

令和元年6月18日現在

機関番号：13904
研究種目：基盤研究(B) (一般)
研究期間：2015～2018
課題番号：15H03992
研究課題名(和文) エレクトロニクスに創発された細菌行動学の創生

研究課題名(英文) Electronics Inspired Bacterial Ethology

研究代表者

石井 仁 (Ishii, Hiromu)

豊橋技術科学大学・リーディング大学院教育推進機構・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) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内寄生や太陽光存在下での細菌の挙動を知るために集積化MEMS技術を利用した、細菌のストレス応答の観測を行った。レジオネラ属菌を観測対象として、紫外光照射やマイクロ空間における運動規制に対するストレス応答として新たな蛍光物質の産生を見出した。この蛍光物質の蛍光をフォトゲート型光学センサで検出することに成功し、細菌センサチップ実現へ道を開いた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの細胞内や自然界で病原細菌がどのような挙動を示すかを、マイクロマシンの技術を用いて調べた。ターゲットとしたのは温泉やクーリングタワーに生息するレジオネラ菌である。この細菌は紫外線照射を受けたり、狭い場所に閉じ込められると蛍光を発する物質を作り出すことがわかった。この物質の蛍光を指標として、LSI技術を用いた光センサでレジオネラ菌を検出することに成功した。これによって、将来、細菌を培養することなく様々な場所で細菌検査ができる小型チップが作製できることを実証した。

研究成果の概要(英文)：We observed stress responses of bacteria using integrated MEMS technology to know the behavior of bacteria in the human cells or under sunlight. We found a new fluorescent material production of Legionella as a stress response to ultraviolet light irradiation and movement restriction in micro spaces of microfluidic chips. We succeeded in detecting the fluorescence from Legionella by using photogate-type optical sensor. This result paved the way to the realization of a bacterial sensor chip.

研究分野：Bio-MEMS

キーワード：MEMS 細菌 レジオネラ フォトゲート 蛍光

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2010年の欧州での大腸菌 O-104 による感染症の発生をはじめとして、レジオネラや大腸菌 O-157 などによる細菌感染症の発症が問題になっていた。従来の細菌学では、イースト菌抽出物質等の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断面しか見ておらず、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ことと期待できる。

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

本研究では、ターゲットとする病原細菌(エレクトロニクスで言う一種のキャリングビークル)をレジオネラ属菌とした。集積化 MEMS 技術によってマイクロ流路チップを作製し、マイクロ空間内にレジオネラを閉じ込めることにより細胞内寄生を模擬した環境を構築する。このマイクロ流路内でのレジオネラの運動状態の規制の影響、あるいは紫外光照射の影響に対応する挙動をレジオネラのストレス応答として観測する。ストレス応答としては、新たな蛍光物質の産生が見られたため、その観測手段には分光学的手法を主として用いた。またレジオネラの産生する蛍光物質の蛍光波長とその強度の紫外光照射時間依存性については反応科学的手法を用いて解析した。さらにフォトゲート型光学センサを用いて、光電流として蛍光の変化を観測し、小型可搬な病原細菌検出センサ実現に向けた検討を行った。

4. 研究成果

本研究で得られた成果は主として、(1) レジオネラ属菌のマイクロ空間における細胞内寄生の模擬とストレス応答、(2) レジオネラ属菌の紫外光照射に対するストレス応答、(3) フォトゲート型光学センサによるレジオネラ属菌のセンシングの三点である。以下に成果を述べる。

(1) レジオネラ属菌のマイクロ空間における細胞内寄生の模擬とストレス応答

レジオネラをマイクロ空間に閉じ込めるために、PDMS 製のマイクロ流路を作製して、マイクロビーズとともに注入し、ビーズの作るマイクロ空間でレジオネラの運動を制限した。図 1 に我々が提案する、レジオネラを微小空間に閉じ込める手法の概略と、この手法に用いた PDMS 製マイクロ流路チップの模式図を示す。このチップを用いてレジオネラ属菌の蛍光検出実験を行った。所望の濃度としたレジオネラ属菌の懸濁液と、マイクロビーズ(以下、ビーズと記述)を純水に入れ、濃度 10^6 bead/mL とした懸濁液を等量ずつ混合した懸濁液を調整した。この懸濁液 1 mL を分取し流路チップに注入した。この流路チップを蛍光顕微鏡にセットし、励起光を照射

