

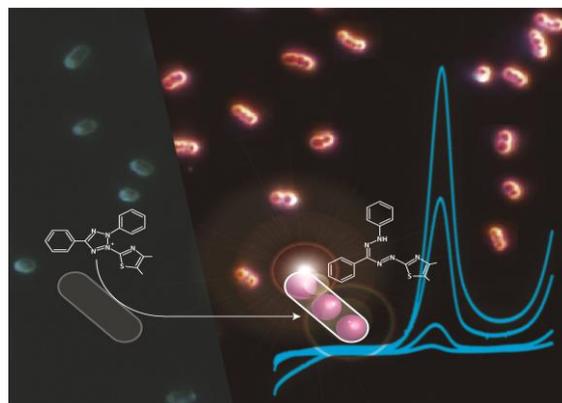
検出限界を 1/10,000 倍上回る検出を実現！

## テトラゾリウム塩を用いた細胞活性の電気化学的評価法を開発

大阪府立大学（学長：辻 洋）大学院工学研究科 博士後期課程2年石木健吾、Nguyen Dung、椎木 弘准教授らの研究グループは、テトラゾリウム塩（解説1）を用いた細胞活性の電気化学的評価法を開発しました。本開発によって、電極に吸着した細菌の迅速な定量が可能になり、従来の MTT アッセイ（解説2）の検出限界を 1/10,000 倍上回る検出が実現されました。本法は、電極に吸着する細胞であれば菌種に関わらず適用できるため、食中毒や感染症の予防、食品の品質管理や安定供給、医薬品の細胞毒性、微生物燃料電池やセンサの形成など様々な分野において細胞活性を評価する有効な手段となります。

### ■本開発のポイント（特徴と効果）

- 1) 細菌を迅速かつ高感度に検出することができます。
- 2) グラム陽性、陰性、菌種にかかわらず、種々の微生物を検出することができます。
- 3) 呼吸や光合成など、種々の細胞の生物活動を定量的に評価できます。



細菌に形成されたホルマゼン結晶の暗視野像

微生物、特に細菌の検出は、医療、創薬、公衆衛生や食の安心安全の確保、機能性食品の品質管理など、豊かな社会の形成においてその重要性が増しています。本研究では、細胞の生命活動に基づいて生じるホルマゼンの電流応答に着目した新しい細菌の検出法を開発しました。従来の MTT アッセイでは目視検出のために  $10^5$  個程度以上の細胞を要します。本開発によってホルマゼンの高感度な計測が可能になり、培養時間が最低でも4時間必要だったところ1時間以内に大幅に短縮することができました。

細菌懸濁液に水溶性のテトラゾリウム塩を加えて1時間培養した後、暗視野顕微鏡で観察すると、細菌表面に赤色の結晶（ホルマゼン）が生成します。結晶は熱溶解により簡単に電極表面に再結晶化することができます。電極に生成したホルマゼンは水に不溶であるため、酸化に基づく大きな電流応答を得ることができます。ホルマゼンの生成量が試料に含まれる菌数に依存することを明らかにし、ホルマゼンの酸化によって得られた電流応答から菌数の定量が可能になりました（検出限界：30細胞程度）。また、試料採取から検出まで1.5時間で高感度な測定が可能です。ホルマゼンは細菌の代謝によって生成されるため、本法によって細胞活性を評価することが可能です。したがって、細胞の呼吸や光合成などを含む生命活動を定量的に評価する有効な手段にもなり得ます。

本成果は米国化学会「*Analytical Chemistry*」オンライン版で2018年8月17日に公開されました。なお、冊子体「*Analytical Chemistry*」誌のカバーアートに選出されました。

