

令和元年6月19日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04137

研究課題名(和文) 分子鑄型ハイブリッドによる光アンテナ形成に基づいた単一細菌検出

研究課題名(英文) Single bacterial cell detection based on optical antenna formation using molecularly imprinted hybrid

研究代表者

椎木 弘 (Shiigi, Hiroshi)

大阪府立大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70335769

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：温度感応性ポリマーによってカプセル化された金ナノ粒子集合体のワンステップ合成に成功した。ポリマーの温度依存性を利用して0157抗原の分子鑄型をハイブリッド表面に形成した。ハイブリッドは298Kで大腸菌0157に結合し、金ナノ粒子の光学的性質により細胞の光散乱強度を増強したが、313Kでは抗体機能の発現は見られなかった。このハイブリッドは026や0 Roughなどの他の血清型の大腸菌に対しても優れた選択性(> 15)を示した。ハイブリッドの結合能力は温度によって可逆的に制御可能であった。この技術は標的細菌の検出だけでなく、新たな細菌の脅威の同定にも適用可能である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発したハイブリッドは分子鑄型に対応する化学構造と自発結合して細菌表面で光アンテナとして機能するため、微量細菌をワンステップで標識できる。したがって、集団食中毒が発生した際、'その場'で'即座'に危害要因を特定でき、早期の段階で被害拡散の抑制が達成できる。他の危害要因として考えられる細菌やウイルスなどへの展開が可能であるだけでなく、エボラ出血熱や新型インフルエンザなど、新たに生じる微生物脅威への迅速な対応が容易である特色を持つ。したがって、様々な危害要因の早期発見に基づいた被害拡散と社会混乱の抑制が期待されるなど、社会的に意義のある研究である。

研究成果の概要(英文)：Nanometer-sized composite particles, which consisted of gold nanoparticles encapsulated by an N-isopropylacrylamide copolymer, were successfully synthesized using a one-step process. Shape complementary cavities of the 0157-antigen were formed on the composite utilizing temperature-dependent affinity changes of the copolymer. The composite bound to enterohemorrhagic Escherichia coli 0157 at 298 K and enhanced light-scattering intensity of the cell due to the optical properties of the gold nanoparticles. Moreover, the composite showed excellent selectivity (>15) against other types of E. coli such as 026 and 0 Rough. Recognition of the 0157-antigen ceased upon heating to 313 K, but was restored upon cooling to 298 K. The binding ability of the composite could be switched reversibly. This technique is applicable not only for the detection of a target bacterium but also for an identification of new bacterial threats by the simple formation of the specific antigen-imprinted composite.

研究分野：バイオ分析

キーワード：分子インプリンティング 形状記憶 単一細胞検出 光アンテナ バイオ分析 ナノ構造体 暗視野顕微鏡 電気化学

1. 研究開始当初の背景

集団食中毒や流行性感染症などの被害拡散を抑制するためには、危害要因となる病原性細菌の迅速な検出が必要である。集団食中毒の危害要因である細菌の検出は食品衛生法の規格基準に基づき公定法により行われている。近年では、乾式培地を用いた簡易法や酵素免疫 (ELISA) 法、ポリマーゼ連鎖反応 (PCR) 法を利用した検出法が開発されている。これらの検出における操作性や感度の向上に関する検討が進んでいるが、細菌の生物機能を利用するものであるため、分離や濃縮に加え、選択、増菌培養などを要し、検出に至るまでに多くの工程と時間 (最低数日) を要する。したがって、集団食中毒の発生により特定食品の摂取に対して生じる「食への不安」が拡大し、消費者だけでなく生産者に至るまで大きな社会混乱を招く。危害要因の迅速な特定が可能になれば早期の「食の安全確保」が速やかな「食の安心」をもたらす、食中毒発生による社会混乱を最小限に抑制することができる。このような背景から、速やかな「食の安全確保」のために科学的根拠に基づいた迅速な検出法の開発が強く求められている。迅速な危害要因の特定のためには、試料に微量に含まれる特定細菌を直接検出する手法の開発が必要である。そこで、本研究では、相補的な形状と化学的相互作用に基づいて優れた認識能を発現する分子鑄型の開発と、それを用いた迅速検出法の開発を行った。

