

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25288069

研究課題名(和文) 導電性ポリマ膜による細菌の選択的保持と分析化学的応用

研究課題名(英文) Development of conducting polymer films imprinted with microbes and their applications to microbial sensors

研究代表者

長岡 勉 (NAGAOKA, TSUTOMU)

大阪府立大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00172510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：この研究では、分子鑄型ポリマ膜を利用した細菌の選択的検出法の開発を行った。細菌のリアルタイム検出法の開発が急がれているが、決定的な方法はまだ存在しない。この研究では、細菌検出に対するこのような現状を踏まえ、申請者らが開発してきた分子鑄型法を細菌のリアルタイム計測技術として応用した。具体的には、細菌をポリピロール膜にドープし、これを過酸化処理により取り出すことで目的とする細菌の鑄型を作製してセンサとし、異種の細菌に対して高い選択性を持たせることに成功した。さらに、高感度な細菌検出を目的として、テトラゾリウム塩を用いた検出法も開発した。

研究成果の概要(英文)：This research project developed sensor films for real-time microbial detection using the imprinting technique that was developed by our group. The sensor films were prepared from polypyrrole film doped with a targeted microbe, such as E. coli O157. The microbe was then removed by over-oxidation of the film, which created the cavities complimentary to the template microbe. In this research project, we focused on preparing highly selective sensor films by optimizing polymerization parameters. In addition, highly sensitive electrochemical detection technique was developed using a tetrazolium salt. These efforts were integrated to realize the fabrication of real-time microbial sensors.

研究分野：分析化学

キーワード：細菌 鑄型 センサ MTT ポリピロール ユピキノン メナキノン

### 1. 研究開始当初の背景

最近、細菌汚染に対する脅威が世界的に高まっている。細菌の検出には培養法がよく用いられているが、この方法は信頼性は高いものの確定までに時間がかかり、通常1日以上を要する。しかし、食品などの細菌汚染の検査にはさらに短時間で確定できる検査法の開発が望まれている。しかしながら、細菌のリアルタイム検出法に関しては、決定的な方法はまだ存在しない。

### 2. 研究の目的

この研究では、細菌検出に対するこのような現状を踏まえ、申請者らが開発してきた分子鋳型法を細菌のリアルタイム計測技術として応用した。具体的には、細菌をポリピロール膜にドープし、これを過酸化処理により取り出すことで目的とする細菌の鋳型を作製してセンサとし、異種の細菌に対して高い選択性を持たせることを目的の一つとした。さらに、上記センサ膜の開発と並行して、高感度な細菌検出法も開発することを目標とした。

### 3. 研究の方法

図1に鋳型法による細菌検出の基本原則を示す。細菌は一般に負に帯電しており、ポリピロールは逆に正に帯電するため、細菌はポリマフィルム内に容易かつ高密度にドープされる(図2)。その後、この細菌を過酸化により取り除けば、細菌の鋳型を有するセンサフィルムが作製される。このセンサフィルムを適当な信号変換器上に配置すればセンサとして利用できる。

この研究では上記原理を用いて種々のポリマ膜センサを作製するとともに、その分析化学的応用について検討を行った。

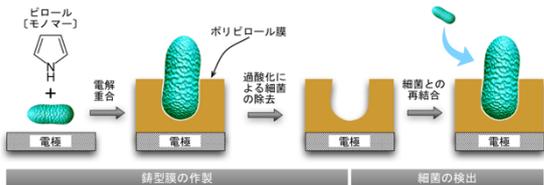


図1 鋳型ポリマの作製原理 ポリピロールは陽電荷を持つため、重合時に陰イオン(ここでは細菌)を自動的に取り込む。このポリマをさらに酸化(過酸化)すると細菌が取り除かれ、鋳型が作製される。鋳型に適合する細菌が溶液中に存在すると鋳型膜との間で再結合が起こり、膜の重量増加などにより検出できる。

### 4. 研究成果

このセンサの作製における技術的な問題は、細菌のポリマ膜からの取り出しであった。例えば、グラム陰性の細菌の表面にはリポ多糖が存在し、これがポリマ鎖と強く相互作用している。従って、細菌が効率よく剥離できれば、細菌の表面構造を写し取った精巧な鋳型が作製できる。反面、この多糖がポリマと極めて強く相互作用するので、細菌の剥

