

金属ナノ粒子を利用した 微生物検出法の開発

教授 椎木 弘

大阪府立大学 工学研究科
物質・化学系専攻 応用化学分野
表面計測化学研究グループ

<http://www2.chem.osakafu-u.ac.jp/ohka/ohka12/home.html>

食中毒発生状況(国内2019年)

総数 **1,061件** 被害者 **13,018名**

細菌・ウイルスが原因の事例

603件^{57%} **11,770名**^{90%}

消費者にとって脅威

食品工場では
食中毒は致命的

食中毒発生 → 営業停止3日間+社会的信用の失墜
例) 25億円以上の損失@中大手 (年売上350億)

食品工場での現在の対応

自社で衛生管理のプロセス・システムを開発運用

- ・商品（野菜など）洗浄
 - ・カット
 - ・調理
 - ・包装
 - ・保管
- などの各工程

HACCP
(危害要因分析必須管理点)
2021年6月義務化



+ 毎日

抜き取り細菌検査

微生物(細菌)検査

食品衛生検査指針・微生物編

公定法, およびそれに準ずる標準試験法

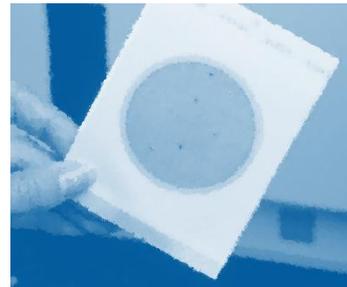
平板菌数測定

標準法 : 寒天培地を用いたコロニー計数

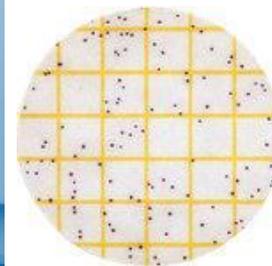
簡便法 : 各種細菌に対応した乾式フィルム培地



寒天培地



乾式フィルム培地



培養 (1~2日間) を要するため判定には数日以上

日常的な自主管理において非培養系の迅速な検出法の開発は喫緊の課題

従来技術とその問題点

	培養法	PCR法	IC法
構成	・ 培養設備	・ 検出器 ・ 試薬キット ・ クリーンベンチ	・ チップ (+培養設備)
測定範囲 (細菌)	○	○ 1-10 ⁷ 細胞	▲ 10 ⁵ 細胞<
検査時間	× 1日以上	× 1時間以上	▲ 15分 (+数時間)
ランニング	○ ~1000円	× 2000円<	○ 500~1000円/回
その他	×設備 ×多工程 ×人件費	×装置・設備 ×多工程 ×人件費	(×設備) (×多工程) (×人件費)

万能な検査法はない

従来技術とその問題点

万能な検査法の開発は無理!!

- ・ 操作が簡単
- ・ 特殊装置が不要
- ・ 低コスト
- ・ ある程度の感度や選択性

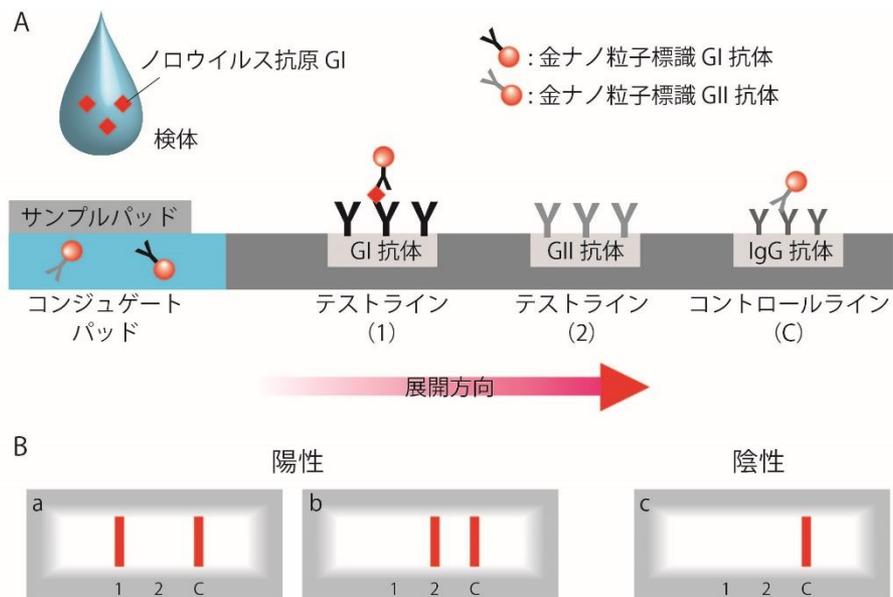
など、どの現場でも望まれている。

新たな検出技術の開発

- ・ 検出法の選択肢を増やす
- ・ 現場に合った検査を実現

イムノクロマト (IC) 法

Influenza virus
Pregnancy test
Food poisoning etc.



