

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02160

研究課題名(和文) ナノ空間の高電界を利用した非線形電気インピーダンス応答による細菌1粒子センシング

研究課題名(英文) Single bacteria sensing using nonlinear electrical impedance response in high electric field created in nano-scaled space

研究代表者

山本 貴富喜 (Yamamoto, Takakatoki)

東京工業大学・工学院・准教授

研究者番号：20322688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロ流路を流れる細菌1粒子測定の実証を通じて、高電界下における単一バイオナノ粒子の電気インピーダンス測定を実証した。さらに、機械学習を利用して測定データから細菌の種類を同定する解析法に着手し、測定するにつれて人工知能が成長し細菌種の分類性能が向上する、いわば「成長するセンサ」の創出に先鞭をつける共に、新たなバイオナノ粒子センシング法の基盤を築いた。その結果、大きさや材質が同じであっても、測定されるインピーダンス特性には表面状態依存性があることを明らかにした。その特徴を利用し、さらに機械学習も用いることによって、大きさがほぼ同一の細菌を95%以上の正解率で分類できることを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

交流型(AC)測定によるナノポア測定は世界初の実証例である。また、従来の直流型(DC)ナノポア測定と比較した場合、位相差の情報が新たに増えることから機械学習における正解率も高くなる傾向が得られており、用途によってはACナノポア法はDCナノポア法の上位互換になり得るものである。まだ概念実証の段階ではあるものの、既に95%以上の正解率を得られており、微生物センサとしての有用性を示すものである。本手法は1つのセンサで網羅的に無数のバクテリアやウイルスをセンシングでき、かつ、測定するほどにセンサAIが強化されて性能が向上する「成長するセンサ」として、その創出に先鞭をつけるものである。

研究成果の概要(英文)：Through the demonstration of the measurement of a single bacterial particle flowing in a microfluidic channel, we have demonstrated the electrical impedance measurement of a single bio-nanoparticle under a high electric field. Furthermore, we developed an analysis method to identify bacterial species from the measurement data using machine learning, and pioneered the realization of a "growing sensor," in which artificial intelligence grows in accordance with the amount of measurement and improves the classification performance of bacterial species. As a result, it was clarified that even if the size and material are the same, impedance characteristics can be obtained depending on the surface condition. By utilizing these characteristics and also using machine learning, we have demonstrated that bacteria of almost the same size can be classified with an accuracy of more than 95%.

研究分野：バイオナノテクノロジー、ナノ流体システム、1分子計測、1分子操作、機械学習

キーワード：インピーダンス測定 ナノポア 単一粒子 ウイルス バクテリア 交流測定 ナノ流体 マイクロ流体

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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ナノスケールの微小空間(ナノ空間)は、電界操作と非常に相性が良い。例えば、電極間隔が 100 nm の場合、わずか 1 V の印加電圧で 10 MV/m もの高電界が得られるので、電極反応を抑制して安定した高電界を発生でき、さらに高電界中にも関わらず耐電圧が低い高感度の測定器を使用できる。従って、ナノ空間は高電界を活用した高感度計測に最適な場となる。一方、ナノ空間は生体分子、ウイルス、細菌などの様々なバイオナノ粒子と同等の大きさであるため、ナノスケールの流路(ナノ流路)はバイオナノ粒子を 1 つずつ流しながら逐次処理ができる唯一無二のプラットフォームと言っても過言では無い側面を持つ。

我々は、このような「ナノ空間+電気」の特徴に着想を得て、バイオナノ粒子を 1 粒子で電氣的に計測する、言わば究極感度のバイオナノ粒子計測法の実現に取り組んでおり、その実現に不可欠となるナノ空間の基礎的現象の解明を進めてきた。特に、電極-溶液界面の電気二重層が見かけ上消失するナノ空間特有の現象を利用して、電気二重層の影響を除いた高感度測定を実証した。ナノ空間の高電界下ではインピーダンス測定が 10 倍以上も高感度になることを見だし、DNA の 1 分子測定にも成功した。ただし、本手法は世界的にも前例が無く、測定の背景にある物理、特に高電界下で得られる高感度化の原理や特徴は未解明である。

