

【公開版】

平成30年度
戦略的基盤技術高度化・連携支援事業
戦略的基盤技術高度化支援事業

「高発現表層タンパク質を標的とした低コスト迅速分析を可能とする
微生物検査の革新」

研究開発成果等報告書

平成31年3月

担当局 近畿経済産業局
補助事業者 公益財団法人京都高度技術研究所

【公開版】

目 次

第1章 研究開発の概要.....	1
1－1 研究開発の背景・研究目的及び目標.....	1
1－2 研究体制.....	7
1－3 成果概要.....	10
1－4 当該研究開発の連絡窓口.....	11
第2章 本論.....	12
2－1 実施内容① 高感度で迅速な微生物分析を実現可能にする試薬開発.....	12
2－2 実施内容② 簡便かつ低コストな分析を実現可能にする装置開発.....	20
2－3 実施内容③ 分析システムの開発.....	22
最終章 全体総括.....	24
3－1 研究開発成果.....	24
3－2 研究開発後の課題.....	25
3－3 事業化展開.....	25
3－4 その他波及効果.....	27
3－5 事業化スケジュール.....	27

【公開版】

第 1 章 研究開発の概要

1－1 研究開発の背景・研究目的及び目標

○背景（社会的意義）

食の安全に関しては世界的に関心が高まってきており、特に日本ではその安全性の基準値は世界の中でも非常に厳しく、食品衛生法違反・食品表示法違反又はその疑いがある製品を自主回収し報告する制度を設けている行政機関も多い。一方で違反に気づきつつも出荷を続け発覚した場合、違反を行った企業のみが社会的制裁を受けるだけではなく、関連分野を扱う企業にも風評被害が及ぶ場合もある。それだけ食の安全・安心に関する意識は企業・国民ともに高い。

また京都市は現在、世界トップクラスの観光都市であり、海外からの観光客への和食文化の普及に力を入れており、食品検査の強化は急務である。その中で京都市の取組としては、食の安全安心推進計画（平成 28 年度～平成 32 年度）があり、その施策のなかで行政による効率的・効果的な監視や検査の実施、食品等事業者による自主衛生管理の推進を掲げている。さらに京都市が管理する中央卸売市場第一市場では、京都市中央卸売市場第一市場マスタープラン（平成 28 年度～平成 37 年度）を策定しており、その基本戦略のひとつとして安全・安心な生鮮食料品等の安全供給に向けた取組の推進を掲げられている。施設設備に伴うハード面の整備に加え、衛生・品質管理体制を確立するなどのソフト面からの取組も進めていくものである。

一方世界に目を向けると、例えば中国における食中毒事件ではその原因が残留農薬、汚染微生物、違法添加物、重金属汚染等さまざまであるが、その中でも汚染微生物による食中毒者数が最も多く、衛生管理の悪さによる食品の腐敗等が直接の原因となることが多い。しかし、その検査・報告システムは十分ではなく企業活動が優先される結果、基準値を超えた食品が市場に流通し健康被害があとを絶たない。そのため、中国の富裕層は中国産の 10 倍近く価格が高くても日本産のお米を買うこともある。一方で中国の食品の最大の輸出先が日本であることを考えると、中国における食品安全問題は日本にとっても重大な懸念事項である。世界的な視点で食品の安全性に関する現状を考慮してもこれらの課題である汚染微生物の迅速検出を行うことで、食品流通の安全性を担保することの社会的意義は大きいものと考えられる。

○社会的ニーズ：新技術を実現するために解決すべき研究開発課題

食品の微生物検査は、現時点においても選択培地を用いて微生物培養試験（寒天平板表面塗抹法）を行い、衛生試験法に準拠し、その生物学的な増殖を確認する方法が一般的である。しかしながら、最低でも 24 時間以上の試験時間、専用の検査空間、無菌設備、専門技術を持った分析スタッフが必要となっている。このような設備及び人的投資を行えない多くの中小企業では専門検査機関に依頼することで対応するも、試料の輸送に係るタイムラグの上積みでさらに長い検査日数を要している。この間に微生物汚染は進行し、致命的なタイムラグの発生も否定できない。

一方、現在の流通システムでは、販売サイドから消費期限の短い食品を迅速にかつロスなく消費者に提供することが要求され、現行法では出荷時点で結果を確認し出荷するという行為そのものが対応困難になっている。その為、現場で安価に、迅速に微生物検査ができるシステムが求められている。

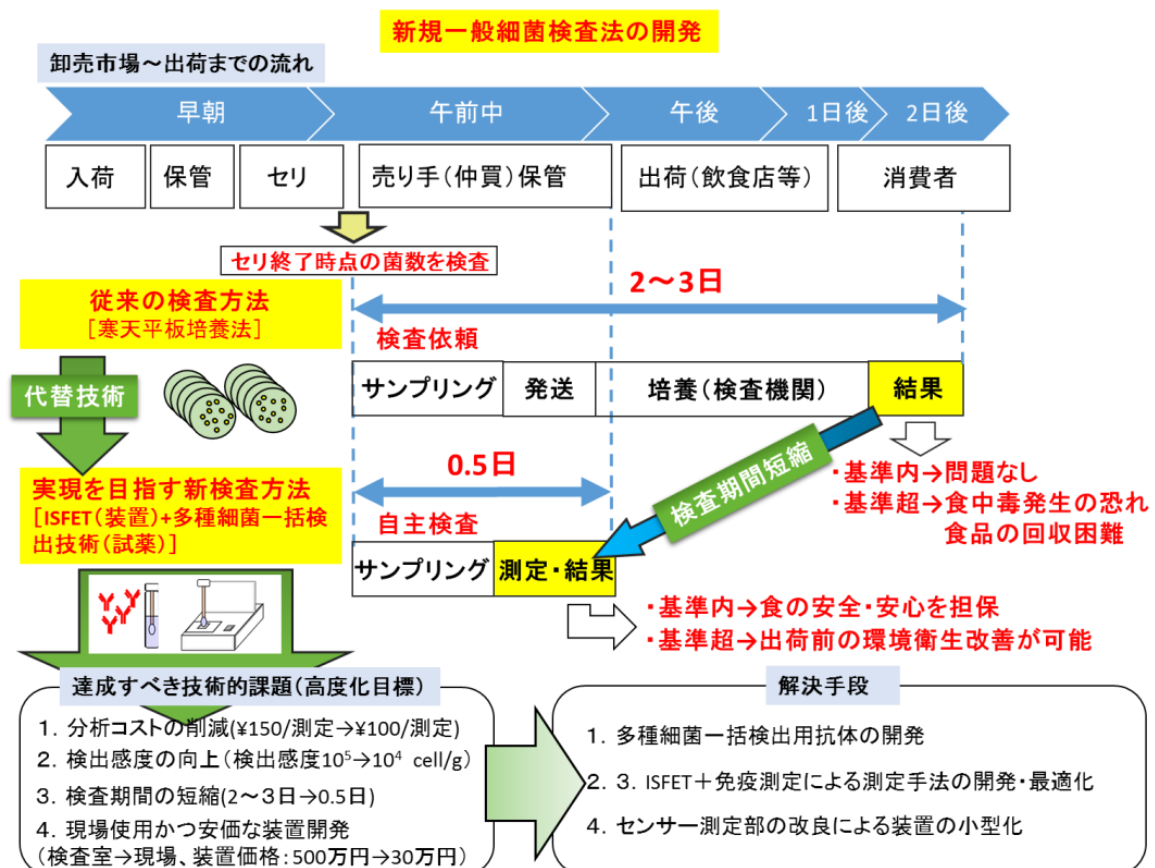


図1. 現状の食品検査と社会的ニーズ

○具体的な市場ニーズの把握

具体的な市場ニーズの把握のために、京都市中央卸売市場へのヒアリング調査を行い、食品検査に関する現状と要望をまとめた。

京都市中央卸売市場では、2017 年に開設 100 年を迎えるため、衛生管理・温度管理の徹底追及などの品質管理の見直しをせまられている。一般細菌は、魚、肉、野菜などの生鮮食品に付着していると、その鮮度を劣化させていく。京都市中央卸売市場では衛生管理の指標として、一般細菌の菌数を適用している。現状、エフコープ生活協同組合の微生物基準によると水産一次加工品では 10^5 cell/g が注意喚起の基準数値となっているが、より出荷元に近い現場のニーズとして、それ以下で検出したいとの要望がある。この一般細菌の検出は、現在は培地法などで実施されているが、結果が明らかになるまで平均 2 日程度であり、時間の短縮は食品検査の切実な課題である。

現状の検査費用は、150 円/回であり、繰り返し測定に耐えるセンサーに改良し採用することで、この費用を下回る検査キットが開発できれば、京都市中央卸売市場も導入の意欲がある。さらに全国の仲卸業者やスーパーも同様のニーズをもっている。

現場では、“設備と手間”が一番問題視されており、食品の検査機関にある先端計測装置では現場のニーズを満たすことはできない。ニーズ調査の結果から、試験室にある設備や器具を使わなくても食品検査ができること、また、そのような簡易検査でも一定の検出感度を確保することが重要であると示唆された。日本国内でも食品の検査指針として HACCP を参考にして進めている機関も多くなってきており、これまでは一般細菌検査の結果、検出基準菌数を上回ったとしても既に市場に流通した商品については同一ロットという概念がないために回収などの対応策もなく、取り扱った店舗・作業員に対する衛生管理徹底のみに焦点が当てられてきた。しかし、今回実現を目指す新たな検査方法を採用し出荷前にチェック可能な体制を構築することで、即時に衛生管理の改善に対応でき、食の安全・安心を担保することが可能となる。対応でき、食の安全・安心を担保することが可能となる。

