

水中細菌計測のための細菌表面構造転写技術の開発

Detection of Bacteria in Water Based on a Transferring Technique of Bacterial Surface Structure

床波 志保

Shiho TOKONAMI

「飲料水・食」の安心・安全の確保および細菌汚染に起因する食中毒や感染症の防止は食品産業や医療業界において重要課題だが、蛍光染色法や培養法を用いた従来法は検査結果を得るまでに数時間～数日を要する場合があるという課題があった。本研究では、導電性ポリマーに細菌の表面化学構造を精巧に転写した細菌鋳型膜の開発を行い、誘電泳動法と組み合わせでわずか数分で標的細菌を高選択的に検出する新手法の開発に成功した。この新手法を用いることで高選択的、高感度かつ従来法よりけた違いの速さの安価な水中細菌検査技術も提供できるため、「水」に関わる産業・医療・農業分野の革新につながる成果と期待される。

The development of methods for securing safety of “drinking water / food” (prevention of food poisoning and infectious diseases caused by bacterial contamination) is one of important issues in the food industry and medical industry, whereas conventional methods using fluorescent labeling method and culturing methods often require several hours to several days in order to obtain the inspection results. In this study, we developed a bacterial imprinted film by elaborately transcribing the surface chemical structure of bacteria into a conductive polymer, and successfully pioneers a novel method to selectively detect target bacteria within only a few minutes in conjunction with dielectrophoresis. This new method will provide a simple underwater bacterial inspection technology with high sensitivity, high selectivity and with incommensurable high speed in comparison with conventional methods, leading to the innovation of the industrial, medical, agriculture fields related to “water”.

はじめに

飲料水、食品、医薬品などに存在する細菌や環境中に存在するウイルスは、食中毒因子となり、微量でも人の健康に大きく影響を与える。また、医療現場においては、院内感染症因子である細菌を速やかに特定する必要があることから、迅速かつ高感度な細菌検出法の開発が求められている。従来の細菌検出は培養法が基本であるが、結果が得られるまでに1～10日程度を必要とするだけでなく、培地の調製や滅菌処理等の操作が煩雑であるという問題点が指摘されている。これらの問題を解決するため、近年では酵素免疫測定法(ELISA法)^[1]や生命体のエネルギー源であるアデノシン三リン酸(ATP)を検出することで間接的に細菌の有無を検出する方法^[2]の開発が行われている。しかし、細菌の種類までを迅速に特定することのできる検出法は皆無であった。一方で、ポリマー表面に検出対象の分子構造をナノレベルで3次元的に転写して検出できる分子鋳型技術も

アミノ酸の光学異性体分離や金属イオン、ATPの検出等に利用されており^[3-6]、この技術に注目すればマクロな細菌であってもその表面の分子構造を転写できるはずとの着想に至った。本研究ではこのような着想の下、「細菌鋳型膜」の開発を行い(Figure 1)、これを検出用基板とした水中細菌のラベルフリーかつ高選択的な検出法の開発に取り組んできた。

細菌鋳型膜の作製と特異検出

筆者は上述のような現状を打破するため、カチオン性導電性高分子であるポリピロール(PPy)と負電荷を持つ細菌との静電相互作用に着目し、細菌の表面化学構造を精巧に転写した高分子膜の合成法を確立した^[7, 8]。PPyは化学酸化重合もしくは電解酸化重合時に静電的にアニオン分子(A-)を取り込んで重合が進む。検出対象を(A-)とすると、ポリピロールに取り込まれた(A-)を取り除くことができれば、

