

細菌の生存度を目視でリアルタイムに測定

金ナノ粒子による色変化で細菌の生物機能を評価

大阪府立大学（学長：辻 洋）大学院工学研究科の椎木 弘准教授、長岡 勉名誉教授らの研究グループは、分子修飾した金ナノ粒子（解説 1）と微生物由来の物質の相互作用を利用して、微生物の生存度が測定できる新しい手法の開発に成功しました。本成果により、目視による細菌の生死判別や生存度のリアルタイム測定が可能になりました。医療、製薬、農業、食品関連産業などの様々な分野における衛生管理や品質管理の観点で、細菌の生存度を正確に評価する有効な手段となります。また、種々の分泌物の標識が可能になることから、細菌の生物機能を評価する新しい方法として期待されます。

■本開発のポイント■

分子導入により特定物質に作用する金ナノ粒子を作製することができます。金ナノ粒子の溶液は、粒子の分散状態に基づいて赤色～青色に変化します。これらのことを利用して、目視による細菌の生死判別や、特定波長の吸光度に着目した生存率の測定を可能にしました。菌種によらず広く利用することができます。

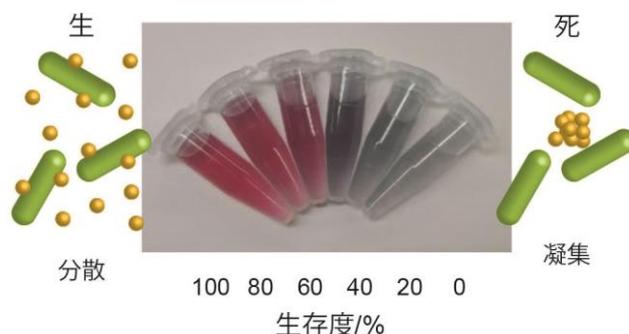


図 微生物の生存度を金ナノ粒子の分散状態に基づいた色変化により判定

細菌の生存度は、衛生管理、抗菌剤の開発、微生物資源の有効利用など、様々な目的において重要なパラメータとなります。本研究では、細菌から分泌される物質と金ナノ粒子に導入した分子の相互作用に基づいて、金ナノ粒子の分散状態が変化することを明らかにしました。さらに、金ナノ粒子を含有する細菌懸濁液の色が細菌の生存度に強く依存することを見出し、色変化を利用して細菌の生存度を評価する簡単な手法を開発しました。金ナノ粒子が分散した溶液の色は赤色、粒子の凝集によって紫色から青色に変化します。この色の変化は肉眼で容易に確認できるため、細菌の生存度をリアルタイムで評価することが可能になります。さらに特定波長の吸光度に着目することで生存度の正確な測定も可能になります。また、グラム陽性、グラム陰性（解説 2）にかかわらず、種々の菌種に適用可能であることから、様々な用途において細菌の生存度を評価する有用な方法となります。本法により、種々の分泌物の標識が可能になることから、細菌の生物機能を評価する有効な手段ともなり得ます。

本成果は米国化学会「*Analytical Chemistry*」オンライン版で 2018 年 3 月 1 日に公開されました。

背景

医療、製薬、農業、食品関連産業などの様々な分野における衛生管理や品質管理の観点から、細菌の数や種類のみならず、その生存度は重要なパラメータの一つとなります。細菌を要因とする感染症や食中毒などは人体に悪影響をもたらすだけでなく、関連産業の信頼を著しく低下させることから、大きな

社会混乱を招きます。したがって、微生物汚染を防止または排除するために、清浄環境を監視するための簡単な方法の開発が切望されています。また、効率的な滅菌とその環境の維持のために抗菌剤の開発が進んでいます。その評価のためには抗菌力の有効性と持続性をリアルタイムで評価することが重要です。一方、細菌は再生可能な資源として有効に利用されています。化学肥料の代替品、有毒物質の排除、金属回収、さらには、微生物燃料電池など様々な開発が進んでいます。細菌の効率的な利用のためには、細菌が活性で、高い生存度を維持するための適切な環境の構築が必要になります。

従来、細菌の生存度の評価にはコロニー計数法（解説 3）が用いられています。コロニー計数法は、24～48 時間の培養、適切な培地の調製、および温度管理を必要とし、これらの諸条件は菌種に依存するため、時間や熟練技術を要します。染色法も有効であり広く用いられていますが、染色操作や蛍光顕微鏡観察のための設備が必要となります。