○研究開発概要

食品流通現場での食品の安全性の検査については現状では検査結果が出るまでに 2～3 日を要する。しかし現場では、食品が市場に流通するまでにその安全性を迅速・簡便に確認できる手法が要求されている。そのため本計画では、多種微生物を一括に検出できる高性能抗体を利用した微生物検出と、ISFET 半導体技術を掛け合わせることで、食品中の汚染微生物の有無を 0.5 日以内に迅速・低コストで測定する技術を開発し、食品流通の安全性を担保することを目的とする。

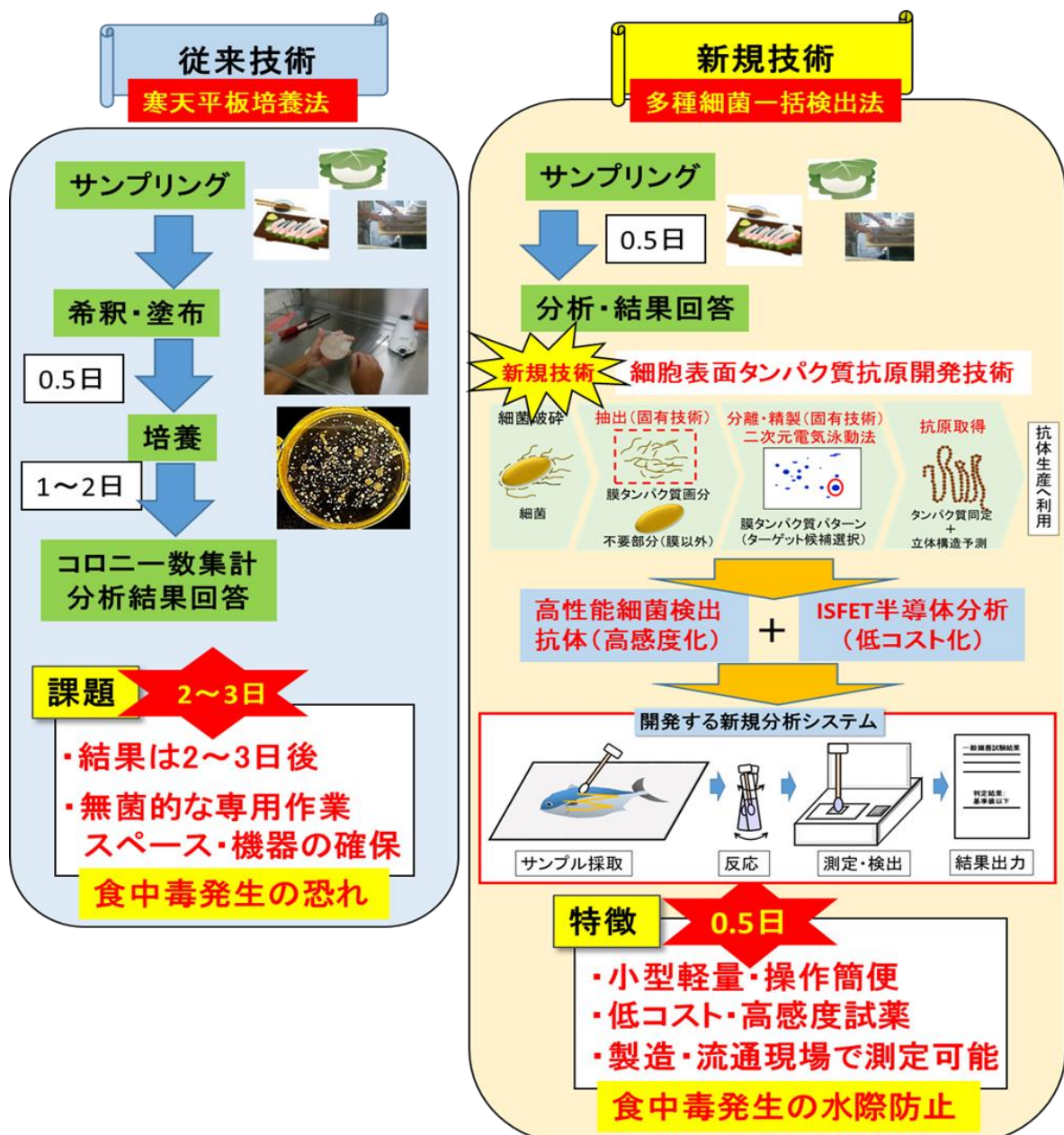


図2.新規技術における従来技術との比較と特徴

○研究開発の課題と高度化目標

本事業において、新技術を実現するための課題は「(十二) 測定計測に係る技術に関する事項・測定計測に係る技術において達成すべき高度化目標」の(3)川下分野横断的な共通の事項・①川下製造業者等の共通の課題及びニーズについて、図3に示す。

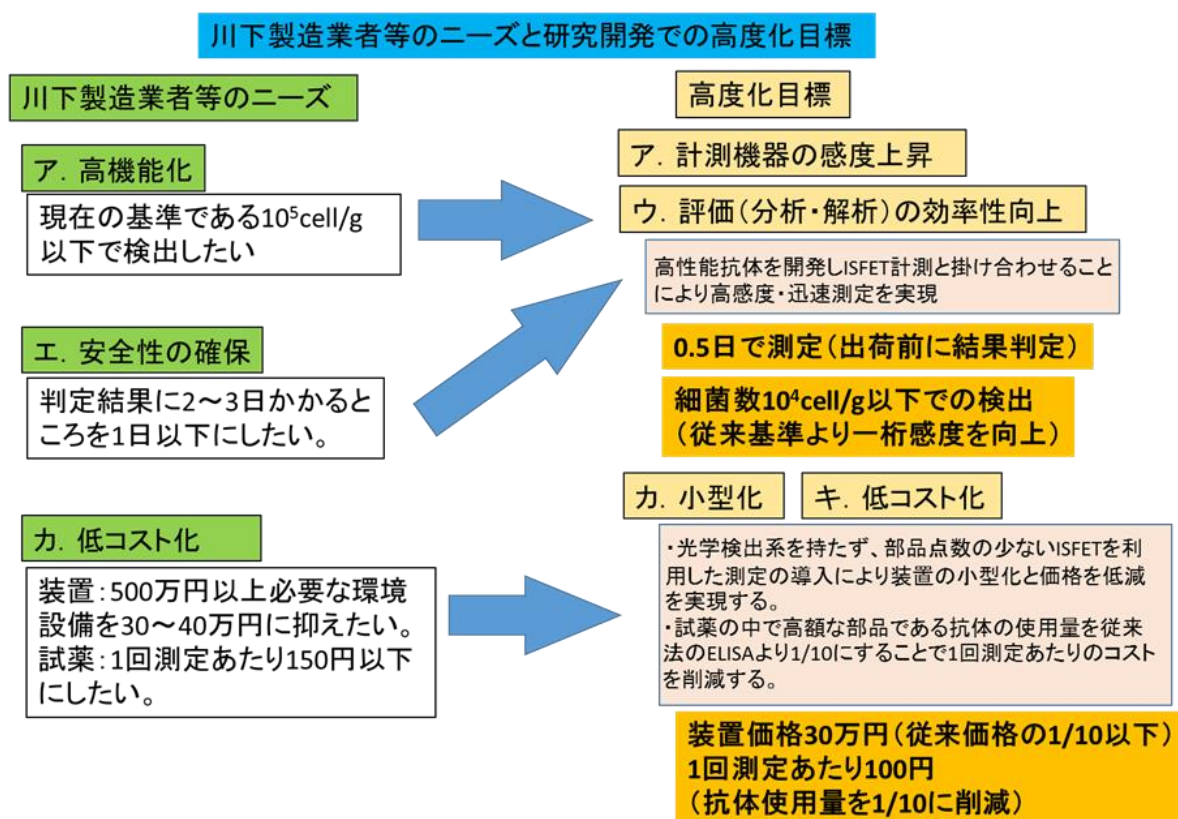


図3. 川下製造業者等のニーズと研究開発での高度化目標

これら新技術を実現するために解決すべき研究課題として、ひとつは高感度で迅速な微生物分析を実現するために微生物表層タンパク質を抗原とする高性能抗体および、ISFET 分析に適した測定法の開発が必要である。また、1 分析あたりのコストを下げるため、既存のISFET 装置本体およびセンサー部の小型化による試薬量の削減を目指した。ISFET 分析ではセンサーの繰り返し使用が可能であり、生体反応を、光を介さずに直接センサーで電気信号に変換することで定量分析に必要な部品点数を圧倒的に縮減できることから、量産に移ればカスタムチップ化などで装置製造コストを大幅に引き下げることができる。

○高度化目標実現に向けた新技術の課題

・低コストに関する技術的課題

低コスト化を達成するためには高性能な抗体を取得する必要があるがそのターゲットとなる抗原（表層タンパク質）を簡易に効率良く抽出・分離回収する技術が確立されていない。また、従来の ISFET を用いた分析法では、専門的なスタッフが実験専用器具等を用い実施している。そのため、現場での使用が困難である。これらの課題を解決すべく以下の開発を行った。

研究項目：【①高感度で迅速な微生物分析を実現可能にする試薬開発】

研究目標①－１：大腸菌群、一般細菌、腸管出血性大腸菌 O157 などの抗原取得

（高度化目標：アに対応）

研究目標①－２：大腸菌群、一般細菌、腸管出血性大腸菌 O157 などの抗体開発

（高度化目標：アに対応）

研究目標①－３：ISFET 計測用の抗体標識用酵素の開発

（高度化目標：アに対応）

研究目標①－４：ISFET 及び高感度免疫反応一体型測定法の開発

（高度化目標：ウに対応）

・簡便に関する技術的課題

現状の ISFET 分析は専用器具・装置・スペースがなければ計測できない装置・分析専用のソフトウェアであるため誰もが簡便に操作できる仕様になっていない。これらの課題を解決すべく以下の開発を行った。

