

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に大腸菌群の有する特異な分解酵素(β -Galactosidase)を滴下し、微小球からの散乱光スペクトル変化をMie散乱理論と実験の両面で検証した。また、抗原抗体反応の反応速度論により、単一微小球を使用した散乱光検出システムによる分解酵素の判定時間と検出下限濃度を決定した。

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^[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、直径10 μ mのポリスチレン微小球(以下、PS微小球)を使用した。微小球からの散乱光スペクトル変化をMie散乱理論で解析した散乱断面積と比較することで、PS微小球表面の抗原抗体反応状態を評価した。また、抗原抗体反応の反応速度論により単一微小球の散乱光検出システムによる判定時間と下方検出限界の実用性を検証した。

2. 実験方法

2.1 単一微小球の検出システム

平成25年度では、大腸菌群の産生する分解酵素(β -Galactosidase)に対する抗体(Anti- β -Galactosidase)を固定化した微小球プローブの作製、および、浸対物レンズを使用した全反射減衰配置における単一微小球の励起と散乱光検出システムの構築を行なった^[2]。そこで平成26年度は、検出部へ分解酵素(β -Galactosidase)を滴下し、抗原抗体反応による微小球の表面状態と散乱光スペクトルの関係について検証した。

図1で示すように、油浸対物レンズ(100 \times)により、全反射減衰配置で照射された単一PS微小球は、TE偏光とTM偏光に対応するWGモードが励起される。PS微小球は、純水または分解酵素(β -Galactosidase)溶液中に配置されるため、検出部を松浪硝子工業(株)のカバーガラス(サイズ24 \times 24mm、厚み0.12-0.17mm)で封

止し、純水または分解酵素(β -Galactosidase)溶液の蒸発防止と表面張力による厚みムラを均一にした。このため、XY方向に観測部を移動してもCCD観測画像に焦点ズレが発生せず、経時的に安定したスペクトル測定も可能となる。また、微小球の表面状態の情報を含んだ散乱光は、検出用の対物レンズ(50 \times)で受光し光ファイバーで導光した後、分光器で検出した。

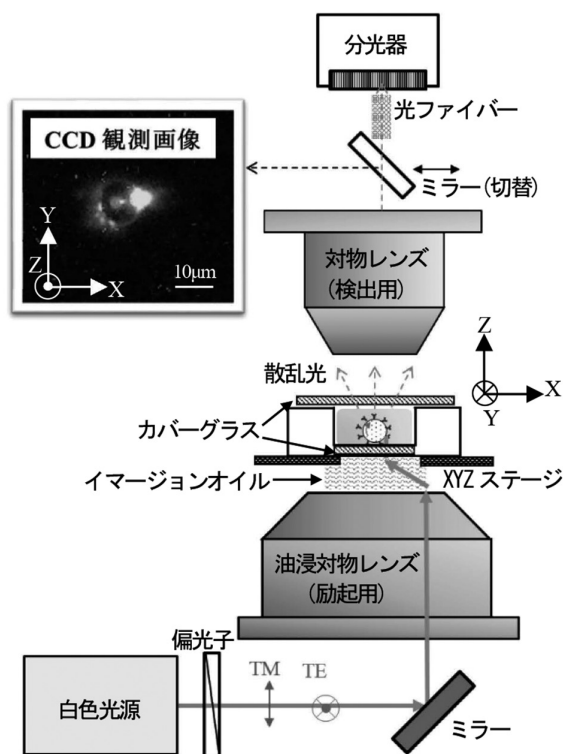
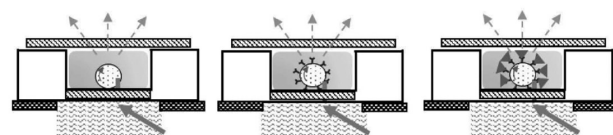


図1 単一PS微小球の評価システム

2.2 PS微小球表面の吸着評価方法

本システムでPS微小球にWGモードが励起されると、散乱光スペクトルの特定波長に鋭い共振波長ピークが確認される。この共振波長ピークはPS微小球の屈折率やサイズに依存している。本測定では、白色光源(ENERGETIQ社製、LDLS白色光源EQ-99、 $\lambda=170\sim 2100\text{nm}$)の580～610nmの波長帯域に着目し、TE偏光とTM偏光に対応した周期的な共振波長ピークを検出した。これらの共振波長ピークをMie散乱理論で得られる散乱断面積の波長ピークと比較することにより、微小球表面の吸着状態を評価した。図2に示すように、微小球の表面状態は、(a)微小球のみ、(b)微小球表面に抗体が固定化、(c)微小球表面に抗体と抗原が固定化の3種類を比較した。なお、検出部に滴下した純水または分解酵素(β -Galactosidase)溶液の量は100 μL であり、(c)の酵素溶液(β -Galactosidase)の濃度は

