

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年4月29日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012

課題番号：24656068

研究課題名（和文） 光記録技術と画像認識技術の融合によるウイルスその場検出器の開発

研究課題名（英文） Development of in-situ virus sensor by combining optical disk and image recognition technologies

研究代表者

粟津 浩一（AWAZU KOICHI）

独立行政法人産業技術総合研究所・電子光技術研究部門・副研究部門長

研究者番号：60356392

研究成果の概要（和文）：光ディスク上に、インフルエンザウイルス、大腸菌等を付着させて、位置情報および形状をデジタル化させること、このデジタル情報を画像化させることに成功した。また、この画像情報を画像認識技術を用いて解析することにより、試験液中の菌の濃度を瞬時に推定可能であることが確認出来た。

研究成果の概要（英文）：We have succeeded to digitize and to make an image of influenza viruses and Escherichia coli attached on an optical disk. We have also confirmed that our Higher-order Local Auto Correlation (HLAC) technology is useful for identifying the scanned images obtained by the optical disk system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：応用物理学一般

科研費の分科・細目：応用物理学・工学基礎・応用物理学一般

キーワード：光記録、パターン認識、ウイルス学

1. 研究開始当初の背景

ウイルスや菌の種類と同定には、予め培養にてその数を増やしてから行うのが一般的である。この手法は長い歴史があることから、生化学や医学、農学など、広い分野で信頼性の高い手法として認知されてきた。その一方で、判定までに数日要するために、迅速な診断を行うことができなかつた。疫学の観点から、あるいは感染を最小限に抑える観点から迅速なウイルスや菌の特定は重要である。培養法に行き詰まりを感じている生化学研究者も多くいるのが現状であった。

2. 研究の目的

感染性のある疾患か否かを短時間で診断する装置開発を救急医療の現場が求めている。本研究ではその要素技術を開発する。光ディスク基板の薄膜表面に抗体を固定し、ウ

イルスの抗原抗体反応を行う。光記録技術を使った位置情報の管理等により、ウイルスを特定する。さらに、ウイルス同定の精度向上およびウイルスの非特異吸着による誤診断防止のため、情報科学におけるパターン認識技術（適応学習型汎用認識システム）を併用し、様々なウイルスの形状による光信号の形状を学習させて検出感度や識別性能を向上させる。光記録、表面化学、ウイルス学、情報科学という四つの異分野を融合し、斬新な技術を開発することにより、社会的に重要なウイルスの迅速測定のための要素技術を開発するのみでなく、全く新しい学問分野を開拓する。

3. 研究の方法

ウイルスを光ディスク上で捕獲するための表面化学の研究を行い、ウイルス固定化技術

を開発する。抗体を表面がSiO₂である光ディスク上に固定化させる手法を開発する。ウイルス分析ディスクでは、ウイルスをシグナルとして捕らえる技術を研究する。測定波長より小さい100 nmサイズのウイルスを検出することはかなり挑戦的テーマである。ウイルスの形状は、ウイルスの種類、環境などによって球状、ひも状などの多形を示す。これらを数多く実際に観察しデータベース化させる。パターン認識技術を用いて膨大な数のウイルスの多形と膨大な数の光ディスクからのシグナルを学習させて、瞬時に見分けるための研究を行う。最終的には、抗体により選択的に捕獲されたウイルスの種類を、パターン認識技術によって特定させることによって、迅速な測定でありながら精度の高い判定を可能にする。

4. 研究成果

(1) ウイルス固定化技術

光ディスク基板の上に、ZnS-SiO₂層及びSiO₂層をスパッタリング法にて成膜した後、シランカップリングにて表面にアミノ基を形成した(図1)。図1a)ではこれに、ビオチンと金ナノ粒子付きストレプトアビジンを順に取り付け、生体物質と光ディスクとの親和性について予備的な検討を行った。一方図1b)ではこれに、アミノ基をその両側に捕捉できるグルタルアルデヒドと、ウイルス捕獲のための抗体とを順に取り付けた。抗体が付かなかった箇所は、エタノールアミンで終端させた。インフルエンザウイルス(A/Udorn/307/1972)は、抗原抗体反応によって固定化した。金ナノ粒子付き抗体は、ウイルス固定化の標識に用いた。

