

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22347

研究課題名(和文) 不活性溶媒を利用した迅速培養技術の探索

研究課題名(英文) Investigation of the rapid culture method using inert solvent

研究代表者

小川 雄一(Ogawa, Yuichi)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：20373285

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：細菌の増殖能を迅速かつ定量的にモニタリングする方法として、近接タイプのアレイ型センサを用い、培地中の細菌増殖を精度よく計測する手法を構築することに成功した。さらに、パーフルオロカーボンと培地の境界部で細菌増殖が盛んになることを見出し、界面での局所的な相互作用が細菌増殖能に影響を与えている事を示唆する結果を得た。培地中の成分の組成について、LC-MS/MSで分析したところ、パーフルオロカーボンの添加により、特定の成分で顕著に増減する傾向が確認され、開発した評価系と組成分析を組み合わせることで、不活性溶剤添加による詳細なメカニズム解明が可能になるとの知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの細菌検査の場面において、従来の検査法では最初に細菌を平板培養法で増殖させる必要がある。そのような中、不活性溶媒を培地に添加すると細菌の増殖能が向上することが分かってきた。しかし、どのような仕組みで不活性溶媒が細胞増殖に影響を与えているかが明らかになっていない。そこで我々は本研究を通じて、迅速かつ定量的な微生物モニタリング技術や代謝物解析からメカニズム解明につながる知見を得た。この結果は、食の安全安心だけでなく、今後ますます重要となる微生物利用の場面でも利用可能な技術であり、食料生産や微生物エネルギー利用、さらには感染症対策や創薬などの場面でも広く貢献できる基盤的な技術と期待される。

研究成果の概要(英文)：As a method for rapidly and quantitatively monitoring the bacterial growth ability, we succeeded in constructing a method for accurately measuring the bacterial growth in the medium using Near-field array sensor. Furthermore, from the image data obtained by the sensor, it was found that bacterial growth flourished at the boundary between perfluorocarbon and the medium. This results suggests that local interactions at the interface affect bacterial growth. As a result of analyzing the composition of the components in the medium by LC-MS / MS, it was clarified that the addition of perfluorocarbon has a significant effect on the amount of metabolites of a specific component. The combination of the developed evaluation system and composition analysis will enable detailed elucidation of the mechanism by which the addition of perfluorocarbons affects bacterial growth potential.

研究分野：生物センシング工学

キーワード：細菌培養 不活性溶剤 センサ 代謝物

1. 研究開始当初の背景

“細菌”は我々の暮らしや生命活動に密接に関わっている原核生物であり、農学的には生態系を支えるミクロな生物としての側面や、バイオマスでのエネルギー生産、発酵食品の製造、我々の体内でも共生関係によって体内バランスを整えることに貢献している極めて重要な生物である。一方、細菌は食中毒や感染症などの原因としても位置づけられ、それらを検出するための早期検出技術が求められているような忌み嫌われる対象物である。しかし、細菌そのものの研究はライフサイエンスの分野で重要な役割も担っている。このような背景のもと、細菌分析技術は目覚ましい進歩を遂げ、PCR や MALDI/TOFMS などを用いて細菌の同定を迅速に行える技術が誕生している。これらの技術は、基礎科学や医療分野、環境計測などでも活躍できる強力なツールであるが、この前処理となる細菌培養は寒天培地に播種するといった極めてローテクな方法に依存している。我々のポストハーベスト分野においても、細菌の迅速な検出は農産物のロス低減や食品加工現場での安全面のチェック、食の安全安心に貢献できる重要な技術であるが、菌の同定が必要な場面では、やはり培養に時間を要する。

一方、我々は通常液体培養に不活性溶媒であるパーフルオロカーボン (PFC) を添加することで、大腸菌の増殖能が飛躍的に高くなり、その効果は偏性嫌気性菌においても生じることを見出した。この発見は、過去の先行研究で報告されている PFC が持っている酸素吸着能による高濃度酸素環境だけが増殖促進の理由ではないことを示唆しており、未知のメカニズムが増殖能を向上させているのではないかと疑問を持った。その後、複数の細菌研究者と議論したところ、本現象は大変興味深く受け入れられ、難培養性の細菌への応用を支持する意見が多かった。そこで本申請において、細菌が速く増殖する条件を明らかにし、さらにそのメカニズムを探索することで、数多くの細菌研究やその産業利用、感染症などの診断技術へ貢献したいと思い、この研究を構想するに至った。

