

令和 6 年 4 月 11 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K14581

研究課題名（和文）学習型AIセンサシステムによる迅速・網羅的細菌検出と同定

研究課題名（英文）An AI-powered sensor system for rapid bacteria detection and identification

研究代表者

嶋田 泰佑 (Taisuke, Shimada)

名古屋大学・工学研究科・助教

研究者番号：00850140

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：細菌感染症は世界的に主要な死因の一つであり、加速する薬剤耐性化はその脅威を増大させる。マイクロ・ナノ構造体を利用したセンサは迅速な細菌検出と同定を実現することが可能な技術的な候補であるが、多種多様な標的細菌をカバーするためには対応するレセプターを多数必要とするという課題がある。本研究では、レセプターを必要としない学習型AIセンサシステムにより、迅速で網羅的な細菌検出とデータ駆動型の同定法を創出する。そのために、単一細菌のセンシングから機械学習によるビッグデータ解析・超高精度推定が可能な革新的システムを創製して、様々な細菌の迅速検出と同定を実現した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

単一細菌細胞の物理的な特性を反映したパルスセンシングを基軸とした、データ駆動的な細菌種の同定が可能な独自システムを開発する。本システムによりレセプターを必要としない学習型センサという新規概念を創造して、レセプターレスな細菌検出・同定技術を開発する。本研究は、レセプターに依存したセンサによる標的細菌の同定にパラダイムシフトを起こし、学習型センサによる迅速・網羅的検出とデータに基づく同定への大転換をもたらす。

研究成果の概要（英文）：Bacteria infections are one of leading causes of death in the world, and emerging drug-resistant bacteria has increased its threat. Sensors using micro- and nano-structures are technical candidates that can realize rapid bacterial detection and identification; however they require a large number of receptor molecules (e.g., peptides and antibodies) to cover a wide variety of target bacteria. This work has proposed an AI-powered sensor system without using receptors for rapid bacterial detection and identification. The sensor system enabled to detect and identify various bacteria rapidly via single bacteria sensing and machine learning-driven pulse analyses.

研究分野：MicroTAS

キーワード：細菌 学習型AIセンサシステム 単一細菌センシング ポアセンサ 機械学習

## 1. 研究開始当初の背景

微生物感染症は世界的に主要な死因の一つであり(*Nature*, 451, 990, 2008; *Lancet*, 395, 200, 2020)、薬剤への耐性化は治療を複雑かつ困難にしている(*Lancet*, 387, 168, 2016)。その中でも細菌の耐性化は急速に進行しており、効果的な対策を欠く場合、将来世界で年間 1,000 万人の死亡者および年間 1 京円を超える経済損失が予測される(*Nature*, 543, 15, 2017; WHO, 2019)。細菌に対抗するアプローチの一つは臨床や食料安全などの領域における迅速な検出と同定であり、そのための技術開発が急務である。現在、細菌検査が必要な試料は微生物研究所へ送付され、既存技術(e.g., 培養法、遺伝子増幅法)による分析が行われるが、輸送・検出時間(数時間~数日)や技術者による複数操作の必要性が課題である(*Nat. Rev. Microbiol.*, 11, 574, 2013)。マイクロ・ナノ構造体を利用したセンサ技術は上記課題を解消するポテンシャルを有しており、抗体などのレセプターを介した特異的な結合をシグナルに変換し、高感度で迅速な細菌検出を行う(*ACS Nano*, 6, 4548, 2012)。しかし、多種多様な細菌(e.g., 病原性, ~500 種類; *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 356, 983, 2001)をカバーするためには、対応するレセプターが多数必要であり、また、それらの安定性が障壁となる。レセプターを使用しないセンサは理想的であるが、細菌の物理的な特性に基づく同定技術が必要であり、未だ挑戦的な課題である。

