

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24656306

研究課題名(和文) 表面プラズモン共鳴を利用したO157ハイスループットスクリーニング法の開発

研究課題名(英文) Development of a surface plasmon resonance sensor for high throughput screening of O157

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) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：病原微生物の検出には、迅速性、簡便性、信頼性、精度などが求められる。現在、病原微生物は培養により、遺伝子を検出することにより、または抗体を用いて検出されているが、それぞれに一長一短がある。本研究では腸管出血性大腸菌O157を表面プラズモン共鳴(SPR)で検出することを試みた。O157検出用SPRセンサ基板の表面を解析しを行い、センサ基板が問題なく作製できていることを明らかにした。このセンサ基板を装着したセンサを用いて、検出限界 $10^8$  cells/mLでO157サンプルを検出できた。本センサは繰り返し利用できた。

研究成果の概要(英文)：Escherichia coli (E. coli) can contaminate drinking water, posing a significant threat to public health safety. In order to prevent such serious health problems, identification and quantification of the bacteria is of great importance. At present, various promising approaches have been introduced over the past decade to identify and quantify pathogens in water samples. However, these existing techniques are complex and require enrichment, fluorescent labelling and longer time to obtain results. Thus, rapid and easy-to-use screening tools of pathogens in water samples are still needed in field settings or even at home. The objective of this study is to develop a SPR biosensor for rapid detection of E. coli O157:H7 in liquid samples. We could determine E. coli O157:H7 within 20 min. the detection limit of the sensor was  $10^8$  cells/mL. Glycine-HCl solution regenerated the sensor.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：センサ

### 1. 研究開始当初の背景

O157 等の腸管出血性大腸菌は、腹痛、下痢、血便などを主症状とする感染症を引き起こし、最悪の場合は感染者を死に至らしめる。厚生労働省の発表によれば患者数は多い年で一万を超え、数年に一度死者が出ている。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。現在厚生労働省は、培養法および VT(ペロ毒素) 遺伝子検出法(PCR 法、LAMP 法、Real-time PCR 法)を O157 検出法として定めている。しかしながらこれらの方法は全て複雑な前処理(培養、PCR 反応)と高度な分析技術が必要とし、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 O157 簡易スクリーニング技術は未だ確立されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、蛍光法ではなく医学生理学分野で高感度分析に用いられている「SPR による抗原抗体反応分析法」を用いた O157 センサを開発する。センサチップに O157 抗体を固定する方法を確立する。非病原性 O157 を用いてセンサの性能(レスポンスタイム、選択性、検出限界)を明らかにする。

O157 抗体を変えてセンサの性能を解析し最適な抗体を明らかにする。河川水、水道水、下水、食品、糞便に非病原性 O157 を添加しセンサの環境サンプルへの応用可能性を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) O157 抗体の固定化：ウイルス吸着タンパク質の固定化技術を確立した。O157 抗体の固定化も同様の方法で問題なく固定化できた。ウイルス吸着タンパク質固定化法(アミンカップリング法)を以下に示す。金薄膜が蒸着されたガラス板を購入した。金薄膜上に 0.01M の 11-メルカプトウンデカン酸のリン酸緩衝液を 100 $\mu$ M 滴下した。これにより金薄膜上にメルカプトウンデカン酸の自己集合膜 (Self-Assembled Monolayer : SAM) が形成される。SAM を用いることによりタンパク質をガラス表面に単分子固定することができる。次に、メルカプトウンデカン酸のもう一方の末端基であるカルボキシル基を、1-エチル-3-(3 ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩を使って、N-ヒドロキシこはく酸イミドのエステルとした。活性化カルボキシル基にタンパク質を含むリン酸緩衝液を滴下し、タンパク質を固定することに成功した。

(2) O157 抗体の固定化：アミンカップリング法により O157 抗体をセンサチップに固定した。上記の方法により O157 抗体をガラ

スに固定した。SAM として、11-メルカプトウンデカン酸以外のメルカプトカルボン酸も使用し、固定化効率を明らかにする。センサの O157:H7 への特異性を高めるためモノクローナル抗体を用いた。開発時間を短縮するために市販の O157 抗体を用いた。以上の研究戦略により、研究を効率的に進めることができた。

(3) O157 抗体の性能評価：センサチップを SPR 装置に装着する。非病原性の O157:H7 を異なる濃度で暴露し、O157:H7 濃度に対する検量線を作成する。非病原性 O157:H7 を培養する。リン酸緩衝液に高濃度に O157:H7 を濃縮する。適宜希釈し、様々な濃度の O157:H7 標準液を作製する。シリンジポンプ(アズワン SPS-1)を用いて流量 20  $\mu$ L/min で O157:H7 標準液をセンサチップに供給する。センサチップ上はあらかじめポリジメチルシロキサン (PDMS) 製のマイクロ流体チップ(容積 100 $\mu$ L)で覆っておく。SPR スペクトルを 0.5sec 毎に解析し、センサのレスポンスタイムを明らかにする。作成した検量線から検出限界および感度(検量線の傾き)を解析する。数種類の非病原性大腸菌標準株 (K12 など)を用いて、センサの O157:H7 に対する特異性を明らかにする。