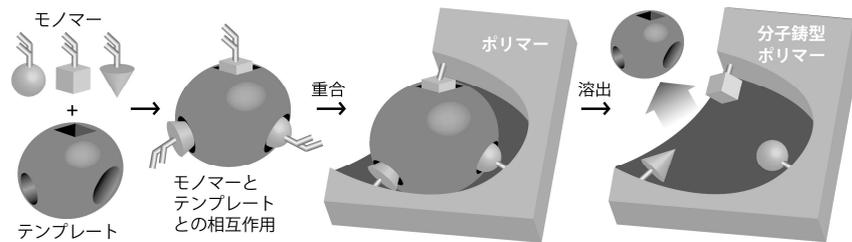


図1 分子鑄型の形成工程

分子鑄型法 (図 1) は、目的物質をテンプレートとして重合反応中に共存させ、テンプレートに選択性のある結合部位をポリマーに構築する方法である。テンプレートの溶出により鑄型が形成されるため、様々な目的物質に対してテーラーメイドできる技術的特徴を有する。さらに、目的物質の化学構造と相互作用する官能基の配置により優れた分子認識能を発現する。このようにして形成された分子鑄型は、目的物質の分子構造に基づいた結合部位を持ち、優れた分子認識能を示した。この技術を細菌細胞に応用し、大腸菌 (*E. coli*) の鑄型形成について検討した。*E. coli* O157 鑄型は *E. coli* O157 細胞を認識し、緑膿菌や黄色ブドウ球菌のみならず、異なる血清型の *E. coli* (O26, O111 など) を識別したことから、サイズや形状だけでなく、細菌表面の複雑な化学構造 (図 2A) を認識する高精度な鑄型の形成が明らかになった。このことは、細菌の表面構造に着目することで、生物機能によらない迅速な検出が可能になることを示す。

光学顕微鏡の理論分解能 (~200 nm) 以下のサイズを持つ金属ナノ粒子を明視野で直接観察することは不可能であるが、局在表面プラズモン共鳴 (LSPR) に基づく散乱光は容易に暗視野観察できる。さらに、複数の金属ナノ粒子が隣接して LSPR がカップリングすることで強い散乱光を生じる。したがって、金属ナノ粒子が細菌表面に選択的に集すれば高感度な光アンテナとして機能し、単一細菌の検出が可能になる。

以上のことから、金属ナノ粒子の集合体を分子鑄型ポリマーでカプセル化することを着想した (図 2B)。この分子鑄型ハイブリッドが細菌表面の特定化学種と特異結合し、高感度な光アンテナとして機能することで細菌のワンステップ検出が可能になる。

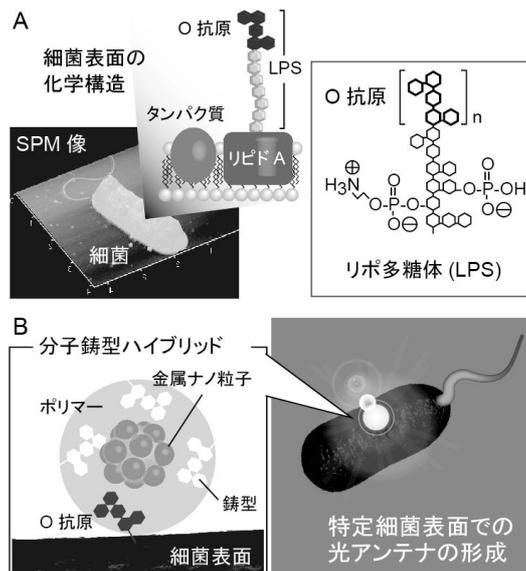


図2 (A)細菌表面の化学構造と、(B)分子鑄型ハイブリッドの特異結合に基づいた細菌表面での光アンテナ形成の概念

2. 研究の目的

本研究は、分子鑄型ハイブリッドを用いて細菌表面の化学構造に基づいた光アンテナを形成することで、試料中に存在する微量細菌のワンステップ検出を目指すものである。光学特性向上の観点から金属ナノ粒子の集合化、および金属ナノ粒子集合体の分子鑄型ポリマーでのカプセル化について検討し、優れた光散乱特性と特異結合性を併せ持つハイブリッドの形成を目的とした。ハイブリッドの特異結合に基づいた光アンテナ形成による迅速な細菌検出を試みた。