申請者は、微細加工技術や分子ナノテクノロジー技術を駆使して創製したマイクロ空間やナノ構造体を活用して、微粒子捕捉・分離技術(*Science Advances*, 2017; *Lab on a Chip*, 2018; *ACS Nano*, 2019; *Analytical Chemistry*, 2019; *Lab on a Chip*, 2021)や単一センシング技術(*ACS Sensors*, 2018; *Micro Total Analysis Systems*, 2017-2020)を開発してきた。また、マイクロ空間でのミリ秒・単一センシングと機械学習による高精度分類推定に基づき、細菌種(精度: 95.5%)の同定法も創出した(*Micro Total Analysis Systems*, 2019)。本研究では、これまでの研究をさらに発展させ、レセプターを必要としない学習型センサという新規概念を創出して、迅速で網羅的な細菌の検出と同定を実現する。本研究成果は、レセプターに依存したセンサによる標的細菌の同定にパラダイムシフトを起こし、学習型センサによる迅速・網羅的検出とデータに基づく同定への大転換をもたらす。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、レセプターを必要としない網羅的な単一細菌センシングから機械学習によるビッグデータ解析・超高精度細菌種推定、ソーティングに基づくデータ学習までの一貫通貫した、学習型 AI センサシステムを創出するところにある。そして、本システムにより、未知な細菌に遭遇してもソーティングに基づくデータ学習を重ね、ビッグデータを強化することで、多種多様な細菌をカバーできる迅速な検出とデータ駆動型の同定を実現する。当該システムは、単一細菌細胞の物理的な特性を反映したパルスセンシングを基軸としており、データ駆動的な細菌種の同定とそのためデータ学習が可能というところに特徴がある。

## 3. 研究の方法

本研究では、(1) 網羅的な単一粒子検出技術の開発と(2) 機械学習による単一細菌識別、(3) オンサイト使用を目指したポアセンサの開発に関する検討を進めた。

### (1) 網羅的な単一粒子検出技術の開発

本ポアセンサではマイクロポアを活用しており、単一細菌が当該ポアを通過する際のイオン流減少をパルスとして計測することで、単一細菌を検出した。パルスとして網羅的に検出するためには、ポアへ漏れなく細菌を導入する必要があるが、細菌は細菌種依存的なポアセンサ表面への吸着性を有するため(*Adv. Healthcare Mater.*, 8, 1801323, 2019)、(i) 圧力的な流体駆動と(ii)電気泳動駆動による検出技術の開発を進めた。

### (i) 圧力的な流体駆動

界面活性剤による分散性向上と圧力的な流体駆動を組み合わせることにより、細菌を網羅的に検出することができるポアセンサの開発を進めた。界面活性剤により細菌の溶液中分散性を向上させるために、当該センサで使用する計測用溶液に代表的な陰イオン界面活性剤である Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) を添加した。高濃度の SDS を添加すると細菌の外膜が破壊されることが想定されたため、細菌に影響を与えない SDS の添加濃度と計測されるパルス数の両者に関する最適化を行った。圧力的な流体駆動は、検出されるパルス数を増加させて極低濃度の細菌懸濁液でも細菌の検出を実現するために検証を行った。ポアセンサに細菌を導入する際、電気泳動的な駆動力に圧力的な駆動力を加えることで、ポアセンサの高感度化を図った。その際、過剰な流量で流体駆動を行うと、細菌のポアセンサを通過する速度が速くなりすぎるため、ポアセンサの感度と細菌の通過速度に関する最適化を進めた。

## (ii) 電気泳動駆動

電気泳動駆動による網羅的な検出を目指して、異電荷の細菌でも検出が可能なシステムの開発を進めた。これは、ポアセンサの計測溶液中において細菌はマイナスに帯電しているという想定で研究を構想していたが、細菌種によってはプラスに帯電しているものがあることという課題に直面したためである。当該システムでは、電氣的に分離された二つのマイクロポアを有するポアセンサを新たに開発するとともに、これらのポアを同時に計測可能な計測装置を構築した。これらのシステム開発に基づき、プラスからマイナス方向とマイナスからプラス方向への電気泳動を駆使して、網羅的な細菌検出を行った。

## (2) 機械学習による単一細菌識別

本項では、(1)で取得したパルスのパターンを学習した分類モデルの活用に基づき、単一細菌識別法の構築を行った。そのために、パルスパターンに関わる特徴的な値(特徴量)を抽出して、パルスの高さや幅などに関わる 10 種類の特徴量を採用した。細菌種に対するこれらの特徴量のデータセットを構築して、データセットを学習データとテストデータに分割した。学習データを用いて機械学習により様々な分類モデルを構築するとともに、テストデータを用いて分類モデルをランク付けして高い分類性能を示すモデルを選択した。選択したモデルに対して新たに取得したパルスデータを入力することで、その分類性能を改めて評価した。