金ナノ粒子は、優れた化学安定性と生体適合性を有していることから、バイオセンシングやバイオイメージングに広く使用されています。特に、イムノクロマト法（解説 4）を用いたインフルエンザ検査キットや妊娠検査薬の標識としてよく利用されています。これは、金ナノ粒子による呈色を利用した目視判定が可能になるため、いつでも、どこでも、だれでも利用できることから広く普及しました。

本研究グループでは、細菌細胞表面の化学構造に着目し、金ナノ粒子を標識とした標的細菌の検出に関する研究を行ってきました。これまでに得られた研究成果により、標的細胞を高精度に検出することが可能になりました。しかし、細菌の有害性、有益性はそれらの生存度にも強く依存するため、生存度をリアルタイムで評価することが重要となります。本研究では、各種分子を修飾した金ナノ粒子を用いた詳細な調査により、細菌から排出される物質と金ナノ粒子の間に働く相互作用の存在を明らかにしました。さらに、金ナノ粒子を含有する細菌懸濁液の色が細菌の生存度に強く依存することを見出し、肉眼で生存度を評価する簡単な手法としての有用性を実証しました。

研究内容と成果

サルモネラ菌 (*Salmonella enterica*) は卵、肉、牛乳などの非加熱食品を汚染する食中毒原因菌のひとつであり、37°C 程度で増殖しますが、70°C で熱処理することで滅菌できます。このことを利用して、生存度 0-100% のサルモネラ菌懸濁液を調製しました。分子修飾により正電荷をもつ金ナノ粒子（粒径 30 nm）を作製し、生存度 100% のサルモネラ菌懸濁液に添加すると、分散した金ナノ粒子に特徴的な赤色を示しました。この懸濁液の色は 12 時間経っても変化しません(図 1A)。つまり、懸濁溶液中において、金ナノ粒子が安定して分散していることを示しています。しかし、生存度の低下に伴い、懸濁液は直ちに赤色から紫色、そして青色に変化しました。

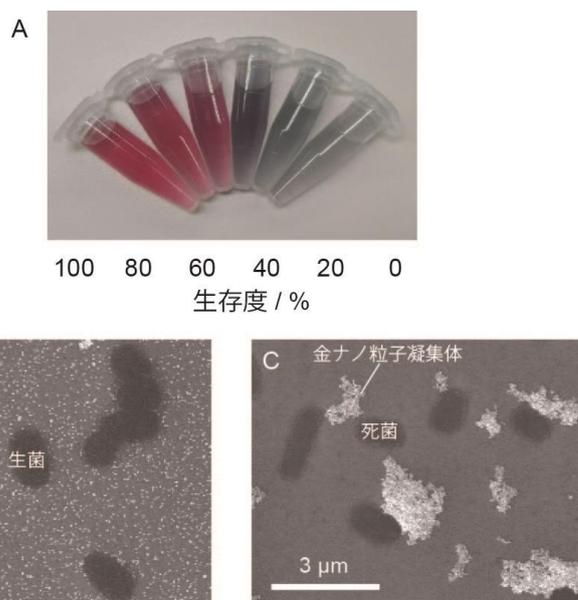


図 1 (A) 正電荷金ナノ粒子の分散状態に基づいたサルモネラ菌懸濁液の色変化。(B) 生菌と金ナノ粒子、(C) 死菌と金ナノ粒子の混合物の走査型電子顕微鏡像

懸濁液一滴を導電基板に滴下して電子顕微鏡観察を行ったところ、生存度 100% (生菌) の場合では、金ナノ粒子は基板に分散して観察されましたが (図 1B)、生存度 0% (死菌) の場合、金ナノ粒子は凝集して観察されました (図 1C)。この結果は、死菌細胞から溶出した物質により金ナノ粒子の凝集が誘発されることを示しています。生存度 0% のサルモネラ菌懸濁液を遠心分離した後、上澄み液中の成分を調べたところ、主に核酸 (DNA や RNA) が検出されました。つまり、正電荷をもつ金ナノ粒子が、核酸骨格中の負電荷をもつホスホジエステルと静電的に作用することによって凝集するものと考えられます。細菌懸濁液の色変化に基づいた生存度評価の有効性を調べるために、アルコール処理や真空乾燥などにより滅菌しました。それぞれの方法で滅菌したサルモネラ菌の懸濁液に金ナノ粒子溶液を添加すると、熱処理のときと同様に、直ちに赤色から青色に変化しました。