3. 研究の方法

金属ナノ粒子が示す特徴的な光散乱特性と高いコントラストでの光学観察が可能な暗視野観察法とを組み合わせることで、食中毒の危害要因である *E.coli* O157 をターゲットとした新しい分析法の開発を目指し、

- 1) 金属ナノ粒子集合体の作製：金属ナノ粒子の集合化に伴う光散乱特性向上について検討
- 2) 特定化学種の分子鑄型形成：細菌表面に存在する特定化学種の分子鑄型形成と評価
- 3) 分子鑄型ハイブリッドの形成：金属ナノ粒子集合体を内包した分子鑄型ポリマーの形成
- 4) 光アンテナ形成によるワンステップ検出：選択性や感度の向上について検討

以上の項目について取り組み、最終的に高感度で迅速な細菌検出を目指した。

4. 研究成果

光学顕微鏡において理論分解能以下のサイズを持つ単一ナノ粒子の明視野での直接観察は不可能であるが、局在表面プラズモン共鳴 (LSPR) に基づく散乱光は容易に暗視野観察できる。これは、金属種や粒径に応じた LSPR の発現により、金属ナノ粒子が特定波長の光を吸収し、散乱光を生じるためである。したがって、金属ナノ粒子の集合化により広い波長域での吸収が可能になり、散乱光が飛躍的に増強される。そこで、金属ナノ粒子の集合化による光散乱特性の向上について検討した。その際、金属種として化学安定性の高い金を用いて検討を行った。分子鑄型形成のためのマトリクスポリマーとしてポリアニリン、ポリピロールや *N*-イソプロピルアクリルアミドなどを用いた。金ナノ粒子をポリアニリンでカプセル化した構造体を形成した。この構造体は単一粒子の 10 倍以上の散乱強度を示した (図 3A)。これは、集合化により広い波長域の光を吸収することが可能になるためで、それに伴って散乱強度が増大するものである。ポリアニリンは電圧印加や溶液の液性によって構造変化することが知られている。アルカリ水溶液中でこの構造体进行处理したところ、ポリアニリンは過酸化によって分解反応が進行し、分子鑄型の形成が困難であった。そこで、この構造体に特異結合性を付与する目的で O157 抗体を共有結合により導入した (図 3B)。抗体導入した構造体は、抗原抗体反応によって *E.coli* O157 に特異的に結合し、細胞の光散乱強度を著しく増大した (図 3C)。この結果により、金ナノ粒子集合体を特異結合を介して細胞表面に配置することで、光アンテナとしての機能を利用した細菌検出の可能性が示唆された。また、ポリアニリンは特徴的な電気化学特性を有することから、電気化学検出の可能性についても検討した。面積を規制した電極に各種細菌を含む試料溶液を滴下し、乾燥させることで電極に細菌を吸着させ、金ナノ粒子集合体分散液に 10 分間浸漬した。この電極を用いて微分パルスボルタメトリを行うと、細胞に結合した構造体に基づく電流応答が得られた。電流応答は電極に吸着した細胞数に応じて増大した (図 4)。構造

体は非常に大きな電流応答を示し、構造体の結合によって 1 細胞の検出が可能であった。一方、標的以外の細菌では全く電流応答が見られず、特異的な検出が可能であった。これらの一連の操作は 1 時間以内で達成された。

ポリアニリンに代わり分子鑄型形成に有用なポリマーを選定した。ポリピロールはポリアニリン同様、電圧印加や溶液の液性によって構造変化する。アルカリ水溶液中での過酸化処理によって構造変化し、標的分子の溶出と共に鑄型の形成が可能であった。また、温度感応性の NIPAm を用いた分子鑄型の形成も可能であった。これらのポリマーは pH や温度などの刺激により構造が変化することから、分子鑄型形成に有用であった。そこで、テンプレートとして O157

