

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：14303

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K18750

研究課題名（和文）プラズマ中の微生物浮遊実験とその応用に関する研究

研究課題名（英文）Experimental study of levitating micro-organisms in plasma and its application

研究代表者

三瓶 明希夫（Sanpei, Akio）

京都工芸繊維大学・電気電子工学系・准教授

研究者番号：90379066

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,500,000円

研究成果の概要（和文）：RFプラズマ中に微生物を浮遊させる技術確立した。オートクレーブ処理で失活した大腸菌や肺炎桿菌等がプラズマのシース端に浮遊することが確認された。肺炎桿菌は分散性が良く、一つ一つの菌が独立に浮遊してクーロン結晶のような準秩序構造が自発的に形成された。プラズマ中に浮かぶ微生物に外部から電場を印加し微生物の応答を計測した結果、微生物種によって振る舞いが異なることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プラズマ中に微粒子を入れると負に帯電し、クーロン力や重力等の力が釣り合う位置で浮遊する事実は良く知られている。本研究では低温プラズマ中に種々の細菌を導入し、それらが帯電することでプラズマに浮遊することを確認され、自発的に秩序構造が形成されることを観測した。この事実は機能性材料・アストロバイオロジー・医療分野に対する応用へ期待できる。

研究成果の概要（英文）：This study reports levitation of microorganisms in the sheath of radio-frequency (RF) plasma. A crystal-like structure was successfully formed as a result of the levitation of a kind of bacillus micro-organisms *Klebsiella pneumoniae* in a plasma. An external electric field was applied to the plasma. The experimental results revealed that the behavior of the levitated microorganisms differs depending on the species.

研究分野：プラズマ科学

キーワード：微粒子プラズマ プラズマ応用 クーロン結晶

### 1. 研究開始当初の背景

本研究では低温プラズマ中に微生物を浮遊させ、その挙動を明らかにするとともに、機能性材料・アストロバイオロジー・医療分野に対する応用の開拓を目的とする。

(1) 宇宙空間における微生物の挙動の模擬実験:2017年5月に、宇宙生物学的プロジェクト「たんぼぼ計画」の一環として、国際宇宙ステーションにおいて真空や放射線に一年間曝されていた微生物が生き延びた実験が報告された。また、ハリケーンで巻き上げられたと考えられる微生物が、地球上空85kmの電離層で生きたまま採取された例がある。これらの極限環境下で、微生物は電離層や太陽風に曝されて帯電しつつ、空気分子や地磁気とも相互作用しながら空間を移動する。この事実はパンスペルミア仮説の幾つかの側面だけではなく、病原菌が地球上の広範囲に渡って如何にスプレッドしていくかを解明する糸口ともなりうる。

(2) メタマテリアルとしての応用:プラズマ中に微粒子を入れると帯電し、自発的に秩序構造を取るクーロン結晶は良く知られている。この現象をメタマテリアルに応用するアイデアが提唱されており、微粒子の代わりに微小なバネをプラズマ中に浮かべる取り組み等がなされている。もし微粒子の代わりに微生物を用いることができれば、微生物のスピロヘータ構造やタンパク質由来のカイラリティを利用することが出来るため、プラズマメタマテリアルの実現が期待できる。

(3) 細菌種同定法の開発:医学的な見地から細菌種の同定は重要であり、同定法の開発は盛んに研究されている。特に、最近では生化学分野技術だけではなく、物理的な質量分析の技術の応用開発がなされているが、装置が複雑・高価なため、より簡便な方法が求められている。プラズマ中の微粒子が帯電してサイズと質量に依存した位置に浮かぶことを利用して、新しい簡易な細菌種同定法の開発に応用できる。

