

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 19 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：26620072

研究課題名(和文)光アンテナによる食中毒危害要因の迅速検出法の開発

研究課題名(英文)Rapid detection of food poisoning bacteria by using light-antenna

研究代表者

椎木 弘 (SHIIGI, Hiroshi)

大阪府立大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70335769

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)：金属ナノ粒子やその構造体は金属種やサイズ、形状に応じて特徴的な光学特性を発現する。そこで、バクテリア表面に存在する化学種と相互作用、あるいは結合する分子や抗体を金属ナノ粒子やその構造体に導入することで、選択的な光アンテナの形成を試みた。単一バクテリアについて、表面の化学構造に基づいた光アンテナの形成とそれによる表面化学種の特定、および分布の可視化が可能になった。さらに、光アンテナ形成に基づいたバクテリアの高感度検出が達成された。

研究成果の概要(英文)：We have found that a high density structure of metal nanoparticles acts like an excellent antenna owing to its optical properties, which permit sensitive detection of bacteria and analysis of a single bacterial cell. By using antibodies, these antennas can be engineered to recognize only specific bacterial species. This system provides a new technique that will allow a more sensitive detection of specific bacteria.

研究分野：分析化学

キーワード：光アンテナ 単一細菌 ナノ構造体 バイオ分析

1. 研究開始当初の背景

集団食中毒の危害要因として代表的な腸管出血性大腸菌は、公定法に基づいて検出されている。迅速な食の安全確保を目指し、各工程における操作性の向上や高感度化が進んでいるが、検出において十分な選択性と感度を得るためには分離や増菌などの培養工程を要する(図1A)。したがって、試料採取から判定までに最低数日を要することから、判定までの工程における迅速化が強く求められている。そこで本研究では、危害要因の迅速な検出を目指し、金属ナノ粒子の特徴的な光散乱特性に基づいた光アンテナの形成により細菌のワンステップ検出法の開発を行った(図1B)。

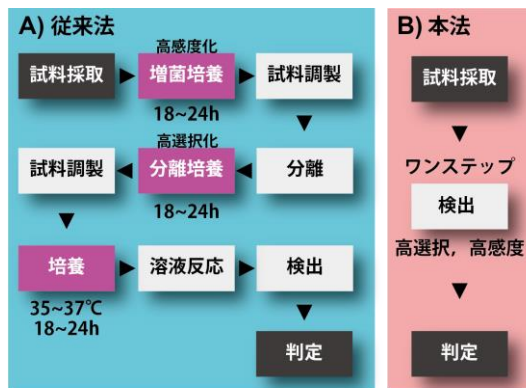


図1 細菌検出フロー：(A)従来法，(B)本法

2. 研究の目的

本研究では、細菌のワンステップ検出法の開発を目的とし、金属ナノ粒子が示す特徴的な光散乱特性と高コントラストにより分解能以下の観察が可能な暗視野観察法を組み合わせた手法の開発を行った。

金属ナノ粒子は、金属種、粒子サイズや形状に応じた特徴的な局在表面プラズモン共鳴(LSPR)により、可視光に対して強い吸収、散乱を示す。したがって、金属ナノ粒子が示す特徴的な散乱光に着目することで光学顕微鏡の理論分解能(200 nm)以下のナノ粒子(粒径：数~数十 nm)でも容易に観察することが可能となる。さらに、金属ナノ粒子の吸着により生じる表面増強ラマン散乱は、共鳴効果を付加的に用いることで散乱断面積を通常のラマン散乱の 10^{11} 倍以上増大することから、高感度な光アンテナとして機能し、極少量の極小サンプルの高感度な検出を可能とする。そこで、特徴的な光散乱特性を持つ金属ナノ粒子を標識として、細菌表面の化学種(各種官能基、抗原など)を可視化することにより、食中毒の危害要因の検出を目的とした。

