

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：54101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05185

研究課題名(和文) 鉄鋼材料およびスラグ上に形成したバイオフィルムのSICMによる水中その場観察

研究課題名(英文) in-situ SICM observation in water on biofilm formed on steels and slags

研究代表者

平井 信充 (Hirai, Nobumitsu)

鈴鹿工業高等専門学校・生物応用化学科・教授

研究者番号：50294020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：バイオフィルムは基板の種類や性状により成長挙動が異なることが知られている。バイオフィルムの生成防止や生成加速に及ぼす基板の影響を明らかにするためには、様々な基板におけるバイオフィルム成長の超初期過程の観察が極めて重要である。我々が既に確立していた「走査型イオン伝導顕微鏡(SICM)によるバイオフィルム水中その場観察技術」は、当初透明試料のみが対象であり、非透明試料の観察は困難であった。本研究では、観察条件や観察システムの最適化を行うことにより、鉄鋼スラグや非透明プラスチックなどの非透明試料上に生成したバイオフィルムについて、SICMを用いて水中でのナノスケール形態観察を行うことに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バイオフィルムは、細菌の作用により水と接する各種材料表面に膜状に形成され、様々な悪影響を引き起こす。そのため、バイオフィルムの生成を抑制する材料の開発が強く望まれているが、材料との相互作用の影響を最も受けるバイオフィルム生成の超初期過程について、その観察手法は確立されていなかった。今回、本研究により、走査型イオン伝導顕微鏡(SICM)を用いて、透明、非透明を問わず様々な基板上に形成したバイオフィルムの生成超初期過程の観察手法の確立に成功した。今後、バイオフィルム付着挙動の基板種依存性をSICMにより明らかにし、バイオフィルムの生成を抑制する材料の開発につながる事が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Biofilm growth behavior is known to vary depending on the substrate type and properties. Observation of the very early stages of biofilm growth on various substrates is extremely important in order to clarify the influence of substrate on the prevention and acceleration of biofilm formation. Our previously established "in-situ observation technique of biofilm in water by Scanning Ion Conductive Microscopy (SICM)" was initially intended for transparent samples only, and it was difficult to observe the biofilm formed on non-transparent samples. In this study, by optimizing the observation conditions and system, we have succeeded in observing the nano-scale morphology of biofilms formed on non-transparent samples, such as steel slag and non-transparent plastics, in water in-situ using SICM.

研究分野：界面制御工学

キーワード：バイオフィルム めめり 走査型プローブ顕微鏡 鉄鋼スラグ 走査型イオン伝導顕微鏡 微生物 水中その場観察 鉄鋼材料

1. 研究開始当初の背景

バイオフィームとは、水があるあらゆる場所に存在しており、自然界にも広く存在する。生物由来の膜状物質であり、細菌の作用により各種材料表面に形成される。バイオフィームの形成過程の概要は以下の通りである。材料表面に付着した細菌が、細胞外重合物質(EPS, Extracellular polymeric substance)を分泌し、それにより、バリアーを形成することで、環境変化や化学物質から内部の細菌を守る。これにより、生息密度の高い閉鎖的なコロニーが形成され、恒常性が保たれると考えられている。

細菌は材料表面に形成されたバイオフィーム中に生息し、材料と相互作用を起こす。具体的には、金属表面に形成されると腐食、歯の表面に形成されると虫歯、病院内で形成されると感染症、食品表面に形成されると腐敗の原因となる。このようにバイオフィームは様々な問題の原因となっていることから、その生成防止や除去方法に関する知見は極めて重要であるが、現状は対処療法的なアプローチに留まっているのが現状である。例えば、一般的には抗菌作用のある金属の基板を用いるとバイオフィームが生成しにくいと考えられていたが、申請者らの過去の研究により、抗菌性を示す Ag 上へのバイオフィームの生成量が、抗菌性を示さない Sn 上へのバイオフィーム生成量より多いことが明らかになったが、この(=バイオフィーム生成量が基板の抗菌性のみでは説明がつかない)理由については現状不明である。