### 2. 研究の目的

プラズマ中に微粒子を入れると負に帯電し、クーロン力や重力等の力が釣り合う位置で浮遊する事実は良く知られている。プラズマ殺菌・滅菌については数多くの研究があるが、プラズマ中に細菌を浮かべ、その挙動を観測したという例は現在までに報告されていない。そのため、本研究では低温プラズマ中に種々の細菌を導入し、それらが帯電することでプラズマに浮遊することを確認する。プラズマ中に浮遊した細菌を微粒子プラズマとして取り扱うことが可能であれば、従来までに微粒子プラズマ分野で培われた様々な理論・計測・制御技術が適用できると期待され、新しい学問領域「微生物・細菌プラズマ」としてのプラズマの新しい応用が開拓される。

### 3. 研究の方法

本研究では失活した病原菌等を対象とする。図1のように13.56MHzのRFプラズマ装置を製作し、プラズマ中に微生物を導入して浮遊させる。観察はレーザーの散乱光を計測する事で行う。微生物は様々なサイズ・形状・質量を持っており、さらに莢膜や内部構造も異なるので、幅広いパラメータを持つさまざまな細菌種に対して実験を行い、浮遊するパラメータの探索と挙動の観察を行う。同時に、浮遊した細菌に対して微粒子プラズマ分野で培われた計測・解析・制御技術の適用を試みる。浮遊実験の後に細菌をSEM等で観察する事により、プラズマ中での浮遊が微生物の外部構造に影響を与えるか調べる。

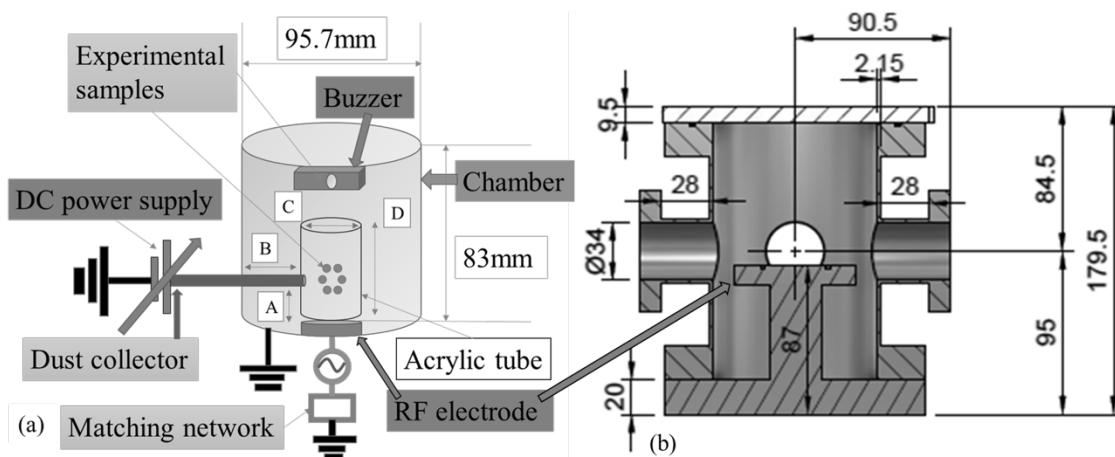


図1:実験装置

#### 4. 研究成果

##### (1) 菌の浮遊とクーロン結晶の形成

実験の結果、オートクレーブ処理で失活した大腸菌 (*E. coli*) や肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) がプラズマのシース端に浮遊することが確認された。大腸菌は凝集しやすい傾向があり、サイズや形状に応じて浮遊位置が変化することが確認された。一方で、肺炎桿菌は分散性が良く、一つ一つの菌が独立に浮遊してクーロン結晶のような準秩序構造が自発的に形成された。図2はプラズマに浮遊した *Klebsiella pneumoniae* の top view であり、白い輝点が一つ一つの菌を表している。100 コマ (1.67 秒) の画像を重ね合わせたものであり、(b) の画像では動き回ったり、ずれた位置に下層の菌が見えることにより引き伸ばされて見える。周辺部である (c) では、平均粒子間隔  $280\mu\text{m}$  程度のハニカム状の秩序構造が形成していることが観測される [A. Sanpei, IEEE TPS (2019)].

