

いつでも、どこでも、だれでも簡単に細菌を検出可能

ナノラズベリーを用いた標的細菌1個の高感度検出に成功！

安心・安全で豊かな社会の形成に貢献

公立大学法人大阪府立大学（理事長：辻 洋）の大学院工学研究科 博士後期課程 2 年 Dung Nguyen、石木健吾、椎木 弘准教授らの研究グループは、ラズベリー状ナノ構造体の電気化学特性を利用して標的細菌の検出に成功しました。本研究により、標的細菌を細胞 1 個から検出することが可能になりました。

■本開発のポイント■

電気化学的に活性な標識の開発により、

- ・細胞 1 個を電気化学的に検出（高感度検出）
- ・1 個から 10 万個の細胞の定量が可能
- ・共存細胞の応答ナシ（特異検出）
- ・自発結合による迅速検出（1 時間以内）
- ・検出手順が簡単
- ・装置の小型化が容易

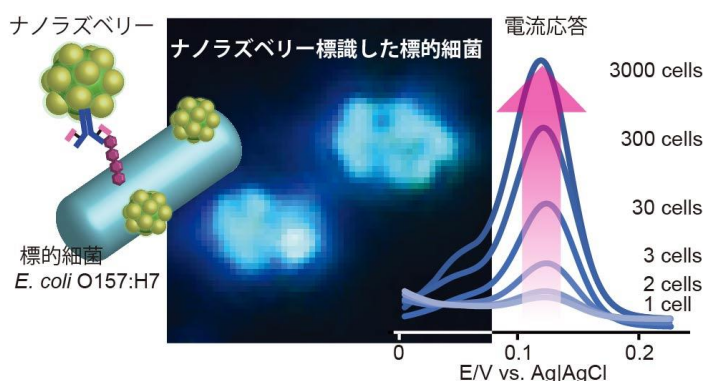


図 標的細胞の標識化と標識の電流応答による定量

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においてその重要性が増しています。本研究では、特徴的な電気化学特性をもつ標識を作製し、電極に吸着した細菌を標識することで、特異かつ高感度な細菌検出を達成しました。

本研究で標識として用いたラズベリー状ナノ構造体は、金ナノ粒子（解説 1）と導電性ポリアニリン（解説 2）からなっており、その構造に特徴的な光学特性と電気化学特性を有しています。このナノラズベリー（解説 3）に抗体を導入することで標的細菌を特異的に標識することができます。ナノラズベリーの電気化学特性に着目することで電極に吸着した細胞 1 個を高感度に検出することが可能になりました。

細菌を含む試料溶液 1 滴を電極に滴下して乾燥させた後、この電極をナノラズベリー分散液に浸漬します。その後、この電極を用いて電気化学測定を行うと、標的細菌に結合したナノラズベリーに基づく電流応答が得られるもので、迅速（1 時間以内）かつ高感度な測定が可能となります。本法では、試料溶液に含まれる他の共存細菌には全く応答が見られず、標的細菌のみを検出することができます。また、電気化学方式は装置の小型化が容易であるため、いつでも、どこで、だれでも簡単に使えるポータブル電気化学センサ（解説 4）が作製できます。このような開発によって、医療、創薬、公衆衛生や食の安心安全の確保、機能性食品の安定供給や品質管理など、様々な用途において、個人、事業所レベルでの自主管理が可能になり、安心・安全で豊かな社会の形成に貢献できます。今後、種々の標的に対応可能なナノ構造体や電極の開発により、実用化を目指します。