一方で、環境中で形成されるバイオフィームは汚染物質を分解し環境浄化に役立つことが知られている。一例として、申請者らの研究によると、転炉系鉄鋼スラグ上のバイオフィームには、同じ環境下で一般的な材料上に形成されるバイオフィームと比較して、硫酸化などの環境浄化細菌が優先的に定着することを明らかにしたが、この(=スラグ上のバイオフィームには環境浄化細菌が優先的に定着する)理由についても現状不明である。

これらの理由を明らかにするためには、基板材料の影響が最も大きいと思われる、菌が材料に付着してバイオフィームが成長し始める「成長の超初期過程」についての詳細な理解が必須である。その理解に向けた重要な解析手法の一つとして、様々な基板上でバイオフィームがどのように成長、溶解、形態変化するかについての、水中その場での観察が挙げられる。

走査型イオン伝導顕微鏡(Scanning Ion Conductance Microscopy; SICM)は、水中での表面ナノスケール構造の観察に適した走査型プローブ顕微鏡(Scanning Probe Microscopy; SPM)の一種である。これまで主に細胞の形態観察に用いられてきたが、筆者らはこの SICM を用いてバイオフィームの形態観察を試み、ガラスや透明プラスチックなどの透明基板上のバイオフィームの形状をナノスケールかつ水中その場で観察する手法を確立した。しかしながら、研究開始当初において、本手法による観察は、透明基板上に生成したバイオフィームのみに観察対象が限られており、非透明基板上に生成したバイオフィームのナノスケール水中その場観察手法の確立には至っていなかった。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、観察に適したバイオフィームの生成方法や SICM の一部改良や観察条件の検討などを行うことにより、非透明試料である鉄鋼材料およびスラグ上に形成するバイオフィームの形状をナノスケールかつ水中その場で観察する手法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究で主な観察対象とした海洋菌バイオフィームの生成方法は以下の通りである。用いた菌は、海洋性ビブリオ菌(*Aliivibrio fischeri* JCM18803, RIKEN)である。まず、寒天培地上のコロニーから釣菌し、マリン液体培地中において 22℃ で 2 日間前培養を行った。次に、培養液をリン酸緩衝溶液(PBS)により 8~32 倍希釈した溶液において 22℃ で 2 日間各種基板へバイオフィームを生成した。バイオフィームを生成した基板は、関係者から提供頂いた実製鋼スラグや、非透明ないし透明プラスチックなどである。その後、グルタルアルデヒド含有 PBS によりバイオフィーム固定化処理、クリスタルバイオレット水溶液によりバイオフィーム染色処理などを行った後、SICM に導入し PBS 中その場形態観察を行った。

4. 研究成果

図1に、実製鋼スラグ上に形成された海洋菌バイオフィルムの SICM による PBS 中その場観察結果の一例を示す。観察範囲は $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ 、画像の画素数は 128×128 であり、明るい分が高い場所、暗い部分が低い場所に相当する。図より左上から右下にかけて比較的厚いバイオフィルムが形成されていることがわかる。

図2に、5種類のプラスチック上に形成された海洋菌バイオフィルムの SICM による PBS 中その場観察結果の一例を示す。図1と同じく、観察範囲は $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ 、画像の画素数は 128×128 であり、明るい分が高い場所、暗い部分が低い場所に相当する。以上、図1、図2に示すように、非透明な試料上に形成されたバイオフィルムの SICM 観察も透明試料と同様に可能であることがわかった。

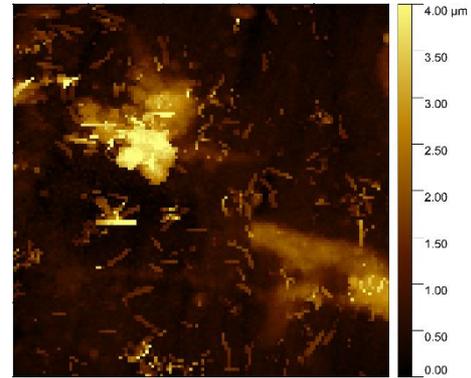
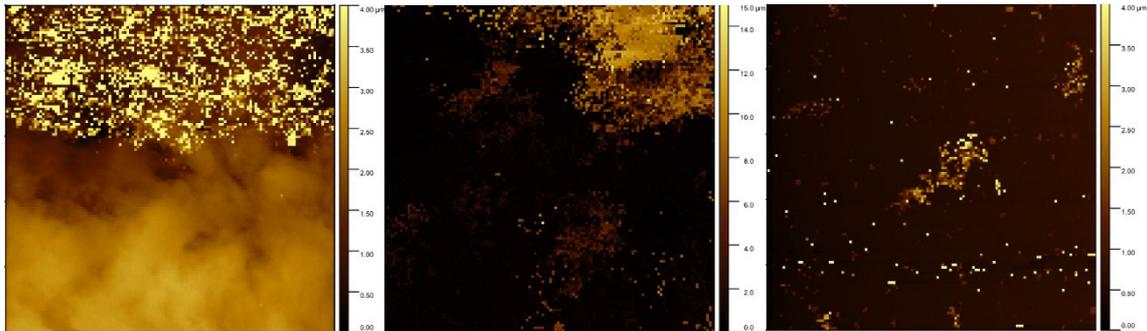