研究項目：【②簡便かつ低コストな分析を実現可能にする装置開発】

研究目標②－１：ISFET を用いた試作装置開発

（高度化目標：ウに対応）

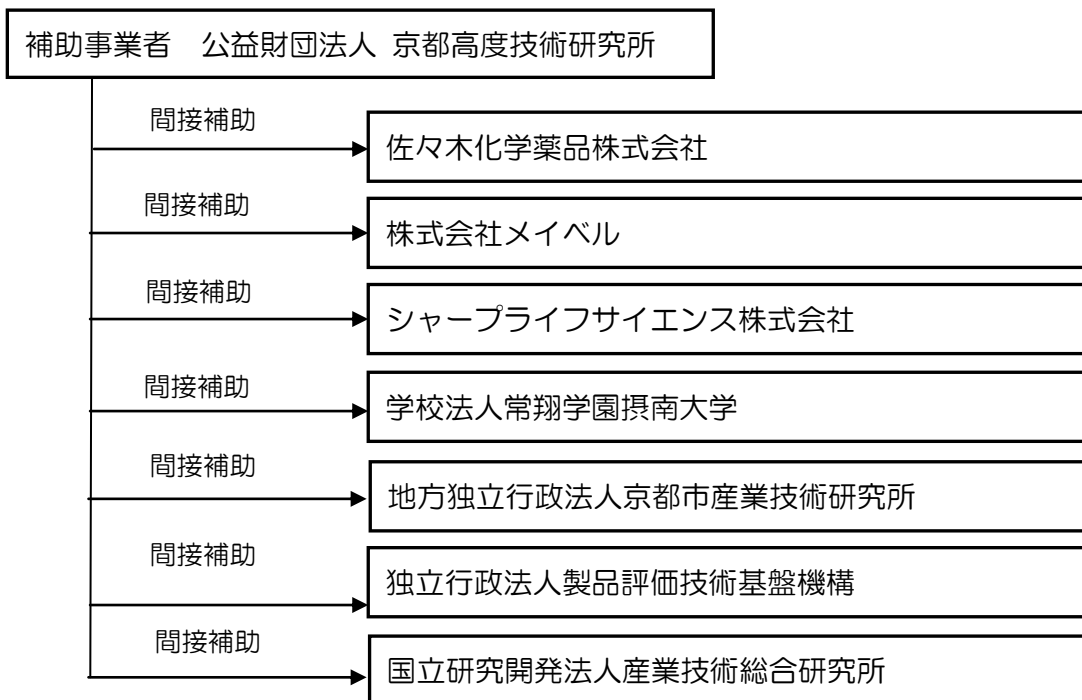
研究項目：【③分析システムの開発】

研究目標③－１：0.5 日測定結果完了

（高度化目標：ウに対応）

1-2 研究体制

(1) 履行体制図



(2) 管理員、研究員及び補助員

【補助事業者】 公益財団法人 京都高度技術研究所

管理員

氏 名	所 属 ・ 役 職
孝本 浩基	地域産業活性化本部 本部長
蒲田 知明	地域産業活性化本部 企業特化型支援部 部長
湯浅 直子	地域産業活性化本部 企業特化型支援部 次長
堀本 妙子	地域産業活性化本部 企業特化型支援部

【間接補助事業者】

研究員

佐々木化学薬品株式会社

氏 名	所 属 ・ 役 職
止原 正博	研究開発部 副責任者
高田 慎一	研究開発部 機能性化学品事業課 副責任者
西村 恒佑	研究開発部 機能性化学品事業課
藤浪 優香	研究開発部 機能性化学品事業課

株式会社メイベル

氏 名	所属・役職
高木 由美	代表取締役
中谷 ひとみ	研究員
進藤 文子	研究員

シャープライフサイエンス株式会社

氏 名	所属・役職
瀬川 裕明	バイオ事業開発部 部長

学校法人常翔学園 摂南大学

氏 名	所属・役職
西矢 芳昭	摂南大学理工学部生命科学科・教授

地方独立行政法人京都市産業技術研究所

氏 名	所属・役職
山本 佳宏	地方独立行政法人京都市産業技術研究所 経営企画室研究戦略リーダー
廣岡 青央	地方独立行政法人京都市産業技術研究所 研究室研究部長
和田 潤	地方独立行政法人京都市産業技術研究所 研究室バイオ系チーム 主席研究員
竹浪 祐介	地方独立行政法人京都市産業技術研究所 研究室デザインチーム 主席研究員
泊 直宏	地方独立行政法人京都市産業技術研究所 研究室バイオ系チーム 主席研究員

独立行政法人 製品評価技術基盤機構

氏 名	所属・役職
照井 保幸	独立行政法人製品評価技術基盤機構 バイオテクノロジーセンター産業連携推進課 地域連携室室長
山口 薫	独立行政法人製品評価技術基盤機構 バイオテクノロジーセンター産業連携推進課 地域連携室主査
竹内 史子	独立行政法人製品評価技術基盤機構 バイオテクノロジーセンター産業連携推進課 地域連携室主任

宮下 美香	独立行政法人製品評価技術基盤機構 バイオテクノロジーセンター産業連携推進課 地域連携室主任
高橋 幹男	独立行政法人製品評価技術基盤機構 東北支所バイオ技術課課長
安海 明百	独立行政法人製品評価技術基盤機構 東北支所バイオ技術課主査

国立研究開発法人産業技術総合研究所

氏 名	所属・役職
中村 努	国立研究開発法人産業技術総合研究所 生命工学領域 バイオメディカル研究部門 生体分子創製研究グループ・主任研究員
星野 英人	国立研究開発法人産業技術総合研究所 生命工学領域 バイオメディカル研究部門 生体分子創製研究グループ・主任研究員

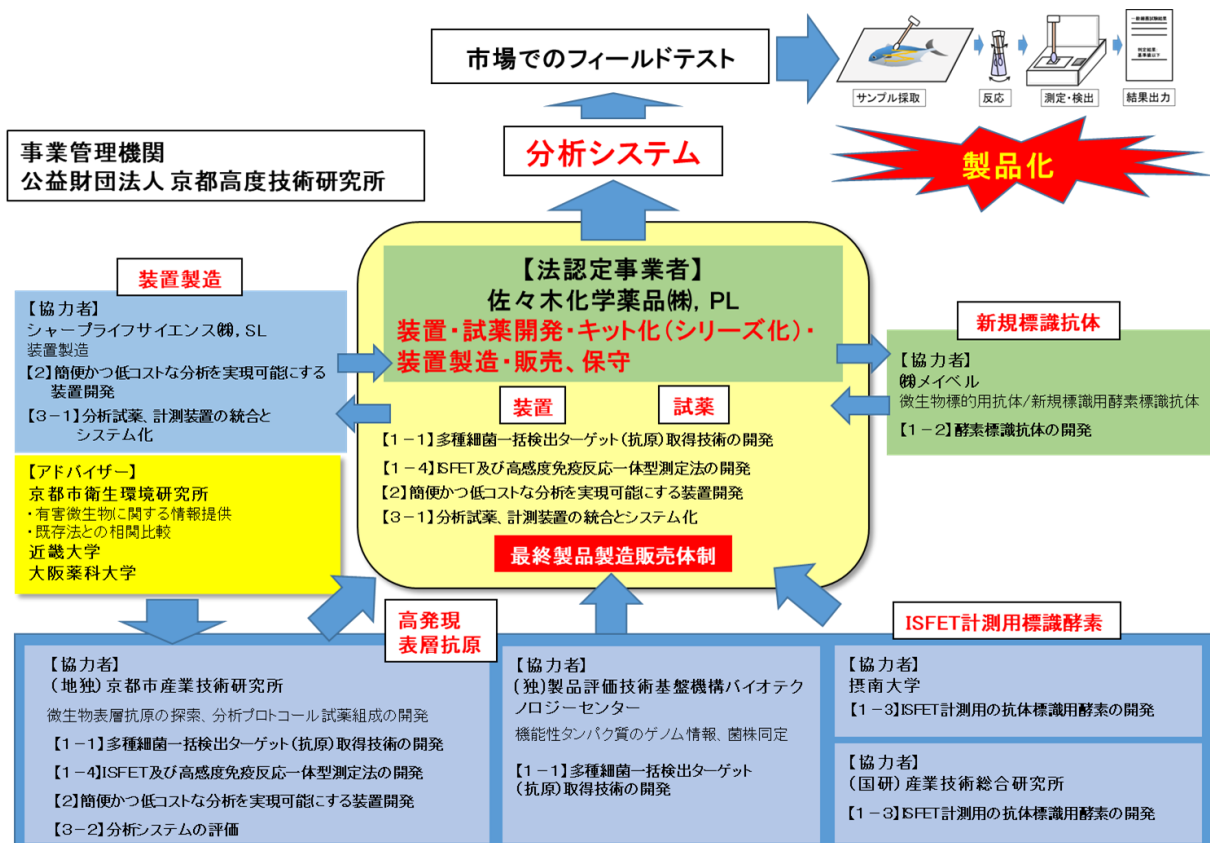


図4. 本事業実施体制

1-3 成果概要

a) 研究開発課題に対する成果概要

【①高感度で迅速な微生物分析を実現可能にする試薬開発】

【①-1】大腸菌群、一般細菌、腸管出血性大腸菌 O157 などの抗原取得

- ・大腸菌表層タンパク質のうち多量に発現しているタンパク質を同定。それらを抗原として取得した。
- ・食品現場よりサンプリングした一般細菌から選抜。それぞれ細菌の共通部位を同定。それらを抗原として取得した。
- ・腸管出血性大腸菌 O157 表層タンパク質のうち多量に発現しているタンパク質を同定。それらを抗原として取得した。

