

(報道資料提供)

2017 年 11 月 29 日 (水) 14 時 提供

お問い合わせ先
公立大学法人大阪府立大学 工学研究科応用化学分野 准教授、 研究推進機構 LAC-SYS 研究所 副所長 床波志保 理学系研究科物理科学専攻 准教授、 研究推進機構 LAC-SYS 研究所 所長 飯田琢也 Tel: 072-254-9824 e-mail: tokonami [at] chem.osakafu-u.ac.jp t-iida [at] p.s.osakafu-u.ac.jp [at] の部分を@と差し替えてください。

～0157 による食中毒などを未然に防ぐ超迅速検出法の開発に期待～

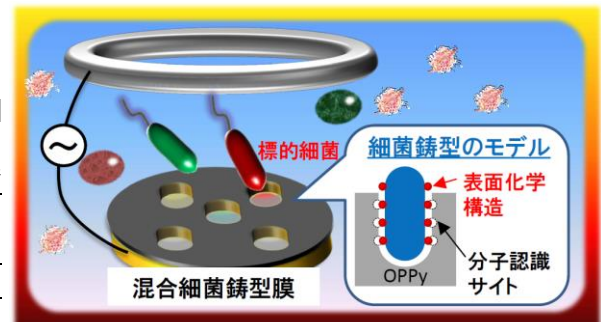
食中毒菌を転写したポリマー膜の高選択・迅速検出のメカニズムを解明

大阪府立大学（学長：辻 洋）LAC-SYS 研究所のチーム（床波 志保 副所長、飯田 琢也 所長、清水恵美 技術補助員、田村 守 特任助教）は、食中毒の原因となる複数種の細菌のナノスケールな表面化学構造をポリマー膜に転写した「混合細菌鑄型膜」の作製に成功し、わずか 5 分以内で食中毒菌を検出し、細菌の種類や 0157、026 といった大腸菌の血清型の違いも識別できる原理を世界に先駆けて解明しました。

研究成果のポイント

1. 複数種類の大腸菌の種類を識別して、わずか 5 分以内で検出することに成功
2. 細菌鑄型膜で選択的に細菌を捉えることができるメカニズムを実験的、理論的に解明
3. 食品中(牛ミンチやレタスなど)の大腸菌群の含有量の大小を推定することに成功

本研究では上述の「混合細菌鑄型膜」に電場をかけて細菌を誘導して選択的にトラップし、膜を設置した水晶振動子の振動数変化から、数分程度の短時間で細菌の含有量と種類を判別することに成功しました。さらに、熱・紫外光・抗生物質など複数手段でダメージを与えた細菌の表面状態の違いを識別できることも示し、細菌表面の糖鎖などの化学構造がポリマー膜に転写されることで、高い選択性が得られることを独自のナノ電磁応答理論で解明しました。



従来の細菌検査などで利用されている蛍光色素を用いた方法や培養法では細菌検出に数日～数週間を要します。しかし、本研究で解明した原理を用いれば、肉や野菜などの一般的な食品中であっても細菌の含有量の違いをわずか 5 分以内に計測できることを示しました。本成果は、物理化学的なアプローチによる細菌や細胞などのミクロンオーダーの生体構造の選択的な検出法の構築へ道を拓くものです。未知の細菌の迅速な同定や検出などに役立つ可能性もあり、食品衛生や医療応用など広範な社会的課題に革新的な手段を提供すると期待されます。

なお、本研究成果は英国 Nature Research の論文誌である『Scientific Reports』にオンライン公開される予定です。

研究論文名： Mechanism in External Field-mediated Trapping of Bacteria Sensitive to Nanoscale Surface Chemical Structure (ナノスケールな表面化学構造に敏感な細菌の外場誘導型トラップのメカニズム)

著者：床波志保^{1,2*}、田村守^{2,3}、清水恵美^{1,2}、飯田琢也^{2,3*}

(¹ 大阪府立大学大学院工学研究科、² 大阪府立大学 LAC-SYS 研究所、

³ 大阪府立大学大学院理学系研究科、)