2. 研究の目的

この不活性溶媒は、半導体プロセスの洗浄やフロンに代わる冷媒として工業的に利用されており、高いガス吸着と放出能を持つことから、酸素運搬媒体として過去には代用赤血球や液体呼吸用の媒質として超未熟児の重症肺機能障害の治療にも試験的に用いられた実績を持つ。また、研究レベルでは同様の方法でプラスミドの大量生成のために利用する方法が報告されているが、このメカニズムについては明らかになっていない。また、この培養法が動物細胞でも利用でき、そのメカニズムが明らかになると、従来の細胞培養法そのものを考え直す必要が出てくる。つまり、細胞や細菌の増殖速度を高めることができ、そのメカニズムが明らかになると、様々な分野に直接的に貢献できる基盤技術になるため、その波及効果は計り知れない。そこで我々は、PFC を用いた迅速培養法の開発を目指し、そのメカニズム解明およびそれに要する技術開発を試みた。

3. 研究の方法

我々は、この現象の解明に対して『細菌の代謝物を不活性溶媒が回収している』、もしくは『溶媒が細胞そのものに影響を与えている』といった仮説をたてている。このとき、菌の増殖を評価する上で、顕微鏡による観察が考えられるが、照明の熱による対流の影響や細菌そのものの動きで定量的な評価が困難である。一方、定量的な検査方法として波長 600 nm の光による濁度 (OD₆₀₀) が一般的ではあるが、リアルタイム性に難があることや、培地の変色の影響も危惧され、測定精度や感度においても十分とはいえない。そこで我々はまず、リアルタイムでモニタリング可能かつ定量的に増殖能を評価するための方法として、近接アレイセンサを用いた細菌増殖能の評価系構築を試みた。さらに、培地中代謝物の増減を高速液体クロマトグラフトンデム型質量分析装置 (LC-MS/MS) で分析し、PFC 添加による効果とそのメカニズム解明を試

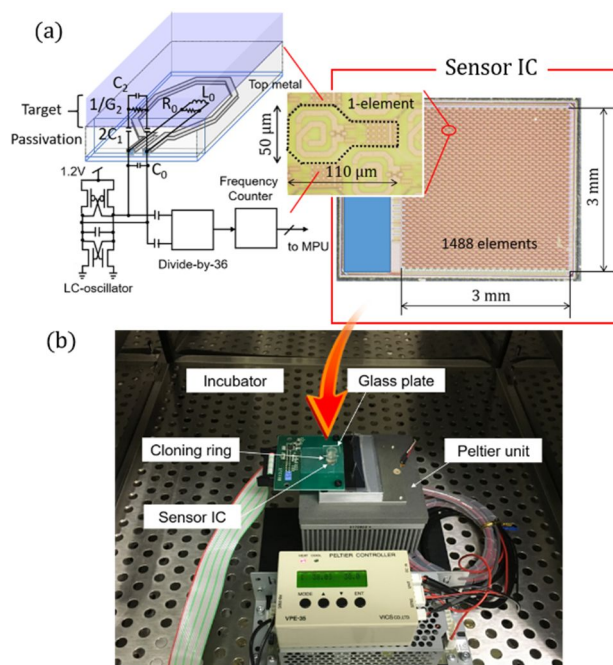


図1 近接アレイセンサ1素子の等価回路図とセンサ IC 全体の写真 (上) および、インキュベータ内での細菌培養測定系の写真 (下)

みた。

1) 近接アレイセンサによる細菌増殖能評価系の構築

現在、我々は 65 GHz の発振器で構成される近接型のアレイセンサを開発している。65 GHz は、自由水の量に敏感な周波数帯であることから、培地が細菌や細胞に置き換わる様子をセンサの感度領域内での誘電率変化としてモニタリングできることが期待される。このセンサは、65 GHz で発振する CMOS トランジスタが 3 mm 角上に 62×24 素子並んでおり、各素子を個別に独立して動作させることが可能である。素子上面の保護膜上に何も無い（空気）のときに 65 GHz の周波数で発振するように設計されており、その保護膜の上の誘電率が変化すると、発振周波数がシフトするという原理となっている。ここでは我々が企業とともに開発した本センサを利用し、細菌増殖モニタリングの応用可能性を検討した。細菌には大腸菌を用い、LB 培地を用いて初期菌濃度を OD₆₀₀ = 0.1, 0.05, 0.01 に調整した培養液をセンサ上の直径 7 ミリのウェルに 200 μL 滴下し、至適温度下で培養する実験を行った。比較対象として、加熱殺菌した区と LB 培地だけの区も準備し、比較を行った。同時に実際の菌数を確認するために同じ条件での培養液を顕微鏡で観察し、センサの出力値の妥当性を検証した。