【①-2】大腸菌群、一般細菌、腸管出血性大腸菌 O157 の抗体開発

- ・①-1 で取得した大腸菌群抗原を用い免疫を行い、大腸菌群用抗体を開発した
- ・①-1 で所得した一般細菌用抗原を用い免疫を行い、一般細菌用抗体を開発した。
- ・①-1 で取得した腸管出血性大腸菌 O157 抗原を用い免疫を行い、腸管出血性大腸菌 O157 用抗体の開発を行った。

【①-3】ISFET 計測用の抗体標識用酵素の開発

酵素の候補として、数値（ターンオーバー数）や基質と生成物の pH 変化の値（pKa 値）を指標として候補となる酵素を探索。そこから酸化還元酵素、加水分解酵素、脱水素酵素、二糖脱アセチル化酵素などを選抜。ISFET 計測用として各種測定条件など確立。

【①-4】：ISFET 及び高感度免疫反応一体型測定法の開発

現場での分析を想定し、実験専用器具を排除し煩雑なステップを簡略化した測定法を開発を実施し、平成 29 年度に開発したアタッチメント機構の問題点を抽出し、センシング部への気泡の混入防止やサンプルの定量性を確保する点眼タイプアタッチメントを開発した。

【②簡便かつ低コストな分析を実現可能にする装置開発】

ISFET を用いた試作装置開発

試作機研究用途に開発された機器を製造現場やスーパーの従業員等誰でも手軽に測定できるユーザーフレンドリーな機器とすべく、タッチパネル操作時にストレスとなるキーボード入力操作を極力減らすため、ブルダウン方式のタッチにより測定開始までたどり着けるアプリ

【公開版】

ケーションを開発するとともに、装置と操作端末を一体型とした試作機 AMIS-6G を開発した。

【③分析システムの開発】

【③－１】：0.5 日測定結果完了

上記【①高感度で迅速な微生物分析を実現可能にする試薬開発】及び、【②簡便かつ低コストな分析を実現可能にする装置開発】で構築した測定方法、測定条件をブラッシュアップし、試作装置を用いての生サンプルによるブラインドテストなど本分析システムの評価を実施した。サンプル採取から、抗体反応、計測までを実施し、0.5 日以内での計測が可能となった。

1－4 当該研究開発の連絡窓口

（事業管理機関）

公益財団法人 京都高度技術研究所

業務管理者：地域産業活性化本部長 孝本 浩基

経理担当者：企業特化型支援部 堀本 妙子

（研究等実施機関）

佐々木化学薬品株式会社

研究開発部 副責任者 止原 正博

TEL：075-581-9141

FAX：075-593-9784

E-mail：m.tomehara@sasaki-c.co.jp

第2章 本論

2-1 実施内容① 高感度で迅速な微生物分析を実現可能にする試薬開発

【①-1】：大腸菌群、一般細菌、腸管出血性大腸菌 O157 の抗原取得

一般細菌用抗体の作成を行うため、まず菌種解析を行った。京都府内の食品加工現場にてサンプリングし、1,206 の分離株を取得。MALDI による簡易同定結果と、16S rRNA 塩基配列の取得及び BLAST 検索により近縁種を調べ、その結果をもとに全サンプル数の中で分離頻度が高い菌種を把握した。

その結果、生鮮食品の腐敗の原因となる菌種、動物や土壌に常在する菌種が存在していたこと、及び採取箇所によらず遍在している菌種として特にグラム陽性菌が多いことなどの遍在傾向を把握した。(図5～6、表1)

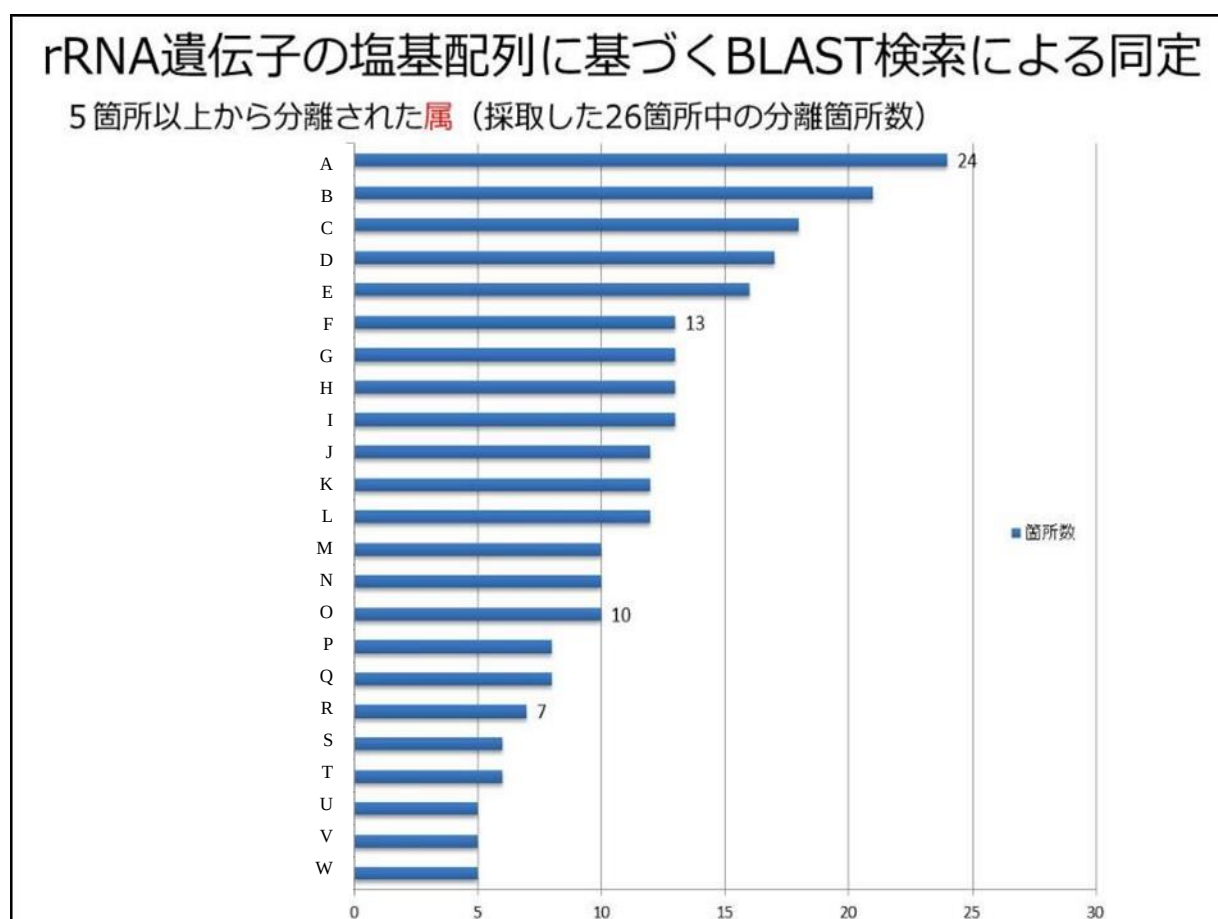


図5 遍在する菌種

No.	属名	種名	26サンプル中の分離頻度	BSL	グラム染色	備考
1			23/26	1	+	放線菌の一種、多様な分離源に存在
2			19/26	1 or 2	-	好冷菌を含む属、環境及び人から分離され、腹膜炎等の病気を引き起こす日和見菌も存在
3			13/26	1 or 2	-	多様な分離源に存在、植物病原菌から日和見菌、冷凍保存中の食品の食中毒原因菌も含む
4			13/26	1	+	放線菌の一種、臨床分離株が多い
5			11/26	1	+	土壌や海水など多様な分離源に存在
6			11/26	1 or 2	+	放線菌、好冷菌を含む属、主に土壌から分離
7			11/26	2※	-	臨床分離株が多い
8			10/26	2	-	大腸菌
9			10/26	1	+	放線菌の一種、好冷菌
10			9/26	1	-	土壌、淡水など多様な分離源に存在、淡水魚の病原菌も含む
11			9/26	1	+	放線菌の一種、深海の堆積物、土壌、人の皮膚、塩漬け肉など多様な分離源に存在
12			8/26	1※	-	海洋性、好冷菌を含む属
13			8/26	1 or 2	-	土壌、水、植物、人の皮膚など多様な分離源に存在、日和見菌も含む
14			7/26	1	-	好冷菌、食品腐敗の原因菌、冷凍保存中の食品の食中毒原因菌の一種
15			7/26	1	-	蛍光菌、多様な分離源に存在、冷凍保存中の食品の食中毒原因菌の一種

