

<平成 28 年度助成>

## 金ナノ粒子標識を用いた腸管出血性大腸菌の 迅速検出法の開発

椎木 弘

(大阪府立大学大学院 工学研究科物質・化学系専攻応用化学分野)

### 背景

細菌を要因とした食中毒の予防や被害拡散の抑制のためには、衛生管理や品質管理など日常的な自主管理と、発生の早期段階における細菌の迅速な検出が必要である。従来の菌数計測法では、選択培養や増菌培養など、検出に至るまでに多くの工程と時間（最低数日）を必要とする。従って、速やかな「食の安全」の確保のためには、迅速な検出を可能にする新しい手法の開発が必要である。

近年、アデノシン三リン酸（ATP）に着目した化学発光法により、迅速な検出が達成されている。ルシフェラーゼがルシフェリンを特異的に酸化し、オキシルシフェリンを生成する。オキシルシフェリンが励起状態から基底状態になるときに黄緑色の発光を生じる。その発光量を測定することで ATP の定量が可能になるもので、HACCP における有用なツールとなっている。一方、ATP は微生物に共通した指標であるため、特定細菌の検出には不向きである。また、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）法では遺伝子情報に基づいた高精度な細菌の特定が可能であるが、装置が高額、試薬調製や機器操作のための人的リソースの確保など、コスト面で課題がある。従って、一次生産から消費まで様々な現場における迅速な検出には、いつでも、どこでも、誰でも計測できる方法を新規に開発する必要がある。そこで、生物機能によらず、細菌の表面構造に着目した新しい概念に基づく迅速な検出を目指し、細菌表面の多種多様な分子群を定性、定量する独創的手法の開発について研究を行っている。

本研究では、腸管出血性大腸菌 O157 (*E. coli*O157)

の表面に存在する特定化学種（O157 抗原）と結合するレセプターを導入した金ナノ粒子を作製した。金はナノサイズ化によって局所表面プラズモン共鳴に起因する特徴的な光学特性を発現する。例えば、金ナノ粒子は分散状態においてステンドグラスや切子などに特徴的な赤色を呈するが、凝集すると青色、そして黒い沈殿となる。これらは、金ナノ粒子の分散状態に基づいた光学特性の変化によるものである。この特性を利用して、簡便かつ迅速な検出法の開発を目指すものである。本法によれば食品試料中に含まれる極少量の *E. coli*O157 をワンステップで検出することができるため、一次生産から消費までの各段階における自主管理に基づく食の安全確保が可能になり、生産者・消費者の双方に重大な被害をもたらす食中毒の予防、被害拡散の抑止、および食料・食品の安定供給が実現できるものと考えられる。

我々は、アミノ酸やペプチドなどの生体分子をテンプレートとした分子鑄型の形成に関する研究を行ってきた。分子鑄型は分子構造に基づいた結合部位を持ち、優れた分子認識能を示した。分子鑄型法は、目的物質をテンプレートとして重合反応中に共存させ、テンプレートに選択性のある結合部位をポリマーに構築する方法で、テンプレートの溶出により鑄型が形成されるため、化学構造と相互作用する官能基の配置により優れた分子認識能を発現する。この技術を応用し、*E. coli*O157:H7 の鑄型形成について検討したところ、この細菌鑄型は、*E. coli*O157:H7 にのみ応答し、緑膿菌や黄色ブドウ球菌のみならず、異なる大腸菌 (*E. coli*O26、O111 など) も識別したことから、細菌のサイズや形状だ

けでなく、細菌表面の複雑な化学構造を認識する高精度な鑄型の形成が達成されたものと推察された。このことは、細菌の表面構造に着目することで、生物機能によらない検出が可能であることを意味している。そこで、細菌に特徴的な抗原に着目した検討を行った。抗原は細菌細胞を覆うリポ多糖であり、菌種によって特徴的な糖鎖配列を持つ。従って、特定の糖鎖に特異結合する鑄型を金ナノ粒子表面に形成することができれば、特定細菌を金ナノ粒子により標識することが可能である。

## 方 法

### 抗原鑄型粒子の作製

抗原鑄型の形成には、*E. coli* O157 から抽出したりポ多糖 (LPS) をテンプレート、モノマーとして *N*-isopropylacrylamide (NIPAm)、acrylic acid (AAc)、*N*-tert-butylacrylamide (TBAAm)、および *N,N*-methylenebisacrylamide (BIS)、酸化剤あるいは開始剤として chloroauric acid、ammonium persulfate、tetramethylethylenediamine を用いた。反応溶液は十分に脱ガスし、窒素流入により嫌気雰囲気において 18 時間重合した。反応の後、テンプレートおよび未反応物は 313K で 4 日間透析することで取り除いた。このようにして、共重合体をマトリクスとした抗原鑄型の形成が可能である。作製したポリマー粒子を透過型電子顕微鏡 (TEM) により、形状やサイズの評価を行った。

