

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25246033

研究課題名(和文) ナノフォトニクス、画像認識技術、金属錯体の融合による菌類同定システム研究

研究課題名(英文) DVD biosensor based on artificial intelligence

研究代表者

栗津 浩一 (Awazu, Koichi)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・電子光技術研究部門・部門付

研究者番号：60356392

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,000,000円

研究成果の概要(和文)：菌類の同定は寒天培地などを用いて数日培養し増殖させるのが一般的である。もし1個体の菌を検出同定できれば、培養の手間と時間を大幅に短縮できることになり、食中毒の診断、初動を劇的に早くすることができる。本研究では菌類に選択的に結合する金属錯体を用いて、菌類の形状と発光を光記録技術により記録させた。記録させた情報をパターン認識技術により、様々な菌類の形状と発光特性を学習させ、1個体の菌でも同定を可能にした。光記録、錯体化学、パターン認識という3つの異分野を融合し、斬新な技術を開発することにより、菌類の迅速同定技術を開発するのみでなく、食中毒患者への迅速な治療を可能にする検出技術を提案するできた。

研究成果の概要(英文)：We used a DVD based optics. DVD disc was used as the substrate. An ITO layer, a PtOx layer, and another ITO layer were deposited on the substrate. Reflectance of the sample was controlled by adjusting the thickness of the ITO layers. The PtOx layer was used to record marks to identify the position on the disk. E. coli (JM109, Takara Bio Inc.) was mixed in a deionized water to make a test water sample. A droplet of the test water was placed on the disk and dried at room temperature. For the evaluation, we used an optical disk tester. An image obtained by the disk tester was identical with an image obtained by an optical microscope. The results demonstrated that E. coli was successfully detected and imaged by the optical disk technology. We would like to emphasize that the method is very simple. As a next step, it is important to combine with an appropriate analyzing method to distinguish between the microorganism on target and other substances of a similar size.

研究分野：無機材料工学

キーワード：DVD センサー 人工知能 錯体化学 情報科学 無機材料 分析化学 菌

1. 研究開始当初の背景

菌類の同定は寒天培地などを用いて数日培養し増殖させるのが一般的である。しかしもし1個体の菌を検出同定できれば、培養の手間と時間を大幅に短縮できることになり、食中毒の診断、初動を劇的に早くすることができる。本研究では菌類に選択的に結合する金属錯体を用いて、菌類の形状と発光を光記録技術により記録させる。記録させた情報をパターン認識技術(適応学習型汎用認識技術)により、様々な菌類の形状と発光特性を学習させ、1個体の菌でも同定を可能にさせる。光記録、錯体化学、パターン認識という3つの異分野を融合し、斬新な技術を開発することにより、菌類の迅速同定技術を開発するのみでなく、食中毒患者への迅速な治療を可能にする検出技術を提案する。また、古典的寒天培地に頼らない全く新しい生化学の手法を提案する。

2. 研究の目的

嘔吐や下痢などの症状の患者であれば急性胃腸炎か食中毒が疑われる。食中毒だとしたらさらに菌の種類によって投与する薬剤が変わってくる。例えば黄色ぶどう球菌に対してはセフェム系薬剤が効果的であるが、カンピロバクターはセフェム系薬剤では治療効果は望めないことが知られている。臨床症状から病原を診断することは不可能で、培養して遺伝子検査をする以外に方法はない。国立感染症研究所の診断マニュアルによれば、診断までに大腸菌で3日、黄色ぶどう球菌で4日間かかる。そのため診断を待たずに、抗生物質を安易に処方してきたが、それが原因で多くの一般に利用される抗生物質に耐性(抵抗性)を持つ変種が生み出されてしまった。従って、数日かかる検査がやはり不可欠であるが、このことは治療の初動が著しく遅くなることを意味する。もし患者を検査して何の菌による食中毒なのかを直ちに診断できれば、迅速かつ適切な抗生物質を投与することが可能となり、医学は大きく進歩することになる。そこで培養を行わず、もしくは極めて短時間の培養で形状と発光波長、発光寿命などの高次情報から菌の種類を特定できるシステム開発を提案する。

3. 研究の方法

(1)光ディスクを用いた大腸菌の検出

実験のため、次の手順で大腸菌試験液を準備した。大腸菌(JM109、タカラバイオ)を液体培地に入れ、37℃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に分離した後、液体培地を取り除いた。大腸菌に純水を加え、これを試験液とした。加える純水の量は、波長600nmの光学濃度(O.D.)が約0.01-0.02になるよう調整した。光ディスク試料は、ポリカーボネート製光ディスク基板上にスパッタリング法にて、ITO 50 nm、PtO_x 10 nm、ITO 50 nmの3層を積層した。