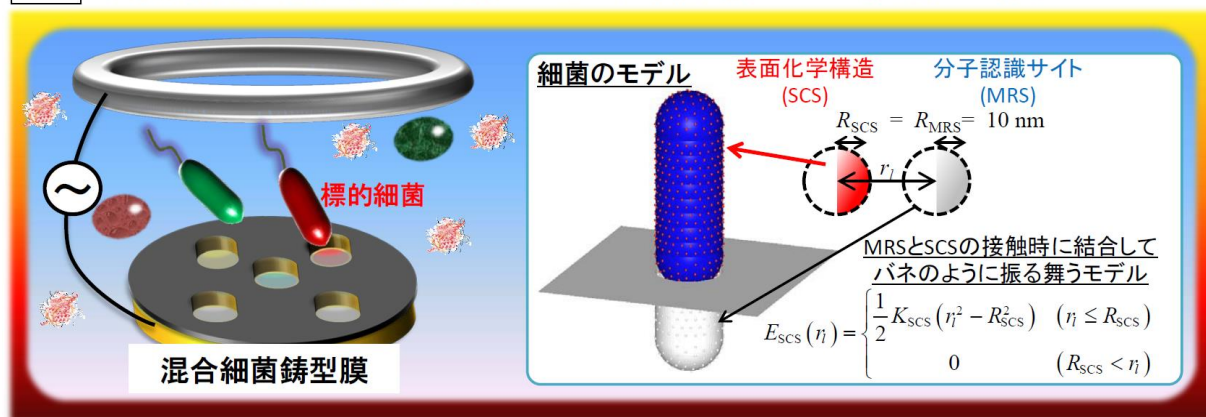
公表雑誌：Scientific Reports (英国 Nature Research の科学論文雑誌)

公表日時：日本時間 2017 年 11 月 30 日(木) 19 時

研究概要

1. 背景

図1 「混合細菌鑄型膜」と低周波電場による迅速・高感度検出法の概念図と理論モデル



21 世紀の人口増加に伴う食糧問題は人類の持続的社会的な発展のための重要課題であり、近年の輸出入の活発化に伴う食の安全保障においても細菌検査の技術は必要不可欠です。また、医療現場においては、院内感染症の因子である細菌を速やかに特定する必要もあり、迅速かつ高感度な細菌検出法の開発が求められています。従来の細菌検出は培養法を基本としていますが、結果が得られるまでに 1～10 日程度を必要とするだけでなく、培地の調製や滅菌処理等の操作が煩雑な場合もあり熟練した知識・技術が要求されます。これらの問題を解決するため、近年では酵素免疫測定法（ELISA 法）や生命体のエネルギー源であるアデノシン三リン酸（ATP）を検出することで間接的に細菌の有無を検出する方法の開発も行われています。しかしながら、細菌の種類までを迅速に特定し、かつ低コスト・コンパクトな検出法はほとんどありませんでした。これらの検査のため、生体由来の化学物質が持つ分子認識機構（解説 1）と呼ばれるメカニズムを利用して、検出対象物質を選択的に検出するバイオセンサに関する研究が盛んに行われています。一例として、抗体を用いた方法は選択性は高いのですが、高価であり特定の菌種にしか利用できないなどの課題がありました。一方、床波らが分子鑄型技術（解説 2）を駆使して開発してきた細菌鑄型膜は、任意の細菌の表面構造をポリマー膜中に転写できるため、多種多様な細菌への応用可能性が期待されていましたが、「複数の細菌を同時検出できるのか？」「どのような仕組みで選択的な検出ができるのか？」などの課題が残されていました。

今回、複数種類の食中毒菌を混合状態で導電性ポリマー膜に同時に取り込んだ「混合細菌鑄型膜」を開発し、誘電泳動法（解説 3）と水晶振動子マイクロバランス (QCM) を組合わせて前者の課題解決に取り組みました（図 1）。さらに、後者の課題である選択的な捕捉の仕組みの解明に関しても、細菌に対して熱処理、紫外線照射、抗生物質投与などの異なる物理化学的ダメージを与えたサンプルを用いた実験を行うと同時に、細菌表面のナノスケールな化学構造をモデル化して飯田らが独自開発したナノ電磁応答理論を適用することで取り組みました。特に、実用化に向けて、汚染の指標となる大腸菌群を鑄型として作成した「混合細菌鑄型膜」で牛ミンチやレタスなどの実際の食品中の細菌検出も試みました。

