

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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26620123

研究課題名(和文)細菌/導電性ポリマ複合体の作製と電気的・光学的情報取得デバイスへの応用

研究課題名(英文)Preparation of bacteria/conducting polymer hybrid materials and their application to electrical and photometrical devices

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：この研究では細菌の多様な性質を調べるため、細菌を導電性ポリマに組み込んで電気的、光学的に検討する方法を開発した。導電性ポリマは陽電荷を持つため、重合時、電荷補償のために負電荷を有する物質を取り込む。細菌は通常負に帯電しているため、細菌を組み込んだ導電性ポリマ膜は容易に作製できる。この研究では、導電性ポリマを細菌固定のための捕捉材として利用するだけでなく、導電性を利用して電極材料としての活用も期待した。研究成果は以下に要約される。1)細菌/ポリピロール膜の作製と評価 2)細菌/PEDOT膜の作製と評価 3)細菌/導電性ポリマ膜の応用 4)光学デバイスの作製と評価

研究成果の概要(英文)：In this project, we have developed conducting-polymer based electrochemical and optical sensor devices. Microbial species usually have negative charges on their surfaces, and easily doped with conducting polymers. The Polypyrrole/microbe films are expected to be electroactive and have functionality based on living microbe activity. The results outlined here are 1) preparation and evaluation of bacteria-polypyrrole films, 2) preparation and evaluation of bacteria-PEDOT films, 3) application of these films, and 4) fabrication of optical devices using gold nanoparticle-polyaniline composite materials.

研究分野：分析化学

キーワード：化学・バイオセンサ 細菌 導電性ポリマ ドープ ナノコンポジット 金ナノ粒子 散乱光

1. 研究開始当初の背景

細菌は病原性を有することもあり、また食品生産などにおいて人間に有益である場合もある。この研究では、このような細菌の多様な性質を調べるため、細菌を導電性ポリマに組み込んで電気的、光学的に検討する方法の開発に取り組んだ。ここで用いる導電性ポリマは陽電荷を持つため、重合時、電荷補償のために陰イオンを取り込む(図1)。この取り込みはイオンだけでなく、陰電荷を帯びている細菌においても起こると申請者は考えた。実際、細菌の表面電位(ζ -電位)は一般に負であるので、細菌とピロール(モノマ)を含む溶液を電極上で酸化すると、細菌をドーピングしたポリピロール膜が自動的に得られる(図2)。導電性高分子膜への細菌の取り込みは申請者の調査によると初めての知見であった。

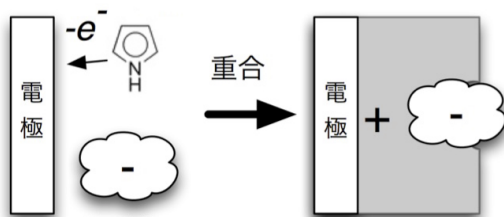


図1 細菌捕捉ポリマ膜の作製
ポリピロールは重合時に陽イオン膜となる。このため合成時に陰イオンを自動的に取り込む。

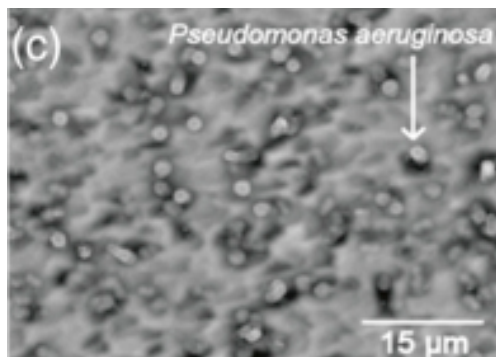


図2 緑膿菌をドーピングしたポリピロール膜のSEM像

図2に示すように、酸性条件で重合すると細菌は全てポリマ膜に垂直に取り込まれ、水平方向にドーピングされた細菌は全く存在しなかった。他の桿菌(約20種)でも全て垂直取り込みが観測された。また、細菌は極めて高密度にドーピングされており、ポリピロールとの親和性は極めて高いことが示された。

2. 研究の目的

この研究では、細菌を固定した導電性ポリマ膜を作製し、細菌と外部電極と間で良好な電気接続の形成を試みた。これにより、細菌の物性を取得し、細菌のリアルタイムセンシング技術への発展を目指した。すなわち、本研究では、導電性ポリマ膜を持つドーピング

特性を利用して、細菌/導電性ポリマ複合体による電氣的結合を行い、細菌の内部情報を電氣的・光学的に読み取り可能なデバイスを試作・評価した。

3. 研究の方法

導電性ポリマ/細菌組込膜はグラッシカーボン、金、ITO電極上で対応するモノマの電解酸化により作製した。その評価は主にpH7緩衝溶液中で、電気化学的に行った。薄相セルは緩衝液を含ませた濾紙をセパレータとして用い、この濾紙の両側をITO電極で挟むことにより作製した。

