

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02502

研究課題名（和文）コロイド科学的技法を駆使したバイオフィルムの形成抑制技術の開発

研究課題名（英文）Development of biofilm formation control technology using colloidal technique

研究代表者

野村 俊之（Nomura, Toshiyuki）

大阪府立大学・工学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：00285305

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、低環境負荷型材料であるマイクロバブル（MB）を用いたバイオフィルムの形成抑制について検討を行った。その結果、種々の操作条件のうち、菌体とMBの接触時間を最適化すると洗浄効率が劇的に向上することを明らかにした。また、MB分散液を酸性にするとより効果的であることも明らかにした。加えて、基板表面をナノ粒子でコーティングすると基板への菌体付着が抑制できることも分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

原子間力顕微鏡を用いた菌体に働く付着力の直接測定により、MB - 菌体間付着力がMB - 基板間付着力より大きくなると、MB洗浄により基板に付着した菌体を除去できること、基板表面をナノ粒子でコーティングすると菌体 - 基板間の付着力が低下して菌体付着を抑制できることを学術的に明らかにした。これらの結果は、MB分散液を装置に流すことによって装置を解体することなくバイオフィルム形成を抑制できる可能性を示唆している。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the suppression of biofilm formation using microbubbles (MB), which is a low environmental load type material. As a result, it was demonstrated that the cleaning efficiency was dramatically improved by optimizing the contact time between the cell and MB. It was also clarified that the bacterial cells adhered on the substrate can be removed more effectively when the MB dispersion is made acidic. In addition, it was also found that coating the surface of the substrate with nanoparticles can suppress the adhesion of bacterial cells to the substrate.

研究分野：細胞間に働く付着力の計測と評価

キーワード：バイオフィルム 原子間力顕微鏡 ノンケミカル洗浄 マイクロバブル 付着力

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

バイオフィームが関係する現象には重大なトラブルになるものが多い。例えば、一見、関連性がないような金属配管の腐食でさえも微生物が関わっており、1年間で30~50億ドルの被害が出ていると言われている(微生物劣化)。また、微生物の混入に細心の注意を払う食品分野でも、バイオフィーム除去のために生産ラインを止めることは避けられない(微生物汚染)。さらに、厄介なのは、微生物がバイオフィームを形成すると、様々な耐性を発現するため、大量の薬剤添加をもってしても、バイオフィームの除去が困難になることである。したがって、バイオフィームの形成抑制技術を確立することは極めて意義深いことである。

近年、界面に付着した汚染物質のバブルを用いたノンケミカルな洗浄技術が注目されている。バブルは、疎水性表面との間に強い疎水性相互作用が働くことが知られている。また、バブル径が減少すると、比表面積が増大することに加え、液中で長時間滞留させることができる。さらに、バブルは低コストで生産できるため、究極の低環境負荷型の材料と言える。しかし、バブルによる洗浄メカニズムには未だ不明な点が多く残されている。したがって、バブル洗浄を工業的な洗浄技術の一つとして確立するには、バブルと対象物質間に働く付着力を直接測定し、正確に理解することが重要である。対象物が微生物の場合、物理化学的相互作用に加えて、生物学的相互作用の影響も考慮する必要がある。しかし、微生物の表面構造は非常に複雑なため、微生物に働く付着力を正確に予測できる理論は確立されていない。一方で、微生物が付着しにくい表面を設計することも重要な技術である。また、微生物を完全除去できない場合、薬剤を用いた微生物の殺菌操作も必要となる。したがって、界面に付着した微生物に由来するトラブルを解決するには、

固体表面に付着した微生物を簡便かつ安価に如何に除去できるか(除去)、汚染源となる微生物の固体表面への付着を如何に抑制できるか(抑制)、除去困難な微生物を如何に少量の薬剤で殺菌できるか(殺菌)の課題をそれぞれ解決する必要がある。

2. 研究の目的

バイオフィームが関係するトラブルには深刻な被害を及ぼすものが多いが、個々の問題に適切に対応できる技術は皆無である。申請者は、原子間力顕微鏡(AFM)を用いて、バブル-酵母間の付着力は基板-酵母間よりも1オーダー程度大きいことを見出した。そこで本研究では、究極の低環境負荷型材料であるバブルの疎水性相互作用を利用して、簡便かつ安価な方法により装置内壁へのバイオフィーム形成の抑制、装置壁面のナノ粒子コーティングによる微生物の付着抑制について実験的検討を行うとともに、微生物-バブル・基板間に働く付着力の直接AFM測定によるコロイド科学的見地からの解析を試みた。