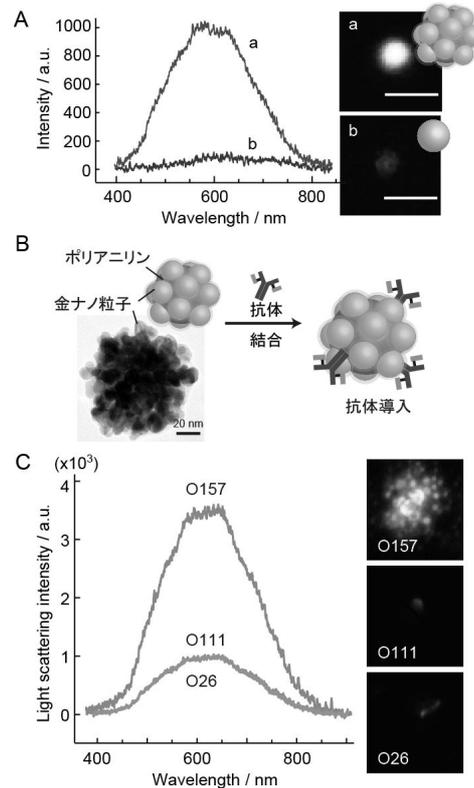


図3 (A) 金ナノ粒子の集合体 (a) および単一粒子 (b) の光散乱スペクトルと暗視野顕微鏡像, (B) 金ナノ粒子集合体への抗体導入, (C) O157 抗体導入集合体で標識した *E. coli* の光散乱強度と暗視野像

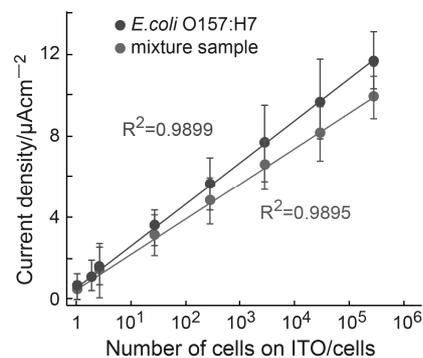


図4 電流応答の細菌吸着数依存性

抗原を用い、NIPAmを構成する各種モノマーを含む重合反応溶液に金イオンを加えた。金ナノ粒子とポリマーの同時形成によるハイブリッドのワンステップ形成が可能であった。これは、金イオンがモノマーを酸化するとともに自身は還元されることを利用するもので、ポリマーと金ナノ粒子が同時に形成され、金ナノ粒子の集合体がポリマーにカプセル化された構造体を得られた。O157 抗原の鑄型は、ポリマー骨格を形成するモノマーとして NIPAm を用いた共重合体をマトリクスとして形成される。モノマー溶液に、金イオンとテンプレート物質として *E. coli* O157 から抽出した LPS を添加した。この溶液に開始剤を加えると重合が進行し、反応溶液は金ナノ粒子の生成を示す赤色に変化した。TEM 観察によると、粒径 100 nm 程度のポリマー粒子の中心部に金ナノ粒子の集合体が観察された (図 5a)。重合反応において金イオンは酸化剤として機能し、自らは還元されることで金ナノ粒子が生成されたものと推察される。また、暗視野顕微鏡によりハイブリッドの光散乱強度を測定したところ、金ナノ粒子の存在により 4 倍程度増強することが確認された (図 5b)。また、NIPAm の相転移温度におけるハイブリッド粒子の色の变化についてスペクトル測定により調べた (図 5c)。室温 (298K) では、金ナノ粒子の分散液と同様、530 nm に金ナノ粒子に特徴的な吸収が観察された。ハイブリッド分散液の温度を 313K まで加温すると分散液は白濁した。白濁によるバックグラウンドの増大がみられたが、金ナノ粒子に基づく吸収強度に変化はみられなかった。再度、室温まで降温したところ元のスペクトルと一致した。つまり、相転移によって LPS テンプレートがポリマーより吐き出される過程 (図 5d) で、ハイブリッド中の金ナノ粒子が安定して存在することが明らかになった。このハイブリッドと *E. coli* O157 の混合分散液をガラススライド上に滴下し、室温において暗視野観察した (図 6)。 *E. coli* O157 はぼんやりとしたロッド状の光スポットとして観察された。これは、細胞内の水 (誘電率 1.3) と周囲空気 (誘電率 1.0) との間に生じる屈折率が小さいためである。しかしながら、ハイブリッドが結合した細胞は、強い散乱光を生じ明確な光スポットとして観察された。これは、ハイブリッド中の金ナノ粒子に基づいて生じるものであり、ハイブリッドを標識とした単一細胞の高感度計測が可能になった。さらに、このハイブリッドの選択的結合性についても評価した。血清型の異なる *E. coli* (O26, O-rough) を用いて同様の実験を行った (図 7)。各種大腸菌懸濁液にハイブリッドを添加して暗視野観察したところ、*E. coli* O157 は強い散乱スポットとして観察されたのに対し、*E. coli* O26 や O-rough は弱い光スポットとして観察された。このように、ハイブリッドは表面に形成された O157 抗原の分子鑄型によって、細胞表面の O 抗原、つまり糖配列を正確に識別することが示された。さらに、*E. coli* O157 細胞表面に特異結合した複数のハイブリッドは細胞の光散乱強度を高め、600 nm における強度 (I) は、ハイブリッドの結合していない細胞 (I_0) の 4 倍程度 ($=I/I_0$) となった。他の血清型では、ハイブリッドは結合しないため、光散乱強度に変化はみられず、細胞のサイズのばらつきに対応した $\pm 10\%$ ($0.2 = I/I_0$) の誤差がみられるのみであった。つまり、ハイブリッドは細胞表面に非特異吸着することなく *E. coli* O157 を標識し、15 倍以上の選択性を示すことが明らかになった。

