

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：32622  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2014～2019  
課題番号：26462957  
研究課題名(和文) 赤外分光法による口腔環境のその場化学分析の試み

研究課題名(英文) Infrared absorptions as bacterial indicators

## 研究代表者

山本 雅人 (YAMAMOTO, Masato)

昭和大学・教養部・准教授

研究者番号：50277844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：11種類の細菌、アシネトバクター バウマンニ、緑膿菌、大腸菌、黄色ブドウ球菌、エンテロバクター アエロゲネス、エンテロバクター クロアカエ、肺炎桿菌、肺炎球菌、ボルフィロモナス ジンジバリス、プレボテラ インターメディア、フソバクテリウム ヌクレアタムについて、それらの周辺で臭う空気の赤外スペクトルを高感度・高分解能で測定した。それぞれに特有な揮発性代謝物による赤外吸収が観測され、強度を赤外吸収が現れる波数領域ごとに分類・整理した。その結果、通常の空気、ヒトの呼気、菌11種類周辺の空気、これらを判別するためのフローチャートをつくることができた。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究は、揮発性代謝産物の赤外線吸収を使用して、緑膿菌、アシネトバクターバウマンニ、その他の細菌、および通常の室内空気を区別できることを示す。また、異なる特性の揮発性分子によって引き起こされる追加の赤外線吸収を観察することにより、識別率を改善できることも示している。この手法は最も安定した構造の単一分子に限定されず、赤外吸収ピークによって示されるすべての浮遊物質からの情報を含む点で新しい。さらに標的バイオマーカーの分子種を確定する必要がない。医療現場では簡便で非接触の監視ツールが求められており、この研究は院内感染に関連する一部の細菌の検出で、赤外レーザーの応用可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：This study shows that the infrared absorptions of volatile metabolites can be used to distinguish between the air around *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, other bacteria, and normal room air. Gas samples were collected from the air surrounding single and mixed laboratory cultures. The infrared spectra of a variety of gasses are measured with a high resolution of 0.5 cm<sup>-1</sup> to obtain information about the wavenumber position of the key bands. The significance of this work is that the specific wavenumber positions of the key bands that allow the application of infrared lasers are provided. As a result, it is considered that *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* can be monitored more sensitively and easily. With further research and development, this simple approach could be used in future applications to identify infections in healthcare settings.

研究分野：赤外分光法

キーワード：赤外分光法 揮発性代謝物 緑膿菌 アシネトバクターバウマンニ 赤外吸収 高分解能測定 非接触判別 赤外レーザー

## 1. 研究開始当初の背景

臨床医学での非接触・非侵襲診断やヘルスケア目的の健康状態モニターのために、揮発性バイオマーカーが注目されてきている。こうしたバイオマーカーは、気体中に見出される特徴的な分子として、主にガスクロマトグラフ質量分析器 (GCMS) を用いて探索されてきた。これらのうち、CO、CO<sub>2</sub>、NO、N<sub>2</sub>O など代表的な小分子については、赤外レーザー分光法による高感度測定が可能になってきており、臨床への応用も提案されている。

赤外レーザーの適用のためには、特定の波数 (波長の逆数) に発振波数をチューニングすることが求められる。その波数は、特定の分子が与える赤外吸収ピーク群の中で、強い強度をもつ一つのピークの位置である。これまで、上記分子 (CO、CO<sub>2</sub>、NO、N<sub>2</sub>O) に加え、エタン、エタノールについて、特定のバイオマーカー分子として、超高感度濃度変化モニターが実現している。このように、赤外レーザーを適用して、目的のバイオマーカー分子の濃度 (分圧) 変化を超高感度にモニターする例は、既知の代表的な一部のバイオマーカー分子にとどまっている。

FTIR による赤外スペクトル測定から菌を分類した報告は近年、複数ある。これらの報告では、培養した菌を処理した後、直接赤外スペクトルを測定している。例えば、赤外透過基板 (KBr か ZnSe) に付着させるか含ませ、それを透過法 (transmission method) で測定している。あるいは、全反射測定法 (Attenuated Total Reflection method、ATR 法) か、拡散反射法 (diffuse reflection method) などの反射法で直接測定している。いずれも、赤外スペクトルを一般的な分解能 4 cm<sup>-1</sup> 程度で得ている。(本研究では、菌から大気中に排出される VOCs (or MVs) の赤外スペクトルをより高分解能な 0.5 cm<sup>-1</sup> で測定した。その結果、非接触での菌種判別を可能にする赤外線吸収 (キーバンド) の波数位置が ±0.25 cm<sup>-1</sup> の精度でわかった。)