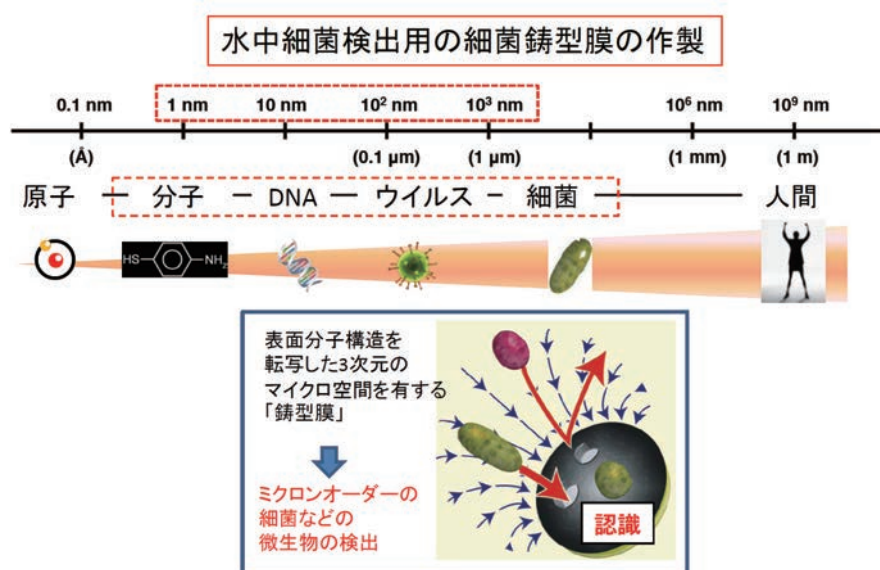


Figure 1 細菌表面の分子構造を転写したマイクロ空間を有する細菌鋳型膜のコンセプト。

ポリピロールには被検出対象である(A-)を認識し得る分子認識サイトを内部表面に有する細菌と同程度の大きさのマイクロ空孔が残ることになる。細菌の脱ドープは、ポリマーを過酸化して電氣的に中性することで達成され、細菌表面の化学的構造などの情報を転写した過酸化ポリピロール(OPPy)膜を形成できる。このような工程を受賞者ら独自に確立して利用することにより、ピロール重合時に緑膿菌を添加して緑膿菌を取込んだ膜を形成し(Figure 2a左)、過酸化処理を施して緑膿菌を脱ドープしてOPPyから成る緑膿菌の鋳型膜を作製することに成功した(Figure 2a右)。このようにして作製した細菌鋳型膜と誘電泳動法、および水晶振動子マイクロバランス(QCM)測定法を組み合わせ、鋳型作製時に用いた細菌を標的として交流電場により電極上の空孔へと誘導して特異的に取り込まれた時に生じる質量変化をQCMの周波数変化を通じて観測した。適用例として、上述の緑膿菌を用いて作製した鋳型膜に緑膿菌分散液を滴下して測定を行ったところ数十秒程度で顕著な変化が見え始め、数分で数kHzオーダーで大幅に周波数が減少した(Figure 2c)。この結果からも、本検出法において誘電泳動が重要な役割を果たしていると考えられる。一方、誘電泳動を行わない場合は検出対象の細菌が溶液中に存在しない場合(細菌添加なし)と同様に周波数応答を示さなかった。また、