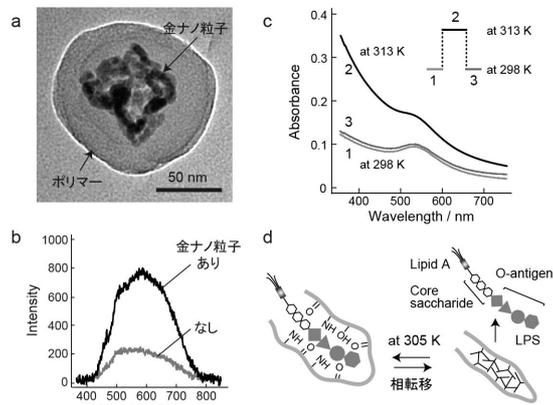


図 5 ハイブリッド粒子の TEM 像 (a) と光散乱スペクトル (b)、および吸収スペクトルの温度依存性 (c) とポリマー相転移の概念図 (d)

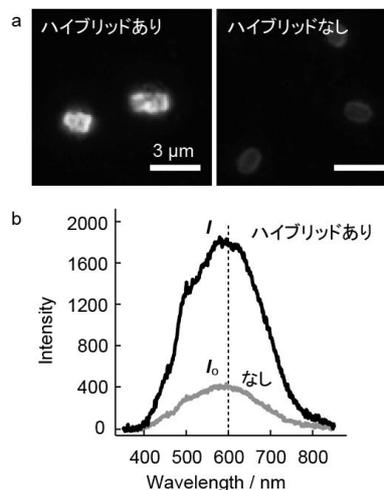


図 6 *E. coli* O157 の暗視野像 (a) と散乱スペクトル (b)

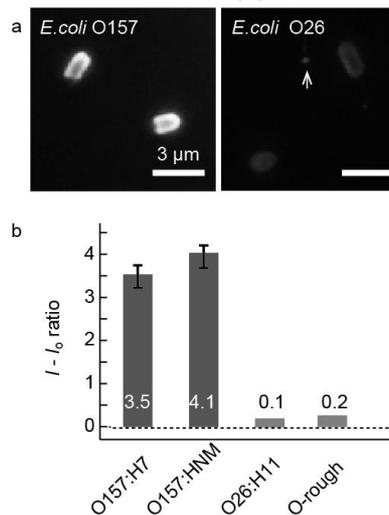


図 7 各種 *E. coli* の暗視野像 (a) と散乱強度に基づいた選択性の評価 (b)