菌が大気中に排出する VOCs については、菌種ごとに調べられ、GCMS によって特徴的な分子種が特定されてきている。緑膿菌については、methyl thiocyanate と benzonitrile が、緑膿菌が大気中に排出する特徴的 VOCs として報告されている。これらの分子は強い赤外吸収ピークを 2000 - 2300 cm<sup>-1</sup> の領域に与え、本報告が示すキーバンドの原因物質である可能性がある。しかし、特定された分子構造の基準振動解析から理論的に予測される赤外吸収ピークの位置が、そのまま自動的に目的に沿うキーバンドになるとは限らない。その理由は、他の菌由来の VOCs や気体試料中に含まれる多種多様な目的外物質など、目的の菌以外に由来する物質が与える赤外吸収バンドが、目的のキーバンドと重なる可能性があるためである。その場合、ピーク強度が精度よく取得できない。そのため、多種多様な多くの気体試料の蓄積から、結果として、キーバンドを見出すことになる。

仮に目的の気体試料を特徴づける分子が、イオン化を伴う GCMS で特定できたとしても、実際の混合気体試料中に存在している状態で、予想される波数位置でキーバンドを与えるとは限らない。分子単独の最安定構造から理論的な赤外吸収の波数位置は求まるが、多種多様な物質が混じり合う混合気体中では、キー分子が単独とは異なる集合状態をとる可能性がある。水分子や二酸化炭素分子と会合する場合、複数の同種分子でクラスターを形成する場合、あるいは粒子状物質の影響を受ける場合 (粒子状物質を形成したり、粒子状物質に吸着したり、粒子状物質に取り込まれる場合) である。その場合、キー分子が理論予測と同じ位置・強度・幅でキーバンドを与えるとは限らない。(本研究では、中赤外～近赤外領域に現れる数千ものピーク群から、目的の指標になるキーバンドを探索的に見出している。よっ

て、原因となるキー物質を単独の最安定構造の分子のみには限定していない。混合気体試料中に含まれ、赤外吸収を与える、あらゆる浮遊物質を対象にしている点で、これまでの研究とは異なっている。)

## 2. 研究の目的

本研究では、緑膿菌とアシネトバクター バウマニの超高感度モニター（嗅ぎ分け判別）を目的の一つとして、それを可能にするキーバンド、あるいはその組み合わせを報告する。これらの菌は、典型的な薬剤耐性菌で、院内感染で問題になっている。非接触で簡易的に検出、モニターすることが医療現場の切実なニーズである。

我々は、多種多様な気体試料の赤外スペクトルを高分解能で測定し、蓄積してきた。観測された膨大な数の赤外吸収ピーク群を網羅的に探索・解析して、揮発性バイオマーカーの代わりになる目的の指標となり得る赤外吸収ピーク（キーバンド）が見出されるか調べてきた。その結果、多様な気体試料の高分解能・高感度の赤外スペクトルの蓄積から、緑膿菌とアシネトバクター バウマニ周辺の気体試料に特徴的なキーバンドを見出し、分子種の特定なしで、他の気体試料と判別する目的が達成できた。

## 3. 研究の方法

### 気体試料の準備

培養した病原菌周辺の空気を間接採取法で採取した。あわせて、通常の室内空気も採取した。これらの気体試料赤外分光光度計(FTIR)で測定し、赤外吸収スペクトル（室内の空気は146個、培地周辺の空気は16個）を蓄積した。菌については標準菌株と病院で得られた薬剤耐性株を含む8種類を培養し、赤外吸収スペクトル203個を測定し、そのうち、緑膿菌由来のVMsを含む気体試料の赤外吸収スペクトルは71個、アシネトバクターバウマニ由来のVMsを含む気体試料を測定した赤外吸収スペクトルは53個である。

### 赤外吸収スペクトルの測定と解析

気体試料は光路長10mのガスセル内に導入し、大気圧のままBruker社製FTIR、VERTEX 70を用いて透過法で測定した。その際、分解能 $0.5\text{ cm}^{-1}$ 、積算時間10分とした。 $500 - 7500\text{ cm}^{-1}$ の領域に現れる赤外吸収ピークについて、高さ強度(吸光度)を読み取った。通常の空気と菌種よる違いも与える赤外吸収ピークを抽出し、そのピーク位置が現れる波数を特定した。あわせて、そのピーク位置周辺でピーク強度を読み取る際の基準となるベース位置も見出した。