プラズマパラメータをコントロールすることで浮遊位置が変化する事が確認された。一例として、封入ガス圧を増加させていくと、中性粒子との冷却が起こることで、温度が低下し、秩序構造が形成される傾向が見られた。

プラズマに浮遊している微生物が複雑な挙動を示す事例が度々観測された。特に、オートクレーブで失活した肺炎桿菌を使った実験では、秩序構造を作って動かない粒子群を掻き分けて移動していく特殊な粒子が観測された [A. Sanpei, IEEE TPS (2019)]. プラズマ中に一時間程度浮遊させた肺炎桿菌を電子顕微鏡で観察したところ、バルクの形状は保持されつつ、表面に  $10\text{nm}$  オーダーの微細な構造が生じていることが確認された。(右図)

特殊な挙動は微生物のマクロな形状や表面の微細構造に起因するものと、微粒子の重心が外部からの力の作用中心とずれていることによる挙動であると予想され、プラズマ中に微生物を模した微粒子を浮かべることでマイクロロボットとして扱え、アクティブマターの新しい系へと応用できる可能性がある。

また、微生物には球形でないものが多く存在し、そのような場合には形状による効果を考慮する必要がある。形状による効果に注目するため、糸状の微粒子やヘリカル形状の微粒子をプラズマ中に浮かべ、その挙動を観察した。糸状微粒子は短いものは電場に沿って縦向きに浮遊するが、長いものはシースに沿うように横向きに浮遊する傾向が確認された。ヘリカル状の微粒子は電場に沿って縦向きに浮遊し、方位角方向に回転する様子が観測された。これらの事実は、微生物の形状がプラズマ中での運動に大きく影響することを示唆するものである。

##### (2) 外部電場による挙動の制御

プラズマ中に浮かぶ微生物に外部から電場を印加し、その応答を詳しく調べた。プラズマ中に円筒形の電極 (ダストコレクタ) を挿入して電圧を印加し、微生物の応答を画像で計測した。その結果、正の電圧を印加した場合に、電極に近い位置に浮遊している微生物はダストコレクターに捕集された。一方、電極から遠い位置に浮遊している微生物は電極からより遠ざかるという現象が観測された。(図4)

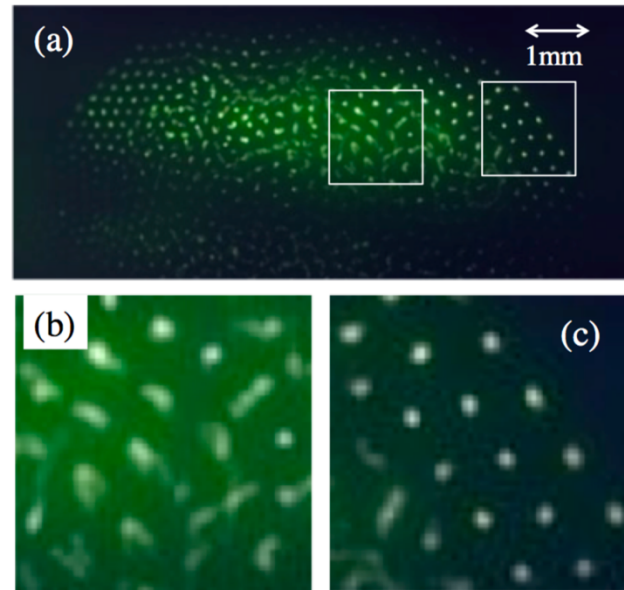


図 2: RF プラズマ中に浮遊した *Klebsiella pneumoniae* の top view. 1.67 秒のイメージを重ね合わせている。周辺部では秩序構造が観測される。