2. 研究方法

これまでに床波グループが分子鋳型技術をベースとして独自に開発して来た細菌鋳型膜作製法を用いて、複数種類の食中毒菌の表面構造を転写した「混合細菌鋳型膜」を作製して本研究に利用しました。この作製法の流れとしては、カチオン性の導電性ポリマー（**解説4**）であるポリピロール（PPy）と負電荷を持つ細菌との静電相互作用に着目し、ピロール重合時に細菌を取込みます。この細菌を取込んだポリマー膜に対して過酸化処理を施すと、細菌が膜から吐き出され、残った細菌と同程度の大きさの空孔内に細菌の表面化学構造(SCS)が転写され分子認識サイト(MRS)が形成されると考えられます(**図1**の右側、(**解説1**)も参照)。このようにして得られた①細菌鋳型膜と、②誘電泳動法、③水晶振動子マイクロバランス(QCM)測定法を組み合わせ複数種類の食中毒菌の検出を行いました。また、汚染の指標となる大腸菌群を用いて同様の工程で作成した混合細菌鋳型膜により、実際に市販の牛肉やレタスをスタッキング(**解説5**)して抽出した液中に含まれる細菌の検出も行いました。

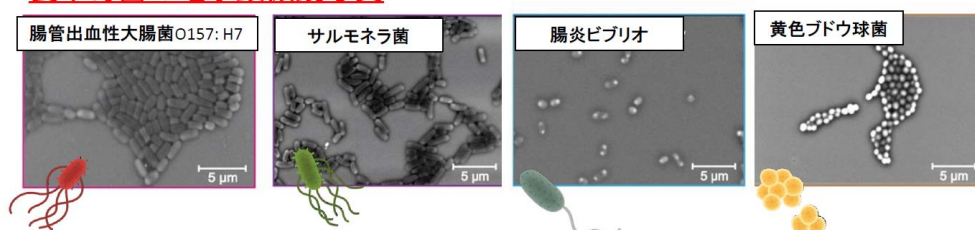
特に腸管出血性大腸菌としてよく知られている O157:H7を対象として、80℃で 20 分間熱処理した場合、波長 254nm の紫外光を殺菌ランプで照射した場合、汎用的な抗生物質であるペニシリン-ストレプトマイシンを投与した場合の 3 種類の方法で表面状態や内部機能を変化させて、元気な細菌で作成した鋳型膜に選択的に捕捉できるかどうかを調べました。

さらに、飯田グループが得意とするナノ電磁応答理論を駆使して、ナノスケールなSCSとMRSの間の結合をバネの伸縮で表現したモデルの下で理論解析を行いました。具体的には、細菌側の SCS の空間配置を様々に変化させて空孔内の MRS の配置とマッチングする場合、ミスマッチの場合の両方で電磁界計算を行い、交流電場の下での細菌の運動も確立的な方法で計算ステップごとにランダムに変化させて評価することで、細菌の表面状態がどのように細菌鋳型膜の選択的捕捉に影響を及ぼすかを調べました。

3. 研究成果

図2 「混合細菌鋳型膜」+誘電泳動+水晶振動子による迅速検出の実験結果

食中毒菌の電子顕微鏡写真



混合鋳型膜の周波数変化(計測時間5分)

