

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14697

研究課題名(和文)光誘導型細菌トラップ法の開発と機能性高分子膜創出

研究課題名(英文) Development of optical guiding bacteria trap method and creation of functional polymer film

研究代表者

床波 志保 (TOKONAMI, Shiho)

大阪府立大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60535491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ポリマー膜への細菌の取込みを光制御する「光誘導型細菌トラップ法」の原理を開拓し、悪性細菌の除菌法の開発による食品衛生への貢献や、有用細菌を高密度捕捉した機能性高分子膜の製造技術開発を目的として研究を遂行した。主な結果を以下に述べる。(1)平坦な光吸収性薄膜にレーザー照射により細菌を集積することで液中細菌数計測を数分程度で可能とし、悪性細菌を死滅できる条件も明らかにした。(2)ハニカム状のマイクロ細孔に細菌を高生存率(90%以上)で光誘導してトラップできる条件を解明し、電流発生菌に適用した場合に、従来法よりも3～4倍迅速に最高電流値が得られることを確認し、電気化学デバイスへの応用可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We tried to pioneer the principle of "Optical Guiding Bacteria Trap Method" for the optical control of bacterial uptake into polymer film. And, we conducted research to develop disinfection method of malignant bacteria, and to produce functional polymer films with densely trapped useful bacteria. The main results are described below: (1) By accumulating bacteria on a flat light absorbing thin film by laser irradiation, the number of bacteria in the liquid can be measured within several minutes, and the conditions for killing the malignant bacteria were also clarified. (2) By clarifying the conditions for the optical guiding of bacteria into honeycomb-shaped micropores with high survival rate (90% or more), we applied them to electrical current generating bacteria. Remarkably, we have clarified that the maximum current value can be obtained 3 to 4 times faster than conventional methods, and revealed the applicability to electrochemical devices.

研究分野：分析化学

キーワード：光トラップ 細菌 固定化 機能性高分子 環境

1. 研究開始当初の背景

21世紀における世界的な食糧問題の解決のため、工場野菜が注目を集めているが、植物工場内の生産物にダメージを与える悪性細菌の繁殖が課題となっており、その検出と除去を効率良く行うシステムが求められている。また、細菌には悪性のものでなくCO₂固定細菌やN₂O還元細菌など温室効果ガスや有害ガスを有用物質に変換できる有用細菌もあり、これら有用細菌を生きたまま高密度に固定化できれば、その機能をフル活用したバイオデバイスが構築できる可能性がある。いずれの細菌を対象とした場合でも細菌数をカウントする際には培養法がしばしば利用されるが、培養自体に数日間を要するという課題もあった。

一方、代表者の床波らは研究開始以前に、標的細菌の形状および表面分子構造を転写したポリマー膜を利用した迅速・高感度な細菌検出法を世界で初めて開発した実績があった[Anal. Chem., 85, 4925 (2013)]。そこで用いたピロールは電解重合する際に陰イオン物質を取り込むが[Anal. Chim. Acta, 641, 7 (2009).]、細菌分散液中で重合すると細菌が取り込まれた状態でポリピロール(PPy)膜が形成される。さらに、この膜を過酸化処理すると細菌は過酸化ポリピロール(OPPy)膜から吐き出され細菌の鋳型が膜上に形成されることも解明していた。さらに、分担者の飯田らとの共同研究で、レーザー照射により生じる熱対流とバブルを用いて、わずか数秒でサブmmの領域にナノ・マイクロスケールの微小物体を高密度集積できる「光アセンブリング」の初歩段階の知見も得ていた[JPC 118, 18799 (2014)]。

2. 研究の目的

本研究では、上記の背景を受け、液中の細菌を迅速にカウントできる計数法や、狙った悪性細菌を局所的に死滅する高効率除菌システムの開発、細菌を光アセンブリングにより高密度に「生きたまま」集積固定した機能性薄膜を作製する『光誘導型細菌トラップ法』の原理開拓を本研究の目的としていた。

特に、前述の高効率除菌システムを開発して食品衛生への貢献を目指すと同時に、有機物をエネルギーに変換できる有用細菌を生きたまま光誘導して高密度固定した有用細菌固定化膜を構築して環境問題解決に貢献することも目的とした。

以下が実施した具体的な研究項目である。
(A)光誘起対流による光誘導型細菌トラップ法の原理説明と細菌数計測への応用
(B)悪性細菌の高効率光集積および除去のための条件探索
(C)有用細菌の高密度固定化膜の作製と機能評価、配向の光制御のための条件探索