金属ナノ粒子の分散と凝集



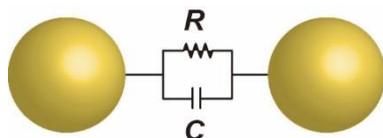
媒質に分散した金ナノ粒子はLSPRに基づく吸収 at 520 nm
凝集により長波長シフト (赤→青)
最終的に光学的にバルク金の特性を示す。



分散

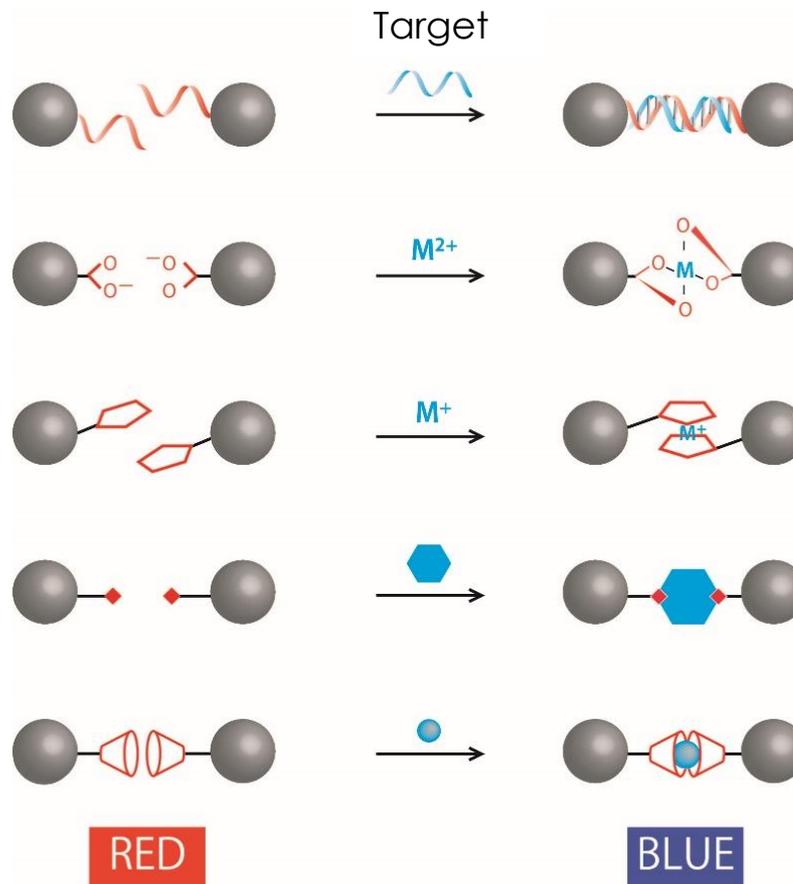


凝集



凝集体
粒界には保護層が存在→分子接合された金ナノ粒子
バルク金 (約1.6 mΩcm) とは異なる電気特性を示す。

金属ナノ粒子の凝集を利用



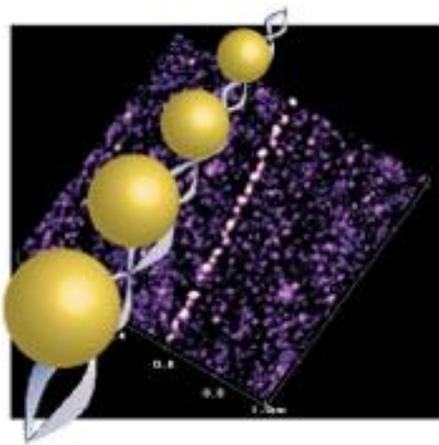
Colorimetric detection

金ナノ粒子の配列

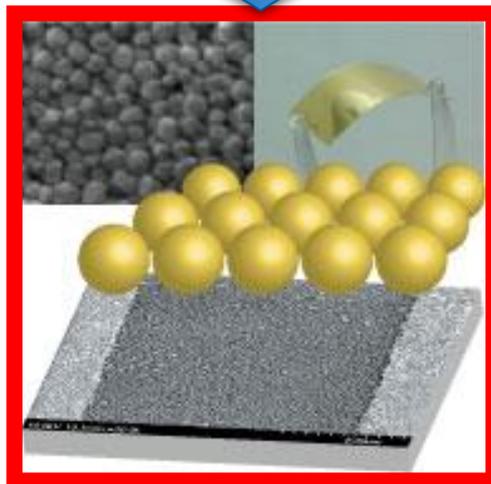
分散



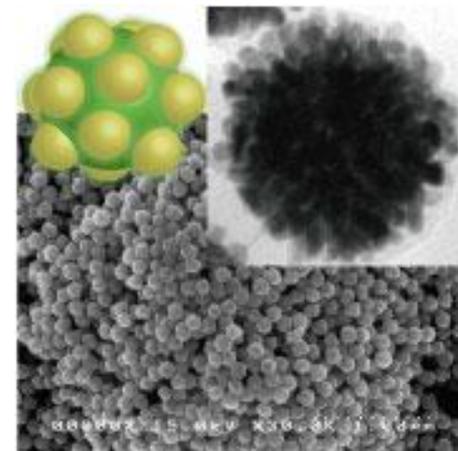
凝集



1D



2D



3D

金属ナノ粒子による薄膜形成

金属ナノ粒子の二次元配列による薄膜形成

金属ナノ粒子によるマイクロビーズの薄膜形成

SEM 表面像

TEM 断面像

メンブレン

善提樹の葉の金属化

単粒子層

マイクロビーズ

ゴルフボール

フレキシブル材料

96 穴マイクロプレート

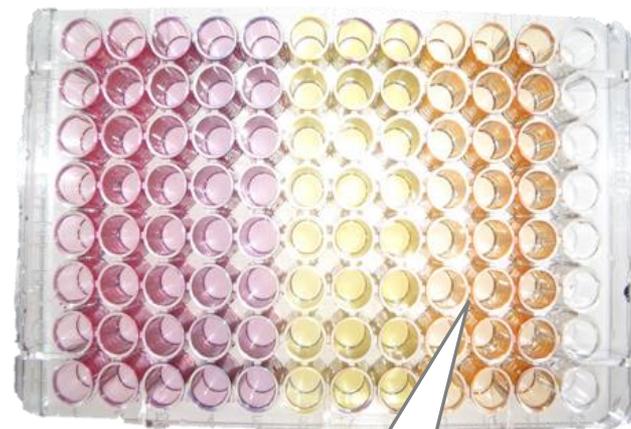
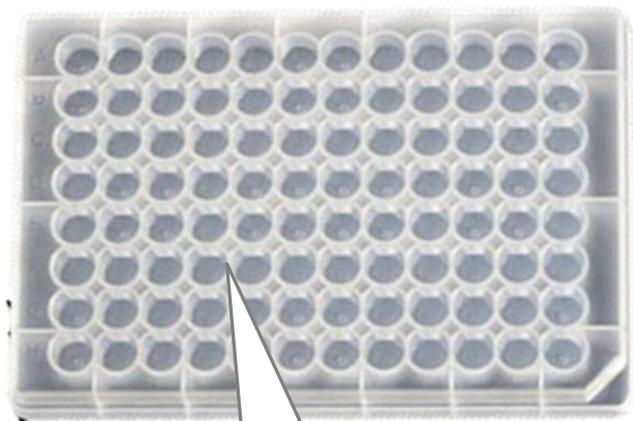
プリント配線

マルチフィラメント

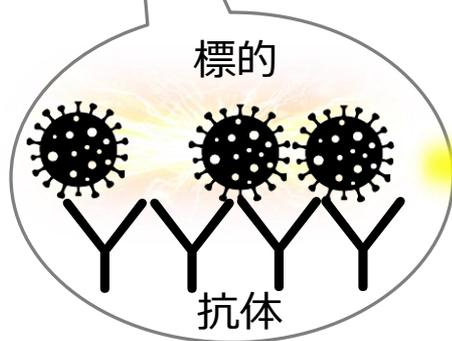
3D プリント造形

The image is a collage illustrating various applications of metal nanoparticles. At the top left is a large leaf with a gold-like metallic sheen, labeled '善提樹の葉の金属化' (Metalization of a tree leaf). To its right are two microscopy images: an SEM surface image of a spherical nanoparticle with a 2 μm scale bar, and a TEM cross-section image showing a single layer of nanoparticles ('単粒子層') and a layer of microbeads ('マイクロビーズ'). Further right is a woven mesh labeled 'メンブレン' (Membrane) and a circular orange disc. Below the leaf are four small images showing different nanoparticle colors (gold, silver, red, grey) and a larger image of two golf balls labeled 'ゴルフボール'. In the center, there are images of flexible materials ('フレキシブル材料') and a 96-well microplate ('96 穴マイクロプレート') containing a grid of gold nanoparticles. To the left of the microplate are images of printed wiring ('プリント配線') and multi-filaments ('マルチフィラメント'). At the bottom right is a 3D printed model of the Taj Mahal, labeled '3D プリント造形'.

