

N-10 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

○坂根 有紀恵¹・山田 健太²・ピタックティータム ニティ¹
石井 聡¹・佐野 大輔¹・高橋 正宏¹・岡部 聡¹・佐藤 久^{1*}

¹北海道大学大学院工学院環境創生工学専攻（〒060-8628 札幌市北区北13条西3丁目）

²北海道大学工学部環境社会工学科（〒060-8628 札幌市北区北13条西3丁目）

* E-mail: qsato@eng.hokudai.ac.jp

1. はじめに

世界保健機関の推定によれば、世界では年間約220万人（このうち190万人は子供）が食中毒および水系感染による下痢症で死亡しており、先進国においても、毎年およそ3人に1人が何らかの病原微生物によって汚染された食品の摂取により健康被害を受けている¹⁾。表1に示すとおり、日本においても、細菌およびウイルスが原因となる食中毒被害が毎年多数発生している²⁾。この状況を改善するには、食中毒や水系感染症を引き起こす病原微生物を、水処理プロセス、食品加工プロセス、病院、さらには各家庭で、低コストで網羅的にモニタリングすることが不可欠となる。

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。培養法は迅速性や精度に欠ける、遺伝子検出法は精度は高いが操作が煩雑で高度な分析技術を要する、抗体を用いた抗原検出法は検出限界が高い、といったように、それぞれに一長一短がある。より信頼性の高い分析を行うためにはこれらの方法を併用することが望ましいと考えられる。また、新たな検出技術が開発されれば検出法の選択肢が広がる。

近年、抗原抗体反応を定量的に分析できる表面プラズモン共鳴（Surface plasmon resonance ; SPR）バイオセンサを用いて病原微生物を検出する研究が活発に行われている^{2,3)}。SPRは、金属表面における電荷密度の集団的振動（プラズモン波と呼ばれる）と光波との共鳴現象であり、SPRバイオセンサはこの光物理学的現象を生体分子間相互作用の検出に応用したものである。図1に、本研究で用いたSPRバイオセンサの検出メカニズムの概略を示す。SPRバイオセンサでは、波長600～800nmの白色光線を、光線と平行な偏光面を持つp波に揃えて、表面に導電体として厚さ50nm程度の金薄膜を蒸着させたガラス板へ側面から入射する。入射角が臨界角よりも大きくなると、入射光はガラス板内で全反射する。このとき、金薄膜側にエバネッセント波と呼ばれる微弱なエネルギー波が発生し、この波数とプラズモン波の波数が一致したときにSPRが生じる。共鳴現象によって白色光のある特定の波長における光エネルギーが金薄膜へ吸収され、光強度が著しく低下する。この光強度が最小となる点の波長（最大共鳴波長と称す）は金薄膜の周辺媒質の屈折率と関係がある。よって、屈折率の変化をガラス板のもう一方の側面から得られる出射光スペクトルの最大共鳴波長の変化から解析できる。

表1 日本における食中毒発生状況(厚生労働省統計)

	2011	2010	2009	2008	2007	2006
細菌性食中毒 患者数	10,948	8,719	6,700	10,331	12,964	9,666
ウイルス性食中毒 患者数	8,737	14,700	10,953	11,630	18,750	27,696
上述の患者数のうちの死者数	10	0	0	1	0	2

SPRバイオセンサでは、ガラス板上の金薄膜に抗体を固定したセンサチップを備えたマイクロ流路を用いる。マイクロ流路に抗原を含むサンプルを供給すると、金薄膜表面に固定化された抗体に抗原が結合し、結合抗原量に応じて金薄膜周辺の屈折率が変化する。この屈折率の変化を出射光スペクトルの最大共鳴波長から解析する。すなわち、抗体に結合した抗原の量を出射光スペクトルの最大共鳴波長のシフト量から定量できる。

本研究ではノロウイルスと腸管出血性大腸菌O157をターゲットとする病原微生物SPRバイオセンサを開発することを試みた。特に、バイオセンサの定量性、定量下限値、感度向上、再利用性について検討した。

2. 実験方法

センサチップは、金蒸着高屈折率ガラス (Au-11; 五稜化学株式会社) を用いて作製した。ガラスを超純水で10分間超音波洗浄し、乾燥後、254nmのUVランプを20分間照射した。0.01Mの10-Carboxy-1-decanethiol (同仁化学) エタノール溶液にガラスを12時間浸漬し、金薄膜上に10-Carboxy-1-decanethiolの自己組織化単分子膜 (Self-Assembled Monolayer: SAM) を形成した。ガラスを超純水で10分間超音波洗浄した後、0.4Mの1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) 水溶液と0.1Mの *N*-hydroxysuccinimide (NHS) 水溶液を各10 μ L金薄膜上に滴下し、1時間静置した。これにより、SAM分子のカルボキシ基が活性エステルとなる。ここに病原微生物に対する抗体を含むリン酸緩衝溶液 (PBS、リン酸濃度は3.1g-P/L) を10 μ L滴下した。本研究で使った抗体溶液は、濃度100 μ g/mLで抗大腸菌O157モノクローナル抗体 (No.1061; ViroStat社) を