離は困難であった。このため、種々剥離条件を検討し、リゾチーム酵素と過酸化技術を併用することにより、高い脱ドープ率が達成できた。

このようにして作製したセンサ膜はプレート細菌に対して高い選択性を有して

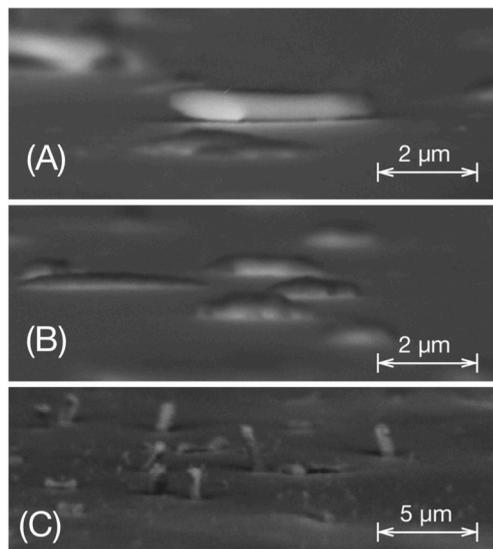


図2 導電性高分子膜に細菌を固定した時のSEM像。固定条件(pH, 高分子の種類など)により、細菌の固定状態が異なる。

おり、センサ膜の選択性を異なる種類の桿菌を用いて調査した。その結果、多く測定で10倍以上の選択性が示された。例として、緑膿菌鋳型センサの応答について述べる。このセンサは緑膿菌の密度に対して良い直線性を示した。さらに、アシネトバクタを緑膿菌鋳型センサで測定すると、期待通りに、アシネトバクタの応答は緑膿菌よりも小さかった。アシネトバクタは緑膿菌よりも小さく、緑膿菌の鋳型孔に容易に進入できるはずであるが、実際には応答は抑制された。これはアシネトバクタが緑膿菌鋳型に侵入しても鋳型表面とは距離が離れており、十分な相互作用が得られないためと考えられ、また細菌と鋳型表面の相互作用は、単に大きさだけで

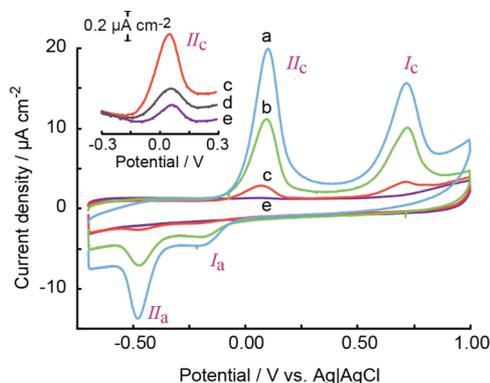


図3 MTT色素のボルタモグラム:細菌試料液をNB中でインキュベートした溶液を電極上で乾燥したのちに得られるボルタモグラム(CV)

なく表面官能基の認識が大きく関与していることが分かった。

次に、細菌の検出についても検討を加えた。細菌は一般に電気化学やフォトメトリの応答を与えないので、簡易な手法による高感度な検出が困難である。従って、上記のセンサの研究では水晶振動子を信号変換器として用いたが、この変換器は高感度ではあるが周辺環境（振動など）の変化に敏感であり、またチップ当たりの価格が高価であるため、実用的な分析には使用しにくい。そこで、他の変換器を検討したところ、酸化還元色素（MTT；テトラゾリウム塩）を用いて細菌を染色し、これを用いて電気学的に検出することが可能であることが分かった（図3）。こ

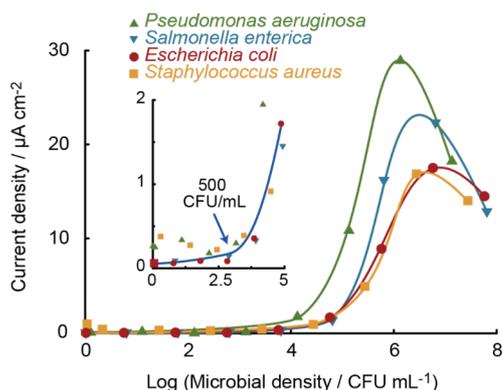


図4 MTT 色素の  $I_c$  のピークの高さと生菌密度との関係

の方法では、 $500 \text{ CFU mL}^{-1}$  までの感度で検出することが可能となり、水溶性のテトラゾリウム塩を用いる光学的定量法に比べて  $100 \sim 1,000$  倍高い感度が得られた（図4）。