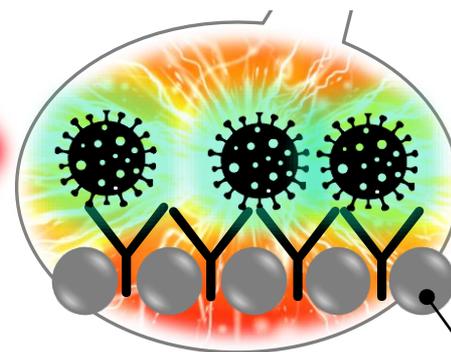
金属ナノ粒子固定化マイクロプレートウェル



局在表面プラズモン共鳴

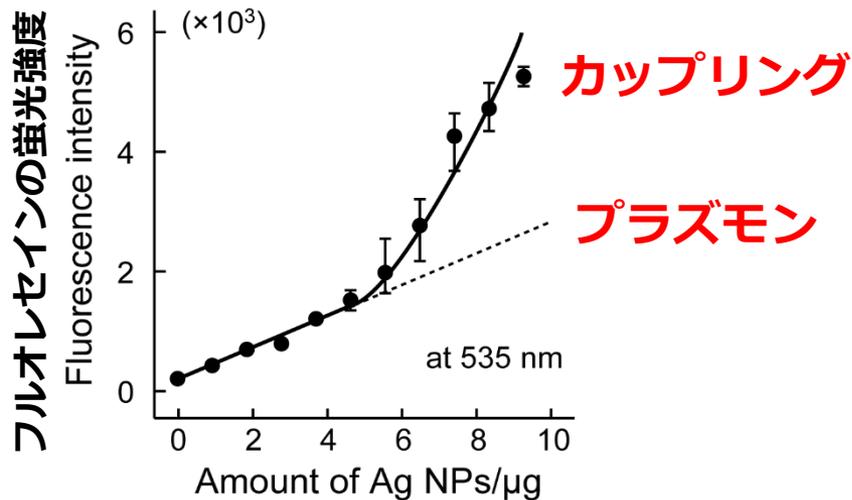
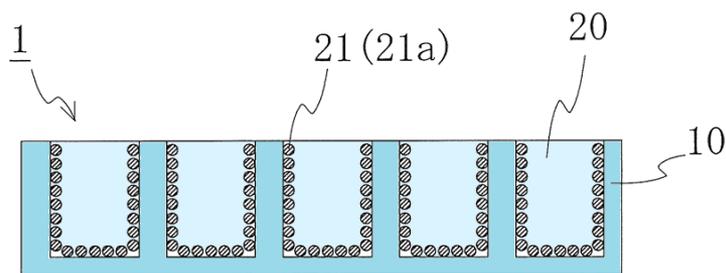


