

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：13904

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23560394

研究課題名(和文)細菌迅速検知チップに関する基礎的研究

研究課題名(英文)Fundamental Research on MEMS-based Bacterial Sensor

研究代表者

石井 仁(Ishii, Hiromu)

豊橋技術科学大学・テラーメイド・バトンゾーン教育推進本部・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) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：病原細菌であるレジオネラ・ニューモフィラ(レジオネラと略記)をターゲットとする細菌センサーの開発を行った。その中で、この細菌がMEMSなどの狭い空間で運動を制限されると蛍光を発することを見出した。この性質を用いてレジオネラトラップの検討を行い、マイクロビーズとレジオネラの懸濁液を注入するだけでこれをトラップする樹脂製のマイクロ流路チップを開発し、レジオネラの蛍光を確認した。当初の目的であった培養無しの細菌センサーへの見通しを得た。さらに、このチップを用いてレジオネラの蛍光の時間依存性を発見した。これはもう一つの目的であったエレクトロニクスに創発された細菌行動学の創生にも資するものである。

研究成果の概要(英文)：Sensing bacteria is attracting a great deal of interest to avoid an outbreak of bacterial infection. The sensors used for this purpose should integrate at least two functions in a small volume: trapping bacteria and detecting them. We developed a PDMS-based microfluidic chip for trapping and detecting *L. pneumophila* cells. By using our finding that *L. pneumophila* might emit fluorescence when they are forced to limit their motion in a narrow space, we can observe fluorescence from *L. pneumophila* cells introduced into the chip together with microbeads. We previously make a mixed suspension of *L. pneumophila* cells and the beads and then introduce them into the microfluidic chip with funnel-shaped protrusions which work as stoppers both for the cells and the beads. The cells are densely packed at the inlet side of the stoppers and restricted their motion confined by microbeads. This method enables us to expect the observation of fluorescence from the *L. pneumophila* cells introduced.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：電気電子工学・電子デバイス・電子機器

キーワード：集積化MEMS 細菌 レジオネラ マイクロ流路 マイクロビーズ 蛍光

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、レジオネラ菌や O-157 などによる細菌感染症が問題になっている。さらに最近では従来の抗生剤が奏功しないアシネトバクターに代表される多剤耐性細菌などによる院内感染も大きな問題になりつつある。これら細菌感染に関する緊急の課題は、感染症や環境の微生物汚染が疑われる現象が発見されてから確定診断までに、培養法によっても、DNA 診断によっても時間がかかることであり、通常数日から二週間程度になる。また、DNA によらずに細菌そのものを検出する方法としてフローサイトメトリー法もあるが、装置がおおがかりとなり、そのためにキメ細かなチェックや常時モニタリングも実現していない。このため、時間的空間的により細かなチェックを簡便に行うことのできる検知装置の開発が強く期待されていた。

(2) 一方、LSI に代表されるエレクトロニクスは微細化を追求する **More Moore** のトレンド軸に加えて、シリコンをプラットフォームとして LSI と異種材料、異種機能を融合することにより、新しい機能を持ったデバイスを実現することを目標とする集積化 MEMS など **More than Moore** のトレンド軸として進展しつつある。このようなトレンドにあって、バイオ分野と MEMS を融合した **Bio-MEMS** チップの開発も進んでおり DNA チップなどはその成功例と言える。しかしながら、これらデバイスでは細菌の同定には培養などの処理が必要であり、確定診断には有効であっても、必ずしも簡便に扱えるものとはなっていなかった。

2. 研究の目的

(1) 以上のような現状に鑑み、細菌それ自身の示す走化性、走光性といった挙動、発光特性などを利用し、これを集積化 MEMS 技術によって作製した **Bio-MEMS** チップによって培養することなく検出可能で、操作が簡便な小型の細菌検出チップを実現し、DNA 検出手法を時間的、空間的に補完することができることを目標とした。

