

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、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。本報では微生物を瞬時に計測する手法を構築し、ポリスチレン微小球(10um)に抗体(Anti- β -galactosidase)を固定化する実験および評価を行なったので報告する。

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低減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のが可能となる。

本報では微生物を瞬時に計測する手法として、単一微小球の検出システムを構築し、10umのポリスチレン微小球(以下、PS微小球)に抗体(Anti- β -galactosidase)を固定化する実験および評価を行なったので報告する。

2. 研究内容と結果

2.1 単一微小球の検出システム

平成22年度は、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た^[1]。平成23年度は実際に単一の微小球を励起し、その散乱光を検出するシステムの構築を行なった。

励起用に用いる油浸対物レンズは、カバーガラスとの屈折率差を小さくする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小さくなるように調整している。本研究で使用している油浸対物レンズは、NA(Numerical Aperture)=1.25、倍率100倍、WD(Working Distance)=0.17mmである。

ここで、スポット径のサイズ W は(1)式で計算され^[2]、本研究で使用する波長が $\lambda=532\text{nm}$ の場合には、 $W \approx 0.5\mu\text{m}$ に絞れることが推測できる。

$$W \leq \frac{\lambda}{NA} \dots (1)$$

図1はヘリウムネオン(HeNe)レーザー($\lambda=632.8\text{nm}$)を直径10umのPS微小球に照射する時の様

子であるが、単一のPS微小球に球径以下に絞った光が入射していることが分かる。このため、PS微小球に抗体を固定化し、抗原抗体反応時の散乱光を検出すれば、単一のPS微小球の表面状態の信号を検出できることになる。

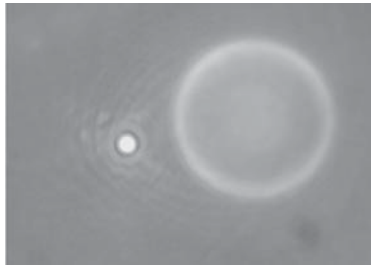


図1 励起光のスポット径

図2に示すように、単一のPS微小球の計測部分は、顕微鏡のステージプレート部にガラスベースディッシュ（IWAKI製、底面厚み0.15～0.18mm）を取り外しできるように設計し、凝集した微小球はマニピュレータ（ナリシゲ製、MMO-203）に装着した光ファイバー（先端部直径≒11μm）を操作することで、選別できるようにしている。

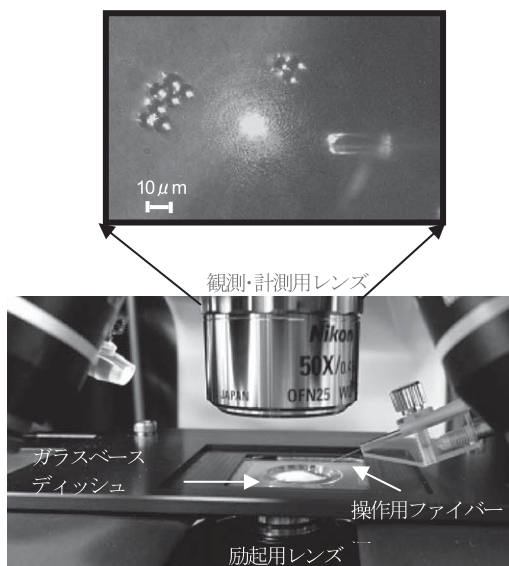


図2 計測部分

また、PS微小球の測定は溶液中で行うため、PS微小球（屈折率1.59）と媒質（屈折率1.33）の屈折率差が小さくなり観測が困難となる。そこで、ガラスベースディッシュの側面部よりライトガイド光を照射し、溶液中のPS微小球の位置を特定できる暗視野照明システムへと改良を行なった。最終的には、図3に示すように、顕微鏡の接眼レンズにCCDカメラを装着しPS