表 1 遍在箇所の多い微生物（属種別）

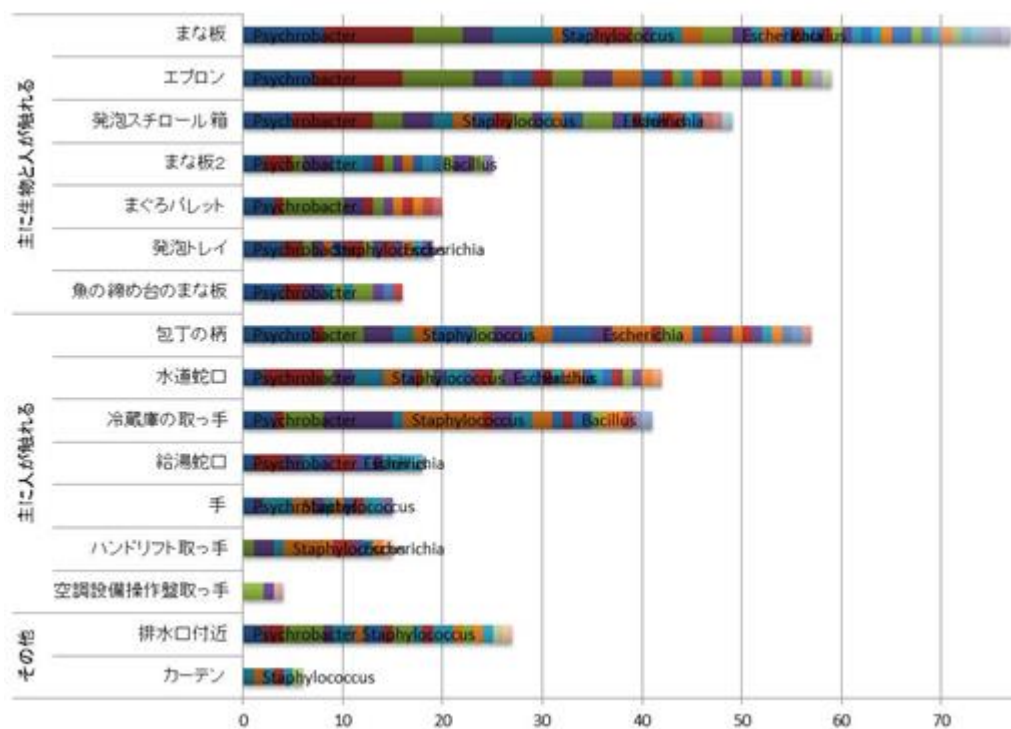


図6 採取箇所、環境毎の菌相

【公開版】

初年度については大腸菌の膜タンパク質をターゲットとして、膜抽出操作からタンパク質同定操作までを行い、二次元電気泳動の結果とこれまでの文献から得られた知見を組み合わせ、候補となるタンパク質を選抜し、抗原とすることで大腸菌検出に用いる抗体を作製した。2年目については、サンプリングにより培養された細菌について 16S rRNA 遺伝子の配列に基づく系統解析、及び MALDI-TOF/MS（マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計）による含有量の多いタンパク質の固有のパターン比較により菌種同定を実施した。その結果、簡易同定（67 属 166 種/1206 株）された中から、遍在箇所の多い標的微生物を表層タンパク質の抗原取得の候補として選抜した。これら選抜した細菌について表層タンパク質の抽出条件を検討し、二次元電気泳動により膜タンパク質を分離後、MALDI-TOF/MS、ペプチドシーケンサーによりタンパク質の同定を行った（図7 グラム陽性菌 5 種 A,B,D,E,F、グラム陰性菌 4 種 C,H,I、大腸菌 J,K）。

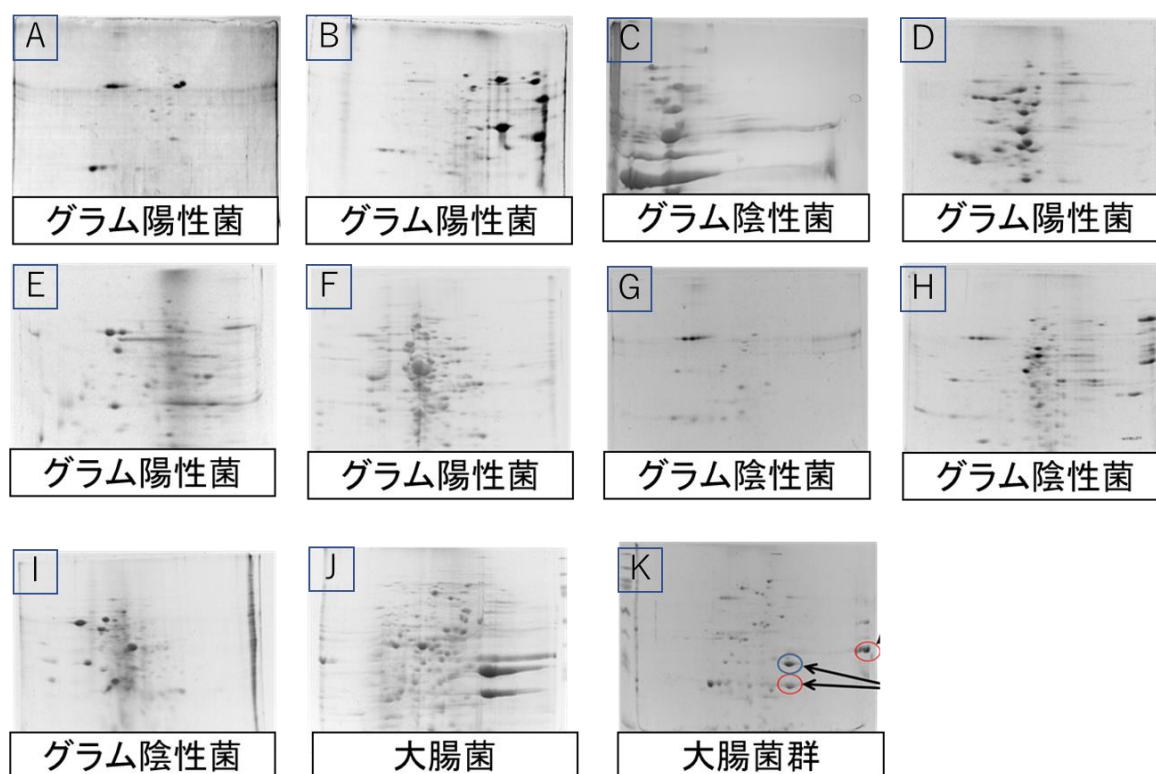


図7 グラム陽性菌 5 種、グラム陰性菌 4 種、大腸菌 2 種
二次元電気泳動による分離

【①－２】：大腸菌群、一般細菌、腸管出血性大腸菌 O157 の抗体開発

①－１で取得した大腸菌群用抗原（２種類）、一般細菌用抗原（４種類）、腸管出血性大腸菌 O157 用抗原を用いて免疫を行い、それぞれに対応した抗体を開発した。大腸菌（図８）
一般細菌（図９）、腸管出血性大腸菌 O157（図１０）

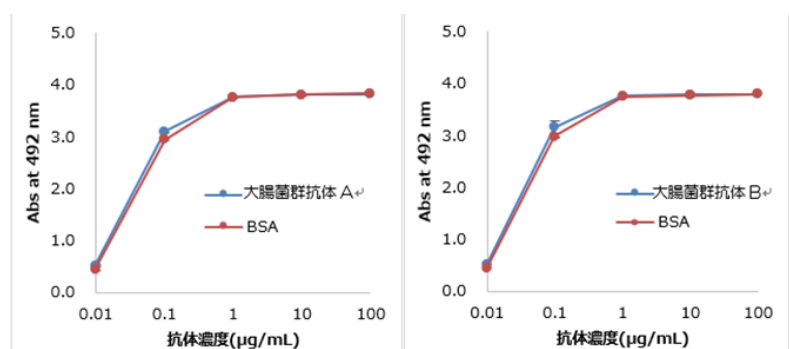


図８ 大腸菌抗体の抗体親和性評価

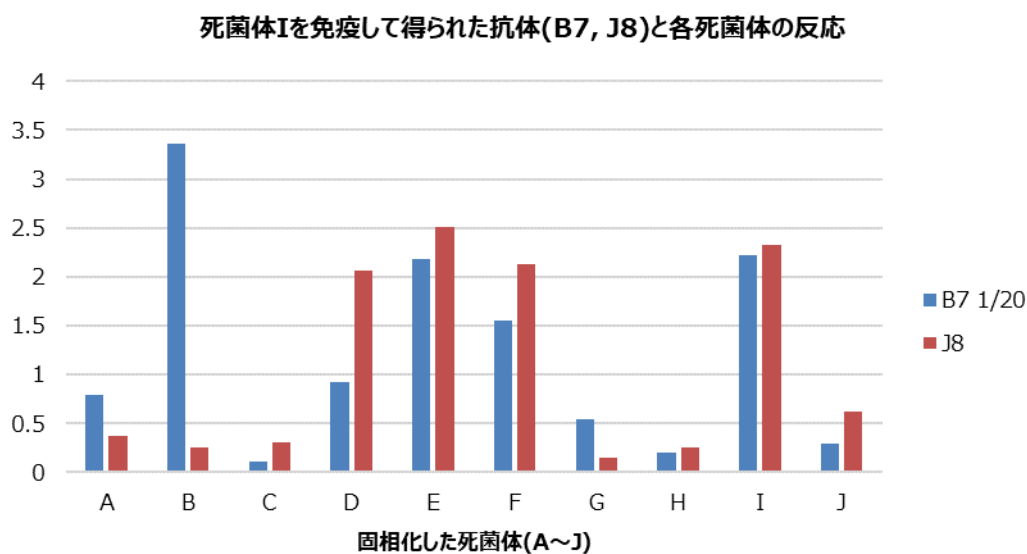


図９ 一般細菌用抗体と各種死滅菌との反応

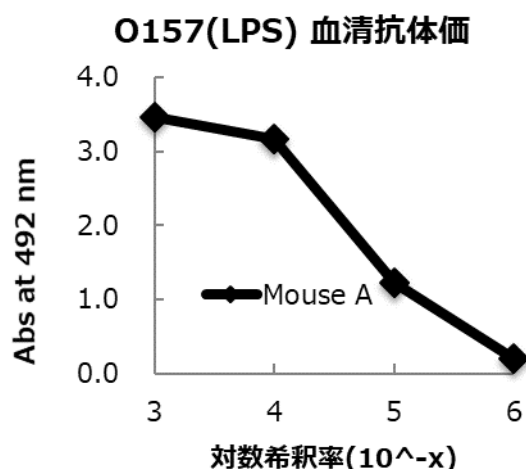


図10 腸管出血性大腸菌 O157 血清抗体価

【①—3】：ISFET 計測の抗体標識用酵素の開発

ISFET 計測の抗体標識用酵素の開発するにあたり、酵素の候補として、数値（ターンオーバー数）や基質と生成物の pH 変化の値（pKa 値）を指標として、酸化還元酵素、加水分解酵素、脱水素酵素、二糖脱アセチル化酵素などを選抜した。

