

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：32419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06530

研究課題名(和文)鉄鋼材料表面に形成されたバイオフィルムの鉱物化に関する研究

研究課題名(英文)Study for biomineralization of biofilm formed on carbon steel

研究代表者

生貝 初 (Ikegai, Hajime)

人間総合科学大学・人間科学部・教授(移行)

研究者番号：60184389

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)：本研究は、炭素鋼表面に形成された緑膿菌のバイオフィルム(BF)中の藍鉄鉱の沈殿、すなわち生体鉱物化の機構を明らかにするために行われた。緑膿菌のBFによって炭素鋼表面に作られた酸素濃淡電池は炭素鋼表面から鉄イオンの溶出を引き起こす(微生物腐食、MIC)。その結果、藍鉄鉱がこの鉄イオンと培地中のリン酸イオンから形成される。BF内に蓄積された鉄の濃度は炭素鋼を100%とすると約13%だった。放射光CTによって凹凸構造のBFの凹んだ部分に沿ってMICと思われる数多くの線状痕が観察された。このMICはこれまで説明されてきた酸素濃淡電池によって引き起こされるMICと形成機構が異なっているように思われた。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify the mechanism of biomineralization, that is, precipitation of vivianite also known as ferrous phosphate in biofilm (BF) of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 formed on a carbon steel surface. *P. aeruginosa* BF created oxygen concentration cells, which ferrous ions eluted from the carbon steel surface (microbiologically influenced corrosion, MIC). Consequently, it appeared that vivianite was formed from ferrous ions and phosphate ions contained in culture medium. Iron concentration accumulated in BF was approximately 13% in comparison with a carbon steel (100%). Analysis of synchrotron radiation computed tomography images showed a number of concave traces, which seemed to indicate MIC, along concave area of BF with bumpy construction. It appears that MIC observed in the present study is different from mechanism of MIC caused by a commonly accepted oxygen concentration cell model.

研究分野：微生物学

キーワード：生体鉱物化 バイオフィルム 炭素鋼 緑膿菌 微生物腐食 藍鉄鉱

1. 研究開始当初の背景

身のまわりや人の体内で増殖し、環境細菌として土壌や河川、湖沼、海洋にも広く生息する緑膿菌が、一般構造用圧延鋼材である炭素鋼 SS400 の表面にバイオフィルムを形成すると、微生物腐食 (Microbiologically Influenced Corrosion, MIC) が発生することを我々は明らかにしてきた。最近、SS400 の表面に緑膿菌のバイオフィルムが形成された後、MIC が発生し少しずつ進行すると、バイオフィルムの中でリン酸鉄の一種である藍鉄鉱が多数生成され、時間の経過とともに目に見えるぐらいの大きさまで結晶が成長することがわかった。このような現象をバイオミネラリゼーション (生体鉱物化) といい、無機物質を特定の形状に固め、骨や歯、真珠、貝殻のような機能性構造物を作るものと、細菌の細胞内や表層で酵素などの生体高分子の力を借りて無機物質を作るものがある。骨や歯の生成などマクロな生体鉱物化は古くから研究されているが、我々の身近にいる緑膿菌のバイオフィルムを介した生体鉱物化の先行研究はこれまでほとんどなく、さまざまな場所で使用されている鉄鋼材料と緑膿菌の相互作用が見過ごされているように思われる。

2. 研究の目的

本研究は、炭素鋼 SS400 表面で形成された緑膿菌のバイオフィルムの中で発生する生体鉱物化がどのように起きるのか調べ、バイオフィルムの形成から MIC、さらに生体鉱物化へ至るプロセスを明らかにすることを目的に行われた。この研究を通して、鉄鋼材料として一般に広く使用されている炭素鋼に対する環境微生物による腐食を抑制する技術開発や建物内の緑膿菌の増殖抑制や排除につながる知見が得られる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) 供試菌