(2) 具体的なターゲットとしては、感染すると発熱や重篤な肺炎を引き起こし、クーリングタワー、温泉など水循環系に常在するレジオネラ・ニューモフィラ（以下レジオネラと略記）の蛍光を検出する細菌センサの実現を目標とした。蛍光を発する細菌はレジオネラ属菌はじめ他にも多く、検出手法を確立すれば光を発する細菌一般への展開が可能である。

(3) さらに、MEMS などの作るマイクロ空間で示される細菌の性質を知ることは、エレクトロニクスに創発された新たな細菌行動学の創生にもつながると考えた。

3. 研究の方法

細菌センサの実現には、少なくとも二つの機能が求められる。一つはレジオネラを捕獲する機能であり、二つ目はレジオネラの蛍光を検出する機能が必要となる。このため、まず捕獲機能を Si-MEMS によって検討し、そこで得られた要諦をより簡便なビーズと有樹脂製マイクロ流路による捕獲方法、構造、検出方法の提案へと展開した。

4. 研究成果

(1) Si-MEMS 型細菌捕獲チップ

まず Si-MEMS 型捕獲構造を用いて得られた知見を簡単に述べる。図 1 に MEMS 型細菌捕獲チップの模式図を示す。MEMS 型細菌捕獲チップ全体は、1×2 cm 角で、このチップの中央には、Si ピラー構造を形成してある。Inlet から注入したレジオネラを複数の Si ピラーでトラップ出来るようにしている。この Si ピラーは一種の篩として働き、ここにレジオネラを捕獲する。ピラーとピラーの間隔や、ピラーの幅、流路の深さ、ピラーの段数、キャップの厚さなどの寸法は、レジオネラの代表的な大きさを考慮して設計している。図 2 に完成したデバイスの光学顕微鏡写真及びマイクロピラー構造の SEM 画像を示す。

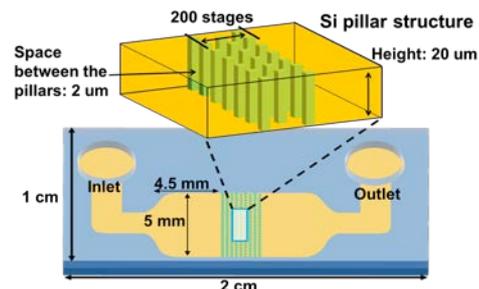


図 1. Si-MEMS 型捕獲チップの模式図

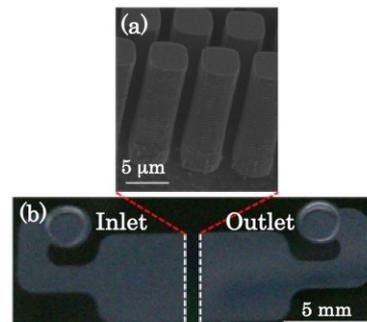


図 2. Si-MEMS 型捕獲チップ
(a) Si マイクロピラー部、(b) 概観

(2) レジオネラの蛍光

次に Si-MEMS 捕獲構造に捕獲されたレジオネラの蛍光について説明する。図 3 は、レジオネラの検液 (1×10^9 個/mL) 1 mL を注射器によってチップに注入し、捕獲したレジオネラの蛍光顕微鏡像を示す。レジオネラは Inlet 側から注入されており、中央の白い破線で囲まれた領域がピラー構造である。赤い破線で囲まれた領域から青白い強い蛍光が観察できる。この領域にレジオネラが捕獲されている。この蛍光を分光することにより