3. 研究の方法

(1) 付着微生物のバブル洗浄

基板の上に菌体懸濁液0.1 mLを滴下して菌体を基板に付着させたのち、バブル分散液中で振とう洗浄を行った。残留した菌体を生死染色した後、共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)で観察した。基板に残存した菌体数は、画像処理ソフトImage Jにより計数した。バブルには、加圧発泡法により発生させた直径10~100 μmのマイクロバブル(MB)を用いた。

(2) ナノ粒子を用いた微生物の付着抑制

摩砕ミル式成膜装置を用いて、基板表面に親水性チタニアナノ粒子(公称径7 nm)をコーティングしたステンレス(SUS304)基板を作製し、MBを含まない分散媒で洗浄後の付着菌体数を未処理のステンレス基板の結果と比較した。

(3) 菌体に働く付着力の直接AFM測定

AFMを用いてMB-菌体、基板-菌体間に働く付着力をそれぞれ直接測定し、両者の付着力の違いを比較した。前者はAFMのカンチレバー先端にMBを固定したマイクロバブルプローブ、後者はシリカ粒子を固定したコロイドプローブを用いて、基板に固定した菌体との付着力を測定した。

4. 研究成果

(1) 付着微生物のバブル洗浄

MBを分散した水中とMBを分散していない水中で振とう洗浄したときの基板(ガラス)に残留している菌体(大腸菌*Escherichia coli* JD23004株(鞭毛欠損株))をCLSMMで観察した。興味深いことに、MB分散液で洗浄したときの付着菌体数は 200 ± 14 cells/Imageであったのに対して、水洗浄したときは 154 ± 12 cells/Imageとなり、MB洗浄の効果が低いことが分かった。バブルが固体表面に衝突する際、表面間に形成される液膜が排除され、気体-液体-固体の三相線が形成されると付着微生物が除去されやすいことが報告されている。これより、MB分散液に微生物が付着した基板を入れて振とう洗浄する方法では、MBと微生物の接触時間が短く、三相線が形成

されなかったことが、洗浄効果が得られなかった主たる要因として考えられる。加えて、水中に MB が分散していると、密度が低下して流体の運動エネルギーが低下したことも要因として考えられる。これらの問題を解決するために、微生物が付着した基板面を下にして所定の時間静止させて MB を付着させてから振とう洗浄する方法について検討を行った (Fig. 1)。MB と微生物の接触時間が 10 s 以上になると、付着微生物の除去効率が劇的に向上することが明らかとなった。これより、細胞に MB を 10 s 以上接触させると、気液固の三相線が形成されたと推察される。

微生物のガラス表面における付着時間を変えて洗浄を行った後の付着菌体数を Fig. 2 に示す。水だけの洗浄では、微生物の付着時間が増加すると付着菌体数は増加し、12 h 以上になると微生物の除去は困難になることが分かった。これは、界面に付着した微生物から分泌された細胞外ポリマーにより微生物 - ガラス間の付着力が大きくなったためと考えられる。一方、MB を接触させてから洗浄を行うと、12 h 以上細胞が付着した条件においても洗浄効率が高いことが分かった。これは、ガラス基板を培地中に浸せきしてバイオフィルムを形成させた条件においても同様の傾向であった。

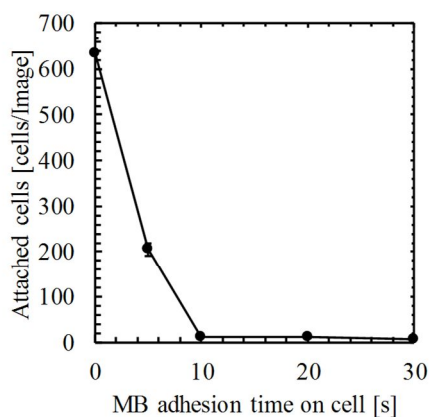


Fig. 1 Attached cells on glass substrate after MB washing with MB adhesion time on the cells.

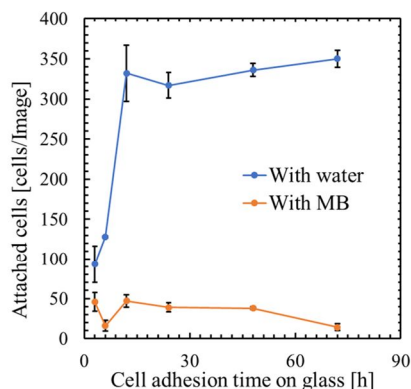


Fig. 2 Attached cells on glass substrate after MB washing with cell adhesion time on the substrate.

