

称号及び氏名	博士（工学） Nguyen Quang Dung
学位授与の日付	2019年 9月 25日
論文名	「Development of Bacterial Marker for Optical and Electrochemical Detection (光学的，電気化学的検出のための細菌標識の開発)」
論文審査委員	主査 久本 秀明 副査 井上 博史 副査 原田 敦史

論文要旨

細菌は、様々な環境に適応し、生態系において重要な役割を果たす。我々の日常生活は多くの有用細菌により成り立っている反面、食中毒や感染症の要因となり人体に悪影響を与える細菌も存在する。細菌の検出は寒天培地を用いる標準法（公定法）により行われているが、標的細菌に適した培地の作製が必要であるため、検出プロセスの簡略化に関する開発が進められてきた。近年では、乾式フィルム培地の開発により操作手順の簡略化が実現されている。乾式フィルム培地を用いる方法は、標準法との相関が高いことから、簡便法として広く用いられている。しかし、培養工程を要するため判定までに最低数日かかることが問題となる。そこで、細菌の迅速検出に関する開発が進められている。抗原抗体反応を利用した酵素結合免疫吸着法では、マイクロプレートに抗体を固相化させることで標的抗原を比較的迅速（＜半日）に検出することが可能である。しかし、操作が煩雑で熟練を要するため、現場実行性が低い。アデノシン三リン酸（ATP）とルシフェラーゼの反応による生物発光に基づいた手法は迅速な検出を実現し、特に危害要因分析に基づく必須管理点に広く利用されている。20分程度での検出可能であるが、生物に共通した ATP を指標とするもので細菌の有無を明確にするものでなく、危害要因の特定は困難である。これらの既存技術は細菌の生物機能を利用するものであり、原理的な制限によって社会ニーズを十分に満足する開発に至っていない。これらの諸問題の解決のためには、種々の現場から採取した試料を培養することなく高感度にかつ特異的に検出する手法の開発が必須である。

本研究では蛍光色素や金属ナノ粒子が有する性質を利用して新しい検出法を開発した。金属ナノ粒子は局在表面プラズモン共鳴（LSPR）に基づき可視光と相互作用することで特徴的な光学特性を生じる。化学安定性の高い金ナノ粒子は生物適合性が高く、粒子表面の分子修飾が容易であるため、微生物との機能的界面を形成するのに有用である。金ナノ粒子から成

る三次元構造体において LSPR が高次にカップリングすることで特異的な光学特性を発現することを発見した。これらのことを利用して高感度標識の開発を行い、新しい細菌検出法の開発について検討した。

第 1 章では本論文の背景、および概要について述べた。

第 2 章では金ナノ粒子が高密度に集合した構造体の形成とその効果について検討した。塩化金酸とアニリンを含む水溶液 (pH 4.1) 中において、アニリンは金イオンにより酸化され、金イオンはアニリンによって還元される。すなわち、金ナノ粒子の生成とポリアニリンの重合反応が同時に生じる。得られた構造体を電子顕微鏡によって観察した。ポリアニリンと思われる直径 100 nm 程度の球状粒子に明確な金ナノ粒子 (直径約 5 nm) が多数内包されて観察された。酸処理した構造体は直径 100 nm 程度の単一粒子として観察された。これは、ドーピングによって金属化するポリアニリンの性質に起因するものであり、ポリアニリンによって隣接した金ナノ粒子が接触することなく、高密度に集合していることを示唆した。構造体においてポリアニリンは金ナノ粒子間に色素分子を配置する場として機能する。LSPR が色素の蛍光を増強することに着目し、構造体にフルオレセインを導入した。蛍光強度は著しく増大 (5 倍以上) し、1 ヶ月以上安定であった。フルオレセインがポリアニリンと静電的に作用し、金ナノ粒子と接することなく捕捉されたためと考えられる。一方、構造体に捕捉されない、あるいは金ナノ粒子との親和性が高い、いずれかの理由によりローダミン 6G には蛍光に増強効果は見られなかった。分子構造に基づいた色素の構造体への導入が可能となり、高感度な蛍光標識としての機能が期待できる。

第 3 章では細菌表面に吸着した金ナノ粒子の光学特性を利用した検出法について検討した。第 2 章で作製した構造体において、金ナノ粒子は直接接触することなく高密度に集合しており、LSPR が高次にカップリングすることで強い散乱光を生じる。このことから、構造体は暗視野顕微鏡下において高感度標識として機能した。抗 O157 抗体を導入した構造体の分散液と大腸菌 O157 懸濁液をスライドガラスに滴下し、自然乾燥した。構造体がすべての細胞に結合し、強い散乱光として観察された。血清型の異なる大腸菌 (O26, O111) について同様の実験を行ったところ、細胞への結合は見られなかった。このとき構造体は比較的弱い散乱光としてスライドガラスに分散して観察された。これらのことから、抗体を介した特異結合によって構造体が細胞表面で高密度に集合するため、散乱光がさらに増強されたものと考えられる。このような効果は、検出の高感度化を可能にするのみならず、構造体の非特異的な凝集との判別に有用であり、偽陽性の低減化に有効である。

第 4 章では蛍光色素の電気化学活性に基づいた細菌検出法の開発について検討した。アクリジンオレンジ (AO) は核酸に選択的な色素であり微生物の定性分析に有用である。しかし、水溶液では中性とカチオン性 (AOH⁺) の異なる形態で存在し、蛍光強度がその構造に強く依存するため定量には注意が必要であった。中性 AO は細胞膜を貫通し、細胞内においてプロトン化される (AOH⁺)。これらの構造はそれぞれ異なる酸化電位を有するため、AOH⁺ のみに着目することで電極上の生細胞数の定量が可能になった。単一細胞当たり 8.4 fA の電流を生じ、検出限界は 10⁵ cells 程度と見積もられた。標識の電気化学活性に着目した検出の有用性が明らかになったが、活性の向上が必要であった。

