

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月10日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22560168

研究課題名（和文） 表面近傍での微生物運動の3次元観察法確立とモデル化

研究課題名（英文） Three dimensional observation and modeling of microorganism motion near a surface

研究代表者

後藤 知伸（GOTO TOMONOBU）

鳥取大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：00260654

研究成果の概要（和文）：表面近傍での微生物運動は、バイオフィーム形成と関連し、湖沼や海洋あるいは生体内の環境と密接に関わる。本研究を含む一連の研究では、細菌の表面への接近と集積を予測するためのモデルを作成することを目的としている。同期した2台の高速度カメラを用いて2方向同時顕微鏡観察を行い、表面近くでの細菌の位置と姿勢を同時に得た。データ取得時間を短縮するため、画像処理による自動計測、顕微鏡ステージの自動制御などの要素技術の開発を行った。

研究成果の概要（英文）：Swimming motion of microorganisms near a surface has close connection with the environment of lakes, marshes, oceans, or in vivo, in conjunction with the biofilm formation. The objective of this study is to make a model describing bacterial motion near a surface; approaching the surface and accumulation on the surface. We have performed bidirectional simultaneous microscopy using two synchronized high-speed cameras, and obtained simultaneously the position and posture of a bacterial cell near a surface. We have developed component technologies such as automatic measurement by the image processing, the automatic control of the microscope stage to shorten data acquisition time.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学・流体工学

キーワード：微生物運動，流体工学，3次元観察，数値解析

1. 研究開始当初の背景

環境中のバイオマスは、食物連鎖の底辺を占める微生物によるものが大きく、海洋や湖沼の環境問題と密接な関係にある。赤潮やアオコの異常発生は対流のみならず、走性に基づいた微生物の自律能動的な運動によって

おり、様々なスケールでの研究が実施されている。本研究は、主に流体力学的な観点から細菌の運動を一個体ずつ扱って、その運動機構の解明を行うと同時に、能動的に運動する微小粒子の拡散係数などについての現象論的なモデルを提供することを目的とする。

環境中の微生物分布には、栄養塩の供給場

所となる岩や泥、他の生物などの表面近傍での能動的な振舞いが大きく影響する。湖沼などでは表面近傍の分散が微生物の分布に大きく影響し、自由表面近傍での振舞いも重要となる。また、生殖細胞である精子は、固体表面近傍に集積することが報告されており、表面近傍での個々の細胞の振舞いが卵と遭遇する精子の選択や遭遇そのものに重要な役割を果たしている可能性がある。

細菌の遊泳運動に関しては、近年、細菌細胞の選別、コロニーの発達、バイオフィルムの形成などと関連して、表面と細菌運動の関係が注目されている。

2. 研究の目的

細菌の表面近くでの運動について、自由空間を運動する細菌とは明らかに異なる運動が見られる。例えば、固体表面との流体力学的な干渉により、軌跡が曲線状になること、速度が大きくなること、固体表面に向かって泳ぐ菌は表面近傍に留まりやすいこと、などである。本研究は、これらの研究を進展させて、自由表面を含む表面近傍での細菌の振舞いや、表面近傍への細菌の接近と集積を定量的に把握しようとするものである。

本研究の最終目的は、液体媒体中を運動する細菌が界面近傍に集積する細菌の挙動を明らかにし、集積特性のモデルを作ることにある。これによって、界面近傍における細菌数の増加に占める増殖と集積の割合の予測が可能になる。また、より複雑な複数種類の細菌や微生物が関与するバイオフィルム形成についての予備的な知見を与えるものと期待できる。

3. 研究の方法

本研究では、界面近傍での細菌運動の数値解析結果と観察結果の比較によって生じた疑問点を解消するため、とくに界面近傍における細菌運動を観察するための実験系の構築に主眼をおいた。すなわち、2個の対物レンズを用いた2方向同時顕微鏡観察による細菌の位置と姿勢の時系列把握、蛍光顕微鏡を用いたべん毛変形の確認を行った。

また、2方向顕微鏡観察を他の微生物の運動観察にも適用した。さらに、数値解析によって細菌の螺旋形べん毛の流体力学的な特性を調べた。

(1) 自由表面近傍での細菌運動の数値解析による予測

これまでの数値解析により、固体表面近傍においては細菌が表面に平行な面内で円運

動することが示されていた。これは、固体表面で流体の速度が0になるという境界条件があるためである。これに対して自由表面においては界面に平行な速度成分が0ではないために、固体表面とは異なる挙動となることが予想される。この点について、数値解析により調べた。