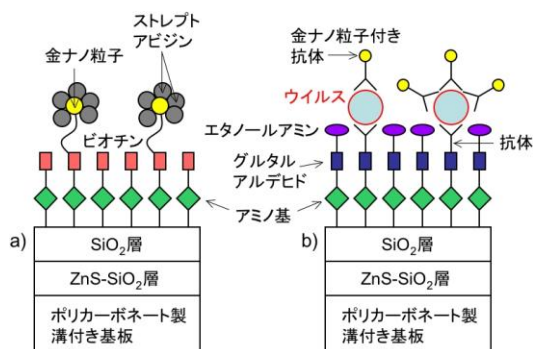


図1 ウイルス固定化の検討

このような手順にて、予備的あるいはウイルス固定化の検討を行ったものの、両者の親和性は決して高くはないことがわかった。具体的に、光ディスクの特性評価はそもそも試料がドライの環境下にて行うが、上記手法では、各種生体物質を含む溶液が乾燥後、大きな染み(図2)や析出物などが試料表面に多数出現した。このときの光ディスクの焦点面は試料表面にあり、大きな染みや析出物も反射光

強度信号の変化として観測されたため、対象物(ストレプトアビジンやウイルス)の情報のみを取得することは困難であるとの判断に至った。改善のためには、ドライとウェットの環境を適切に両立させる方法を確立する必要があるが、まずは比較的簡易な方法により、ウイルスを光ディスクで検出するための検討を次節にて行った。

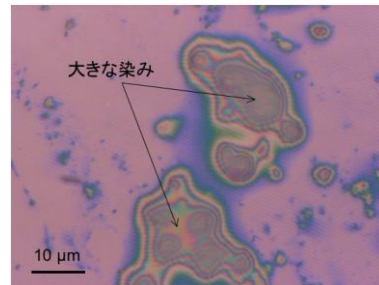


図2 ストレプトアビジン固定化検討後の試料表面の例(光学顕微鏡像)

(2) 光ディスクを使ったウイルスの検出

ウイルスと金ナノ粒子付き抗体とを抗原抗体反応させた溶液を、光ディスク試料上に直接滴下し、物理吸着にてウイルスを固定化する方法に変更した(図3)。光ディスク基板の薄膜材料には、以下の理由から、酸化インジウム錫(ITO)を用いた。1) 高パワーのレーザー照射によって不可逆的に反射光強度が異なる部分(位置決めのためのマーカー)を形成できたこと、2) 光透過性があり、基板側からウイルス読み取りのためのレーザー照射時に光のロスが少ないこと、3) 電気伝導性があり、走査型電子顕微鏡(SEM)で観察時のチャージアップの影響が低減できること、の3点である。ウイルスの屈折率nを蛋白質と同じ1.45と仮定し、ウイルス付着部の光ディスクの反射率を計算した。ITO(n=2.2)の層厚を140 nmに設計すると、ウイルス付着に伴い、反射率は半減する(16→8%)と予測された。

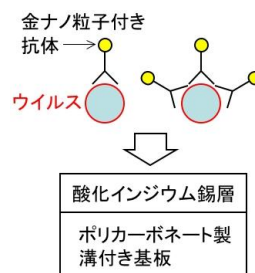


図3 物理吸着によるウイルスの固定化

インフルエンザウイルスが 8.0×10^9 pfu/mlの濃度で含まれる溶液 $5 \mu\text{l}$ と、金ナノ粒子(直径:10 nm)が付いた抗体を含む溶液 $50 \mu\text{l}$ とを混合し、両者を抗原抗体反応させた後、リン酸緩衝生理食塩水を足して計 $500 \mu\text{l}$ の試験液を作った。ディスク試料表面

に試験液を約 $50 \mu\text{l}$ 滴下し、30分間待った後、純水で軽く濯ぎ、自然乾燥させた。図 4 は、光ディスク試料表面の光学顕微鏡像であり、位置決めのためのマーカーの他、暗い染み部分が複数観測された。図 5 は、図 4 の染み部分を SEM 観察した結果であり、染みの部分に金ナノ粒子が付着凝集している様子が観測された。このことから染みの正体はウイルス（の集合体、一塊単位）であることがわかる。