カルボキシ基を有するクエン酸を修飾した金ナノ粒子 (粒径 30 nm) は負電荷を示します。この金ナノ粒子をサルモネラ菌懸濁液中に添加すると、正電荷金ナノ粒子とは異なる挙動を示しました。生存度 0% のサルモネラ菌懸濁液に添加すると、分散した金ナノ粒子に特徴的な赤色を呈しました (図 2A)。これは、負電荷金ナノ粒子が死菌から溶出した核酸の存在下で互いに反発し、懸濁液中において安定に分散するためです。この懸濁液は、金ナノ粒子分散液の典型的な吸光スペクトルを示し、波長 530 nm に特徴的なピークが見られました (図 2B)。細菌の生存度の増大につれ、懸濁液の色は赤色から次第に紫色に変化しました。530 nm のピーク強度の減少に伴い、長波長領域 (750 nm) のブロードな吸収が増大しました。750 nm における吸光度は、生存度と良い相関を示しました (図 2C)。これらのデータは、クエン酸修飾した金ナノ粒子が生存度の正確な測定を容易にすることを示しています。クエン酸修飾した金ナノ粒子は優れた生体適合性を示すことが報告されており、私たちも、金ナノ粒子を懸濁液に加えた後、少なくとも 12 時間、細菌の生存度に変化がないことを確認しました。このことは、金ナノ粒子の凝集が生菌によって誘発されることを示しています。そこで、生存度 100% 懸濁液中における金ナノ粒子の凝集過程を暗視野顕微鏡法 (解説 5) で追跡しました (図 3a)。金ナノ粒子を添加した直後では、細菌細胞は単分散状態の緑色の光スポットとして観察されました。時間の経過とともに徐々に自己会合し、細