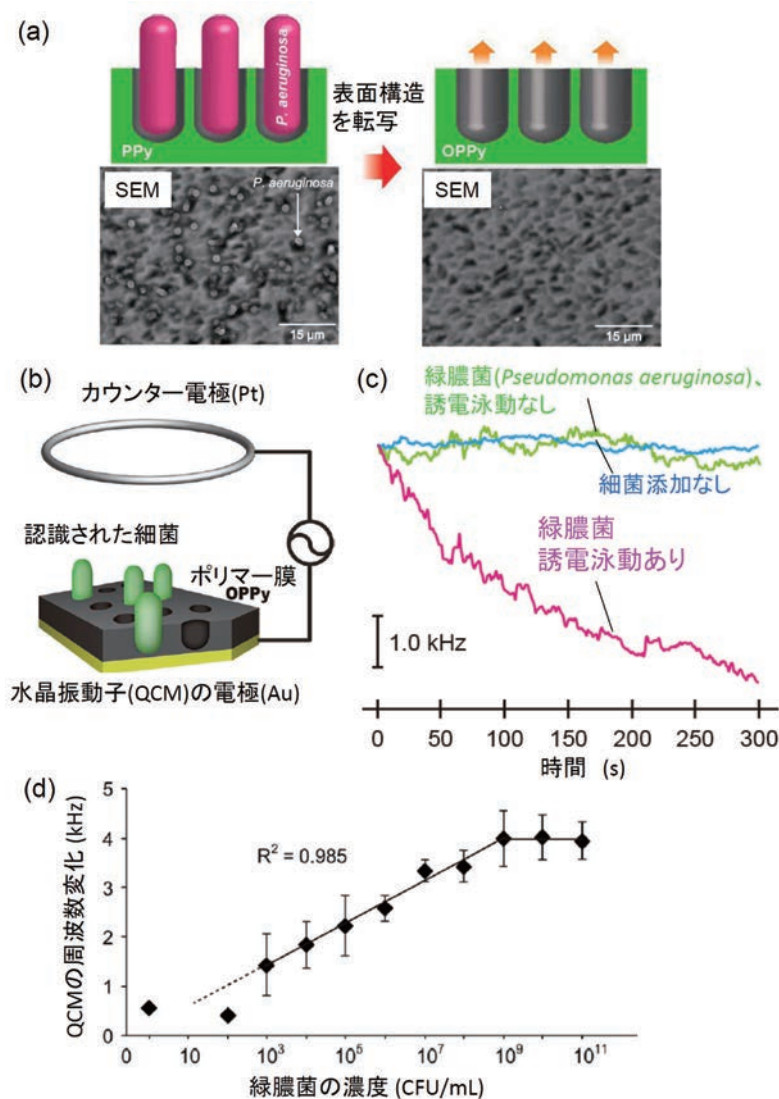


Figure 2 (a) 細菌鋳型膜の概念図(上段)と標的細菌の取込と脱ドープ前後の走査型電子顕微鏡(SEM)像(下段)。(b) 細菌鋳型膜と水晶振動子マイクロバランス(QCM)を組合わせた実験系。(c) QCMセンサの周波数変化の時間依存性。(d) QCMの周波数変化の緑膿菌の濃度依存性。