信号感度
100倍以上

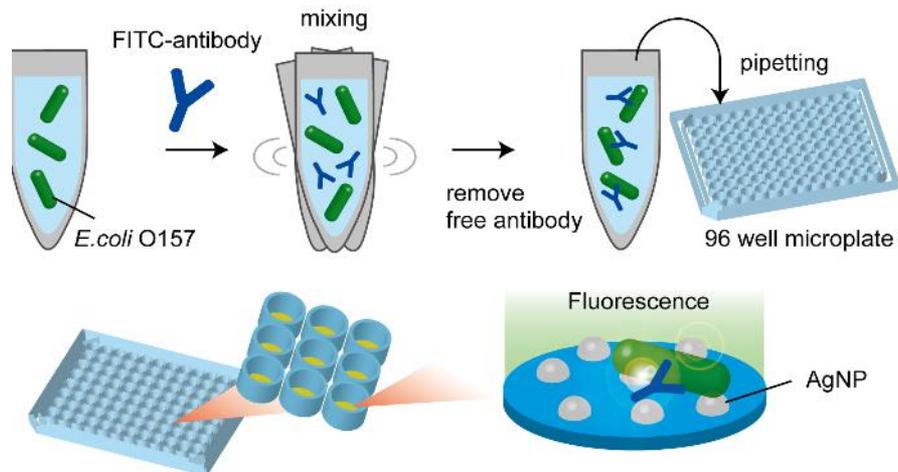


金属ナノ粒子

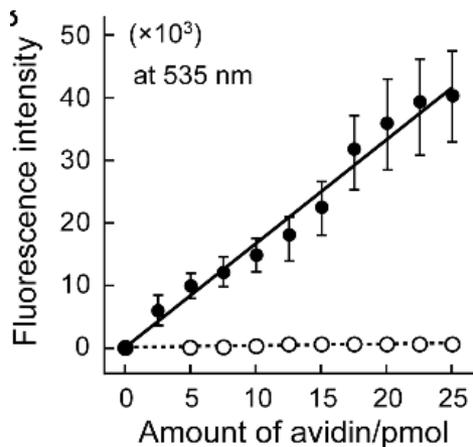
蛍光増強機構



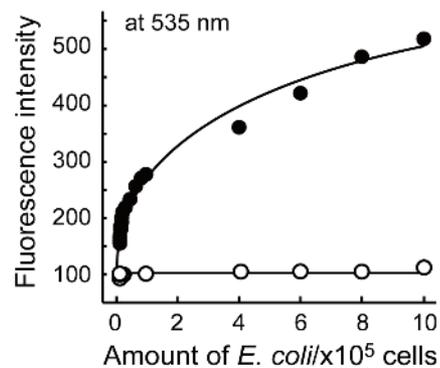
検出例



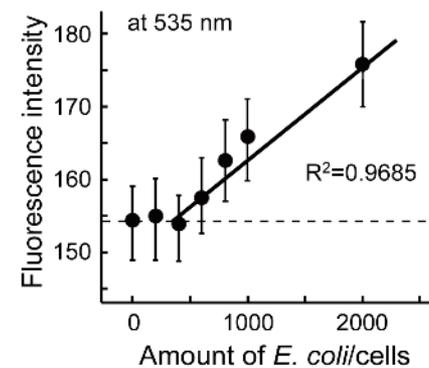
FITC標識ストレプトアビジン/ビオチン



2.5~25pmol



大腸菌O157 10^3 cells/mL

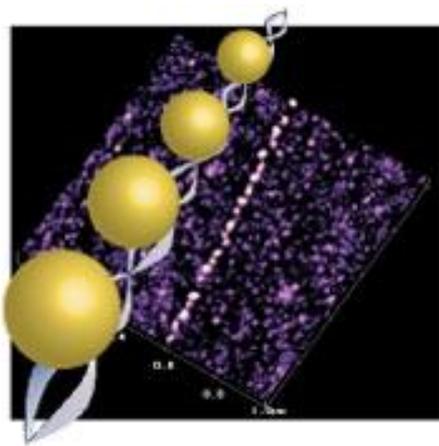
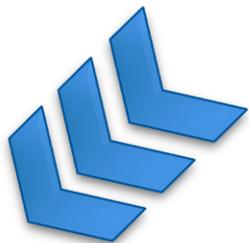


金ナノ粒子の配列

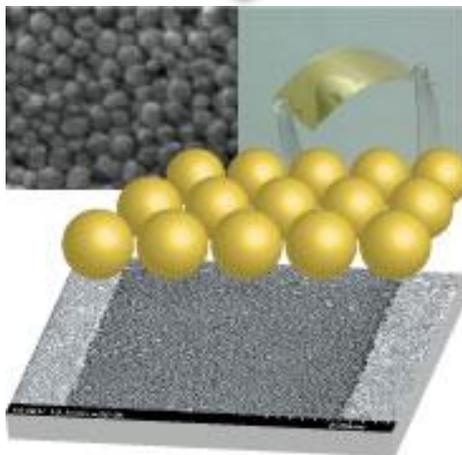
分散



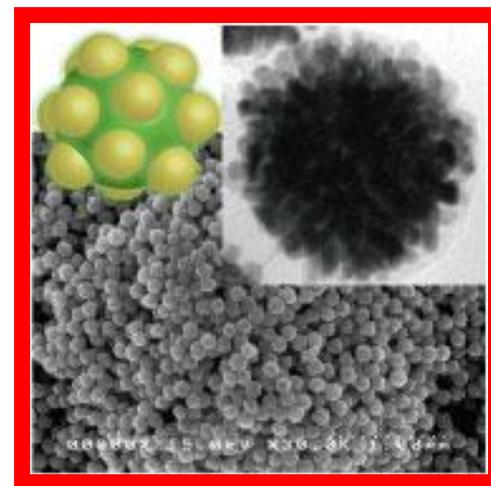
凝集



1D



2D



3D

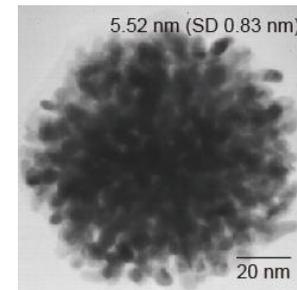
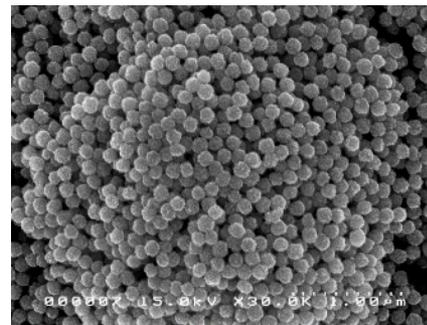
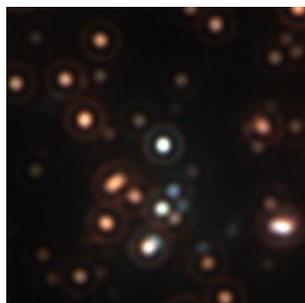
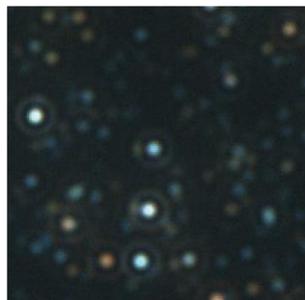
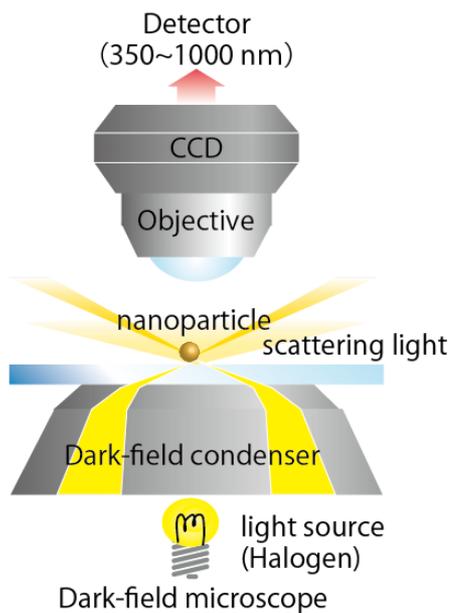
検出例