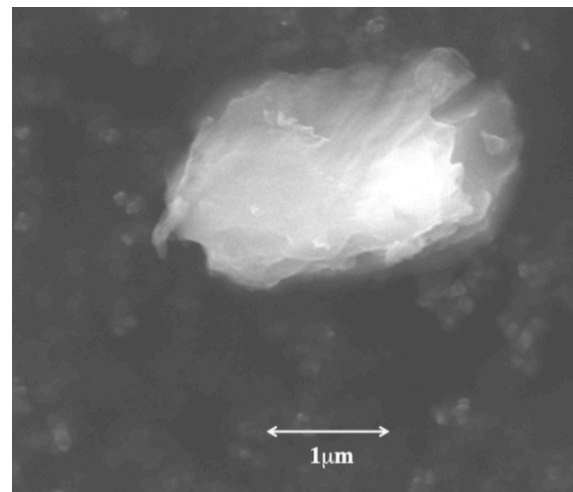


図 3: プラズマ中に浮かべた肺炎桿菌の SEM 像。表面に微細構造が観測された。

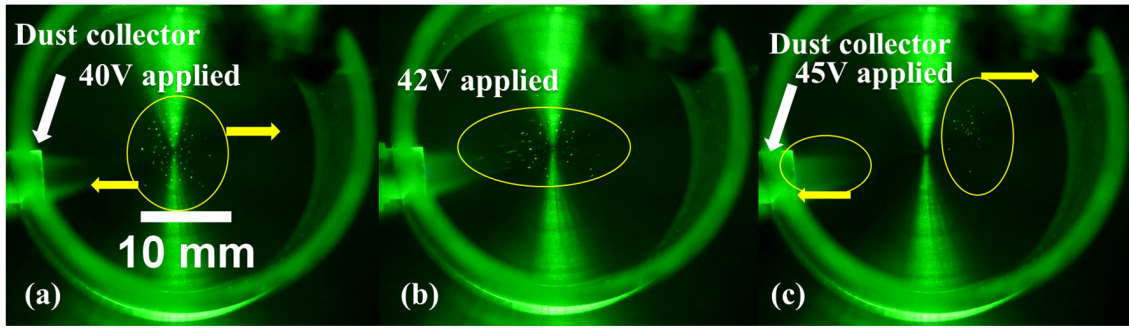


図 4: 外部から印加される電圧によって, 浮遊する微生物に引力と斥力が同時に発生する.

これは電極から近いところではクーロン力による引力が支配的である一方, 離れたところではイオンフローによる斥力が支配的であることが理由である. ダストコレクタに浮遊微生物群が捕集され始める印加電圧の閾値の大きさは, その微生物の表面積の大きさに依存性を持つことが分かった. 図 5 は, ダストコレクタへ捕集するための査定印加電圧の微生物種依存性を表しており, 小さな菌種ほど小さな電位で捕集されることが読み取れる. また, RF 放電電力を増加させていくと, 全ての微生物種で引力と斥力の境界線がダストコレクタ側に近づくことが分かった. これらの事実は, 細菌のプラズマ浮遊技術が微生物種の同定・分離への応用可能性があることを示唆するものである [Y. Kawade, JJAP (2021)].

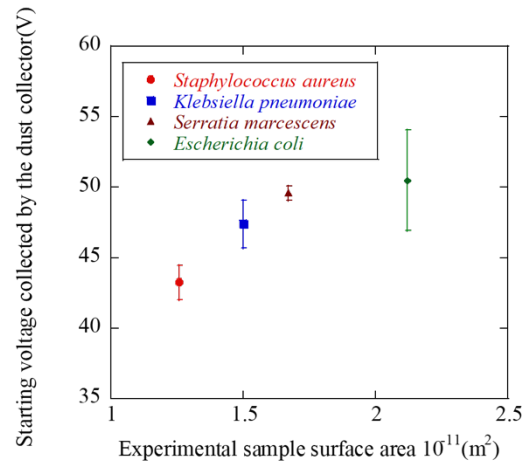


図 5: ダストコレクタへの最低印加電圧に対する微生物種及び微生物種表面積比較

### (3) 一方向からの, 浮遊微生物の三次元位置計測手法の開発

マルチレンズを通して撮像することで視差のある像を取得し, インテグラルフोटोगラフィーとデコンボリューションを用いて, 三次元情報を一方向から取得できるシステムの構築を進めた.