Pseudomonas aeruginosa PA01 株 (緑膿菌)、*Pseudoalteromonas carrageenovora* NBRC 12985 株、*Alivibrio fischeri* NBRC101058 株、*Brevundimonas diminuta* NBRC3140 株、*B. diminuta* NBRC13181 株、*B. diminuta* NBRC14213 株、*B. diminuta* NBRC12697 株、*Staphylococcus aureus* 209P 株 (黄色ブドウ球菌)、*Escherichia coli* K12G6 株 (大腸菌)、*Serratia marcescens* CDC4444-60 株 (セラチア菌)、*Enterococcus faecalis* ATCC51299 株 (腸球菌) を用いた。

(2) 金属試験片の作製

表面を鏡面加工した炭素鋼 SS400 やマグネシウム等の金属を円形 (サイズ: 厚さ 0.5xφ 10mm) に加工し試験片を作製した。また SPring-8 の放射光を用いたバイオフィルム観察用試験片は、鏡面加工した炭素鋼 SS400 を針状 (縦 x 横 x 長さ、0.5mmx 0.6mmx10mm) に切り出し作製した。

(3) バイオフィルムの形成

普通ブイヨン (NB) を用いて、18 時間、35°C で前培養した緑膿菌、黄色ブドウ球菌、大腸菌、セラチア菌、腸球菌をそれぞれ、約 10³ 個/ml になるように増殖培地 (NB、緑膿菌のみ NB と M9 最少培地 (以下 M9)) に接種・調製した菌液を U 底 96 穴マイクロプレート (ポリスチレン製) ウェル中に 100 μl、平底 24 穴マイクロプレート (ポリスチレン製) ウェル中に 2ml 分注するか、あるいは中試験管に 3ml 分注した。円形試験片は 24 穴マイクロプレートの菌液に浸漬後、指示された時間、35°C で好氣的に静置培養した。針状試験片は 3ml の M9 に浸漬した。顕微鏡観察や放射光によるコンピュータ断層 (放射光 CT) 撮影に用いる針状試験片表面の BF は、試験片を超純水で軽く洗浄後、超臨界二酸化炭素あるいはエタノール脱水後 2-メチル-2-プロパノールに浸漬し減圧下で緩やかに乾燥させた。

(4) バイオフィルムの定量評価

バイオフィルムが形成された U 底 96 穴マイクロプレートウェル内壁あるいは試験片表面を超純水で 3 回洗浄し、0.1% クリスタルバイオレット (CV) 液を加えた。非特異的にウェルや円形の試験片に結合している CV を超純水で洗浄除去し、99% エタノールでバイオフィルムから CV を抽出した。マイクロプレートリーダーで測定したエタノール抽出液の吸収 (570nm) をバイオフィルムの形成量として評価した。

(5) 放射光を用いた試験片の観察

針状の SS400 表面の緑膿菌の BF を緩やかに乾燥させた後、SPring-8 のビームライン (BL20XU) の回転ステージに SS400 試験片を設置し放射光 CT 像を撮影した。約 2,000 枚の写真をもとに針状 SS400 試験片を 3D に再構成した。なお 3D 可視化された試験片の赤と黄土色は実際の試験片の色ではなく任意に色付けしたものである。

4. 研究成果

(1) 集束イオン/電子ビーム加工観察装置 (FIB/SEM) によるバイオフィルムの断面 (X-Z 軸) の解析

炭素鋼 SS400 の表面に形成された緑膿菌のバイオフィルムを FIB/SEM を用いて観察した。はじめにバイオフィルムが形成された SS400 の表面構造を観察するために、収束ガリウムイオンビームを照射しバイオフィルムの断面を露出させた (図 1A、B、C)。走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて、バイオフィルムの表面や表層に近い内部 (図 1C の酸素や炭素、リンの領域) に緑膿菌と思われる桿状の構造物が確認できた (図 1B)。しかしながら、浸漬 9 日と 30 日経過した炭素鋼試験片の表面は無機的な結晶状の物質に多数被覆されていたが緑膿菌は観察できなかった。次にガリウムイオンビームで削り取ったバイオフィルム断面 (図 2D) の元素分析を行った。バイオフィルムの Z 軸方向の分析位置を Spot1