上記の大腸菌に加えて、乳酸菌 *Lactiplantibacillus plantarum* JCM 1149 株、乳酸菌 *Lactococcus lactis* JCM5805 株、脱窒菌 *Paracoccus denitrificans* NBRC13302 株について、同様に MB 洗浄をおこなった。(Fig. 3)。 *L. plantarum* 以外では 99% 以上の菌体が除去されているのに対して、 *L. plantarum* では 5% 程度の菌体が残留していることが分かった。洗浄後に付着していた *L. plantarum* について生死判別すると、そのほとんどが死菌体であることも分かった。さらに、 *L. plantarum* の培養時間を変えて MB 洗浄を行なったところ、培養時間の増加に伴い死菌体の割合が増加し、洗浄後に付着していた死菌体数が増加することが分かった。大腸菌を死滅させた菌体を用いて同様の実験を行なったところ、同様に MB 洗浄効果が大幅に低下したことから、菌体が死滅すると MB による除去効率が低下することが明らかとなった。

死菌体も含めた菌体の除去効率の向上を目的として、168 時間培養した *L. plantarum* を酸性 (pH4) に調整した MB 分散液で洗浄を行った (Fig. 4)。分散媒を酸性条件にすると洗浄後の付着死菌体数は減少することが分かった。MB の分散液が中性から酸性に変化すると、MB は負帯電から正帯電に変化することが知られている。したがって、酸性条件下では、MB が正に帯電したことで負に帯電する微生物と付着しやすくなり、除去効率が向上したと推定される。

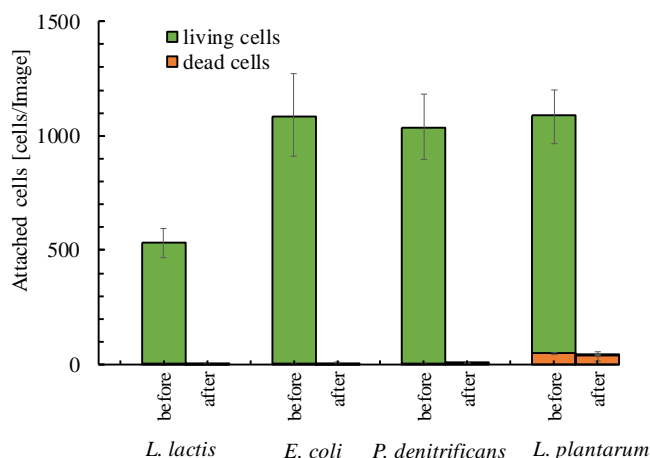


Fig. 3 Attached cells on glass substrate before and after MB washing.

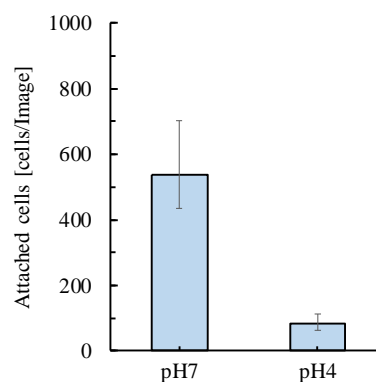


Fig. 4 Effect of solution pH on attached cells on glass substrate after MB washing.

(2) ナノ粒子を用いた微生物の付着抑制

SUS 基板表面の乳酸菌の付着状態を比較した CLSM 画像を Fig. 5 に示す。洗浄乳酸菌において、未処理の SUS 基板表面には乳酸菌が 341 cells/Image が付着していたのに対して、SUS 表面をチタニアナノ粒子で処理すると 11 cells/Image と乳酸菌の付着が抑制されていることが分かった。また、未洗浄乳酸菌では、未処理の SUS 基板表面には乳酸菌が 1 画面当たり 256 cells/Image が付着していたのに対して、SUS 表面をチタニアナノ粒子で処理すると 4 cells/Image と乳酸菌の付着が抑制されていることが分かった。乳酸菌と SUS 基板表面の表面張力に基づき、乳酸菌が付着したときの表面自由エネルギー変化を算出したところ、未処理の SUS 基板に対しては -8.1 mJ/m^2 と負の値であるのに対して、チタニアナノ粒子で処理すると 14.3 mJ/m^2 と正の値となることが分かった。このことから、SUS 基板を親水性のナノ粒子で処理すると、乳酸菌は熱力学的に付着し難くなることが予測され、実験結果の傾向とよく一致していた。また、未洗浄乳酸菌においては、洗浄乳酸菌よりも付着微生物数が減少していた要因として、未洗浄乳酸菌に付着した細胞外ポリマーにより乳酸菌と基板間の距離が長くなったことが考えられる。加えて、SUS 表面をチタニアナノ粒子で処理したことで表面粗さが 0.879 nm から 6.899 nm に増加しており、基板と菌体の接触面積が減少したことも、菌体の付着が抑制された要因として推察される。