3. 研究の方法

代表者、分担者らが各々得意とするポリマー膜への細菌固定化のノウハウと、光アセンブリングのノウハウを融合した新規技術である「光誘導型細菌トラップ法」を構築し、細菌数計測、悪性細菌除去、有用細菌の高密度固定への応用を試みた。特に、熱流体力学の理論手法を駆使して、集光したレーザー光が誘起する熱対流の評価も行った。得られた原理・技術を電流発生菌などの有用細菌に応用し、乳酸を分解して高効率に電気エネルギーに変換する電流発生菌固定化電極の作製も試みた。

4. 研究成果

項目(A)の成果: 光吸収性の薄膜にレーザー照射して発生した対流と光誘起バブルにより基板上的狙った場所に細菌を高密度集積して固定化するための原理開拓を行った。特に、蛍光染色された細菌を光アセンブリングで集積するプロセスを観察するシステムを整備し、まずは平坦な金薄膜を表面に形成した基板上で生存率を評価するための方法の基礎を開拓した(図1)。また、光アセンブリングによる細菌集積化の最適条件探索のため、基板上的光吸収性の薄膜の成膜条件や経時変化についても調べた。結果として、膜厚や成膜後の日数によって光誘起バブルのサイズのバラつきが抑えられる条件を示した。この条件下で細菌と同体積のマイクロビーズを用いた予備実験で見積った集合率から基板上的液滴中に含まれる全細菌数を、ラベルフリーでわずか数分で見積ることができる迅速細菌計測法に応用できる可能性を解明した[Opt. Mater. Exp. 6, 1280 (2016)](図2)。従来、細菌数計測に用いられる培養法は数日の時間を要するのに対し、開発した「光誘導細菌計数法」の原理はわずか1分半とケタ違いに迅速かつ正確に細菌数を算出できるため食品・環境計測での利用可能性が大いに期待できる。さらに、導電率測定用電極間に導電率が既知のナノ粒子を集積化することにも成功し、自然堆積の数十分の一の短時間で電気計測できることを明らかにした(特願2017-95715)。これらの成果は、光誘導型細菌トラップと電気的手法を組み合わせたハイブリッド型の細菌誘導法に基づく細菌検出や機能性細菌固定化膜の作製法への基礎開拓につながる重要な成果である。

項目(B)の成果: 中央に窪みを持つ容器を光吸収性薄膜でコートした系に細菌の分散液を導入し、凹型界面を形成することで平坦な光吸収性基板の場合でも蒸発等の非平衡過程による光誘起対流の加速・制御ができることを解明し、高効率光発熱集合の原理を解明した(特願2017-037316)。この原理を利用して、光誘起バブル近傍に集積した細菌が占める面積と溶液全体に存在する

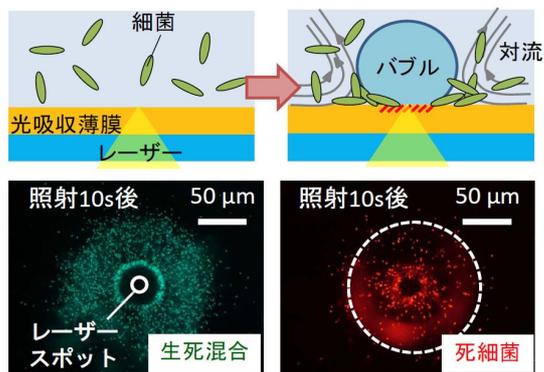


図1: 平坦基板を用いた光誘導型細菌トラップ法の成果

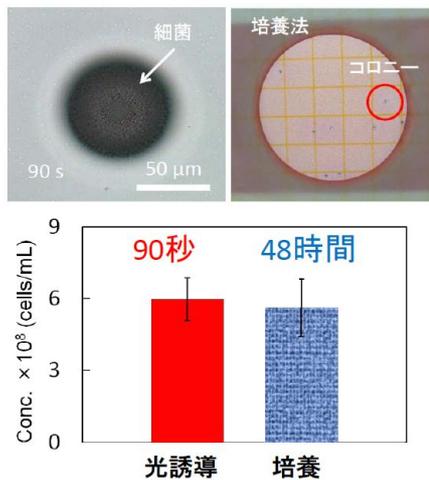


図2: 迅速細菌計数法の開発の成果

細菌数の相関を表す検量線を得ることに成功した。加えて、 10^3 cells/mLに迫る微量の悪性細菌の迅速な計数法の構築に成功し、光発熱効果による高効率除菌に関する指針も得た。