背景

微生物は私たちの生活環境のみならず地球上のあらゆる環境に広く分布しています。ヨーグルトや漬物、納豆など発酵食品の製造に利用されるのみならず、土壌や肥養液にも多く含まれており、農作物に必要な窒素やリンなどの栄養源を供給する微生物源として有用です。近年では、微生物燃料電池における電子供給源として用いられています。一方、微生物、特に細菌を危害要因とした集団食中毒や流行性感染症は衛生管理技術の発達した現代においてもしばしば発生し、大きな社会混乱を引き起こします。安心して安全に日常生活を送るためには、自主管理に基づく危害要因発生の予防と、発生時における迅速な危害要因の特定による被害拡散の抑制が重要です。現在、細菌検出は食品衛生法（公定法）に基づいた希釈平板法（解説3）で行われており、細菌の生物機能を利用するため培養工程を要します。近年では、標的細菌に対応した乾式フィルム培地の開発により操作手順の簡略化が達成されており、標準法と高い相関性があることから簡便法として用いられています。この方法は、米国では農務省や食品医薬品局がオフィシャルメソッドとして定めています。現在、大腸菌、黄色ブドウ球菌、サルモネラ菌、大腸菌群に対応した培地が販売されていますが、培養を要するため判定までに最低数日を要します。これらの細菌の生物機能に着目した方法は、必然的に培養を必要とします。そこで、細菌の生物機能を利用しながら、かつ迅速な検出法を開発しました。

テトラゾリウム塩(3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)は細胞に含まれる酵素や電子伝達体（解説4）などと反応し、還元されてホルマザンになります(図1)。ホルマザンは紫や赤など特徴的な色を示すことから、比色分析（解説5）に利用されます。テトラゾリウム塩を用いた比色分析は、酵素活性や呼吸などを含む細胞の生命活動の評価を可能とするため、医学、生物学の分野において幅広く利用されています。私たちは、ホルマザンの化学的性質と電気化学的特性に着目しました。テトラゾリウム塩は水に可溶性酸化体ですが、細胞によって還元体のホルマザンになります。ホルマザンは水に不溶性であるため電極表面に堆積します。電極に堆積したホルマザンは大きな酸化電流を示します。本研究では、この現象を利用して細菌の電気化学検出に応用しました。

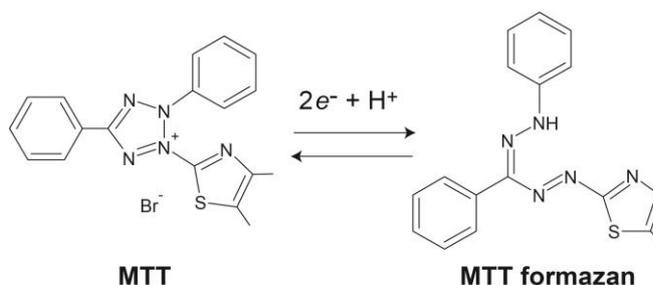


図1テトラゾリウム塩（MTT）の構造変化。

図2はホルマザンのCV（Cyclic Voltammogram）を示しています。縦軸は電流密度（ $\mu\text{A cm}^{-2}$ ）で、横軸は電位（V vs. Ag/AgCl）で示されています。電位は-0.5Vから1.0Vまで変化させられています。図には5つの異なる濃度のホルマザンに対するCVが示されています。a)  $10^6$  CFU mL<sup>-1</sup>, b)  $10^5$  CFU mL<sup>-1</sup>, c)  $10^3$  CFU mL<sup>-1</sup>, d)  $10^1$  CFU mL<sup>-1</sup>, e) 0 CFU mL<sup>-1</sup>。鋭い酸化ピークは電位が約0.1V付近に現れ、その電流密度は濃度が増えるにつれて増加します。還元ピークは電位が約-0.2V付近に現れ、その電流密度は濃度が増えるにつれて減少します。

研究内容と成果

大腸菌懸濁液 1 mL にテトラゾリウム塩の 1 種である MTT を加えて 1 時間培養するとホルマザンが生成します。この分散液を遠心分離し、上澄みを除去します。そのうち 5  $\mu\text{L}$  を電極に滴下し、熱溶解させることで電極表面に細胞を吸着させました。その後、リン酸緩衝液中でサイクリックボルタンメトリー（CV, 解説 6）を行いました（図 2）。-0.7 V から正方向に掃引すると、+0.1V と +0.7V 付近に鋭い酸化ピークが現れました。これらの酸化ピークの電流値と掃引速度は比例したことから、電流応