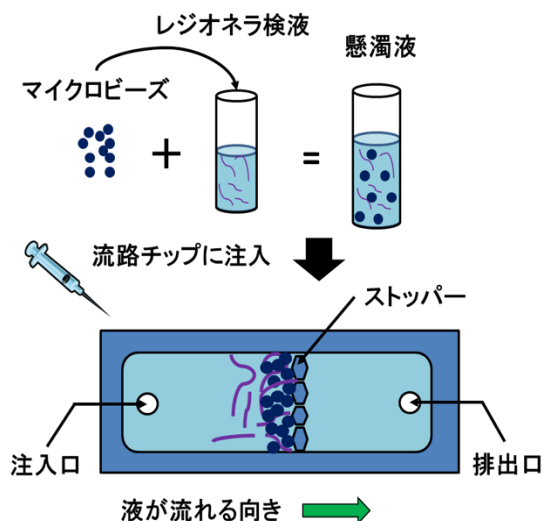


図1 PDMS製マイクロ流路チップの模式図

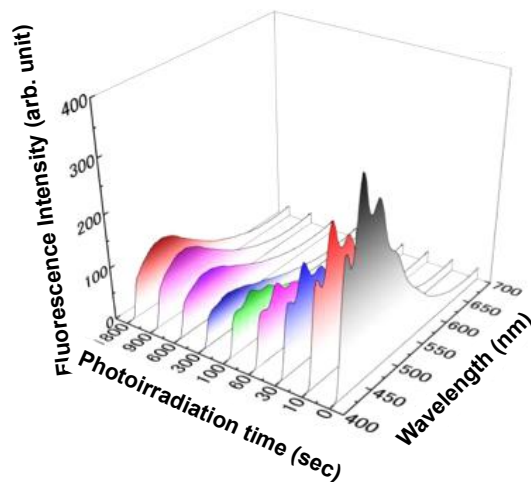


図2 レジオネラ・デューモフィの蛍光スペクトルの紫外光照射時間依存性

してレジオネラ属菌の蛍光分光を行った。図2にレジオネラ・デュモフィの蛍光スペクトルの紫外光照射時間依存性を示す。励起光照射直後に、波長450 nm, 420 nm, 480 nmにピークが観測される。これはレジオネラ・デュモフィがその細胞内に持つ蛍光物質 legioliulin のスペクトルである。照射時間の経過に伴い、これらピークは急激に減衰し、波長470 nm付近のブロードなピークが支配的育って来る。これは新たなレジオネラ・デュモフィが新たな蛍光物質を産生していることを示している。このような新たな蛍光物質の産生は、水中を自由に運動するレジオネラ・デュモフィには全く見られなかった。これは、ビーズ間のマイクロ空間への閉じこめによる運動制限と、紫外光の照射が蛍光物質を産生するトリガーになっていることを示している。このように細胞内寄生のようなマイクロ空間中では、培養液中で自由運動をするレジオネラとは異なる挙動を示すことがわかった。このようにMEMS技術を利用した細菌のストレス応答の観測は、細菌の持つ未知の性質を知る手法になり得ることを示している。

(2) レジオネラ属菌の紫外光照射に対するストレス応答

本節では紫外光に対するストレス反応として蛍光物質を新たに産生するレジオネラを例として、その特徴的蛍光波長とその強度の紫外励起光照射時間依存性を示し、その反応化学的扱いの有効性も併せて記す。

図3はレジオネラ・エリスラの蛍光スペクトルを示す。このスペクトル図では紫外励起光照射時間をパラメータとして0秒から約1500秒までの複数の蛍光スペクトルを示している。このレジオネラは赤色蛍光を示すことが知られている。図からわかるように確かに赤色と言われる可視光波長域590 nm, 635 nm, 675 nmにピークを示している。通常、蛍光は紫外励起光照射によって褪色する。すなわち光反応による変化や分解によって蛍光物質が非蛍光物質へ変化する。これら特徴的なピークを観測すると、590 nmと635 nmのピークは時間とともに減衰しており、通常の蛍光の変化を示している。しかしながら675 nmのピークは明らかに時間とともにその強度が増大していることが観測された。これは新たな蛍光物質の産生を示している。従来は目視による観測だったために観測されなかったが、分光器を用いてはじ