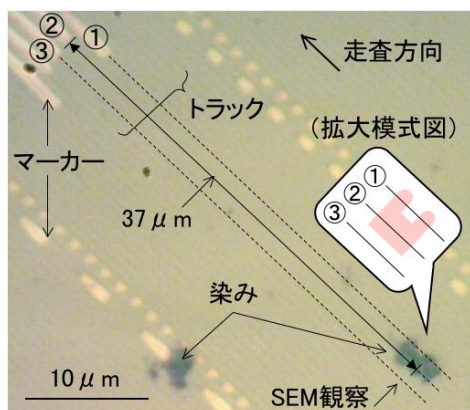


図 4 図 3 の光ディスク試料にウイルス滴下後の試料表面（光学顕微鏡像）

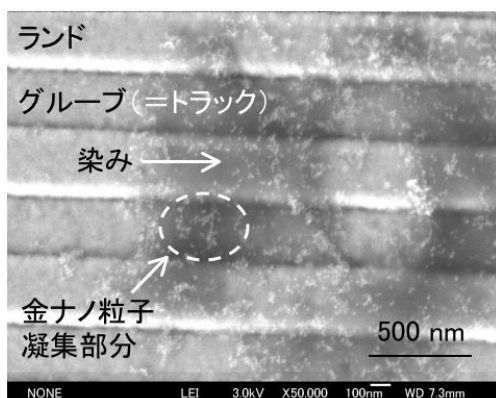


図 5 図 4 の染み部分の SEM 像

図 6 は、図 4 の走査方向に光ディスクテスタで①②③の各トラックをレーザ光（波長：405 nm）で高速走査したときの反射光強度（電圧表示）である。例えば②について、図 4 の染み（=ウイルス）～マーカー端の距離が $37 \mu\text{m}$ 、図 6 のディップ～マーカー端の距離が $34 \mu\text{m}$ とほぼ同じであった。また図 6 の反射光強度の低下は、光学計算による予測と一致する。これらのことから、光ディスクによるウイルス検出を実証することができた。本実験方法では、一塊単位での評価となったが、発表論文 (T. Shima *et al.*, J. Biomater. Nanobiotechnol., 4 (2012) 145.) では、1 個単位のポリスチレンビーズ（直径：100 nm）や 1～数個程度のインフルエンザウイルスの検出も可能であることを示している。

ウイルス検出を行った図 6 のディップの数

について、①では 2 箇所、②では 1 箇所が観測され、③では観測されなかった。この走査結果は、図 4 の対象形状から予測される内容と合致する（図 4 の拡大模式図参照）。つまり、検出対象が数 μm ～数 $10 \mu\text{m}$ の大きさであって、複数のトラックに跨って存在する場合は、各トラックの走査で得られた輪切りの信号情報を基に、コンピュータ上で元の「形状」を再構成することも可能である。しかしながら、光学顕微鏡で観測された染みの形状はまちまちであり、一塊あたりのウイルスの構成個数を含め、法則性を見出すのは困難と予測された。光ディスク技術とパターン認識技術の融合のため、形状がより明瞭で、個単位の認識も容易な大腸菌を使い、次節にて本節同様の実験を行った。

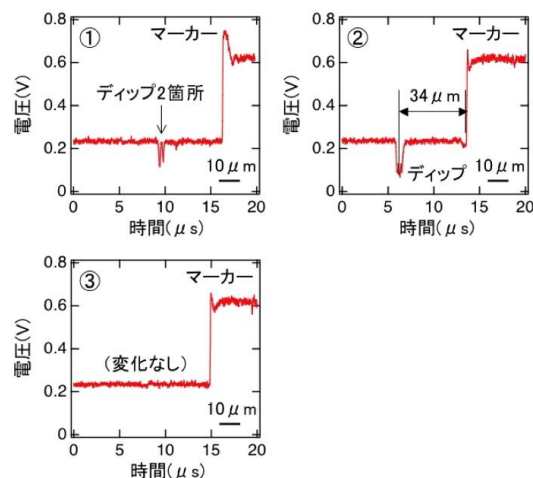


図 6 図 4 の各トラックを走査時の反射光強度（電圧表示）

(3) 光ディスクを使った大腸菌の検出

大腸菌（JM109、タカラバイオ社製）を、まずリリア-ベルターニ液体培地に入れ、 37°C で一晩保ち、培養した。遠心分離器にて大腸菌と液体培地とを分離し、その後大腸菌に純水を加え、試験液を作製した。加える純水の量は、波長 600 nm の光学濃度 (O. D.) が 0.1 となるよう調整した。実験には前節と同様、ITO 層にあらかじめ位置決め用のマーカーを設けた光ディスク試料を用いた。形状評価等を行うため、実験にはできるだけマーカー端が揃った箇所を選んだ。マーカー近傍のディスク試料表面に試験液を $10 \mu\text{l}$ 滴下し、自然乾燥させた。

該箇所の光学顕微鏡像（図 7）から、ミクロンオーダーの大腸菌が分布している様子が観察された。図 7 の a) から h) がマーカー（計 8 本）であり、例えば c) であれば、レーザ光（波長：405 nm）は、線速 4.9 m/s で図の破線をマーカー部分が含まれるように、走査を行った。図 8 に、全マーカーについて同様に走査し得た、反射光強度（電圧表示）の測定結果を示す。マーカー内の強度に変動

