をもつ材質であるポリスチレン球（以下、PS微小球）を選定することとした。

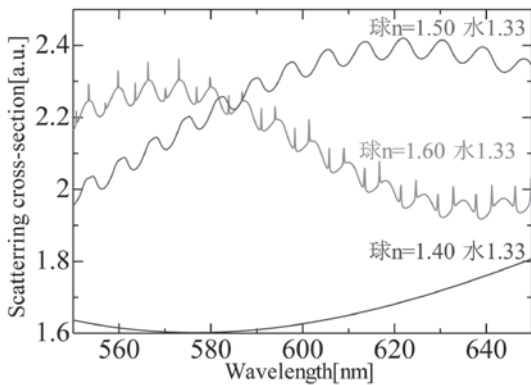


図3 媒質中における散乱断面積

## 2.2 抗体の固定化および固定化量の評価

微生物の判定をおこなうため、PS微小球の表面上に抗体を固定化し抗原抗体反応を利用する。抗体に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-Gal）に対する抗体（anti-β-Gal）を選択した。また、PS微小球の表面は疎水性のため物理吸着法を利用した抗体固定化法が有効であることが分かった。なお、PS微小球への固定化量の評価には図4に示すようにELISA(Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)を利用し、吸光度測定値からラングミュアプロットをすることでanti-β-Galの抗体量の評価を実施する。

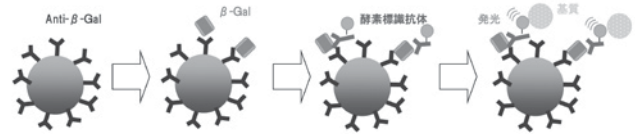


図4 抗体固定化、および評価方法

## 2.3 近接場光励起システム

PS微小球のWGモードを励起するためには入射光と球表面の角周波数を一致させる必要がある。しかし、表面プラズモンの励起方法と同様に、通常の伝播光では励起ができないため、近接場光による励起が必要となる。そこで本研究では、油浸対物レンズよりカバーガラスに全反射入射させることで、カバーガラス表面近傍に近接場光（エバネセント光）を発生させるPS微小球の励起システムを構築した。図5は実験光路の概略図であるが、励起光（ $\lambda = 532\text{nm}$ ）のレーザーをレンズで平行光（無限光学系）にし、ピンホールにより倒立型の油浸対物レンズの入射位置を調整している。また、油浸対物レンズを倒立型にするため、顕微鏡のコンデンサー部を改良し、微小球径以下にスポット径を絞ることが可能となった。