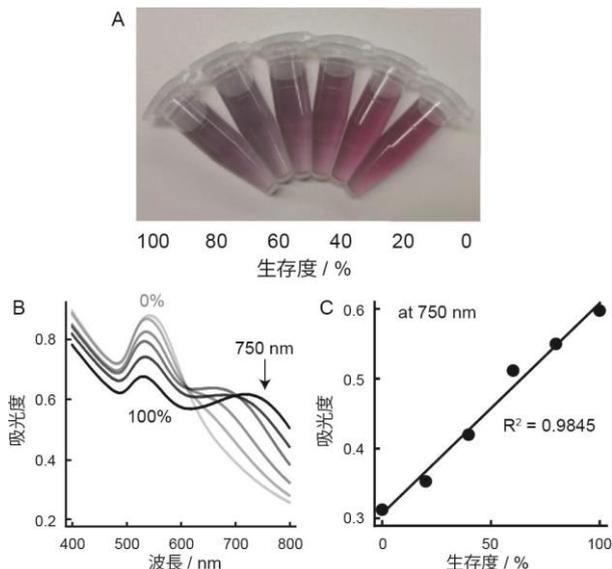


図 2 (A) クエン酸修飾金ナノ粒子の分散状態に基づいた細菌懸濁液の色変化、(B) 吸光スペクトル、(C) 吸光度と生存度の相関性

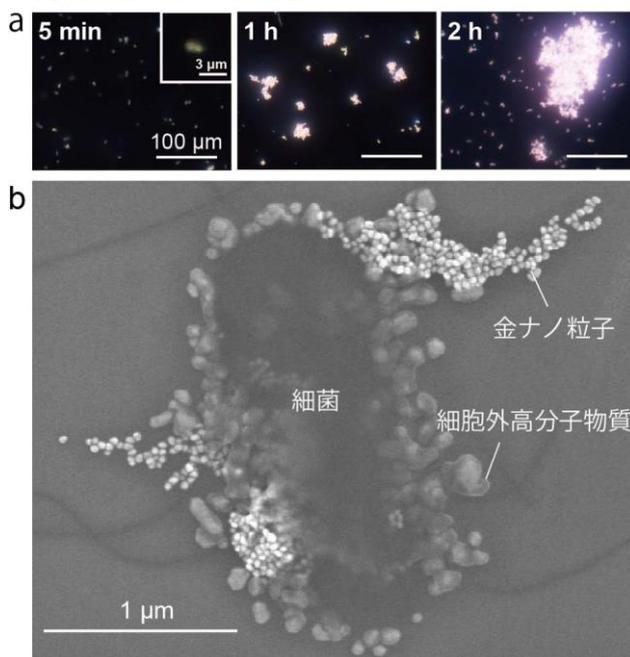


図 3 細胞外高分子物質分泌に基づくクエン酸修飾金ナノ粒子の凝集の様子、(a) 暗視野顕微鏡像、(b) 走査型電子顕微鏡像

胞集合体の形成が観察されました。一般に、生菌は接着性の細胞外高分子物質（解説 6）を分泌することにより、互いに、または固体表面に付着して、バイオフィームとして知られる自己組織体を形成します。走査型電子顕微鏡により、サルモネラ菌から分泌された細胞外高分子物質によって金ナノ粒子の凝集が誘発される様子が観察されました（図 3b）。また、金ナノ粒子を含まないクエン酸塩水溶液中では、バイオフィームは形成されません。さらに、クエン酸同様、カルボキシ基を有する安息香酸を修飾した金ナノ粒子の共存下においても、バイオフィームの形成は認められませんでした。つまり、化学種および金ナノ粒子の存在そのものが、バイオフィームの形成に直接関係しないことが明らかになりました。私たちは、金ナノ粒子と修飾分子（クエン酸）の結合力が重要なカギを握ると考えています。

このようにして、金ナノ粒子の分散状態に基づく色変化を利用したサルモネラ菌の生存度の測定が可能になりましたが、この方法の有用性を確認するために、大腸菌、黄色ブドウ球菌、および枯草菌のような他のグラム陰性菌およびグラム陽性菌についても同様に調べました。

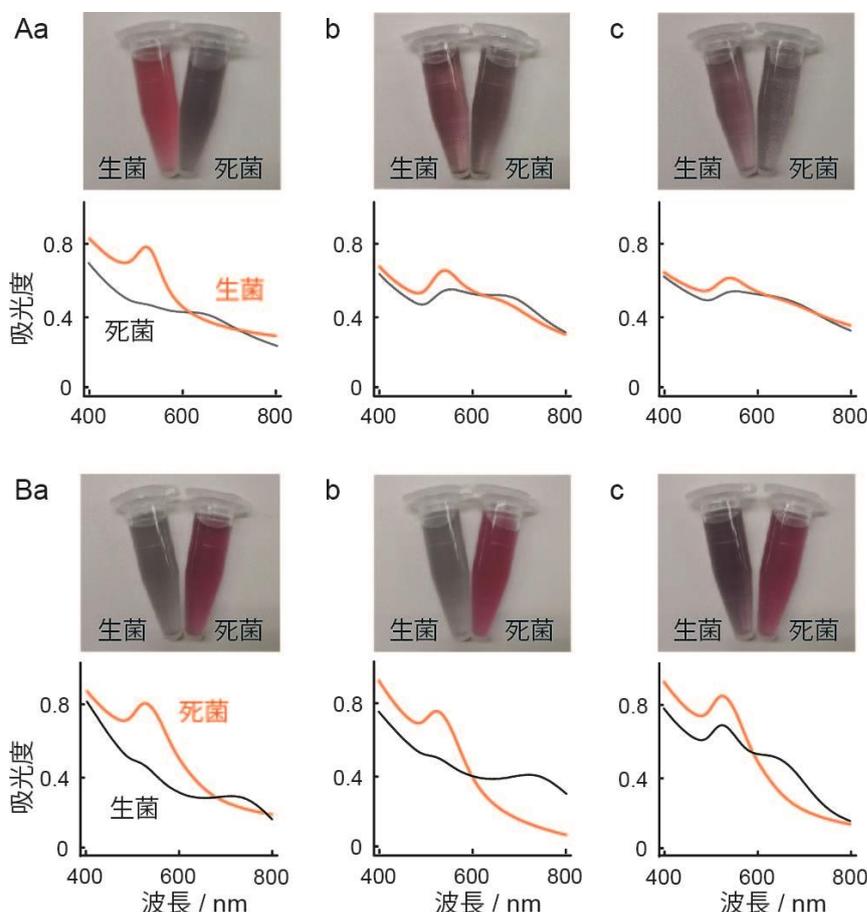


図 4 (A) 正電荷金ナノ粒子、(B) クエン酸修飾金ナノ粒子を用いた各種細菌の生死判別。
(a)大腸菌、(b)黄色ブドウ球菌、(c)枯草菌

いずれの死菌も 15 分以内に正電荷金ナノ粒子の凝集を誘発し、懸濁液の色変化に基づいた目視判定が可能でした（図 4A）。このことから、金ナノ粒子の凝集は細胞表面の化学構造によらず、死菌から放出される核酸によって引き起こされることが明らかになりました。一方、クエン酸修飾した金ナノ粒子の凝集は生菌によってのみ誘導されました（図 4B）。その際、菌種によって色変化に要する時間に違いが生じ、枯草菌では 2 時間以上、サルモネラ菌では 90 分、大腸菌および黄色ブドウ球菌では直ちに变化しました。