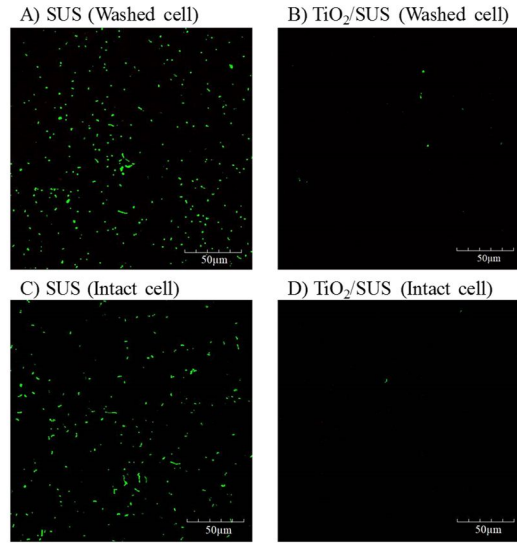


Fig. 5 Confocal images of attached cells on SUS substrate.

(3) 菌体に働く付着力の直接 AFM 測定

菌体が死滅すると MB 洗浄効果が減少する要因について理解するために、菌体 - ガラス間および菌体 - MB 間に働く付着力を死菌体と生菌体それぞれについて直接 AFM 測定を行った。*L. plantarum* の菌体 - ガラス間の付着力を Fig. 6(A) に示す。ガラスに対する付着力は、死菌体の方が生菌体よりも大きくなることが分かった。これは、細胞膜が損傷した死菌体において、細胞内からバイオポリマーが流出したためと推定される。次に *L. plantarum* の菌体 - MB 間の付着力を Fig. 6(B) に示す。MB に対する付着力は、死菌体の方が生菌体よりも小さくなることが分かった。以上より、MB 洗浄により生菌体の増殖によるバイオフィルム化を抑制できることが分かった。

乳酸菌 - SUS 基板間に働く付着力の測定結果を Fig. 7 に示す。未処理の SUS 基板では $0.76 \pm 0.07 \text{ nN}$ であったのに対して、基板表面をチタニアナノ粒子で処理すると $0.28 \pm 0.03 \text{ nN}$ に減少し、乳酸菌と SUS 基板間には付着力がほとんど作用していないことが分かった。以上より、SUS 基板表面には微生物が付着し易いが、その表面を親水性ナノ粒子で処理すると、微生物の付着が抑制できることが分かった。

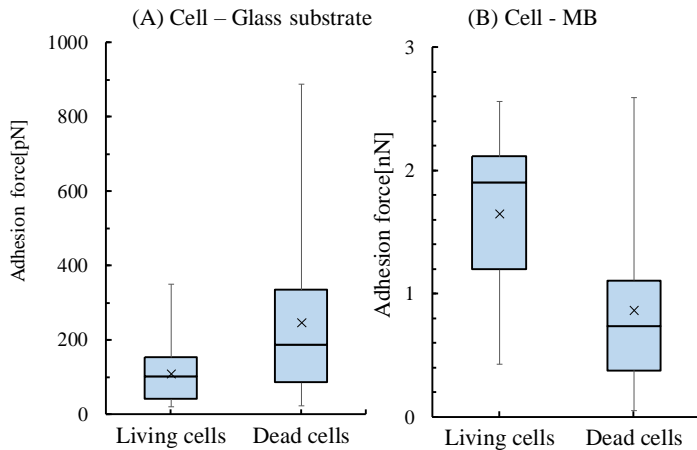


Fig. 6 Adhesion forces measured using AFM.