## 4. 研究成果

### 緑膿菌

赤外吸収スペクトル中で緑膿菌に特徴的な領域が見出された。縦軸は吸光度で、吸収ピークは上向きになる。緑膿菌周辺から得られた気体試料で強く現れる赤外吸収バンドが $2213.2\text{ cm}^{-1}$ に現れている。ここの強度を、ベースポイントを $2213.7\text{ cm}^{-1}$ に定めて、吸光度の差として読み取った。このように、結果として、緑膿菌周辺の気体が、他の気体試料か

ら区別されるような、吸光度の差を与える追加の波数位置として、 $778.4\text{ cm}^{-1}$  (ピーク位置、固定波数 P) と  $778.6\text{ cm}^{-1}$  (ベース位置、固定波数 B) のセットも見出した。

これら 2 種類の吸光度差 (P at  $778.4$  - B at  $778.6$ 、P at  $2213.2$  - B at  $2213.7$ ) をそれぞれ、横軸(x 軸)と縦軸(y 軸)にプロットし、色々な気体試料を測定した合計 365 個のスペクトルと比較すると、緑膿菌周辺の気体を含む試料によるものはすべて特定の範囲 ( $x > 0$  and  $y > 0.003$ ) に現れることで判別できた。緑膿菌の存在が、周辺空気を通過する特定の波数の赤外線強度変化から、明確にわかることが示された。

#### アシネトバクターバウマニ

同様に、横軸に  $1215.0\text{ cm}^{-1}$  (固定波数 P) と  $1214.5\text{ cm}^{-1}$  (固定波数 B) の吸光度の差 (P at  $1215.0$  - B at  $1214.5$ ) を、縦軸には、 $2982.3\text{ cm}^{-1}$  (固定波数 P) と  $2982.9\text{ cm}^{-1}$  (固定波数 B) での吸光度の差 (P at  $2982.3$  - B at  $2982.9$ ) をプロットすると、アシネトバクターバウマニ周辺の気体を含む試料はある領域 (二本の原点を通る一次関数  $y = 9.65x$  と  $y = 3.76x$ 、に挟まれる場所) に示される。その結果、他のほとんどの気体試料から区別できた。このように縦軸と横軸、それぞれに対応する VMs の混合比に特徴があることで、アシネトバクターバウマニが他の菌からほぼ判別できる。

横軸に  $4768.7\text{ cm}^{-1}$  (固定波数 P) と  $4768.1\text{ cm}^{-1}$  (固定波数 B)、それぞれでの吸光度の差 (P at  $4768.7$  - B at  $4768.1$ ) を、縦軸に、 $5353.8\text{ cm}^{-1}$  (固定波数 P) と  $5354.4\text{ cm}^{-1}$  (固定波数 B) での吸光度の差 (P at  $5353.8$  - B at  $5354.4$ ) をプロットした図もあわせると、識別しづらかった他の気体試料ともほぼ区別された。他の領域もあわせて指標とすることで、識別率を改善することができる。

#### 赤外レーザーへの応用と数値の取り扱い

今回の FTIR で得た結果を赤外レーザーに応用して、緑膿菌などの病原菌の検出・監視を行う場合は、まず (1) 固定波数 P と固定波数 B それぞれの波数位置に発振波数をもつ独立した赤外レーザーを 2 個 1 セット以上用意し、それぞれ赤外光の線幅に応じて発振波数の微調整を行う。次に (2) 固定波数 P と固定波数 B それぞれのレーザー光が気体試料中を通過した後の強度を受光部から得る。それらの比 ( $I_{\text{at 固定波数 P}} / I_{\text{at 固定波数 B}}$ ) を透過率の比 ( $T_{\text{at 固定波数 P}} / T_{\text{at 固定波数 B}}$ ) に対応する値とする。この常用対数にマイナスをかけ、吸光度の差に対応する値 ( $-\log_{10}(I_{\text{at 固定波数 P}} / I_{\text{at 固定波数 B}})$ ) に変換する。最後に (3) 光路長に応じた処理を行い、本データと比較すればよい。

赤外レーザーの場合、特定の波数以外に強度をほぼ与えないので、固定波数 P と固定波数 B それぞれの波数位置において、独立した別の赤外線レーザーにより光強度を観測する。 $I_{\text{at 固定波数 P}} / I_{\text{at 固定波数 B}}$  は、固定波数 P と固定波数 B で赤外レーザーが気体試料を通過した後には与える光強度の比に対応する。