ナノコンポジットはアニリンと金ナノ粒子を含む溶液を水溶液中で酸化重合することにより作製した。

上記材料の評価には蛍光顕微鏡、暗視野顕微鏡、SEM、TEM、電気化学測定装置等を使用した。

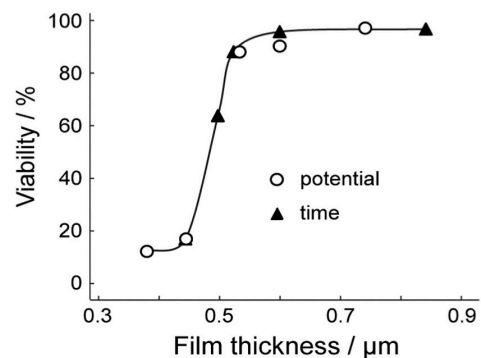


図3 緑膿菌をドーピングしたPEDOT膜における細菌生存率と膜厚の関係

4. 研究成果

1) 細菌/ポリピロール膜の作製条件と物性に関する検討

ポリピロールはほとんど全ての細菌をドーピングすることができる。本研究では主に緑膿菌および大腸菌について、膜生成と物性の両面から評価した。膜に細菌を組み込むとき、その生存率は応用上重要である。ポリピロールはポリアニリンよりもより中性に近い条件で膜生成を行うことが可能であるので、細菌を生存させたままでドーピングすることが可能となる。pH5で膜の重合を行ったとき、緑膿菌の生存率は50~90%であった。大腸菌に対しては95%を超える生存率が確認された。

2) 細菌/PEDOT膜の作製条件に関する検討

Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT)は、ポリピロールと異なり透明な膜であるので、光学的な応用も期待できる。この膜についてもポリピロールと同様で、容易に細菌をドーピングした膜が作製できた。PEDOTは特にpH7での重合が可能であるので、細菌の生存には

好都合である。図3は緑膿菌について、生存率の膜厚依存性を示したもので、膜厚が0.5 μm より大きくなると生存率はほぼ100%となった。この図はまた、電極のみでは生存率は低く、高い生存率を維持するためにはポリマ膜が必須であることを示している。したがって、細菌の活性を電極で観測する場合には、導電性ポリマはその簡便性も相まって、優れた捕捉材料である。

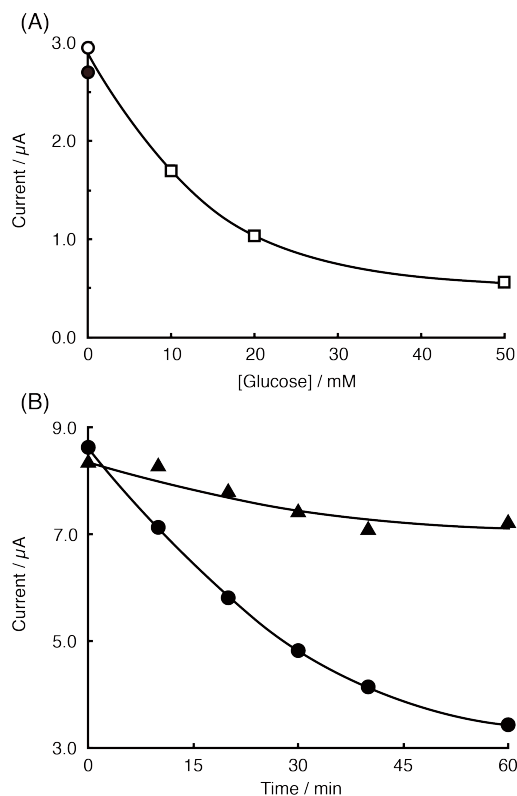


図4 大腸菌をドーブしたポリピロール膜の酸素還元電流の (A) グルコース濃度に対する効果, および (B) 時間変化に対する効果; (\blacktriangle) ポリピロール/リン酸塩膜, (\bullet) ポリピロール/大腸菌膜

3) 細菌/導電性ポリマ膜の応用

ポリピロール/大腸菌膜の活性度を薄相電気化学セルを用いて評価した。薄相セルを用いた理由は電解質溶液の量を減らすことによって膜活性の評価を容易にするためである。図4はポリピロール/大腸菌膜上での酸素還元電流の変化を示している。大腸菌の代謝により溶液中の酸素濃度が減少することが分かる。(A)に示すように、栄養源として添加したグルコースの濃度が増大すると酸素の消費も増大し、電流は減少した。この減少は(B)に示すように大腸菌をドーブしていない膜ではほとんど起こらなかったため、大腸菌の代謝によるものと考えられる。