3. 研究の方法

金属ナノ粒子が示す特徴的な光散乱特性と高いコントラストにより分解能以下の観

察が可能な暗視野観察法とを組み合わせることで、食中毒などの危害要因である細菌をターゲットとした新しい分析法の開発を目指し、

- (1)金属ナノ粒子標識作製と光散乱特性評価
 - (2)標識による細菌の可視化
 - (3)標識法による細菌の検出
- の各項目について検討した。最終的に各種細菌の高感度で迅速な検出を目指した。

4. 研究成果

(1)金属ナノ粒子標識作製と光散乱特性評価

理論分解能以下のサイズを持つ金属ナノ粒子の光学顕微鏡観察は不可能であるが、散乱光に着目することで暗視野での観察が可能になる。これは特定波長での励起によりナノ粒子表面で集団的電子振動に基づき生じる効率的な吸収や散乱が、金属種、サイズや形状に応じた特徴的なLSPRを発現することに基づく。そこで、種々の金属種、サイズや形状のナノ粒子を作製し、光散乱特性について詳細に調べた。

金属種としてAg, Au, Cu, Pt, Pdを用いてナノ粒子を作製した。各種金属ナノ粒子を暗視野顕微鏡により観察したところ、Agが最も高い散乱強度を示した。しかしながら、Agは化学安定性に乏しく、水溶液中にイオンとして溶出する。Agイオンは、細菌の生存状態に影響を与えることが知られており、抗菌作用を利用した用途に適している。一方、化学安定性が高いAu, Pt, Pdの内、Auが最も高い散乱強度を示した。これらの光散乱特性は、粒径や分散状態に強く依存した。また、Cuについては酸化物であるCu₂Oが高い化学安定性を示し、分散状態によらず、青い単色の散乱光を示した。さらに、これらの金属ナノ粒子が凝集することで散乱強度が飛躍的に増大することを見出した。そこで、散乱強度、化学安定性などの観点からAuに着目し、金ナノ粒子の集合体を形成した。

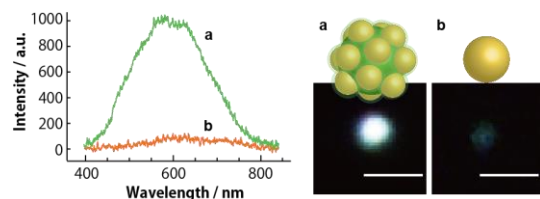


図2 金ナノ粒子の集合体(a)および単一粒子(b)の光散乱スペクトルと暗視野顕微鏡像

金ナノ粒子集合体は単一粒子の10倍以上の散乱強度を示した(図2)。これは、集合化により広い波長域の光を吸収することが可能になるため、それに伴って散乱強度が増大するものである。

(2)標識による細菌の可視化

各種分子を化学修飾した金ナノ粒子を標

識として電子顕微鏡観察を行った。金ナノ粒子の結合によりバクテリアの形状とともに、バクテリア表面の官能基や化学種の種類、およびそれらの分布の可視化を試みた。

グラム陽性菌は厚いペプチドグリカン層により覆われた構造を持ち、グラム陰性菌はリポ多糖類に覆われている。いずれの場合も、バクテリアは負のゼータ電位 (-20 mV) を示す。そこで、アミノ基を持つ分子 a により化学修飾した金ナノ粒子 A を作製し、バクテリア懸濁液と混合した。金ナノ粒子 A (ゼータ電位: $+20$ mV) はバクテリア表面に吸着した (図 3)。一方、カルボキシ基を持つ分子 b を修飾した金ナノ粒子 B (ゼータ電位: -40 mV) はバクテリア表面への吸着はみられず、基板に分散した状態で観察された。