Gold nanoparticle

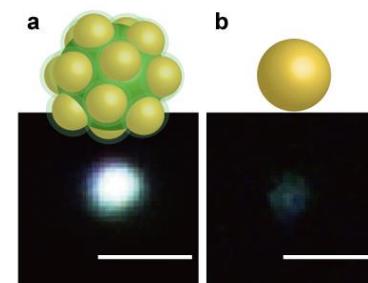
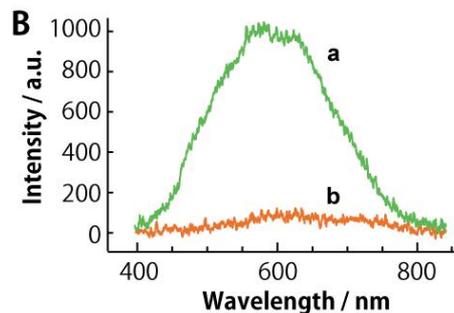
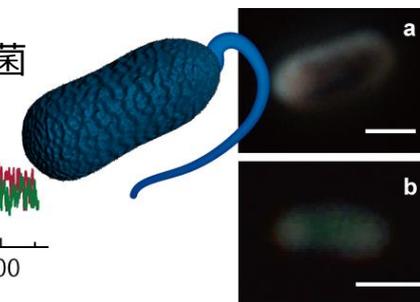
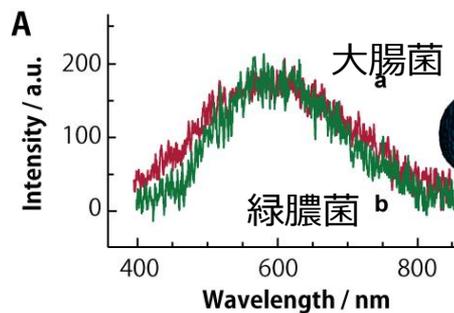


1 nm 2 nm 30 nm 60 nm 100 nm

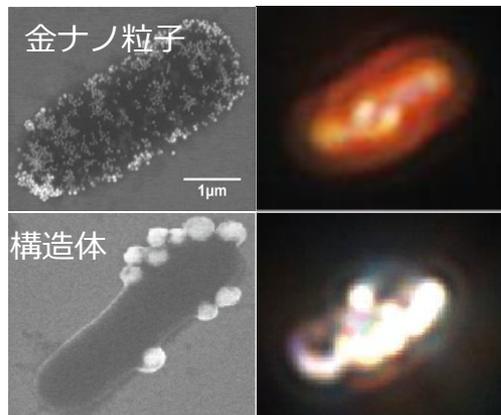
Light scattering



Chem. Commun. **2006**, 4288
Chem. Commun. **2009**, 3615



検出例

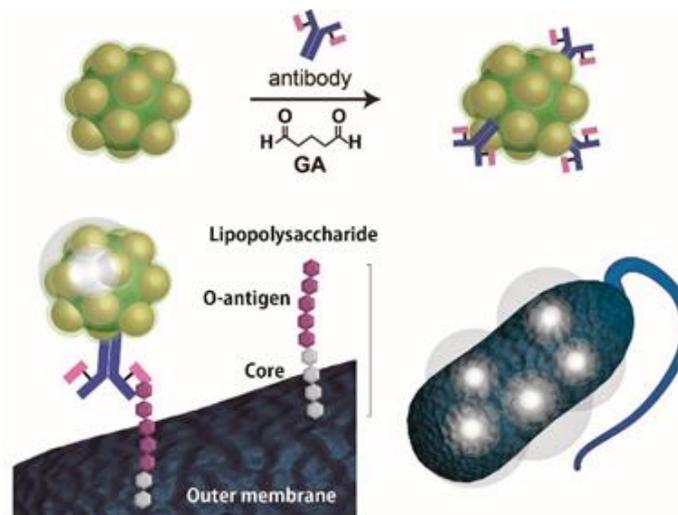


腐敗牛肉汁中*のO157検出
* *Aeromonas salmonicida*,
*Serratia liquefaciens*など

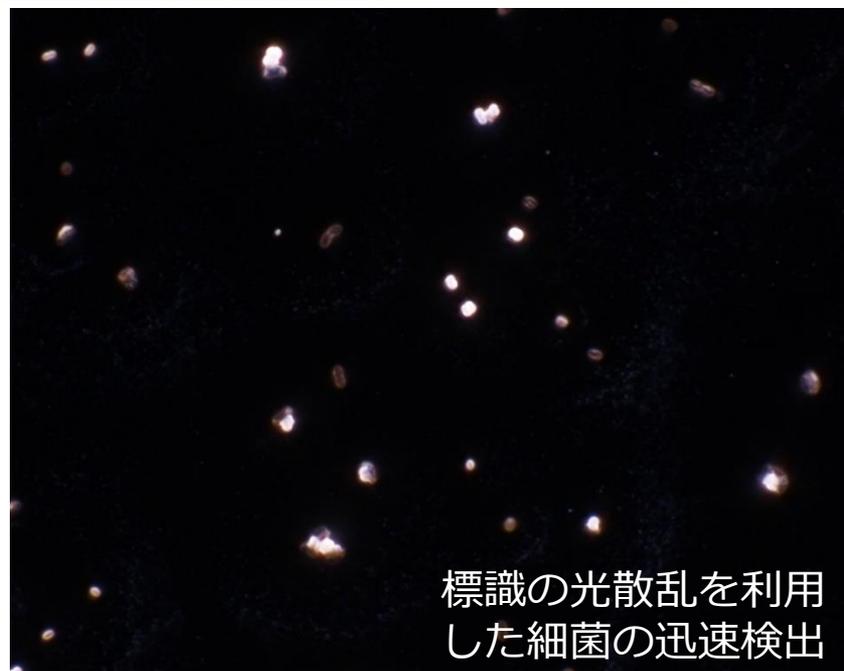
試料中のO157を50%に調整
(全細菌濃度: 7.4×10^8 cells/mL)
O157 添加率 0.50
暗視野中の全細菌数 42 cells
散乱光の強いもの 22 cells
散乱光の弱いもの 20 cells