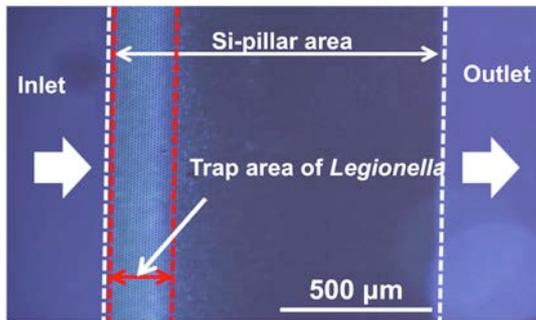


図 3. ピラー部に捕獲され蛍光を発するレジオネラ

450–460 nm 付近にブロードなピークを持つことが分かった。なおこの研究の過程で、レジオネラが上述のような極狭い空間に閉じ込められ運動を制限されると強い蛍光を発すると言う新しい知見を得た。

(3) マイクロビーズと PDMS 製樹脂を用いたマイクロ流路チップ

前節で開発した Si-MEMS 型捕獲チップによりレジオネラの運動制限による蛍光観測と定量的検出の可能性を見出したが、図 4 (a) に示すように、レジオネラ菌が Inlet 側の Si ピラーの狭いエリアのみにトラップされ、必ずしもすべての導入レジオネラを観測できず、観測エリアが小さくなるという欠点があった。この問題を解決するため、レジオネラ菌をマイクロビーズと懸濁し、マイクロビーズの作る空間にレジオネラを閉じこめ運動制限による蛍光を誘導し、導入したすべてのレジオネラを観測可能な方法を提案した (図 4 (b))。図 5 に提案した PDMS 製マイクロ流路の模式図を示す。左右に Inlet, Outlet があり、流路の中心にビーズを堰き止めるためのストッパーがある。この構造は、ビーズとレジオネラを懸濁してインレットから流路に導入すると、ストッパーが漏斗、ビーズ

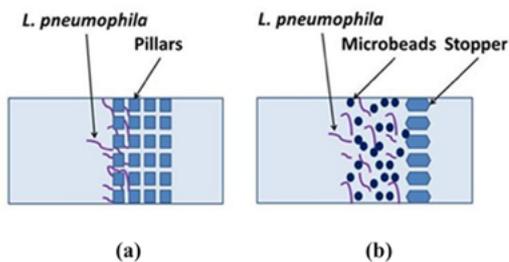


図 4. レジオネラ捕獲方法の違い
(a)シリコンピラー、(b)マイクロビーズ

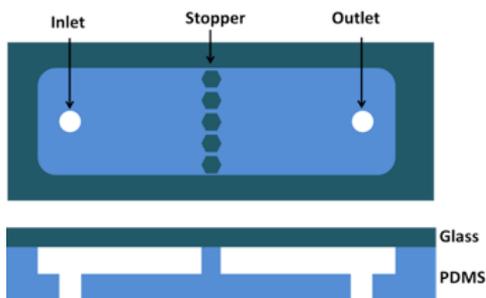


図 5. PDMS 製流路チップの模式的概念図

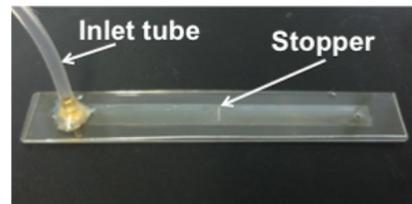


図 6. PDMS 製流路チップ

が濾紙のように作用し、結果としてレジオネラをマイクロ空間に捕獲して運動制限させ、蛍光を観測することを期待したものである。図 6 は作製した PDMS 製マイクロ流路チップを示す。

(4) レジオネラの捕獲

本節では、ビーズと PDMS 製マイクロ流路によって、レジオネラの捕獲及び蛍光検出実験を行った結果を述べる。まず、レジオネラの蛍光観測を行った。レジオネラ濃度が 10^6 cell/mL になるように、レジオネラとビーズを調整した懸濁液を注入した。図 7 はこのレジオネラ菌液を注入して観測した蛍光顕微鏡像である。Inlet 側にビーズが堰き止められ、青白い蛍光を観測できている。この事実は、当初の期待通りレジオネラがビーズ間に捕獲されて運動を制限されて蛍光を発したものと推測できる。図 8 に測定した蛍光スペクトルを示す。この図から、ビーズとレジオネラを懸濁した場合に蛍光が観測されること、一方、レジオネラのみの場合 (自由に運動した場合)、レジオネラ濃度は 10 倍の濃度であるのにも関わらず、蛍光は観測されない。このことは、先にも記したようにレジオネラがビーズ間にトラップされたことを強く支