第 5 章では第 3 章で作製した三次元構造体の電流応答に着目した細菌検出法の開発について検討した。抗 O157 抗体を導入した構造体はポリアニリンに特有の電気化学特性を示した。微分パルスボルタンメトリー (DPV) の結果、酸性溶液中において明瞭な酸化電流が観察され、抗体導入による構造体の電気化学活性への影響は見られなかった。そこで、抗体導入構造体を標識とした大腸菌 O157 の電気化学検出を試みた。暗視野顕微鏡によって、ITO ガラス表面に吸着した細菌細胞は流水や溶液への浸漬による脱落なく、強固に吸着していることを確認した。大腸菌 O157 を吸着させた ITO ガラスを標識分散液に浸漬した後 DPV 測定したところ、標識に基づく明瞭な電流応答が見られた。この電流応答は、ITO 表面に吸着した細胞数に強く依存し、単一細胞レベルの検出が可能になった。一方、血清型の異なる大腸菌や他

の菌種について同様の検討を行ったが、まったく応答は見られなかった。また、実試料においても同様に特異的かつ高感度な検出が実現された。

第6章では分子インプリンティング技術を利用して細胞表面の化学構造に選択的なキャビティの形成について検討した。大腸菌は負のゼータ電位を有することから、導電性ポリピロール (PPy) のドーパントとして機能した。溶菌処理によって PPy マトリクスに得られたキャビティの形状は血清型に基づいて異なった。大腸菌 O157 ではロッド状キャビティが70%以上占めるのに対し、O rough では50%程度にとどまった。血清型によって表面の糖鎖構造が異なり、PPy との親和性が異なるためと考えられる。キャビティの細胞との結合性について調べたところ、大腸菌 O157 キャビティは大腸菌 O157 細胞に高い選択性(10倍程度)を示し、低密度(10^4 cells/mL)の分散液においても結合したのに対し、O rough キャビティは高密度の O rough 細胞分散液($>10^6$ cells/mL)であっても結合した細胞数は少なく、選択性は3倍程度にとどまった。このように、キャビティの細胞認識は細胞の形状や大きさのみならず、細胞表面の化学構造との種々の結合や化学的相互作用により実現されることが明らかになった。これらのことから、菌種に特徴的な化学構造に着目した特異検出のみならず、細菌に共通した構造に着目したブロード検出が可能となることが示唆された。

第7章では本論文を総括した。

本論文では、細菌の化学的性質に着目した迅速検出法の開発を行った。細胞表面の化学構造の標識は、従来の生物機能に着目した一元的な検出法に所望の選択性を組み合わせ、検出のテーラーメイド化を実現する。既存法における種々の課題を克服する新しい手法として今後の発展が期待される。

審査結果の要旨

本論文は、蛍光色素や金属ナノ粒子の光学的、および電気化学的性質を利用し、迅速かつ高感度な細菌検出法の開発に関する研究成果をまとめたものであり、以下の成果を得ている。

(1) 金ナノ粒子とポリアニリンからなる球状のナノ構造体が、隣接した金ナノ粒子が接触することなく高密度に集合して形成されていることを明らかにした。ポリアニリンが金ナノ粒子間に色素分子を配置する場として機能し、構造体に導入したフルオレセインの蛍光強度は金ナノ粒子の局在表面プラズモンによって著しく増大した。

(2) 抗 O157 抗体を導入したナノ構造体は大腸菌 O157 の細胞表面に集合し、暗視野顕微鏡下において強い散乱光として観察された。他の血清型大腸菌細胞への結合は見られなかった。この効果は、細菌検出の高感度化を可能にするのみならず、構造体の非特異的な凝集との判別に有用であり、偽陽性の低減化に有効であった。

(3) 核酸に選択的なアクリジンオレンジは、水溶液では中性とカチオン性の異なる形態で存在し、その蛍光強度は化学構造に強く依存した。中性アクリジンオレンジは細胞膜を貫通し、細胞内においてカチオン性となる。これらの構造はそれぞれ異なる酸化電位を有することから、カチオン性にのみ着目することで電極上の生細胞数の定量が可能になった。

(4) 抗 O157 抗体を導入したナノ構造体はポリアニリンに特有の電気化学特性を示した。この構造体を標識とした大腸菌 O157 の電気化学検出を試みた。標識に基づく明瞭な電流応答は電極に吸着した大腸菌 O157 の細胞数に強く依存し、単一細胞レベルの検出が可能になった。実試料においても同様に特異的かつ高感度な検出が実現された。

(5) 分子インプリンティングを利用して細胞表面の化学構造に選択的なキャビティを形成した。大腸菌は負のゼータ電位を有することから、導電性ポリピロールをマトリクスとしたキャビティ形成が可能であった。キャビティの形状は血清型によって異なり、キャビティと細胞との結合性は、細胞表面で生じる種々の結合や相互作用により発現することが明らかになった。

以上の諸成果は、細菌の迅速かつ高感度な検出を可能にするものであり、既存法における種々の課題を克服する新しい手法として今後の発展が期待される。また、申請者が自立して研究活動を行うのに十分な能力と学識を有することを証したものである。