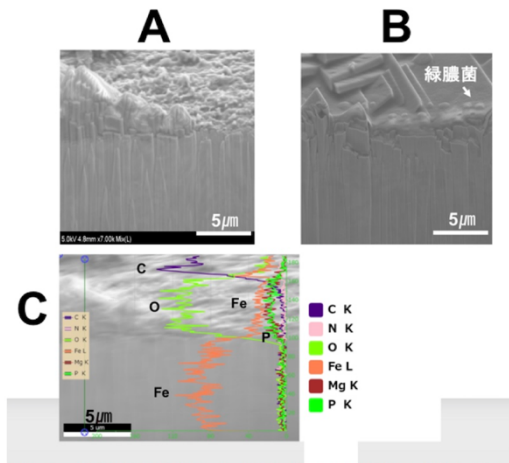


図 1. 培養 2 日目における炭素鋼表面のガリウムイオンビーム照射によって削られた断面の分析 A、SEM 像 白いバーは 5 μm ; B、A と別の領域の断面構造、緑膿菌と藍鉄鉱の結晶が観察された。白いバーは 5 μm ; 図 1C は図 1A と同じ部分を元素分析した。

から Spot12 まで分割し、各点で元素分析を行った (図 2E、F)。Spot1 はバイオフィルムの最表層である。ここでは M9 に含まれるグルコース由来と考えられる炭素が検出された。Spot2 から 10 までバイオフィルムが生体鉱物化した部分である。直下の堆積物から最下層 (基部) の炭素鋼まで、鉄やリン、酸素が検出され、生体鉱物として検出された藍鉄鉱 ($\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) 由来の元素と考えられた。さらに XRD で検出されなかったマグネシウムがこの生体鉱物化した物質に含まれていることがわかった。おそらく鉄の一部が培地成分のマグネシウムに置換されていると考えられる。

(2) バイオフィルムの中に含まれる鉄の含量

SPring-8 で測定したバイオフィルムの X 線吸収係数を求めてバイオフィルムに含まれる鉄の濃度を計算した。通常、37.7KeV の

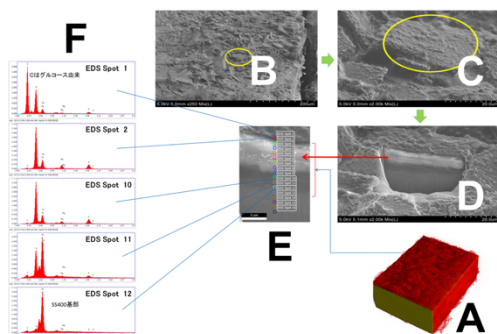


図 2. 集束イオン/電子ビーム加工観察装置 (FIB/SEM) によるバイオフィルムの断面 (X-Z 軸) の解析

培養 30 日目 A、緑膿菌培養液に 30 日間浸漬した SS400 を放射光 CT によって 3D 可視化した画像。赤は鉄が含まれるバイオフィルム。B、C、A はガリウムイオンビームで削り取った部分の SEM 像である。最終的に D で示した断面を上 (表層) から下 (SS400 表面) に 12 点設定し元素分析を行った。

エネルギーをもつ X 線を鉄に照射すると、鉄の線吸収係数は 36.7908cm^{-1} になる。一方、SPring-8 の放射光を照射したときは、物質の線吸収係数は小さくなる (0.88 倍)。そこでこれを補正すると、SPring-8 の放射光照射時の鉄の CT 値は 32.4581 Hounsfield Unit (HU) となる。SS400 の表面に形成された鉄を含むバイオフィルムの CT を測定すると 4.05HU だったので、このバイオフィルムの中に含まれる鉄は 12.5% であることがわかった。