微小球をリアルタイムに観測しながら、散乱光を分光器で検出できるシステムを構築した。



図3 PS微小球の検出システム

2.2 抗体の固定化プローブの作製および評価

微生物の判定には、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-galactosidase）に対する抗体（Anti-β-galactosidase）を選択した。PS微小球に抗体（Anti-β-galactosidase）を固定するプローブは図4に示すように、カルボキシル基を修飾したPS微小球に抗体を共有結合させることで作製した。

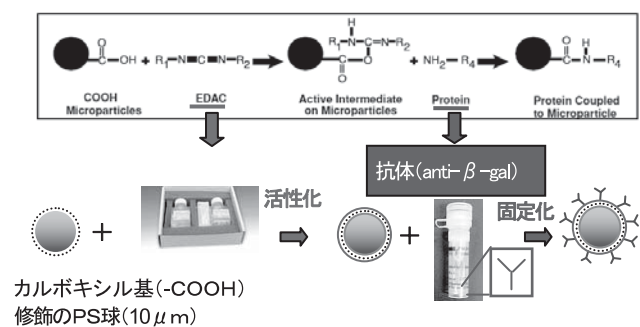


図4 抗体固定化プローブ

PS微小球への固定化量については、反応溶液の上澄み（固定化していない抗体）を取り除き、投入量との差分から算出する。タンパク質の紫外吸収が現れる280nmの吸光度測定値から抗体量を算出したところ、208ugの抗体の投入量に対して、約36%にあたる76ugが固定化していることが分かった。

2.3 単一微小球からの散乱光スペクトル

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]。測定ではこの周回する電磁波モードであるウィスパリング・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した。図5は、2.1で構築した単一微小球の検出システムにより、空気中におけるPS微小球の散乱光を検出したスペクトルである。蛍光の波長帯域の中に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モードを検出できていることが分かる。

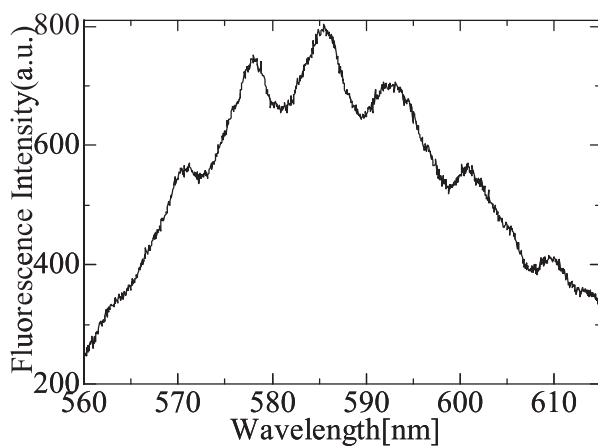


図5 散乱光スペクトル

また、溶液中において2.2で作製した抗体固定化プローブの散乱光を検出したところ、空気中のPS微小球の散乱光スペクトルと比較し、共鳴ピークのシフト変化が確認された。更に、酵素溶液(β -galactosidase)を滴下し、抗原抗体反応をさせた場合には、新たな共鳴ピークが発生していることを確認した。

3. 考察

2.3で発生した新たな共鳴ピークは、PS微小球に固定化した抗体(anti- β -galactosidase)と酵素(β -galactosidase)が反応した場合のみに現れる特有のモードであるのか確認する必要がある。そこで、抗体を固定化していないPS微小球に酵素溶液(β -galactosidase)を滴下し、散乱光のピークシフトやモードの変化を確認した。測定の結果、抗体が固定化していないPS微小球は、散乱光のピークシフトや新たなモードが発生せず、純水中の共鳴モードと類似していることが分かった。このため、抗原抗体反応時に現れる共

鳴モードは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。

4. 結言

微生物(大腸菌群)を検出するプローブとして抗体を固定化したPS微小球プローブを作製し、 β ガラクトシダーゼ(β -galactosidase)と抗原抗体反応させた時、PS微小球からの散乱光スペクトルの変化を確認することができた。平成24年度は、PS微小球プローブによるスペクトル検出の再現性を高め、卓上型の検出装置(システム)の構築を進めていく予定である。

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]左貝潤一, 光学の基礎, コロナ社, (1997)
- [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)