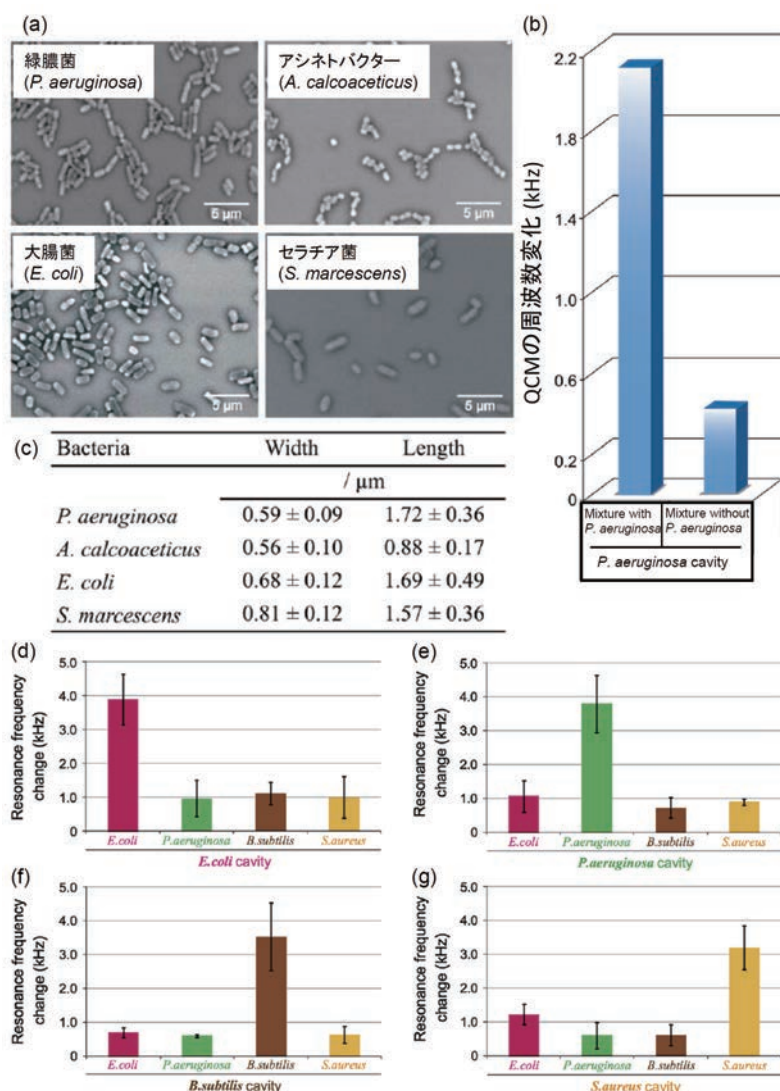


Figure 3 (a)4種類の細菌のSEM像。(b)緑膿菌で作成した空孔を有する鋳型膜において、混合サンプル中に緑膿菌(*P. aeruginosa*)が含まれている場合と含まれていない場合の周波数変化。(c)細菌サイズをまとめた表。(g)-(j)異なる細菌を用いて作製した空孔を有する細菌鋳型膜それぞれに対応する細菌を含むサンプルを滴下して測定した場合の周波数変化。

緑膿菌の濃度とQCMの周波数変化に明瞭な相関があることも確認した(Figure 2d)。特に、 $10^3 \sim 10^9$ CFU/mLの範囲でターゲットとする細菌に対して高感度に応答し、1000 CFU/mL程度の少数の細菌でも検出できる非常に高い感度を示すことが分かった。

加えて、本手法により、形状の類似した緑膿菌、アシネトバクター菌、大腸菌、セラチア菌の4種類の細菌混合液(Figure 3a, 3c)から標的細菌(緑膿菌)を選択的かつ高感度に検出可能であることを示した点も水中細菌計測における重要な成果である。これらの細菌の混合液を、緑膿菌を用いて作製した鋳型膜(緑膿菌鋳型膜)に滴下してQCMの周波数変化を測定したところ、2.2 kHzという有意な周波数変化を観測できた(Figure 3b)。さらに、比較実験として緑膿菌を含まない混合液でも同様の測定を行ったところ周波数変化は1けた小さく、混合サンプルでも特異検出ができることを確認した。細菌のサイズ分布をFigure 3cの表

に示したように、10~20%程度の広がりを持つ。したがって、大きさだけを考えるとどの細菌も鋳型に入る可能性があるが、上記のような特異性が得られることから、鋳型に転写された細菌表面の化学構造により高精度な細菌認識が行われたものと考えられる。

一方で、Figure 3a-3cで細菌鋳型膜で特異検出できることを示した細菌はいずれも細菌の表面構造に着目すると最外膜にリポ多糖が存在するグラム陰性菌である。しかしながら、グラム陽性菌の表面はペプチドグリカンが露出しており全く表面構造が異なる。このように表面の化学種が全く異なる場合でも細菌鋳型膜への転写が可能であるかどうかは研究開始当初は未解明の課題であった。そこで、前述のQCM電極上の細菌鋳型膜と誘電泳動を組み合わせた手法をグラム陰性の緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*)), 大腸菌(*Escherichia coli* (*E. coli*)), およびグラム陽性の枯草菌(*Bacillus subtilis* (*B. subtilis*)), 黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*))の4種類のグラム陰性、陽性の両方の細菌に適用した^[9]。まず、大腸菌の鋳型を有するセンサ膜(大腸菌鋳型膜)の特異性を緑膿菌、枯草菌、および黄色ブドウ球菌に対する周波数応答を比較することで確認した(Figure 3d)。結果として、鋳型作成時に用いた大腸菌に対する周波数変化が最も大きく(3.9 kHz)、一方