10 $\mu\text{g/mL}$ とした。



(a)微小球のみ (b)抗体固定化 (c)抗原抗体固定化

図2 微小球の表面状態の比較

2.3 抗原抗体反応時間とPS微小球表面の吸着状態

PS微小球表面において、抗原抗体反応による複合体の状態を検証するため、酵素濃度(β -Galactosidase)に対し、時間による共振波長ピークの変化量を比較した。抗原抗体反応の反応速度論では、抗原と抗体の複合体濃度は時間経過に伴い指数関数的に増加するため³⁾、本システムでは、共振波長ピークのシフト量 $\Delta\lambda$ が経時変化 Δt に伴い指数関数的に増加することが予測される。ここで、実験で得られた共振波長ピークのシフト量 $\Delta\lambda$ と経過時間 Δt の関係について反応速度論で得られた下記の非線形曲線関数でフィッティングし、抗原抗体反応の判定時間や検出下限濃度を評価した。

$$y = y_0 + \alpha e^{-(t-t_0)/\tau} \dots (1)$$

ここで、 y と y_0 は共振波長ピークのシフト量とシフト最大量、 α は振幅、 t と t_0 は経過時間と補正時間、 τ は減衰定数を示す。

なお、本システムでは、図3に示すように、検出部にカバーガラスの封止作業が発生するため、酵素溶液(β -Galactosidase)を滴下し、共振波長ピークのシフト量 $\Delta\lambda$ を取得するまでに約2分が経過している。

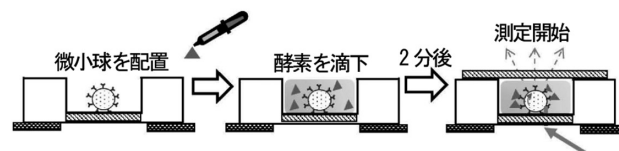


図3 検出部のカバーガラス封止

3 結果と考察

3.1 単一PS微小球からの散乱光スペクトル

図4は、実験で取得したTE偏光とTM偏光のそれぞれの散乱光スペクトルを示す⁴⁾。散乱光の隣り合う共振波長ピークの間隔は7～8nmであり、(1)から(3)へとPS微小球表面に抗体や抗原が固定化するにつれて、共振波長ピークが約1～4nm長波長側へシフトする。

PS微小球表面へ抗体や抗原が固定化することで、微小球の直径や屈折率が変化し、共振波長ピークがシフトしたと考えられる。なお、ここでの縦軸の散乱光強度は、散乱光強度の最大値によって規格化した。

図5は、Mie理論による散乱断面積を示している¹⁴⁾。微小球のみ:(4)の散乱断面積スペクトルの計算において、PS微小球の直径は $10.04\ \mu\text{m}$ 、微小球と周囲媒体(純水)の屈折率はそれぞれ1.59と1.33とした。PS微小球表面に抗体や抗原が固定化した場合には、抗体層:(5)と抗原抗体層:(6)のPS微小球モデルを考える。図4(2)、(3)の共振波長ピークを図5(5)、(6)に示した散乱断面積のピーク波長と比較した結果、抗体と抗原の厚みはそれぞれ14nmと16nmと算出できた。また、分解酵素(β -Galactosidase)が高濃度になるにつれて、抗原抗体反応によりPS微小球表面の密度が増加するために、抗原抗体層の屈折率は1.50～1.56と算出できた。これらの数値はタンパク質のサイズと屈折率にほぼ一致する¹⁵⁻¹⁹⁾。さらに、微小球表面において、抗原抗体層の厚みは30nmであることから抗原と抗体は1:1で反応していることが推測できる。

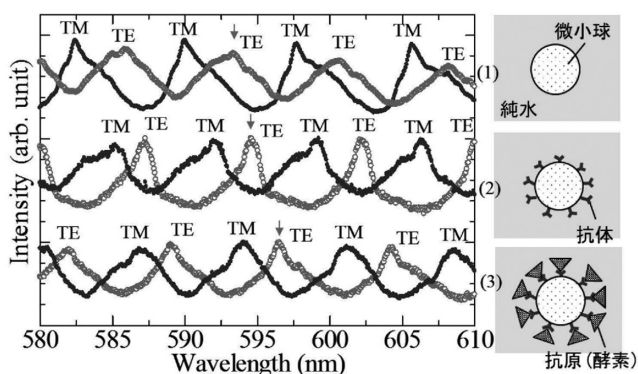


図4 PS微小球の表面状態と散乱光スペクトル

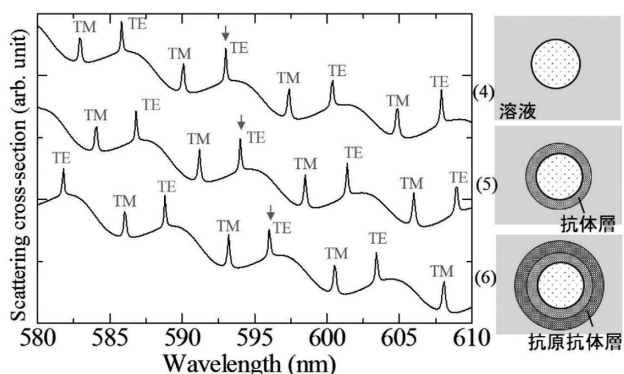


図5 Mie理論により算出したPS微小球の散乱断面積

3.2 抗原抗体反応による共振波長ピークシフト

図6は、抗原抗体反応が開始した後のTE偏光の共振波長ピークのシフト量 $\Delta\lambda$ を示す¹⁰⁾。共振波長ピークのシフト量 $\Delta\lambda$ は、図4の(2)のTE偏光に対する共振波長ピーク(587nm)からの変化量である。共振波長ピークのシフト量 $\Delta\lambda$ は、経時変化に伴い指数関数的に増加する。また、滴下する分解酵素(β -Galactosidase)の濃度が高濃度になるにつれて、共振波長ピークのシフト量 $\Delta\lambda$ は短時間に大きく増加する傾向を確認できる。

