

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：16401  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2018～2021  
課題番号：18K05174  
研究課題名(和文) バクテリオファージをテーラード細菌認識素子とする新奇な細菌検出技術の開発

研究課題名(英文) Development of novel bacterial detection methods using bacteriophages as recognition elements

研究代表者  
渡辺 茂 (Watanabe, Shigeru)  
高知大学・教育研究部総合科学系複合領域科学部門・教授

研究者番号：70253333  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：金ナノ粒子をガラスビーズ上に集積化した後、その表面にファージを担持させることでファージ修飾金平糖型金ナノ粒子を調製した。これを各種細菌と混合後、暗視野顕微鏡を用いて観察すると細菌に結合した金平糖型金ナノ粒子が発する強力な散乱光によって、細菌を容易に検出できることがわかった(検出限界～10,000 cfu/ml)。また、金平糖型金ナノ粒子は粒子表面に担持させたファージの宿主以外には結合せず、その選択性は属のみならず種レベルに至ることがわかった。本手法は、利用するファージを変えることによって細菌選択性を自在に制御できる可能性があり、多種多様な細菌の高選択的な検出への応用が期待できる。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

バクテリオファージは、細菌特異的に感染するウイルスの総称であり、標的細菌を特異的に識別する機能を備えている。本研究では、抗体に代えバクテリオファージを利用した新たな細菌検出技術を開発し、ファージが微生物学・医学分野のみならず分析化学分野に置いても強力な分析ツールとなることを実証した。また、本技術は遺伝子や免疫検出法に代わる迅速かつ簡便な細菌検出法への応用が期待できる。迅速な微生物検査は、早期診断・治療および二次感染の予防に不可欠であり、現場の衛生管理をはじめ緊急検査、診察前至急検査、在宅検査のみならず災害時においても感染症の発生・拡大防止に活用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Phage-modified konpeito-like gold nanoparticles have been prepared by self-assembling phage on the surface of gold nanoparticles accumulated on glass beads. The konpeito-like gold nanoparticles were mixed with various bacteria and observed using a dark-field microscope. The bacteria were easily detected by the strong scattered light emitted by the konpeito-like gold nanoparticles bound to the bacteria (detection limit (LOD) 10000 cfu/ml). The gold nanoparticles do not bind to any host other than the host of the phage loaded on the surface of the particles, and the selectivity of the gold nanoparticles reaches not only the genus but also the species level. This method has the potential to control the bacterial selectivity of gold nanoparticles by changing the phage used, and is expected to be applied to the rapid and highly selective detection of bacteria.

研究分野：分析化学

キーワード：金ナノ粒子 バクテリオファージ 暗視野顕微鏡 光散乱 プラズモニクス 細菌

## 1. 研究開始当初の背景

細菌感染症は公衆衛生に対する世界的な脅威であり、病原性細菌を正確かつ迅速に検出・同定することは、公衆衛生のみならず医療診断、食品安全、環境モニタリング、バイオテロ対策の観点からも特に重要である。しかし、従来の培養に基づく方法は、安価で簡単であるが手間と時間がかかり、培養可能な細菌にしか適応できない。近年、病原性細菌を迅速かつ高感度に検出するために、培養に依存しない手法が数多く開発されており、その中でも分子生物学的手法や免疫学的手法が最もよく利用されている。しかし、PCR法は選択されたプライマーとプローブの品質に特に敏感であり、イムノアッセイ法は親和性の高い抗体をいかに入手できるかにかかっている。最近では、これらの手法に加えてバイオセンサーが着目されている。

バイオセンサーは、標的を識別するバイオレセプターと標的認識現象を検出可能な信号に変換するトランスデューサーから構成されている。バイオセンサーにとって最も重要な構成要素は、その選択性を決定するバイオレセプターであり、抗体、酵素、DNA、アプタマー、レクチンなど様々な生体材料が利用されてきた。近年“バクテリオファージ(ファージ)”が、抗体に代わる有望なバイオレセプターとして注目を集めている。ファージは細菌にのみ感染するウイルスの一種であり、人体や動植物には無害で抗体よりも低コストかつ短時間で調製でき、保存期間も長い。自然界には多種多様なファージにあふれており、それぞれの細菌には特異的なファージが存在する。従って、標的細菌に特異的なファージをバイオレセプターとして利用することで、多種多様な細菌の高選択的な検出が期待できる。