で他の細菌に対する周波数変化は小さく、緑膿菌では0.99 kHz、枯草菌では1.1 kHz、黄色ブドウ球菌では1.0 kHzという値であった。同様の結果が緑膿菌鋳型膜(Figure 3e)、枯草菌鋳型膜(Figure 3f)、黄色ブドウ球菌鋳型膜(Figure 3g)でも各々を用いて作製した鋳型膜の場合に得られた。これらの結果から、OPPy膜中に形成されたマイクロ空間中の分子認識サイトがグラム陽性菌およびグラム陰性菌に対する細菌鋳型としても高い特異性を持つことが示され、グラム陰性・陽性の種類や形状を問わず多種多様な水中に生息する細菌に適用可能であることが示唆された。また実試料分析を行った結果、試料の簡単な前処理(遠心分離)のみで飲料水や食肉などの分析が行えることも明らかにしており水計測への有用性も示している。

光集積による迅速細菌数計測法の開発

新たな展開として、光物理を専門とする研究グループとの

共同研究により、光集積法に着目した水中の細菌数の迅速計測法の基礎原理解明にも成功している^[10]。本計測法では、光吸収性の薄膜にレーザー光照射することで誘起された熱対流とバブルを利用する (Figure 4a)。予備実験では、熱対流でレーザー照射点近傍にマイクロビーズを輸送し、バブル表面と基板の間に集合して得られた構造体の体積から、そこに含まれるビーズの数を算出して集合率を見積った、さらに、このような光発熱集合が細菌にも適用できることを確認するため、蛍光染色した大腸菌を用いた予備実験も行い、液中の細菌濃度に依存して集合する細菌の数が変化することも確認した (Figure 4b)。これらの結果を踏まえて、蛍光染色せずに、光学的透過像から光発熱集合で集積した細菌から成る構造体の体積を評価し、溶液中の全細菌数の推定をわずか90秒で迅速に行い培養法と同程度の精度を得ることに成功している (Figure 4c)。このように、従来は数日を要する培養法より桁違いの速さで細菌数を評価できる超迅速細菌数計測法の基礎構築に成功した。

おわりに

前半で紹介した細菌鋳型膜を用いた成果は、数分で細菌の有無の確認を行うだけでなく、高い選択性を持つセンサ膜を用いることで菌種の同定までも可能にするため、厳密な衛生管理が必要な浄水場、飲料水・食品製造工場や飲食店を含む食品産業全般におけるセンサ基板としての活用が期待できる。培養法による従来の検出では結果を得るまでに数日を要するが、電場や光などの外場と組合せたアクティブな検出方式^[11]を採用することにより検出時間の大幅な短縮が実現される。また、酵素や抗体などの高価かつ入手困難な認識体を用いず化学的に安定なポリマー膜を用いるため検出基板を安価に作製可能である。さらに、酵素、蛍光物質による標識をはじめとする前処理が不要であるため、熟練の分析技術者を要することなく迅速な分析が可能である点も高い優位性を示す。培養法に代替する技術として遺伝子解析法も注目を集めているが、感度が低いためポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による増感行程が必須であるが、本手法は増感行程を必要とせず特異的な細菌検出が可能である。特に、本研究で開発した細菌鋳型膜を用いる方式は、同一手順で即座に細菌鋳型膜が作製できるため、新たな細菌の脅威が発生した場合でも速やかに対応可能である点も特筆すべきである。また、電場による誘導だけでなく後半で紹介した光発熱集合法を用いれば、レーザー照射

