

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26630243

研究課題名(和文) 近接場光による病原微生物蛍光マルチセンサの超小型・高感度化

研究課題名(英文) Hyper-miniaturization of fluorescence multisensor for pathogens with high sensitivity by evanescent light

研究代表者

佐藤 久 (Sato, Hisashi)

北海道大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80326636

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)：ガラス基板に金を蒸着した。この基板にDSPの自己組織化単分子膜を形成し、そこにリガンドである抗0157モノクローナル抗体を結合し、センサチップを作製した。K<sub>3</sub>(Fe(CN)<sub>6</sub>)およびK<sub>4</sub>(Fe(CN)<sub>6</sub>)を含む水溶液を用いてサイクリックボルタンメトリーにより大腸菌0157を定量する電気化学的センサを開発した。センサの検出限界は10 cell/mLと非常に低かった。

研究成果の概要(英文)：Gold thin film was immobilized on a glass plate. DSP molecules, which served as self-assembled monolayer, were immobilized on it. Anti-E. coli 0157 antibody was immobilized on it. The glass plate was called a sensor chip. The electrical signal was measured through a redox couple [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup>/<sup>4-</sup> by cyclic voltammetric analysis. The lower detection limit was 10 cell/mL.

研究分野：水環境工学

キーワード：バイオセンサ

### 1. 研究開始当初の背景

世界保健機構の報告によれば、世界では約 11 億人が安全な飲料水を利用できず、年間約 40 億の下痢発生病数のうちの 88%が衛生学的に安全でない飲料水の利用に起因し、下痢で年間 180 万人が死亡しており、そのほとんどが 5 歳未満の子どもである (WHO 2007 Combating waterborne disease at the household level)。わが国でも例えば腸管出血性大腸菌 O157:H7 は毎月検出されている。感染症予防および検出法：感染症の予防には、できるだけ多くの飲食物をスクリーニング検査する事、二次感染を防ぐためには感染が疑われる患者を医療機関で速やかにスクリーニング検査する事が極めて重要である。現在病原微生物は、培養、遺伝子検出、抗原抗体反応などにより検出されている。しかしながらこれらの方法は全て複雑な前処理、高度な分析技術、長い分析時間を必要とし、スクリーニング法としては極めて不適切である。スクリーニングの重要性は明白であるにもかかわらず、国内外を見ても病原微生物簡易スクリーニング技術は未だ確立されていない。

研究代表者は H22 年度から H25 年度の 4 年間、科研費挑戦的萌芽研究に採択され、蛍光分子や表面プラズモン共鳴 (SPR) を用いて病原微生物センサを開発する事に挑戦してきた。これまでの研究では O157 やノロウイルスを検出できたものの、検出限界が  $10^5$  個/mL と高かった。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、光化学分野で用いられている物理現象である「近接場光」を用いてセンサチップ上に高エネルギー電磁場を発生させ、これで蛍光色素を励起する、超高感度病原微生物センサを開発する。

### 3. 研究の方法

1cm 角に切断したガラス基板にチタン (厚さ 10 nm) および金 (厚さ 190 nm) を蒸着した。この基板を 5 mM の Dithiobissuccinimidyl propionate (DSP)-メタノール溶液に浸漬し、DSP の自己組織化単分子膜 (DSP-SAM) を形成後、そこにリガンドである抗 O157 モノクローナル抗体 (ViroStat 社 1061) を添加しアミンカップリング法により抗 O157 抗体を結合した。続いて、抗体が結合しなかった DSP-SAM の活性エステル部位に電子メディエーターとして機能するアミノフェロセンを結合した。最後に、残存した活性エステルを 1 M エタノールアミンにより不活化した。O157 がセンサチップ表面の抗 O157 抗体に捕捉されるとフェロセンの反応サイトがブロックされ、サイクリックボルタンメトリー測定時のフェロセンの酸化応答電流量が低下する。本センサではこの現象を利用して菌体濃度を定量する。この検出原理から明らかなように、センサの性能はセンサチップ表面の状態に

