

令和 3 年 5 月 29 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H01842

研究課題名(和文)細菌内無機元素の高分解能動態観測を目指した高機能マイクロ流路液体セルの開発

研究課題名(英文)High functional microfluidic liquid cell for dynamic visualization of inorganic elements in bacteria at high resolution

研究代表者

石田 忠 (Ishida, Tadashi)

東京工業大学・工学院・准教授

研究者番号：80517607

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：耐性菌の増加が懸念される中、耐性菌の新規治療方法の開発が遅れている。そこで、これまでバイオ分野であまり注目されていなかった無機元素の観点から、液中細菌を高分解能観察するための技術を開発した。高分解能で電子顕微鏡観察するための薄膜技術や細菌搬送技術を開発し、液中細菌の高分解能観察を実現した。これにより数百nm級の構造やウイルスの観察も可能となった。さらに、細菌の無機元素の検出にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、液中細菌やウイルスの高分解能観察と無機元素分析を可能とした。これにより、これまで得られなかった細菌の生命現象に関する知見や細菌とウイルスの相互作用を高分解能で観察できるようになる。これらの知見は、耐性菌の新規治療方法の開発に大いに役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：While increase of drug resistive bacteria is one of big concerns of humans, development of new treatments for the drug resistive bacteria have not been well developed. From the points of inorganic elemental view, which are vital for bacterial culture but are not strongly focused in biology field, we developed in-liquid electron microscopy of bacteria at high resolution. A super thin electron transparent membrane and transportation methods of bacteria in a microchannel were developed, resulting in high resolution visualization of bacteria in liquid. With this technology, we achieved the visualization of hundreds-nanometer structures in bacteria in liquid and viruses, and further analyze the elemental spectrums of bacteria.

研究分野：ナノマイクロシステム

キーワード：マイクロ流路 SEM 電子線透過膜 液中細菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

耐性菌感染症の新治療法として、新規作用機序の抗生剤やファージセラピーが求められているが、既にそれらに対して細菌が耐性を獲得することが予測されている。細菌が耐性を容易に獲得してしまうと、現状の偶然に頼った新治療法開発では、新治療法が開発できても再び容易に困難な状況に戻ってしまう。そこで、細菌の生命現象や耐性機構等をナノレベルで解明し、それらの知見に基づいて計画的に治療法を開発することが望ましい。このとき細菌について遺伝子解析やタンパク質発現などの有機物質についての研究は盛んに行われているが、無機物質に関しては計測手法の欠如から十分研究されていない。細菌培養に無機微量元素が不可欠であることを考えると、新治療法開発にとって重要な知見が得られる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、無機元素の観点から細菌を研究するために、マイクロ流路を用いて高分解能観察・高機能を両立した液体セル(MEMS 液体セル)を開発することである。耐性菌感染症の治療法開発において重要となりうる、細菌の生存に不可欠な必須無機元素の役割や細菌群が形成するバイオフィルムによる耐性機構に関する知見を、ナノレベルで獲得することを目指す。

3. 研究の方法

高分解能観察・高機能を両立した MEMS 液体セルの開発のために、(A)高分解能液中 SEM 観察技術と(B)ナノバイオ試料の液中搬送技術を開発し、それらを用いて(C) ナノバイオ試料の観察・分析を行う。

(A) 高分解能液中 SEM 観察技術

(A-1) 超薄電子線透過膜

電子顕微鏡観察の高分解能と電子線ダメージの低減を実現するために、電子線透過膜である窒化珪素膜(SiN 膜)の厚みを 80 nm から 10 nm 以下に薄化する。これにより SiN 膜中における電子線散乱を低減する。

(A-2) 寒天製流路

液体培地を用いずに細菌を培養する方法として寒天培地を用いる方法がある。そこで、寒天培地でできたマイクロ流路を開発する。これにより、細菌と SiN 膜の間の培養液を空気に置き換えることで、電子線散乱を低減する。

(B) ナノバイオ試料の液中搬送技術

(B-1) 壁なしマイクロ流路技術

通常マイクロ流路は流路壁が存在し、それが存在するために SiN 膜と機械構造が接触し、その結果として SiN 膜の破壊につながる。培養液が流れる部分と流れない部分を疎水性・親水性パターンにより作り分けた壁なし流路技術を開発することで、マイクロ流路と SiN 膜の接触を完全に回避する。

(B-2) 粗微動切替機能付き水圧アクチュエータ

SiN 膜と細菌の間の液体を減らすことが電子線散乱の低減につながるため、細菌を SiN 膜に接近するアクチュエータを開発する。マイクロ流路と親和性の高いバルーンアクチュエータに粗微動切替機構を実装し、SiN 膜から離れたところでは粗動(数十マイクロメートルオーダー)、SiN 膜近傍では微動(数マイクロメートルオーダー)に切り替える。電子線ダメージを低減しつつ分解能を向上するために、観察時にのみ細菌を SiN 膜に接近させる。

