

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：227500068

研究課題名（和文） 細菌、ウイルス、毒素タンパク質の一斉同時分析が可能な
イオンチャンネルセンサの開発研究課題名（英文） Development of Simultaneous detection for Bacteria, Virus, and Toxin
using Microchip with Ion-channel Sensor

研究代表者

倉光 英樹 (Hideki Kuramitz)

富山大学・大学院理工学研究部（理学）・准教授

研究者番号：70397165

研究成果の概要（和文）：

優れたイオンチャンネルバイオセンサをマイクロ流体デバイスへ展開し、細菌、ウイルス、および毒素タンパク質の一斉同時スクリーニングが可能なデバイスの開発を目的とした。検出部の開発では、コレラト毒素、MS2、大腸菌に対してイオンチャンネル能を示す抗体組織化膜を電極表面上に構築した。一方、分離部として、ピンチドフローフラクシオネーションを利用したサイズ分離マイクロ流路を作製した。1 μm の抗体修飾磁性マイクロ粒子を調整し、大腸菌と反応させた後、マイクロ流路へ送液したところ、粒子に反応させた大腸菌濃度の増加に伴って、回収率の減少がみられた。本法は 5×10^2 cfu/mL レベルの大腸菌の簡易分析が可能である。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study is the development for the microchip device with ion-channel sensor for simultaneous detection of bacteria, virus, and protein toxin. The development of detecting units for cholera toxin, MS2, and E-coli were successively achieved by constructing the antibody assembled membrane that acts as the ion-channel for ferrocyanide on the electrode surface. As the separating units, the separation of E-coli bound/unbound magnetic microbeads (1 μm) was investigated using the pinched flow fractionation microchip. The determination of 5×10^2 cfu/mL E-coli was achieved by this method.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 22 年度 | 2,400,000 | 720,000 | 3,120,000 |
| 23 年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：分析化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：電気化学分析，大腸菌，毒素タンパク質，マイクロ流路，磁性粒子

1. 研究開始当初の背景

水系感染症の流行は既に過去のものと思われがちである。しかし、近年の SARS や鳥インフルエンザなどの流行が示すように、感染症が消滅することは無く、水系においても新興・再興の感染症に対して決して油断はで

きない。現に、地球温暖化による異常気象に伴う洪水の多発などにより、コレラなどの細菌性感染症の拡大・深刻化が世界的に問題視されている (WER, WHO, 2007, 82, 273-284)。飲料水や食品に含まれる疾患リスクの早期発見は、予測困難な感染症による被害を未然

に防ぐ対策として極めて有効であり、我々の健康や生命そのものを維持するうえで重要な役割を担う。従って、疾患原因となる細菌やウイルス、さらに、細菌などが生産する毒素タンパク質に起因するリスクの評価手段として活用可能な、新しい分析法やより利便性を高めた分析デバイスの開発が急務とされている。

2. 研究の目的

病原性の細菌、ウイルス、およびそれらが生産する毒素タンパク質のスクリーニング試験は、飲料水や食品の安全管理に資する重要な科学技術である。本研究では、数種類の細菌、ウイルス、タンパク質の一斉同時高感度検出が可能なマイクロ流体デバイスの開発を目的とする。当該研究で提案するアッセイデバイスの大きな特徴は、従来からよく利用されている酵素免疫定量法 (ELISA) ではなく、電気化学イオンチャンネルバイオセンサという独自の検出原理を利用する点である。簡便性・迅速性に優れたイオンチャンネルバイオセンサをマイクロ流体デバイスへ展開することで、ELISA を利用した既存デバイスの問題点を克服する新技術の開発に挑戦する。

3. 研究の方法

各分析対象物質の抗体を修飾させた電極を以下の方法で作成し、抗体-抗原反応を利用したイオンチャンネルセンサ (ICSS) の開発を行った。電極への抗体の修飾方法は、1) 抗体の電極への非特異的吸着を利用した修飾方法、2) メルカプト酸の自己集積単分子膜 (SAM) に抗体をアミド結合により修飾する方法、3) SAM としたビオチンに抗体をアビジンで架橋して修飾する方法をそれぞれ試みた。センサの応答は電極活性イオンである $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ のボルタモグラムから評価した。

ピンチドフローフラクショネーションを利用したサイズ分離マイクロ流路を作製した。大腸菌と磁性粒子 (直径 $1 \mu\text{m}$) の大きさが同程度であることに着目し、磁性粒子と大腸菌結合粒子 (大腸菌を結合させた磁性粒子) のサイズ分級による検出を試した。サイズ分級にはマイクロ流路を用い、数百 μL の試料の送液で大腸菌の分離定量を試みた。