酸化還元酵素は、現行の過酸化水素を使用する際の保管条件や測定法の課題を解決する新規な系として開発。結果として、直線性もあり ISFET センサーへ問題無く適用できることが示された（図11）。

加水分解酵素は、従来の反応系でも十分に ISFET センサーへ問題無く適用できる（図12）。加えて、現行測定法のリン酸系基質以外の基質を調査した結果、他の有機酸系では pH が低下するため断念。そのため抗体標識方法を、加水分解酵素予想立体構造を基に活性中心付近における野生型および変異体の結合予測から、タンパク質工学技術による効率的な抗体標識を考案した（図13）。

脱水酵素では、高比活性変異体のシンプルな精製工程を確立し、高純度なものを大量生産可能となった（図14）。また、高比活性変異酵素の特性評価（熱安定性や反応温度プロファイルなど）を行い、保存安定性など問題無いことを確認した。また、立体構造解析を行うことで、可動ループと基質結合の関係を可視化することに成功した。

二糖脱アセチル化酵素は、触媒反応によるアミノ基と酸の生成が ISFET 装置により計測できることを確認した（図15）。

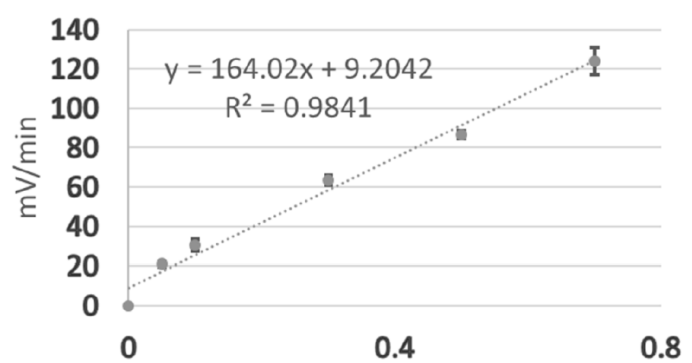


図 1 1 酸化還元酵素の濃度と ISFET 感度の直線性

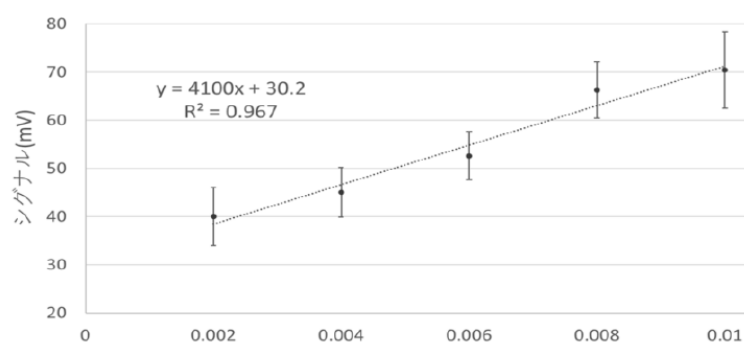


図 1 2 加水分解酵素濃度と ISFET 感度の直線性

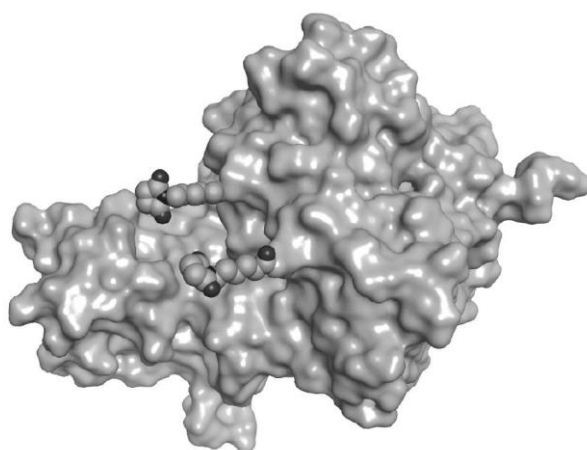


図 1 3 活性中心付近における野生型および変異体の EMCS 結合予測

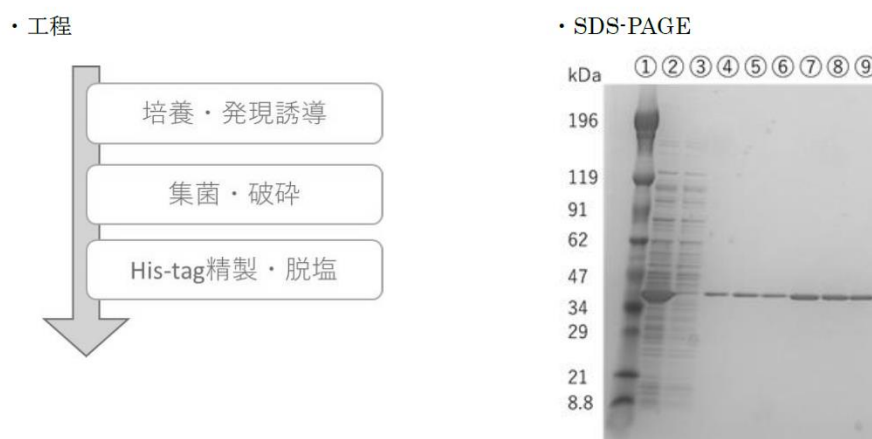


図1 4 変異体酵素の精製工程とタンパク質純度（SDS-PAGE）

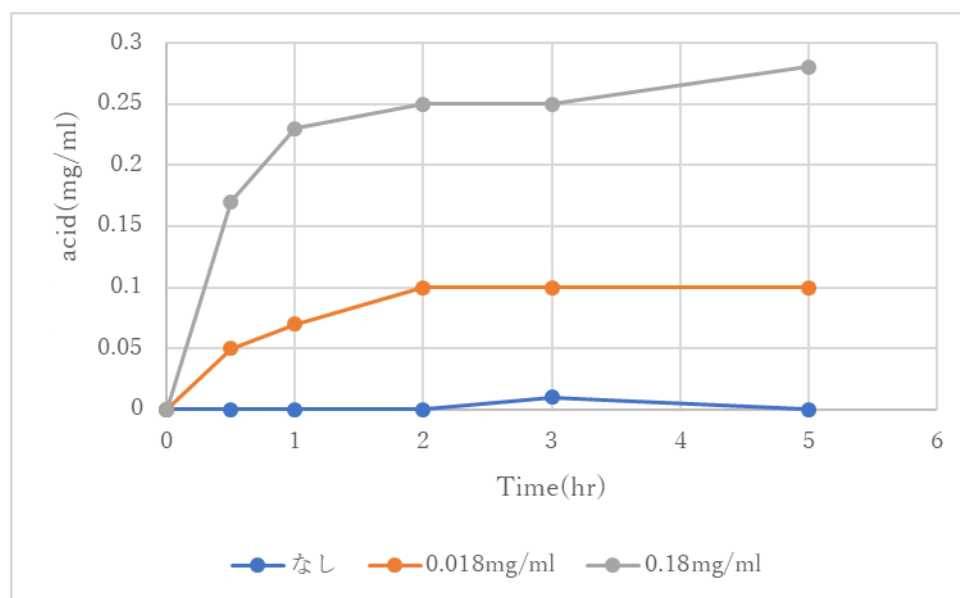


図1 5 触媒反応による酸の生成

【①－4】：ISFET 及び高感度免疫反応一体型測定法の開発

目標となる一体型測定法の確立のためには、専門的な技術員や器具、煩雑な作業を利用しない仕組みを作る必要がある。従来、ISFET を利用した酵素反応測定、および免疫反応測定をおこなうには、マイクロピペッター、シリンジ、遠心機、遠沈管、フィルターシステムなどの実験用器具が必要であったが、専用器具を必要としない方法の開発を重点的に実施し、それらを利用しないサンプル処理方法を検討した。初年度は採取したサンプルをアブライするシリンジと滅菌フィルターを一体型とした治具を用いることにより細菌を除去するステッ

【公開版】

プを簡易化した（図16）。さらに2年目は、サンプリング、細菌除去、酵素反応を一体型にしたフローズルタイプのアタッチメントを試作しワンタッチで測定可能な測定系を開発した（図17）。さらに最終年度については、気泡の混入と定量性が確保できないというフローズルタイプの問題を解決するため、点眼タイプのアタッチメントを試作・検討した（図18）。またサンプリングについても拭き取りとアプライを一体型とした方式を採用した。その結果、汎用機器を用いて3ステップで誰でも容易に測定までたどり着ける工程を開発することができた。