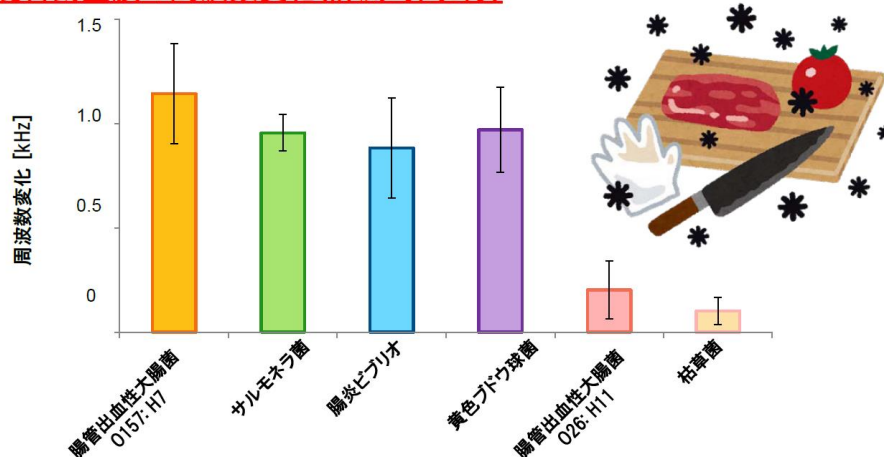
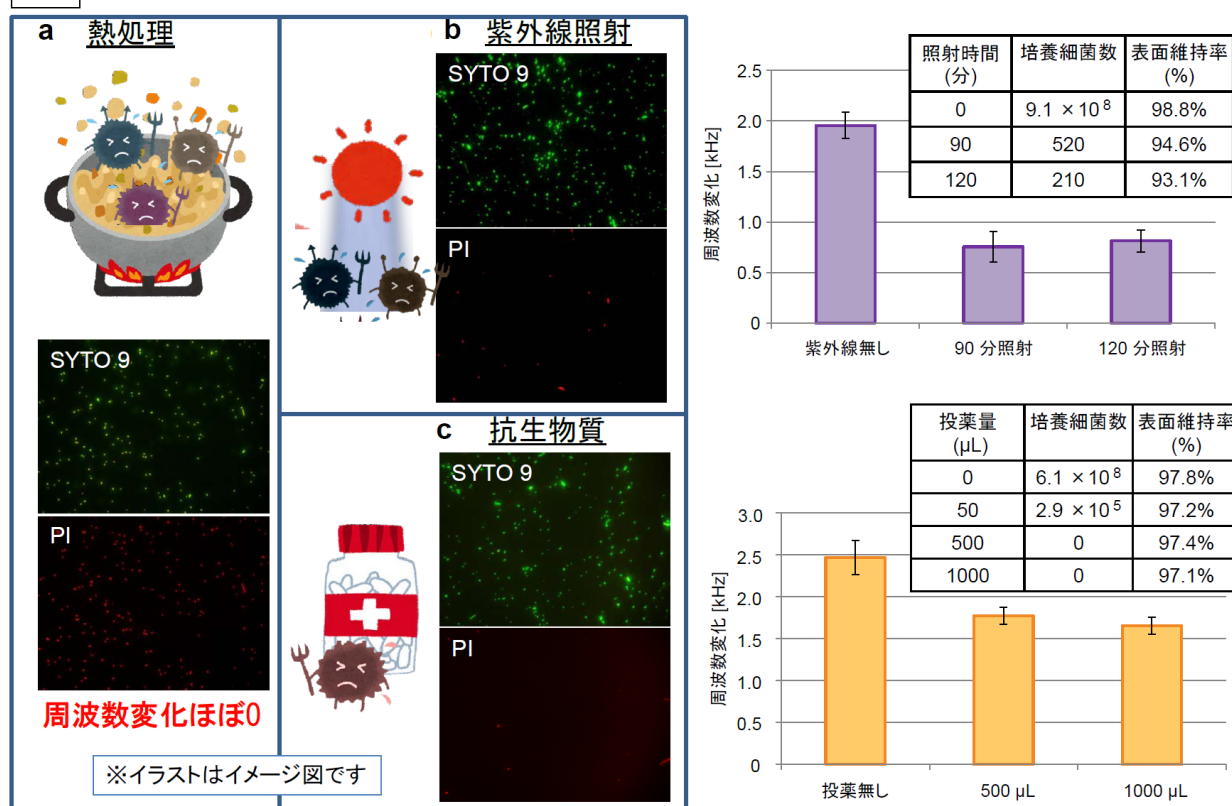


図2に腸管細菌出血性大腸菌 O157: H7 とサルモネラ菌、腸炎ビブリオ、黄色ブドウ球菌の4種類の食中毒菌を用いて作製した混合細菌鋳型膜を用いて、6種類の細菌の検出を試みた結果を示しています。電子顕微鏡写真にあるように、黄色ブドウ球菌以外は桿菌と呼ばれる棒状の構造をしています。いずれも、数マイクロメートル程度のサイズで形状もほぼ同様ですが、個別の細菌を用いて作製した鋳型膜による予備実験では鋳型作製時に用いた細菌のみを滴下した場合だけ、電極の重さが変わって水晶振動子の周波数が変化することを確認しています。実際に、混合細菌鋳型膜を用いた本実験では、鋳型膜作製時に用いなかった枯草菌や腸管出血性大腸菌 O26: H11 を用いた場合には周波数変化が1/10程度となり、明瞭な差異が確認できました。特に、同種の細菌である O157: H7 と O26: H11 であっても、血清型（解説6）の違いを含めて検出できたことは早期治療にもつながるため、画期的な成果であると言えます。