があったものの、その位置を特定することは容易であった。またマーカー以外の部分では、反射光強度は基本的に一定である中、強度の凹みが数カ所あった。図8のa)からh)までの結果を、マーカー端は揃っているとの仮定で並べ、二次元マッピングを行った結果を図9に示す。図8の強度の凹み部分については、濃い青色で示した。

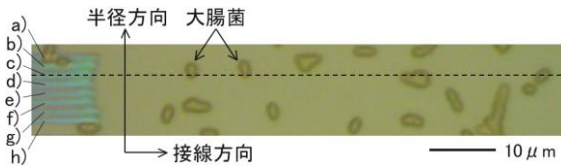


図7 大腸菌溶液滴下後の試料表面 (光学顕微鏡像)

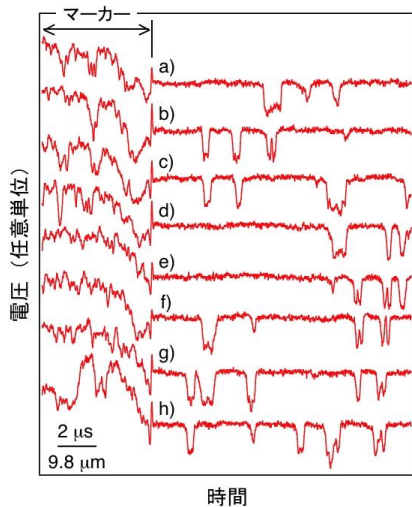


図8 図7の各トラックを走査時の反射光強度 (電圧表示)

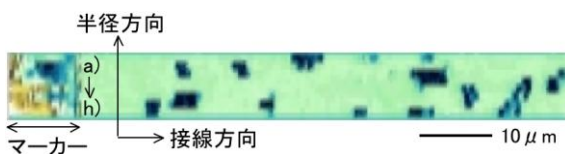


図9 図8の二次元マッピング (走査像)

図7と図9を比較すると、ほぼ同様の像が得られていることがわかる。具体的には、大腸菌(群)の大きさ及び個数を走査像(図9)にて再現することができた。未だ形状は明瞭ではないものの、次の工夫により改善を図ることができる。まず、図7のマーカー間の距離(ピッチ)は、 $1.36\mu\text{m}$ (グループ一つおき)であったが、毎グループあるいはランドとグループ(図5参照)の両方にマーカーを設けるか、あるいは、より狭ピッチの光ディスク基板を使うなどすれば、ピッチは約半分以下($0.20\sim 0.74\mu\text{m}$)となり、ディスク半径方向の情報量を増やすことができる。また、図7のマーカー端の位置をより適切に揃える

などすれば、ディスク接線方向の像形成時の精度は高まる。これまでに、ピッチを $0.74\mu\text{m}$ にまで狭める検討は進めている。本節の成果については、別途学術論文等においてまとめる予定である。

(4) 二次元マッピング像の画像解析

前述の手順で生成した二次元マッピング像を、画像認識技術を用いて解析した。

試験液としては、大腸菌に純水を加え、波長 600nm の光学濃度(O.D.)が0.05、0.1、0.2となるように調整したものを使用した。画像解析には、高次局所自己相関(Higher-order Local AutoCorrelation; HLAC)特徴に基づくパターン認識技術を用いて画像解析した。

HLACは、産業技術総合研究所独自の特徴抽出手法で、対象が画像中の何処にあっても検出可能、特徴量の大きさから対象の数や面積を推定可能、検出候補の数に影響を受けず高速に処理可能など、パターン認識にとって好ましい性質を数多く有する特徴量である。HLAC特徴量の計算では、あらかじめ用意した複数のマスクで画像全体を走査して合致した部分領域の数を積算する。マスク毎の値を連結して得られるベクトルがHLAC特徴量となり、これを適切に多変量解析することで、所望の解析結果を得ることができる。詳細については文献(大津, 適応学習型汎用認識システム, 2011)を参照されたい。

上記3種類の試験液から得られる複数の二次元マッピング像からHLAC特徴量を計算し、主成分分析を行った結果を図10に示す。グラフの縦軸と横軸はそれぞれ第1主成分と第2主成分を示す。また、赤い四角(Refと表記)は大腸菌が存在しない箇所の二次元マッピング像から取得したHLAC特徴量に対応し、青・緑・橙色の四角はそれぞれO.D.が0.05、0.1、0.2に対応する。