2. 研究の目的

本手法を新たな計測法として確立すると共に、超高感度なナノバイオ粒子センシング技術の基盤を築くため、ナノ・マイクロ流路を流れる細菌 1 粒子測定の実証を通じて高電界下における単一バイオナノ粒子の電気インピーダンス特性を明らかにする。さらに、機械学習を利用して測定データから細菌の種類を同定する解析手法を開発し、測定量に応じて人工知能が成長し、細菌種の分類精度が向上する、いわば「成長するセンサ」の創出に先鞭をつける共に、新たなバイオナノ粒子センシング法の基盤を築く。

3. 研究の方法

3-1. 測定デバイスの作製方法

まず、細菌 1 粒子を閉じ込める断面サイズが数 100nm~数 μm の誘電体(PDMS)流路チップと、測定用の金電極を内蔵した電極チップから構成される測定デバイスを作製した。作製に当たっては、ナノ・マイクロ流路部とサンプルの入口などの 2 段階の高さを有する構造を、基板の表裏から位置合わせの上で露光してパターンニングする、両面リソグラフィーにて作製した。

3-2. ロックインアンプを用いた交流計測

一般的に、測定周波数を広帯域化すると、様々な周波数からのノイズの重畳によって信号対雑音比(SNR)が悪くなるため、交流測定は微小信号測定に向かないことが多い。そこで、ノイズに埋もれた pA レベルの測定信号を抽出するに当たり、ロックインアンプ法を利用した。本手法は、様々なノイズが重畳された測定信号に対し、別途、同じ周波数の参照信号を掛け合わせることで参照信号と同じ周波数成分のみを抽出し、他の周波数成分(ノイズ)を除外する手法である。ロックインアンプでは、特定の周波数という狭い帯域幅を維持しながら(低ノイズ)、高周波まで測定できるため(広帯域)、低ノイズで広帯域という一見矛盾した計測を実現することができる。

3-3. 機械学習による測定波形からの細菌種分類と同定

各細菌から得られるノイズの多い波形から細菌種を分類するため機械学習を利用した。アルゴリズムにはニューラルネットワークも利用し、各手法間での分類・同定精度を比較した。従来のナノポア法は専ら DC 測定であり、得られる波形は電流値変化のみであるが、交流法では電流値変化と位相変化の両方が得られるので、マルチモーダルなデータによる分類・同定性能も評価した。

4. 研究成果

4-1. 単一粒子の交流ナノポア測定

図 1 は、作製したデバイスを用い、ロックインアンプ測定で得られた代表的な電流値変化と位相変化のパルス波形である。サンプルには直径 500 nm のポリスチレン粒子を用いた。図を見て分かるように、電流値パルスと位相パルスは同期して発生しており、単一粒子に由来していることが明らかである。また、電圧に対する電流の位相が進んでいる(増大)ことから、粒子が誘電性を有していることもわかる。ベースラインはデバイスのインピーダンス特性を示しており、デバイス自体が容量性の特性を有していることがわかる。1 kHz から 300 kHz の範囲における周波数応答を元に導出した、粒子のインピーダンス特性を図 2 に示す。ここでは、直径 1 μm のポリスチレン粒子を測定した結果のナイキストプロットであり、大きさと材質は同じで、表面の修飾のみ