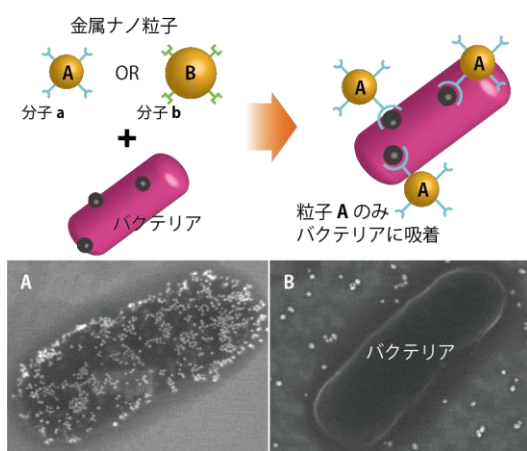


図 3 分子修飾金ナノ粒子によるバクテリアの標識。(A)アミノ基, (B)カルボキシ基導入した粒子

このようにして、金属ナノ粒子を用いることでバクテリア表面の化学種の分布を明らかにすることができた。

(3) 標識法によるバクテリアの検出

金ナノ粒子集合体に、特定バクテリアの表面に存在する化学種と特異的に結合するレセプター分子を導入することで、選択的な標識が可能になる。そこで、金ナノ粒子集合体に O157 抗体を導入した。

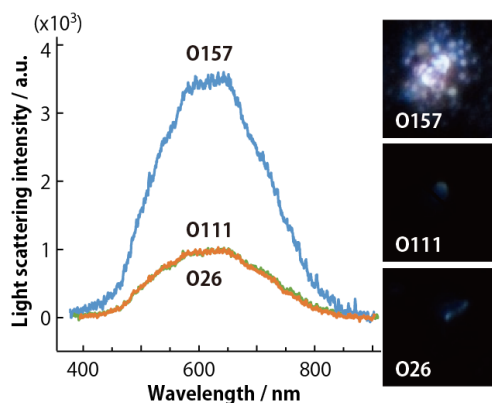


図 4 O157 抗体導入金ナノ粒子集合体により標識した大腸菌の光散乱スペクトルと暗視野顕微鏡像

O157 抗体は大腸菌の表面に存在する O157 抗原に特異結合する。エチル (ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (EDC) と N-ヒドロキシコハク酸イミド (NHS) は、抗体が分子内に有するカルボキシル基を活性化する。この活性化カルボキシル基と、金ナノ粒子集合体表面のアミノ基とのアミド結合の形成により、抗体導入を行った。この集合体を、大腸菌 O157, および O26, O111 とそれぞれ混合し、暗視野観察した (図 4)。

大腸菌 O157 は金ナノ粒子集合体に特徴的な強い白色散乱光として観察され、高い散乱強度を示した。一方、大腸菌 O26, および O111 からは集合体の結合に基づく光散乱、およびスペクトル変化は見られなかった。これらの結果は、金ナノ粒子集合体が抗原抗体反応 (結合定数 $>10^{10}$) に基づき、大腸菌表面の特定化学種である O157 抗原に結合したことを意味する。本法により、抗原に着目することで、同種のバクテリア (大腸菌) の識別が可能である。

本研究では、金属種、サイズや形状により特徴的な光学特性を示すナノ粒子を作製し、それらの光散乱特性について詳細に調べた。Ag が最も高い散乱強度を示した。Au, Pt, Pd などは化学安定性が高く、その中でも Au が最も高い散乱強度を示した。Cu 酸化物である Cu_2O は高い化学安定性を示し、ナノ粒子の分散状態によらず、青い単色の光散乱を示した。金属ナノ粒子の光学特性は、サイズや形状だけでなく、その分散状態にも強く依存する。そこで、金ナノ粒子集合体の形成を行ったところ、単一粒子の 10 倍以上の散乱強度を示した。これは、金ナノ粒子が三次元的に高密度に集合して形成された構造を有する集合体が、広い波長域の光を効率的に吸収し、散乱するためである。

O157 抗体を導入した金ナノ粒子集合体は大腸菌 O157 に特異結合した。このとき、大腸菌は強い白色散乱光として観察され、高い散乱強度を示した。一方、O26, および O111 への結合は見られなかったことから、抗原に着目することで、同種のバクテリア (大腸菌) の識別が可能になった。