図3 細菌の表面にダメージを与えた場合の評価（緑は全細菌、赤は外膜が損傷した細菌）



さらに、「2. 研究方法」で述べたような3種類の方法で細菌にダメージを与えた場合（**図3**）、熱処理を行った後は細胞膜自体も破壊され、内部の機能も停止していると考えられ細菌鋳型膜作製時に用いた細菌であるにもかかわらず、水晶振動子の周波数はほとんど変化しませんでした。また、培養しても数が増えなかったことから死滅したと考えられます。さらに紫外線照射した場合は赤色に発光しなかったことから、細胞膜は維持されていると考えられますが、照射時間を90分、120分と延ばすと周波数変化が半減することから、SCSの大半がダメージを受けていると推測されます。さらに、培養細菌数も照射時間の増大に伴い大幅に減少していることからほとんどが機能停止したと思われます。また、抗生物質を投与した場合、膜透過性があると報告されている物質が含まれているため、細胞膜はほとんどダメージを受けず、投薬量を増やしても周波数変化がほぼ維持された状態にもかかわらず、培養細菌数だけがほぼゼロに近づいて行く様子が分かります。

図4は理論解析のモデルを示しています。鋳型作製時に用いた細菌と鋳型内の分子認識サイトの空間配置が一致している場合を「マッチング(細菌<A>)」、異なる場合は「ミスマッチ(細菌)」と表記しています。特に、細菌が実験と同じ10メガヘルツの交流電場を印加された時の計算結果を掲載していますが、いずれの場合も電場がオンの場合には膜と垂直方向の電場に平行に細菌が配向して細菌鋳型膜上の空孔内に入ることを確認しました。特に、電場をオフにするとミスマッチの場合は空孔から即座に逃げ出し、一方で、マッチングした場合には電場をオフにした後もSCSとMRSの結合が周囲からの揺らぎよりも強く、長い間トラップされ続けることが分かりました。

図4 ナノ電磁応答理論による解析結果

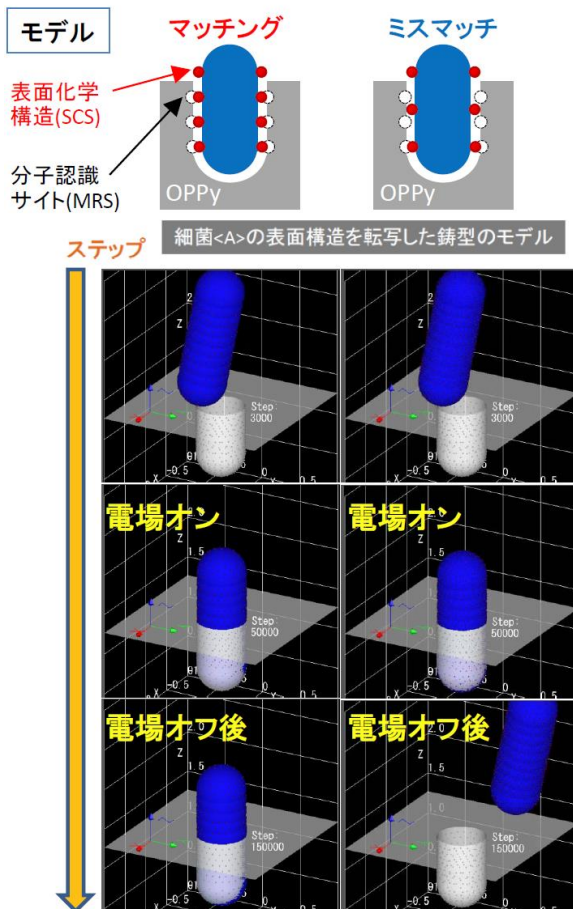
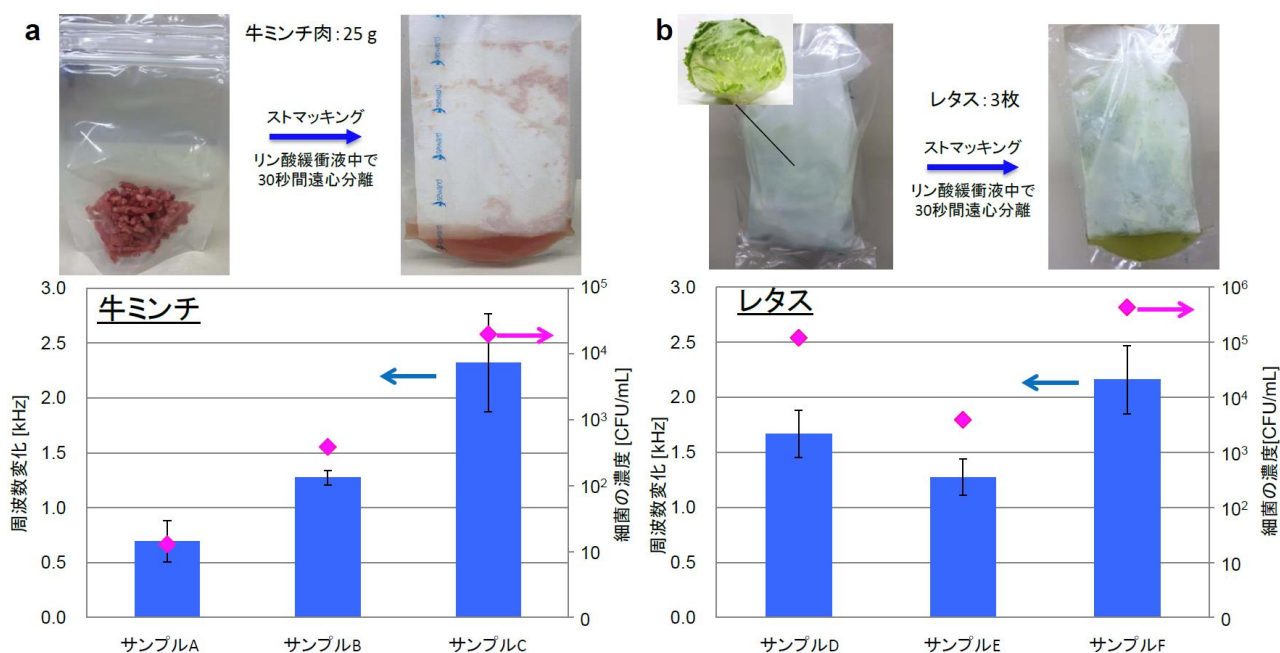