4. 研究成果

ビオチン SAM にアビジンを架橋して修飾した抗体膜電極と分析対象物質のひとつであるモデル分析対象タンパク質として用いた OVA とを反応させた結果、 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ の電流応答が増大した。この現象は、他の 2 つの修飾方法を利用した抗体膜電極では観られなかった。コレラ毒素、MS2 の場合においても、分析対象物質との反応により電流応答の増大が得られたことから、本研究で開発したセンサは等電点もサイズも全く異なる

分析対象物質を同一の原理で検出可能であることを明らかにした。このセンサの分析対象物質との反応に伴う電流応答の増大は、電極表面の抗体修飾量に依存していることから、この現象は分析対象物質の抗体への結合によって引き起こされていることは明らかである。また、MS2 のような、タンパク質と比較してサイズがはるかに大きい物質を検出するためには、タンパク質を検出対象とする場合と比較して、電極表面に修飾する抗体の密度を低くする必要があることを見出した。本研究で開発したセンサは、分析対象物質の抗体膜への結合が関与しているため、分析対象物質のサイズに応じて、センサ応答の発生に関与する抗体密度が決定される。さらに、分析対象物質との反応前後における $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ の拡散係数を算出した結果、反応後に拡散係数が増大していた。この現象は、の理由は解明できていないが、検討したすべての分析対象物質の場合で得られた。OVA、コレラ毒素、MS2 の検出限界はそれぞれ 3.8 pM 、 21 pM 、 $1.7 \times 10^6 \text{ PFU/mL}$ であった。

一方、センサデバイスの分離部として、ピンチドフローフラクショネーションを利用したサイズ分離マイクロ流路を作製し、大腸菌のサイズ分級を試みた。本法で用いるマイクロ流路は、流路内に形成させた分級対象物質の直径と同程度の幅の層流を利用することで、選択的な回収を可能にする手法である。そこで、直径 $1 \mu\text{m}$ の磁性粒子を対象に液層幅を検討したところ、液層幅が $1 \mu\text{m}$ の時に 90% 以上の回収率を得ることに成功した。また、マイクロ流路への送液前に大腸菌と反応させた大腸菌結合粒子の回収率を調べたところ、反応させた大腸菌濃度の増加に伴って、回収率の減少がみられた。更に、大腸菌結合粒子を蛍光顕微鏡で観察したところ、大腸菌濃度の増加に伴って、凝集体のサイズが大きくなっていることが確認できた。本法は大腸菌結合粒子のサイズ分級により、4 時間の測定時間で $5 \times 10^2 \text{ cfu/mL}$ レベルの大腸菌の簡易分析が可能である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① H. Kuramitz, Y. Mawatari, M. Ikeuchi, O. Kutomi, N. Hata, S. Taguchi, and K. Sugawara, *Analytical Sciences*, **2012**, *28*, 77-81.
- ② M. Fukushima, Y. Mizutani, S. Maeno, Q. Zhu, H. Kuramitz, and S. Nagao, *Molecules*, **2012**, *17*, 48-60.
- ③ K. Sazawa, M. Tachi, T. Wakimoto, T. Kawakami, N. Hata, S. Taguchi and H.

Kuramitz, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **2011**, 8, 1655-1670.

- ④ H. Kuramitz, S. Miyagaki, E. Ueno, N. Hata, S. Taguchi, and K. Sugawara, *Analyst*, **2011**, 136, 2373-2378.
- ⑤ 田口 茂, 藤井絢子, 起 孝志, 倉光英樹, 波多宣子, *分析化学*, **2010**, 59, 1133-1136.