ITOは光ディスク試料の反射率調整のために用いた。PtO_xは記録のために用い[1]、試料を光学顕微鏡で観察するときの目印を形成した。

光ディスク基板上にあるグループ(溝)をレーザー光で走査した結果を多数配列させて大面積の走査像を得ることと、試料半径方向の測定ピッチを狭めて高精細なイメージングを行うことの2点を中心に評価技術の検討を行った。具体的には、走査本数はこれまで数本であったが[2]、容易に数百本以上(長さ:数百μm以上)に増やせるようにした。測定ピッチはこれまで1.36 μmであったが[2]、まずは0.74 μmに狭めるようにした。

(2)大腸菌と夾雑物との区別

実際の検査対象水には、大腸菌以外に多くの夾雑物が含まれている。夾雑物の一例として、大腸菌に類似する大きさのポリスチレンビーズ(直径:0.75 μm)を含む混合試験液を作製した。大腸菌とビーズはほぼ等量となるよう濃度を調整した。混合試験液を光ディスク試料上に滴下し、(1)と同様のイメージング試験を行い、大腸菌と夾雑物(ビーズ)が区別できるかを検討した。

(3)大腸菌への蛍光染色

大腸菌を高濃度を含む純水とZnCl₂エタノール溶液を混合して暫く放置し、大腸菌のリン酸基にZn²⁺イオンを結合させた。遠心分離して液体を取り除いてから、ピピリジンヘキサトリエンを含むエタノール溶液を入れて、Zn²⁺イオンとピピリジンヘキサトリエンを結合させた。Zn²⁺イオンを介して大腸菌とピピリジンヘキサトリエンを結合させることにより、大腸菌に蛍光染色をする検討を行った。

4. 研究成果

(1)光ディスクを用いた大腸菌の検出

光ディスク試料上に、大腸菌試験液を10 μl滴下し、自然乾燥させた。菌飛散防止のためPt-Pdを5 nm追加成膜した後に、試料表面のAFM観察を行った結果を図1に示す。図から、大腸菌はその棒状の形状を維持しているが、解析した高さは約100 nmとやや低かった。

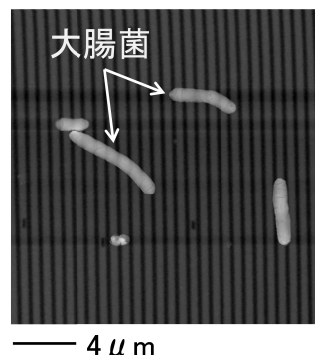


図1 光ディスク試料上に大腸菌が附着したときのAFM像

図 2(a)は、大腸菌が試料上に付着したときの断面の様子を表した模式図である。大腸菌は、屈折率 $n=1.4$ の薄膜(膜厚: t)であると仮定した[3]。また大腸菌は試料のランド(畝)で保持されていることから、レーザ光が走査するグループ(溝)との間に、ランド高さ相当(44 nm)の空隙が存在するとした。図 2(b)は、図 2(a)の構造に対し、基板側から波長 $\lambda=660$ nm の光を照射したときの反射率を計算した結果である。図 2(b)から、付着物が無いとき($t=0$ nm)に比べ、大腸菌が付着し乾燥したとき($t=100$ nm)は、反射率は減少することが予測される。

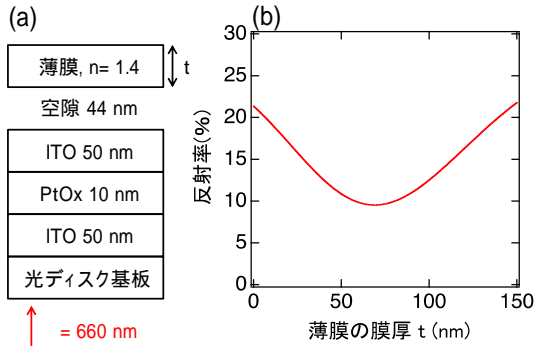


図 2 (a)試料断面模式図
(b)反射率計算結果

図 3(a)は、大腸菌が試料に付着したときの光学顕微鏡像(グレースケール表示)である。図左下は、PtO_x層に形成した目印であり、これより図上側の斑点は全て大腸菌である。