2) PFC / 培地界面周辺での細菌増殖能モニタリング

PFC を添加した培養液での細菌増殖を考える際、もし PFC と培地間で何らかの物質の移動があると仮定すると、PFC 界面からの距離に応じて増殖速度や量に差が生じることが予想される。そこでセンサがアレイ状であることを利用し、センサ上ウェルの培養液中に PFC の微小なドロップを作成し（図 2）、その状態で細菌を培養した際の信号変化と PFC 界面からの距離との関係性を調査した。

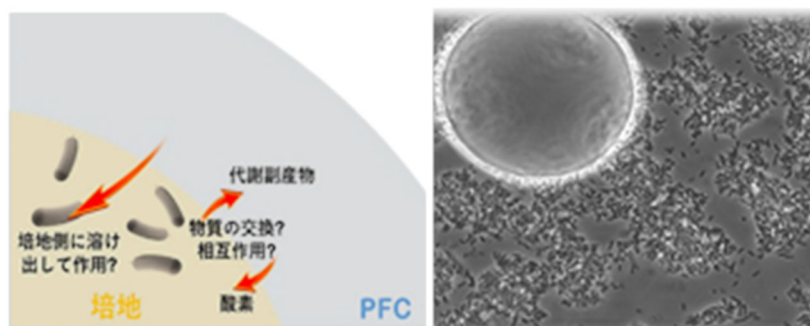


図2 培地と PFC 界面での物質のやり取りの模式図（左）と PFC を滴下した周辺で大腸菌が増殖している顕微鏡像（右）

4. 研究成果

1) 近接アレイセンサによる細菌増殖能評価系の構築

図 3（左）は、センサ上で初期濃度の異なる大腸菌を 200 μL の液体培地で培養し、その間に变化したセンサの出力値（周波数シフト量）の測定開始時からの変化量を縦軸に取ったグラフである。測定開始を示す横軸のゼロは、センサに菌培養液を滴下した後、比重の大きな細菌がセンサ表面まで沈下してからを基準としている。グラフの各点は、10 秒毎にセンサから出力された 1488 点の共振周波数の平均値を示す。OD₆₀₀ = 0.01, 0.03, 0.05 で示す初期濃度は、既存法である波長 600 nm に対する濁度を示し、生菌および 98°C、30 分間の加熱処理で作った死菌、培地だけの計 5 種類の測定結果を示す。

近似曲線は増殖期の菌数増加と同様に指数関数的な立ち上がりを見せ、初期濃度の高いサンプルほどカーブの立ち上がりが大きい結果となった。本センサは、センサの性質上センサ表面から約 10 μm 程度上方までしか発振器の電場が届いていないことから、近接場センサとしてふるまう。また、細菌は水よりも比重が大きいことから、ほとんどの細菌は底面で増殖を繰り返すこととなり、その結果水分子を多く含む培地が細菌に置き換わることで、分裂と共に近接場領域での誘電率が低下し、センサの出力値が変化したと考えられる。

そのことは顕微鏡観察の結果からも考察される。同じ初期濃度で培養したサンプルの顕微鏡画像を図 3（右）に示す。写真中の黒色バーは 5 μm のスケールを示している。初期濃度が高いほど、菌の数が多いことが分かり、死菌については 30 分経過後も菌数に変化は見られず、この結果はセンサを用いた結果とも一致する。このセンサが近接場領域のみ感度を有する点と、この周波数帯域で大きな誘電率を持つ培地が、脂質や他の生体分子を含むことで相対的に低い誘電率を取る細菌に置き換わるという点において、このセンシング方法は増殖能を評価する際に極めて迅速な定量評価を可能とし、PFC などの添加効果を評価する上で効果的であることが分かった。