### 各種細菌試料の調製

各種細菌の培養、および細菌を用いたすべての実験は、病原体など安全管理規定に基づくバイオセーフティーレベル 2 区域として整備・管理された実験室で行った。菌株は寒天増殖培地を用い、303K で 18 時間培養した。単一のコロニーを液体増殖培地 (30mL) に抽出し、303K で 18 時間インキュベートした。培養懸濁液 (10mL) を遠心分離し、沈殿物をリン酸緩衝液 (10mL) に再懸濁させた。この処置を 3 回繰り返した。最終的に、リン酸緩衝液を

用いて細菌濃度が  $2.0 \times 10^9$  cells mL<sup>-1</sup> となるように調整した。また、本研究ではベロ毒素非産生大腸菌 PV856 (O157:H7)、PV276 (O157:HNM)、および PV01-198 (O26:H11) を使用した。

### 抗原鑄型粒子を用いた細菌の検出

抗原鑄型粒子分散液 (0.5mL) と細菌懸濁液 (0.5mL) とを混合し、攪拌した。混合分散液 (0.01mL) をガラススライド上にピペットで移して乾燥させた後、ガラススライド上の細菌を暗視野顕微鏡により観察した。その際、ミニグレーティングスペクトロメータを用いて光散乱スペクトルを測定した。

## 結果と考察

抗原鑄型は、ポリマー骨格を形成するモノマーとして NIPAm を用い、AAc、TBAAm、および BIS からなる共重合体をマトリクスとして形成される。これらのモノマー溶液に、標的糖鎖を持つテンプレート物質として *E. coli* O157 から抽出したりポ多糖を添加した。この溶液に、酸化剤あるいは開始剤を加えると重合が進行し、反応溶液は金ナノ粒子の生成を示す赤色に変化した。ポリマー粒子を TEM 観察すると、粒径約 100nm の粒子の中に金ナノ粒子の生成が認められた (図 1a)。重合反応において chloroauric acid は酸化剤として機能し、自らは還元されることで金ナノ粒子が生成されたものと推察される。

また、暗視野顕微鏡によりポリマー粒子を観察したところ、光散乱強度は金ナノ粒子の形成により 4 倍程度増強することが確認された (図 1b)。このポリマーは温度感応性ポリマーとして知られている。そこで、相転移温度における粒子の色の変化についてスペクトル測定を行った (図 1c)。室温 (298K) では、金ナノ粒子の分散液と同様、530nm に金ナノ粒子に特徴的な吸収が観察された。ポリマー粒子分散液の温度を 313K まで加温すると、溶液は白濁した。白濁によるバックグラウンドの増大がみられたが、金ナノ粒子に基づく吸収に変化はみられな

