

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450384

研究課題名(和文) 金属周期構造体を用いた細菌計測技術の開発

研究課題名(英文) Development of Bacteria Detection Sensor Using Periodic Metal Structure

研究代表者

小川 雄一(Ogawa, Yuichi)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20373285

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：簡便な細菌検査技術の開発を目的とし、金属周期構造を利用した検査法を提案した。フィルタを利用する簡易総菌数計測と、抗体を利用した菌種判定計測を行い、 10^4 /mLの大腸菌の計測に成功した。さらに、夾雑物が大腸菌と抗体との結合を妨げていることが確認されたが、選択的に大腸菌を検出していることが認められた。

研究成果の概要(英文)：We proposed a sensor for food inspection using a metallic periodic structure, and its aim was developing a quick bacterial detection sensor based on the changing transmission spectra of a metallic mesh for food safety. We demonstrated and compared two ways of detection: a simple test of a total number of bacteria on a membrane filter and a determination of specific bacteria using antibody on a metallic mesh. As a result, we succeeded in detection of *E. coli* more than 10^4 /mL concentration. Even it was confirmed that foreign substances inhibit the specific binding with bacteria and antibody, our sensor could detect *E. coli* quantitatively.

研究分野：生物センシング工学

キーワード：バイオセンサ 大腸菌 テラヘルツ分光

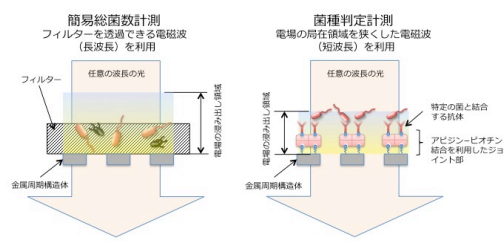
1. 研究開始当初の背景

食品中の黄色ブドウ球菌やサルモネラ菌、大腸菌などの細菌は、口から取り込まれて腸管内で増殖し、嘔吐や下痢などを生じさせ、毒性の強いものであれば、死に至る事も報告されている。そのため、厚生労働省は公定法として食品中微生物の検査法を定めているが、多くは培地による培養を必要とするため、検査結果が出るまでに数日の培養期間を要する。また、水質検査においては、化学的検査項目以外に細菌学的検査項目が行われており、後者の検査では大腸菌群測定法が広く用いられている。ここでも、数十時間もの培養時間を必要としており、それらの作業には専門的な知識や技術を必要とすることから迅速で簡便な技術が望まれている。同様に、乳牛の飼育現場においても簡便で迅速な乳房炎診断技術が求められており、ここでも生乳中の細菌を検出し、診断や治療に役立てることが急務となっている。

我々は2007年に金属メッシュ状の周期構造体をセンサとして用いることで、高感度なセンサとして動作する事を明らかにし、それ以降さまざまなセンサ応用を研究してきた。これは、金属の周期構造のサイズとそれに入射する光の波長が同程度のときに生じる共鳴現象を利用した方法である。この共鳴により金属表面に電場が局在するため、金属表面に存在する物質の誘電特性に応じて敏感に透過スペクトルが変化する。従来、このような共鳴現象は、表面プラズモン共鳴 (SPR) と呼ばれるセンサが実用化され、タンパク質の結合定数を導出するために利用されているが、SPRの共鳴現象は、可視光を利用する必要のあることから、金属表面の電場の局在領域が狭く、タンパク質程度の大きさの物質しか検出できない。しかし、我々が提案する方式は、原理的に構造と波長で共鳴波長が決まるため、対象物の大きさに合わせた、さまざまな電場領域を作り出すことができ、効率よく電場を利用することができる。これまで、1 THz (波長 300 μm) から 40 THz (波長 7.5 μm) にわたる、さまざまなサイズの周期構造体を作成し、タンパク質などを検出できるセンサとして動作することを確認済みである。さらに、企業との共同により、100 THz (波長 3 μm) で動作する基板レスの周期構造体を作成する目処がたっている。従って、センサを独自に作成する準備はできており、今後表面処理を経て目的物質の検出可能性を明らかにする段階にある。

2. 研究の目的

本研究では、迅速で簡便な細菌検査を目指し、金属周期構造体を利用した2種類の細菌検査法を開発する(図1)。本研究で用いる食品として、飲料水と生乳を対象とし、大腸菌 (*Escherichia coli* W3110) をモデルサンプルとし、飲料水に関しては濾過したフィルターをそのままセンサに密着させて総菌数