含むPBS、濃度100 μ g/mLで抗ノロウイルスGII.4モノクローナル抗体 (P3B11; abcam社) を含むPBS、である。ノロウイルスの高感度検出のためのサンドイッチ法のシグナル増幅プローブとして、ウイルス吸着タンパク質 (Virus-Binding Protein: VBP) を、Imai *et al.*⁵⁾の方法に準拠して作製した。実験には濃度70 μ g/mLでVBPを含むPBSを用いた。このように作製した、抗体が固定化された高屈折率ガラス (センサチップと称す) にポリジメチルシロキサン (PDMS) 流路 (容積6 μ L) を重ね、フローセル型センサとした。これを光導波路分光装置 (S-SPR-6000; システムインストルメンツ株式会社) に固定し、マイクロシリンジポンプ (MSPE-1; アズワン) を用いてセンサにサンプル溶液を供給した。サンプル溶液は非病原性大腸菌O157:H7 (ATCC 700728) およびノロウイルスのウイルス様粒子 (NoVLP) を含むPBSとした。センサチップ上で生ずる抗原抗体反応は、SPRスペクトルの最大共鳴波長のシフト量を用いて定量した。さらに、pH 3.0のGlycine-HCl緩衝溶液を用いてO157用SPRセンサチップの再利用を試みた。まずセンサチップに大腸菌を10⁸個/mLの濃度で含むPBSを供給した。次にGlycine-HCl緩衝溶液を供給し、続けてPBSで洗浄した。本実験ではこの操作を連続して繰り返し行った。

3. 結果と考察

図2にO157用SPRセンサチップにサンプル溶液を供給した際のセンサグラムを示す。まず、大腸菌を含まないPBSを20分間供給した。最大共鳴波長が675.6nmで安定していたので、20分の地点で大腸菌濃度10⁵個/mLのPBSを供給した。その後6分間では最大共鳴波長は変化しなかった。PBSでセンサチップを洗浄した後、開始から31分後に大腸菌濃度10⁶個/mLのPBSを供給した。すぐに最大共鳴波長は増大し、開始から36分後に676.4nmで安定した。その後PBSで洗浄したところ、676.2nmで安定した。開始から47分後に大腸菌濃度10⁷個/mLのPBSを供給した。最大共鳴波長は大幅に増大し、開始から63分後に679.7nmで安定した。その後PBSで洗浄したところ、678.8nmで安定した。開始から76分後に大腸菌濃度10⁸個/mLのPBSを供給した。最大共鳴波長は急激に増大し、78分に682.5nmで安定した。このように、大腸菌を含まないPBS由来の最大共鳴波長と大腸菌を含むPBS由来の最大共鳴波長との差 (波長シフト幅) はセンサチップに抗原抗体反応により結合した大腸菌量に応じて増大した。この結果から、O157用SPRセンサの検量線を作成することができた (図3)。

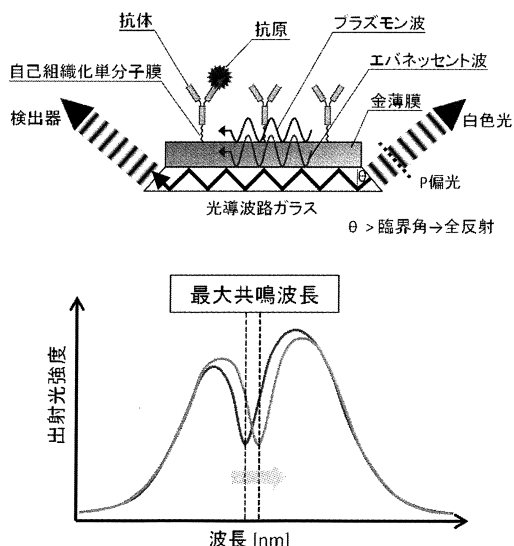


図1 上: SPRバイオセンサの構造、下: 出射光スペクトルの例

図4にノロウイルス用SPRセンサチップにサンプル溶液を供給した際のセンサグラムを示す。開始から29分までNoVLPを含まないPBSを供給した。開始から29分の地点でNoVLP濃度 10^7 個/mLのPBSを供給した。開始から34分後に最大共鳴波長が687.2nmで定常となった。その後PBSで洗浄した後も最大共鳴波長はほとんど変化しなかった。開始から44分後に、センサシグナルである波長シフト幅を増幅させるためのプローブとしてVBPを供給した。すぐに最大共鳴波長は増大し、開始から53分後に688.7nmで定常となった。その後PBSで洗浄したところ、688.1nmで定常となった。この結果から、一次抗体のみのSPRセンサでは、NoVLP濃度 10^7 個/mLに対応する波長シフト幅は約0.3nmであったのに対し、サンドイッチ法により波長シフト幅を1.2nm (4倍) に増幅できることが明らかとなった。