このようなファージの感染特異性を利用した細菌検出技術は、ファージタイピングなど応用微生物学の観点から研究が進められている。しかし、ファージを細菌に対するバイオレセプターとしてとらえ、ナノ粒子をはじめとしたナノ材料と融合させることで新たな細菌検出技術を開発しようとする分析化学的アプローチは、まだ緒に就いたばかりである。

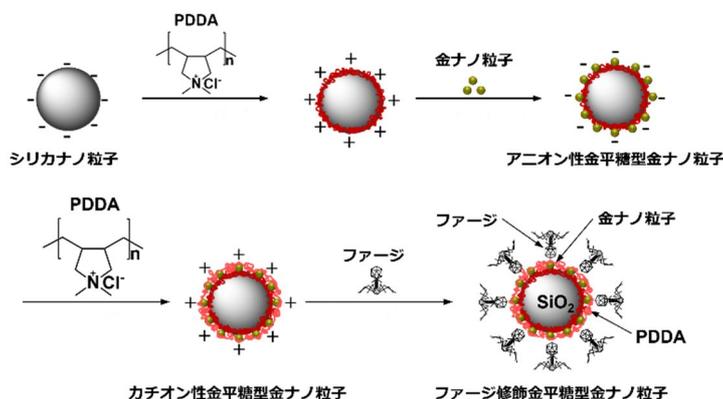
## 2. 研究の目的

本研究では、ファージを新たなバイオレセプターとして、光散乱特性に優れる金ナノ粒子とハイブリッド化した“ファージ修飾金平糖型金ナノ粒子”を作製し、金平糖型金ナノ粒子が発する強力な散乱光を通して細菌を高選択的に検出する細菌検出法を開発する。その原理実証を通して、ファージとナノ粒子のハイブリッド技術の開発やハイブリッドナノ粒子の構造最適化および検出技術の定性・定量評価を実施し、ファージが微生物学・医学分野のみならず分析化学分野においても強力な分析ツールとなることを示す。

## 3. 研究の方法

金ナノ粒子は、プラズモン共鳴に起因する強い光散乱を示し、その散乱断面積は粒径の6乗に比例する。そのため、ある程度の粒径があれば非常に強い散乱光によって、暗視野顕微鏡による光学観察が可能である。従って、金ナノ粒子の凝集体は、優れた光散乱体となることが期待される。しかし、凝集体の大きさや形状を制御し、均質な光散乱体を形成することは困難である。そこで、シリカナノ粒子(粒径 300 nm)上に金ナノ粒子(粒径 32.5 nm)を固定化した金平糖型金ナノ粒子を新たな光散乱体として設計し、交互積層法(LbL: Layer-by-Layer self-assembly)を利用して作製方法を検討した。さらに、静電的相互作用を利用して配向を制御しながら、その表面にファージを担持させる方法について検討し、細菌検出用プローブを作製した(スキーム 1)。

ファージ修飾金平糖型金ナノ粒子の光散乱特性を測定するとともに、各種細菌を分散させた緩衝溶液と混合し、暗視野顕微鏡を用いて選択的に標的細菌を検出できるか検討した。この時、ファージの有無が、金平糖型金ナノ粒子の細菌選択性に重要な役割を担うことを検証した。また、金平糖型金ナノ粒子が結合した細菌から最も強力な散乱光が観察される金平糖型金ナノ粒子と細菌の最適混合比について検討した。さらに培養法で得られた細菌数に対して検量線を作成し、検出範囲や検出限界を算出した。



スキーム 1.