これらの相違は、細胞外高分子物質の分泌速度に依存するものと考えられ、本法は生死判別だけでなく、細菌の生物機能の多角的な評価に適用可能であることが明らかになりました。また、多種細菌混合物についても生存度に基づいた色変化が観察され、肉眼で識別することが可能でした。

本法は金ナノ粒子の分散性を利用するもので、その分散性は液性に強く依存することが知られています。そこで、溶液の pH およびイオン強度が金ナノ粒子の分散性に与える影響を調べました。イオン強度が 0.2 未満では、正電荷金ナノ粒子は pH2~12、クエン酸修飾した金ナノ粒子は pH4~9 の比較的広い pH 領域で安定であり、本法の有用性が示されました。

本成果によって、グラム陽性、グラム陰性、菌種にかかわらず、様々な細菌の生存度を目視により評価することが可能になりました。本法は、様々な用途において細菌の生存度を評価する有用な方法となるだけでなく、細胞外高分子物質などの分泌物に着目した細菌の生物機能の評価にも有効な手段となり得ます。

本開発の特徴と効果

金ナノ粒子の分散状態に基づいた色変化は、

- 1) 細菌の生存度に強く依存することが明らかになりました。
- 2) 細菌の生存度の肉眼での評価を可能にしました。
- 3) グラム陽性、グラム陰性、菌種にかかわらず利用することができます。

さらに、

- 4) 特定波長の吸光度に着目することで細菌の生存度が正確に測定できます。
- 5) 金ナノ粒子の分子修飾により様々な分泌物の標識化が可能になります。

研究助成等

本開発は農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業 (25020A)、JSPS 科学研究費補助金 (26620072、16H04137)、JSPS 特別研究員 (16J07230) の支援により行われました。

用語解説

(解説 1) 金ナノ粒子：金コロイドとも呼ばれ、1 から 100 nm 程度の粒径をもつ金の粒子のこと。分散状態では特徴的な光学特性に基づく赤色を呈することから、古くからステンドグラスや切子などの赤として、近年では、インフルエンザや妊娠検査用テストストリップの標識として利用されている。

(解説 2) グラム陽性菌、グラム陰性菌：グラム染色によって紫色になるのがグラム陽性菌、紫色にならず赤く見えるのがグラム陰性菌と総称される。染色性の違いは細胞壁の構造に起因し、厚いペプチドグリカン層により覆われたグラム陽性菌に対し、グラム陰性菌はリポ多糖類により覆われている。

(解説 3) コロニー計数法：希釈平板法では、細菌を含む懸濁液を 10~1000 倍に希釈した細菌試料をそれぞれ寒天上に広げて培養する。寒天上の細菌はそれぞれの位置で繁殖し、一定時間するとコロニーを形成する。形成されたコロニーを細菌試料における細菌一細胞と考え、菌数を計測する方法である。

(解説 4) イムノクロマト法：テストストリップ上を被検体が試薬を溶解しながらゆっくりと流れる性質を応用した免疫測定法である。試料中に被検体が存在する場合、金ナノ粒子により標識した一次抗体と被検体が結合して形成された複合体はストリップを流れ、テストライン部に固定化された二次抗体により捕捉される。このとき、テストライン部が金ナノ粒子による赤色を呈する場合、陽性と判定される。

(解説 5) 暗視野顕微鏡：コンデンサレンズを通じ試料に斜めから入射光を導入することで、試料からの散乱光を観察する光学顕微鏡の一種。光学顕微鏡では理論分解能 (200 nm) 以下の観察は不可能であるが、散乱光に着目することでナノメートルサイズの試料や微細構造の観察が可能となる。

(解説 6) 細胞外高分子物質：微生物が細胞外に分泌する高分子であり、多糖類、ポリペプチド、および細胞外ヌクレオチドなどの様々な分子から構成される。微生物が形成するバイオフィルムや細胞接着において重要な役割を果たす。

発表論文

論文名：Real-Time Evaluation of Bacterial Viability Using Gold Nanoparticles

著者名：Takamasa Kinoshita、Kengo Ishiki、Dung Q. Nguyen、Hiroshi Shiigi、and Tsutomu Nagaoka

掲載誌： *Analytical Chemistry* (American Chemical Society)

<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.analchem.7b05439>