各種大腸菌懸濁液にハイブリッドを添加して暗視野観察したところ、*E. coli* O157 は強い散乱スポットとして観察されたのに対し、*E. coli* O26 や O-rough は弱い光スポットとして観察された。このように、ハイブリッドは表面に形成された O157 抗原の分子鑄型によって、細胞表面の O 抗原、つまり糖配列を正確に識別することが示された。さらに、*E. coli* O157 細胞表面に特異結合した複数のハイブリッドは細胞の光散乱強度を高め、600 nm における強度 (I) は、ハイブリッドの結合していない細胞 (I_0) の 4 倍程度 ($=I/I_0$) となった。他の血清型では、ハイブリッドは結合しないため、光散乱強度に変化はみられず、細胞のサイズのばらつきに対応した $\pm 10\%$ ($0.2 = I/I_0$) の誤差がみられるのみであった。つまり、ハイブリッドは細胞表面に非特異吸着することなく *E. coli* O157 を標識し、15 倍以上の選択性を示すことが明らかになった。

以上、特異結合性を有するハイブリッドを標識とすることで、細菌細胞表面の化学構造に基づいた細菌の特定が達成され、迅速で高感度、高選択的な光学検出が実現された。これまでにない方法論としてその原理を構築することができた。本開発によって、いつでも、どこでも、だれでも迅速かつ高精度に検出できる手法の確立が可能である。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 18 件)

- 1) D. Q. Nguyen, X. Shan, M. Saito, K. Iwamoto, Z. Chen, H. Shiiigi*,
Evaluation of Surface Structure of *Escherichia coli* Using Polypyrrole Matrix,
Anal. Sci. (査読有), **accepted**.
- 2) H. Shiiigi*, T. Tomiyama, M. Saito, K. Ishiki, D. Q. Nguyen, T. Endo, Y. Yamamoto, X. Shan, Z. Chen, T. Nishino, H. Nakao, T. Nagaoka,
Smart Golden Leaves Fabricated by Integrating Au Nanoparticles and Cellulose Nanofibers,
ChemNanoMat (査読有), **in press**.
- 3) D. Q. Nguyen, K. Ishiki, H. Shiiigi*,
(**Invited paper**) Single cell immunodetection of *Escherichia coli* O157:H7 on an indium-tin-oxide electrode by using an electrochemical label with an organic-inorganic nanostructure,
Microchimica Acta (査読有), **185** (10), 465 (2018). DOI:
<https://doi.org/10.1007/s00604-018-3001-5>
- 4) K. Ishiki, D. Q. Nguyen, A. Morishita, H. Shiiigi*, T. Nagaoka*,
Electrochemical detection of viable bacterial cells using a tetrazolium salt (**Cover Art**),
Anal. Chem. (査読有), **90** (18), 10903-10909 (2018).
- 5) X. Shan, T. Yamauchi, H. Shiiigi*, T. Nagaoka,
Binding Constant of the Cell-shaped Cavity Formed on a Polymer for *Escherichia coli* O157 (**Hot Article Award**),
Anal. Sci. (査読有), **34** (4), 483-486 (2018).
- 6) X. Shan, T. Yamauchi, Y. Yamamoto, H. Shiiigi*, T. Nagaoka,
A rapid and specific bacterial detection method based on cell-imprinted microplates (**Front cover**),
Analyst (査読有), **143**, 1568-1574 (2018).
- 7) T. Kinoshita, K. Ishiki, D. Q. Nguyen, H. Shiiigi*, T. Nagaoka,
Real-Time Evaluation of Bacterial Viability Using Gold Nanoparticles,
Anal. Chem. (査読有), **90** (6), 4098-4103 (2018).
- 8) 椎木 弘*, 長岡 勉,
金ナノ粒子を利用した分析技術,
ぶんせき (査読無), **3**, 94-99 (2018).
- 9) T. Nishino*, H. Shiiigi, M. Kiguchi, T. Nagaoka,
Specific single-molecule detection of glucose in a supramolecularly designed tunnel junction,
Chem. Commun. (査読有), **53**, 5212-5215 (2017).
- 10) K. Ishiki, H. Shiiigi*, T. Nagaoka,
Optical Elemental Analysis of Metals Using *Shewanella oneidensis* (**Front cover, Hot Article Award**),
Anal. Sci. (査読有), **33** (5), 551-553 (2017).
- 11) T. Kinoshita, D. Q. Nguyen, D. Q. Le, K. Ishiki, H. Shiiigi*, T. Nagaoka,
Shape Memory Characteristics of O157-Antigenic Cavities Generated on Nanocomposites Consisting of Copolymer-Encapsulated Gold Nanoparticles,
Anal. Chem. (査読有), **89** (8), 4680-4684 (2017).
- 12) X. Shan, T. Yamauchi, Y. Yamamoto, S. Niyomdech, K. Ishiki, D. Q. Le, H. Shiiigi*, T. Nagaoka,
Spontaneous and specific binding of enterohemorrhagic *Escherichia coli* to overoxidized polypyrrole-coated microspheres,
Chem. Commun. (査読有), **53**, 3890-3893 (2017).
- 13) K. Ishiki, K. Okada, D. Q. Le, H. Shiiigi*, T. Nagaoka,
Investigation Concerning the Formation Process of Gold Nanoparticles by *Shewanella oneidensis* MR-1 (**Front cover, Hot Article Award**),
Anal. Sci. (査読有), **33** (2), 129-131 (2017).
- 14) A. Morishita, S. Higashimae, A. Nomoto, H. Shiiigi, T. Nagaoka*,
Electrochemical Investigation of Isoprenoid Quinone Productions by *Shewanella oneidensis* MR-1 Detected by Its Destructive Adsorption on an Indium-Tin-Oxide Electrode,
J. Electrochem. Soc. (査読有), **163** (10), G166-G172 (2016).
- 15) T. Kinoshita, M. Fukuda, D. Q. Nguyen, K. Ishiki, T. Nishino, H. Shiiigi*, T. Nagaoka,
Nanoantenna for bacterial detection,
Procedia Chem. (査読有), **20**, 90-92 (2016).