項目(C)の成果: ハニカム状のマイクロ細孔の隔壁部にレーザー照射することで細菌を光誘導により高密度に細孔内にトラップすることに成功し、蛍光イメージから生存率が90%以上となる可能性を明らかにした(図3)(特願2016-1160558)。さらに、光吸収性薄膜コートをした細孔基板にレーザー照射した時の光誘起対流の流体力学による初步段階の計算も行い、細菌が流線に沿って基板に平行に細孔中にトラップされることを説明できる可能性を示唆した。

特に、本研究の最重要課題である有用細菌固定化膜の応用においては、電流発生菌の生きたままトラップに成功し、文献値を凌ぐ短時間で高い出力が得られること、および細菌を固定した細孔基板自体が高性能アノード電極として機能することを確認した(特願2017-37649)。これは高効率なバイオ燃料電池への道を拓く重要な成果である。

以上、本研究で得られた一連の成果は環境エネルギー技術や食品衛生への応用など新たな農芸化学の地平を拓くと期待される。

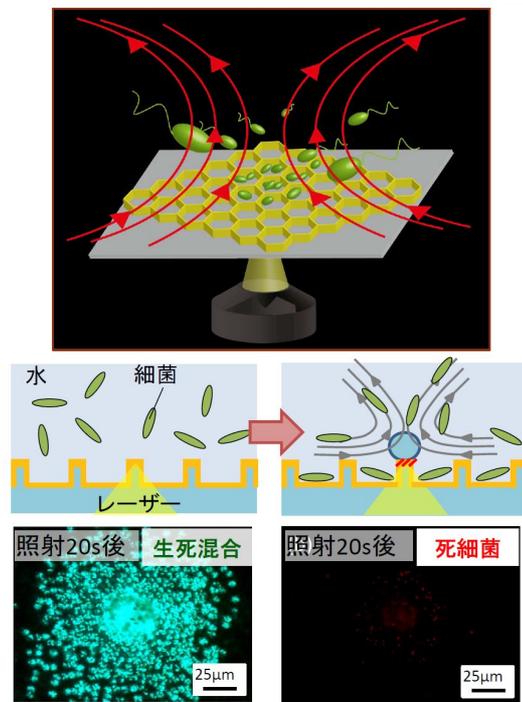


図3: ハニカム細孔による光誘導型細菌トラップの成果

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 9 件)

- [1] T. Yoshikawa, M. Tamura, S. Tokonami*, T. Iida*, "Optical Trap-Mediated High-Sensitivity Nanohole Array Biosensors with Random Nanospikes", J. Phys. Chem. Lett. 8, 370-374(2017). 査読有
DOI: 10.1021/acs.jpcllett.6b02262
- [2] T. Iida*, Y. Nishimura, M. Tamura, K. Nishida, S. Ito, S. Tokonami*, "Submillimetre Network Formation by Light-induced Hybridization of Zeptomole-level DNA", Scientific Reports, 6, 37768 (2016). 査読有
DOI: 10.1038/srep37768
- [3] 飯田琢也, 床波志保, 伊都将司, 光と揺らぎによるナノ物質の動態制御と生体模倣エンジニアリング / Dynamics Control of Nanomaterials by Light and Fluctuations and Biomimetic Engineering, 光学, 46(3), 104-112 (2017). 査読有
- [4] Y. Yamamoto, E. Shimizu, Y. Nishimura, T. Iida*, S. Tokonami*, "Development of a rapid bacterial counting method based on photothermal assembling", Optical Materials Express, 6(4), 1280-1285 (2016). 査読有
DOI: 10.1364/OME.6.001280
- [5] D. Q. Le, S. Tokonami, T. Nishino H. Shiigi, T. Nagaoka*, "Electrochemical Evaluation of Poly