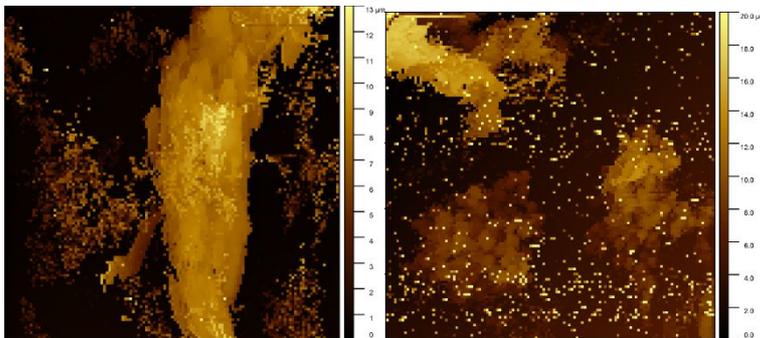
図1 実製鋼スラグ上に形成された海洋菌バイオフィルムの SICM による PBS 中その場観察結果



(a)フッ素樹脂上

(b)ポリエチレン上

(c)アクリル樹脂上



(d)ABS樹脂上

(e)塩化ビニル上

図2 各種プラスチック上に形成された海洋菌バイオフィルムの SICM による PBS 中その場観察結果

以上、申請者らが世界で最初に開発していた SICM によるバイオフィルムの水中その場観察手法について、本研究により非透明基板への拡張に成功した。今後、バイオフィルム付着挙動の基板種依存性を SICM により明らかにし、バイオフィルムの生成を抑制する材料の開発につながる事が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hirai Nobumitsu, Horii Masaya, Kogo Takeshi, Ogawa Akiko, Kuroda Daisuke, Kanematsu Hideyuki, Nakata Junji, Katsuyama Shigeru	4. 巻 15
2. 論文標題 Simple Methods for Evaluating Acid Permeation and Biofilm Formation Behaviors on Polysiloxane Films	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 2272 ~ 2272
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ma15062272	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 Takahashi Toshiyuki, Kai Hotaka, Hirai Nobumitsu	4. 巻 62
2. 論文標題 Quantitative Evaluation Methods for Surface Processing Technology Using Microbial Biofilm: Microbial Biofilm on Iron and Steel Slag, and the Effects of Slag Attached Biofilm on pH Buffering Action	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ISIJ International	6. 最初と最後の頁 821 ~ 831
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2355/isijinternational.ISIJINT-2021-411	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 甲斐穂高, 中根十愛, 梅川響, 東浦芙宇, 平井信充	4. 巻 28
2. 論文標題 バイオフィルムの定量方法の比較検討	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Technology and Education	6. 最初と最後の頁 17 ~ 25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔学会発表〕 計28件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 三輪 有平, 平井 信充, 佐野 勝彦, 鈴木 彰, 澤田 善秋, 幸後 健, 小川 亜希子, 黒田 大介, 兼松 秀行
2. 発表標題 紫外線照射したガラス基板上へのバイオフィルム生成能および純水、模擬バイオフィルム溶液の濡れ性評価
3. 学会等名 電気化学会第89回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堀井 雅也, 平井 信充, 佐野 勝彦, 鈴木 彰, 澤田 善秋, 幸後 健, 小川 亜希子, 黒田 大介, 兼松 秀行
2. 発表標題 シラン系樹脂コーティング膜上へのバイオフィーム附着性及び純水及び模擬バイオフィーム溶液の濡れ性の影響
3. 学会等名 電気化学会第89回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋 穂乃実, 平井 信充, 佐野 勝彦, 鈴木 彰, 澤田 善秋, 幸後 健, 小川 亜希子, 黒田 大介, 兼松 秀行, 岩田 太
2. 発表標題 各種プラスチック基板上における海洋菌バイオフィーム生成と模擬バイオフィームの濡れ性
3. 学会等名 第31回日本MRS年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 船越 美里, 平井 信充, 佐野 勝彦, 鈴木 彰, 澤田 善秋, 幸後 健, 小川 亜希子, 黒田 大介, 兼松 秀行
2. 発表標題 各種金属基板上的の水および模擬バイオフィーム液滴の濡れ挙動