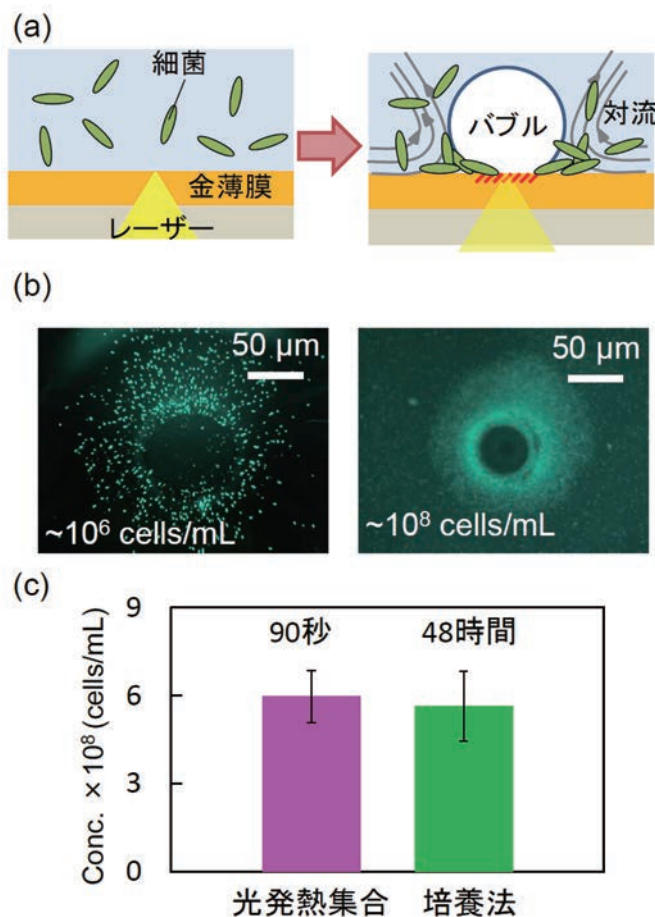


Figure 4 (a) 光発熱集合法による迅速細菌数計測法の原理のイメージ図。(b) 蛍光色素を用いた異なる濃度の*E. coli*の光発熱集合の予備実験。(c) 光発熱集合を用いた液中の緑膿菌の迅速検出に関する本実験の結果。培養法と同程度の精度で計測できることを確認している。

で非接触に細菌を集合して数分で溶液中の全細菌数が得られるため、筆者が所属するLAC-SYS研究所で現在開発を進めている「光誘導加速」の新技術^[12]を取り入れることで、細菌鋳型膜との組み合わせや細菌の表面化学構造とセンサ上の検出部位との分子認識を加速して迅速特異検出の新たな手段を提供できるため今後の発展研究が期待できる。

本研究とも関連する市場動向に目を向けると、経済産業省の「平成26年度インフラシステム輸出促進調査等事業(水ビジネス市場に関する動向調査)報告書」では水処理技術の世界市場としては2015年に61兆円だったが、2018年には70兆円と予測されている。また、マーケットアンドマーケット (Markets and Markets) の「バイオセンサ市場、分析と2020年までの予測」レポートにおいて、2013年の市場は113億9000万ドルだったが、2014-2020年の期間に年平均成長率10.00%で成長して、2020年には226億8000万ドルに達すると予測されている。水処理技術での市場に加えて、ポイント・オブ・ケア・テスト (POCT) における在宅診断、バイオテロ防止などの市場拡大も考慮に入れると、今後の伸長が期待できる分野へ確実な技術提供ができると確信している。一方、日本の農業危機が叫ばれる中、気候変動により収穫量が左右されず、また、「飲料水・食」の安全・

安心が確保される工場野菜への期待が近年高まっている。その様な中、水耕栽培により成り立つ植物工場内の細菌管理は極めて重要とされている。本手法による細菌検出を工場内の養液循環系内に設置することで、一般的に根腐りを引き起こし、養液を介して伝染する病害菌(例: *Pythium* 属菌, *Phytophthora* 属菌)の発生予防に役立つと考えられる。したがって、本手法により得られる成果は、日本の次世代農業技術の開発および高付加価値農産物の生産にも大きく貢献できる可能性がある。

これらの社会情勢を鑑み、本研究成果を基礎とする多検体同時検出などのハイスループット化が進めば、衛生管理を基本とした「飲料水・食」の安全・安心確保および感染症から身を守るための健康管理が一度に行えるようになり、人々の快適な暮らしをスマートにサポートする次世代バイオ技術の革新につながるため、今後も発展研究を精力的に進めて行きたい。