## 4. 研究成果

**スキーム 1** にファージ修飾金平糖型ナノ粒子の合成法を示す。シリカナノ粒子(粒径:300 nm)とポリ(ジアリルジメチルアンモニウムクロリド)(PDDA)を混合し,粒子表面をカチオン性ポリマーで被覆後,アニオン性のクエン酸還元金ナノ粒子(粒径:32.5 nm)を吸着させることによって金平糖のような形をした金平糖型金ナノ粒子を合成した。

ファージを細菌認識部位として利用する場合,最も注意しなければならないことはファージの配向制御である。ファージの宿主特異性は,尾部に存在する吸着タンパク質にある。その機能を最大限発揮させるには,頭部を粒子表面に向け,細菌と結合可能な状態で固定化する必要がある(図 1)。金平糖型金ナノ粒子のファージ修飾には,静電的相互作用を介した配向制御法を利用した。一般に静電的相互作用を利用してリガンドとなる生体分子を粒子表面に固定化する方法は,簡便性に優れるもののリガンドの配向を制御することが難しく,固定化されたりリガンドはランダム配向となる。しかし,ファージの場合,ポリアニオンである DNA を格納している頭部は,尾部に比べて負電荷を帯びており,正電荷を帯びた粒子表面に対して頭部を向けて結合する。この手法は,分子生物学的あるいは化学的修飾をファージに加える必要がなく,単離したファージを直接利用できるなど簡便性において優れている。合成直後の金平糖型金ナノ粒子は,最表層がアニオン性金ナノ粒子で被覆されており負電荷を帯びている。そのため,このままでは負電荷を帯びたファージ頭部を粒子表面に向かって吸着させることができない。そこでファージの吸着に先立ち,カチオン性ポリマー(PDDA)で被覆し,正電荷を帯びさせた後,ファージを吸着させることによってファージ修飾金ナノ粒子を作製した。

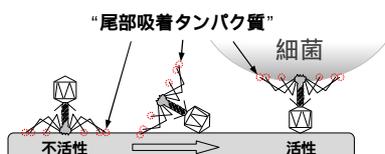


図 1. ファージの配向と細菌吸着機能の関係性

図 2 に細菌や金平糖型金ナノ粒子の暗視野顕微鏡像を示す。粒径が 30 nm の金ナノ粒子の場合,散乱光が少なく観察できなかったがこれをシリカ粒子表面に集積化したファージ修飾金平糖型金ナノ粒子では,単一粒子が明確に観察され(図 2c),金平糖型金ナノ粒子が優れた光散乱体であることを確認した。また,金平糖型金ナノ粒子は黄色い散乱光を発生しており,黄色ブドウ球菌や大腸菌など細菌が発する青白い散乱光とは異なっていることがわかった(図 2a, b)。さらに,このような金平糖型金ナノ粒子が複数個結合した黄色ブドウ球菌からは,最も強力な白黄色の散乱光が観察されることがわかった(図 2d)。

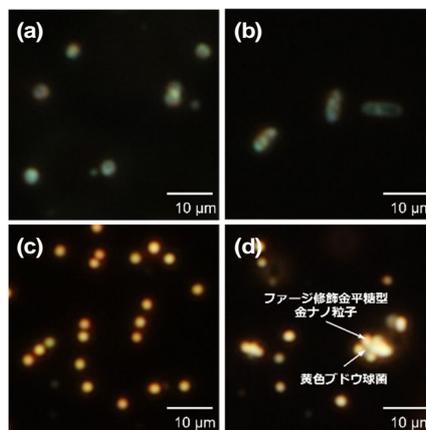


図 2. 暗視野顕微鏡像:(a)黄色ブドウ球菌 (*S.aureus*), (b) 大腸菌 (*E.coli*), (c) ファージ修飾金平糖型金ナノ粒子, (d) *S.aureus* と S13'ファージ修飾金平糖型金ナノ粒子の混合試料