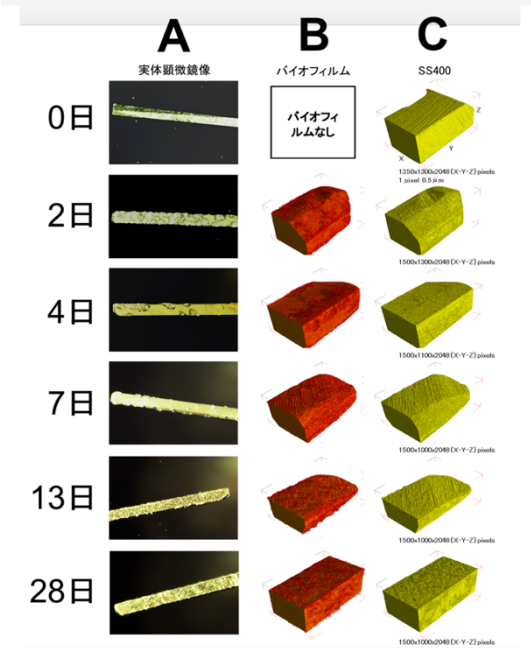


図 3. 緑膿菌の培養液に浸漬した炭素鋼 SS400 試験片の放射光 CT を用いた 3D 可視化 A、実体顕微鏡で観察した針状試験片像 ; B、バイオフィルム内で生じた藍鉄鉱 (赤色) が表面に形成された SS400 ; C、表面をおおっていた藍鉄鉱を取り去った SS400 の最表面構造。0 日から 28 日の数字は SS400 の緑膿菌培養液中への浸漬日数を示す。

(3) バイオフィルム中の生体鉱物化の成長

緑膿菌の培養液に浸漬した SS400 試験片の表面に形成されたバイオフィルムは、浸漬 2 日目で厚さ $50\ \mu\text{m}$ 程度の凹凸状の構造をしている (1)。この中で鉄とリン酸塩が反応した藍鉄鉱がいつごろから形成されるのか、放射光 CT の解析によって経時的な変化を追跡し調べた (図 3)。その結果、浸漬後 2 日目で SS400 表層全体にリン酸鉄の形成が起きていることが確認できたが、浸漬日数 28 日まで顕著なバイオフィルムの成長は認められなかった (図 3B の赤)。一方、図 3C で示した炭素鋼表面の形態変化は、浸漬後 13 日目まで SS400 試料には認められなかった。浸漬後 28 日目の試験片試料の表面に鉄イオンが溶出して生じたと思われる線状の凹構造が無数に形成されていることがわかった (図 3C、28 日)。またバイオフィルムが形成された SS400 試験片を乾燥させ実体顕微鏡で観察すると、典型的なバイオフィルムの凹凸構造ではなくリン酸塩が析出し沈着したような表

面構造になっていることがわかった(図3A)。実体顕微鏡による観察では、SS400表面の腐食の度合いが大きいように思われた。しかしながら実際には図3Bの赤色のリン酸鉄の沈殿層が薄く、浸漬28日までバイオフィーム直下のSS400表面の形態変化は僅かでMICはゆっくり進行しているように思われた(図3C)。バイオフィームをアルコール脱水する過程でバイオフィーム内に残存していたリン酸塩の濃縮が起きて析出物が生じ、本来の状態とは異なる表面形態に変化した可能性も考えられた。