(4) O157 抗体の最適化：複数の O157 抗体を購入し、各抗体を用いてセンサチップを作製し、性能を評価することで、SPR センサにとって最適な O157 抗体を明らかにする。アミンカップリング法により複数の O157 抗体を、各々ガラスに固定し、複数のセンサチップを作製する。「3. O157 抗体の性能評価」と同様の方法で各センサチップのレスポンスタイム、検出限界、感度、特異性を明らかにする。この結果から、SPR センサにとって最適な抗体を明らかにする。

(5) O157 抗体の性能評価：最適なセンサチップを SPR 装置に装着する。環境サンプルに O157:H7 を異なる濃度となるように添加し、O157:H7 濃度に対する検量線を作成する。センサへの夾雑物の影響を明らかにする。この結果から、本センサの環境サンプルへの応用可能性を明らかにする。最適化されたセンサチップを用いて SPR センサを作製する。環境サンプル(河川水、水道水、下水、食品、糞便など)に非病原性の O157:H7 を異なる濃度で添加し、O157:H7 濃度に対する検量線を作成する。「3. O157 抗体の性能評価」と同様の方法で各センサチップのレスポンスタイム、検出限界、感度、特異性を明らかにする。センサへの夾雑物(SS、有機物、無機イオン、微生物)の影響を明らかにする。夾雑物がセンサ検出値に悪影響を及ぼすことが判明した場合には、簡単な前処理(フィルターを用いたろ過、遠心分離、pH 調整、キレート剤の添加など)を施す。この結果から、本センサの環境サンプルへの応用可能性を明らかにする。

#### 4. 研究成果

センサチップ表面に DAPI 染色した O157 を供給し蛍光顕微鏡で観察した。O157 密度を測定したところ  $6.7\text{cells}/\text{視野}(n=6)$  であった。一方、抗体を固定化していないセンサチップ表面の O157 密度は  $0.5\text{cells}/\text{視野}(n=2)$  であった。この結果から、O157 は抗原抗体反応によりセンサチップに補足されること、抗体がなくても O157 は非特異的にセンサチップに補足される場合があることが明らかとなった。

サイクリックボルタンメトリーにより 11-MUA 形成密度は  $7.4 \times 10^{-10}\text{mol}/\text{cm}^2$  と算出された。金薄膜への 11-MUA の飽和吸着密度  $8.3 \times 10^{-10}\text{mol}/\text{cm}^2$  と比較すると、作製したセンサ基板には高密度で 11-MUA の SAM が形成されていることが示唆された。引き続き NHS エステル化した基板表面では、11-MUA の SAM のみが形成された基板には見られなかった窒素原子のピークが観察された。これは NHS の窒素原子に由来するものと考えられることから、基板表面の SAM のカルボキシ基が NHS エステル化されたことが分かった。濃度 0.1、1 または  $10\mu\text{g}/\text{mL}$  の抗体含有 PBS 溶液を SPR センサ基板に供給したところ、抗体濃度に比例して SPR シグナルが上昇したため、抗体が高濃度である方がセンサ基板に抗体が効率よく固定化されたと考えられた。この結果から、抗体濃度  $10\mu\text{g}/\text{mL}$  でセンサ基板を作製し、下記の O157 検出およびセンサ再生実験を行った。

次に、サンプル中の O157 を検出することを試みた。これまでに本研究グループで SPR を用いて O157 を検出した実験において検出限界は  $10^8\text{cells}/\text{mL}$  であった。O157 は抗体よりも 2 桁程度大きいためセンサチップに補足されにくいのではないかと考え、O157 を粉碎することが検出限界に与える影響を検討した。光導波路分光装置にランニングバッファを供給しセンサシグナル(共鳴波長)が安定するまで待った。3 分後、粉碎した O157(粉碎前の濃度は  $10^6\text{cells}/\text{mL}$ ) を含むサンプルを供給した。この時には有為なセンサシグナルの増大は見られなかった。次に  $10^7\text{cells}/\text{mL}$  に相当するサンプルを供給したがそれでもセンサシグナルの増大は見られなかった。62 分後、 $10^8\text{cells}/\text{mL}$  に相当するサンプルを供給したところ、センサシグナルは 15 分間に  $637.8\text{nm}$  から  $638.5\text{nm}$  に増大した。その後ランニングバッファで洗浄したところ、センサシグナルは  $638.4\text{nm}$  で安定した。この結果から、 $10^8\text{cells}/\text{mL}$  に相当する粉碎 O157 サンプルは  $0.6\text{nm}$  のセンサシグナルの変化をもたらすことが明らかとなった。当初、O157 を粉碎すると検出限界が低下すると予想したが、検出限界は変化しなかった。