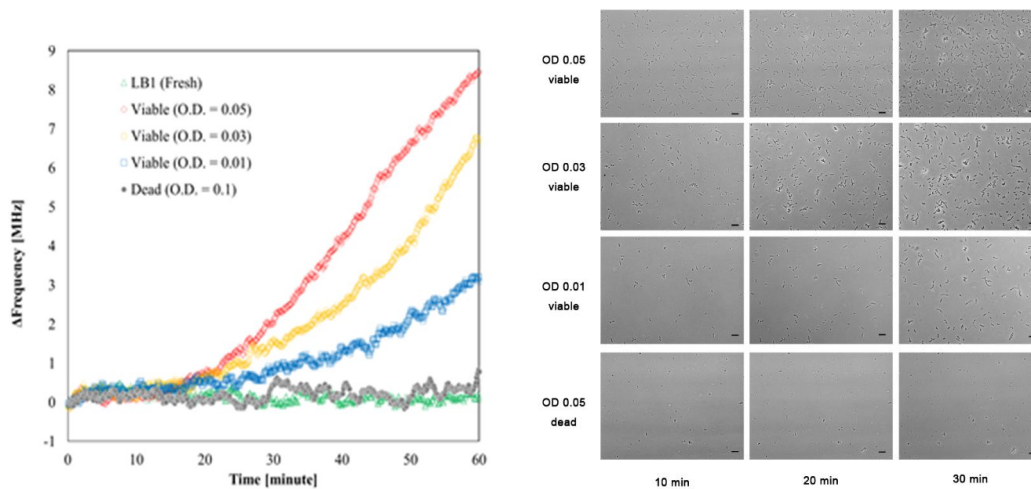


図3 近接アレイセンサで計測した初期濃度の異なる細菌の測定結果(左)と同じ条件で培養した細菌の顕微鏡像(右)

2) PFC /培地界面周辺での細菌増殖能モニタリング

PFC と培地間で何らかのやり取りがあるとすれば、その増殖能は、PFC からの距離に依存すると考えられる。そこでセンサ上に PFC の液滴を作り、その状態で細菌培養の実験を行った。PFC は水を多く含む培地と比較して誘電率が低く、センサ上では図4(上)の左側の半円形として観察された。図のように距離に応じて4つの領域を設定し、それぞれの区画において測定開始時からのセンサ出力値変化量の平均値を増殖曲線としてプロットした。

図4(下)に示す通り、PFC に近いほど増殖カーブの立ち上がりが大きく、増殖能が促進されている結果を得た。ここでは示していないが、PFC を加えていない実験結果と比較すると、領域 ① において有意に増殖能増加の効果が確認された。また、周波数シフト量は、距離に対して減少傾向を示しており、領域 ④ や ③ ではほぼ PFC の効果は認められなかった。

PFC に対して、何らかの物質の流入や流出があると仮定すると、センサの端から端までの距離を拡散するのに要する時間は、水の拡散係数から大雑把に見積もると、 10^3 秒オーダーと考えられ、その場合は測定領域全体で増殖が促進されると考えられる。しかし、実際には領域 ①、② といった近傍のみで見られる現象であることや、大腸菌が運動性を持つことを考えると、界面に触れる確率の高い大腸菌の増殖能が向上していることも示唆される。