レンズアレイは直径 2.2mm 程度の凸レンズを 9x6 並べたものを使用している. 少しずつ異なる画像が 54 枚撮影できる. 図 6(a) は撮影された画像の一部である. そこから光線追跡を行うことにより, 微生物の位置を特定できる. 光点 (レーザーで散乱された微生物) の数が多いと光線が偽の交点 (Ghost) を形成する (図 6(b), (c)). 本研究ではルーシー・リチャードソン・デコンボリューションを適用することで, Ghost の判定を可能にし, 除去することに成功した. これによ理, 一方向からの観測のみで, 浮遊微生物の三次元位置が計測可能となった [A. Sanpei, Opt. Express (2020)].

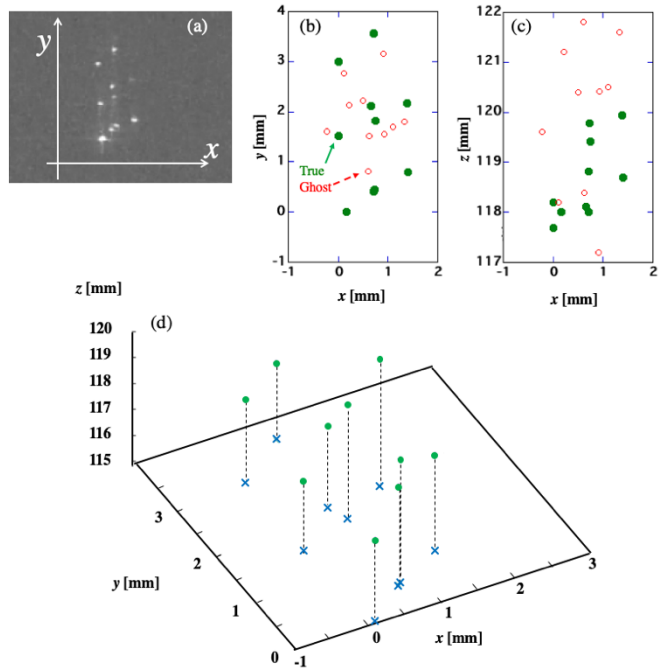


図 6: 撮影された画像の一部(a). 再構成結果の x-y 平面 (b)および x-z 平面(c)投影図, 鳥瞰図(d).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sanpei Akio, Kigami Tomohito, Hayashi Yasuaki, Himura Haruhiko, Masamune Sadao, Sanpei Mai	4. 巻 47
2. 論文標題 First Observation of Crystallike Configuration of Microorganisms in an RF Plasma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 IEEE Transactions on Plasma Science	6. 最初と最後の頁 3074 ~ 3078
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1109/TPS.2019.2916422	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sanpei Akio, Kai Eisaku, Kawade Yasutaka	4. 巻 28
2. 論文標題 Removal of ghost particles from the reconstruction of dusty plasma in integral photography by three-dimensional deconvolution	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Optics Express	6. 最初と最後の頁 37743 ~ 37743
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1364/OE.409139	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawade Yasutaka, Sanpei Akio, Akamatsu Keita, Ochiai Ryotaro, Okada Toshikazu, Hayashi Yasuaki, Himura Haruhiko	4. 巻 60
2. 論文標題 Collection of microorganisms levitating in a radio-frequency discharge	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 046002 ~ 046002
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.35848/1347-4065/abe643	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 3件／うち国際学会 9件）

