

# グルコース消費を指標とした信号累積型イオン感応性電界効果トランジスタ (SA-ISFET) センサーを用いた大腸菌検出法の検討

バイオ系チーム 泊 直宏  
京都バイオ計測センター 山本 佳宏

## 要 旨

信号累積型イオン感応性電界効果トランジスタ (SA-ISFET) センサーは、微小なプロトン変化を検出することが可能なセンサーであり、酵素反応前後で生じるプロトンの増減を検出することにより、リアルタイム、ノンラベルで酵素アッセイに利用することができる。

我々はこれまで、SA-ISFETセンサーを用いて様々な酵素反応の測定アプリケーション、さらには食品に含まれる成分の定量や抗原抗体反応の計測など、酵素反応検出を応用した測定法を開発してきた。本研究では、微生物のグルコース代謝に起因する出力を計測する方法について大腸菌をモデルとして検討を行い、1 mLあたり $10^7$  CFUオーダーの大腸菌を検出することができた。しかし、一般細菌については試料1 gあたり $10^5$  CFU以上存在することが腐敗や商品回収の指標となる食品が多いため、今後は試料1 gあたり $10^5$  CFUオーダーの菌数を検出できる測定条件を検討し、食の安全・安心に寄与できる微生物検査手法の開発を進めていく予定である。

## 1. はじめに

近年、例えば食品の安全性や健康など、人を取り巻く環境に関する項目を「測る」技術としてセンシング技術が脚光を浴び、さまざまな領域で研究開発が進み実用化がなされている。

本研究で用いるセンサーのベースとなるセンシング技術であるイオン感応性電界効果トランジスタ (ISFET) は1970年代に開発された技術である。

このISFETは「ソース」、「ドレイン」、そしてセンシング部分の表面を絶縁膜で覆った「ゲート」の3つの部分から構成され、ゲートに直接電圧をかけることでソースドレイン間の電流を制御するFETトランジスタをベースとしている。センサー膜に接する部分に溶液層を設け、その溶液に浸した参照電極に電圧をかけることでソースドレイン間の電流を変化させその結果、溶液中のプロトン濃度が増加することでゲート間を流れる電流を変化させることができる。この原理を用いてISFETセンサーをバイオセンサーとして利用するための研究が行われていたが、当時は電氣的に発生するノイズや検出に使用する試薬の純度など様々な面での問題があり、バイオセンサーとして実用化されることはなかった。

しかし、2000年代初めに信号を積分することにより感度が改善された信号累積型イオン感応性電界効果トランジスタ (SA-ISFET) が開発された。SA-ISFETはキャパシタと呼ばれる貯蔵タンクのように電流を一時的

に蓄積し増幅することができる機構を持ち合わせたセンサーであり、累積することでS/N比 (シグナル/ノイズ比) を増大させ、電圧として取り出すことにより高感度でイオン濃度の変化を検出することができる。そのため、SA-ISFETはISFETの課題であったノイズの問題を解決することができたことと、累積効果による感度の上昇、さらには試薬の純度の向上により、近年では環境汚染物質や生体反応などを測定するセンサーとして注目されている。

我々は酵素反応の前後で生じるプロトンの微小変化をSA-ISFETセンサーで検出することができることに着目し、これまでさまざまな酵素を対象として、その酵素反応をリアルタイム、ノンラベルで計測することができる測定アプリケーションを開発しており、さらに食品中の尿素的定量や、PCB等の環境汚染物質や大腸菌をターゲットとした抗原抗体反応の検出など、酵素反応を利用した応用アプリケーションを開発してきた<sup>1)~6)</sup>。

本研究では、SA-ISFETセンサーを用いた応用アプリケーションの一つとして、世界的に関心が高まってきている「食の安全・安心」を脅かす食品汚染微生物を検出する手法の検討を行った。微生物が生命活動を行うなかで消費するグルコースの反応をセンシングすることで、食品など環境中に存在する微生物を検出する技術を確立すべく、大腸菌をモデルとした測定法を検討したので報告する。

## 2. 実験方法

### 2.1 測定用大腸菌サンプルの調製

グルコース代謝測定用の微生物として大腸菌*Escherichia coli* K12株 (*E. coli* K12) を選択した。この*E. coli* K12株をLB寒天培地で37℃の条件にて培養し、生じたコロニーを掻き取り、0.85%生理食塩水に懸濁し分光光度計600nmの濁度でおよそ0.5付近になるように調製した。グルコースを代謝できるのは生菌のみであることから、生菌と死菌のセンサー出力を比較するため、調製したサンプルについて少量取り分け100℃で20分処理し、死菌サンプルを調製した。

### 2.2 サンプルに含まれる*E. coli* K12株の菌数計測

2.1で調製した*E. coli* K12株を0.85%生理食塩水で10倍ずつ段階希釈し、 $10^5$ 倍希釈したサンプル100 $\mu$ LをLB寒天培地にプレーティングにより植菌し、37℃で16時間培養後に生じたコロニーをカウントすることにより2.1で調製したサンプルに含まれる*E. coli* K12株の菌体数を見積もった。

