

# 共鳴励起光応答を用いた微生物検知技術に関する基礎検討

朝日 一平, 杉本 幸代, 市川 祐嗣, 荻田 将一, 山下 望  
株式会社四国総合研究所 (〒761-0192 香川県高松市屋島西町 2109 番地 8)

## Fundamental study of microorganism detection techniques using resonance excitation photoresponse

Ippei ASAH, Sachiyo SUGIMOTO, Yuji ICHIKAWA, Masakazu OGITA, Nozomi YAMASHITA  
Shikoku Research Institute Inc., 2109-8 Yashima-nishimachi, Takamatsu-shi, Kagawa-ken 761-0192

Abstract: We are currently conducting research and development aimed at establishing optical measurement techniques applicable to the detection of various hazardous substances, which can be used in the event of large-scale disasters such as CBRNE disasters. In order to establish a technology to deal with accidents, disasters, and infectious disease outbreaks caused by microorganisms, they are conducting a basic study on a technology to detect and identify microorganisms by observing fluorescence and resonance Raman scattering generated from materials by resonance excitation and analyzing the dependence of their spectra on the excitation wavelength. In this report, we describe the experimental methods and the results of the basic studies.

**Key Words:** Resonance Raman scattering, LIF, Bacteria, viruses, LIDAR

### 1. 序 論

我々は現在、CBRNE 災害などの大規模災害発生時に活用することができる、様々な有害物質検知に応用可能な光学的計測技術の確立を目的とした研究開発を進めている。その中で、微生物に起因する事故や災害、感染症流行時における対処技術の確立を目指し、共鳴励起によって物質から生じる共鳴ラマン散乱や蛍光を観測し、それらのスペクトルの励起波長依存性を解析することによって、微生物を検知・同定する技術について基礎検討を進めている。本報告では、実験方法や基礎検討の結果について述べる。

### 2. 基礎実験方法

共鳴ラマン効果は、対象物質の電子吸収帯に一致する波長の光で励起した際に、ラマン散乱のスペクトルパターンが変化し、散乱光強度が増強する現象である。

一般に、微生物はその大きさや構造上の違いによって、真核生物、原核生物、ウイルスに分類され、本報告では真核生物に属する真菌及び、原核生物に属する細菌をサンプルとして用いる。細菌の基本構造を Fig.1 に、実験装置構成を Fig.2 にそれぞれ示す。

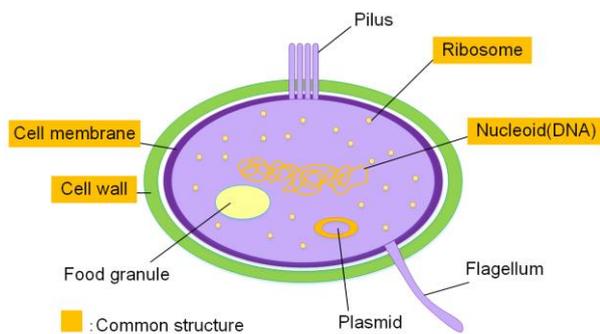


Fig.1 Basic structure of bacteria

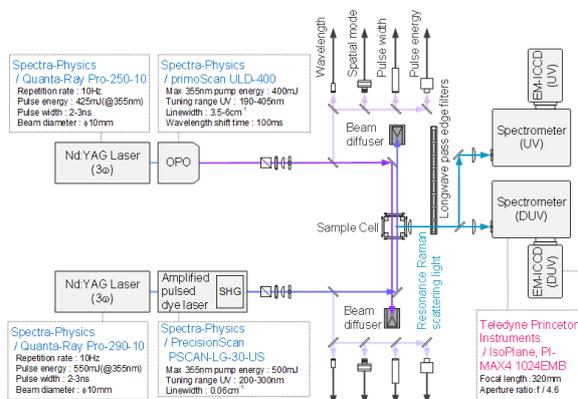


Fig.2 Configuration of experimental apparatus

Fig.1 に示すように、複雑な分子の集合体である微生物を光励起した場合、例えば DNA を構成するアデニン、グアニンなどの核酸塩基と呼ばれる分子や、トリプトファン、チロシンなどのアミノ酸に属する分子など、多数の分子の光応答が重畳したスペクトルパターンが得られる。基礎実験では、複数の無害な生物サンプルを用いて共鳴条件で励起した際の光応答を観測する。したがって Fig.2 に示すように実験装置構成は、多くの物質の共鳴波長域が存在する深紫外波長域において発振波長掃引が可能な波長可変レーザー装置と、深紫外～紫外波長域において感度の高い分光検出器によって構成される。