(B-3) 誘電泳動による細菌捕捉技術

SiN 膜上に対向電極を配置し、誘電泳動を用いて、電極間に細菌を捕捉する。これにより、細菌を SiN 膜上に配置することが可能となり、電子線散乱の原因となる液体を排除できる。電極間ギャップを数マイクロメートルにすることで、少量の細菌を電子線透過膜上に誘電泳動で捕獲する。

(B-4) 光ピンセットによる細菌の三次元搬送技術

光ピンセットを導入可能なマイクロ流路を開発する。PDMS では光ピンセット用レーザーが散乱し細菌を捕捉することができないため、片面を SiN 膜、もう片面を開放としたマイクロ流路を開発する。また光ピンセットを実装するため、光学顕微鏡と電子顕微鏡の融合を試みる。

(C) 液中・気中のナノバイオ試料の電子顕微鏡観察

(A)(B)で開発した高分解能液中 SEM 観察技術とナノバイオ試料の液中搬送技術を融合して、細菌の液中・気中の高分解能観察に取り組む。液滴、細菌、バイオフィルム、ファージの高分解能観察と成分分析を行い、微量元素の分析を行う。

4. 研究成果

本研究の目的である「無機元素の観点から細菌を研究するための、高分解能観察・高機能を両

立したマイクロ流路液体セルを開発」において、3で述べたA)高分解能液中SEM観察技術と(B)ナノバイオ試料の液中搬送技術を開発し、それらを用いて(C)ナノバイオ試料の観察・分析を行った。

(A) 高分解能液中SEM観察技術

(A-1) 超薄電子線透過膜

真空と大気圧の隔壁として機能する超薄SiN膜を形成した。膜厚10nmのSiN膜は作製プロセス時に割れることが多く、歩留まりが極めて低かった。そこで、SiN膜の保護層としてPDMS製のマイクロ流路を事前に接合し、エッチャントによるSiN膜へのダメージを回避した。これにより、歩留まりが劇的に向上し、マイクロ流路内のナノバイオ試料の高分解能観察が可能となった。

(A-2) 寒天製流路

鋳型を使ったソフトリソグラフィ法で寒天にマイクロ流路を形成した(図1)。流路内において培養液なしでの細菌培養を実現した(図2)。この寒天製マイクロ流路にSiN膜を実装することで、液体なしで細菌のSEM観察ができるようになった。

(B) ナノバイオ試料の液中搬送技術

(B-1) 壁なしマイクロ流路技術

疎水性パターンと親水性パターンにより定義された壁のないマイクロ流路技術を開発した。細菌懸濁した培養液を導入したところ、親水性パターンに沿って細菌懸濁液を流せることを確認した。さらに表面エネルギーの観点から設計し、受動バルブ(図3)や蒸発防止機能、混合機能などを実現した。これらを組み合わせれば、アクチュエータにより細菌をSiN膜に接近しても、接触する機械構造のないマイクロ流路が実現する。

(B-2) 粗微動切替機能付き水圧アクチュエータ

シリコンゴム膜にストップ構造を実装した粗微動駆動機構付きアクチュエータを開発した(図4)。ストップ構造の内外におけるシリコンゴム膜のばね定数の違いを利用し、アクチュエータとして機能する膜の変位をストップ構造の接触前後で切り替えた。これにより、アクチュエータ特性の粗微動比において14を実現した(図5)。これにより、SiN膜から離れた位置では粗動で動き、SiN膜近傍では粗動の1/10程度の微動で動けるようになり、SiN膜に接触する直前まで近づけることができる。

(B-3) 誘電泳動による細菌捕捉技術

対向電極付きSiN膜を開発した。ガラス基板上で電極間に交流電圧を印加したところシアノバクテリアを電極間に捕捉できたが、SiN膜上ではシアノバクテリアを電極間に捕捉できなかった。この原因が基板と電極間の容量性カップリングであることを特定した。SiN膜の上にPDMS膜を設置することで容量性カップリングを抑制し、対向電極間にシアノバクテリアを捕捉できた(図6)。