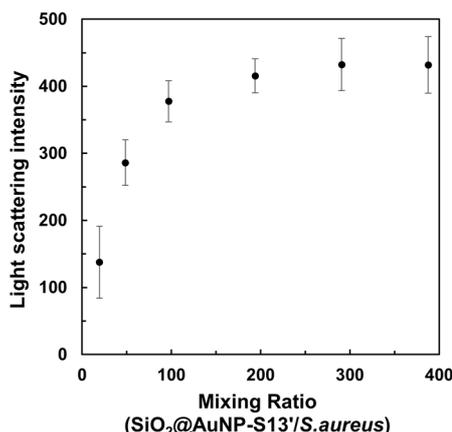


図 3. ファージ修飾金平糖型金ナノ粒子と黄色ブドウ球菌 (*S.aureus*) の混合比に依存した細菌の散乱光強度

図 4 は, S13' ファージを担持させる前後の金平糖型金ナノ粒子を黄色ブドウ球菌や大腸菌とそれぞれ混合し,暗視野顕微鏡で観察した結果を示している。ファージ未修飾金平糖型金ナノ粒子は,両細菌を区別することなく細菌に吸着する様子が観察された(図 4e,f)。これは,ファージ未修飾金平糖型金ナノ粒子は,最表面がカチオン性ポリマーで被覆され正電荷を帯びており,そのため負電荷を帯びた細菌表面に静電的相互作用を介して細菌の種類に関係なく非特異的に結合したと考えられる。

ファージ修飾金平糖型金ナノ粒子が結合した細菌が発する散乱光の強度は,細菌に結合する金平糖型金ナノ粒子の粒子数が多いほど増大し,細菌とファージ修飾金平糖型金ナノ粒子の混合比に依存すると考えられる。そこで,様々な混合比で調製した試料を暗視野顕微鏡で観察し,細菌が発する散乱光強度を混合比に対してプロットした(図 3)。細菌量に対して 200 倍のファージ修飾金平糖型金ナノ粒子を添加した時,細菌が発する散乱光強度が最大に達した。それ以上の金平糖型金ナノ粒子を添加しても,観察される散乱光強度にほとんど変化は認められなかったことから最適混合比を 200 倍とした。

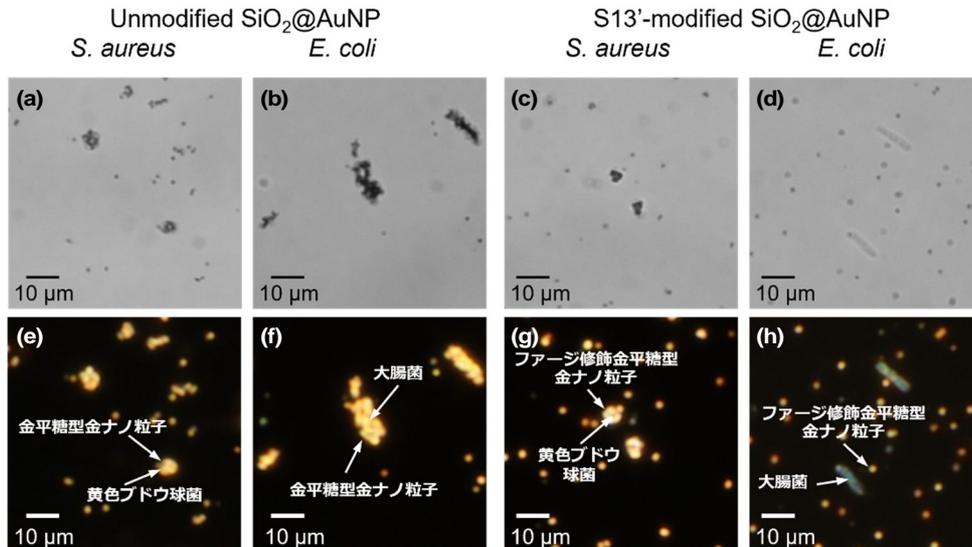


図4. S13'ファージ未修飾またはS13'ファージ修飾金平糖型金ナノ粒子と黄色ブドウ球菌 (*S.aureus*) もしくは大腸菌 (*E.coli*) と混合した試料の明視野顕微鏡像(a) - (d)と暗視野顕微鏡像(e) - (h)。