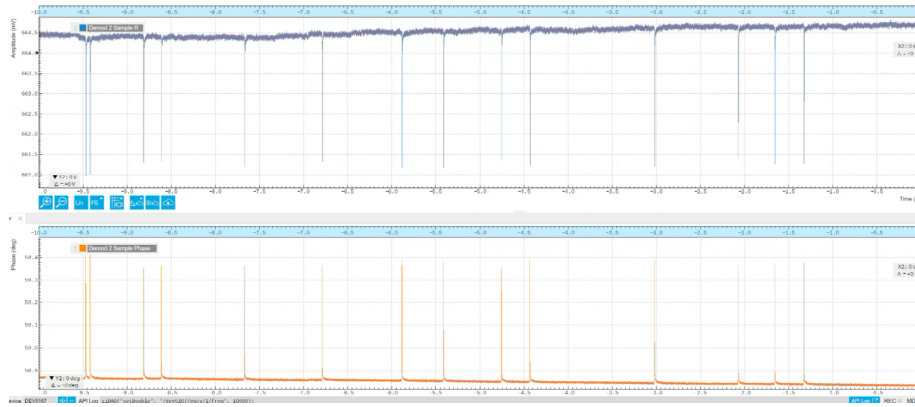


図1 代表的な AC ナノポア法で得られた電流値と位相パルス波形。上側は電流の絶対値の変化、下側は印加電圧に対する測定電流の位相変化。

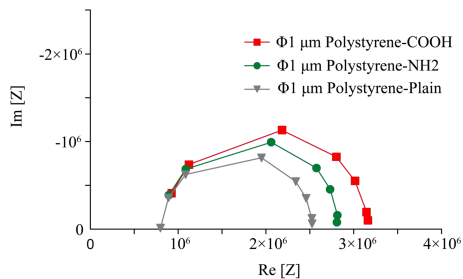


図2 単一粒子のインピーダンス特性。全ての粒子で直径は1 μ m、材質はポリスチレン。表面修飾のみが異なる。

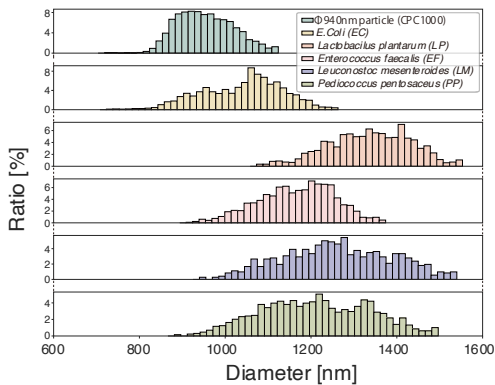


図3 細菌6種間の大きさの比較。

	CPC1000	E.coli	LP	EF	LM	PP
CPC1000	667	8	23	10	6	6
E.coli	15	642	16	15	16	16
LP	16	22	566	53	28	35
EF	13	48	19	570	29	41
LM	19	56	18	37	456	134
PP	11	37	31	51	97	493

図4 図3の細菌6種の測定波形をランダムフォレスト法で分類して得られた混同行列

が異なる。表面修飾によってインピーダンス特性が異なることを明確に示しており、本手法は表面状態に敏感に応答していることが明らかである。まだ仮説の段階を出てはいないものの、kHz オーダーの比較的低周波で表面に応答することから、カウンターイオン分極などのメカニズムによる電気容量が測定されているものと考えているが、その詳細の解明は今後の課題として残された。

4-2. 単一細菌測定と機械学習による分類

図3に、電流パルスから得られた各細菌の大きさのヒストグラムを示す。細菌は大きさの分布が広く、かつ菌種間で大きさはほぼ同一であり、大きさのみからは菌種を分類することが困難である。そこで、機械学習を利用して単一細菌由来の波形から菌種の分類を行った。一般的な分類アルゴリズムを評価した結果、図4に示すようにランダムフォレスト法で最も良い78.6%の分類結果が得られた。次に、ニューラルネットワークを用いた代表的な手法間で分類精度を比較した結果を図5に示す。時系列データに強いLong Short Term Memory (LSTM)法で最も良い95.7%の正解率が得られ、畳み込みニューラルネットワーク (CNN)でも93%が得られた。ただし、学習時間に関してはCNNが2分であったのに対し、LSTMは2時間かかり、正解率と時間コストのトレードオフの関係が浮上した。

以上、機械学習を利用することによって、少なくとも今回用いた細菌6種で、95%以上の正解率で菌種を分類できることが明らかになった。測定法も機械学習の手法もまだ概念実証の段階であり、今後さらなる分類性能の向上が期待される。

ML model	CNN	RNN	LSTM
Accuracy	93.0 %	56.2 %	95.7 %
Training time	2 min	20 min	1 h