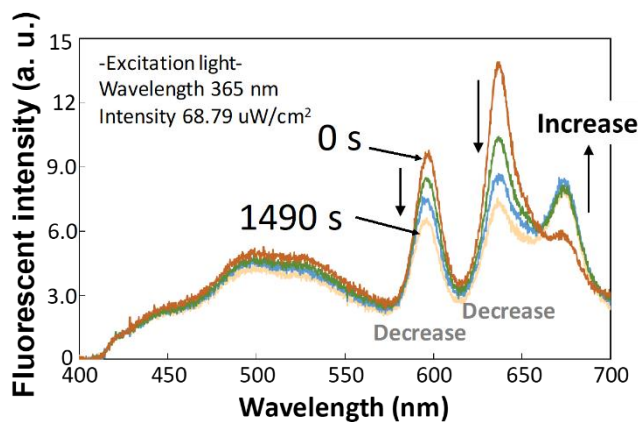
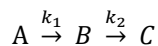


図3 レジオネラ・エリスラの蛍光スペクトル

めて発見されたものと考えている。

次に675 nmのピークが増大は何を意味しているのかを反応化学的に考察する。図4のプロットは波長675 nmのピークの紫外励起光照射時間依存性を示す。励起光の照射とともに強度は増大し、やがて緩慢な減衰へと転ずることがわかる。仮にこの過程をレジオネラ・エリスラの紫外励起光照射に伴う次のようなストレス応答を仮定してみる。



すなわち、レジオネラ・エリスラ細胞内の生体物質(A)が、紫外光照射によりある種の代謝系が働くことにより蛍光物質(B)へと変化し、その後光反応によって非蛍光物質(C)へと変化してゆくと考える。この反応過程を逐次反応と記述し、それぞれの反応速度定数を k_1 、 k_2 とし、初期の生体物質濃度を $[A_0]$ とする。それぞれの物質A、B、Cの反応速度は以下のように与えられる。

我々の検討では、レジオネラ・エリスラを培養条件下に置かない実験をしているため、初期の生体物質濃度以上に生体物質が増加することは無く、すべて非蛍光物質に変化することを境界条件とする。つまり、 $t=0$ のときに

$[B(0)]=0$, $[C(0)]=0$, $t \rightarrow \infty$ のとき, $[A(\infty)]=0$, $[B(\infty)]=0$, $[C(\infty)]=0$ とする。

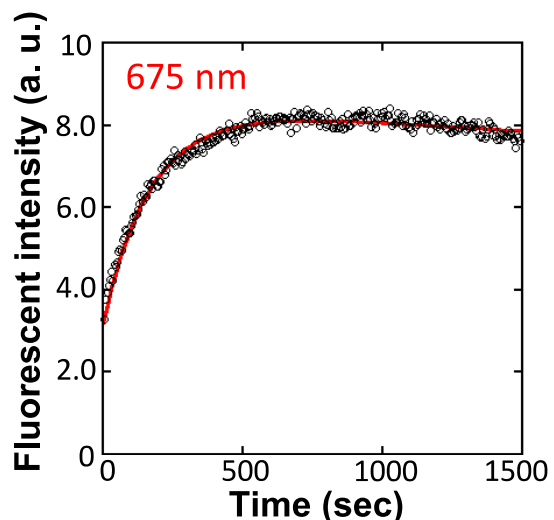


図4 レジオネラ・エリスラの675 nmのピークの紫外励起光照射時間依存性

$$\frac{d[A]}{dt} = -k_1 \times A$$

$$\frac{d[B]}{dt} = k_1 \times A - k_2 \times B$$

$$\frac{d[C]}{dt} = k_2 \times B$$

この反応速度式を解くと蛍光物質 B の濃度 [B(t)] は以下の様に与えられる。

$$B(t) = A_0 \times \frac{k_1}{k_2 - k_1} (\exp(-k_1 t) - \exp(-k_2 t))$$

この式を用いて図 4 のプロットをカーブフィッティングした結果が図 4 の実線である。この式が実測した蛍光強度の挙動をよく表しており、仮定の確からしさがわかる。ちなみにそれぞれの反応の反応速度定数は、

$$k_1 = 9.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$$

$$k_2 = 5.7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$$

となる。反応速度定数が $k_1 < k_2$ となっていることは、蛍光物質の生成過程が律速反応であることも示している。この反応過程の仮定の真偽はさらなる研究に俟つことになるが、レジオネラのセンシングの観点からは一種のセンシングパラメータとなり得る。例えば前述のレジオネラ・ディモフィであれば、紫外光照射とともに青色蛍光強度が単調に減少しその反応速度定数は 0.04 s^{-1} というように、レジオネラ・エリスラの場合とは異なる。我々は他のレジオネラ属菌でも異なる特徴的波長やその強度の励起光照射時間依存性を見つけており、こうした検討からそれぞれのレジオネラを特徴づけるセンシングパラメータとしての反応速度定数のルックアップテーブルを作成している。これと次節に述べるフォトゲート型光センサの光電流を照らし合わせることによってレジオネラの識別が可能になると考えている。