1. 発表者名 川出恭隆, 三瓶明希夫
2. 発表標題 RFプラズマ空間における微生物浮遊現象に関する研究
3. 学会等名 第80回応用物理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 赤松慧太, 三瓶明希夫
2. 発表標題 RFプラズマ中のロッド状微粒子についての挙動シミュレーション
3. 学会等名 第36回 プラズマ・核融合学会 年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川出恭隆, 三瓶明希夫
2. 発表標題 RFプラズマ中における細菌浮遊現象に対する挙動の菌種依存性の研究
3. 学会等名 第36回 プラズマ・核融合学会 年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川出恭隆, 三瓶明希夫
2. 発表標題 Effects of external fields on levitating microorganisms in an RF plasma
3. 学会等名 20TH WORKSHOP ON FINE PARTICLE PLASMAS (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川出恭隆, 三瓶明希夫
2. 発表標題 Influence of external field on levitating microorganisms in an RF plasma
3. 学会等名 ISPlasma2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三瓶明希夫
2. 発表標題 Three-dimensional imaging of levitating dust and background plasma through integral photography with deconvolution
3. 学会等名 20TH WORKSHOP ON FINE PARTICLE PLASMAS (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三瓶明希夫
2. 発表標題 RFプラズマ中の微生物の浮遊とクーロン結晶形成
3. 学会等名 H30 年度 東北大学電気通信研究所 共同プロジェクト研究会 微粒子-流体混成系がもたらす多様な機能性 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akio Sanpei, Tomohito Kigami, Itaru Yoneda, Eisaku Kai, Yasuaki Hayashi, Mai Sampei
2. 発表標題 Levitation of micro-organisms and three dimensional imaging of dust in RF plasmas
3. 学会等名 19th Workshop on Fine Particle Plasmas (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三瓶明希夫
2. 発表標題 浮遊状態におけるバクテリアに対するプラズマ照射とバクテリアの照射後の表面状態
3. 学会等名 第1回バイオメディカル研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akio Sanpei, Tomohito Kigami, Itaru Yoneda, Yasutaka Kawade, Yasuaki Hayashi, Haruhiko Himura, Sadao Masamune and Mai Sampei
2. 発表標題 Levitation Phenomena of Microorganisms in Ionized Gas
3. 学会等名 The 3rd International Symposium Kyoto Biomolecular Mass Spectrometry Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三瓶明希夫, 木上智仁, 米田至, 川出恭隆, 林康明, 比村治彦, 政宗貞男, 三瓶舞
2. 発表標題 RFプラズマ中の微生物浮遊実験
3. 学会等名 第66回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木上智仁, 三瓶明希夫, 米田至, 林康明
2. 発表標題 RFプラズマ中の細菌浮遊現象
3. 学会等名 第35回プラズマ・核融合学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 米田至, 三瓶明希夫, 木上智仁, 林康明
2. 発表標題 RFプラズマ中の糸状微粒子の浮遊実験
3. 学会等名 第35回プラズマ・核融合学会年会
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 A. Sanpei, E. Kai, H. Himura, Y. Hayashi, S. Masamune, S. Ohdachi, K. Nagasaki
2. 発表標題 Three-dimensional imaging diagnostics for plasmas with integral photography and deconvolution techniques
3. 学会等名 OSA Imaging and Applied Optics Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三瓶明希夫, 川出恭隆, 赤松慧汰, 落合遼太郎, 比村治彦, 林康明
2. 発表標題 RFプラズマ中の微生物および非球形微粒子の浮遊実験
3. 学会等名 第81回応用物理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Y. Kawade, A. Sanpei, K. Akamatsu, R. Ochiai, Y. Hayashi, H. Himura
2. 発表標題 Observation of Microorganisms Levitation Phenomenon in an RF Plasma
3. 学会等名 The 29th International Toki Conference (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 R. OCHIAI, Y. KAWADE, A. SANPEI, I. YONEDA, K. AKAMATSU, Y. HAYASHI, H. HIMURA
2. 発表標題 Comparative observation of the behavior of various microorganisms levitate in an RF plasma
3. 学会等名 The 21st Workshop on Fine Particle Plasmas (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akio Sanpei, Y. Kawade, K. Akamatsu, R. Ochiai, Y. Hayashi
2. 発表標題 Removal of ghost particles from the reconstruction of dusty plasma in integral photography by three-dimensional deconvolution
3. 学会等名 The 21st Workshop on Fine Particle Plasmas (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 T. Mieno, Y. Hayashi, K. Xue, H. Totsuji, K. Takahashi, Y. Saitou, O. Ishihara, A. Sanpei, et al	4. 発行年 2020年
2. 出版社 IntechOpen	5. 総ページ数 226
3. 書名 Progress in Fine Particle Plasmas	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
連携研究者	林 康明 (Hayashi Yasuaki)  (30243116)	大和大学・理工学部・教授  (34453)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------