このように大腸菌をドーブした膜を用いて、生物センサデバイスが容易に作製できた。膜内での大腸菌は生存率も高く、その生物活性を電気化学的に利用できることも分かっ

た。

4) 光学デバイスの作製と評価

この項目ではポリアニリンと金ナノ粒子からなる複合体を用いて検討を行った。複合体は多くの金ナノ粒子をアSEMBルしており、ナノ粒子単体に比べて、非常に強い散乱光が生じる(図5)。

この項目では、細菌にコンポジットを添加して細菌検出デバイスとしての評価を行った。*E. coli* O157の抗体を導入したコンポジットはこの細菌に対して高い選択性を有しており、また感度に関しても 10 cells mL^{-1} の定量が可能であった。また、このコンポジットの実用性を評価する目的で、散乱光モニタデバイスを作製した。このシステムでは $100 \sim 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ の範囲で良い直線性が得られ、実際にO157の定量が可能であることがわかった。このことから、このコンポジットは実用性にも優れた材料であることが分かった。

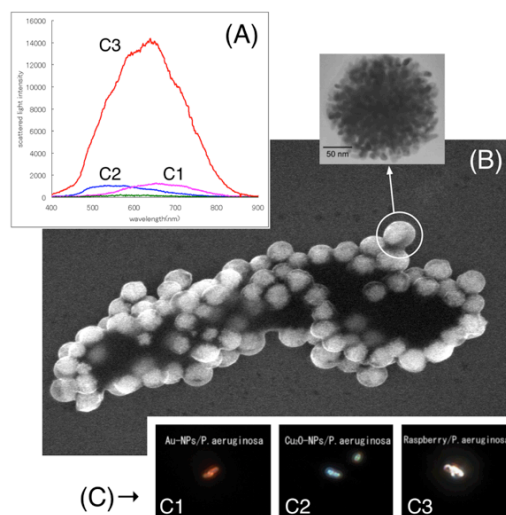


図5 (A) 緑膿菌に吸着したナノ粒子コンポジットの光散乱スペクトル, (B) 緑膿菌に吸着したコンポジットのSEM像, (C) 緑膿菌に吸着したナノ粒子の散乱光[暗視野顕微鏡像]; C1 金ナノ粒子単体, C2 酸化銅ナノ粒子単体, C3 金ナノ粒子コンポジット。(A)より、ナノコンポジットはナノ粒子単体に比べて極めて強い散乱光を生じており、高感度な検出が可能なが分かる。

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] 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.

[2] 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.

- [3] D.Q. Le, S. Tokonami, T. Nishino, H. Shiigi, T. Nagaoka, Electrochemical evaluation of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) films doped with bacteria based on viability analysis, Bioelectrochem 105 (2015) 50-5.
- [4] T. Kinoshita, D.Q. Nguyen, T. Nishino, H. Nakao, H. Shiigi, T. Nagaoka, Fluorescence Enhancement of Nanoraspberry Hot-spot Source Composed of Gold Nanoparticles and Aniline Oligomers, Anal. Sci. 31 (2015) 487-93.
- [5] 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.

[学会発表] (計 6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, Pacifichem2015, 2015.12.15-12.20, Hawaiian convention center, Honolulu, USA
- [2] T. Kinoshita, M. Fuuda, D. Q. Nguyen, K. Ishiki, T. Nishino, H. Shiigi, T. Nagaoka, Nanoantenna for bacterial detection, ACCS 2015, 2015.11.16-11.18, Shangrii-La hotel, Penang, Malaysia
- [3] 木下隆将, 福田真帆, 椎木 弘, 長岡 勉, Detection of pathogenic bacteria using nanocomposite as an optical nanoantenna, 第76回応用物理学会秋季学術講演会, 2015.09.13-09.16, 名古屋国際会議場, 愛知県名古屋市
- [4] D. Q. Le, M. T. Nishino, S. Tokonami, H. Shiigi, T. Nagaoka, Electrical characteristics of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) doped with bacteria, ICFIA19, 2014.11.30-12.05, アクロス福岡, 福岡県福岡市
- [5] 椎木 弘, 西野智昭, 床波志保, 長岡 勉, 細菌を吸着させた電極のボルタンメトリ, 第60回ポーラログラフィー及び電気分析討論会, 2014.11.15-11.16, 京都工芸繊維大学, 京都府京都市
- [6] 長岡 勉, 椎木 弘, 西野智昭, 床波志保, 細菌の導電性ポリマへの固定化と化学センサへの応用, 日本分析化学会,

2014.09.17-09.19, 広島大学, 広島県東広島市

[図書] (計 1件)

- [1] 椎木 弘, 床波志保, 長岡 勉, 第2篇 用途開発研究最前線 第3章 導電性高分子を用いて分子の鑄型センサを作る-分子から細菌までの計測-, 導電性ポリマー材の高機能化と用途開発最前線, NTS, 2014, 286 (195-201).

[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