3. 学会等名 第31回日本MRS年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀井 雅也, 平井 信充, 佐野 勝彦, 鈴木 彰, 澤田 善秋, 幸後 健, 小川 亜希子, 黒田 大介, 兼松 秀行
2. 発表標題 シラン系樹脂膜上における水およびバイオフィーム模擬水溶液の濡れ挙動
3. 学会等名 第31回日本MRS年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平井信充, 小川亜希子, 甲斐穂高, 幸後健, 高橋利幸
2. 発表標題 鉄鋼スラグによる沿岸域環境改善に及ぼすバイオフィルムの役割の可能性 とその分析技術
3. 学会等名 令和3年度 KOSENフォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤 翠花, 平井 信充, 加藤 妃華, 佐野 勝彦, 鈴木 彰, 澤田 善秋, 幸後 健, 小川 亜希子, 黒田 大介, 兼松 秀行
2. 発表標題 バイオフィルム液滴の濡れ挙動に及ぼす液滴への各種アミノ酸の添加効果
3. 学会等名 第31回日本MRS年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三輪 有平, 平井 信充, 佐野 勝彦, 鈴木 彰, 澤田 善秋, 幸後 健, 小川 亜希子, 黒田 大介, 兼松 秀行
2. 発表標題 各種基板上でのバイオフィルム模擬液滴の濡れ挙動に及ぼす紫外線照射の影響
3. 学会等名 第31回日本MRS年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中根 十愛, 平井 信充
2. 発表標題 ガラス上に形成されたバイオフィルムのTOC測定に対する測定手順の影響
3. 学会等名 第31回日本MRS年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平井 信充, 福澤 直人, 塚本 照輝, 岩田 太, 兼松 秀行
2. 発表標題 様々な基板上に形成したバイオフィルムの走査型イオン伝導顕微鏡解析
3. 学会等名 第31回日本MRS年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三輪有平, 平井信充, 佐野勝彦, 鈴木 彰, 澤田善秋, 幸後 健, 小川亜希子, 黒田大介, 兼松秀行
2. 発表標題 模擬バイオフィルムとしてのアルギン酸ナトリウム水溶液の濡れ性に及ぼす基板への 紫外線照射効果
3. 学会等名 令和3年度表面技術若手研究者・技術者研究交流発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中根十愛, 平井信充
2. 発表標題 TOC 法によるスラグ上バイオフィルム定量の検討
3. 学会等名 令和3年度表面技術若手研究者・技術者研究交流発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀井雅也, 平井信充, 佐野勝彦, 鈴木 彰, 澤田善秋, 幸後 健, 小川亜希子, 黒田大介, 兼松秀行
2. 発表標題 シラン系樹脂コーティング膜上への純水の濡れ性挙動の評価
3. 学会等名 令和3年度表面技術若手研究者・技術者研究交流発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中根 十愛, 平井 信充
2. 発表標題 ガラス上バイオフィルムにおけるTOC測定のはらつき発生要因の検討
3. 学会等名 2021年電気化学秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀井 雅也, 平井 信充, 佐野 勝彦, 鈴木 彰, 澤田 善秋, 幸後 健, 小川 亜希子, 黒田 大介, 兼松 秀行
2. 発表標題 シラン系樹脂膜への水およびバイオフィルム模擬水溶液の濡れ挙動
3. 学会等名 2021年電気化学秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 N. Hirai, N. Fukuzawa, T. Tsukamoto, F. Iwata, H. Kanematsu
2. 発表標題 In-situ observation on morphology of <i>Aliivibrio fischeri</i> biofilm formed on various plastics substrate by scanning ion conductance microscopy
3. 学会等名 Interfinish2020 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 N. Hirai, K. Fujimoto, Y. Akatsuka, T. Kogo, H. Kai, A. Ogawa, H. Kanematsu
2. 発表標題 Environmental Biofilm Formation on Steelmaking Slag