本論文は Springer Nature 社「*Microchimica Acta*」オンライン版で 2018 年 9 月 17 日に公開されました。

【研究に関するお問い合わせ】 公立大学法人大阪府立大学

工学研究科 准教授 椎木 弘

Email shii [at] chem.osakafu-u.ac.jp [at] の部分を@と差し替えてください。

背景

細菌は生態系の形成に不可欠な構成要素であり、環境浄化や有機栽培、機能性食品など私たちが豊かな生活を営む上で重要な役割を果たしています。一方、一部の細菌は感染症や食中毒の要因となり、人体に悪影響を及ぼします。したがって、感染症や食中毒の被害拡散の抑制や製造プロセスにおける品質管理などをはじめとする様々な用途において、いつでも、どこでも、だれでも簡単に細菌を検出できる手法の開発が必要です。細菌の検出には、特別な装置が必要なく、簡単に検出できるシート状培地を用いた計数が広く用いられています。しかし、24 時間以上の培養時間を要し、被検試料数や標的の種類に応じて培地を用意する必要があります。そこで、抗原抗体アッセイ、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) など非培養ベースの検出法が利用されています。しかし、これらの手法は、操作が煩雑で人的リソースの確保を要します。ポリマーゼ連鎖反応 (PCR) 法では遺伝子情報に基づいた高精度な細菌の特定が可能であり、近年では迅速な検出が可能となっていますが、装置が大きく、種々の現場における細菌の検出には課題があります。そこで、本研究グループでは、装置の小型化が容易である電気化学方式に着目し、標的細菌の検出に関する検討を行ってきました。

研究内容と成果

本研究で開発したナノ構造体は、多数の金ナノ粒子 (粒径 10 nm) が導電性高分子ポリアニリンに内包されたラズベリー状の構造を有しており、その粒径は 100 nm 程度です (図 1)。このナノラズベリーは金ナノ粒子が密に集合した構造に基づく特徴的な光学特性とともにポリアニリンの電気化学特性を有するユニークな材料です。また、ポリアニリンのアミノ基との結合により、ナノラズベリーの表面には特定細菌に特異結合する抗体を導入することができます。本研究では、大腸菌 0157 を標的とし、抗 0157 抗体をナノラズベリーに導入しました。この抗 0157 抗体導入ナノラズベリーを用いた標的細菌の検出手順は次のようになります (図 2)。

面積を規制した電極 (3 mm²) に各種細菌を含む試料溶液 (3 μL) を滴下し、乾燥させることで電極に細菌を吸着させます。次に、この電極をナノラズベリー分散液に 10 分間浸漬します。電極を取り出し、電解液中で微分パルスボルタンメトリ (解説 5) を行うと、標的細胞に結合したナノラズベリーに基づく電流応答が得られます。これらの操作 (1 時間以内) により試料溶液に含まれる標的細菌を高感度に検出することができます。