$$22/42 = 0.523... = \underline{0.52}$$

標識された細菌は52%

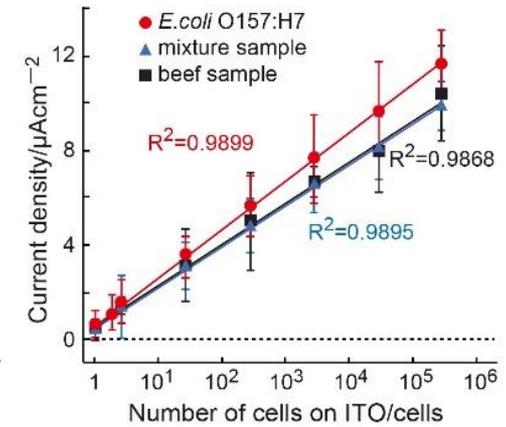
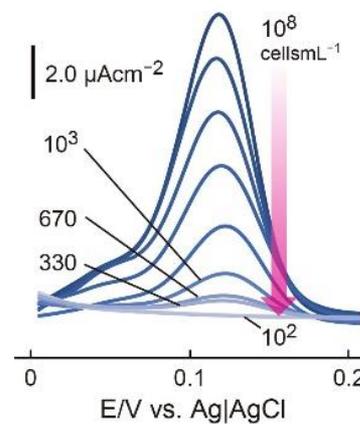
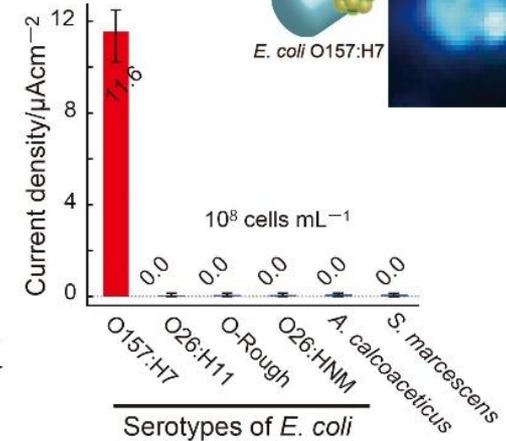
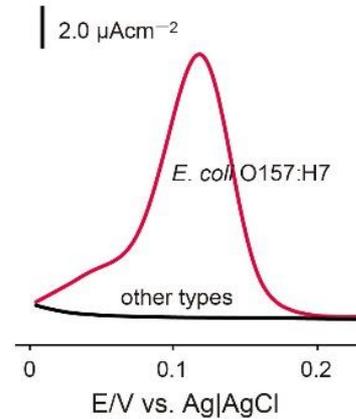
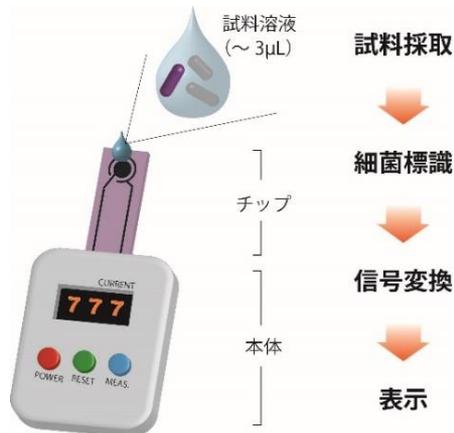
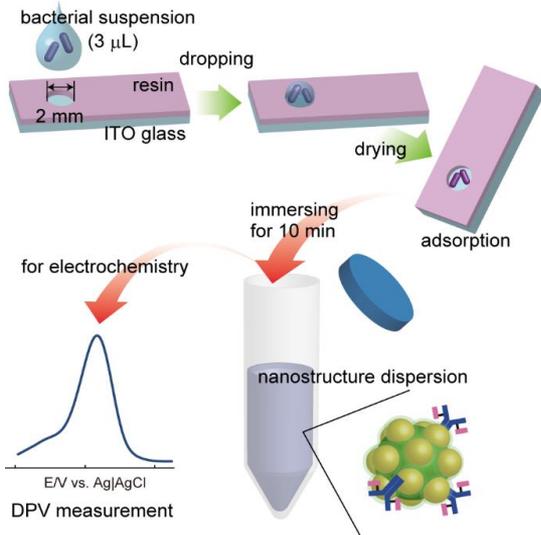


標識の
光信号や
電気信号
に着目



標識の光散乱を利用
した細菌の迅速検出

検出例



DPV of the different cell types on the electrode after immersion in the nanostructure dispersion and current density at 0.12 V (n = 4).