### 3. 実験結果

Fig.3 に枯草菌を波長 210 nm で励起した場合に得られる光応答例を示す。Fig.3(a)の実線で示した事例のように、枯草菌を構成する各種分子から発生する蛍光と共鳴ラマン散乱が重畳した形でスペクトルデータが得られる。一般に、蛍光は発光強度が強い一方で、スペクトルに分子の個性的な特徴が反映されず、物質の同定に利用できる場合は限定的である。これに対し、共鳴ラマン散乱光は、個別の構成分子に由来する複数のピークを示し、同定に適した情報を得ることができる。ここでは、光応答スペクトルから、蛍光の寄与が強いベースラインを設定し、両者の差分をとる（ベースライン補正）ことで得られる、鮮明化した共鳴ラマンスペクトルデータ（Fig.3(b)）によって、微生物種固有のパターンを抽出した。Fig.4 は抽出した共鳴ラマンスペクトルの励起波長依存性を示す励起プロファイルについて、枯草菌（Fig.4(a)）と大腸菌（Fig.4(b)）のデータを比較したものであり、両者が一見して異なる応答を示していることがわかる。この結果は、共鳴ラマン励起プロファイルを取得することによって、微生物の同定ができる可能性を示唆するものである。

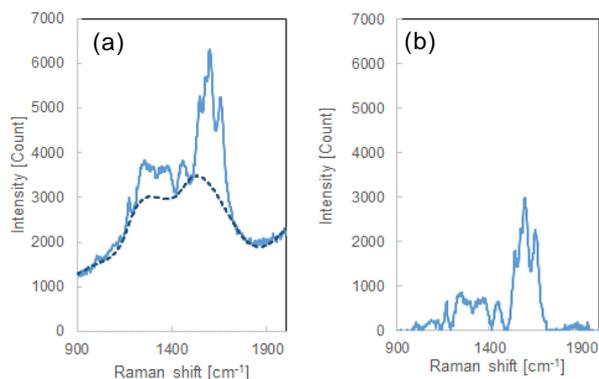


Fig.3 Examples of photoresponse in resonance excitation of *Bacillus subtilis* (Excitation wavelength : 210 nm)

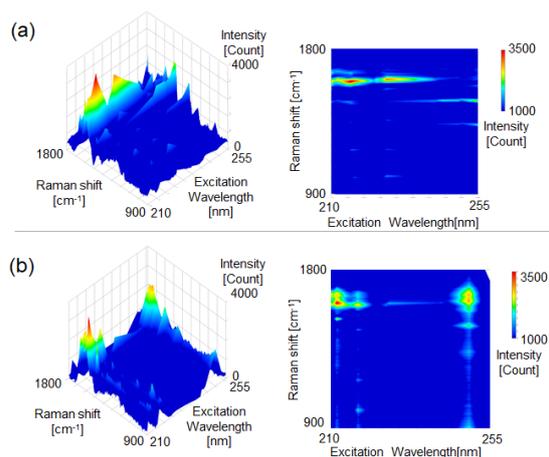


Fig.4 Examples Raman excitation profile of *bacillus subtilis* (a) and *escherichia coli* (b)

### 4. 結論

微生物を検知・同定する技術の確立を目指し、共鳴励起に伴う光応答を観測する手法に関する基礎実験を行った。その結果、計測によって得られるスペクトルデータを比較するのみでは、それぞれの微生物の応答について顕著な差異は認められないが、共鳴ラマンスペクトルを抽出し、励起プロファイルを比較することで、それぞれが一見して異なるプロファイルを示し、各微生物種を識別することが可能であることを強く示唆する結果が得られた。

本検討は、最終的に LIDAR 或いはフラッシュ LIDAR の形式の装置を完成させ、微生物のリモートセンシングや空間分布の可視化の実現を目指している。今後は、ウイルスへの適用可能性評価及び遠隔計測に向けた研究開発を進める予定である。

### 謝辞

本研究は、防衛装備庁が実施する安全保障技術研究推進制度 JPJ004596 の支援を受けたものである。