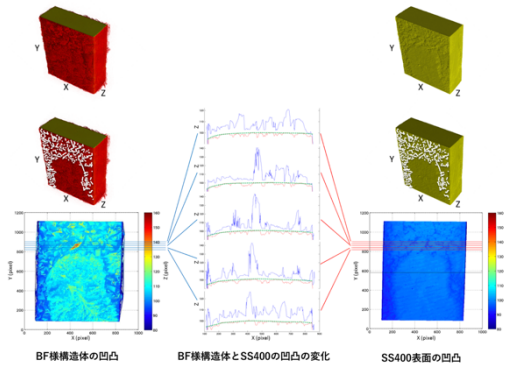


図4. 緑膿菌の培養液に30日間浸漬した炭素鋼SS400試験片表面のZ軸方向の変化

(4) SS400の表面に発生した線状のMICとバイオフィームの構造学的相関

放射光CTで3D可視化した画像をもとにして、バイオフィームの凹凸構造とSS400の腐食構造の関係を形態学的に調べた。図4は緑膿菌の培養液に30日間浸漬したSS400試験片表面のZ軸方向の変化を示した。試験片のY軸820、840、860、880pixelsのところそれぞれX軸方向にスライスして断面図(X-Z)を作成し、Z軸方向の変化を数値化して凹凸の状態を解析した。青線と赤線はバイオフィームとSS400表面の凹凸の変化をそれぞれ示した。この解析によって、MICが原因で削られたと考えられるSS400の凹領域は、バイオフィームの凹領域の下にあることが明らかになった(図5)。

次に図4、5の試験片と異なるSS400試験片(緑膿菌の培養液に30日間浸漬した試験片)を用いて図6Aの赤枠で囲んだ領域(X軸:180~600pixels、Y軸:40~200pixels)で形成されたバイオフィームの凸領域(青)と

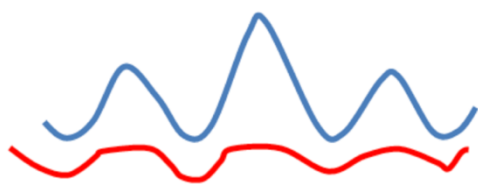


図5. 緑膿菌のバイオフィームが形成された炭素鋼SS400表面の断面(X-Z)の変化
青線、バイオフィーム；赤線、SS400

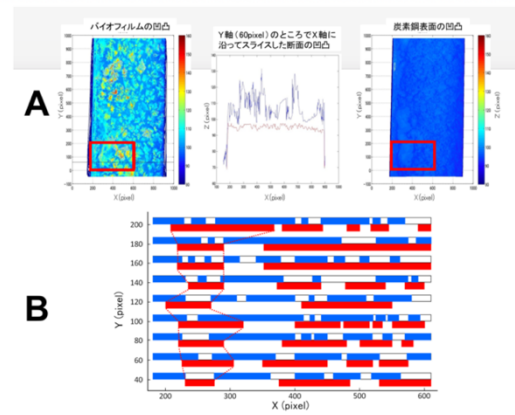


図6. 緑膿菌培養液に30日間浸漬した炭素鋼SS400表面に形成されたバイオフィームとMICの凹凸の軌跡

A、試験片断面の凹凸；B、X軸に沿ったバイオフィームとMICの長さ

SS400の凹領域(赤)を形成するX軸方向の長さをそれぞれ測定した。測定したデータを図6Bのように描画し、バイオフィームがどのような形状(凹または凸)になると、SS400のMICが起きやすいか調べた。その結果、MICはバイオフィームの直下で生じていた。興味深いことにMICはバイオフィームの凸領域の縁の下まで潜りこんでいることがわかった。これらの結果をもとにして、バイオフィームの形成によって引き起こされる炭素鋼SS400のMIC機構を推測した。これまでバイオフィームによって引き起こされたMICは、酸素が透過しにくい部分であるバイオフィームの最も厚い中心部(凸領域)から起きると考えられていた(図7A、文献2)。しかしながら、本研究によってバイオフィームの最も薄い部分(凹領域)の直下でMICが起きることが示唆された(図7B)。