実際に、植物工場内で巡回している養肥液の分析を行ったところ、培養法で得られた値と良い一致を示した。この方法では、細菌が細胞内で色素をフォルマザンに還元することを利用しているが、MTTのフォルマザンは水に不溶性であるために電極表面に濃縮させることが可能であり、このことが高感度化につながったものと考えている。また、MTTのフォルマザンへの還元は1時間程度のインキュベーションで十分な感度が得られたので、当初目標であるリアルタイム分析がほぼ達成された。全体の分析時間は2時間程度であり、培養法の24時間に比べて、分析時間は大いに短縮された。

さらに細菌を固定した電極の活用法についても種々検討を行った。図5は大腸菌をドープしたポリピロール膜上における酸素の還元電流を示したものである。溶液にグルコースを添加すると溶存酸素が細菌の代謝により低下するため、還元電流も低下した。この電流は溶液をグルコース無添加のものに取り替えると元の状態に復帰したことから、電流低下は細菌の活動によるものであった。このように導電性高分子膜内に細菌を固定

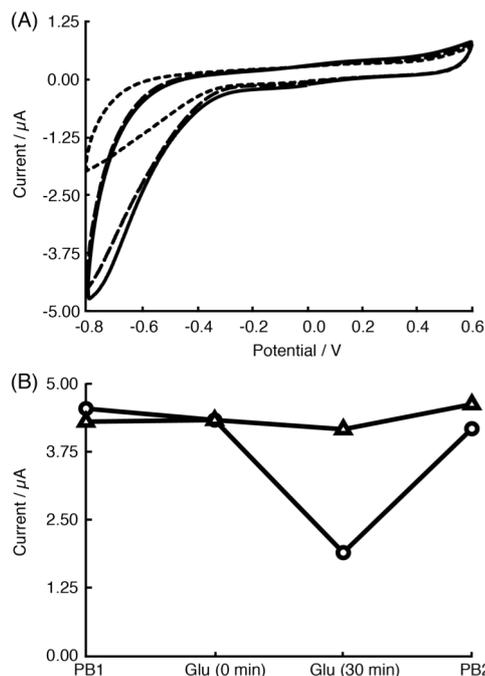


図5 細菌を固定したポリピロール膜における酸素還元 CV(A)と還元電流の変化(B):PB, pH 7 緩衝溶液; Glu, グルコース溶液

しても細菌は生きており、通常生命活動を行うことが分かった。このことを利用して、この膜はグルコースセンサとして機能することが分かった。

図6はITO電極上に *Shewanella oneidensis* を乾燥固定した時のCVであるが、この電極からは3つの酸化ピークが検出された。これは種々検討の結果、細胞の内膜に存在するユビキノン、メナキノン、メチルメナキノンに帰属されることが分かった。細菌を乾燥することにより外膜が破壊され、内部に存在する疎水性のイソプレノイドキノンが電極に吸着する結果、この応答が得られた。この乾燥固定法はこれまで報告のない新しい手法であり、このような簡単な操作により細菌内のキノンが定量できるようになったことは極めて有用性が高い。また、図より分かるように、このような簡単な方法であってもキノンに特化した測定がなされていることは注目に値する。

これらのキノンは内膜において膜タンパクに電子を渡す重要な役割を担っており、従来は有機溶媒による抽出によって検討されてきた。今回の研究では、このような抽出操作によらず極めて簡単にキノンの同定および定量が可能となることが分かり、生物化学的、分析化学的に大きな成果と言える。

好気性条件と嫌気性条件において *S. oneidensis* の培養して、これらキノンの検出を行った。好気性条件では *S. oneidensis* は酸素を最終的な電子受容体として利用するためユビキノンを多く生成する。これに対して嫌気性条件では酸素が利用できないため、それ以外の物質を電子受容体とする必要があるが、これらの物質の酸化還元電位は酸素

よりもかなり低いことが多い。このため *S. oneidensis* はユビキノンを利用することができず、代わりに(メチル)メナキノンを多く生産する。両条件において実際にこれらのキノンを定量したところ、上記の予測通りの結果が得られ、本法の信頼性が確認できた。