(3) フォトゲート型光学センサによるレジオネラ属菌のセンシング

ここでは上述のように我々が発見したレジオネラのストレス応答をコンパクトな系でセンシングした結果を記す。図 5 にレジオネラの蛍光の検出に用いたフォトゲート型光学センサと測定の様子の断面図を示す。レジオネラからの蛍光はフォトゲート型光学センサに入射し、光電流として観測される。このフォトゲート型光学センサは豊橋技術科学大学のクリーンルームにて作製したものである。実験では、コロニーから採取した細菌を PDMS 製のトラップに入れ、波長 365 nm の紫外光を照射した。フォトゲート型光学センサの光電流は半導体パラメータアナライザを用いて取得した。同時に細菌の蛍光スペクトルも分光器を用いて取得した。レジオネラ・エリスラでは 4-(2) に示したように 675 nm 付近に蛍光物質の産生を示す指標となりうる特徴的波長を持っている。そのためセンサ直上に 650 nm 以上の波長の光を透過するフィルタを用いて測定を行った。図 6 はレジオネラ・エリスラの波長 676 nm の蛍光の強度の紫外光照射時間依存性とフォトゲート型光学センサの電流値を示す。図からわかるようにフォトゲート型光学センサを用いて光電流強度の変化として、レジオネラ・エリスラの特徴的波長の変化を捉えることに成功した。また、分光器で取得した蛍光強度とセンサの光電流の照射時間依存性も、その初期においてよく一致した。以上より光学フィルタとフォトゲート型蛍光センサの組合せを用いてレジオネラ属菌の検出が可能であることを実証した。

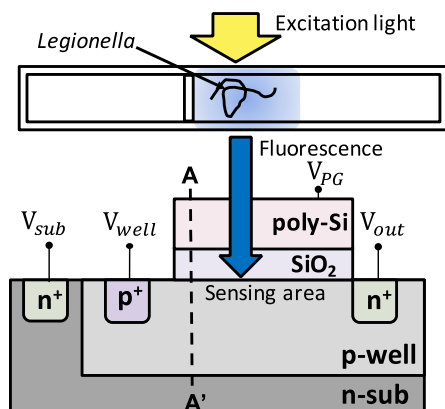


図 5 MEMS 流路とフォトゲート型センサ断面

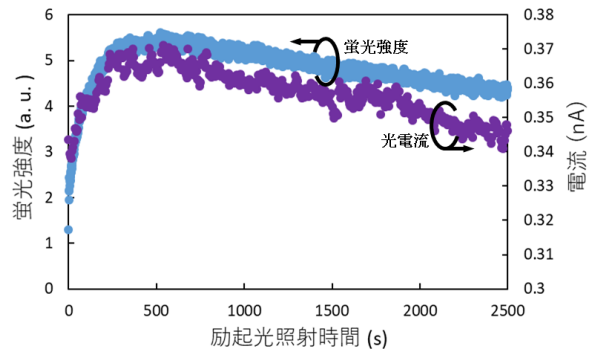


図 6 レジオネラ・エリスラの波長 676 nm の蛍光強度と光電流

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ①田中佐和子, 澤田和明, 石井仁, 町田克之, 二階堂靖彦, 齋藤光正, “蛍光センサによる細菌識別に向けたレジオネラ属菌の発光特性の検討” 電子情報通信学会技術研究報告, 査読無, Vol. 118, No. 175, ED2018-22, pp. 5-8 (2018).
- ②Shuhei Onishi, Choi Yong Joon, Makoto Ishida, Kazuaki. Sawada, Hiromu Ishii, Katsuyuki Machida, Kazuya Masu, Yasuhiko Nikaido, Mitsumasa Saito, and Shinichi Yoshida “Detection of bacterial fluorescence by the combination of Si photodetector with MEMS microfluidic chip” ECS Trans., 査読有, Vol. 80, No. 4. pp. 157-164 (2017).
- ③Y. Nishimura, M. Ishida, K. Sawada, H. Ishii, K. Machida, K. Masu, C. Wang, K. Iida, M. Saito, and S. Yoshida “Observation of Stress Responses of Bacteria Confined in a MEMS Microfluidic Chip” ECS Trans., Invited Review, 査読無, Vol. 69, No. 10, pp. 259-267 (2015),

[学会発表] (計 16 件)