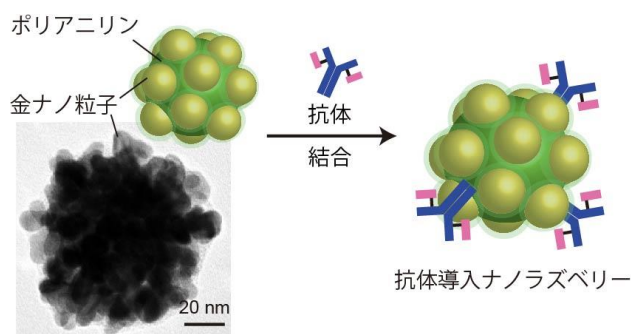


図 1 ナノラズベリーへの抗体導入

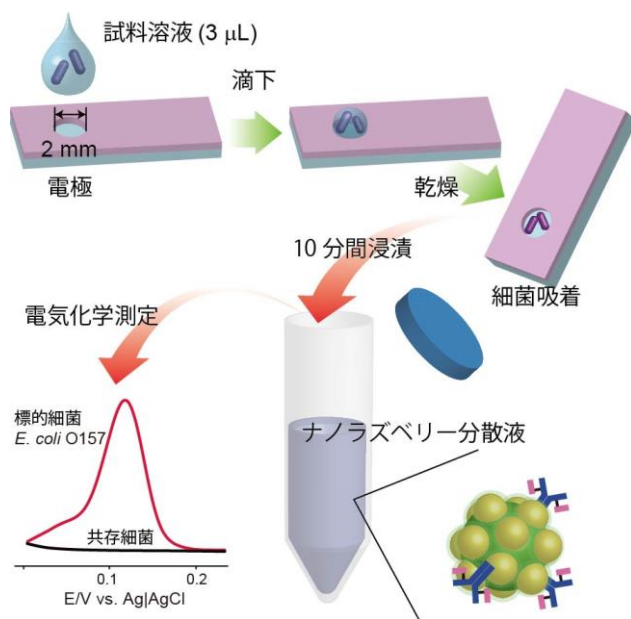


図 2 測定手順

細菌が吸着した電極を抗体導入ナノラズベリー分散液に浸漬した後、暗視野顕微鏡（解説 6）により観察したところ、ナノラズベリーは対応する標的細菌（大腸菌 O157）にのみ結合し、ナノラズベリーの特徴的な光散乱特性に基づいた高感度な観察が可能になりました（図 3A）。この電極を用いて微分パルスボルタンメトリを行うと、ナノラズベリーに基づく電流応答が得られました。一方、標的以外の細菌では全く電流応答が見られませんでした（図 3B）。本法が非常に高い選択性を有することが明らかになりました。

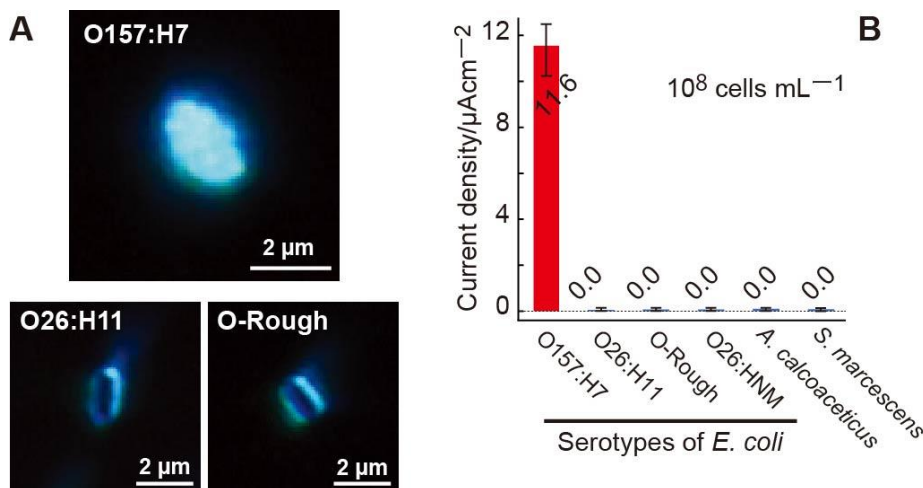


図 3 抗体導入ナノラズベリーの細菌への結合性 (A), 選択性 (B)

細菌は電極に非特異的に吸着します（図 4A）。したがって、試料溶液に標的以外の細菌が含まれる場合、それらはすべて電極表面に吸着します。通常、細菌は絶縁体として取り扱うことができるため、細菌が電極に吸着しただけでは電流応答は得られません。細菌が吸着した電極を抗体導入ナノラズベリー分散液に浸漬すると、ナノラズベリーが標的細菌にのみ結合します。標的細菌に結合したナノラズベリーにより生じる電流応答を計測することで、標的細菌を高選択的に、高感度に検出することが可能になります。このときの電流応答は、試料溶液に含まれる標的細菌の密度（ $3 \times 10^2 \sim 1 \times 10^8$ 細胞 mL⁻¹）に強く依存しました（図 4B）。