図5にGlycine-HCl緩衝溶液を用いてO157用SPRセンサチップの再生を行った際のセンサグラムを示す。大腸菌を含むPBSからGlycine-HCl緩衝溶液に切り替えると最大共鳴波長は減少し、その後PBSで洗浄したがほとんど変化しなかった。続けて大腸菌を供給すると、最大共鳴波長は再度増大した。このサイクルを4回繰り返した。平均シフト幅 (PBS洗浄時および大腸菌供給時の最大共鳴波長の差) は約2.6nm (標準偏差は0.48nm) であった。このことから、Glycine-HCl緩衝溶液の供給によるpHの低下によって、抗体に結合した大腸菌が解離したと考えられる。さらに、この一連の操作を繰り返すと、大腸菌供給時およびPBS洗浄時の最大共鳴波長の定常値が増大していった。これは、装置が何らかの物理的影響 (温度変化、振動、外部光等) を受けたことで、応答のベースラインがドリフトしたためであると考えられる。このことはセンサの精度を向上させる上で解決すべき課題である。

4. 結論

本研究では、市販の抗O157抗体および抗ノロウイルス抗体を用いた病原微生物SPRバイオセンサを開発した。このセンサを用いることで定量的に大腸菌を検出でき、検量線を作成できた。ノロウイルスに関しては、シグナル増幅プローブとしてVBPを使ったサンドイッチ法により、センサシグナルを4倍に増幅できた。さらに、Glycine-HCl緩衝溶液を用いて、O157用センサチップを再利用することができた。

今後はさらなるセンサの改良 (例えばセンサシグナルの安定性向上、定量下限値の低下など) を行う。

謝辞

本研究を遂行するにあたりCRESTおよび科研費 (2465 6306、22656115) の支援を受けました。ここに記し謝意を表します。

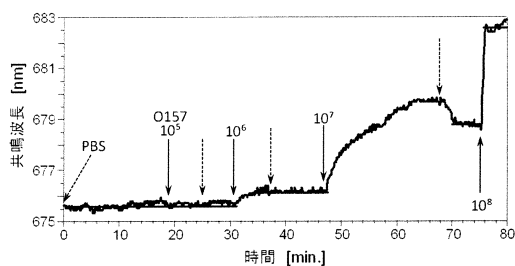


図 2 O157 用 SPR センサチップにサンプル溶液を供給した際のセンサグラム

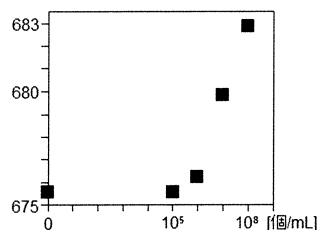


図3 O157用SPRセンサの検量線

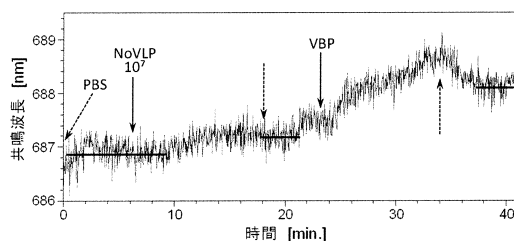


図 4 ノロウイルス用 SPR センサチップにサンプル溶液を供給した際のセンサグラム

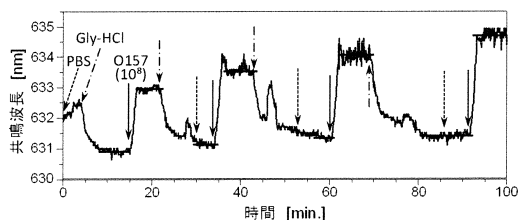


図 5 Glycine-HCl 緩衝溶液を用いた O157 用 SPR センサチップの再生

参考文献

- 1) WHO Food Safety; <http://www.who.int/foodsafety/en/>
- 2) 厚生労働省; <http://www.mhlw.go.jp/>
- 3) Arora et al. 2011 Biosens. Bioelectron. 28(1) 1-12.
- 4) Skottunpa et al. 2008 Biosens. Bioelectron. 24(3) 339-348.
- 5) Bergwerff and van Knapen 2006 J. AOAC Int. 89(3) 826-831.
- 6) Imai et al. 2011 BMC Biotechnol. 11 123.