

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：13904

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02196

研究課題名(和文)細菌ストレス応答の動的過程解明:エレクトロニクスに創発された新細菌同定法への展開

研究課題名(英文)Dynamic Processes of Bacterial Stress Response: Development of Novel Bacterial Identification Method Inspired by Electronics

研究代表者

石井 仁 (Ishii, Hiromu)

豊橋技術科学大学・研究推進アドミニストレーションセンター・特任教授

研究者番号：20506175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：バイオフィームなどの環境に常在する病原細菌の一つであるレジオネラ属菌を細菌の動的過程解明のモデル細菌とし、このレジオネラ属菌の紫外光や化学物質に対するストレス応答の動的過程を細胞内の蛍光物質の減少、増加過程として反応化学的に記述した。さらにフォトゲート型細菌センサチップをMEMS流路とハイブリッド化した細菌センサシステム構築を進め、3Dプリンタを用いて作製した筐体にフォトゲート型細菌センサとMEMS流路を実装し、3.5x13 cm²程度の小型可搬な細菌センサシステムを作製した。この細菌センサシステムを用いて、レジオネラ属菌の蛍光の動的過程を観測しレジオネラ属菌の識別に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バイオフィームなどの環境に常在する病原細菌の一つであるレジオネラ属菌を細菌の動的過程解明のモデル細菌とし、このレジオネラ属菌の紫外光や化学物質に対するストレス応答の動的過程を細胞内の蛍光物質の減少、増加過程として反応化学的に記述した。さらにフォトゲート型細菌センサチップをMEMS流路とハイブリッド化した小型可搬な細菌センサシステム構築をした。これにより、培養期間を要することなく医療現場や高齢者施設で即時的に病原細菌の検知を可能とし、感染のアウトブレイク前に警告を発する可能性を示すことができる。

研究成果の概要(英文)：Legionella species, one of the pathogenic bacteria that are endemic to the environment such as biofilms, was used as a model bacterium to elucidate the dynamic process of bacteria. The dynamic process of the stress response of Legionella species to UV light was described by the reaction kinetics as the decrease and increase of intracellular fluorescent substances. We also developed a bacterial sensor system by hybridizing a photogate-type bacterial sensor with a MEMS microfluidic. That is, we developed a compact and portable bacterial sensor system of about 3.5x13 cm² by mounting a photogate-type bacterial sensor and a MEMS microfluidic in a housing fabricated by a 3D printer. Using this bacterial sensor system, we observed the dynamic process of fluorescence of Legionella bacteria and succeeded in identifying Legionella species.

研究分野：集積化MEMS

キーワード：Bio-MEMS 細菌 フォトゲート レジオネラ属菌 反応化学

1. 研究開始当初の背景

レジオネラや大腸菌 0-157 などによる細菌感染症のアウトブレイクが問題になっていた。従来の細菌学では、栄養を含む培地を用い、増殖に適した温度で細菌を培養しており、細菌学の知見は主として好適培養条件下での細菌の性質に依拠して感染症の予防、治療の方法が考えられてきた。しかしながら、感染症の発生を必ずしも有効に抑えることができない近年の事実は、限られた好適条件下での細菌行動の一面しか見ておらず、実は細菌の多様な行動を見逃している可能性が大きいことを物語っている。これまでの知識だけでは細菌感染症の発生メカニズムが充分説明できないことが多いのはこのためとも考えられる。細菌の様々な環境条件下における行動の把握は細菌感染症の予防にとっても、感染後の病態理解においても重要な知見を与えることになると期待できる。

2. 研究の目的

必ずしも好適培養条件下ではない、むしろ細胞内寄生を模擬するマイクロ空間内、紫外光などの短波長を含む太陽光照射環境下における細菌の性質を検討することにより、これまで知られていなかった新たな細菌挙動(ストレス応答)を見出し病原細菌学に貢献すること、そうしたストレス応答を指標とした小型可搬な病原細菌検出用センサの開発への道を拓くことを目的とする。

3. 研究の方法

レジオネラ属菌をターゲット細菌とし、この細菌のストレス応答をフォトゲート型蛍光センサで取得・記録し該細菌の識別データとし、さらにこのフォトゲート型蛍光センサを実装した小型・可搬なシステムを構築することとした。