- (3,4-ethylenedioxythiophene) Films Doped with Bacteria Based on Viability Analysis”, *Bioelectrochem.*, 105, 50-55 (2015). 査読有
DOI: 10.1016/j.bioelechem.2015.05.003
- [6] S. Tokonami, H. Zhang, Y. Cao, L. Lu, Z. Cheng, S. Zhang, “Catalytic Activities for Glucose Oxidation of Au/Pd Bimetallic Nanoparticles Prepared via Simultaneous NaBH₄ Reduction”, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 15(8), 5785-5793(9) (2015). 査読有
DOI: 10.1166/jnn.2015.10292
- [7] D. Q. Le, A. Morishita, S. Tokonami, T. Nishino, H. Shiigi, M. Miyake, T. Nagaoka, “Voltammetric Detection and Profiling of Isoprenoid Quinones Hydrophobically Transferred From Bacterial Cells”, *Anal. Chem.*, 2015, 87 (16), 8416-8423 (2015). 査読有
DOI: 10.1021/acs.analchem.5b01772
- [8] A. Kosuga*, Y. Yamamoto, M. Miyai, M. Matsuzawa, Y. Nishimura, S. Hidaka, K. Yamamoto, S. Tanaka, Y. Yamamoto, S. Tokonami, T. Iida*, “A High Performance Photothermal Film with Spherical Shell-type Metallic Nanocomposites for Solar”, *Nanoscale*, 7, 7580-7584 (2015). 査読有
DOI: 10.1039/C5NR00943J
- [9] 西村勇姿、西田啓亮、山本陽二郎、伊都將司、床波志保、飯田琢也、金属ナノ粒子の集団的光発熱効果による新規バイオ分析法の開拓、*ケミカルエンジニアリング*, 60(10), 52-58, 2015. 査読有
- [学会発表](計 48 件)
- [1] S. Kurita, Y. Nishimura, Y. Yamamoto, O. Karthaus, T. Iida, S. Tokonami, “Bacterial trapping Using Photothermal Convection”, 2016 4th TKU-OPU Joint Symposium, 2016/11/20-21, Taiwan(China) <受賞>
- [2] 床波志保, ナノ・マイクロ空間創成に基づく新規分析手法 / Novel Analytical Methods Based on the Creation of Nano- and Micro-Spaces, 第 10 回 NanoSquare ワークショップ / The 10th NanoSquare Workshop, 2016/11/4, 大阪府立大学 なかもずキャンパス サイエンスホール(大阪府堺市) **招待講演**
- [3] 床波志保, ポリマー材料を利用した細菌 / 細胞の迅速検出, はりま産学交流会 10 月創造例会, 2016/10/21, 姫路商工会議所(兵庫県姫路市) **招待講演**
- [4] S. Kurita, Y. Nishimura, Y. Yamamoto, O. Karthaus, T. Iida, S. Tokonami, “Densely Fixed Bacteria Using Photoinduced Convection”, OPU-KIST Joint Symposium on Next Generation Photochemistry and Photophysics: From Materials to Applications, 2016/9/25-28, Seoul, (South Korea)
- [5] Y. Yamamoto, Y. Nishimura, S. Tokonami, T. Iida*, N. Fukui, T. Tanaka, A. Osuka, H. Yorimitsu, “Laser-mediated Solvothermal Deposition of Diporphyrin by Photothermal Effect of Gold Thin Film”, OPU-KIST Joint Symposium on Next Generation Photochemistry and Photophysics: From Materials to Applications, 2016/9/25-28, Seoul, (South Korea)
- [6] T. Iida, Y. Yamamoto, E. Shimizu, Y. Nishimura, S. Tokonami, Photothermal assembling of bacteria for rapid counting, 42nd Micro and Nano Engineering(MNE2016), 2016/9/19-23, Vienna(Austria)
- [7] 床波志保, 椎木弘, 長岡勉, 中瀬生彦, 田村守, 飯田琢也, 分析空間創成に基づく迅速検出法の開発, 日本分析化学会第 65 年会, 2016/9/14-16, 北海道大学工学部(北海道札幌市) **招待講演**
- [8] 飯田琢也, 床波志保, ナノ物質中電子系の光誘起協力現象とフォトサーマル・フルイデイクス, 2016/9/13-16, 第 77 回応用物理学会周期学術講演会, 朱鷺メッセ(新潟県新潟市) **招待講演**
- [9] S. Kurita, Y. Nishimura, Y. Yamamoto, O. Karthaus, T. Iida, S. Tokonami, “Bacterial Fixation Using Photoinduced Convection”, RSC Tokyo International Conference 2016, 2016/9/8-9 Chiba(Japan)
- [10] Y. Yamamoto, E. Shimizu, Y. Nishimura, S. Tokonami, T. Iida, “Rapid Bacterial Counting Method using Photothermal Effect”, The 14th International Conference of Near-Field Optics, Nanophotonics and Related Techniques(NFO-14), 2016/9/4-8, Hamamatsu(Japan)
- [11] T. Iida, Y. Yamamoto, Y. Nishimura, S. Tokonami, N. Fukui, T. Tanaka, A. Osuka, H. Yorimitsu, “Assembling of Porphyrin-based Molecules by Laser-induced Convection”, KJF International Conference on Organic Materials for Electronics and Photonics 2016 (KJF-ICOMEF 2016), 2016/9/4-7, Fukuoka(Japan)
- [12] 飯田琢也, 田村守, 西村勇姿, 山本靖之, 床波志保, フォトサーマル・フルイデイクスによる生体ナノ/マイクロ構造の制御, 第 6 回光科学異分野横断萌芽研究会, 2016/8/17-19, 山喜旅館(静岡県伊東市)