## (3) オンサイト使用を目指したポアセンサの開発

センサデバイス表面の検討に基づき、オンサイト使用を志向したポアセンサの開発を行った。これまでのセンサデバイスはデバイス材料(シリコン樹脂)の特性に由来して時間経過により計測溶液をマイクロポアに充填できなくなるという課題があった。このため、作製直後に使用することを想定してデバイスの設計・作製が行われてきたため、オンサイト展開は極めて困難であった。オンサイトでは、保管したデバイスを使用する前に計測溶液を充填することが想定されるため、親水的な表面を利用して計測溶液を自己駆動的に充填可能なデバイスを開発した。具体的には、未硬化のシリコン樹脂をポリエチレングリコール化する添加剤を加えることでセンサデバイス表面の親水化を行った。センサデバイス表面として応用可能な添加剤の量を最適化するとともに、計測溶液が未充填のまま保管したセンサデバイスにより、単一細菌を検出できるかを検証した。

## 4. 研究成果

### (1) 網羅的な単一粒子検出技術の開発

#### (i) 圧力的な流体駆動に基づく網羅的な単一細菌検出技術の開発

単一検体の網羅的な検出を目的として、界面活性剤と圧力駆動の活用による単一細菌センシング法の構築を行った。本センシングでは、検体の分散性向上のために界面活性剤の添加を検討した。ここでは、細菌は界面活性剤により化学的に破碎されることがあるため、単一細菌センシングに影響がないように界面活性剤の濃度を最適化した。電氣的な駆動だけでは、検体の表面電荷に由来して検出頻度が異なったため、圧力的な流体駆動を利用して網羅的な検出法を構築した。100 秒間の計測において、 $\sim 10^4$  particles/mL の定量下限で検出可能であった。

#### (ii) 電気泳動駆動に基づく網羅的な単一細菌検出技術の開発

泳動方向の異なる細菌を検出することができる計測システムを構築した。プラスからマイナス方向に細菌は泳動されると想定していたが、細菌種によってはマイナスからプラス方向に流れるものがあるという課題に直面した。そこで、電氣的に分離された二つのマイクロポアを有するセンサデバイスを新たに開発して、二つの電気泳動方向を同時に計測することができるシステムを構築した。臨床的に重要な細菌をモデルとしてセンシングを行ったところ、緑膿菌や大腸菌はプラスからマイナス方向、アシネトバクターと黄色ブドウ球菌はマイナスからプラス方向の電気泳動に基づき、パルスとして単一細菌を検出可能であることを確認した。

## (2) 機械学習による単一細菌識別

(1)で検出したパルスの特徴量抽出と機械学習による分類を行うことで、単一細菌の識別を進めた。具体的には、プラスからマイナス方向とマイナスからプラス方向の電気泳動方向に基づき二つのグループに分けて、特徴量抽出では、パルスの高さや幅などに関わる 10 種類の特徴量を各パルスから抽出した。そして、各泳動方向グループのパルス特徴量を機械学習することで、分類モデルを構築した。当該モデルによって、プラスからマイナス方向では 96.6%、マイナスからプラス方向では 84.6%で単一パルスを分類可能であることを実証した。

なお、前処理を含めた単一細菌センシングから細菌種の識別までのワークフローは 20 分程度で実施可能であることを確認している。これらの結果から、単一細菌センシングに基づき細菌種を迅速に同定可能なセンサシステムの開発に成功した。

### (3) オンサイト使用を目指したポアセンサの開発

センサデバイス表面の最適化と単一細菌検出に関する検証を行った。センサデバイス表面の最適化では、過剰な添加剤をシリコン樹脂に加えると、センサデバイスの作製プロセスに含まれるシリコン樹脂とガラスの貼り合わせができなくなることが観察された。センサデバイス作製に影響がない、かつ、センサデバイス表面を親水化することができる添加材の量を詳細に検証することで、両者を満たす条件を明らかにした。単一細菌検出では、30日間乾燥状態で保管したデバイスでもポアセンサが自己駆動的に計測溶液で満たされることを確認した。さらに、30日間保管したデバイスを用いた計測で、単一大腸菌の検出と精密なサイズ解析が可能であることも実証した。