4. 研究成果

本研究で得られた成果は主として、(1) フォトゲート型蛍光センサと MEMS 流路を実装し小型・可搬な細菌センサの実現、(2) この細菌センサを用いたレジオネラ属菌の識別に成功したことこの二点である。以下にそれら成果について述べる。

(1) フォトゲート型蛍光センサを用いた小型・可搬細菌センサの作製

図 1(a)にフォトゲート型蛍光センサ(以下センサと略記)の模式的断面図を示す。このセンサでは紫外光の照射によるレジオネラ属菌の蛍光がセンシングエリアに入り、光電子を生成する。これを電流として読み取ることにより蛍光の検出を行う。図 1(b)はセンシングエリア内のフォトゲートと Si 界面から深さ方向のポテンシャルを模式的に示したものである。従来、ゲート電圧 V_{PG} を印加することによって形成されるポテンシャルのピークを境にして、フォトゲートとの界面側に流れる電流、 I_{out} を計測してきた。光の Si 中への侵入深度は、図 2 に示すように波長に応じて異なり、短波長は浅く、長波長は深くまで侵入することが知られている。このとき、センサ内部に形成されるポテンシャルピークの基板側の光電流 I_{sub} を計測すると、深くまで侵入した長波長の蛍光の挙動を反映した情報を得ることができると考えられる。このため本研究では新たに I_{out} と I_{sub} を同時に計測し両電流の比を取得する手法を用いた。波長により異なるシリコンの吸収係数による減衰特性の違いから、それぞれの電流比を取ることで波長情報の取得が可能であると考えられる。本研究で用いたフォトゲート型蛍光センサのゲート電圧 1~4 V 印加時のポテンシャルピーク位置は図 2 に述べたように約 1.15~1.52 μm 程度であり、比較的短波長の青色、緑色の 470 nm、530 nm では深さ 1 μm 程度で殆どの光が吸収され、ポテンシャルピーク位置を境とした表面側電流 I_{out} の寄与が大きく、一方、長波長の 660 nm の光はフォトゲート電圧印加時に形成されるポテンシャルピーク位置約 1 μm から手前のセンサ表