謝辞

最後に本研究を支えて下さった大阪府立大学LAC-SYS研究所の飯田琢也所長、研究遂行に当たり協力してくれた大学院生諸子に深く感謝する。また、多岐に渡りご指導を頂いた大阪府立大学工学研究科の長岡勉教授、椎木弘准教授、学生諸子にも深く感謝する。本研究の一部は日本学術振興会の科研費基盤(B)(No. 15H03010, No. 26286029), 科研費挑戦的萌芽研究(No.15K14697), 科研費基盤研究(A)(No. 17H00856), 科研費若手研究(A)(24685013), 科学技術振興機構A-STEP, 農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業, キヤノン財団, 大阪府立大学キーププロジェクトなどの支援を受けて遂行された。

参考文献

- [1] E. Galikowska, D. Kunikowska, E. Tokarska-Pietrzak, H. Dziadziuszko, J. M. Łoś, P. Golec, G. Węgrzyn, and M. Łoś, Specific detection of Salmonella enterica and Escherichia coli strains by using ELISA with bacteriophages as recognition agents. *Euro. J. Clin. Microbiol. & Infect. Diseases*, 30, 1067(2011).
- [2] J. Berg, Y. P. Hung, G. Yellen, A genetically encoded fluorescent reporter of ATP: ADP ratio, *Nat. Methods* 6, 161 (2009).
- [3] M. Heitzmann, C. Bucher, J.C. Moutet, E. Pereira, B.L. Rivas, G. Royal, E. Saint-Aman: Complexation of poly (pyrrole-EDTA like) film modified electrodes: Application to metal cations electroanalysis. *Electrochimica Acta* 52, 3082(2007).
- [4] G. O. Buica, C. Bucher, J.C. Moutet, G. Royal, E. Saint-Aman, E.M. Ungureanu, Voltammetric Sensing of Mercury and Copper Cations at Poly (EDTA-like) Film Modified Electrode. *Electroanalysis* 21, 77(2009).
- [5] S. Takeda, H. Yagi, S. Mizuguchi, H. Funahashi, H. Shiigi and T. Nagaoka, A highly sensitive amperometric adenosine triphosphate sensor based on molecularly imprinted oversized polypyrrole *J. Flow Injection Anal.* 25, 77(2008).
- [6] S. Tokonami, H. Shiigi, T. Nagaoka, Micro- and Nanosized Molecularly Imprinted Polymers for High-Throughput Analytical Applications, *Anal. Chim. Acta* 641, 7(2009).
- [7] S. Tokonami, K. Saimatsu, Y. Nakadoi, M. Furuta, H. Shiigi, T. Nagaoka, Vertical Immobilization of Viable Bacilliform Bacteria into Polypyrrole Films, *Anal. Sci.* 28, 319(2012).
- [8] S. Tokonami, Y. Nakadoi, K. Saimatsu, M. Takahashi, M. Ikemizu, T. Kadoma, L. Q. Dung, H. Shiigi, T. Nagaoka, Label-Free and Selective Bacteria Detection Using a Film with Transferred Bacterial Configuration, *Anal. Chem.* 85, 4925 (2013).
- [9] S. Tokonami, Y. Nakadoi, H. Nakata, S. Takami, T. Kadoma, H. Shiigi, T. Nagaoka, Recognition of Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria with a Functionalized Conducting Polymer Film, *Res. Chem. Intermed.* 40, 2327(2014).
- [10] Y. Yamamoto, E. Shimizu, Y. Nishimura, T. Iida, S. Tokonami, Development of a rapid bacterial counting method based on photothermal assembling, *Opt. Mater. Exp.*, 6, 1280-1285(2016).
- [11] S. Tokonami, T. Iida, Novel Sensing Strategies for Bacterial Detection Based on Active and Passive Methods Driven by External Field, *Anal. Chim. Acta*, in press.
- [12] T. Iida, Y. Nishimura, M. Tamura, K. Nishida, S. Ito, S. Tokonami, Submillimetre Network Formation by Light-induced Hybridization of Zeptomole-level DNA, *Sci. Rep.*, 6, 37768(2016).



床波 志保

Shiho TOKONAMI

大阪府立大学大学院工学研究科
応用化学分野 准教授
LAC-SYS研究所 (RILACS) 副所長
博士 (工学)