図6では培養は最初、好気性で始まり時間とともに酸素が細菌により使用されて嫌気性となる。生産は最初ユビキノンが中心であるが、嫌気条件が進行するに連れメナキノンの生産にシフトすることがわかる。

ユビキノン、メナキノンの生産比率は細菌の性質(好気性、嫌気性)により異なり、こ

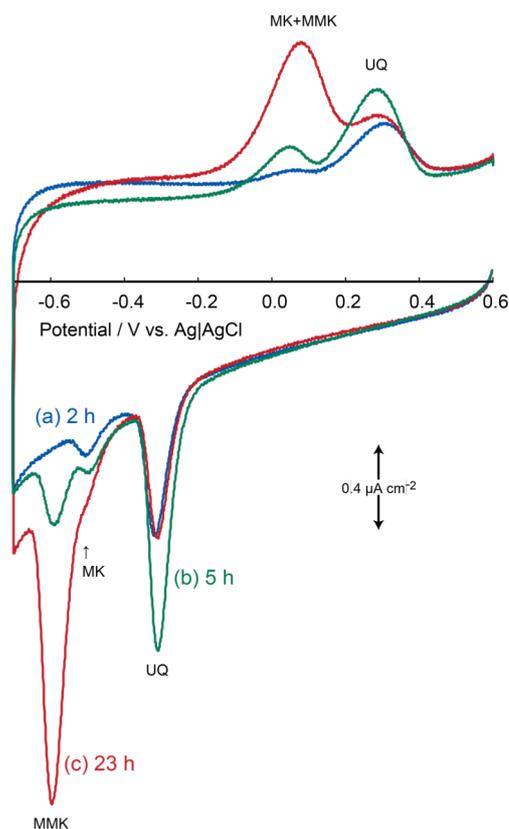


図6 閉鎖系において培養した *S. oneidensis* を乾燥した固定したITO電極のCV応答:UQ, ユビキノン;MK, メナキノン;MMK, メチルメナキノン

の比率を調べることにより細菌群の性質を調べることができる。この方法はキノンプロファイルとして知られており、この分析法が溶媒抽出を経ずにほぼリアルタイムで計測できるようになったことは、本研究の大きな成果の一つと言える。

#### 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 6件)

- [1] H. Shiigi, T. Kinoshita, M. Fukuda, D.Q. Le, T. Nishino, T. Nagaoka, Nanoantennas as biomarkers for bacterial detection, Anal.

Chem. 87 (2015) 4042-6. DOI: 10.1021/acs.analchem.5b00415. 査読あり

- [2] D.Q. Le, A. Morishita, S. Tokonami, T. Nishino, H. Shiigi, M. Miyake, T. Nagaoka, Voltammetric Detection and Profiling of Isoprenoid Quinones Hydrophobically Transferred From Bacterial Cells, Anal. Chem, 87 (2015) 8416-23. DOI: 10.1021/acs.analchem.5b01772 査読あり
- [3] D.Q. Le, M. Takai, S. Suekuni, S. Tokonami, T. Nishino, H. Shiigi, T. Nagaoka, Development of an observation platform for bacterial activity using polypyrrole films doped with bacteria, Anal. Chem. 87 (2015) 4047-52. DOI: 10.1021/acs.analchem.5b00544 査読あり
- [4] T. Kinoshita, H. Murakami, Y. Muranaka, Y. Yamamoto, T. Nishino, H. Shiigi, T. Nagaoka, Tracking the Growth of Tadpole-shaped Aggregates by Scanning Electron Microscopy, Anal. Sci. 30 (2014) 319-22. DOI: 10.2116/analsci.30.319 査読あり
- [5] H. Shiigi, Y. Muranaka, Y. Hatsuoka, Y. Yamamoto, T. Nagaoka, Electrochemical Catalytic Activity of Organic-Inorganic Hybrid Nanoraspberry Consisted of Gold Nanoparticle and Aniline Oligomer, J. Electrochem. Soc. 160 (2013) H813-H7. DOI: 10.1149/2.058311jes 査読あり
- [6] S. Tokonami, Y. Nakadoi, M. Takahashi, M. Ikemizu, T. Kadoma, K. Saimatsu, L.Q. Dung, H. Shiigi, T. Nagaoka, Label-free and selective bacteria detection using a film with transferred bacterial configuration, Anal. Chem. 85 (2013) 4925-9. DOI: 10.1021/ac3034618 査読あり