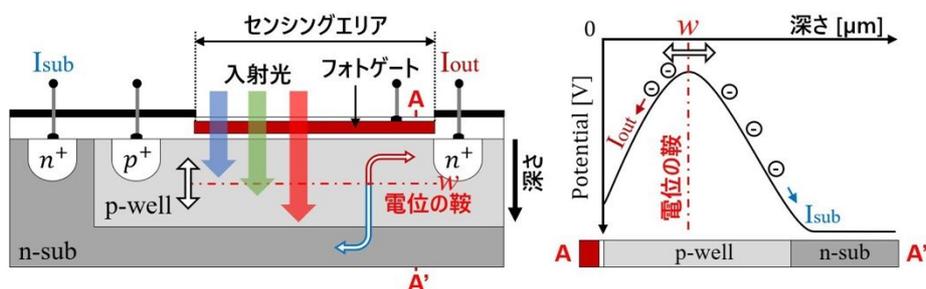


図 1 (a) フォトゲート型蛍光センサ断面模式図 (b)ポテンシャル模式図

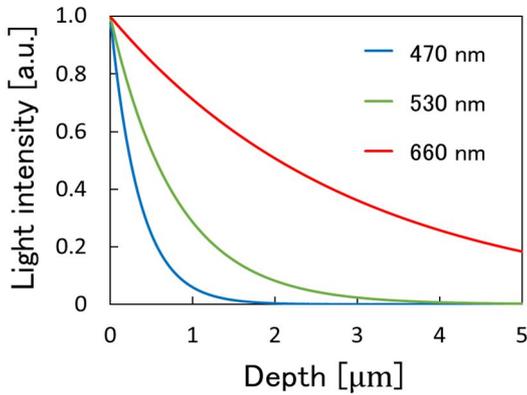


図 2 . 光強度 vs. Si 中侵入深度

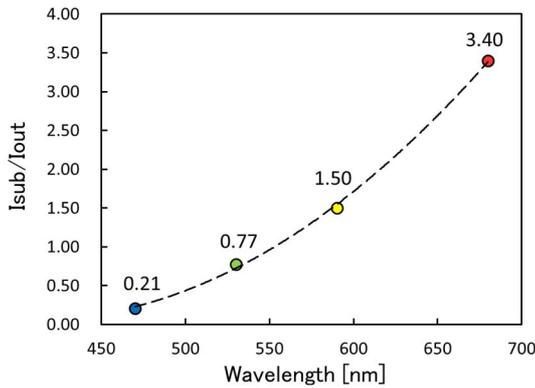


図 3. 電流比の LED 波長依存性

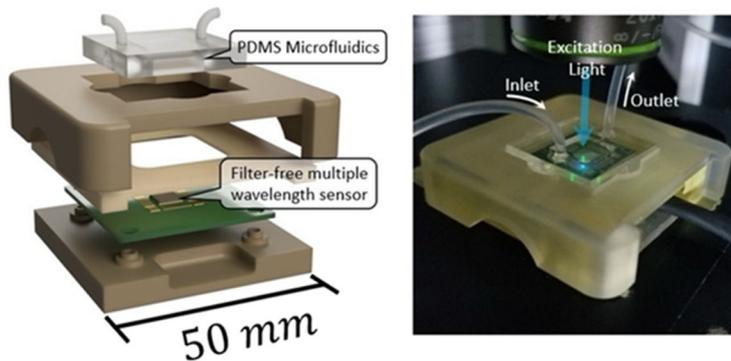


図 4 . 細菌注入用流路及びセンサ固定用治具

システムの概要及び構成に示す。設計仕様として、レジオネラ属菌測定時のセンサ応答の電流値オーダーならびに電流値の時間変化量を確認し、電流値数百 pA ~ 数 nA オーダーかつ時間変化が数十 ~ 数 pA であったため、ダイナミックレンジを 30 nA、分解能を 1.25 pA/LSB とした。センサ電流値読み出しの構成には、取得した表面側電流 I_{out} 及び基板側電流 I_{sub} の各センサ応答をオペアンプによる I-V 変換回路で電圧値に変換する。オペアンプは fA オーダーの入力バイアス、低ノイズ高精度なアンプを選定し、この信号を 16 bit の AD コンバータでデジタル変換したものをマイコンで読み出す構成とした。マイコンボードはアナログ電圧制御可能なものを選定し

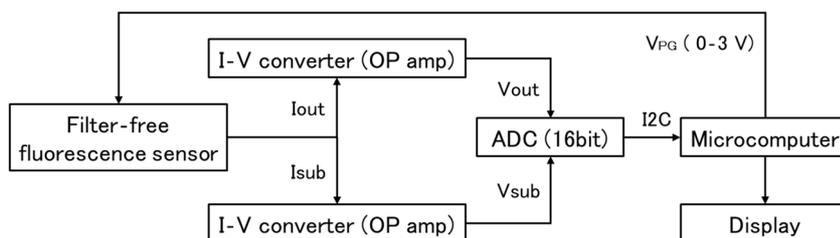


図 5 . 小型測定システム構成

面側では吸収が少なく、ピーク位置から基板側に流れる電流 I_{sub} の寄与が大きくなると推定できる。

図 3 は提案する両電流の比率を取ることによって波長情報が取得できるか否かを検討した結果である。この図では、LED 光源波長を 470、530、590、680 nm の 4 波長用意し、300 μm 角のセンシングエリアに 400 μm 径のファイバ、20 倍対物レンズを介して照射した。フォトゲート電圧を 3 V 印加した際の表面側電流 I_{out} と基板側電流 I_{sub} の電流比率の測定結果を示している。図 3 の結果からポテンシャルピークを境に表面側と基板側に流れる 2 つの電流の比率により短波長の光ほど表面側電流 I_{out} の電流値が大きく、 I_{sub}/I_{out} が小さくなり、長波長の光ほど基板側電流 I_{sub} の電流値が大きく、 I_{sub}/I_{out} が大きくなることが確認された。この結果から電流比率からの波長情報の取得が可能であることが実証された。これによって菌種により蛍光スペクトルの波長が異なるレジオネラ属菌において提案手法の適用による波長情報の取得による菌種識別可能性があると考えられた。次に従来用いて来た半導体パラメータアナライザ、蛍光顕微鏡といったバルキーな測定系に代わる小型・可搬な測定システムの構築について述べる。