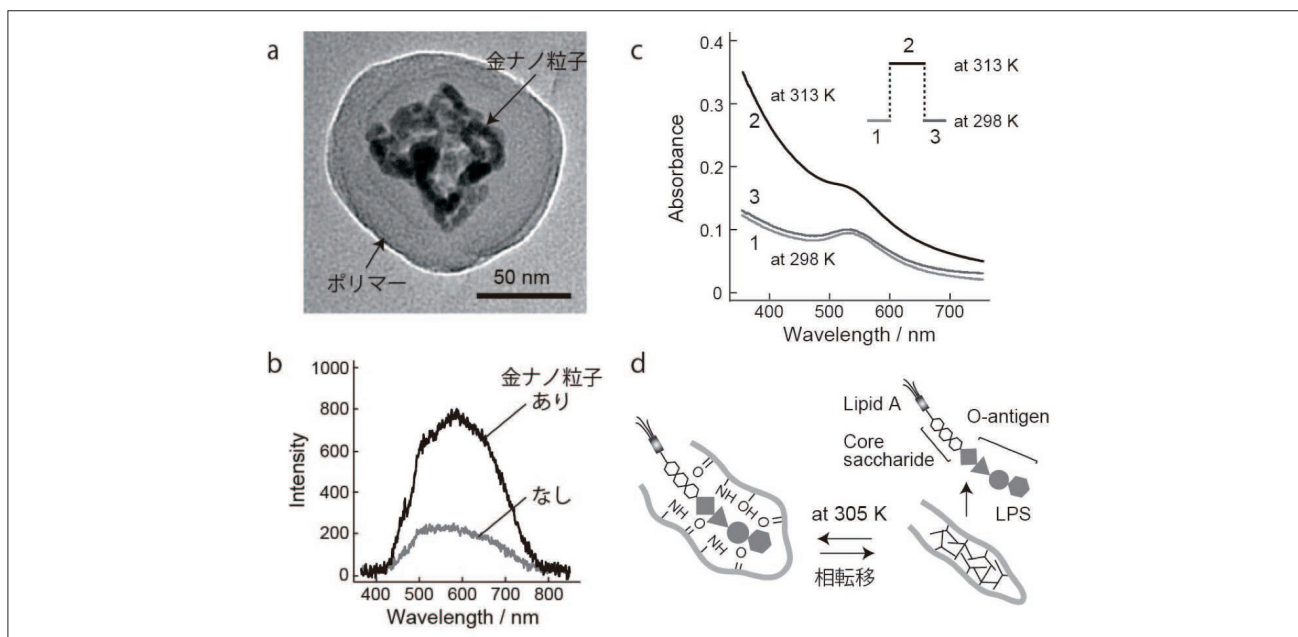


図1 ポリマー粒子のTEM 像(a)と光散乱スペクトル(b)、および吸収スペクトルの温度依存性(c)とポリマー相転移の概念図(d)

かった (図 1 c のスペクトル 2)。再度、室温まで降温したところ元のスペクトル 1 (図 1 c) と一致した。つまり、相転移によって LPS テンプレートがポリマーより吐き出される過程で、ポリマー粒子中の金ナノ粒子が安定して存在することが明らかになった。

このポリマー粒子分散液と細菌懸濁液の混合分散液をガラススライド上に滴下し、室温において暗視野顕微鏡観察を行った (図 2)。暗視野下での観察において、*E. coli*O157 はぼんやりとしたロッド状の光スポットとして観察された。これは、細胞内の水

(誘電率 1.3) と周囲空気 (誘電率 1.0) との間に生じる屈折率が小さいためである。しかしながら、ポリマー粒子により標識された細胞は、強い散乱光を生じ、明確な光スポットとして観察された。これは、ポリマー粒子中の金ナノ粒子に基づいて生じるものであり、ポリマー粒子を標識として用いることで単一細胞の高感度な計測が可能になった。

さらに、このポリマー粒子の選択的結合性についても評価した。異なる表面構造を有する *E. coli* (O26, O-rough) などを用いて同様の実験を行った。各種大腸菌懸濁液にポリマー粒子を添加して暗視野顕

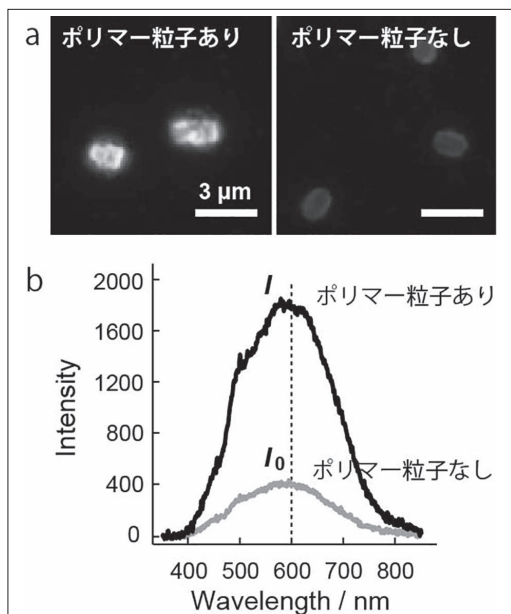


図2 *E. coli* O157の暗視野像(a)と光散乱スペクトル(b)

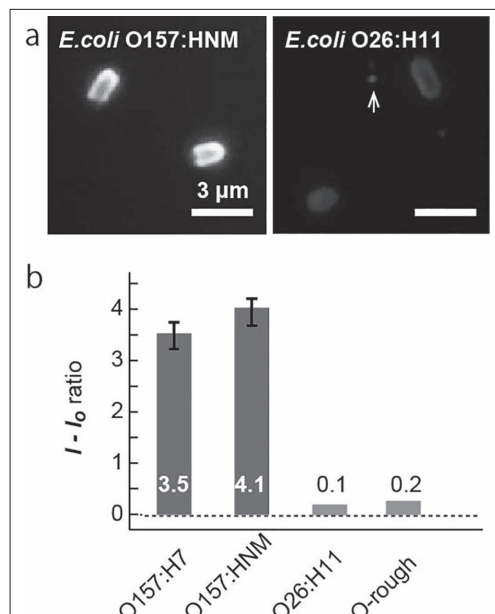


図3 各種 *E. coli*の暗視野像(a)と光散乱強度に基づいた選択性の評価(b)

微鏡観察を行った(図3a)。*E. coli*O157:HNMは、*E. coli*O157:H7同様、強い散乱スポットとして観察され、ポリマー粒子の選択的結合は細菌表面で顕著であった。一方、*E. coli*O26:H11や*E. coli*O-roughは弱い光スポットとして観察され、ポリマー粒子は細胞と結合せず、基板上に観察された(図3a矢印)。このように、ポリマー粒子は表面に形成されたO157抗原の鑄型によって、細胞表面のO抗原、つまり糖鎖配列を正確に識別できることが示された。