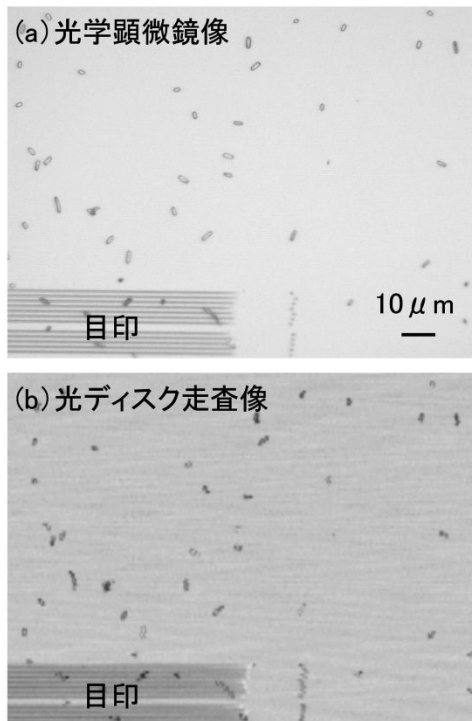


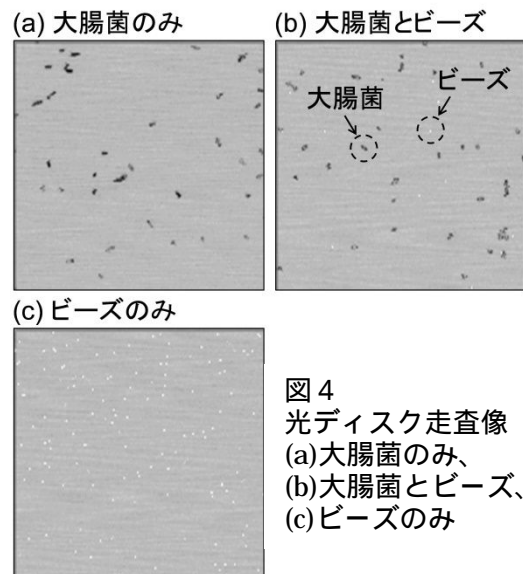
図 3 (a)光学顕微鏡と(b)光ディスクで
同じ箇所を評価した結果

図 3(b)は、図 3(a)と同じ箇所について、光ディスク試料のグループ(溝)をレーザ光(波長 $\lambda=660$ nm)で走査して反射光強度を測定し、その結果を配列することで得た走査像である。図 3(a)と図 3(b)の像は、目印を含め、ほぼ同一であった。また図 3(b)の大腸菌がある部分は黒く表示されているが、これは周辺部に比べて反射光強度が低かったことを表しており、図 2(b)で予測された計算結果とも合う。一連の結果から、光ディスクを用いた本手法により、大腸菌が分散した状態を適切に評価できることが示された。

光ディスクを用いる方法において高精細な像を得るときに課題となるのは、グループ周期で決まる試料半径方向の測定ピッチを狭めることである。図 3(b)よりも高精細な像を得ることを目指して、波長 $\lambda=405$ nm のレーザ光で測定ピッチ $0.40 \mu\text{m}$ の光ディスク基板を大面積に走査する仕組みを構築している。これまでに走査像を得ることは出来ているが、試料接線方向の位置合わせが適切に行えない場合があり、現在その解決を図っている。

(2)大腸菌と夾雑物との区別

図 4 に、(a)大腸菌のみ、(b)大腸菌とビーズの混合、(c)ビーズのみの液を滴下し乾燥させた



せた後に、光ディスクを用いた方法でイメージングを行った結果を示す。ビーズの場合は、試料への付着に伴い、反射光強度が増加する変化を示したため、図では白く表示されている。また、大腸菌(棒状)とビーズ(球状、点状)では見え方が異なる様子が観察されている。このように、反射率や形状などから、夾雑物との区別を行うことができる見込みがある。

(3)大腸菌への蛍光染色

図 5 に、Zn²⁺イオンを介して大腸菌とビビ

リジンヘキサトリエンを結合させた液をガラス基板上に滴下し乾燥させた後、表面を蛍光顕微鏡で観察した結果を示す。光ディスクへの応用を踏まえて、波長 = 405 nm の光で励起した。図中の小さな構造物は、その大きさと形状から、大腸菌からの発光であると考えられる。つまり、本研究で検討した方法で大腸菌を蛍光染色することに成功した。従来の蛍光染色剤に比べて、褪色性が抑えられている特長があった。但し図では大きさ 10 μm 以上の凝集体も多く観測されており、蛍光染色の仕方に課題を残した。

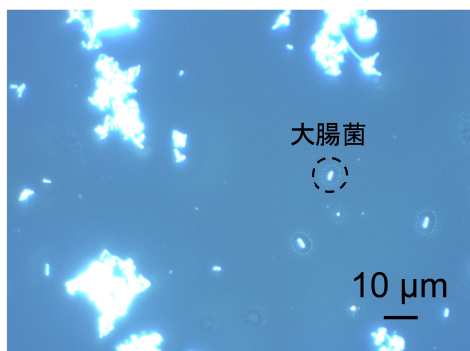


図5 大腸菌に蛍光染色処理した後の蛍光顕微鏡像

波長 = 405 nm のレーザー光で光ディスク試料を走査して、蛍光走査像を得る検討を行った。これまでのところ、図5の凝集体からの蛍光信号は測定できているが、個々大腸菌からの蛍光をきちんと確認するまでには至っていない。光ディスク試料は回転するため、蛍光観測に要する時間を十分確保できなかったことが一因と考えられる。光検出系の見直しにより現在その解決を図っている。