### 2.3 グルコース代謝出力の測定

SA-ISFETセンサーは微小のプロトン濃度変化を捉える非常に繊細なセンサーである。通常の酵素反応で用いられる20mM~100mM濃度の緩衝液ではプロトン変化が緩衝能により打ち消され、酵素反応に基づくセンサー出力を検出することができないため、1 mM程度の非常に緩衝能が低い条件下にて測定を行う必要がある。また測定系にpHメーターで用いられる参照電極を有するためNaClなどの塩を50~200mM程度必要とする。これら条件を鑑みて、緩衝能がなく、かつNaClを有する0.85%の生理食塩水をグルコース代謝測定用の組成液として選択した。

SA-ISFET測定にはバイオエックス社製のAMIS-101を使用した。本装置で使用するセンサーはセンサーAとBの2つのバッチを有し、センサーAとセンサーBの出力の差分を測定することができる。そこでセンサーAに生菌とグルコース、センサーBに死菌とグルコースを添加し37℃で10分間インキュベートした後、10分間のセンサーAとセンサーBの出力を測定し、その差分を比較した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 *E. coli* K12株の計測

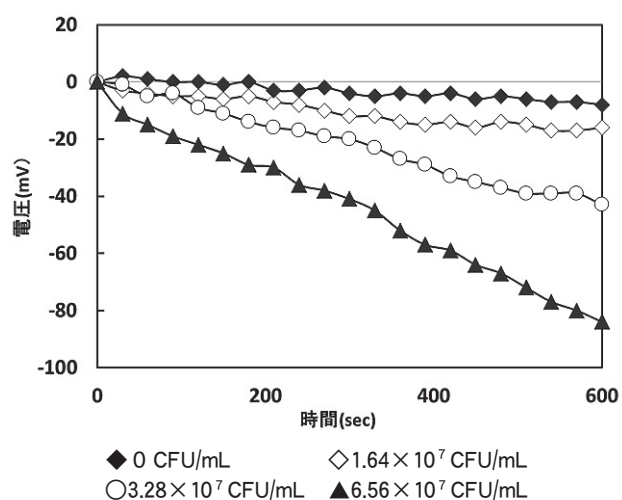
2.1の方法に従い*E. coli* K12株のサンプルを調製し分光光度計にて600nmの濁度を測定したところ0.386であった。このサンプルを2.2の方法に従いLB寒天培地にて2連で培養した結果、生じたコロニー数は328であり(図.1)、調製したサンプル中に1 mLあたり $3.28 \times 10^8$  CFU (Colony Forming Unit: 細菌検査で用いられる単位。細菌を培地で培養し生じたコロニー数) 程度の*E. coli* K12株が存在することが示された。



図.1 LB寒天培地で培養した大腸菌 37℃の条件下、16時間培養し、328個のコロニーを得た。

### 3.2 グルコース代謝出力の測定

2.3の方法に従い、センサーAに*E. coli* K12株の生菌、センサーBに死菌を0 (ブランク)、 $1.64 \times 10^7$ 、 $3.28 \times 10^7$ 、 $6.56 \times 10^7$  CFU/mLの4種類の濃度を振って添加し、グルコース濃度は最終0.05mg/mLとなるように添加した。これらをそれぞれ37℃で10分間インキュベートし、その後グルコース代謝に起因するセンサー出力を10分間モニタリングし計測した。その結果、菌数の増加に応じてセンサー出力が増大し*E. coli* K12株のグルコース代謝に基づく出力を測定できていることが示された(図.2)。今回の結果より、測定可能な菌数は $10^7$  CFU/mL以上であることが示唆された。



p57 (2017)

6) Naohiro Tomari *et al.* : Analytical Biochemistry, 584, 113353 (2019).

図 2 大腸菌 *E. coli* K12 株のグルコース代謝に基づくプロトン変化の出力センサー A に生菌，センサー B に死菌を添加しセンサー A-B の出力を表示。

測定条件

グルコース濃度：0.05mg/mL，測定用バッファー：0.85%生理食塩水，測定温度：37°C，測定時間：10分，サンプル中の菌数 (CFU)：0， $1.64 \times 10^7$ ， $3.28 \times 10^7$ ， $6.56 \times 10^7$

#### 4. まとめ

本研究において，微生物の代謝に基づくセンシングデータを大腸菌 *E. coli* K12 株のグルコース代謝をモデル測定系として，SA-ISFET センサーを用いて検出することができた。

病原微生物を除く一般細菌などの菌数については試料 1 g あたり  $10^5$  CFU 以上存在することが腐敗や商品回収の指標となる食品が多いため，今後は引き続き *E. coli* K12 株をモデル微生物として選択し，1 g あたり  $10^5$  CFU オーダーの菌数を検出できる測定条件を検討し，食の安全・安心に寄与できる微生物検査手法の開発を進めていきたい。

#### 参考文献

- 1) Naohiro Tomari *et al.* : Journal of Bioscience and Bioengineering, 119, 247 (2013).
- 2) 泊直宏他：京都市産業技術研究所研究報告，No.4, p39 (2014)
- 3) 泊直宏他：京都市産業技術研究所研究報告，No.5, p93 (2015)
- 4) 泊直宏他：京都市産業技術研究所研究報告，No.6, p52 (2016)
- 5) 泊直宏他：京都市産業技術研究所研究報告，No.7,