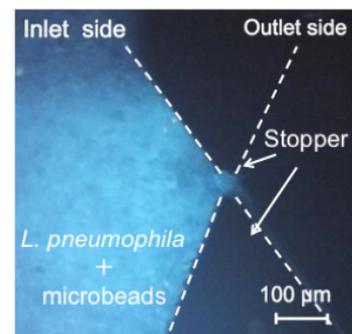


図 7. マイクロビーズ間に捕獲され蛍光を発するレジオネラ

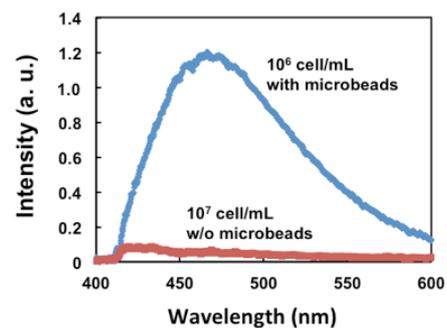


図 8. レジオネラの蛍光スペクトル

持する。さらに蛍光強度は注入したレジオネラ濃度と強い相関を持つことも確認した。このことは、定量的なセンサを作成するための基礎的知見となる。

(5) 蛍光の時間依存性

さらに我々は、本チップを用いてレジオネラの蛍光が紫外の励起光の照射時間に依存すると言う新たな知見を見出した。図9は、蛍光強度と励起光の照射時間との関係を示す。励起光は波長 350 nm の紫外光である。ビーズのみの場合では、蛍光強度は励起光照射時間に依存せずほぼ一定であるのに対し、ビーズとレジオネラの懸濁液の場合は、励起光照射と共に蛍光強度が増加し、ピークに達した後に減少してゆくことがわかる。蛍光強度の増加は、励起光の照射とともにレジオネラ菌が蛍光物質の産生を開始していることを示していると考えられる。一方、蛍光強度の減少は、蛍光物質の紫外光による光分解が重なったものと考えている。以上の結果は、これまでの知見である運動の制限に加えて、紫外光の照射が蛍光物質の産生開始の引き金になっていることを強く示唆している。

以上のように、マイクロ流路内での運動制限、紫外光照射といった外部刺激によって蛍光物質の産生が誘導される事実は、新たな細菌学的知見であり、本研究の目的の一つであった、エレクトロニクスに創発された細菌行動学の創生に資するものであると考えている。

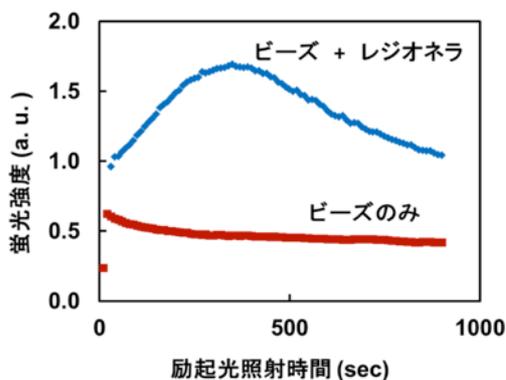


図9. 蛍光の励起光照射時間依存性

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

Hiromu Ishii, Kazuaki Sawada, Makoto Ishida, Katsuyuki Machida, Ken-Ichiro Iida, Mitsumasa Saito, and Shin-ichi Yoshida, "Bio-MEMS Chip for Bacteria Detection -A Challenge of Si Technology to Biomedical Field-" ECS Trans. Vol. 58, No. 9, pp.125-133 (2013). (Invited Review 査読無)

[学会発表] (計19件)