異なる波長帯で動作するセンサ(金属周期構造体)で2種類の計測手法を検討し、感度や利便性を考慮のうえ、それぞれの最適波長とセンサ形状を明らかにする。

図1 本研究で実施する2つの測定系の概要

を検出する。また、生乳に関しては、他の夾雑物成分が含まれている事を考慮し、特異的に結合する抗体をセンサ基板上に結合させ、その結合の有無を高感度に検出するという菌種判定計測を実施し、本手法による細菌検査の有効性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、金属の周期構造体として、厚み 6 μm のニッケル薄膜に 18 μm 角の正方形孔が 26 μm 間隔で正方格子状に配列した金属メッシュを用いた。懸濁液を濾過してフィルタ表面に捕捉された大腸菌の定量(簡易総菌数計測)、ならびに金属メッシュ表面に固定した抗体の大腸菌への特異的な親和性を利用した検出(菌種判別計測)を以下の方法で行った。

0 mL⁻¹ から 10⁷ mL⁻¹ まで調製した大腸菌 (*Escherichia coli* W3110) 懸濁液各 5 mL を直径 13 mm、ポア径 0.1 μm のメンブレンフィルタ(メルクミリポア社、オムニポア)で濾過した。濾過直後のメンブレンフィルタを陰圧で金属メッシュ上に密着させ、1 分間乾燥した後 FT-FIR (日本分光, FARIS-1S) を用い分解能 60 GHz、積算 100 回として透過測定を行った。次に抗体の特異的親和性を利用した検出を行うため、上記金属メッシュ表面をアミノ化、マレイミド化した後、チオールビオチン、ストレプトアビジンを介してビオチン標識された抗大腸菌抗体を固定した。濃度の異なる大腸菌懸濁液中で 30 分反応させ、洗浄・乾燥後に前述の FT-FIR を用いて同様に透過測定した。

さらに、生乳中夾雑物存在下での細菌の検出可能性を検証する為、モデル細菌に先述の大腸菌を用い、抗原抗体反応による生乳中大腸菌の特異的な検出可能性について検証した。生乳に対し大腸菌濃度が 0 mL⁻¹ から 10⁸ mL⁻¹ となるように大腸菌を懸濁し、各濃度の大腸菌懸濁乳について遠心分離による大腸菌層の簡易抽出を行った。この試料について、先述の方法で抗体固定化を行った金属メッシュで検出を行い、夾雑物有無の影響を評価した。

4. 研究成果

メンブレンフィルタを密着して測定され

た透過スペクトルを図2に示す。金属メッシュのみ(破線)からメンブレンフィルタ、大腸菌と付着するのに伴い共鳴ピークに低周波方向への周波数シフトが見られた(実線)。また各実験の測定結果において共鳴ピークの周波数シフト量を算出したところ、菌数・菌濃度に応じた周波数シフトが見られ(図3)、検出感度はメンブレンフィルタの測定では菌数 2×10^7 ($2.1 \times 10^5 \text{ mm}^{-2}$, $2.1 \times 10^2 \text{ ng/mm}^2$)、抗体を用いた検出では $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ であった。

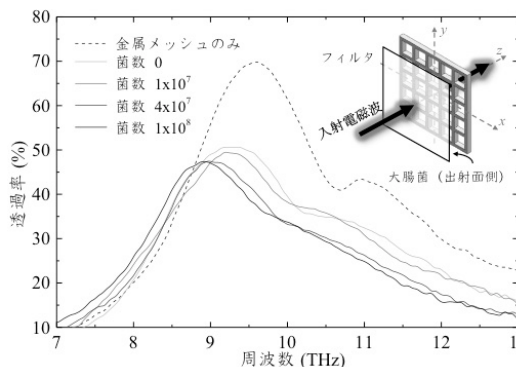


図2 大腸菌を濾過したメンブレンフィルタを密着した金属メッシュの透過スペクトル

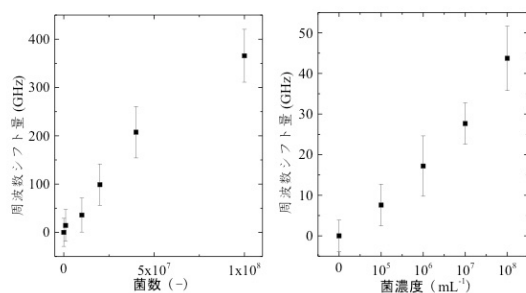


図3 周波数シフトの変化(左:メンブレンフィルタによる検出, 右:抗体を用いた検出)