実用化に向けた課題

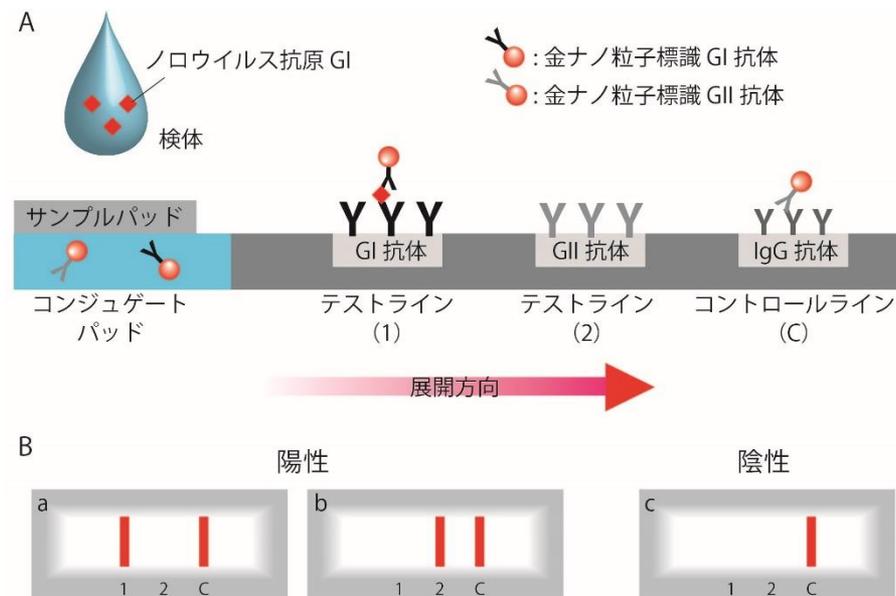
万能な検査法の開発は無理!!

- ・ 操作が簡単
 - ・ 特殊装置が不要
 - ・ 低コスト
 - ・ ある程度の感度や選択性
- など、どの現場でも望まれている。

新たな検出技術の開発

- ・ 検出法の選択肢を増やす
- ・ 共同研究によって現場に合った検査を実現

イムノクロマト (IC) 法



本技術に関する知的財産権

- ・特願2021-032552

「細菌および／またはウイルスを検出する検出装置、検出方法および標識キット」

発明人：椎木 弘，出願人：公立大学法人大阪

- ・特願2020-75852「センサー」

発明人：椎木 弘，出願人：公立大学法人大阪

- ・特願2020-74794「センサー」

発明人：椎木 弘，出願人：公立大学法人大阪

- ・第6358610号（特願2013-174694）「被検出微生物を検出する検出方法」，

発明人：椎木 弘，長岡 勉，出願人：公立大学法人大阪

産学連携の経歴

- 2005年～現在 ポリマー素材，家電，めっき，電気，繊維，半導体，センサ，化粧品など
21社（現在4社）の各種メーカーと共同研究実施
- 2005～2008年 NEDO産業技術研究助成事業助成（代表）
「ワンステップナノめっき法によるプラスチックビーズの導電化技術の開発」
- 2008～2009年 JST大学発ベンチャー創出推進事業（分担）
「低環境負荷ナノめっき法を用いた高密度実装材料の開発」 **GreenChem株式会社**
- 2009年 JST シーズ発掘試験A（発掘型）（代表）
「金属ナノ粒子を用いたフレキシブル導電性パターンのワンステップ作製技術の開発」
- 2011～2012年 JST A-STEP FS シーズ顕在化タイプ（分担）
「バイオフィリー技術により作製するコレステロールセンサとその実用化の研究」
- 2012～2013年 JST A-STEP FS シーズ顕在化タイプ（分担）
「金属ナノ粒子を用いる新規電子回路形成法の開発」
- 2012～2013年 JST A-STEP FS 探索タイプ（代表）
「導電性磁性マイクロビーズを用いたワンステップ免疫検査法の開発」
- 2015～2016年 JSTマッチングプランナープログラム・探索試験**
「微量細菌のワンステップ検査を実現する超高感度マイクロプレートの開発」
- 2015～2019年 農水省農食事業（分担），近畿経産局サポイン事業（分担） 2件
- 2019年～ JST START・プロジェクト支援型（代表）**
「高感度標識による細菌及びウイルスの迅速検出」
- 2021年～ NEDO先導プロ・エネ環（分担）
「バイオフィリー・還元ナノ粒子化技術による貴金属回収・高付加価値化の研究開発」



お問い合わせ先

公立大学法人大阪 大阪府立大学
学術研究支援部 URAセンター

TEL : 072-254-9128

FAX : 072-254-7475

e-mail : URA-center@ao.osakafu-u.ac.jp