大きく依存する。そこで、サイクリックボルタンメトリーおよび走査型トンネル顕微鏡 (STM) を用い、センサチップ作製の各々のステップにおいて表面構造を解析した。解析の際には、試験電極にセンサチップを、対極に白金電極を、参照電極に Ag | AgCl (飽和 KCl) を使用した。

ベロ毒素非産生性の O157:H7 (ATCC 700728) を検出ターゲットとして用いた。サイクリックボルタンメトリー測定には平板型電気化学センサチップ (日立化成株式会社) を使用した。対極に金電極を用い、参照電極には内圏型酸化還元能を有する導電性高分子修飾電極 (ポリアニリン電極) を用いた。上記センサチップ作製手順に従い試験電極をセンサチップとした。

作製した平板型電気化学センサチップを、O157 (濃度  $10^1$ - $10^8$  cells/mL) を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH7.4、O157 溶液と称す) 3 mL に 30 分間浸漬し、リン酸緩衝液で洗浄した後に USB コネクタでファンクションジェネレーター内蔵型ポテンシostat (Ivium CompactStat ; 北斗電工) に接続し、サイクリックボルタンメトリー測定を 2 分 20 秒行った。その際、フェロセンの酸化応答電流量を増大させるため、電解液に 200 mM  $K_3(Fe(CN)_6)$  および 200 mM  $K_4(Fe(CN)_6)$  を含む 0.1 M NaCl 水溶液を使用した。また、本センサの交差反応性を評価するため、大腸菌 K12 (MG1655) (以下 K12) を含むサンプル溶液 (K12 溶液と称す) 3 mL に、平板型電気化学センサチップを 30 分間浸漬し、リン酸緩衝液で洗浄した後にサイクリックボルタンメトリー測定を行った。

### 4. 研究成果

サイクリックボルタンメトリーによる DSP-SAM の還元脱離法と STM による表面解析の結果、DSP の固定化時間が 30 分以上、DSP 濃度が 5 mM 以上で高配向に DSP-SAM を形成できることが分かった。DSU、DSO を用いた際は、炭素鎖数が多くなることで抵抗が大きくなり、酸化還元反応が生じるポイントと Au 表面との間で電子の移動が阻害されてしまった、と考えられる。また、濃度 5 mM で DSP を 30 分間固定化した場合のセンサ表面における DSP 濃度は  $6.70 \times 10^{-10}$  mol/cm<sup>2</sup> と算出された (n = 5)。この値は Rudzinski らが示した金表面における DSP-SAM の飽和吸着密度 ( $6.67 \times 10^{-10}$  mol/cm<sup>2</sup>) と同程度であるので、本研究では DSP-SAM を高密度に形成できたことが示唆された。また、サイクリックボルタンメトリーを用いて他のパラメーターも最適化した。その結果、SAM の炭素鎖数を 3 (すなわち DSP)、アミノフェロセン溶媒を pH7.4 の PBS、アミノフェロセンの固定化時間を 15 分、抗体固定化時間を 60 分、エタノールアミンによる不活化時間を 15 分と決定した。4 種類の基板表面を FT-IR を用いて解析した。基板は DSP を固定化したもの、DSP、アミ

ノフェロセンを固定化したもの、 DSP と抗体を固定化したもの、 DSP、抗体、アミノフェロセン、エタノールアミンを固定化したもの、である。測定器内を完全な真空状態にはすることができなかつたために空気中の水分や二酸化炭素のピークが生じてしまった。の基板表面では  $1620\text{ cm}^{-1}$  に -C-O- の対称伸縮振動のピークがみられ、これはエタノールアミン由来のものと考えられる。アミノフェロセン、抗体、基板表面、いずれも  $1218\text{ cm}^{-1}$  にアミド結合由来の -C-N- 対称伸縮振動ピークが見られた。表面に抗体が固定化されると、構造由来の様々なピークが得られたが、振動の向きなどがランダムであるため、同定することが難しかった。