まず現場での即時検査を想定して浴場や室外機等の循環水からの細菌検出・識別が可能な PDMS 製の流路及び測定時の流路およびセンサの固定用治具の設計および 3D プリントを用いた作製を行った。設計した各パーツを組み立てたものを図 4 に示す。このシステムを用いることによって、菌液等のサンプルを注入し流路は測定が終わった際に付け替えることで、繰り返しの測定が可能となった。次にレジオネラ属菌の蛍光放出によるセンサ応答の簡易取得が可能な測定系の構成を設計し、仕様を決定した。図 5 に測定シ

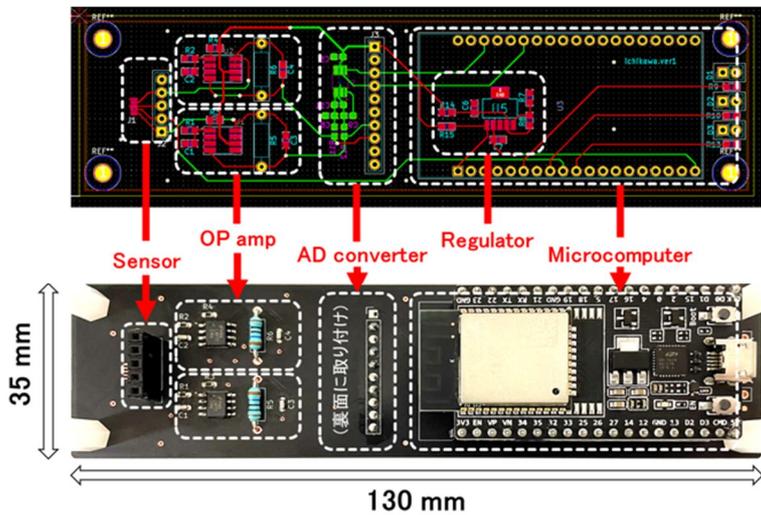


図6. 基板レイアウト及び実装時の写真

ており各回路及びセンサへの電源制御を行っている。また、現場での即時検査に向けて無線接続での制御も可能なボードであるため、この構成にバッテリーを搭載することで遠隔での計測も可能なものとした。

次に測定システム製作のため、PCB 設計には Kicad を用い、基板への実装を行った。各部品のレイアウト及び実装した基板のサイズを図6に示す。従来手法の測定で用いていた半導体パラメータアナライザ (HP4155) は寸法が $580 \times 430 \times 220 \text{ mm}^3$ 、重量約 20 kg で持ち運びに制限があったが、 $35 \times 130 \text{ mm}^2$ の小型で

十分な可搬性を持つ測定系とした。

次に設計仕様ならびに測定システムの動作確認を行った。470、660 nm の LED 光源照射時の入射光強度と出力特性を測定した。2 波長の光源を $300 \mu\text{m}$ 角のセンシングエリアに $400 \mu\text{m}$ 径のファイバ、20 倍対物レンズを介して照射し、フォトゲート電圧を 3 V 印加した際のセンサ応答を小型測定システムで取得した結果を図7に示す。この結果から、入射光強度に対する小型測定システムで取得したセンサ応答の線形性を確認した。また、波長ごとに光吸収特性が異なるため入射光強度に対する出力の傾きが異なる結果が