(2) 自由表面近傍での細菌運動の蛍光顕微鏡観察

数値解析では仮定がなされている。その内で、不確かさの大きいものとして、自由表面が変形しないということと、べん毛の回転以外には細菌形状は変形しないということがあげられる。これらの点を確認するために、(1)の数値解析と並行して、細菌運動の蛍光顕微鏡観察を行った。

(3) 2方向同時顕微鏡観察による細菌の位置と姿勢の把握

これまでの数値解析により、固体表面近傍への細菌の集積特性は細菌の姿勢に大きく依存していることが示されていた。

このことを実証するため、個々の細菌の位置と姿勢が同時に把握することを目的として、2方向からの同時観察を行った。2つの対物レンズを光軸が直交するように配置し、それぞれのレンズからの映像を同期した2台の高速度カメラで撮像した。

得られた2つの映像から細菌の菌体が短い俵型であることを利用して、位置と姿勢を算出した。また、これらの算出時間を短縮するため、これらを自動的に推定するプログラムを作成した。

(4) 渦鞭毛藻の運動への2方向顕微鏡観察法の適用

真核生物である渦鞭毛藻は屈曲する鞭毛を用いて遊泳運動する。鞭毛虫は横鞭毛と縦鞭毛など複数の鞭毛をもつ種も多いが、遊泳時のそれらの働きは明確になっていない。また、鞭毛に付随した膜状構造の有無について疑問がある。

2方向顕微鏡観察を鞭毛虫の観察に適用し、鞭毛虫の運動姿勢の観察を行った。

(5) 対象物を視野内に納め続けるトラッキング顕微鏡の試作

細菌や真核細胞微生物のように運動する対象物を顕微鏡で観察する場合、視野から対象物がはずれていってしまうことが、観察を困難にする。この問題は低倍率にして視野を広くすれば避けられるが、姿勢を把握することが困難となる。そこで、対象物の運動に合わせて顕微鏡ステージを動かし、対象物を継続的に視野内に捉えることができる顕微鏡を試作した。

(6) 螺旋形状の流体力学的特性の数値解析
細菌べん毛は螺旋形状であり、その回転によって流体から受ける反力が細菌の推進力となる。べん毛を長手方向に分割して考えると、屈曲運動する真核生物の鞭毛とは異なり、どの微小長さ要素も均一な推進力を出すことができる。また、バイオミメティクスの観点からは、細菌の単純な構造は模倣しやすい。これらの背景から、低レイノルズ数の状況で回転する螺旋形の流体力学的な特性を数値解析によって検討した。

4. 研究成果

(1) 自由表面近傍での細菌運動の数値解析による予測

変形しない自由表面の近くを運動する細菌の速度を境界要素法によって計算した。

固体表面近くの運動と同様に円形の軌跡を描くことが示されたが、その半径は固体表面の場合よりも大きく、円の回転方向が固体表面とは逆になる。

この結果は、既存の観察結果と完全には一致していない。

(2) 自由表面近傍での細菌運動の蛍光顕微鏡観察

単毛性細菌であるビブリオ菌の自由表面近くの運動を観察した。

自由表面近くにおいて、べん毛が変形している場合があることが確認できた。

(1)、(2)の研究成果は、既存の観察結果と数値解析結果の差異の原因の一候補として、数値解析では考慮されていない細菌べん毛の変形があげられることを示した。

細菌の表面への集積特性の理解には、ここに掲げたべん毛の変形の他にも個々の細菌の個体差も考える必要があり、今後の課題として残されている。

(3) 2方向同時顕微鏡観察による細菌の位置と姿勢の把握

2方向からの同期した画像を用いることにより、単毛性細菌 *Vibrio alginolyticus* が界面に近づいていき、円状の軌跡を描くときの位置と姿勢を取得することができた。これは、数値解析で得られていた界面近傍の運動と定性的には一致している。また、菌体を楕円近似して位置と姿勢を推定するプログラムを用いて、同じ映像からそれらの値を自動的に推定した。プログラムを利用することにより、位置と姿勢の取得時間が大幅に減少する。