一方, S13'ファージ修飾金平糖型金ナノ粒子では, S13'ファージの宿主である黄色ブドウ球菌 (*S.aureus*) にのみ結合し, 強力な散乱光を発する様子が観察された (図4g, h)。このことは, S13'ファージ修飾金平糖型金ナノ粒子と黄色ブドウ球菌や大腸菌を混合し, 観察した走査型電子顕微鏡像からも確認された (図5)。さらに, 同じ黄色ブドウ球菌種である *S. pseudintermedius* と混合しても S13'ファージ修飾金平糖型金ナノ粒子が結合の様子は観察されなかった。粒子表面に固定化されたファージが, 失活することなく属のみならず種レベルで細菌認識機能を発現できることが明らかになるとともに, 静電的相互作用を介した簡便な方法でも, 細菌の検出に十分なファージの配向制御が達成できることがわかった。

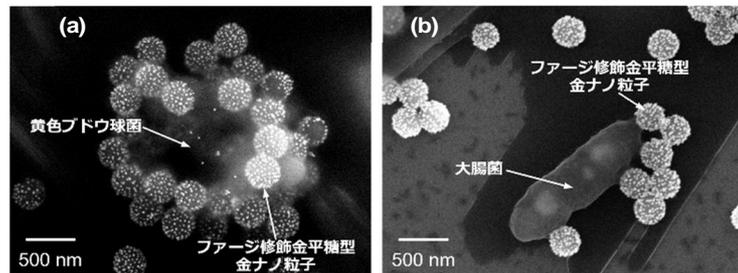


図5. S13'ファージ修飾金平糖型金ナノ粒子と (a) 黄色ブドウ球菌 (宿主) または (b) 大腸菌の混合試料の走査型電子顕微鏡像。

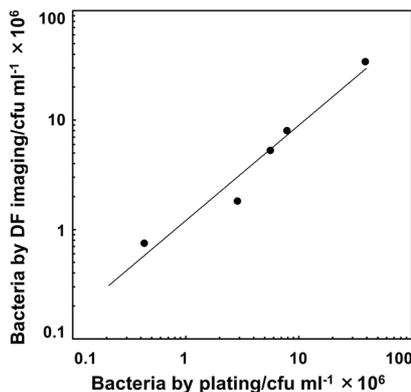


図6. S13'ファージ修飾金平糖型金ナノ粒子を利用して暗視野顕微鏡法で検出された黄色ブドウ球菌 (*S.aureus*) 数と培養法で求められた細菌数の相関性

な存在である。ファージは細菌の数だけ存在しており, 多種多様な細菌を標的とした細菌検出への応用が期待できる。また, 可視領域に強力な光吸収や光散乱を示す金ナノ粒子は, 目視による検出など迅速細菌検査に欠かせない光学的特性を備えている。安全安心な社会の重要性が再認識される中, 両者の特異性を巧みに利用した迅速かつ高感度・高選択的な細菌検出法の開発をより一層推進する。

さらに図6に培養法で得られた試料中の細菌数に対して暗視野顕微鏡法で検出した細菌数をプロットして作成した検量線を示す。細菌数が,  $1 \times 10^5$  cfu/ml ~  $1 \times 10^8$  cfu/ml の間で良好な直線関係 (相関係数 0.998) が得られ, 検出限界値は  $8 \times 10^4$  cfu/ml となった。これは, 事前濃縮や酵素反応を利用した検出信号の増幅を全く行うことなく, 光学顕微鏡で検出可能な限界値と同等のレベルにある。

細菌の抗原抗体検査における抗体の代替として細菌の天敵ウイルス (“バクテリオファージ”) に着目し, 金ナノ粒子と組合わせた新たな細菌検出法を開発した。細菌検出において, ファージは抗体に勝るとも劣らない機能を備えており, 特にパンデミックなど緊急時に迅速細菌検査の社会的重要性が一挙に高まることを考えると, 生産性や即応性に優れたファージは極めて貴重