図5は汚染の指標となる大腸菌群を用いて混合細菌鋳型膜を作成し、それを用いて実際の食品に含まれる細菌を検出した結果です。それぞれ管理方法が異なる牛ミンチ肉とレタスからストマッキングで抽出した液体サンプルを混合細菌鋳型膜の表面に滴下し、誘電泳動を行った場合の周波数変化と培養で得られた細菌数を各サンプルごとにプロットしたデータです。それぞれ周波数変化の大小と細菌数の間に相関があることが分かり、10～100匹程度の少量の細菌でもわずか5分で検出できる可能性が明らかとなりました。この成果は高感度かつ迅速な食品検査に役立つ重要な成果と言えます。

図5 食品に含まれる細菌の検出に「混合細菌鋳型膜」を用いた結果



なお、本研究は、生体光物理を専門とする飯田琢也 准教授と分析化学を専門とする床波志保 准教授が共同で研究計画のデザインを行い、その主導の下、清水恵美研究補助員が実験データを取得し、同所属の田村守 特認助教が理論解析の大部分を担当して遂行されました。また、本学工学域 4 回生の西尾まどか氏には実験データの一部の取得の補助を頂き、大阪府立大学生命環境科学研究科三宅眞実教授には細菌の一部(E. coli 0157:H7, and E. coli 026:H11)のご提供を頂きました。

4. 今後への期待

高分子膜中に複数種類の細菌表面の化学構造を転写した「混合細菌鋳型」を開発し、高選択性と迅速性の物理化学的起源を解明し、蛍光色素を用いない簡便・低コストな革新的細菌検出法のブレークスルーの基盤構築に向け大きく飛躍しました。従来法と比較しても、デバイスサイズが 1 円玉程度とコンパクトで、ポータブルに場所を選ばず食品衛生やポイント・オブ・ケア診断、継続的な環境モニタリングにも利用できる画期的な細菌検査法を提供する成果と言えます。さらに、本手法はここで述べた以外の多様な細菌にも利用できる有望な手段となる可能性があり、抗菌薬が効かない多剤耐性緑膿菌やメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）などの迅速検出、病原性ウイルス検出や未知の細菌の検出などへの応用も期待できます。これらの成果は食の安全保障の観点から、21 世紀の超スマート社会のプラットフォーム構築に新機軸を提供し得るものです。