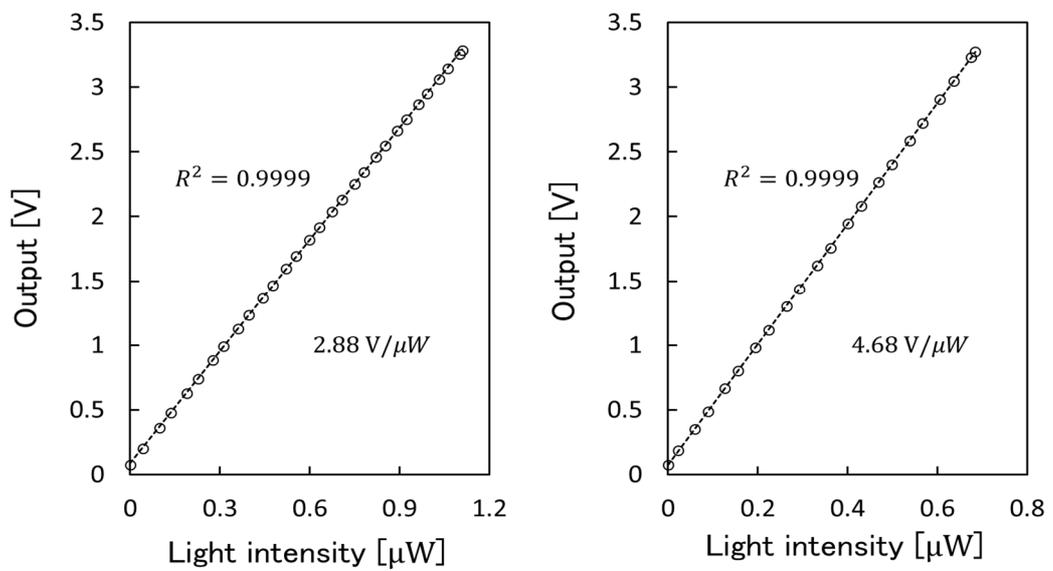


図7. 入射光強度-小型測定システムで取得したセンサ応答特性 (左: 470 nm, 右 660nm)

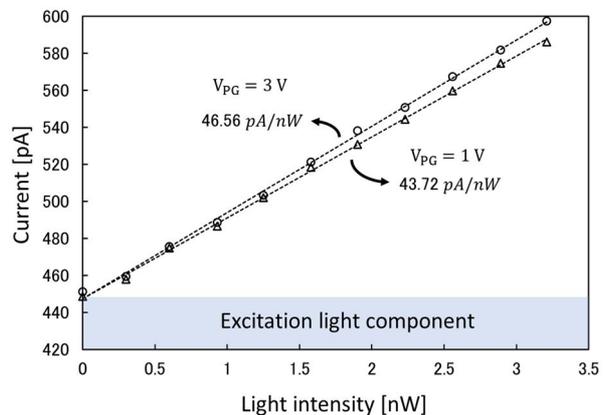


図8. 紫外励起光及び LED 光源 (660 nm)

得られている。この検討によりダイナミックレンジ内での入射光強度-出力特性の動作確認ができた。図8は実際のレジオネラ属菌測定を想定して微弱光の信号取得の可能性を検討する模擬実験を行った結果である。レジオネラ属菌測定時の条件と同じ励起光強度として1 mWの紫外励起光と同時に赤色蛍光を模擬した660 nmのLED光源を0~3 nWに変化させ照射した際のセンサ応答の測定結果を示している。フォトゲート電圧は1 Vと3 V印加時の応答を取得した。この結果から、レジオネラ属菌の蛍光測定を模擬した励起光と蛍光が同時に入射した条件下においても蛍光相当の微弱な光強度変化に対する出力の線形応答が確認できた。

(2) 細菌センサを用いたレジオネラ属菌の識別

ここでは実際のレジオネラ属菌測定として青色蛍光を放出する *L. dumoffii*、赤色蛍光を放出する *L. erythra* の2種のレジオネラ菌を提案手法ならびに製作した小型測定システムを用いた測定について述べる。これまでの細菌測定により分光器で取得した蛍光スペクトルを図9及び図10に示す。図9は青色の蛍光を放出する *L. dumoffii* の蛍光スペクトルであり、主に450 nmから550 nmの短波長帯に蛍光スペクトルが見られ、その強度が蛍光退色により時間的に減少していく特徴を持つ。図10は赤色蛍光を放出する *L. erythra* の蛍光スペクトルであり、600 nm