(B-4) 光ピンセットによる細菌の三次元搬

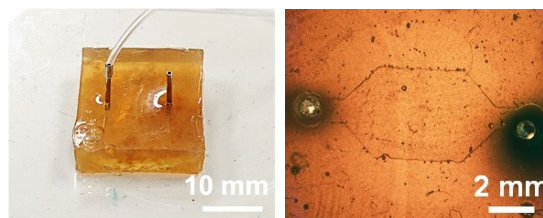


図1 寒天製マイクロ流路

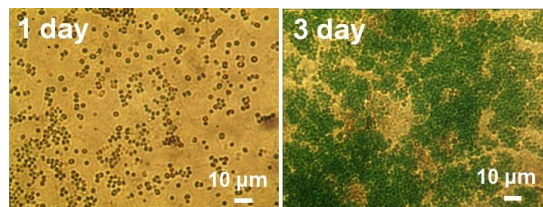


図2 寒天マイクロ流路内での細菌培養

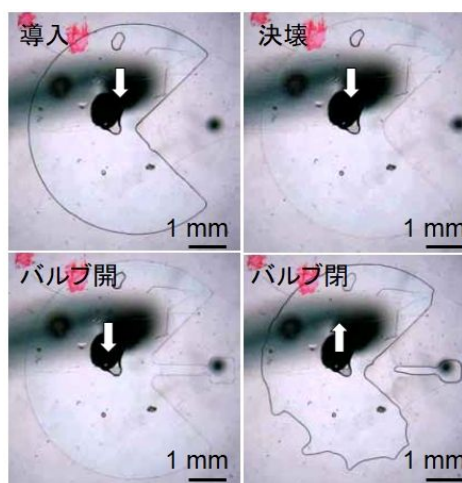


図3 壁なし流路バルブ

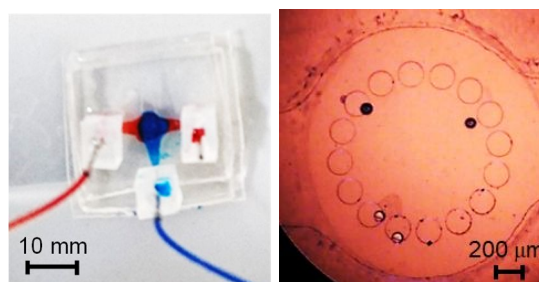


図4 粗微動切替機構付きマイクロアクチュエータ

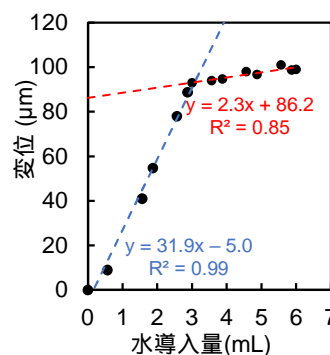


図5 粗微動切替機構付きマイクロアクチュエータの駆動特性

送技術

マイクロ流路内の試料を 3 次元的に搬送することを可能とするべく、光ピンセットを使用可能な開放型マイクロ流路を開発した。SiN 膜と開放型マイクロ流路を組み合わせ、SEM と光学顕微鏡を組み合わせ、光学顕微鏡観察下で光ピンセットによる試料搬送を実現した(図 7)。ただし、光ピンセットのレーザーが SEM の反射検出器で検出され、ナノバイオ試料の搬送中に SEM 観察することができなかった。

(C) 液中・気中のナノバイオ試料の電子顕微鏡観察

MEMS 液体セルを用いて水滴の凝縮過程を観察した。直径数 μm の水滴が薄膜に形成されたのちに、徐々にその直径が大きくなる成長過程を観察した。さらに、隣接する水滴と接触して融合する融合過程も観察した。成長過程に比べ融合過程では凝縮スピードが 10 倍程度加速していた。また、寒天流路を有する MEMS 液体セルを用いて、寒天に接するシアノバクテリアと大腸菌を観察した。シアノバクテリアは鮮明に観察できたが、大腸菌はコントラストが低かった。これはシアノバクテリアの方が重元素を多く含んでいることを示唆している。

さらに、超薄 SiN 膜を用いた MEMS 液体セルで細菌を観察した。液中シアノバクテリアの高分解能電子顕微鏡観察に成功した。シアノバクテリアにおいて 100 nm レベル級の微細構造の液中観察を実現し、シアノバクテリアの分裂時に形成する PD リングのような構造を観察できた(図 8)。一方、電子線透過膜越しにシアノバクテリアの成分分析をエネルギー分散 X 線分光計測で行ったところ、K や Ca、Cr などの無機成分の検出に成功した。シアノバクテリアのバイオフィルムの SEM 観察や元素分析を試みたが、バイオフィルムの形成を確認することができず、観察や分析に至らなかった。

さらに、大腸菌に感染するバクテリオファージの一種 T7 ファージを超薄 SiN 膜越しで SEM 観察した。直径 200 nm 程度のファージの頭部が超薄 SiN 膜越しに SEM 観察できた(図 9)。