- 16) T. Kinoshita, Y. Hatsuoka, D. Q. Nguyen, R. Iwata, H. Shiigi, T. Nagaoka*,
(**Invited paper**) Electrochemical Response of Acridine Orange in Bacterial Cell,
Electrochemistry (査読有), **84** (5), 334-337 (2016).
- 17) T. Kinoshita, K. Kiso, D. Q. Le, H. Shiigi*, T. Nagaoka,
Light-scattering Characteristics of Metal Nanoparticles on a Single Bacterial Cell,
Anal. Sci. (査読有), **32** (3), 301-305 (2016).
- 18) H. Shiigi*, T. Fujita, X. Shan, M. Terabe, A. Mihashi, Y. Yamamoto, T. Nagaoka,
Optical Characterization of Gold Nanoparticle Layers Formed on Plastic Microbeads,
Anal. Sci. (査読有), **32** (3), 281-286 (2016).

〔学会発表〕(計 4 件)

- 1) 椎木 弘, (Invited) ナノ～マイクロ空間を用いたバイオセンシング,
ヘルスケアデバイス実装研究会第9回公開研究会(大津, 2019年1月)
- 2) H. Shiigi*, (Invited) Development of Artificial Antibodies for Bioanalysis,
3rd International Conference on Emerging Advanced Nanomaterials (Newcastle, Oct. 2018).
- 3) H. Shiigi*, (Invited) Nano- and micro-sized space for bioanalysis and biosensing,
4th Asian Symposium for Analytical Sciences (Sendai, Sep. 2018).
- 4) T. Nagaoka*, H. Shiigi, (Invited) Development of bacterial sensors based on conducting-
polymer imprinting technology,
Asianalysis XIII (Chiang Mai, Dec. 2016).

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 複合面状体およびその製造方法、それが形成された部材

発明者: 長岡 勉, 椎木 弘, 山本陽二郎

権利者: 公立大学法人大阪府立大学

種類: 特許

番号: 特願 2018-035153

出願年: 2018

国内外の別: 国内

取得状況(計 1 件)

名称: 被検出微生物を検出する検出方法

発明者: 椎木 弘, 長岡 勉

権利者: 公立大学法人大阪府立大学

種類: 特許

番号: 特許第 6358610 号

取得年: 2018

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

分子認識化学研究グループホームページ

<http://www2.chem.osakafu-u.ac.jp/ohka/ohka12/home.html>

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名: 長岡 勉

ローマ字氏名: Nagaoka Tsutomu

研究協力者氏名: 西野 智昭

ローマ字氏名: Nishino Tomoaki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。