(4) 画像認識による大腸菌数推定

大腸菌のみの光ディスク走査像から、大腸菌数の推定を下記の手順にて試みた。まず、走査像を人間による目視計数した結果と画像から抽出した高次局所自己相関特徴との関係性を、重回帰分析によりモデル化する。次に、大腸菌数を推定したい操作像から同様に抽出した高次局所自己相関特徴をモデル式に代入することで、その走査像に含まれる大腸菌の推定数が得られる。推定結果の実例を図6に示す。グラフの印は、数千個の矩形領域(1024x2703画素)に区切られた走査像における個々の小領域毎の観測結果を表しており、横軸は人間による目視計数値、縦軸は本手法による推定値を示す。多少のばらつきが見られるものの、実測値と推定値との間に高い相関が見られる。小領域毎の誤差が僅かであっても、走査像全体に亘って積算すると、相殺分を考慮しても誤差は小さいため、走査像のノイズ低減や特徴抽出法の改良などによる一層の精度向上を検討している。

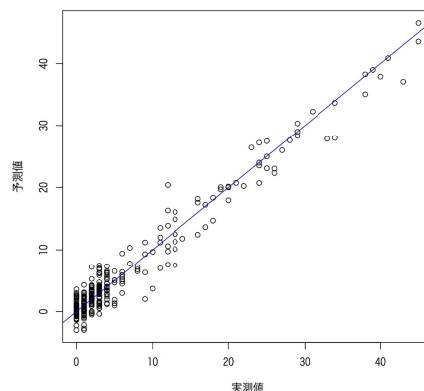


図6 画像認識技術による大腸菌推定

<引用文献>

- [1] T. Shima and J. Tominaga, Jpn. J. Appl. Phys. 42 (2003) 3479.
- [2] T. Shima *et al.*, Jpn. J. Appl. Phys. 52 (2013) 108004.
- [3] A.E. Balaev *et al.*, Proc. SPIE 4707 (2002) 253.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

T. Shima, M. Fujimaki, and K. Awazu, Optical disk-based imaging system to be used as an optical microscope, Jpn. J. Appl. Phys., 査読有, 掲載決定.

T. Shima, S.C.B. Gopinath, M. Fujimaki, and K. Awazu, Detection and Two-Dimensional Imaging of *Escherichia coli* Attached to an Optical Disk, Jpn. J. Appl. Phys., 査読有, 52, 2013, 108004 (3頁), DOI:10.7567/JJAP.52.108004.

[学会発表](計5件)

藤巻 真他, 光ディスク型センサによる微生物の検出・同定, 2016/1/28, Inter Aqua2016 産総研水プロジェクトセミナー, 東京ビッグサイト(東京都江東区).

M. Fujimaki *et al.*, Optical Disc-Based Sensor for Microorganism Detection, Metrology Arena in Thailand, 2016/1/19, Bangkok (Thailand).

T. Shima *et al.*, Optical Disc-Based Sensor for Microorganism Detection in Water, China-Japan Joint Seminar on Wastewater Resource Reclamation and Reuse in the Course of Urbanization, 2015/12/6, Shenzhen (China).

粟津 浩一他, Rapid detection of microorganism in water using optical disk technology, Int. Conf. on the Water Crisis in the Asia-Pacific Region, 2015/2/12, 香川大学(香川県高松市).

粟津 浩一他，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，平成 25 年度 産総研・エネルギーシンポジウム，2013/8/2，機械振興会館ホール（東京都港区）。

国立研究開発法人産業技術総合研究所・人工知能研究センター・研究チーム付
研究者番号：80357368

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：微小構造物検出装置、微小構造物検出方法、及び微小構造物検出用ディスク

発明者：島 隆之，藤巻 真，王 曉民

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2016-17895

出願年月日：平成 28 年 2 月 2 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）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・電子光技術研究部門・研究部門付

研究者番号：60356392

(2) 研究分担者

村川 正宏（MURAKAWA, Masahiro）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・人工知能研究センター・研究チーム長

研究者番号：10358153

島 隆之（SHIMA, Takayuki）

国立研究開発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）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・電子光技術研究部門・研究グループ長

研究者番号：10392656

野里 博和（NOSATO, Hirokazu）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・人工知能研究センター・主任研究員

研究者番号：40435764

園田 与理子（SONODA, Yoriko）

国立研究開発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：70357333

坂無 英徳（SAKANASHI, Hidenori）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・人工知能研究センター・主任研究員

研究者番号：80357368

高橋 栄一（TAKAHASHI, Eiichi）