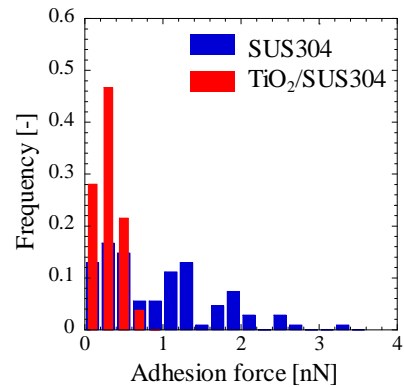


Fig. 7 Distribution of adhesion forces between a cell and a substrate.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tanaka Tomohiko, Fujisawa Eri, Yoshihara Akinori, Konishi Yasuhiro, Nomura Toshiyuki, Kondo Akira, Naito Makio	4. 巻 57
2. 論文標題 Control of Biofilm Formation Using Hydrophilic Nanoparticles	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the Society of Powder Technology, Japan	6. 最初と最後の頁 588 ~ 592
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4164/sptj.57.588	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 Yumiyama Shohei, Kato Satoshi, Konishi Yasuhiro, Nomura Toshiyuki	4. 巻 583
2. 論文標題 Direct measurement of interaction forces between a yeast cell and a microbubble using atomic force microscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects	6. 最初と最後の頁 123963 ~ 123963
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.colsurfa.2019.123963	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16件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 野村俊之
2. 発表標題 バイオ粒子が関係する界面現象の微粒子工学的理解
3. 学会等名 日本粉体工業技術協会技術情報交流懇話会第65回水曜会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野村俊之
2. 発表標題 バイオ粒子の表面性状評価と界面付着現象の理解 - 新型コロナウイルスCOVID-19から生産プロセスの現場まで -
3. 学会等名 国際粉体工業展東京2020「最新技術フォーラム」（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野村俊之
2. 発表標題 ナノ粒子を接合した固体表面へのカビ胞子の付着抑制
3. 学会等名 大阪大学接合科学研究所「東京セミナー」(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野村俊之
2. 発表標題 微生物の付着・バイオフィルム形成 現象の理解と工学的に制御するためのポイント
3. 学会等名 情報機構セミナー(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野村俊之
2. 発表標題 原子間力顕微鏡 AFM を用いた微粒子に働く相互作用の直接測定
3. 学会等名 2019年度第1回不均質構造の利用と制御に関するワークショップ(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本拓海, 田中智彦, 野村俊之, 近藤 光, 内藤牧男
2. 発表標題 親水性ナノ粒子を用いた表面処理による基板表面への細胞の付着抑制
3. 学会等名 第55回粉体工学会夏期シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤 聡, 小西康裕, 野村俊之
2. 発表標題 微生物 - 基板間に働く付着力がバイオフィルム形成に及ぼす影響
3. 学会等名 第 5 5 回粉体工学会夏期シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中智彦, 小西康裕, 野村俊之, 近藤 光, 内藤牧男
2. 発表標題 親水性ナノ粒子を用いたバイオフィルムの形成抑制
3. 学会等名 2 0 1 9 年度粉体工学会秋期研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野村俊之
2. 発表標題 微粒子工学で、微生物現象を制す！
3. 学会等名 APPIE産学官連携フェア2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野村俊之, 和田将幸, 小西康裕
2. 発表標題 原子間力顕微鏡を用いた酵母 - 乳酸菌間に働く付着力の直接測定
3. 学会等名 第 5 7 回粉体に関する討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤 聡, 小西康裕, 野村俊之
2. 発表標題 原子間力顕微鏡を用いた酵母 - マイクロバブル間に働く相互作用力の直接測定
3. 学会等名 化学工学会姫路大会 2 0 1 9
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本拓海, 小西康裕, 野村俊之
2. 発表標題 平行平板流れ場と原子間力顕微鏡を用いた微生物に働く付着力の測定
3. 学会等名 化学工学会姫路大会 2 0 1 9
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野村俊之
2. 発表標題 バイオコロイド (生きた微生物) に働く相互作用評価とその応用
3. 学会等名 先進セラミックス第124委員会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中智彦, 小西康裕, 野村俊之, 近藤 光, 内藤牧男
2. 発表標題 チタニアナノ粒子を用いたステンレス表面への微生物の付着抑制
3. 学会等名 第 2 2 回化学工学会学生発表会 (岡山大会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 T. Matsumoto, A. Yoshihara, Y. Konishi, T. Nomura
2. 発表標題 Measurement of microbial adhesive forces using parallel plate flow chamber and atomic force microscopy
3. 学会等名 18th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress (APCCHE 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 S. Kato, S. Yumiyama, Y. Konishi, T. Nomura
2. 発表標題 Direct measurement of interaction forces between a yeast cell and a microbubble using atomic force microscopy
3. 学会等名 18th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress (APCCHE 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------