さらに、夾雑物を含む生乳中と含まない PBS 中のサンプルで比較実験を行った結果、図4に示す結果を得た。周波数シフトは、各溶解中の大腸菌濃度が 0 mL^{-1} のディップ周波数を基準とし、各濃度のディップ周波数の差分から算出した。

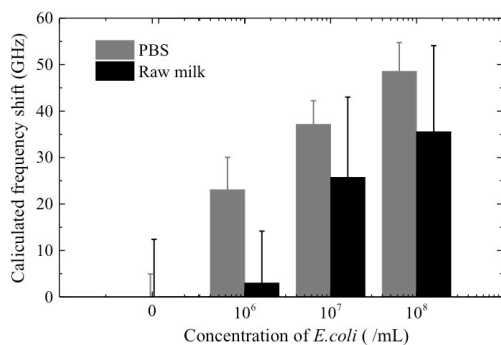


図4 PBS 及び生乳中の各大腸菌濃度の周波数シフト

図4に見られるように、カゼイン等のタンパク質や乳糖などを含む生乳中においても PBS 中の結果と同様に、大腸菌濃度が増加するにつれて周波数シフト量が濃度依存的に変化しており、夾雑物下においても本手法で定量評価が可能であることを示すことができた。一方、 0 mL^{-1} と 10^8 mL^{-1} の識別が出来ることが確認できたが、PBS 中の結果と比較すると、感度の低下が認められた。要因としては、各濃度における周波数シフト量が減少したことと、測定バラツキが大きくなったことが考えられる。

周波数シフト量が減少した理由には、遠心分離による大腸菌抽出を行う過程で、抽出前の濃度よりも抽出後の濃度が減少したことが考えられる。その為、大腸菌抽出乳内の大腸菌濃度が PBS に懸濁した大腸菌濃度よりも少なく見積もられている可能性がある。また、果実ジュース中の糖やタンパク質が抗体と大腸菌の反応を阻害し、検出感度を減少させることが報告されており、抽出乳中に残存した乳糖、及びカゼインや乳清等のタンパク質により同様の現象が生じたとも考えられる。一方、エラーバーが増加した原因には、生乳中のカゼインや乳清、及び遠心分離による除去が不十分であった乳中体細胞や乳脂肪等の夾雑物が、金属メッシュ表面に残ったことが考えられる。また、上記のような夾雑物が大腸菌固定を阻害した為、同濃度の懸濁液中で金属メッシュ表面に固定される大腸菌数にばらつきが生じた可能性も考えられる。今後は、抗原抗体反応を用いた大腸菌固定化プロトコル、及び生乳中からの大腸菌抽出方法の更なる検討により金属メッシュの検出感度を向上させることで、乳房炎の防除の現場検査としての活用が期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計9件)

- ① 寶来昂平, 鈴木哲仁, 近藤直, 小川雄一, 近藤孝志, 神波誠治, 花粉が金属メッシュセンサの透過特性に及ぼす影響”, 農業食料工学会関西支部報, 査読無, 116号, p.54 (2014)
- ② 鈴木哲仁, 栗田一平, 小川雄一, 近藤孝志, 神波誠治, 三浦佳子, 近藤直, “金属メッシュセンサを用いた大腸菌の簡易検出”, 第73回農業食料工学会年次大会講演要旨, 査読無, p.100 (2014)
- ③ K. Horai, T. Suzuki, Y. Ogawa, N. Kondo, T. Kondo, S. Kamba: Combination of monolith polymer and metallic mesh sensor, International Symposium on Frontier of Terahertz Science, 査読無, Program Guide of FTS, 71(2014).
- ④ I. Kurita, T. Suzuki, Y. Ogawa, N. Kondo, T. Kondo, S. Kamba, Y. Miura, “Specific Detection of Escherichia coli by Using Metallic Mesh Sensor in THz Region,” IEEE Xplore, General Assembly and