今後は(A)と(B)で開発した技術をさらに組み合わせることで、実験自由度が高く高分解能可能な MEMS 液体セルを開発する予定である。

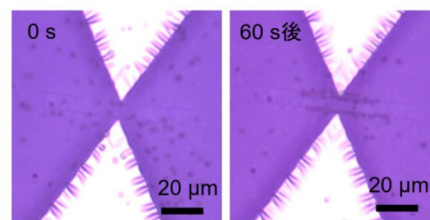


図 6 誘電泳動によるシアノバクテリアの捕捉

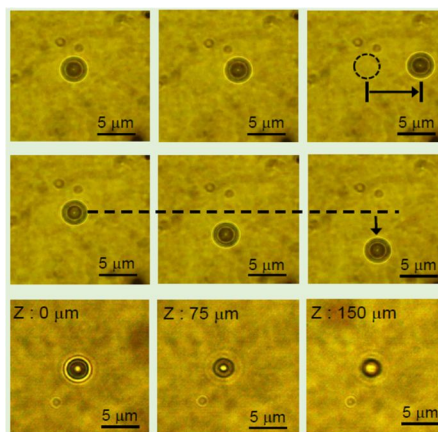


図 7 光ピンセットを用いたマイクロビーズの三次元搬送

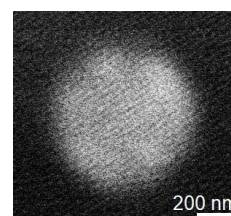


図 8 シアノバクテリアの液中観察

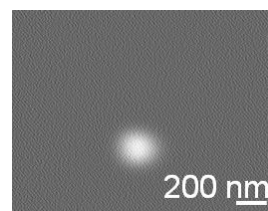


図 9 T7 ファージの膜越し観察

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tadashi Ishida	4. 巻 102
2. 論文標題 Development of MEMS liquid cell to visualize the dynamics of bubbles and droplets at the microscale	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Electronics and Communications in Japan	6. 最初と最後の頁 55-60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ecj.12205	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 石田忠	4. 巻 139
2. 論文標題 マイクロスケール気泡・液滴の電子顕微鏡動的観察のためのMEMS液体セルの開発	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 電気学会論文誌E	6. 最初と最後の頁 137-142
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1541/ieejsmas.139.137	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Tadashi Ishida
2. 発表標題 In-situ Visualization of Water Drop Condensation at Different Temperatures Using the Combination of a Microfluidic Liquid Cell and a Scanning Electron Microscope
3. 学会等名 20th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石浦 史也, 石田 忠
2. 発表標題 親水性パターンを用いた局所決壊式マイクロバルブの開発
3. 学会等名 第36回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安藤 瑞基, 石田 忠
2. 発表標題 寒天マイクロ流路デバイスを用いた流路内細菌培養
3. 学会等名 第36回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 仁木 彰太, 石田 忠
2. 発表標題 光ピンセットを用いた流路内物体操作とその電子顕微鏡観察のための開放型マイクロ流路デバイスの開発
3. 学会等名 第36回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山内 凱偉, 石田 忠
2. 発表標題 マイクロピラーを用いた粗微動切替可能な水圧バルーンアクチュエータの開発
3. 学会等名 第36回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tadashi Ishida, Tomohiro Hayashi
2. 発表標題 In-situ Observation of Water Condensation Using Electron Microscope at Atmospheric Condition
3. 学会等名 Water on Materials Surface 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石田 忠
2. 発表標題 MEMS液中セルと電子顕微鏡を用いた液試料のマイクロスケール動態観察
3. 学会等名 第35回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安藤 瑞基, 小俣 透, 石田 忠
2. 発表標題 培養細菌の高分解能電子顕微鏡観察を目指した寒天マイクロ流体デバイスの開発
3. 学会等名 IIP2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉原 晶彦, 石田 忠
2. 発表標題 液中ナノバイオ試料の電子顕微鏡観察のための超薄電子線透過膜を有するMEMS液体セルの開発
3. 学会等名 第37回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tadashi Ishida
2. 発表標題 MEMS liquid cell for in-liquid electron microscopy
3. 学会等名 15th IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered & Molecular Systems, (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石田 忠
2. 発表標題 ナノバイオ試料の液中電子顕微鏡観察のためのマイクロ流路デバイス
3. 学会等名 令和3年電気学会全国大会シンポジウム
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 メンブレンデバイス及びその製造方法	発明者 石田忠、杉原晶彦	権利者 国立大学法人東京工業大学
産業財産権の種類、番号 特許、2020-055359	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

小俣石田研究室 http://www.bmm.mech.e.titech.ac.jp/
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	林 智広 (Hayashi Tomohiro) (30401574)	東京工業大学・物質理工学院・准教授 (12608)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------