しかし、分解酵素(β -Galactosidase)の濃度が $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ になると、増加する傾きに変化がなくなり、シフト量 $\Delta\lambda$ も飽和しているのを確認できる。これらの変化を(1)式で表される非線形曲線関数でフィッティングして解析した。分解酵素(β -Galactosidase)の濃度が $5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上では、フィッティング解析の信頼度を示す決定係数(R^2)が0.82～0.90と高くなるため、微小球表面は時間とともに抗原抗体反応による複合層が形成されていることが予想される。一方、分解酵素(β -Galactosidase)の濃度が $1\sim 3\ \mu\text{g}/\text{mL}$ の低濃度では、決定係数(R^2)が0.78以下と低くなり、抗原抗体反応が指数関数的に増加していないことがわかる。さらに、本評価システムで使用した分光器の波長分解能は1nmであるが、共振波長ピークのシフト量 $\Delta\lambda$ が1nm以上となるのは、分解酵素(β -Galactosidase)の濃度が $5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の場合である。また、共振波長ピークのシフト量 $\Delta\lambda$ は8分で飽和状態に達するため、微小球表面の抗原抗体反応を安定して検出するには、最低でも8分を要することがわかる。

これらの結果より、本評価システムでは、分解酵素(β -Galactosidase)の検出下限濃度は $5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、検出時間は8分であることがわかる。

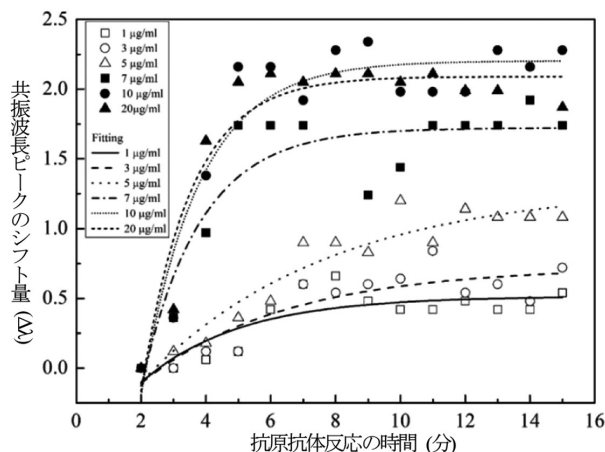


図6 時間変化による共振波長ピークのシフト量

4. 結 言

単一PS微小球の散乱光検出システムにより、大腸菌群の産生する分解酵素(β -Galactosidase)を検出した。Mie理論を利用した散乱断面積の光学モデルにより、微小球表面に固定化した抗体と抗原のサイズはそれぞれ14nmと16nm、そして、抗原と抗体の複合層の屈折率は1.50～1.56と算出できた。また、共振波長ピークのシフト量の安定性と分光器の波長分解能より、本検出システムの判定時間は8分、検出下限濃度は5 μ g/mLであることがわかった。本検出システムは10分以内での判定が可能のため、スクリーニングによって分裂前の汚染菌を迅速に判定検査できる可能性がある。平成27年度は、試作装置を作製し性能評価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, 今任稔彦, 原口雅宣, 長崎県工業技術センター研究報告, No43, pp.26-28 (2014)
- [3] 片倉啓雄, “バイオプロセスシステム: 効率よく利用するための基礎と応用”, 清水浩 編集, シーエムシー出版, 79 (2009)
- [4] T. Tajiri, S. Matsumoto, T. Imato, T. Okamoto, and M. Haraguchi, IEEE Sensors 2014 Conference Proceedings, pp. 641-644 (2014)
- [5] X. Fan, I. M. White, S. I. Shopova, H. Zhu, J. D. Suter, and Y. Sun, Anal. Chim. Acta, 620, 8 (2008)
- [6] J. Voros, Biophys. J., 87, 553 (2004)
- [7] L. F. Pease III, J. T. Elliott, D. Tsai, M. R. Zachariah, and M. J. Tarlov, Biotechnol. Bioeng., 101, 1214 (2008)
- [8] Y. H. Tan, M. Liu, B. Nolting, J. G. Go, J. G. Hague, and G. Y. Liu, ACS Nano, 2, 2374 (2008)
- [9] 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)
- [10] T. Tajiri, S. Matsumoto, T. Imato, T. Okamoto, and M. Haraguchi, Anal. Sci., 30,799-804 (2014)