- [13] 床波志保, 「分析対象に適した空間創成に基づく迅速・高感度検出」, 第124回分析技術研究会, 2016/6/16, パナソニックリゾート大阪(大阪府池田市) **招待講演**
- [14] 床波志保, 清水恵美, 椎木 弘, 長岡 勉, 中瀬 生彦, 飯田琢也, ポリマー膜上に形成されたマイクロ空間を利用したバイオセンシング, 第76回分析化学討論会, 2016/5/28-29, 岐阜薬科大学・岐阜大学(岐阜県岐阜市)
- [15] 山本 靖之, 清水恵美, 西村勇姿, 床波志保, 飯田琢也, 光発熱集合法を用いた細菌数の迅速定量分析, 第76回分析化学討論会, 2016/5/28-29, 岐阜薬科大学・岐阜大学(岐阜県岐阜市) <受賞>
- [16] K. Numada, H. Shiigi, T. Nagaoka, I. Nakase, S. Tokonami, "Label-free cancer cell detection using conducting polymer film", The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (Pacifichem2015), 2015/12/15-20, Honolulu, Hawaii(USA)
- [17] D. Q. Le, T. Kinoshita, A. Morishita, S. Tokonami, T. Nishino, H. Shiigi, T. Nagaoka, "Conducting polymers for bacterial detection: Applications to sensors and trapping agents", The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (Pacifichem2015), 2015/12/15-20, Honolulu, Hawaii(USA)
- [18] Y. Nishimura, Y. Yamamoto, S. Ito, S. Tokonami, T. Iida, "Control of photothermal effect in metallic nanoparticle-assembled system for detecting biochemical substances", The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (Pacifichem2015), 2015/12/15-20, Honolulu, Hawaii(USA)
- [19] Y. Yamamoto, Y. Nishimura, T. Tanaka, H. Yorimitsu, A. Osuka, S. Tokonami, T. Iida, "Photothermal assembling of porphyrin dimers", The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (Pacifichem2015), 2015/12/15-20, Honolulu, Hawaii(USA)
- [20] 床波志保, ナノ~マイクロ構造体を対象としたテーラード型検出法の開発, 第98回テクノラボツアー「大阪府立大学ナノアライアンスセンター設立記念研究会」, 2015/12/10, 大阪府立大学中百舌鳥キャンパス(大阪府堺市) **招待講演**
- [21] 床波志保, ナノ・マイクロ空間の創生とバイオセンサ開発, 第238回コロキウム, 2015/11/26-27, 山口東京理科大学(山口県山陽小野田市) **招待講演**
- [22] K. Numada, S. Tokonami, "Preparation of Micro-Cavities for Cancer Cell Detection", The 3rd OPU-TKU International Symposium on Frontier Chemistry and Materials for the 21st Century (第3回 OPU-TKU 国際シンポジウム), 2015/11/19-20, Sakai(Japan)
- [23] 床波志保, 中田啓之, 清水恵美, 椎木 弘, 長岡 勉, 細菌構造転写技術に基づく迅速検出法の開発, 第36回日本食品微生物学会学術総会, 2015/11/12-13, 川崎市教育文化会館(神奈川県川崎市)
- [24] T. Iida, M. Tamura, Y. Nishimura, S. Tokonami, "Optical Control of Biomolecular Recognition with Metallic Nanoparticles", 28th International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC 2015), 2015/11/10-13, Toyama(Japan)
- [25] M. Miyai, Y. Yamamoto, Y. Nishimura, S. Tokonami, T. Iida, "Optical Assembling of Light Absorbing Nanoparticles and Microparticles", 28th International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC 2015), 2015/11/10-13, Toyama(Japan)
- [26] T. Iida*, Y. Nishimura, Y. Yamamoto, S. Ito, S. Tokonami, "Collective photothermal effect of high-density metal nanoparticles for detection of allergen proteins", 2015/9/15-17, Munich(Germany)
- [27] S. Tokonami, K. Nishida, S. Hidaka, Y. Yamamoto, H. Nakao, T. Iida, "Optical measurement of coupled system of heterogeneous metal nanoparticles for detection of DNA", 2015/9/15-17, Munich(Germany)
- [28] 飯田琢也, 田村 守, 西村勇姿, 床波志保, 生体分子認識の光制御理論と分析応用, 日本分析化学会第64年会, 2015/9/9-11, 九州大学伊都キャンパス(福岡県福岡市)
- [29] 飯田琢也, 田村守, 西村勇姿, 伊都 将司, 床波志保, 異分野横断研究による生体分子認識の光制御への展開, 第5回光科学異分野横断萌芽研究会, 2015/8/4-6 ホテル竹島(愛知県蒲郡市),
- [30] M. Tamura, H. Nakata, S. Tokonami, T. Iida, "Computational Simulation of Selective Trapping of Bacteria based on Dielectrophoresis and Molecular Imprinting Method", ICCBE 2015, 2015/7/20-22, Paris(France)
- [31] T. Iida, M. Tamura, T. Yoshikawa, S. Tokonami, "Nano optical assembling for the control of collective modes and novel highly-sensitive nano-hole array optical biosensor", 日本学術振興会 日伊 - 二国間交流事業, Italy-Japan