透過率 (transmittance,  $T$ ) は、特定の波数位置において検知器が出力する光強度 (intensity,  $I$ ) の比 ( $I / I_{\text{blank}}$ ) で、目的の試料がある場合の値 ( $I$ ) を無い場合 ( $I_{\text{blank}}$ ) の値で割って得られる。 ( $T = I / I_{\text{blank}}$ ) 異なる固定波数 P と固定波数 B における、透過率の比  $T_P / T_B$  は ( $I_{\text{at 固定波数 P}} / I_{\text{blank at 固定波数 P}}$ ) / ( $I_{\text{at 固定波数 B}} / I_{\text{blank at 固定波数 B}}$ ) であり、 $I_{\text{blank at 固定波数 P}} \doteq I_{\text{blank at 固定波数 B}}$  を仮定すれば、 $T_{\text{at 固定波数 P}} / T_{\text{at 固定波数 B}} \doteq I_{\text{at 固定波数 P}} / I_{\text{at 固定波数 B}}$  となる。(今回使用した FTIR の光源が与える赤外光強度は、波数変化に対して連続的に緩やかに変化する。このため、固定波数 P と固定波数 B の差程度、狭い  $1\text{ cm}^{-1}$  程度の範

囲内ではほぼ一定とみなした。つまり、 $I_{\text{blank at 固定波数 P}} \doteq I_{\text{blank at 固定波数 B}}$ を仮定している。）

本報告書では、赤外吸収スペクトルから判別式を得て、吸光度（absorbance,  $A$ ）の値を代入して用いる。吸光度と透過率は「吸光度 $=-\log(\text{透過率})$ 」の関係式で示される。よって、固定波数  $P$  と固定波数  $B$  での吸光度の差（ $A_{\text{at 固定波数 P}} - A_{\text{at 固定波数 B}}$ ）は $-\log(T_{\text{at 固定波数 P}} / T_{\text{at 固定波数 B}})$ となる。これは固定波数  $P$  と固定波数  $B$  のセットの赤外レーザーから得られる値 $-\log(I_{\text{at 固定波数 P}} / I_{\text{at 固定波数 B}})$ に相当する。

この吸光度の差は、キーとなる吸収ピークの強度で、対応する分子振動をもつ特定のVM分子の分圧（濃度）に比例する[21]。固定波数  $P$  と固定波数  $B$  のセットを複数セット組み合わせることで、複数のVMsの混合比を調べられる。

本報告は、光路長 10 m のガスセルで大気圧の気体試料を測定した結果に基づく。Lambert-Beer の法則により、吸光度は分圧（濃度）と光路長に比例する。光路長が 10 m でない場合、判別式の一部が変更される。光路長が  $L$  m [メートル] の場合、吸光度は  $L / 10$  倍で得られる。原点を通らない関数が判別式に含まれる場合、例えば  $y > 0.003$  の式の場合、式中の値(0.003)は光路長が  $L$  m [メートル] の場合、 $L / 10$  倍になる。大気圧は本報告の実験場所と同じ場合を仮定している。その他の原点を通る判別式は、縦軸・横軸とも等倍されるので、光路長の影響を受けない。

赤外レーザーのメリットは、光路長を長くすることで高感度化が可能であり、オープンパスでの利用も可能なことである。多重反射させることで、空間の大きさも制御できる。将来、医療現場や品質管理の現場や環境監視の場で、目的に沿う空間・感度の条件で利用されることが期待できる。本研究は、その第一歩として、赤外レーザーの発振波数の情報を提供している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本雅人ら
2. 発表標題 臭いの可視化の試み ~ ヒトの健康と関わる菌について種類による臭いの違いを赤外分光法で明らかにする ~
3. 学会等名 昭和大学学士会後援セミナー アーツ・アンド・サイエンス部会（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 山本雅人ら
2. 発表標題 においの可視化の試み2 ~ 複数種類の菌によるにおいの違いを赤外分光法で判別できるか ~
3. 学会等名 昭和大学学士会後援セミナー アーツ・アンド・サイエンス部会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田中義人、村山正和、宮澤昌行、山本雅人、寺崎雅子、小林一女
2. 発表標題 呼気の赤外吸収スペクトル測定と健康にかかわる情報抽出の試み
3. 学会等名 第120回 耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 「微生物のスクリーニング方法及びスクリーニング装置」	発明者 山本雅人、稲垣昌博、荒田悟	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特許第6581171号	取得年 2019年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

論文については、複数の原稿について投稿中か、あるいは投稿準備中である。

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
研究 分 担 者	井上 利志子  (INOUE TOSHIKO)  (90398701)	昭和大学・歯学部・研究補助員   (32622)	
研究 分 担 者	藤島 昭宏  (FUJISHIMA AKIHIRO)  (50209045)	昭和大学・歯学部・講師   (32622)	