今後の課題として、開発した混合細菌鋳型膜を利用してより少ない数の細菌の検出を行うための条件探索や、量子化学的アプローチによる表面化学構造と分子認識サイトの結合プロセスの詳細な機構の解明、細菌を「生きたまま（機能を保持したまま）」高密度かつ選択的にトラップするための継続的な技術開発が必要不可欠と考えられます。

5. 研究助成資金等

本研究は、大阪府立大学キーププロジェクト、日本学術振興会 科学研究費補助金基盤研究（B）（No. 15H03010）、科研費基盤研究（A）（17H00856）、キヤノン財団、特別研究員奨励費（No. 14J08760）、および新学術領域(提案型)「光圧によるナノ物質操作と秩序の創生」（No. 16H06507, No. 16H06505）、その他の支援を受けて完成しました。

6. 用語解説

解説 1：分子認識機構：例えば、水素結合、金属配位相互作用、疎水性力、分子間力、 $\pi-\pi$ 相互作用、ハロゲン結合、静電気力などの非共有結合的な比較的弱い相互作用によって、ホスト分子（本研究の鋳型膜を構成する OPPY に相当）およびゲスト分子（本研究のターゲットとなる細菌の「表面化学構造(SCS)」に相当）が高い相補性を示して選択的に結合する機構のことを指します。特に、鋳型膜上に形成された細菌と同程度の大きさの空孔内において、SCS の情報が転写された多数のナノスケールな化学構造を「分子認識サイト(MRS)」と我々は呼んでいます。生命活動において重要となる DNA や RNA などの核酸のハイブリダイゼーションや、タンパク質に関する抗原-抗体反応などが挙げられ「鍵と鍵穴モデル」でしばしば説明されます。このような性質を利用してプローブとなるホスト分子をあらかじめ仕掛けることでターゲット

トとなるゲスト分子との特異的な（選択的な）結合過程を電氣的、光学的な信号の変化を通じて検出できるため、分子認識機構は生体関連物質を検出する様々なタイプのバイオセンサ技術に利用されています。

解説 2：分子鑄型技術：分子鑄型技術は、非共有結合や可逆的共有結合による鑄型重合法の一つで、鑄型分子との相互作用を形成する機能性ポリマーを用いて高分子内にターゲット分子の鑄型を作り、鑄型分子の形状や化学的性質を高分子内に記憶させるものです。鑄型となる分子を中心にして対応する結合部位が形成され、抗体などの生体分子を使わないことから、熱や圧力、pH に対しても安定であり、様々な分析方法を使用できるという利点があります。

解説 3：誘電泳動法：溶液中に存在する粒子に外部から電場を与えると、溶液と粒子の界面に電荷が誘起されます。その生じる電荷量はそれぞれの溶媒と粒子の分極のしやすさ、すなわち物質固有の誘電率に依存し、この相違により双極子モーメントが誘起されます。均一な電場を印加した場合、粒子を挟んで左右に形成される電場強度は同じであるため、粒子に働く力は打ち消し合うため、粒子に駆動力は生じません。一方、不均一な電場を印加した場合、粒子を挟んで左右に形成される電場強度に差が生じます。このため、粒子に働く力に差が生じ、粒子に駆動力が発生します。この現象が誘電泳動です。

解説 4：導電性ポリマー：

一般的な高分子（ポリマー）は絶縁体です。これはポリマーを構成する分子の結合が σ 結合であり、この σ 電子は容易に励起、移動しないためです。これに対して、ポリアセチレンのように π 電子が高分子の鎖全体に広がった構造を示す共役ポリマーは、金属などを添加しなくても導電性を示します。この導電性ポリマーは、金属に比べて原材料が安価であり、軽く、加工性にも優れており幅広い応用研究が行われています。導電性ポリマーには、ポリピロール、ポリチオフェン、ポリアニリンなどがあり、これらの重合は電解重合法および化学重合法により行われます。

解説 5：ストマッキング：食品衛生検査を行う際の前処理方法の 1 つであり、食品サンプルから微生物を抽出する方法です。食品サンプルを破碎することにより食品内部からも微生物を抽出することでサンプル中の正確な微生物検出を可能にします。

解説 6：血清型：細菌などの細胞表面の抗原の構造に基づいて細菌の種類を細分化する際に用いられ、各々の抗血清（抗原に対する抗体を含む血清）に対応した型を血清型と言います。例えば大腸菌の場合、O 抗原（菌体）、K 抗原（莢膜）、H 抗原（鞭毛）の組み合わせに基づいて血清型別を行います。