[学会発表] (計 12件)

- [1] S. Suekuni, T. Tamura, H. Shiigi, T. Nagaoka, Development of an observation platform for bacterial activity using conducting polymer films doped with bacteria, Pacificchem2015, 2015.12.15~ 12.20, Hawaiian convention center, Honolulu, USA
- [2] M. Takai, K. Ishiki, H. Shiigi, T. Nagaoka, Electrochemical evaluation of bacterial activity using fluorescent labels, Pacificchem2015, 2015.12.15~12.20, Hawaiian convention center, Honolulu, USA
- [3] D. Q. Le, T. Kinoshita, S. Tokonami, T. Nishino, H. Shiigi, T. Nagaoka, Conducting polymers for bacterial detection: Applications to sensors and trapping agents, Pacificchem2015, 2015.12.15~ 12.20, Waikiki Beach Marriot, Honolulu, USA
- [4] 長岡 勉, 椎木弘, 細菌の特異的検出を可能とする金属ナノ粒子ポリマコンポジットの開発, 日本分析化学会第64年会, 九州大学伊都キャンパス, 2015.09.09~09.11, 福岡県福岡市

- [5] D. Q. Le, T. Kinoshita, Y. Hatusuoka, S. Suekuni, S. Tokonami, T. Nishino, H. Shiigi, T. Nagaoka, Development of Bacteria-imprinted conducting polymers for bacterial monitoring and sensor applications, eccos30, 2015.09.01~09.05, Kervansaray Lara Hotel & Convention Center, Antalya, Turkey
- [6] T. Nagaoka, S. Tokonami, H. Shiigi, D. Q. Le, Bacterial sensors fabricated with conducting polymers doped with template bacteria, 第24回日本MRS年次大会, 国際シンポジウム, 2014.12.10~12.14, 横浜情報文化センター, 神奈川県横浜市
- [7] 長岡 勉, 椎木 弘, 西野智昭, 床波志保, 細菌を組み込んだ導電性高分子膜の作製と細菌センサへの応用, 2014 電気化学会秋季大会, 2014.09.27~09.28, 北海道大学, 北海道札幌市
- [8] 長岡勉, 椎木 弘, 西野智昭, 床波志保, 細菌の導電性ポリマ膜への固定化と化学センサへの応用, 日本分析化学会第63年会, 2014, 09.17~09.19, 広島大学, 広島県東広島市
- [9] 長岡 勉, 椎木 弘, 西野智昭, 床波志保, 過酸化ポリピロールを用いる細菌鑄型センサの作製, 電気化学会, 2014.03.29~03.31, 関西大学, 大阪府吹田市
- [10] 木下高将, 初岡 優, 椎木 弘, 長岡 勉, 菌ナノ粒子-ポリアニリンハイブリッドの電気化学特性, 電気化学会, 2014.03.29~03.31, 関西大学, 大阪府吹田市
- [11] D. Q. Le, H. Shiigi, S. Tokonami, T. Nagaoka, Bacteria-imprinted conducting polymer based sensors/detectors, 18th international congress on flow injection analysis, 2013.09.15~09.20, HF Ipanema Port Hotel, Port, Portuguese
- [12] D. Q. Le, K. Saimatsu, S. Tokonami, H. Shiigi, T. Nagaoka, Immobilization of bacteria into conducting polymer film, 18th international congress on flow injection analysis, 2013.09.15~09.20, HF Ipanema Port, Port, Portuguese

〔図書〕(計 2件)

- [1] 椎木 弘, 長岡 勉, 第9章 生物学的分析, 小熊幸一, 酒井忠雄 編, 基礎分析化学, 朝倉書店, 2015, 198 (172-185).
- [2] 椎木 弘, 床波志保, 陳 智棟, 長岡 勉, 第4章 第1節 導電性ポリマを用いる鑄型センサの作製と桿菌センサへの応用, バイオセンサの先端科学技術と新製品への応用開発, 技術情報協会, 2014, 534(131-135).

〔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://www.chem.osakafu-u.ac.jp/ohka/ohka12/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

長岡 勉 (NAGAOKA TSUTOMU)

大阪府立大学・工学研究科・教授

研究者番号：00172510

(3)連携研究者

椎木 弘 (SHIIGI HIROSHI)

大阪府立大学・工学研究科・准教授

研究者番号：70335769