SPR センサへ O157 サンプルを供給した結果、O157 濃度  $10^8\text{cells}/\text{mL}$  以上で有意な SPR シグナル(共鳴波長の変化)が得られた。そこでセンサ基板の再生実験では、 $10^8\text{cells}/\text{mL}$  の

O157 サンプルおよび再生溶液を交互に供給した。O157 サンプルの供給を 12 分間  $\times 4$  行なった結果、サンプル供給の前後で  $0.52 \pm 0.07\text{nm}$  の SPR シグナル上昇がみられた。4 回の試験におけるサンプル供給前の PBS 送液時のシグナルの変動から算出したドリフトは  $0.07\text{nm}$  以下であり、開発したセンサで  $10^8\text{cells}/\text{mL}$  の O157 サンプルを検出できたことは明らかである。さらに、本センサは繰り返し利用できることも明らかとなった。

#### 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 12 件)

1. N. Pitakteeratham, Y. Sakamaki, K. Yamada, S. Ishii, M. Takahashi, S. Okabe, H. Satoh 2013. Development of surface plasmon resonance (SPR) biosensor for Escherichia coli O157. ica2013. 18-20 Sep. 2013, Narbonne, France.
2. Y. Sakamaki, K. Yamada, D. Sano, M. Takahashi, S. Okabe, H. Satoh 2013. Rapid and Label-Free Detection of Norovirus GI.4 by Surface Plasmon Resonance. ica2013. 18-20 Sep. 2013, Narbonne, France.
3. 坂槇 有紀恵・山田 健太・津田 収・大森 徹・川口 俊一・高橋 正宏・岡部 聡・佐藤 久 表面プラズモン共鳴を利用した病原微生物バイオセンサの開発. 第 48 回日本水環境学会年会. 東北大学・仙台 (20140318)
4. 津田 収・坂槇 有紀恵・山田 健太・大森 徹・川口 俊一・佐藤 久・高橋 正宏・岡部 聡 表面プラズモン共鳴を利用した迅速な腸管出血性大腸菌 O157 バイオセンサの開発. 第 48 回日本水環境学会年会. 東北大学・仙台(20140318)
5. 山田 健太・Niti Pitakteeratham・坂槇 有紀恵・石井 聡・高橋 正宏・岡部 聡・佐藤 久 表面プラズモン共鳴を利用した病原微生物バイオセンサの開発. 日本分析化学会第 62 年会. 近畿大学・東大阪 (20130911)
6. 坂槇 有紀恵、山田 健太、佐野 大輔、高橋 正宏、岡部 聡、佐藤 久 表面プラズモン共鳴を利用したノロウイルスバイオセンサの開発. 日本分析化学会 第 73 回分析化学討論会. 北海道大学・函館 (20130518)
7. 山田 健太、ピタクティエラム ニティ、坂槇 有紀恵、石井 聡、高橋 正宏、岡部 聡、佐藤 久 表面プラズモン共鳴を利用した大腸菌 O157 バイオセンサの開発. 日本分析化学会 第 73 回分析化学討論会. 北海道

- 大学・函館(20130518)
8. 坂楨 有紀恵、山田 健太、佐野 大輔、高橋 正宏、岡部 聡、佐藤 久 表面プラズモン共鳴を利用した病原微生物バイオセンサの開発. 第 47 回日本水環境学会年会. 大阪工業大学・大阪(20130312)
  9. 山田 健太、ピタックティータム ニティ、坂楨 有紀恵、石井 聡、高橋 正宏、岡部 聡、佐藤 久 表面プラズモン共鳴を利用した大腸菌 O157 バイオセンサの開発. 第 47 回日本水環境学会年会. 大阪工業大学・大阪(20130312)
  10. 坂楨 有紀恵、山田 健太、ピタックティータム ニティ、石井 聡、佐野 大輔、高橋 正宏、岡部 聡、佐藤 久 表面プラズモン共鳴を利用した病原微生物バイオセンサの開発. 第 49 回環境工学研究フォーラム. 京都大学・京都(20121129)
  11. 坂楨 有紀恵・山田 健太・高橋 正宏・岡部 聡・佐藤 久 表面プラズモン共鳴を用いた水中病原性微生物バイオセンサ. 日本分析化学会第 61 年会. 金沢大学・金沢(20120919)
  12. 佐藤久、坂楨有紀恵、山田健太、ピタックティータムニティ、石井聡、佐野大輔、高橋正宏、岡部聡 表面プラズモン共鳴を利用した水中病原微生物検出バイオセンサの開発. 第 15 回水環境学会シンポジウム. 佐賀大学・佐賀(20120910)
  - 13.

〔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 なし

( )

研究者番号：