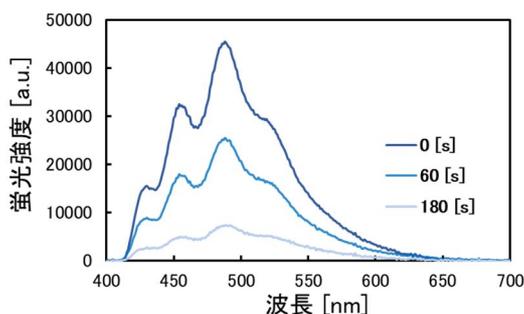


図9. *L. dumoffii* の蛍光スペクトル

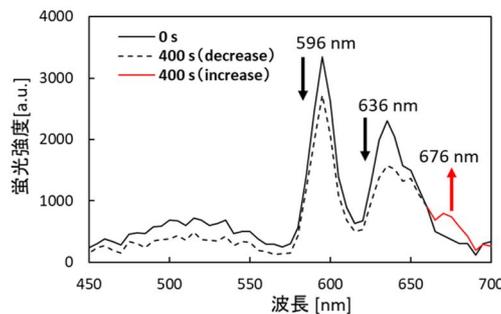


図10. *L. erythra* の蛍光スペクトル

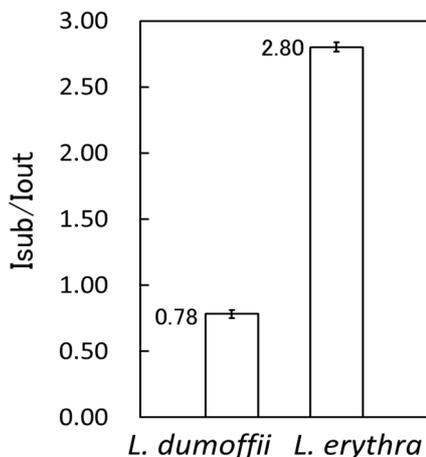


図11. 各菌における電流比率の測定結果

から700nm程度の長波長蛍光が見られる。この菌種は他の菌種にも見られる蛍光退色による光強度の減少だけでなく、670 nm付近に紫外励起光の照射時間と共に増加するピークが特徴的である。この二種のレジオネラ属菌について前述のセンサを用いて表面側電流 I_{out} と基板側電流 I_{sub} の比率 I_{sub}/I_{out} 光電流の比を取得した結果が図11である。