Workshop at CNR in Rome, Rome Italy,
2015/7/13-14, Rome(Italy) **招待講演**

- [32] T. Yoshikawa, M. Tamura, Nguyen Duy Vy, S. Tokonami, T. Iida, "Modulated Extraordinary Optical Transmission by Random Metallic Nano-spikes and Trapping Effect", APNF010, 2015/7/7-10, Hokkaido(Japan)
- [33] Y. Yamamoto, Y. Nishimura, S. Tokonami, T. Iida, "Assembling of heterogeneous microparticles by photothermal effect of metallic nano-film", APNF010, 2015/7/7-10, Hokkaido(Japan)
- [34] 宮井萌、山本靖之、西村勇姿、床波志保、飯田琢也、金属ナノ粒子-マイクロ粒子混合系における高速光集積現象と分析応用、第75回分析化学討論会、2015/5/23-24、山梨大学甲府キャンパス、(山梨県山梨市) <受賞>
- [35] T. Iida, M. Tamura, Y. Nishimura, S. Tokonami, "Optical Response of Nonequilibrium Nano-system with Biomaterials", 11th International Conference on Excitonic and Photonic Processes in Condensed Matter and Nano Materials (Excon2015), 2015/5/18-22, Montreal (Canada) **招待講演**

他 13 件

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 4 件)

名称：微小物体の集積装置および集積方法
発明者：飯田琢也、床波志保、山本康之
権利者：大阪府立大学
種類：特許
番号：特願 2017-037316
出願年月日：2017/2/28
国内外の別：国内

名称：電気化学デバイスおよびその製造方法、
並びに微生物燃料電池
発明者：飯田琢也、床波志保
権利者：大阪府立大学
種類：特許
番号：特願 2017-37649
出願年月日：2017/2/28
国内外の別：国内

名称：微小物体の捕集装置および捕集キット
ならびに微小物体の捕集方法
発明者：床波志保、飯田琢也、藤岡一志
権利者：大阪府立大学、シャープ株式会社
種類：特許

番号：特願 2016-1160558
出願年月日：2016/5/11
国内外の別：国内

名称：集積装置および集積方法、微小物体集積構造体の製造装置、微生物の集積除去装置、被検出物質の検出装置、被分離物質の分離装置、ならびに被導入物質の導入装置
発明者：飯田琢也、床波志保、中瀬生彦、西村勇姿、山本靖之
権利者：大阪府立大学、シャープ株式会社
種類：特許
番号：PCT/JP2015/063364
出願年月日：2015/5/8
国内外の別：国外

〔その他〕
ホームページ等
http://www2.chem.osakafu-u.ac.jp/ohka/tonokonami_lab/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

床波志保 (TOKONAMI, Shiho)
大阪府立大学・工学研究科・准教授
研究者番号：60535491

(2) 研究分担者

飯田琢也 (IIDA, Takuya)
大阪府立大学・理学系研究科・准教授
研究者番号：10405350