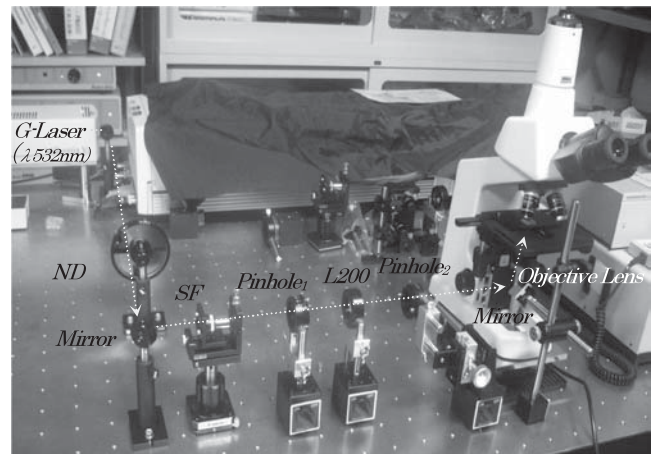


図5 励起システム

図6に倒立型油浸対物レンズの励起方法について示す。

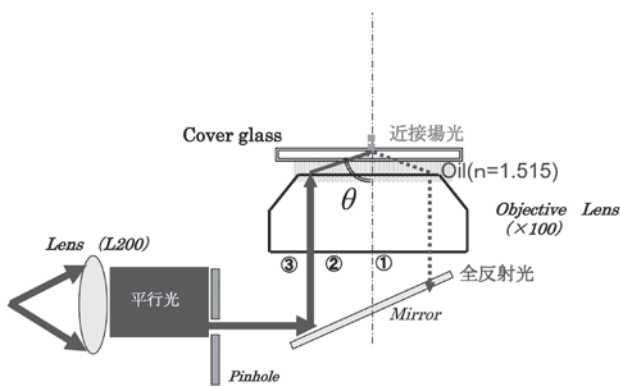


図6 油浸レンズによる励起方法

本励起システムではカバーガラスの屈折率  $n = 1.515$ 、油浸対物レンズの開口数  $NA = 1.25$  を用いるため、(2) 式よりカバーガラスへの入射角度  $\theta$  は最大で  $56^\circ$  となる。

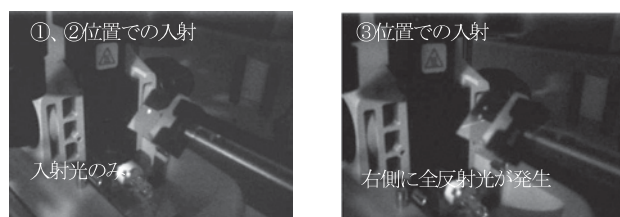
$$NA = n \sin \theta \quad \dots (2)$$

カバーガラス ( $n = 1.515$ ) は  $42^\circ$  以上の入射で全反射するため、油浸対物レンズへの入射位置をピンホールで調整することで全反射光 (エバネセント光) の発生が可能となる。

図7 (a) は図6の油浸対物レンズへの入射光位置を変化させた時の、カバーガラスの透過光を確認した様子である。①の中心部から②の辺縁部方向へ入射光をシフトするにつれ透過光が減少していく様子が確認できる。また、③の辺縁部では透過光がなくなり、図7 (b) のようにカバーガラスからの強い反射光を確認できる。



(a) カバーガラスの透過光



(b) 油浸対物レンズからの反射光

図7 透過光、反射光の様子

図8に反射光強度を計測した結果を示すが、②から③の位置にかけ急激に反射光強度が上昇する全反射光状態となり、近接場光 (エバネセント光) が発生していることを確認できた。

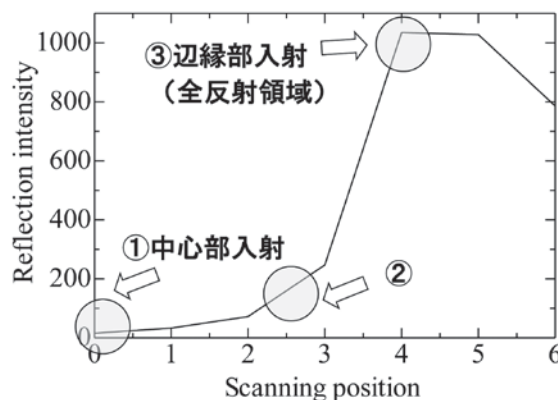


図8 カバーガラスからの反射光強度

### 3. 考察

PS 微小球の励起システムが構築できたため、油浸対物レンズから絞った光を PS 微小球に照射することで WG モードを励起し、PS 微小球から散乱光ピークを発生できると考える。本実験ではローダミン B 誘電体 ( $\lambda_{ex} 569\text{nm} / \lambda_{em} 585\text{nm}$ ) の蛍光色素で染色された PS 微小球の蛍光を先鋭化した光ファイバーで検出することで、散乱光ピークの検出が可能と考える。また、WG モードのシミュレーションと実測値の散乱光ピークを比較することで anti-  $\beta$ -Gal の固定、および  $\beta$ -Gal との結合が判定できると考える。

### 4. 結言

微生物 (大腸菌群) を検出するプローブとして PS 微小球を選定し、anti-  $\beta$ -Gal の固定化に物理吸着が有効なことが分かった。また、PS 微小球の励起に油浸対物レンズを利用した近接場光 (エバネセント光) の励起システムを構築することができた。平成 23 年度は、抗体-PS 微小球プローブを作成し、WG モードによる散乱光ピークを検出する予定である。

### 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) M.Haraguchi, F.Komatsu, T.Tajiri et al., Surface Science, Vol.548, No.1-3, pp.59-66, (2004)