Confusion matrix	CNN						RNN						LSTM					
	CPC1000	E.coli	LP	EF	LM	PP	CPC1000	E.coli	LP	EF	LM	PP	CPC1000	E.coli	LP	EF	LM	PP
CPC1000	667	8	23	10	6	6	188	16	41	25	38	187	15	21	7	15	15	15
E.coli	15	642	16	15	16	16	204	57	187	18	90	191	19	22	1	16	1	16
LP	16	22	566	53	28	35	61	30	180	36	74	187	19	14	5	22	1	16
EF	13	48	19	570	29	41	121	154	164	453	75	230	11	28	13	162	6	16
LM	19	56	18	37	456	134	46	43	45	53	183	227	0	0	0	0	0	137
PP	11	37	31	51	97	493	73	94	80	155	260	44	2	2	0	8	7	162

図5 ニューラルネットワークベースの機械学習手法間での比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kazuki Kitta, Maami Sakamoto, Kei Hayakawa, Akira Nukazuka, Kazuhiko Kano, and Takatoki Yamamoto	4. 巻 8
2. 論文標題 Nanopore Impedance Spectroscopy Reveals Electrical Properties of Single Nanoparticles for Detecting and Identifying Pathogenic Viruses	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 14684-14693
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsomega.3c00628	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 山本 貴富喜、橋田 和樹、坂本 まあみ、早川 溪、糠塚 明、加納 一彦	4. 巻 -
2. 論文標題 交流ナノボア法による単一ナノ粒子のインピーダンス計測とウイルスセンシングへの応用	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 電気学会論文誌E	6. 最初と最後の頁 -
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 Yukihiro Yamaguchi and Takatoki Yamamoto	4. 巻 12
2. 論文標題 One-Dimensional Flow of Bacteria on an Electrode Rail by Dielectrophoresis: Toward Single-Cell-Based Analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 123-137
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/mi 12020123	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 坂本 まあみ、山本 貴富喜
2. 発表標題 機械学習による交流ナノボア計測におけるウイルス・バクテリア同定能の高度化
3. 学会等名 第39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 2022年

1. 発表者名 仲間礼佳、山本貴富喜
2. 発表標題 交流ナノポア法の広帯域化におけるナノポア形状の数値解析
3. 学会等名 第39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 2022年

1. 発表者名 小若 龍世、山本 貴富喜
2. 発表標題 流路型ナノポアを用いた交流ナノポア法による単一ナノ粒子の周波数特性評価
3. 学会等名 第13回 マイクロ・ナノ工学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堀 宏輔、坂本 まあみ、山本 貴富喜
2. 発表標題 ACナノポア法の広帯域化に向けたナノポア構造の検討
3. 学会等名 第13回 マイクロ・ナノ工学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本 貴富喜
2. 発表標題 ACナノポア法による単一ナノ粒子の電気物性測定能に関する数値解析
3. 学会等名 COMSOL Conference Tokyo 2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takatoki Yamamoto
2. 発表標題 FORMATION OF BACTERIA STREAM IN LINE BY DIELECTROPHORESIS
3. 学会等名 Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (Micro TAS 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takatoki Yamamoto
2. 発表標題 VIRUS IDENTIFICATION BY EASY TO FABRICATE NANOPORE-CHIP USING ULTRATHIN GLASS-FILM AND OPTICAL BONDING
3. 学会等名 The 24th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤健地, 山本貴富喜
2. 発表標題 ブラウン運動を利用した細菌1細胞捕捉法の数値解析
3. 学会等名 マイクロ・ナノ工学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村泰輝, 山本貴富喜
2. 発表標題 ガラスフィルムを用いたナノポアデバイスの作成と バイオナノ粒子計測への応用
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 山口 悠弘 正 山本貴富喜
2. 発表標題 誘電泳動力を用いた1細菌計数デバイスの実現に向けた細菌配列技術の実現
3. 学会等名 マイクロ・ナノ工学シンポジウム
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 山本 貴富喜 (執筆分担)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 244
3. 書名 AI・ナノ・量子による超高感度・迅速バイオセンシング	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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