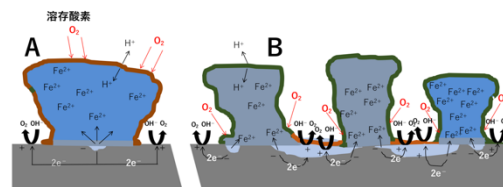


図7. バイオフィームの形成によって発生する炭素鋼SS400のMIC

(5) 生体鉱物化を引き起こす細菌

緑膿菌のバイオフィーム内部の生体鉱物化(藍鉄鉱形成)がヒト常在細菌(黄色ブドウ球菌、大腸菌、セラチア菌、腸球菌)で起きるかどうか調べた。試験片表面に存在するリンの量をSEM-EDXを用いて半定量的に測定し、生体鉱物化を検討した。黄色ブドウ球菌、大腸菌、腸球菌の培養液に浸漬したSS400試験片表面のリンの質量濃度はM9の中に浸漬した試験片とほぼ同じで0.6~1.1%であった。これに対し緑膿菌やセラチア菌の培養液に浸漬した試験片表面のリンの質量濃度は2.4~3.1%であった。今回、SS400を各種細菌の培養液に浸漬した条件(培地、温度、時間)は、これまで緑膿菌がSS400表面にバイオフィーム

イルムを形成し生体鋳物化が生じることが確認されている条件と同一である。セラチア菌培養液に浸漬したSS400表面に検出されたリンは藍鉄鋳由来と推測された。したがってセラチア菌は炭素鋼表面にリン酸鉄を沈殿(生体鋳物化)させる能力を持っている可能性が高いと考えられた。

また、マグネシウム要求性の環境細菌 *B. diminuta* (NBRC3140, NBRC13181, NBRC14213, NBRC12697) のバイオフィーム形成能について検討した。NBRC12697を除いた3菌種は硫酸鉄が存在するとバイオフィームの形成が高まることがわかった。次に、これら *B. diminuta* がSS400試験片表面にバイオフィームを形成するかどうか調べたところ、NBRC14213とNBRC12697がSS400の表面にバイオフィームを形成することがわかった。しかしながら、*B. diminuta* が生体鋳物化を引き起こすかどうかは確認できなかった。

(6) まとめ

炭素鋼SS400を緑膿菌培養液に30日間浸漬すると、SS400表面から鉄イオンが溶出し深さ2.5μm程度のMICが凹凸構造のバイオフィームの凹部分に沿って発生することがわかった。溶出した鉄イオンはリン酸イオンと反応して水に溶けにくいリン酸第一鉄(Fe₃(PO₄)₂)が生じると考えられた。すでに1990年代後半から、軟鋼(mild steel)を *Pseudomonas putida* や *Rhodococcus* 属などの環境細菌の培養液に浸漬すると、我々の研究と同じように藍鉄鋳が生じることが報告されている(3)。さらに軟鋼に形成された藍鉄鋳の層がMICやバイオフィームの形成を阻害するという結果も報告されている(3)。しかしながら我々はこれらと一致する結果をこれまでの研究から得ていない。むしろ炭素鋼SS400の表面にリン酸鉄の化成処理をすると緑膿菌のバイオフィームの形成が高まる結果が得られている。何故このような正反対の結果が得られたのか、本研究では明らかにできなかった。今後の研究課題にしたい。

<引用文献>

- ①生貝 初、緑膿菌バイオフィームを用いた微生物腐食モデル、Bacterial Adherence & Biofilm, 27巻、5-9、2013
- ② Liu, H., D. Xu, A. Q. Dao, G. Zhang, Y. Lv, and H. Liu, Study of corrosion behavior and mechanism of carbon steel in the presence of *Chlorella vulgaris*. Corrosion Science, 101: 84-93, 2015
- ③ Volkland, H-P., H. Harms, B. Muller, G. Repphun, O. Wanner, and A. J. B. Zehnder, Bacterial phosphating of mild (unalloyed) steel. App. Environ. Microbiol., 66: 4389-4395, 2000
- ④ Volkland, H-P., H. Harms, K. Knopf, O. Wanner, and A. J. B. Zehnder, Corrosion inhibition of mild steel by bacteria.