- ①Hiromu Ishii, Sawako Tanaka, Makoto Ishida, Kazuaki Sawada, Katsuyuki Machida, Yasuhiko Nikaido, Mitsumasa Saito, and Shin-ichi Yoshida, “Bacterial identification by using photogate-type optical sensor” 236th The Electrochemical Society Meeting, Atlanta, USA (2019). 招待講演 (決定) .
- ②田中佐和子, 大西脩平, 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 “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可能性の検討” 第 10 回集積化 MEMS シンポジウム論文集, 01-am2-C-3-1~4, 札幌 (2018). 査読有.
- ③S. Tanaka, S. Onishi, M. Ishida, K. Sawada, H. Ishii, K. Machida, Y. Nikaido, M. Saito, and S. Yoshida, “Chemical Kinetic Analysis for Temporal Variation of Fluorescence from *Legionella*,” Proc. 2nd Taiwan-Japan Joint Symp. 21st Nano-engineering and Micro-system Technology Taiwan, P09, p.7, Taipei, June 2018. 査読有.
- ④大西脩平, 崔容俊, 石田誠, 澤田和明, 石井仁, 町田克之, 益一哉, 二階堂靖彦, 齋藤光正, 吉田眞一 “フォトゲート型蛍光センサを用いたレジオネラの蛍光観測” 第 9 回集積化 MEMS シンポジウム論文集, 02am2-B-4-1~4, 広島 (2017). 査読有.
- ⑤Shuhei Onishi, Choi Yong Joon, Makoto Ishida, Kazuaki. Sawada, Hiromu Ishii, Katsuyuki Machida, Kazuya Masu, Yasuhiko Nikaido, Mitsumasa Saito, and Shinichi Yoshida “Detection of bacterial fluorescence by the combination of Si photodetector with MEMS microfluidic chip” The 232nd Electrochemical Society Fall Meeting, Abs. No. 1149, National Harbor, MD, USA (2017). 招待講演.
- ⑥大西脩平, 西村祐典, 石田誠, 澤田和明, 石井仁, 町田克之, 益一哉, 王常楽, 飯田健一郎, 齋藤光正, 吉田 眞一 “マイクロ流路チップを用いたレジオネラ・ニューモフィラとレジオネラ・デュモフィのストレス応答の観測” 第 8 回集積化 MEMS シンポジウム論文集 p. 25 am2-PM-019-1~5, 平戸文化センター, 平戸 (2016). 査読有.
- ⑦Yusuke Nishimura, Onishi Shuhei, Makoto Ishida, Kazuaki Sawada, Hiromu Ishii, Katsuyuki Machida, Kazuya Masu, Changle Wang, Mitsumasa Saito, Shinichi Yoshida, “Comparison of Bacterial Stress Responses between *Legionella pneumophila* and *Legionella dumoffii* Trapped in a MEMS Microfluidic Chip” Proc. Asia-Pacific Conference of Transducers and Micro-Nano Technology (APCOT) 2016, 2c-4, Kanazawa, Japan (2016). 査読有.
- ⑧Y. Nishimura, M. Ishida, K. Sawada, H. Ishii, K. Machida, K. Masu, C. Wang, K. Iida, M. Saito, and S. Yoshida, “Stress Responses of Bacteria, *Legionella*, Confined in MEMS Microfluidic Chip” Proc. 9th Int’ l Symp. on Nanomedicine (ISNM2015), p. 69, Tsu, Japan (2015). 招待講演.
- ⑨西村祐典, 石田誠, 澤田和明, 石井仁, 町田克之, 益一哉, 王常楽, 飯田健一郎, 齋藤光正, 吉田眞一 “マイクロ流路内でのレジオネラ属菌のストレス応答” 第 7 回集積化 MEMS シンポジウム論文集 pp. 30pm1-D-3-1~4, 朱鷺メッセ, 新潟 2015. 査読有.
- ⑩Y. Nishimura, M. Ishida, K. Sawada, H. Ishii, K. Machida, K. Masu, C. Wang, K. Iida, M. Saito, and S. Yoshida “Observation of Stress Responses of Bacteria Confined in a MEMS Microfluidic Chip” Ext. Abstract No. 1103, The 228th Electrochemical Society Fall Meeting, Phoenix, USA (2015). 招待講演.

6. 研究組織

(1) 研究分担者

①研究分担者氏名：齋藤 光正

ローマ字氏名：Mitsumasa Saito

所属研究機関名：産業医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：00315087

②研究分担者氏名：町田 克之

ローマ字氏名：Katsuyuki Machida

所属研究機関名：東京工業大学

部局名：科学技術創成研究院

職名：特任教授

研究者番号（8桁）：90597676

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。