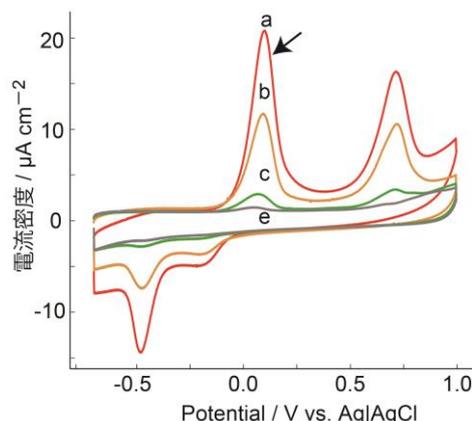


図 2 ホルマザンの CV. 大腸菌濃度, (a)  $10^6$ , (b)  $10^5$ , (c)  $10^3$ , (e) 0 CFU mL<sup>-1</sup>.

答は電極表面に吸着した化学種の酸化、すなわち大腸菌に堆積したホルマザンの酸化に基づく電流応答であるが明らかになりました。この電流応答は、電極表面に吸着した細胞数、つまり懸濁液試料中に含まれる菌数に強く依存しました。これらの電流応答は、大腸菌だけでなくサルモネラ菌や緑膿菌、黄色ブドウ球菌にも同様に確認されました。いずれも、懸濁液の菌体密度の増加にともない電流値が上昇しました。電流応答について3σ法により検出限界を算出したところ、 $2.8 \times 10^1$  CFU mL<sup>-1</sup>と見積もられました。これはMTTを利用した比色分析における検出限界の約1/10,000倍以上です。また、比色分析では少なくとも4時間、希釈平板法では通常24時間以上の培養を要しますが、本法ではサンプル採取から検出まで1.5時間以内での検出が可能でした。本法を用いて肥養液（本学の植物工場研究センターから提供）に含まれる微生物の定量を行ったところ、 $4.9 \times 10^4$  CFU mL<sup>-1</sup>と算出されました。一方、希釈平板法を用いて同じサンプルを測定した結果、 $5.0 \times 10^4$  CFU mL<sup>-1</sup>と見積もられ、これらの異なる検出法に良い相関がみられました。これより、本法は細菌の検出だけでなく、有用な微生物群の定量も可能であることが明らかになりました。

細菌表面に形成されたホルマザン結晶を暗視野顕微鏡により観察しました（図3）。培養前の細胞はロッド状の弱い散乱スポットとして観察されました（a）。培養後の細胞には赤色の球状スポットが観察されました（b）。これは、細胞表面でホルマザン結晶が生成していることを示しています。一方、熱溶解した後の電極表面の電子顕微鏡観察では、ホルマザンは細菌の形状に沿ったロッド状の結晶として観察されました。菌体密度が $10^6$  CFU mL<sup>-1</sup>以上の場合、ホルマザンは針状の結晶として観察され、その結晶は細胞よりも大きいことがわかりました。菌体密度によるホルマザン結晶の形状の違いは、細菌が生成するホルマザンの量に起因すると考えられます。熱によってホルマザン結晶が溶解しますが、菌体密度が低い場合では、ホルマザンは再結晶に際し、細菌の形状に沿ったロッド状の結晶として再形成されます。菌体密度が高い場合は、溶解するホルマザンが多くなるため、再結晶において成長する結晶が大きくなり、針状のホルマザン結晶が生成するものと考えられます。