Biofouling, 15: 287-297, 2000

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6件)

① 生貝 初、小林 正和、平井 信充、戸田 裕之、諸星 知宏、池田 幸、上杉 健太朗、黒田 大介、兼松 秀行、鉄鋼材料表面に形成された緑膿菌のバイオフィームは微生物腐食と生体鋳物化を誘導する、Bacterial Adherence & Biofilm、査読有、29巻、2015年、91-94

② Kanematsu, H., H. Kudara, S. Kanesaki, T. Kogo, H. Ikegai, A. Ogawa, and N. Hirai, Application of a loop-type laboratory biofilm reactor to the evaluation and polymer such as urinary stents catheters, Materials, 査読有, Vol.9, 2016, 824-833

③ Kanematsu, H., D.M. Barry, H. Ikegai, M. Yoshitake, and Y. Mizunoe, Biofilm evaluation method outside body to inside -Problem presentations for the future-, Medical Reserch Archives, 査読有, Vol.4, 2017, 1-17

④ Kanematsu, H., M. Satoh, K. Shindo, D.M. Barry, N. Hirai, A. Ogawa, T. Kogo, Y. Utsumi, A. Yamaguchi, H. Ikegai, Y. Mizunoe, Biofilm formation behaviors on graphene by *E. coli* and *S. epidermidis*, ECS Transactions, 査読有, Vol.4, 2017, 1167-1175

DOI: 10.1149/08010.1167ecst

⑤ Kanematsu, H., S. Maeda, D.M. Barry, S. Umeki, K. Tohji, N. Hirai, A. Ogawa, T. Kogo, H. Ikegai, and Y. Mizunoe, Effects of elastic waves at several frequencies on biofilm formation in circulating laboratory biofilm reactors, Ceramic Transactions, 査読有, 2018, in print

⑥ Kanematsu, H., S. Kanesaki, H. Kudara, D.M. Barry, A. Ogawa, T. Kougo, D. Kuroda, N. Hirai, H. Ikegai, and Y. Mizunoe, Biofilm Formation on Titanium Alloy Surfaces in a Laboratory Biofilm Reactor, Ceramic Transactions, 査読有, 2018, in print

[学会発表] (計12件)

① 生貝 初、小林 正和、平井 信充、戸田 裕之、諸星 知宏、池田 幸、上杉 健太朗、黒田 大介、兼松 秀行、鉄鋼材料表面に形成された緑膿菌のバイオフィームは微生物腐食と生体鋳物化を誘導する、日本バイオフィーム学会第29回学術集会、2015年7月10日~11日、蒲郡

② 生貝 初、小林 正和、平井 信充、戸田 裕之、諸星 知宏、池田 幸、上杉 健太朗、黒田 大介、兼松 秀行、鉄鋼材料表

面に形成された緑膿菌バイオフィルムの生体鋳物化、日本防菌防黴学会第42回年次大会、2015年9月1日～2日、豊中

③ 生貝 初、平井 信充、小林 正和、戸田 裕之、黒田 大介、兼松 秀行、鉄鋼材料に微生物腐食を引き起こす緑膿菌バイオフィルムの生体鋳物化、日本鉄鋼協会第170回秋季講演大会、2015年9月16日～18日、福岡

④ 平井 信充、黒木 雅人、生貝 初、兼松 秀行、幸後 健、小川 亜希子、各種プラスチック基板上へのバイオフィルムの附着性評価、日本鉄鋼協会第172回秋季講演大会、2016年9月21日～23日、豊中

⑤ 生貝 初、小林 正和、平井 信充、戸田 裕之、上杉 健太郎、兼松 秀行、緑膿菌のバイオフィルムによって引き起こされた微生物腐食と生体鋳物化、日本防菌防黴学会第43回年次大会、2016年9月26日～27日、豊中