(1)～(3)の結果から、網羅的な単一細菌検出技術と機械学習による細菌種の同定技術、オンサイトで使用可能なポアセンサを新規に構築することで、レセプターを必要としない迅速な単一細菌検出・同定を実現した。当該センサシステムを用いた様々な細菌種の検出・同定が強く期待されるが、そのためには各細菌種のパルスデータを蓄積して他の細菌種にも拡張することが求められる。当該課題を解決することで、細菌や薬剤耐性菌による感染症を未然防止に向けて、レセプターを使用しないセンサシステムによる迅速で網羅的な細菌検出・同定を推進することができる。

## 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 0件）

1. 著者名 Shimada Taisuke, Fujino Keiko, Yasui Takao, Kaji Noritada, Ueda Yasuyuki, Fujii Kentaro, Yukawa Hiroshi, Baba Yoshinobu	4. 巻 95
2. 論文標題 Resistive Pulse Sensing on a Capillary-Assisted Microfluidic Platform for On-Site Single-Particle Analyses	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 18335 ~ 18343
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.3c02539	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 Shimada Taisuke, Ueda Yasuyuki, Takemaru Hikari, Baba Yoshinobu, Yukawa Hiroshi	4. 巻 171
2. 論文標題 Nano-quantum sensors-based imaging and sensing for target-based drug discovery and development	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Trends in Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 117496 ~ 117496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.trac.2023.117496	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 嶋田 泰佑, 竹下 大貴, 伊藤 聡, 安井 隆雄, 馬場 嘉信	4. 巻 72
2. 論文標題 PMMA 製ナノワイヤデバイスによる体液中細胞外小胞由来 microRNA 抽出	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bunseki Kagaku	6. 最初と最後の頁 105-110
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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 嶋田泰佑
2. 発表標題 ナノバイオデバイスを用いた生体内外の分子・微粒子解析法の開発
3. 学会等名 第39回 分析化学中部夏季セミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上健太郎, 嶋田泰佑, 安井隆雄, 山崎聖司, 西野邦彦, 馬場嘉信
2. 発表標題 単一細菌センシングと抗菌薬刺激による耐性菌の迅速識別
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井上健太郎, 嶋田泰佑, 安井隆雄, 山崎聖司, 西野邦彦, 馬場嘉信
2. 発表標題 単一細菌計測と薬剤刺激による菌種・耐性識別
3. 学会等名 第53回 中部化学関係学協会支部連合秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上健太郎, 嶋田泰佑, 安井隆雄, 山崎聖司, 西野邦彦, 馬場嘉信
2. 発表標題 単一細菌センシングによる迅速な菌種・耐性識別
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第46回研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 嶋田泰佑, 藤野慶子, 安井隆雄, 加地範匡, 馬場嘉信
2. 発表標題 PEG 化PDMS を用いたポアセンサ保管と単一細菌計測への応用
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第46回研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上健太郎, 嶋田泰佑, 安井隆雄, 山崎聖司, 西野邦彦, 馬場嘉信
2. 発表標題 マイクロボアを用いた抗菌薬刺激応答の解析と耐性識別
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第45回研究会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 井上健太郎, 嶋田泰佑, 安井隆雄, 山崎聖司, 西野邦彦, 馬場嘉信	4. 発行年 2023年
2. 出版社 化学とマイクロ・ナノシステム学会	5. 総ページ数 2
3. 書名 単一細菌センシングによる迅速な菌種・耐性識別法の創出	

1. 著者名 嶋田泰佑, 馬場嘉信	4. 発行年 2022年
2. 出版社 日本空気清浄協会	5. 総ページ数 7
3. 書名 バイオエアロゾルの捕集と検出技術	

1. 著者名 嶋田 泰佑	4. 発行年 2022年
2. 出版社 化学とマイクロ・ナノシステム学会	5. 総ページ数 1
3. 書名 センサ技術を用いた細菌の検出・同定	

〔産業財産権〕

〔その他〕

researchmap  
<https://researchmap.jp/t.shimada>

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