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Imai Masashi, Mine Kouhei, Tomonari Haruna, Uchiyama Jumpei, Matuzaki Shigenobu, Niko Yosuke, Hadano Shingo, Watanabe Shigeru	4. 巻 91
2. 論文標題 Dark-Field Microscopic Detection of Bacteria using Bacteriophage-Immobilized SiO <sub>2</sub> @AuNP Core/Shell Nanoparticles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 12352 ~ 12357
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.analchem.9b02715	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山下 智史, 仁子 陽輔, 波多野 慎悟, 渡辺 茂, 内山 伊代, 内山 淳平, 松崎 茂展
2. 発表標題 バクテリオファージを利用した細菌の金ナノ粒子凝集比色検出
3. 学会等名 日本化学会 第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今井 齊志, 仁子陽輔, 波多野慎悟, 渡辺 茂, 内山伊代, 内山淳平, 松崎茂展
2. 発表標題 バクテリオファージを利用した細菌の高選択的な細菌検出技術の開発
3. 学会等名 日本分析化学会 第69年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今井 齊志, 仁子陽輔, 波多野慎悟, 渡辺 茂, 内山伊代, 内山淳平, 松崎茂展
2. 発表標題 バクテリオファージを用いた細菌の超選択的な暗視野顕微鏡検出技術の開発
3. 学会等名 第10回CSJ化学フェスタ2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 関田慎也, 山下智史, 仁子陽輔, 波多野慎悟, 渡辺茂, 松崎茂展, 内山伊代, 内山淳平
2. 発表標題 蛍光色素含有ナノ粒子担持バクテリオファージの開発と細菌検出への応用
3. 学会等名 2020年色材研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今井斉志, 仁子陽輔, 波多野慎悟, 渡辺 茂, 松崎茂展, 内山淳平
2. 発表標題 バクテリオファージ修飾SiO <sub>2</sub> @AuNPs コア-シェル型ナノ粒子を利用した細菌の暗視野顕微鏡検出
3. 学会等名 第9回CSJ化学フェスタ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下智史, 仁子陽輔, 波多野慎悟, 渡辺 茂, 松崎茂展, 内山淳平
2. 発表標題 チオール化バクテリオファージを利用した細菌の金ナノ粒子凝集比色検出
3. 学会等名 2019年日本化学会中四国支部大会徳島大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 関田慎也, 仁子陽輔, 波多野慎悟, 渡辺 茂, 松崎茂展, 内山淳平
2. 発表標題 高輝度蛍光性ナノエマルションの作製と細菌検出用プローブへの応用
3. 学会等名 高知化学シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 関田慎也, 山下智史, 齋藤愛梨, 仁子陽輔, 波多野慎悟, 渡辺 茂
2. 発表標題 高輝度蛍光ナノエマルジョンの作製と細菌検出への応用
3. 学会等名 第79回分析化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤愛梨, 越智里香, 波多野慎悟, 渡辺 茂, 仁子陽輔
2. 発表標題 目視による細菌検出を志向した蛍光性ナノエマルジョンの開発
3. 学会等名 日本化学会第98 回春季年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤愛梨, 越智里香, 波多野慎悟, 渡辺 茂, 仁子陽輔
2. 発表標題 細菌検出を可能とする色素含有型高輝度ナノエマルジョンの開発
3. 学会等名 高知化学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤愛梨, 越智里香, 波多野慎悟, 渡辺 茂, 仁子陽輔
2. 発表標題 色素含有エマルジョンを用いた細菌検出用蛍光ナノセンサーの開発
3. 学会等名 第8 回CSJ 化学フェスタ2018
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	内山 淳平  (Uchiyama Jyunpei)  (20574619)	岡山大学・医歯薬学域・准教授   (15301)	
研究 分担者	松崎 茂展  (Matuzaki Shigenori)  (00190439)	高知学園大学・健康科学部・教授   (36403)	
研究 分担者	仁子 陽輔  (Niko Yousuke)  (20782056)	高知大学・教育研究部総合科学系複合領域科学部門・助教   (16401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------