しかし、現在の2方向顕微鏡観察では、対象をする細菌に焦点が常に合った状態を保

つことは難しく、映像中の細菌の像は濃淡が変化したり、輪郭がぼけたりする。このため、自動的に推定した位置、姿勢と、一枚ずつの画像から目視によって得られた位置、姿勢の間には菌体の短径程度のズレが生じている。今後、データの蓄積によって、位置、姿勢と細菌の界面近傍への集積特性が明らかになっていくものと期待でき、そのためにはデータ取得の自動化は避けられないが、現在のプログラムでは、精度面の問題が残る。

(4) 渦鞭毛藻の運動への2方向顕微鏡観察法の適用

渦鞭毛藻 *Symbiodinium* の運動を2方向顕微鏡観察法によって捉えることができた。横鞭毛の波の伝播方向と本体の回転方向が同じであることが示され、縦鞭毛が回転方向の制御に重要な役割を果たしていることが示唆された。

今後、縦鞭毛の運動も同時に観察し、流体力学的な運動解析と比較することにより、横鞭毛、縦鞭毛の機能の明確化ができる。

(5) 対象物を視野内に納め続けるトラッキング顕微鏡の試作

電動 XY ステージを顕微鏡に装着し、画像処理とステージの制御を組み合わせてトラッキング顕微鏡を試作した。回転運動している渦鞭毛藻 *Symbiodinium* を対象として、顕微鏡視野内に納めることができることを確認した。ステージの制御時間が律束段階になっているので、ステージの移動回数を減らすような方法をとっている。

今後、3次元ステージと2方向観察顕微鏡を組み合わせて、3次元トラッキングを目指す。

(3)、(4)の研究成果は、運動する微小対象物の観察法として、2方向顕微鏡観察法が有効であることを示している。細菌の界面集積特性のモデル化に必要なデータ蓄積のためには、(5)の対象物の3次元トラッキングの実現と合わせて、映像データの自動処理について、さらに改善が必要である。

(6) 螺旋形状の流体力学的特性の数値解析

螺旋形単体が螺旋軸まわりに回転するとき、推進力と回転に必要なトルクとの比が最大になるのは、螺旋の巻き数が1であるときであることが示された。巻き数が大きいときには、一部に逆流が生じており、これが巻き数の増加に対して推進力が線形的に増加しない原因となっていることがわかった。また、菌体が存在するときには、菌体がないときよりも推進力と回転トルクの比が大きくなることがわかった。

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4件)

- ① Tomonobu Goto, Tonau Nakai, Bacterial Locomotion in an Infinite Liquid Medium and in the Presence of a Nearby Surface, Journal of Aero Aqua Bio-mechanisms, 査読有 Vol. 3 (2013) No. 1, pp.2-7, https://www.jstage.jst.go.jp/article/jabmech/3/1/3_2/_pdf.
- ② 後藤知伸, 中井唱, 細菌の泳ぎと流体力学, 油空圧技術, 査読無, Vol. 51 (2012) No. 7, pp. 38-44.
- ③ 中井唱, 後藤知伸, 2方向同時観察による三次元顕微鏡システムの開発, ケミカルエンジニアリング, 査読無, 第56巻 (2011), 第1号, pp. 11-15.
- ④ Tomonobu Goto, Takafumi Maiguma, Tonau Nakai, Boundary Element Analysis on the Fluid-Dynamic Interaction between a Singly Flagellated Bacterium and a Free Surface, Journal of Aero Aqua Bio-mechanisms, 査読有 Vol. 1 (2010) No. 1, pp. 39-44, https://www.jstage.jst.go.jp/article/jabmech/1/1/1_1_39/_pdf.