以上のことから、金属ナノ粒子が示す特徴的な光散乱特性と高コントラストにより分解能以下の観察が可能暗視野観察法を組み合わせることで、バクテリアのワンステップ検出が可能になった。また、分子修飾した金ナノ粒子を標識することで、バクテリアの形状とともに表面の官能基や化学種の種類や分布の可視化に成功し、金属ナノ粒子のサイズを分解能とした、表面解析の可能性が示唆された。本手法は検出対象に応じたレセプター分子を用いることで、大腸菌以外の病原性バクテリアやウイルスなどにも適応可能である。したがって、新型インフルエンザや口蹄疫ウイルス感染症など、検出に緊急を要すだけでなく高い選択性と感度を要する場合に有効な手段となり得る。

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 10 件)

- 1) T. Kinoshita, K. Kiso, D. Q. Le, H. Shiigi, T. Nagaoka, Light-scattering Characteristics of Metal Nanoparticles on a Single Bacterial Cell, *Anal. Sci.*, 査読有, **32**(3), (2016), 301-306. DOI:10.2116/analsci.32.301
- 2) 木下隆将, 椎木 弘, 長岡 勉, 光アンテナの形成による病原性細菌の迅速検出, *化学工学*, 査読無, **366**(11), (2015), 812-816.
- 3) T. Kinoshita, D. 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.*, 査読有, **31**(6), 487-493 (2015). DOI: 10.2116/analsci.31.487
- 4) H. Shiigi, T. Kinoshita, M. Fukuda, L. Q. Dung, T. Nishino, T. Nagaoka, Nanoantennas as Biomarkers for Bacterial Detection, *Anal. Chem.*, 査読有, **87**(7), 4042-4046 (2015). DOI:10.1021/acs.analchem.5b00415
- 5) P. T. Bui, T. Nishino, H. Shiigi, T. Nagaoka, One-by-one single-molecule detection of mutated nucleobases by monitoring tunneling current using a DNA tip, *Chem. Commun.*, 査読有, **51**, 1666-1669(2015). DOI: 10.1039/C4CC08227C
- 6) H. Shiigi, M. Fukuda, T. Tono, K. Takada, T. Okada, L. Q. Dung, Y. Hatsuoka, T. Kinoshita, M. Takai, S. Tokonami, H. Nakao, T. Nishino, Y. Yamamoto, T. Nagaoka, Construction of nanoantennas on the bacterial outer membrane, *Chem. Commun.*, 査読有, **50**, 6252-6255(2014). DOI: 10.1039/c4cc01204f
- 7) H. Shiigi, T. Kinoshita, N. Shibutani, T. Nishino, T. Nagaoka, Efficient Collection and Sensitive Detection using Conducting Magnetic Microbeads, *Anal. Chem.*, 査読有, **86**(10), 4977-4981 (2014). DOI:10.1021/ac500452w
- 8) T. Kinoshita, H. Murakami, Y. Muranaka, Y. Yamamoto, T. Nishino, H. Shiigi, T. Nagaoka, Tracking the Growth of Tadpole-shaped Aggregates by Scanning Electron Microscopy, *Anal. Sci.*, 査読有, **30**(3), 319-322 (2014). DOI: 10.2116/analsci.30.319
- 9) H. Shiigi, Y. Muranaka, M. Iwamoto, K. Masuda, Y. Yamamoto, T. Nagaoka, One-step Preparation of Glucose Oxidase-Nanoparticle Hybrid, *BUNSEKI KAGAKU*, 査読有, **63**(2), 73-78 (2014). DOI: 10.2116/bunsekikagaku.63.73
- 10) H. Shiigi, T. Nagaoka, Molecularly Bridged Gold Nanoparticle Array for Sensing Applications, *Anal. Sci.*, 査読有, **30**(1), 89-96 (2014). DOI: 10.2116/analsci.30.89

[学会発表] (計 12 件)

- 1) M. Fukuda, T. Kinoshita, H. Shiigi, T. Nagaoka, Optical nanoantenna for bacterial detection, Pacificchem2015, Dec.15-20, 2015,

Honolulu (United States).