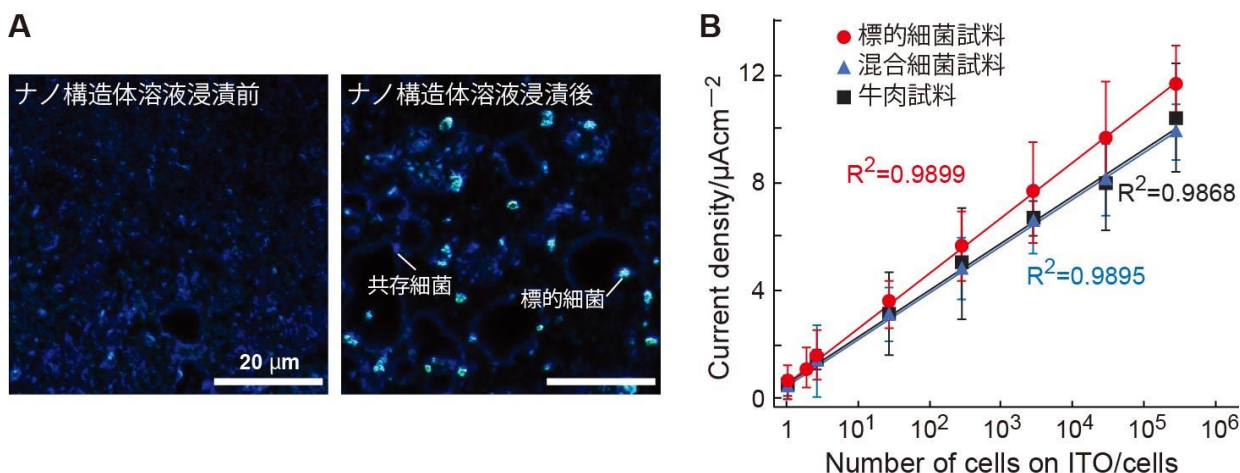


図 4 電極に吸着した細菌の暗視野顕微鏡像 (A) と電流応答の細菌吸着数依存性 (B)

さらに、血清型の異なる他の大腸菌やセラチア菌、アシネトバクターなどの混合細菌試料、あるいは牛肉を腐らせて調製した試料に含まれる標的細菌（大腸菌 0157）の定量にも成功しました。

暗視野顕微鏡観察により、実際に電極表面に吸着した標的細菌細胞数を調べました。すると、試料溶液の細菌密度が 3×10^2 細胞 mL^{-1} のとき、電極に吸着した細菌細胞は1個でした。したがって、ナノラズベリーを用いた標識化によって、細胞1個の検出が実現されたわけです。混合細菌試料や牛肉試料においても、試料中に含まれる標的の細胞1個を検出することが可能でした。

本成果によって、いつでも、どこで、だれでも使用できる小型センサを開発することが可能となり、様々な場面において、簡単に細菌を検出することが可能になります。今後、種々の標的に対応可能なナノ構造体や電極の開発により、実用化を目指します。

本開発の特徴と効果

- ・細胞1個を電気化学的に検出することができる（高感度検出）。
- ・1個から10万個の細胞の定量が可能です。
- ・共存細胞の影響を受けません（特異検出）。
- ・自発結合により迅速検出が可能です（1時間以内）。
- ・試料採取から検出までの手順が簡単です。
- ・電気化学方式なので装置の小型化が容易です。

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）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で、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利用され、近年では、インフルエンザや妊娠検査キットの標識として利用されています。

（解説2）ポリアニリン：導電性高分子の一つで、白川秀樹博士（筑波大学名誉教授）とともにノーベル化学賞を受賞した A. G. MacDiarmid 博士や A. J. Heeger 博士らによって見出されました。酸化状態やドーピングレベルに基づいて共役 π 電子系が高分子鎖に沿って形成され、導電性が発現します。

（解説3）ナノラズベリー：金イオン (Au^{3+}) をアニリンで還元すると、金ナノ粒子が生成するとともにアニリンは酸化されポリアニリンとなります。本研究グループが世界で初めて作製に成功したナノ構造体のことで、その形状に因んでナノラズベリーと命名しました (Chem. Commun.、2006、4288-4290)。

（解説4）電気化学センサ：電極での物質の化学反応により生じる電流応答を利用する方式のセンサのことです。電気信号は信号変換が容易であるため、測定値を直ちに表示できるなど、デバイスの小型を可能にします。血糖自己測定に使用する携帯型血糖値計のほとんどは電気化学方式を採用しています。

（解説 5）微分パルスボルタンメトリ：電気化学測定法の一つであり、時間幅の小さいパルス状の電位を印加し、基底電位を変化させることで、充電電流を低減することが可能です。したがって、目的の化学反応により得られる電流応答を高感度に取得する有用な測定テクニックとして利用されています。

（解説 6）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です。光学顕微鏡では理論分解能（200 nm）以下の観察は不可能ですが、散乱光に着目することで微小試料や微細構造の観察が可能となります。

発表論文

論文名：Single cell immunodetection of *Escherichia coli* 0157:H7 on an indium-tin-oxide electrode by using an electrochemical label with an organic-inorganic nanostructure

著者名：Dung Quang Nguyen、Kengo Ishiki、Hiroshi Shiigi

掲載誌：*Microchimica Acta* (Springer Nature)

<https://doi.org/10.1007/s00604-018-3001-5>