(1) Youngshik Shin, Kyohei Katsube, Kazuaki Sawada, Makoto Ishida, Hiromu Ishii, Katsuyuki Machida, Kazuya Masu, Ken-ichiro Iida, Mitsumasa Saito, and Shin-ichi Yoshida, "Fabrication of Bio-MEMS Device for on-chip Testing of the Bacteria Behavior" Abstract No. B 5.3, Heterogeneous Integration Challenges of MEMS, Sensor, and CMOS LSI, Symp. B, 2012 MRS Spring Meeting, JSAP-MRS, San Francisco, USA (2012). 査読有

(2) Kyohei Katsube, Ryuhei Hayashi, Youngshik Shin, Hirokazu Nakazawa, Makoto Ishida, Kazuaki Sawada, Hiromu Ishii, Katsuyuki Machida, Noboru Ishihara, Kazuya Masu, Yuta Takekawa, Changle Wang, Ken-ichiro Iida, Mitsumasa Saito, Jun Fujii, Shin-ichi Yoshida, "Bio-MEMES Chip for Trapping Bacteria by Si-pillar Structure and Its Application to Legionella" Abstract No. ac12000224, The 6th Asia-Pacific Conference on Transducers and Micro/Nano Technologies (APCOT), IEEE, Nanjing, China (2012). 査読有

(3) Hiromu Ishii, Makoto Ishida, Kazuaki Sawada, Katsuyuki Machida, Ken-ichiro Iida, Mitsumasa Saito, and Shin-ichi Yoshida, "Bio-MEMS Chip for Bacteria Detection -A Challenge of Si Technology to Biomedical Field-" Abs. E12-2222, The 224th Electrochemical Society Fall Meeting, San Francisco, USA (2013). 招待, 査読無

(4) R. Hayashi, H. Nakazawa, K. Sawada, M. Ishida, H. Ishii, K. Machida, C. Wang, K. Iida, M. Saito, and S. Yoshida, "Bacterial Diagnostic Chip by the Detection of Fluorescence from Legionella pneumophila in a Microbeads Suspension" Abs. Q2-1485, The 225th Electrochemical Society Spring Meeting, Orland USA (2013). 招待, 査読無

(5) R. Hayashi, Y. Nishimura, H. Nakazawa, M. Ishida, K. Sawada, H. Ishii, K. Machida, N. Ishihara, K. Masu, C. Wang, K. Iida, M. Saito, and S. Yoshida, "PDMS-BASED MICROFLUIDIC CHIP FOR DETECTION OF LEGIONELLA PNEUMOPHILA BY MIXING WITH MICROBEAD" The 7th Asia-Pacific Conference on Transducers and Micro/Nano Technologies (APCOT), Daegu, Korea (2014). accepted for presentation, 査読有

(6) Hiromu Ishii, Makoto Ishida, Kazuaki Sawada, Katsuyuki Machida, Kazuya Masu, Ken-ichiro Iida, Mitsumasa Saito, and Shin-ichi Yoshida, "Bacterial diagnostic microfluidic chip for detecting Legionella pneumophila" IEEE INEC2014, Sapporo, Japan (2014). 招待, 査読無

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：細菌検知方法、細菌検査用デバイスおよび細菌検査装置

発明者：中沢寛一、石井仁、林隆平、澤田和明、吉田眞二、齋藤光正

権利者：国立大学法人 豊橋技術科学大学
国立大学法人 九州大学

種類：特許

番号：特願 2014-026939

出願年月日：2014 年 2 月 14 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 仁 (Hiromu Ishii)

豊橋技術科学大学 テーラーメイド・バトンゾーン教育推進本部

特任教授

研究者番号：20506157

(2) 連携研究者

町田 克之 (Katsuyuki Machida)

東京工業大学 総合理工学研究科

連携教授

研究者番号：90597676

吉田 眞一 (Shin-ichi Yoshida)

九州大学 医学研究院

教授

研究者番号：60128113