[学会発表] (計17件)

- ① 三宅正芳, 中井唱, 後藤知伸, らせん型べん毛により推進する細菌の推進効率に関する数値解析, 日本機械学会第25回バイオエンジニアリング講演会(2013/1/9 於つくば)
- ② 植木裕太, 中井唱, 後藤知伸, 二方向同時観察法を用いた三次元自動追跡機能付き顕微鏡の試作(二次元平面内でのリアルタイム自動追跡), 日本機械学会 2012年度年次大会 (2012/9/12 於金沢)
- ③ Tonau Nakai, Ikuko Shihira-Ishikawa, Atsushi Miyawaki, Tomonobu Goto, Boundary Element Analysis and Three-Dimensional Observation of Propulsive Force and Torque of a Dinoflagellate *Symbiodinium*, The Fifth International Symposium on Aero Aqua Bio-Mechanisms (2012/8/26 台北)
- ④ Tomonobu Goto, Tonau Nakai, Bacterial Locomotion in an Infinite Liquid Medium and in the Presence of a Nearby Surface, The Fifth International Symposium on Aero Aqua Bio-Mechanisms (2012/8/26 台北)
- ⑤ Tonau Nakai, Ikuko Shihira-Ishikawa, Atsushi Miyawaki, Tomonobu Goto, BOUNDARY ELEMENT ANALYSIS OF PROPULSIVE

FORCE AND TORQUE OF A DINOFLAGELLATE SYMBIODINIUM, The 23rd International Congress of Theoretical and Applied Mechanics (ICTAM2012) (2012/8/20 北京)

- ⑥ 三宅正芳, 笠原浩平, 後藤知伸, 中井唱, 推進するらせん型の形状最適化に関するストークス流れの数値解析, 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会2012 (2012/5/28 於浜松)
- ⑦ 三上和博, 後藤知伸, 中井唱, 2方向の明視野顕微鏡像を用いた細菌の3次元位置及び姿勢の自動推定, 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会2012 (2012/5/28 於浜松)
- ⑧ 後藤知伸, 中井唱, 小谷鮎美, 界面近傍での細菌遊泳運動とべん毛変形の観察, 日本機械学会 第24回バイオエンジニアリング講演会 (2012/1/7 於大阪)
- ⑨ 中井唱, 村野ひとみ, 後藤知伸, 渦鞭毛藻 *Symbiodinium* の推進時に起る自転運動の三次元解析, 日本機械学会 第24回バイオエンジニアリング講演会 (2012/1/7 於大阪)
- ⑩ 三上和博, 中井唱, 後藤知伸, 同期した2つの映像から細菌の妥当な位置及び姿勢を算出するプログラムの開発, 日本機械学会 第24回バイオエンジニアリング講演会 (2012/1/7 於大阪)
- ⑪ 中井唱, 村野ひとみ, 後藤知伸, 渦鞭毛藻 *Symbiodinium* の自転によるトルクの2方向同時観察による解析, 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会2011 (2011/5/28 於岡山)
- ⑫ 井上拓哉, 中井唱, 後藤知伸, 単毛性細菌と境界の相互作用による形状及び遊泳運動の変化, 日本機械学会 中国四国支部第49期総会・講演会 (2011/3/5 於岡山)
- ⑬ 笠原浩平, 中井唱, 後藤知伸, らせん型の推進効率の形状依存性に関する境界要素解析, 日本機械学会 2010年度年次大会 (2010/9/6 於名古屋)
- ⑭ 井上拓哉, 中井唱, 後藤知伸, 細菌の遊泳軌跡の曲率と境界からの距離との関係ピントはずれを利用した観察, 日本機械学会 2010年度年次大会 (2010/9/6 於名古屋)
- ⑮ Tomonobu Goto, Ryo Katayose, Takuya Inoue, Tonau Nakai, Three Dimensional Observation of Bacterial Swimming Motion near a Surface, 6th World Congress of Biomechanics (2010/8/3 Singapore)
- ⑯ Tonau Nakai, Ikuko Shihira-Ishikawa, Atsushi Miyawaki, Tomonobu Goto, Boundary Element Analysis of Propulsion of a Dinoflagellate *Symbiodinium*

Generated by a Transverse Flagellum
with a Membrane, 6th World Congress of
Biomechanics (2010/8/3 Singapore)

- ⑰ 片寄 良, 井上拓哉, 後藤知伸, 中井 唱,
境界近傍での単毛性細菌の位置・姿勢の同
時計測, 日本機械学会 ロボティクス・メ
カトロニクス講演会 2010(2010/6/16 於
旭川)

[その他]

ホームページ等

<http://www.damp.tottori-u.ac.jp/~lab5/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 知伸 (GOTO TOMONOBU)

鳥取大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：00260654

(2) 研究分担者

中井 唱 (NAKAI TONAU)

鳥取大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：80452548