⑥ Nobumitsu Hirai, Soki Iida, Masayoshi Yoshioka, Yusuke Eguchi, Futoshi Iwata, Hajime Ikegai, and Hideyuki Kanematsu, Trial of in-situ observation on indigenous bacterium biofilm in aqueous solution by means of scanning ion conductive microscopy, International Symposium on Biomedical Engineering, Nov. 10, 2016, Tokyo Med. Dent. Univ., Tokyo

⑦ 平井 信充、飯田 壮葵、吉岡 正義、江口 由祐、岩田 太、生貝 初、兼松 秀行、走査型イオン伝導顕微鏡による常在菌バイオフィルム形態観察、平成28年度生体医歯工学共同研究拠点成果報告会、2017年3月24日、東京医科歯科大学、東京

⑧ 平井 信充、兼松 秀行、生貝 初、白澤 樹、江口 由祐、岩田 太、走査型イオン伝導顕微鏡を用いた常在菌バイオフィルム形態観察、日本鉄鋼協会第174回秋季講演大会、2017年9月6日～8日、札幌

⑨ 生貝 初、小林 正和、平井 信充、兼松 秀行、戸田 裕之、上杉 健太郎、バイオフィルムによって引き起こされた微生物腐食の機構、日本鉄鋼協会第174回秋季講演大会、2017年9月6日～8日、札幌

⑩ 堀内 智博、太田 知克、土屋 禎、生貝 初、バイオフィルムの形成評価に用いる試験菌の選定、日本防菌防黴学会第44回年次大会、2017年9月26日～27日、豊中

⑪ 生貝 初、バイオフィルム形成菌、日本防菌防黴学会第44回年次大会、2017年9月27日～27日、豊中

⑫ Kanematsu, H., T. Sato, T. Kamiyo, S. Honma, A. Oizumi, S. Umeki, A. Ogawa, N. Hirai, T. Kogo, D. Kuroda, H. Ikegai, and Y. Mizunoe, In biofilm formation behavior on polymer brush surfaces by *E. coli* and *S. pidermidis*, 2018 TMS Annual Meeting & Exhibition, The Minerals, Metals & Materials Society, 2018, Phoenix, Arizona,

USA

[図書] (計4件)

- ① Hajime Ikegai, Genomics approach, In: Kanematsu, H. and D.M. Barry (eds.), *Biofilm and Materials Science*, pp.53-60, Springer, 2015
- ② Hajime Ikegai, Metal ion sensor of pore-forming toxin for environmental evaluation, In: Kanematsu, H. and D.M. Barry (eds.), *Corrosion control and surface finishing*, pp.203-212, Springer, 2016
- ③ Kanematsu, H., K. Sano, H. Ikegai, D.M. Barry, M. Yoshitake, Y. Mizunoe, and T. Tanaka, Nano-composite polymer film for anti-biofouling materials surfaces. In: Barhoum, A., and M.A. Salam (eds.), *Fundamentals of Nanoparticles Classifications, Synthesis Methods, Properties and Characterization*, Elsevier, 2018, in print
- ④ Kanematsu, H., D.M. Barry, H. Ikegai, M. Yoshitake, and Y. Mizunoe, Nanofibers and biofilm in materials science, In: Salam, M.A., and A. Barhoum (eds.), *Handbook of Nanofibers*, Springer Nature, 2018, in print

6. 研究組織

(1) 研究代表者

生貝 初 (IKEGAI, Hajime)
 人間総合科学大学・人間科学部・ヘルスフードサイエンス学科・教授
 研究者番号：60184389

(2) 研究分担者

平井 信充 (HIRAI, Nobumitsu)
 鈴鹿工業高等専門学校・生物応用化学科・准教授
 研究者番号：50294020

(3) 連携研究者

兼松 秀行 (KANEMATSU, Hideyuki)
 鈴鹿工業高等専門学校・材料工学科・教授
 研究者番号：10185952