さらに、*E. coli*O157細胞表面に特異結合した複数のポリマー粒子は細胞の光散乱強度を高め、600 nmにおける強度( $I$ )は、ポリマー粒子の結合していない細胞( $I_0$ )の4倍程度( $= I/I_0$ )となった。一方、その他の菌種では、ポリマー粒子は結合しないため、光散乱強度に変化はみられず、細胞のサイズのばらつきに対応した $\pm 10\%$  ( $0.2 = I/I_0$ )の誤差のみが観察された。つまり、ポリマー粒子は細胞表面に非特異吸着することなく*E. coli*O157を標識し、30倍以上の選択性を示すことが明らかになった。

実サンプルにおける*E. coli*O157検出について検討を行った。牛ミンチからストマッキングにより得られた細菌溶液には*E. coli*O157の存在は認められなかったため、細菌濃度が一定になるように*E. coli*O157を添加し、試料溶液を調製した。種々の細菌を含む試料溶液において、ポリマー粒子は選択的に*E. coli*O157に結合し、暗視野下において明瞭に観察され、試料中の*E. coli*O157の菌数計測が容易であった。このとき、分析誤差は $\pm 4.0\%$ であった。また、一定視野(約50cellsの細胞が存在する)における散乱強度を測定したところ、標識された*E. coli*O157の増大に伴って強度は直線的に増大し、試料中の*E. coli*O157の定量が達成された( $R^2=0.9827$ )。

以上、細菌細胞表面の化学構造に基づいた細菌の特定が達成され、迅速で高感度、高選択的な検出が実現したことで、これまでにない方法論としてその原理を構築することができた。今後、ポリマー粒子の改良によって、特定細菌の存在が目視で判断可能になるよう研究を進め、いつでも、どこでも、誰でも正確に検出できる方法を開発したい。

#### 謝辞

研究遂行にあたり、ご助言いただきました大阪府立大学大学院工学研究科 長岡勉教授、ならびにベロ毒素非産生大腸菌をご提供いただきました生命環境科学研究科 三宅眞実教授に御礼申し上げます。本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団ならびに関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。

#### 参考文献

- 1) T. Kinoshita, D. Q. Nguyen, D. Q. Le, K. Ishiki, H. Shiigi, T. Nagaoka, Shape Memory Characteristics of O157-Antigenic Cavities Generated on Nanocomposites Consisting of Copolymer-Encapsulated Gold Nanoparticles, *Anal. Chem.*, 89(8), 4680-4684 (2017).
- 2) X. Shan, T. Yamauchi, Y. Yamamoto, S. Niyomdecha, K. Ishiki, D. Q. Le, H. Shiigi, T. Nagaoka, Spontaneous and specific binding of enterohemorrhagic *Escherichia coli* to overoxidized polypyrrole-coated microspheres, *Chem. Commun.*, 53, 3890-3893 (2017).
- 3) K. Ishiki, H. Shiigi, T. Nagaoka, Optical Elemental Analysis of Metals Using *Shewanella oneidensis*, *Anal. Sci.*, 33(5), 551-553 (2017).



## **Development of a rapid detection method for enterohemorrhagic *Escherichia coli* using a gold nanoparticle label**

**Hiroshi Shiigi**

*Department of Applied Chemistry Division of Materials Science and Engineering,  
Graduate School of Engineering Osaka Prefecture University*

Nanometer-sized composite particles consisting of gold nanoparticles encapsulated by an *N*-isopropylacrylamide copolymer were successfully synthesized using a one-step process. Shape complementary cavities of the O157-antigen, which acts as an artificial antibody, were formed on the composite by utilizing temperature-dependent affinity changes of the copolymer. The composite bound to enterohemorrhagic *Escherichia coli* (*E. coli*) O157 at 298 K and enhanced the light-scattering intensity of these cells due to the optical properties of the gold nanoparticles. Moreover, the composite displayed excellent selectivity (> 30) versus other types of *E. coli*, such as O26 and O-rough. Recognition of the O157-antigen ceased upon heating to 313 K, but was restored upon cooling to 298 K. During repeated temperature cycling around the phase transition temperature of the copolymer (305 K), the composite reproducibly displayed a recognition behavior at 298 K. As the binding ability of the composite could be reversibly switched, it was concluded that the molecular structure of the O157-antigen had been memorized by the composite, rather than being molded into it. This technique is applicable not only for the detection of a target bacterium, but also for the identification of new bacterial threats through the simple formation of a specific antigen-imprinted composite.