- Scientific Symposium (URSI GASS), 査読無, 2014 XXXIth URSI, 1-4 (2014).
- ⑤ T. Suzuki, Y. Ogawa, N. Kondo, T. Kondo, S. Kamba, “Detection of Biological Targets by Using Porous Polymer And Metamaterial Mesh Sensors,” 2014 IEEE Sensors Proceedings, 査読無, 2191-2194 (2014)
- ⑥ 安村怜仁朱, 寶来昂平, 鈴木哲仁, 小川雄一, 近藤直, “モノリス型ポリマーを用いた一体型金属メッシュセンサの透過特性評価”, 日本分光学会テラヘルツ分光部会～テラヘルツ科学の最先端 II ～講演要旨集, 査読無, P-1 (2015)
- ⑦ Gao Tianqi, 鈴木哲仁, 小川雄一, 近藤直, “Reflection Property of Metallic Mesh with Different Surface Hydrophobicity”, 日本分光学会テラヘルツ分光部会～テラヘルツ科学の最先端 II～講演要旨集, 査読無, P-5 (2015)
- ⑧ 寶来昂平, 鈴木哲仁, 小川雄一, 近藤直, 菜嶋茂樹, “多孔質膜一体型金属メッシュセンサによるタンパク質の定量評価”, 日本分光学会テラヘルツ分光部会～テラヘルツ科学の最先端 II～講演要旨集, 査読無, P-12 (2015)
- ⑨ 安村怜仁朱, 寶来昂平, 鈴木哲仁, 小川雄一, 近藤直, “金属メッシュセンサによる微量物質検出のためのポリマーモノリスの評価”, 農業食料工学会関西支部報, 査読無, 120号 (2016)印刷中

[学会発表] (計 10 件)

- ① 鈴木哲仁, 栗田一平, 小川雄一, 近藤孝志, 神波誠治, 三浦佳子, 近藤直, “金属メッシュセンサを用いた大腸菌の簡易検出”, 第73回農業食料工学会年次大会, 琉球大学工学部・農学部, 中頭郡, 5月16-19日 (2014)
- ② Kurita, T. Suzuki, Y. Ogawa, N. Kondo, T. Kondo, S. Kamba, Y. Miura, “Specific Detection of Escherichia coli by Using Metallic Mesh Sensor in THz Region,” XXXI URSI General Assembly and Scientific Symposium, China, Beijing, August 16-23 (2014)
- ③ K. Horai, T. Suzuki, Y. Ogawa, N. Kondo, T. Kondo, S. Kamba: Combination of monolith polymer and metallic mesh sensor, International Symposium on Frontier of Terahertz Science, Okinawa, Japan, August 4-6 (2014)
- ④ T. Suzuki, Y. Ogawa, N. Kondo, T. Kondo, S. Kamba, “Detection of Biological Targets by Using Porous Polymer And Metamaterial Mesh Sensors,” IEEE Sensors 2014, Valencia Conference Centre, Valencia, Spain, November 3-5 (2014)
- ⑤ 寶来昂平, 鈴木哲仁, 小川雄一, 近藤直, “モノリス一体型金属メッシュを用いた

タンパク質の定量測定”, 農業食料工学会関西支部第134回例会, ヤンマーミュージアム, 滋賀県長浜市, 10月9-10日 (2015)

- ⑥ 安村怜仁朱, 寶来昂平, 鈴木哲仁, 小川雄一, 近藤直, “金属メッシュセンサによるポリマーモノリス上の細菌検出”, 農業食料工学会関西支部第134回例会, ヤンマーミュージアム, 滋賀県長浜市, 10月9-10日 (2015)
- ⑦ 安村怜仁朱, 寶来昂平, 鈴木哲仁, 小川雄一, 近藤直, “モノリス型ポリマーを用いた一体型金属メッシュセンサの透過特性評価”, 日本分光学会テラヘルツ分光部会～テラヘルツ科学の最先端 II ～, 岩松旅館会議室, 仙台市青葉区, 11月19-20日 (2015)
- ⑧ Gao Tianqi, 鈴木哲仁, 小川雄一, 近藤直, “Reflection Property of Metallic Mesh with Different Surface Hydrophobicity”, 日本分光学会テラヘルツ分光部会～テラヘルツ科学の最先端 II～, 岩松旅館会議室, 仙台市青葉区, 11月19-20日 (2015)
- ⑨ 寶来昂平, 鈴木哲仁, 小川雄一, 近藤直, 菜嶋茂樹, “多孔質膜一体型金属メッシュセンサによるタンパク質の定量評価”, 日本分光学会テラヘルツ分光部会～テラヘルツ科学の最先端 II～, 岩松旅館会議室, 仙台市青葉区, 11月19-20日 (2015)
- ⑩ 安村怜仁朱, 寶来昂平, 鈴木哲仁, 小川雄一, 近藤直, “金属メッシュセンサによる微量物質検出のためのポリマーモノリスの評価”, 農業食料工学会関西支部第135回例会, 神戸大学農学部, 神戸市, 3月2日 (2016)

[図書] (計 0 件)

[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 0 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 雄一 (OGAWA, Yuichi)
京都大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：20373285

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：