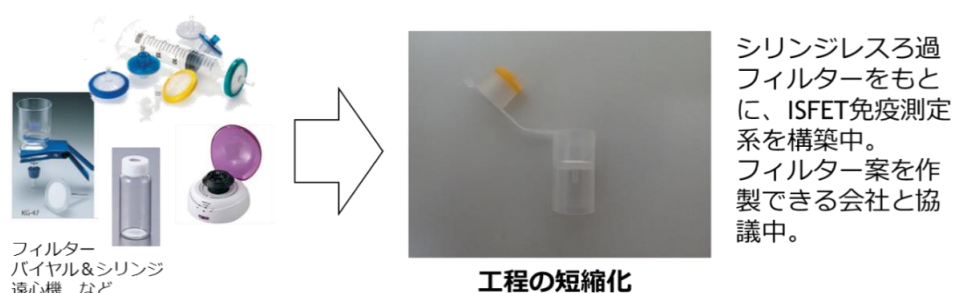


図16 H28 年度モデル



図17 平成29 年度モデル



図18 平成30年度モデル（試験管付き綿棒およびフィルターユニット）

【公開版】

平成 29 年度に実施したシリンジレスフィルターでは、センシング部へ添加する際に、気泡の混入と定量性、ろ過方法などの問題点があり、その問題点を改良するため、点眼タイプのアタッチメントを開発した。点眼タイプとすることで、サンプルをセンシング部分へ点眼容器から滴下することで気泡の発生を回避、設計段階でコントロールすることにより $20 \pm 1 \mu\text{L}$ /一滴と安定し定量性も確保することができた。さらに、内部にフィルター膜、基質や酵素を最初からセットすることで、サンプル採取から液の調整まで、実験器具を使用することなく測定できるようになった。①STEP1：スワブでサンプリング→②STEP2：点眼タイプアタッチメントへ添加→③STEP3：センサーへ滴下と 3 ステップで測定できる当初の目標であった、ISFET のインターフェース部分に装着可能で簡便な操作で検出可能な ISFET 免疫測定系を構築した（図 19）。

酵素標識抗体の保存条件、抗体シートを作成するうえでのブロッキング剤の選択、抗原と抗体の反応時間、測定用培地の検討、全体の測定時間など、簡易な操作で酵素反応の出力を得るために、通常の実験室レベルの測定とは異なる測定環境において、多くのトライ＆エラーを繰り返した検討を重ねる過程で様々なトラブルシューティングのデータも取得した。



図 19 ISFET 装置への滴下方法の改善を検討

2-2 実施内容② 簡便かつ低コストな分析を実現可能にする装置開発

【②-1】：ISFET を用いた試作装置開発

・装置開発

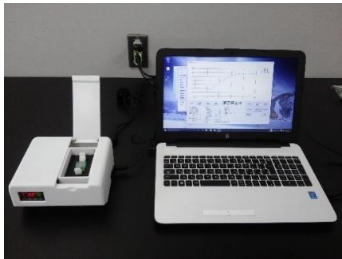
株式会社バイオエックス社で市販されている卓上型生理活性反応測定装置 AMIS-301 をベースに省スペースでも設置可能なデザインを優先し、従来の使用感を考慮に入れ平成 28 年度モデルを試作した（図 20）。

さらに小型化・省スペース化を図るとともに衛生面にも配慮したシンプルな試作装置とすべく、平成 28 年度モデルで課題のあったセンサーの取り付けなどのアクセス機構の開発

【公開版】

を実施するとともにタッチパネルを導入し、本体とタッチパネルを Bluetooth で接続することで、パソコンを使用しない操作しやすい機構に重点を置いた機器開発を実施した。平成 28 年度モデルよりさらに小型化を達成し、片手で扱いしやすい機器平成 29 年度モデルを開発した（図 20）

京都市中央卸売市場第一市場や展示会、ユーザーなどで平成 29 年度モデル試作機のヒアリングを実施。その評価結果を収集し、キーボード操作のわずらわしさ、本体と操作部が分かれている、などの問題点などの声を聞き装置の改良を行った。平成 30 年度モデルでは、キーボード操作からプルダウン方式に変更、操作部分も装置と一体とすることで操作性が格段にアップした。さらに設置スペースも縮小されどこでも使用できる装置となった。（図 20）



平成 28 年度モデル



平成 29 年度モデル

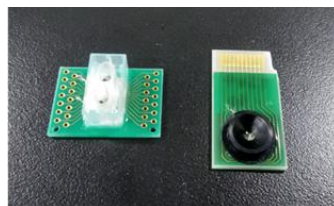


平成 30 年度モデル

図 20 各年度モデルの推移

・センサー開発

ISFET の測定に用いるセンサーについては、平成 28 年度の試作機モデルまでは研究機器仕様のタイプをベースにしていたため、センサーの取り付けを一般ユーザーが行うには、難易度が高く、試作機を導入した京都市中央卸売市場第一市場の検査室からも取り付けがしにくいという声が挙っていた。そのため、誰でもが容易に取り付け可能なように、SD カードを差し込む形状と同様のスロットタイプに変更し、操作性の向上がなされた（図 21）。



従来 ⇒ スロットタイプ

図 21 従来センサーとスロットタイプセンサー

2-3 実施内容③ 分析システムの開発

【③-1】：0.5 日測定結果完了

誰でも容易に合否を判断できるシステムを開発するため、測定フローの構築、試薬キットの開発を実施。分析時間の短縮と計測精度の向上を目指し、データ処理能力を向上させるため、ファームウェアの改良、新たな基板の設計、アプリケーションの開発を実施した。

試薬と計測装置の統合とシステム化を達成するため、簡易操作を行うための装置アプリケーションソフトの開発を実施するとともに、アプリケーションの合否判断データを確立するための大腸菌測定を実施。【①】で開発した点眼タイプアタッチメントを用いた試薬キットを統合し、サンプル採取から測定までのフローを構築した。その結果、試薬キットを用いて、【①】で実施している測定法にて、ISFET で検出可能な細菌数の閾値の設定を行うための条件を見出し、当初の目標であった検査の基準である（細菌数 10^5 cell/g）となる値を安定して測定できた。サンプル採取から試薬反応、計測に至るまでの一通りの流れを実施。試作装置を用いての生サンプルによるブラインドテストなど本分析システムの評価を実施し、サンプリング採取から測定までの時間は下記のように設定した。（図22～24）

サンプル採取から抗体反応：サンプル採取 2～3 分、試薬反応時間 5 分

測定時間：10 分、トータル測定時間：約 20 分／測定

以上のことより 0.5 日での測定結果検証・確認という当初の目標を達成した。



図22 平成 30 年度モデル操作モニタ

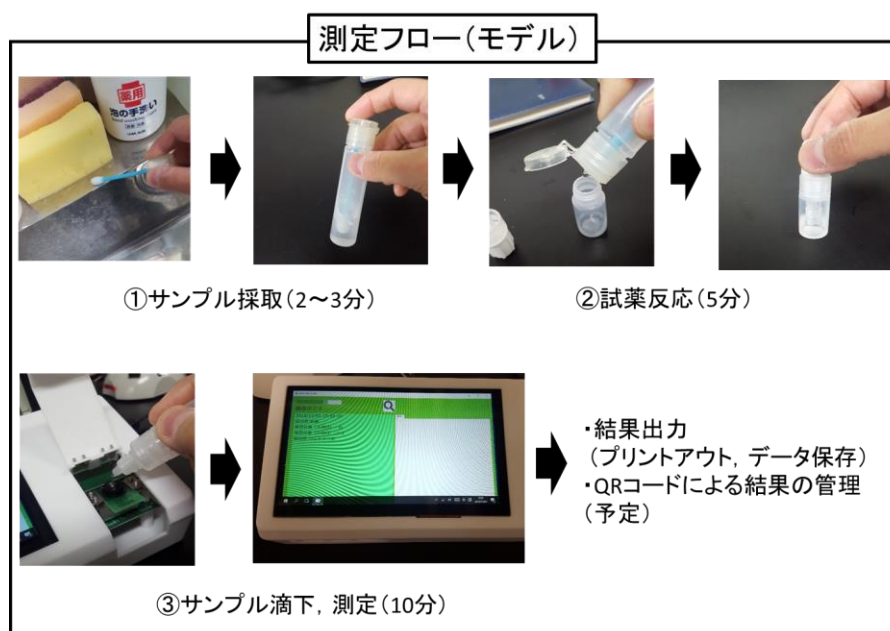


図23 開発した3ステップによる簡易測定フロー

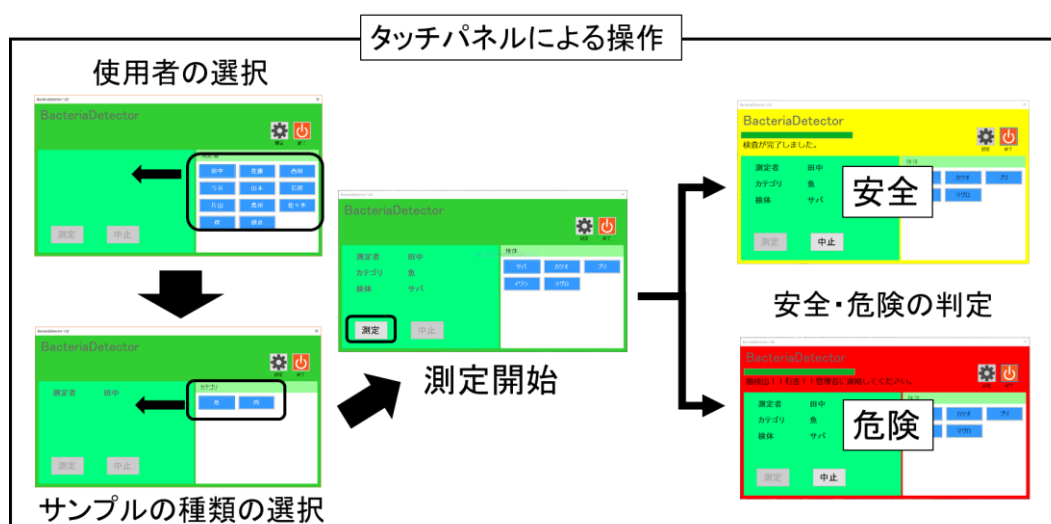
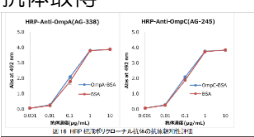
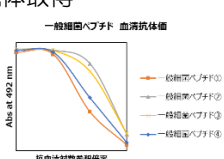
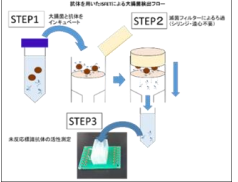