4 種類の基板表面を STM を用いて解析した。基板は 何も固定化していない基板、 DSP を固定化した基板、 DSP、アミノフェロセンを固定化した基板、 DSP、抗体、アミノフェロセンを固定化した表面、である。それぞれの段階で表面が構築されて一定いることが確認できた。との表面はもっとも特徴的であった。では大きな黒点が目立っていた。電荷密度の低いフェロセンの鉄原子が点在していることが確認できた。また、では白い棒状の影を確認できた。の STM イメージをさらに色強度を調製し確認しやすくなったイメージを解析した。抗体と思われる多くの Y 字構造を確認できた。

0157 を測定した ( $n = 4$ )。0157 はベロ毒素非産生性の大腸菌 0157:H7 を使用し、Brilliant Green Bile Broth (BGGB) 培地にて 20 時間程度、37 のインキュベーター内で振とう培養した。その後、遠心機 (ハイブリット冷却遠心機; 久保田商事株式会社) を使用し、6000rpm ( $4830 \times g$ ) で 5 分間遠心分離した。上澄み液を排液した後 PBS を投入し、Vortex で再懸濁させた後再度遠心分離、PBS 置換を行った。その後、OD 計 (SmartSpec Plus スペクトロフォトメーター; BIO-RAD 社) を用いて濁度から 0157 濃度を測定した。濃度測定後、PBS を用いて各濃度に希釈した 0157 サンプル溶液 1mL を用意した。

検出原理から予想される通り 0157 濃度の増加に伴い酸化応答電氣量が低下した。0157 を含まない溶液の酸化応答電氣量は  $105\text{ }\mu\text{C}/\text{cm}^2$  (標準偏差  $1.91\text{ }\mu\text{C}/\text{cm}^2$ )、 $10\text{ cell}/\text{mL}$  の 0157 サンプル溶液の酸化応答電氣量は  $84.4\text{ }\mu\text{C}/\text{cm}^2$  (標準偏差  $14.8\text{ }\mu\text{C}/\text{cm}^2$ ) であり、低濃度のサンプル溶液の測定も可能であった。検量線のダイナミックレンジは 8 桁と極めて広がった。次に、K12 溶液にセンサチップを浸漬させた後のサイクリックボルタンメトリ測定を行った ( $n = 4$ )。K12 を含まない溶液と  $10^6\text{ cells}/\text{mL}$  の K12 を含むサンプル溶液の酸化電氣量に著しい変化はなかった。この結果より、センサ表面の抗 0157 抗体が K12 を捕捉せず、センサ表面のフェロセンの反応サイトがブロックされなかつたことが示唆された。

本研究で使用した平板型電気化学センサチップは寸法  $12\text{W} \times 35\text{D} \times 2\text{H mm}$ 、電気化学装置は寸法  $120\text{W} \times 260\text{D} \times 25\text{H mm}$ 、重量 600 g と非常に小型であり、ノート PC に接続することで容易に測定できた。操作時間を含め、分析時間は 40 分以内であった。

本研究では市販の抗 0157 抗体とフェロセンを固定化したセンサチップを用いることで、高感度なラベルフリー腸管出血性大腸菌 0157 バイオセンサを開発した。このセンサを用いることで定量的に 0157 を検出できた。また、開発したセンサは K12 に対する交差反応性を示さなかつた。今後は食品や水中の 0157 濃度を分析する。また、他の病原微生物センサを開発する。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

1. 山田健太、矢嶋健人、川口俊一、石井聡、佐野大輔、高橋正宏、佐藤久 サイクリックボルタンメトリーを用いた腸管出血性大腸菌 0157 バイオセンサの開発. 第 49 回日本水環境学会年会. 金沢大学・金沢 (20150318)

[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  
<http://www.eng.hokudai.ac.jp/labo/aqua/contents/HisashiSato/index-HisashiSato.html>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 久 (SATO, Hisashi)

北海道大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：80326636

(2)研究分担者

石井 聡 (ISHII, Satoshi)

北海道大学・大学院工学研究院・助教

研究者番号：10612674

(3)連携研究者

( )

研究者番号：