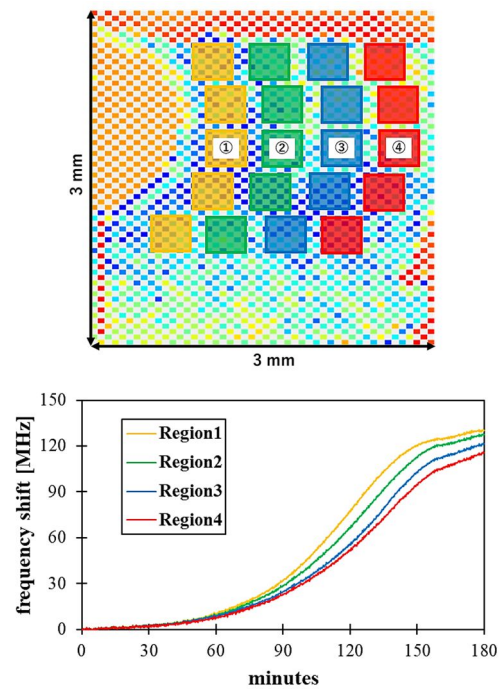


図4 近接アレイセンサで測定したヒートマップ(画像中左上部の半円がPFCドロップ)および、各測定領域の平均値で示した増殖カーブ(下)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ogawa Yuichi, Kikuchi Shojiro, Yamashige Yoshihisa, Shiraga Keiichiro, Mitsunaka Takeshi	4. 巻 176
2. 論文標題 Near-field sensor array with 65-GHz CMOS oscillators for rapid detection of viable Escherichia coli	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biosensors and Bioelectronics	6. 最初と最後の頁 112935 ~ 112935
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bios.2020.112935	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ogawa Yuichi	4. 巻 11789
2. 論文標題 Understanding of the dynamics of water molecules by using terahertz spectroscopy and its bio-applications	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 SPIE Proceedings 11789	6. 最初と最後の頁 1178902-1 ~ 8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1117/12.2589583	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 山重貴久, 菊池正二郎, 原田昌彦, 陳 思遥, 小川雄一	4. 巻 83
2. 論文標題 近接型アレイセンサによる微量牛乳中の非標識大腸菌計測	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 農業食料工学会誌	6. 最初と最後の頁 221 ~ 222
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 山重貴久, 小川雄一, 菊池正二郎, 満仲健, 白神慧一郎, 鈴木哲仁, 近藤直	4. 巻 128
2. 論文標題 サブミリ波近接アレイセンサを用いた大腸菌 (Escherichia coli) の増殖モニタリング	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 関西農業食料工学会会報	6. 最初と最後の頁 38
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Siyao Chen, Yoshihisa Yamashige, Naoshi Kondo, Yuichi Ogawa	4. 巻 129
2. 論文標題 Bacteria Detection and Separation Using Dielectrophoresis on Near-Field Array Sensor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 関西農業食料工学会会報	6. 最初と最後の頁 29 ~ 30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 山重貴久, 菊池正二郎, 小川雄一
2. 発表標題 60GHzで動作する近接アレイセンサによる大腸菌の増殖能の評価
3. 学会等名 シンポジウムテラヘルツ科学の最先端
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小川雄一
2. 発表標題 ライフサイエンスに貢献するためのテラヘルツ研究
3. 学会等名 ポストLEDフォトンクス公開シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小川雄一
2. 発表標題 テラヘルツ波を用いた細胞計測と操作
3. 学会等名 ACS (American Chemical Society) on Campus (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田昌彦
2. 発表標題 細胞核内の階層構造による生命機能の制御
3. 学会等名 遺伝研研究会「クロマチン・細胞核の形成のダイナミクスによるゲノム制御」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小川雄一, 菊池正二郎, 松井毅
2. 発表標題 細胞計測を目的としたテラヘルツ近接アレイセンサの開発
3. 学会等名 産学共創基礎基盤研究プログラム「テラヘルツ波新時代を切り拓く革新的基盤技術の創出」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小川雄一, 菊池正二郎
2. 発表標題 水の誘電緩和に着目したCMOSバイオセンサ
3. 学会等名 電子情報通信学会2021年総合大会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小川雄一
2. 発表標題 水のテラヘルツ分光に基づく細菌検査用センサの開発
3. 学会等名 レーザー学会学術講演会第41回年次大会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuichi Ogawa
2. 発表標題 Understanding of the dynamics of water molecules by using terahertz spectroscopy and its bio-applications
3. 学会等名 The 4 th International Seminar on Photonics, Optics, and its Applications (ISPhOA) 2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原田昌彦
2. 発表標題 東北大学農学研究科の取り組みと農学分野における利用可能性
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山重貴久, 小川雄一, 菊池正二郎, 満仲健, 白神慧一郎, 鈴木哲仁, 近藤直
2. 発表標題 サブミリ波近接アレイセンサを用いた大腸菌 (Escherichia coli) の増殖モニタリング
3. 学会等名 第143回関西農業食料工学会例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Siyao Chen, Yoshihisa Yamashige, Naoshi Kondo, Yuichi Ogawa
2. 発表標題 Bacteria Detection and Separation Using Dielectrophoresis on Near-Field Array Sensor
3. 学会等名 第144回関西農業食料工学会例会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 微生物検査方法および微生物検査装置菊池	発明者 菊池正二郎，小川雄 —	権利者 兵庫医科大学， 京都大学
産業財産権の種類、番号 特許、2020 94081	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	原田 昌彦 (Harata Masahiko) (70218642)	東北大学・農学研究科・教授 (11301)	
研究 分担者	菊池 正二郎 (Kikuchi Syojiro) (70381960)	兵庫医科大学・医学部・准教授 (34519)	

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
---------	---------