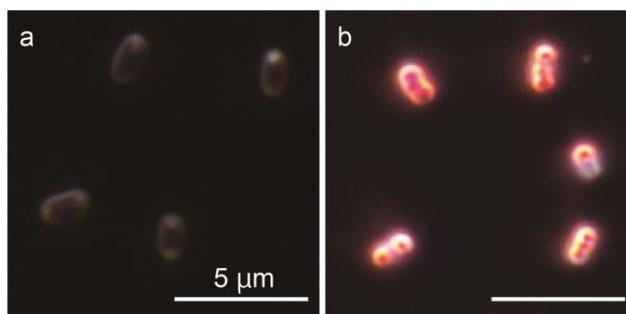


図3 電極表面に吸着した大腸菌細胞の暗視野顕微鏡像。(a)培養前と(b)培養後

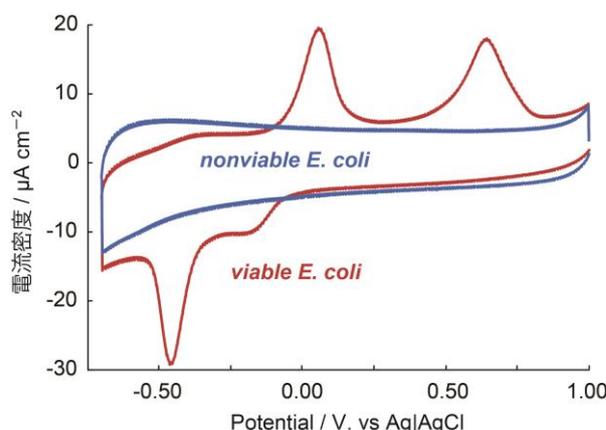


図4 生細胞・死細胞のボルタンモグラム。

ホルマザンは細胞の代謝により生成されます。したがって、死細胞ではホルマザンは生成しません。そこで、あらかじめ滅菌処理した細菌懸濁液にMTTを加えて培養し、サイクリックボルタンメトリーを行いました（図4）。生細胞の場合、ホルマザンの酸化還元に基づく電流応答が確認されましたが、死細胞の場合は、電流ピークは観察されませんでした。すなわち、本法は生細胞をターゲットとした検出に有用です。したがって、細胞の代謝活動量の指標として活用できます。種々の細胞の呼吸や光合成など、酸化還元反応を伴う生物機能を定量的に評価する手法として期待されます。

## 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（25288039、16H04137）の支援により行われました。

## 用語解説

（解説1）テトラゾリウム塩：細胞の代謝活性の評価に用いられる呈色指示薬のひとつ。テトラゾリウム塩は、細胞に含まれる酵素や電子伝達体により還元されホルマザンを生成する。ホルマザンは紫色や赤色などの特徴的な色を示すため、酵素活性や呼吸活性などを比色により評価することができる。

（解説2）MTT アッセイ：テトラゾリウム塩のひとつである MTT (3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) が酵素によってホルマザン色素（紫色）に還元されることを利用した比色定量法である。培養細胞の生存率や増殖率を調べることができる。様々な医薬品や毒物の細胞毒性の評価に用いられる。

（解説3）希釈平板法：微生物を液体培地や寒天培地上で増殖させ、コロニー計数により、試料中に含まれる微生物の数を測定する方法。微生物における検出法として広く利用されている。

（解説4）電子伝達体：生体内での電子伝達を担う物質の総称。エネルギー源として利用されるアデノシン三リン酸（ATP）の合成、呼吸や光合成などを含む生物の生命活動において重要な役割を果たす。

（解説5）比色分析：色素の呈色反応によって生じる色変化から目的物質の濃度を定量する分析法。色の濃淡で濃度を判定するため、食品・医学分野における現場分析に広く利用されている。

（解説6）サイクリックボルタンメトリー：作用極の電位を正、あるいは負の方向に掃引し、応答電流を測定することで、酸化還元特性を評価する電気化学的手法。酸化還元反応を電位により定性、電流応答により定量的に分析できることから、電気化学の分野において最も基本的な測定法の1つである。

## 発表論文

論文名：Electrochemical Detection of Viable Bacterial Cells Using a Tetrazolium Salt

著者名：Kengo Ishiki, Dung Q. Nguyen, Aya Morishita, Hiroshi Shiigi, and Tsutomu Nagaoka

掲載誌：Analytical Chemistry (American Chemical Society)

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.8b02404>