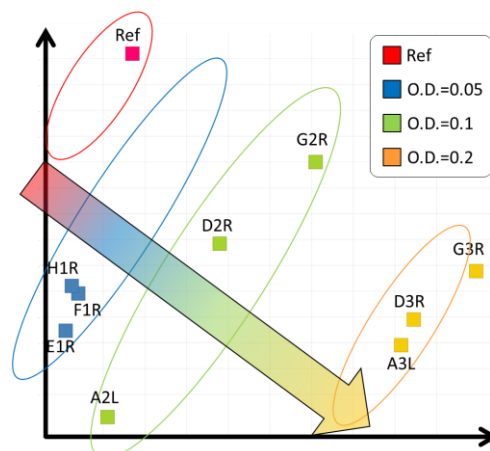


図10 二次元マッピング像の画像解析結果

グラフからは、O. D.が増加するに従って、微量の主成分分析結果が右肩下がりに分布する傾向が明らかに見て取れる。これより、光ディスクを使った大腸菌の検出結果を画像解析することで、その濃度を推定できる事が分かった。今後は、長桿菌や連鎖球菌など他の菌における光学濃度と HLAC 特徴量との関連性の調査や、菌種の同定などについて引き続き検討を行う。

(5)まとめ

ウイルス、菌類を同定するには、培養法を用いることが一般的である。しかし培養には数日の日数がかかるために、感染初期には原因を特定することができない。そこで、光ディスク上でウイルスや菌類を捕獲して、その形状からウイルス、菌の種類を同定することができれば、生化学の観点から画期的といえる。光ディスク上に、インフルエンザウイルス、大腸菌等を付着させて、位置情報および形状をデジタル化させることに成功した。さらにこのデジタル情報を画像化させることにも成功した。この画像情報をパターン認識技術により解析することで、試験液中の菌の濃度を瞬時に推定することができた。この謂わば「光ディスク顕微鏡」をベースに、パターン認識技術による付着物の種別判定精度を高めていくことで、迅速な診断を行うための装置を早期に実現していく。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

① Takayuki Shima, Makoto Fujimaki, Akihiro Yoshida, Subash C. B. Gopinath, Masashi Kuwahara, Yoshimichi Ohki and Koichi Awazu, Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology, 査読有, 4 巻, 2013, 145-150, DOI: 10.4236/jbnb.2013.42020.

[学会発表] (計1件)

① 粟津浩一、島隆之、藤巻真、桑原正史、野里博和、坂無英徳、高橋栄一、村川正宏、玉木秀幸、菅野学、成廣隆、鎌形洋一、水中に含まれる微生物の検出・特定のための画像認識技術を融合させた光ディスク型センサ、産業技術連携推進会議(環境・エネルギー部会・分科会・研究会合同総会)、2013年1月31日、産業技術総合研究所・共用講堂(茨城県)。

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称：微小構造物検出装置及び方法並びに検出用ディスク

発明者：島隆之、粟津浩一、藤巻真、桑原正史

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2013-022522

出願年月日：平成 25 年 2 月 7 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

粟津 浩一 (AWAZU KOICHI)

独立行政法人産業技術総合研究所・電子光技術研究部門・副研究部門長

研究者番号：60356392

(2)研究分担者

村川 正宏 (MURAKAWA MASAHIRO)

独立行政法人産業技術総合研究所・情報技術研究部門・研究グループ長

研究者番号：10358153

島 隆之 (SHIMA TAKAYUKI)

独立行政法人産業技術総合研究所・電子光技術研究部門・主任研究員

研究者番号：10371048

藤巻 真 (FUJIMAKI MAKOTO)

独立行政法人産業技術総合研究所・電子光技術研究部門・主任研究員

研究者番号：10392656

野里 博和 (NOSATO HIROKAZU)

独立行政法人産業技術総合研究所・情報技術研究部門・主任研究員

研究者番号：40435764

清水 一史 (SHIMIZU KAZUHUMI)

神戸大学・医学研究科・特務教授

研究者番号：50004677

黒田 和道 (KURODA KAZUMICHI)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号：50215109

坂無 英徳 (SAKANASHI HIDENORI)

独立行政法人産業技術総合研究所・情報技術研究部門・主任研究員

研究者番号：80357102

高橋 栄一 (TAKAHASHI EIICHI)

独立行政法人産業技術総合研究所・情報技術研究部門・主任研究員

研究者番号：80357368