- 2) Y. Takai, M. Terabe, H. Shiigi, T. Nagaoka, Electrical and optical characteristics of gold nanoparticles-deposited microbeads, Pacificchem 2015, Dec.15-20, 2015, Honolulu (United States).
- 3) T. Kinoshita, M. Fukuda, D. Nguyen, K. Ishiki, T. Nishino, H. Shiigi, T. Nagaoka, Nanoantenna for Bacterial Detection, 2015 Asian Conference on Chemical Sensor, Nov.16-18, 2015, Penang (Malaysia).
- 4) Y. Takai, M. Terabe, T. Nishino, S. Tokonami, H. Shiigi, T. Nagaoka, Molecular Sensing on Microbead, 2015 Asian Conference on Chemical Sensor, Nov.16-18, 2015, Penang (Malaysia).
- 5) 長岡 勉, 椎木 弘, 細菌の特異的検出を可能とする金属ナノ粒子ポリマ・コンポジットの開発, 日本分析化学会第 64 年会, 2015 年 9 月 9-11 日, 九州大学 (福岡) .
- 6) T. Kinoshita, M. Fukuda, H. Shiigi, T. Nagaoka, Optical Detection of Pathogenic Bacteria Using Nanocomposite as a Biomarker, 7th East Symposium on Functional Dyes and Advanced Materials, Sep. 2-5, 2015, 大阪府立大学 (大阪・堺) .
- 7) D. Nguyen, T. Kinoshita, H. Shiigi, T. Nagaoka, Fluorescence Enhancement of Nanoraspberry Composed of Gold Nanoparticles and Aniline Oligomer, 7th East Symposium on Functional Dyes and Advanced Materials, Sep. 2-5, 2015, 大阪府立大学 (大阪・堺) .
- 8) T. Kinoshita, M. Fukuda, T. Nishino, H. Shiigi, T. Nagaoka, Electron Microscopic Tracking Growth Process of Tadpole-Shaped Hybrid Composed of Au NPs and Polyaniline, 19th International Conference on Flow Injection Analysis, Nov. 30-Dec. 05, 2014, アクロス福岡 (福岡) .
- 9) 椎木 弘, 西野智昭, 床波志保, 長岡 勉, 隙間の化学, 第 60 回ポーラログラフイーおよび電気分析化学討論会, 2014 年 11 月 15-16 日, 京都工繊大学 (京都) .
- 10) T. Kinoshita, Y. Hatsuoka, H. Nakao, T. Nishino, Y. Yamamoto, H. Shiigi, T. Nagaoka, Electron Microscopic Tracking Growth Process of Tadpole-Shaped Nanoparticles Aggregate, 13th European Vacuum Conference, Sep. 8-12, 2014, Aveiro (Portugal).
- 11) Y. Hatsuoka, M. Fukuda, T. Kinoshita, S. Tokonami, H. Nakao, T. Nishino, H. Shiigi, T. Nagaoka, Formation of Nanoantenna on a Bacterium, 13th European Vacuum Conference, Sep. 8-12, 2014, Aveiro (Portugal).
- 12) H. Shiigi, M. Fukuda, T. Kinoshita, Y. Hatsuoka, T. Nishino, T. Nagaoka, Formation of Nanoantenna on a Bacterial Surface, ECOSS30, Aug. 31-Sep. 5, 2014, Antalya (Turkey).

[図書] (計 3 件)

- 1) 椎木 弘, 長岡 勉, 基礎分析化学, 198 (173-185), (2015), 朝倉書店.
- 2) 長岡 勉, 椎木 弘, プラズモンナノ材料開発の最前線と応用, 280 (103-111), (2013), CMC 出版.
- 3) 床波志保, 椎木 弘, 長岡 勉, 金属ナノ・マイクロ粒子の最新技術と応用, 236 (218-224), (2013), CMC出版.

[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

椎木 弘 (SHIIGI HIROSHI)

大阪府立大学・工学研究科・准教授

研究者番号：70335769

(2) 連携研究者

長岡 勉 (NAGAOKA TSUTOMU)

大阪府立大学・工学研究科・教授

研究者番号：00172510

西野 智昭 (NISHINO TOMOAKI)

東京工業大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：80372415