[学会発表] (計 43 件)

- ① K. Sazawa, H. Kuramitz, N. Hata, S. Taguchi, and M. Fukushima, *IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011 (ICAS2011)*, 22-26 May 2011, Kyoto, Japan, P0916.
- ② M. Ikeuchi, H. Kuramitz, N. Hata, S. Taguchi, and K. Sugawara, *62nd Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry*, 11-16 Sep. 2011, Niigata, Japan, s04-P003.
- ③ T. Wakimoto, K. Sazawa, N. Hata, S. Taguchi, and H. Kuramitz, *3rd International Workshop on "Wild Fire and Carbon Management in Peat-Forest in Indonesia"*, 22-24 September 2011, Palangka Raya, Indonesia.
- ④ K. Sazawa, W. Ohura, Y. Furuhashi, N. Hata, S. Taguchi, M. Fukushima, and H. Kuramitz, *The 4th IWA-ASPIRE Conference & Exhibition*, 2-6 Oct. 2011, Tokyo, Japan.
- ⑤ T. Okazaki, W. Wang, H. Kuramitz, N. Hata, and S. Taguchi, *The 4th IWA-ASPIRE Conference & Exhibition*, 2-6 Oct. 2011, Tokyo, Japan.
- ⑥ N. Hata, T. Nakajima, K. Nakagawa, M. Nakamura, H. Kuramitz, S. Taguchi, and H. Chiba, *The 4th IWA-ASPIRE Conference & Exhibition*, 2-6 Oct. 2011, Tokyo, Japan.
- ⑦ N. Hata, S. Terashima, R. Yasui, H. Kuramitz, and S. Taguchi, *The 4th IWA-ASPIRE Conference & Exhibition*, 2-6 Oct. 2011, Tokyo, Japan.
- ⑧ S. Taguchi, K. Murai, Y. Hayakawa, S. Tamizu, M. Kuwata, Y. Katayama, N. Hata, and H. Kuramitz, *The 4th IWA-ASPIRE Conference & Exhibition*, 2-6 Oct. 2011, Tokyo, Japan.
- ⑨ 鈴木智代・長尾誠也・倉光英樹・落合伸也・徳成武勇・山本政儀, *第27回日本腐植物質学会講演会*, 2011, 11月17日～18日, 金沢大学, P-8.
- ⑩ 福嶋正巳・水谷祐介・前野翔平・倉光英樹・長尾誠也, *第27回日本腐植物質学会講演会*, 2011, 11月17日～18日, 金沢大学, P-4.
- ⑪ 脇本孝俊・佐澤和人・倉光英樹・波多宣

子・田口茂・福嶋正巳・田中俊逸, *第27回日本腐植物質学会講演会*, 2011, 11月17日～18日, 金沢大学, S-5.

- ⑫ 桑田真実・村居景太・片山祐貴・倉光英樹・波多宣子・田口茂, *日本分析化学会第60年会*, 2011年9月14日～16日, 名古屋大学, E3005Y.
- ⑬ 水名健太・波多宣子・倉光英樹・田口茂・中山慶子・山本保・高村禪, *日本分析化学会第60年会*, 2011年9月14日～16日, 名古屋大学, F2005Y.
- ⑭ 浅岡雅・廣上永子・倉光英樹・波多宣子・田口茂・川上貴教, *日本分析化学会第60年会*, 2011年9月14日～16日, 名古屋大学, F2002Y.
- ⑮ H. Kuramitz and K. Sugawara, *3rd International Conference for Young Chemists (ICYC 2010)*, 23rd-25th, June, 2010, Penang, Malaysia, KN-15.
- ⑯ K. Sazawa, H. Kuramitz, N. Hata, and S. Taguchi, *The 17th Asian Symposium on Ecotechnology (ASET17)*, 11-13 November 2010, Toyama, Japan.
- ⑰ H. Kuramitz, K. Sazawa, N. Hata, and S. Taguchi, *2nd International Workshop on "Wild Fire and Carbon Management in Peat-Forest in Indonesia"*, 28-29 September 2010, Palangka Raya, Indonesia.
- ⑱ K. Sazawa, H. Kuramitz, N. Hata, and S. Taguchi, *2nd International Workshop on "Wild Fire and Carbon Management in Peat-Forest in Indonesia"*, 28-29 September 2010, Palangka Raya, Indonesia.
- ⑲ W. R. Heineman, H. B. Halsall, C. J. Seliskar, H. Kuramitz, *The 61st Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry*, September 26th – October 1th, 2010, Nice, France.
- など

[図書] (計 件)

- ① 倉光英樹 (共著) 2. 化学反応による定性分析, 2. 1. 化学反応による検出, 2. 1. 1. 陽イオン, 2. 1. 2. 陰イオン「分析化学便覧 (第6版)」日本分析化学会編, 丸善, 頁11-17, **2011**.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況（計◇件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.sci.u-toyama.ac.jp/env/kuramitz/indexJP.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉光 英樹 (Hideki Kuramitz)

富山大学・大学院理工学研究部（理学）・

准教授

研究者番号：70397165

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：