図24 開発した操作アプリケーション

最終章 全体総括

3-1 研究開発成果

各課題の研究開発成果について下記に示す。

研究開発等の年度目標	＜年度目標＞ 表層抗原の取得（大腸菌群用）、抗体作製 ISFET 免疫測定法の検討	＜年度目標＞ 表層抗原の取得（一般細菌用）、抗体の作製 ISFET 免疫測定法の最適化	＜年度目標＞ 表層抗原の取得（O157用）抗体作製
【1-1】多種細菌一括検出ターゲット（抗原）取得技術の開発 標的微生物の選択 抗原の選抜	大腸菌群から目的タンパク質を抽出し2種類の抗原を取得した	一般細菌群から複数の細菌同一種タンパク質を抽出し4種の抗原を取得した	O157 から目的タンパク質を抽出し2種類の抗原を取得した
【1-2】酵素標識抗体の開発 抗体の開発 酵素の標識	抗体取得 	抗体取得 一般細菌ヘパチド 血清抗体価 	免疫実施中 
【1-3】ISFET 計測用の抗体標識用酵素の開発 酵素の選抜 酵素の精製	酸化還元酵素 加水分解酵素 脱水素酵素 二糖脱アセチル化酵素 酵素の選抜	酸化還元酵素 加水分解酵素 脱水素酵素 二糖脱アセチル化酵素 ISFET 計測条件検討	酸化還元酵素 加水分解酵素 脱水素酵素 二糖脱アセチル化酵素 ISFET 計測条件検討 立体構造確認
【1-4】ISFET 及び高感度免疫反応一体型測定法の開発 反応工程の簡便化 0.5 日で完了するプロトコルの作製	3ステップ 	3ステップ 	3ステップ 
【2. 簡便かつ低コストな分析を実現可能にする装置開発】	試作装置開発 測定部部材選択 	試作装置試験導入 出力の再現性確認・安定化 	試作装置試験導入 出力の再現性確認・安定化 
【3. 分析システムの開発】		生サンプルによる評価 出力の再現性・安定性確認	0.5 日測定結果完了
【3-1. 分析試薬、計測装置の統合とシステム化】 装置アプリケーションの開発			
【3-2. 分析システムの評価】 サンプル採取から測定までの検証			

3-2 研究開発後の課題

課題1：測定結果の安定性

開発課題【①高感度で迅速な微生物分析を実現可能にする試薬開発】で得られた抗体について、事業化段階へ進めるためにはさらに安定した計測結果が得られる機構が必要である。そのためには、ISFET 計測用の抗体と抗体標識用酵素を用いた計測データの蓄積が必要である。どの現場、どの環境条件でも簡易に保管・使用できる反応機構を構築することが課題となる。

課題2：信頼性の確保

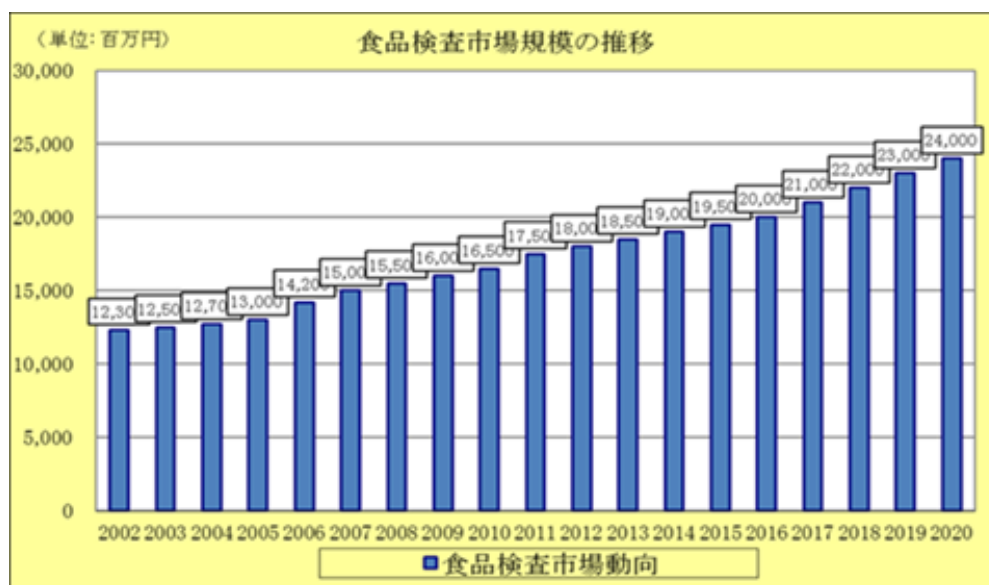
本事業で開発したプロセスは従来の細菌検査にはない画期的なプロセスである。そのため、従来の寒天培地法なのが記載されている「食品衛生検査指針」など食品衛生検査の指針の一つとなる必要がある。引き続き、学術的な知見からも開発成果をまとめ学会発表、学術論文などを作成し信頼性の確保が課題となる

3-3 事業化展開

・市場規模

国内の食品検査市場は規制の強化や衛生管理意識の向上によって右肩上がりに推移している。2006 年度はノロウイルス感染症が爆発的に流行、2012 年度は生レバーの販売・提供が禁止され、衛生管理意識が相対的に上昇している。2018 年にも食品衛生法など関連法の改正案を提出する方針である。加えて、2020 年東京五輪・パラリンピックや環太平洋連携協定（TPP）発効を控えている。そのため、国主導で HACCP の認証取得を、製造業者や輸出入業者など国内の食品事業者が段階的に義務付ける方針（2016 年 12 月、厚生労働省は食品衛生管理の国際基準「HACCP」の導入を全ての食品事業者が義務づける方針を決定。ただし、対応が難しい中小事業者は基準の一部簡略化が認められる。）を固めている。この動きに伴って食品メーカーが衛生管理手法の改善を図ることにより、質の高い食品分析装置のニーズが高まると推測される。

海外においても、食品の国際規格を策定している Codex 委員会が策定した「HACCP プラン作成 7 原則 12 手順」を WTO 加盟国において導入することが求められている。食の安全・安心は日本国のみならず、世界的に重要である。



(図25 食品検査市場動向)

・ 想定ユーザー

開発製品の販売先は、仲卸業者、スーパー、デパート、レストラン、食品会社、食品検査の受託分析会社や検査キット販売代理店などを想定している。特に仲卸業者や食品会社などでは、現場レベルでの早期検査システムを切望しており、一般細菌検査を容易かつ迅速に対応できる本システムを導入するメリットは非常に高いと言える。

仲卸業者や食品会社の多くは、汚染微生物検査を外注しており、検査が出るまでに数日要している。生鮮食品はこの間に商品としての価値が失われる。公定法による検査は確実だが、検査日数がかかることが難点である。

本システムを導入することによって、現場作業者が早期に汚染微生物のスクリーニング検査を実施することができる。検査に問題がない食品は早期に出荷が可能であり、スクリーニング検査でピックアップされた食品は、培地検査で陽性・陰性の判断をすればよい。結果的に本システムを導入することによって、“食”の安全・安心な流通が確保されることにつながる。

我々が行った市場調査によると、焼き肉チェーン店、冷凍食品メーカー、検査キット販売大手企業などに調査を行ったところ、すべての機関で本システム並びに試薬キットのニーズがあった。京都市中央卸売市場では、2027年に開設100年を迎えるにあたり、衛生管理・温度管理の徹底追及などの品質管理の見直しをせまられている。京都市中央卸売市場で

【公開版】

は、本システムの試験的運用に関して快諾を得ており、その導入に関しても前向きである。本システムを京都市中央卸売市場に導入し、「京都基準」をつくれば、全国の仲卸業者、スーパーなどに展開できる。焼き肉チェーン A 社では、生肉の取り扱いがあるため、衛生管理は特に厳しい体制をとっている。現状は培地検査や ATP システムを使用しているが、食品検査として満足していない。本事業で目指すシステムを提案したところ、導入したいとの回答があった。冷凍食品大手メーカー B 社では、加工された食品は微生物検査を合格した商品でなければ出荷できない取り決めがあるため、検査時間は重要な項目であるとしている。ランニングコストよりもいかに迅速に、高い精度の測定ができるのかを重視している。臨床検査や食品検査キット大手の C 社でも需要があるとの回答があった。現状の ATP システムでは菌の同定ができないため、これらの同定まで可能な本システムへの期待は高かった。B 社は、日本国内の検査指針も HACCP を参考にしており、どこでもだれでも簡易に測定できるものが求められているとの主張が強い。

3-4 その他波及効果

食品検査の分野においては、迅速にその場で検出し合否の判断ができることにより、生鮮食品の流通では安心と安全が強固になる。また、海外からの食品輸入に関しても、通関検査時に迅速に判断ができるようになるため、全数検査が可能となり、海外食品による日本国内における健康被害を水際で食い止めることが可能になる。また近年問題視されている、鳥インフルエンザや E 型肝炎ウイルスなどの検出にも応用することができる。各ウイルスのタンパク質を解析することにより、それぞれに応じた抗原・抗体を開発、ISFET 装置にて分析することで迅速に安価に検出することが可能となる。

3-5 事業化スケジュール

製品等の名称		一般細菌検出キット及び ISFET 簡易分析装置				
開発事業者		佐々木化学薬品株式会社				
想定するサンプル出荷先		食品加工会社、卸業者				
スケジュール	事業年度	2019 年	2020 年	2021 年	2020 年	2021 年度
	サンプルの出荷					
	追加研究					
	製品等の生産					
	製品等の販売					