3. 学会等名 Interfinish2020 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 M. Horii, N. Hirai, K. Sano, A. Suzuki, Y. Sawada, T. Kogo, A. Ogawa, D. Kuroda, H. Kanematsu
2. 発表標題 Evaluation of Wettability Behavior of Pure Water on Silane Resin Coating Films
3. 学会等名 Interfinish2020 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 N. Hirai, M. Horii, N. Sugawara, H. Kato, K. Sano, A. Suzuki, Y. Sawada, T. Kogo, A. Ogawa, D. Kuroda, H. Kanematsu
2. 発表標題 Behavior of polysiloxane films in contact with aqueous solutions or biofilm simulating solutions
3. 学会等名 ISATE2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平井 信充, 菅原 菜々子, 加藤 妃華, 堀井 雅也, 佐野 勝彦, 鈴木 彰, 澤田 善秋, 幸後 健, 小川 亜希子, 黒田 大介, 兼松 秀行
2. 発表標題 各種基板上での模擬バイオフィルムの大気中および水中濡れ挙動の観察
3. 学会等名 電気化学会第88回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平井信充, 加藤妃華, 菅原菜々子, 堀井雅也, 佐野勝彦, 鈴木彰, 澤田善秋, 幸後健, 小川亜希子, 黒田大介, 兼松秀行
2. 発表標題 各種基板上への模擬バイオフィルムの濡れ挙動の観察
3. 学会等名 表面技術協会第143回講演大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平井信充, 加藤妃華, 菅原菜々子, 堀井雅也, 佐野勝彦, 鈴木彰, 澤田善秋, 幸後健, 小川亜希子, 黒田大介, 兼松秀行
2. 発表標題 各種基板上への模擬バイオフィルムの濡れ性評価
3. 学会等名 第26回高専シンポジウムオンライン
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤 妃華, 平井 信充, 幸後 健, 黒田 大介, 兼松 秀行, 佐野 勝彦, 澤田 善秋
2. 発表標題 各種基板上における模擬バイオフィルムの濡れ性評価
3. 学会等名 第30回日本MRS年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菅原 菜々子, 平井 信充, 幸後 健, 黒田 大介, 兼松 秀行, 佐野 勝彦, 澤田 善秋
2. 発表標題 各種基板上での模擬バイオフィルムの水中濡れ挙動の観察
3. 学会等名 第30回日本MRS年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平井 信充, 岩田 太, 兼松 秀行
2. 発表標題 バイオフィルム生成過程のSICMその場観察
3. 学会等名 第30回日本MRS年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川戸 渚, 平井 信充
2. 発表標題 バイオフィルム生成過程の光学顕微鏡その場観察
3. 学会等名 第30回日本MRS年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平井信充, 岩田太, 兼松秀行
2. 発表標題 バイオフィルム付着形態の走査型イオン伝導顕微鏡による水中その場観察
3. 学会等名 日本鉄鋼協会材料の組織と特性部会シンポジウム：「様々な環境における金属材料の腐食を考える～材料学・物理化学・電気化学・微生物学からのアプローチ～」
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平井信充, 岩田太, 兼松秀行
2. 発表標題 走査型イオン伝導顕微鏡によるバイオフィルム付着形状の液中その場観察
3. 学会等名 表面技術協会第142回講演大会
4. 発表年 2020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
研究 分 担 者	兼松 秀行 (Kanematsu Hideyuki) (10185952)	鈴鹿工業高等専門学校・その他部局等・特命教授 (54101)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	岩田 太 (Iwata Futoshi) (30262794)	静岡大学・電子工学研究所・教授 (13801)	

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