図3のLEDによって取得した電流比の波長依存性と参照してわかるようにレジオネラ属菌の青色蛍光と赤色蛍光を識別できていることがわかる。以上、(1)(2)の取組の結果からフォトゲート型蛍光センサを実装した小型・可搬な蛍光計測システムおよび、提案したフォトゲート型蛍光センサの表面側電流と基板側電流比の測定によるレジオネラ属菌の識別を可能としたと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Ishii Hiromu, Tanaka Sawako, Ishida Makoto, Sawada Kazuaki, Machida Katsuyuki, Nikaido Yasuhiko, Saito Mitsumasa, Yoshida Shinichi	4. 巻 92
2. 論文標題 Bacterial Identification by Using Photogate-Type Optical Sensor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ECS Transactions	6. 最初と最後の頁 155 ~ 162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1149/09204.0155ecst	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 -
1. 著者名 Tanaka Sawako, Choi Young Joon, Ishida Makoto, Sawada Kazuaki, Ishii Hiromu, Machida Katsuyuki, Nikaido Yasuhiko, Saito Mitsumasa, Yoshida Shin-ichi	4. 巻 140
2. 論文標題 Sensing Legionella by Photogate-type Fluorescence Sensor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 IEEJ Transactions on Sensors and Micromachines	6. 最初と最後の頁 103 ~ 108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1541/ieejsmas.140.103	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 -
1. 著者名 Tanaka Sawako, Choi Young Joon, Ishida Makoto, Sawada Kazuaki, Ishii Hiromu, Machida Katsuyuki, Nikaido Yasuhiko, Saito Mitsumasa, Yoshida Shin ichi	4. 巻 103
2. 論文標題 Sensing Legionella by photogate type fluorescence sensor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Electronics and Communications in Japan	6. 最初と最後の頁 83 ~ 89
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ecj.12269	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 -
1. 著者名 Honda Yuto, Ichikawa Ryosuke, Choi Yong Joon, Murakami Kensuke, Takahashi Kazuhiro, Noda Toshihiko, Sawada Kazuaki, Ishii Hiromu, Machida Katsuyuki, Ito Hiroyuki, Miyahara Satoshi, Nikaido Yasuhiko, Saito Mitsumasa	4. 巻 61
2. 論文標題 Detection system for Legionella bacteria using photogate-type optical sensor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 SD1010 ~ SD1010
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.35848/1347-4065/ac5a25	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 2件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 本田優斗, 田中佐和子, 崔容俊, 澤田和明, 野田俊彦, 高橋一浩, 石井仁, 町田克之, 二階堂靖彦, 齋藤光正, 吉田眞一
2. 発表標題 フォトゲート型蛍光センサによるレジオネラ属菌の識別方法の検討
3. 学会等名 電気学会E部門総合研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 本田優斗, 田中佐和子, 崔容俊, 野田俊彦, 高橋一浩, 澤田和明, 石井仁, 町田克之, 伊藤浩之, 二階堂靖彦, 齋藤光正, 吉田眞一
2. 発表標題 レジオネラ属菌の識別に向けたフォトゲート型蛍光センサによる計測手法の検討 ---- Legionella erythra の蛍光計測への応用----
3. 学会等名 第12回集積化MEMSシンポジウム, 応用物理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 本田優斗, 田中佐和子, 崔容俊, 村上健介, 野田俊彦, 高橋一浩, 澤田和明, 石井仁, 町田克之, 伊藤浩之, 二階堂靖彦, 齋藤光正
2. 発表標題 レジオネラ菌の識別に向けたフォトゲート型蛍光センサによる計測システムの検討
3. 学会等名 第68回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 H. Ishii, S. Tanaka, M. Ishida, K. Sawada, K. Machida, Y. Nikaido, M. Saito, S. Yoshida
2. 発表標題 Bacterial identification by using photogate-type optical sensor
3. 学会等名 136th The Electrochemical Society Meeting, Atlanta, USA. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名	S. Tanaka, Y. J. Choi, T. Noda, M. Ishida, K. Sawada, H. Ishii, K. Machida, Y. Nikaido, M. Saito S. Yoshida
2. 発表標題	Identification of Legionella Species by Photogate-Type Optical Sensor
3. 学会等名	IEEE Sensors, Montreal Canada (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	田中佐和子, 崔容俊, 石田誠, 澤田和明, 石井仁, 町田克之, 二階堂靖彦, 齋藤光正, 吉田眞一
2. 発表標題	レジオネラ属菌の蛍光強度の励起光強度依存性 II
3. 学会等名	2019年第80回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	田中佐和子, 崔容俊, 石田誠, 澤田和明, 石井仁, 町田克之, 二階堂靖彦, 齋藤光正, 吉田眞一
2. 発表標題	フォトゲート型光センサを用いたレジオネラ属菌のセンシング
3. 学会等名	バイオ・マイクロシステム研究会, 令和元年度E部門総合研究会, 電気学会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	田中佐和子, 崔容俊, 石田誠, 澤田和明, 石井仁, 町田克之, 二階堂靖彦, 齋藤光正, 吉田眞一
2. 発表標題	フォトゲート型蛍光センサによるレジオネラ属菌の菌種識別
3. 学会等名	第11回集積化MEMSシンポジウム, 応用物理学会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名 H. Ishii, Y. J. Choi, K. Sawada, K. Kachida, H. Ito, S. Miyahara, M. Saito, S. Yoshida
2. 発表標題 Detection of Legionella by Photogate-type Optical Sensor
3. 学会等名 The 10th International Conference on Legionella (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuto Honda, Ryosuke Ichikawa, Yong Joon Choi, Kensuke Murakami, Kazuhiro Takahashi, Toshihiko Noda, Kazuaki Sawada, Hiromu Ishii, Katsuyuki Machida, Hiroyuki Ito, Satoshi Miyahara, Yasuhiko Nikaido, and Mitsumasa Saito
2. 発表標題 Detection System of Legionella Bacteria using Photogate Type Optical Sensor
3. 学会等名 34th International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本田優斗, 崔容俊, 村上健介, 野田俊彦, 高橋一浩, 澤田和明, 石井仁, 町田克之, 伊藤浩之, 宮原敏, 二階堂靖彦, 齋藤光正
2. 発表標題 フォトゲート型蛍光センサによるレジオネラ属菌検知システムの検討
3. 学会等名 第13回集積化MEMSシンポジウム, 応用物理学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	齋藤 光正 (Saito Mitsumasa) (00315087)	産業医科大学・医学部・教授 (37116)	

6. 研究組織（つづき）

	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	町田 克之 (Machida Katsuyuki) (90597676)	東京工業大学・科学技術創成研究院・特任教授 (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