

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24760136

研究課題名(和文) 界面近傍における細菌集団のマルチスケール三次元解析

研究課題名(英文) Three Dimensional Analysis of the Locomotion of Bacteria near a Surface

研究代表者

中井 唱 (NAKAI, Tonau)

鳥取大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80452548

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：細菌がバイオフィームなど壁面上に集団を形成するメカニズムを明らかにするために、細菌の界面近傍での3次元運動の観察を行った。2方向から同一対象物を観察できるような顕微鏡光学系を組み、画像処理により細菌の位置を自動取得し、細菌の3次元遊泳軌跡を容易に計測する手法を確立した。また、細菌の密集時に発生する集団運動の計測を行った。集団運動を行うには、平均の細菌間距離が約5 μm 以下になる必要があることが分かった。集団運動の度合いを示す指標として、個々の細菌の速度ベクトルの相関を調査した。ランダムな遊泳時と集団運動時では、距離が10 μm における相関に大きな差が出ることが分かった。

研究成果の概要(英文)：To find the mechanism of formation of bacterial biofilm, we observed 3 dimensional swimming motions of bacteria. We constructed the biplane microscopy that has two orthogonal optical axes. By analysis of the obtained images, 3D trajectories of bacterial swimming are measured. We also conducted measurement of the collective motion of bacteria. *Bacillus subtilis* cells swim collectively when the culture medium becomes crowded with the average distance less than 5 micrometers. To quantify the degree of collective motion, we compared the velocity correlation of swarmer cells with that of randomly swimming cells. Large difference is found at the distance of 10 micrometers, which is several times as long as the size of a cell.

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：細菌 集団運動 べん毛 3次元計測 顕微鏡 流体解析 画像処理

1. 研究開始当初の背景

微生物は自然環境のサイクルにおける分解者としての役割や発酵食品の生成など、古来より人類の生活を支えてきた。これら微生物のほとんどは、エサとなる有機物のごく近傍に集団で存在している。例えば歯垢や台所のヌメリはバイオフィームと呼ばれ、細菌どうしが相互作用することで一種のコミュニティのようなものを形成していると言われている。近年、これら微生物群を積極的に利用し、環境改善や新たなエネルギー資源に役立てる動きが起こっている。バイオフィームの発生を抑える、あるいは任意の場所に形成させる、等の制御が可能になれば、環境・衛生・食品などの分野に大きく貢献するであろう。しかし現状では「この菌を池に投入すると水がきれいになった」など、肝心の微生物の動きを把握しないままにこれらの技術が手当たり次第に使われている。またその効果について十分に検証が行われていない。将来微生物を積極的に利用するには、微生物集団の動きや、時空間パターンのダイナミクスを物理の視点から捉えることが必要であると考え。そこで、本研究ではバイオフィームの成長・発達の予測を目標とする。

これまでに、界面と細菌運動に関する研究が行われてきた(Diluzioら(2005), Frymierら(1995), Bergら(1990))。我々は、単毛性細菌の界面近傍での遊泳特性に着目し、これまでに以下の成果を得ている。

- (1) 個々の細菌の界面への集積現象を観察しており、固体壁だけでなく水面など自由表面にも集積しやすいこと、界面による遊泳運動の変化が計測されている。また前進よりも後退遊泳時に界面に集まりやすいことが分かった。
- (2) 2方向からの同時観察により、界面近傍における細菌運動の三次元観測に成功した。
- (3) 流体力の影響を考慮した遊泳計算を行い、界面の流体力学的影響を裏付ける結果が得られている。

これらから、細菌は界面近傍を遊泳する際に、界面からの流体力学的影響を大きく受けることが明らかになっている。上記は個々の細菌に及ぼす界面の流体力学的影響を調査したものであるが、これらの影響により、さらに大きなスケールのコロニーやバイオフィ

ームの形成にも影響を及ぼすものと考え。そこで本研究では、1体の細菌が界面に集まり、バイオフィームのような界面に付着した集合体の形成までの過程を、様々な時空間スケールで解析することを目指す。界面からの距離により細菌の振る舞いが異なると考えられるので、界面近傍における細菌の集団を三次元観察し、数値解析との比較を行う。また、自然界に見られるバイオフィームの3次元観察を行い、単一種の細菌集団と振る舞いの違いを比較する。これまでに培地上における細菌の動きやすさによりコロニー形状が変化するなどの研究はなされているが、本研究は、ミクロスケールで見た個々の細菌の運動特性や細菌どうしの相互作用を流体力学的に解析し、コロニー形状などのマクロスケール特性との関連を明らかにしようとするものである。バイオフィームの増殖、除去などの制御をするためにはバイオフィームが作られるまでの過程を明らかにする必要があると考え。

2. 研究の目的

- (1) 現在開発中の三次元観察顕微鏡を発展させ、より広範囲で三次元観察できるようにする。また、三次元計測の自動化を行い、複数の細菌の運動を容易に解析できるようにする。
- (2) 細菌の運動モードの違い(前進・後退運動)による、コロニー成長の違いをみる。可能であれば、実際のバイオフィームを観察し、培地中の細菌集団との違いを見る。
- (3) 数値計算においては、らせん形ペン毛の回転を模擬したシミュレーションを行い、2体の菌が接近したときの流体力や流れ場を解析できるようにする。

観察・数値計算結果を比較し、個々の細菌の運動特性とコロニーサイズ程度の流動特性との関係を解明することを研究期間内の達成目標とする。

バイオフィーム内の階層構造は、a)1体の細菌、b)2体の相互作用、c)サブmmスケールのマクロな流動、d)バイオフィーム全体、のように大まかに分けられると考えられるが、本研究では図1に示すように、b)における細菌の挙動を明らかにし、c)d)における数値モデルを提唱することを目標とする。

3. 研究の方法

(1) 複数対象物の三次元運動計測における自動化、精度向上

我々が現在開発中の三次元観察装置を図1に示す。2台の顕微鏡、カメラを用いて2方向から細菌を同時撮影することで三次元解析を実現している。三次元観察可能な範囲は用いる対物レンズの焦点深度に大きく影響する。大きさ数 μm の細菌を観察する際には高倍率のレンズが必要である。現段階では $100\mu\text{m} \times 20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ の三次元空間を観察可能であるが、領域の端ではいずれか一方の画像が焦点から外れてしまい、正確な計測が困難となっている。本研究では複数の細菌を同時観察するので、観察範囲を広げ、計測精度の向上をはかる必要がある。このために、焦点深度の深い対物レンズおよび長作動対物レンズを購入する。また、観察チャンバーの形状を工夫して、ガラスの反射光などが視野に入らないようにする。

得られた細菌の動画を、画像処理を用いて自動的に菌体の3次元位置・姿勢情報の時系列データを抽出できる処理系を構築する。具体的には、得られた細菌の画像を輪郭抽出し、菌体の重心位置と姿勢角を推定するプログラムを作成する。2方向の映像それぞれにこの処理を施すことで、細菌遊泳の三次元情報を取得する。

(2) 細菌の集団運動による流れの計測

細菌を半流動培地上で培養することで、運動性を持った細菌を密集して増殖させることができる。これにより、バイオフィームと同様な状況である細菌の集団運動を発生させることができる。本研究では枯草菌 *B. subtilis* を用いて、集団運動が作り出す渦の計測を行った。細菌数密度の増加とともに、速度相関にどのような差が出るかを計測した。

(3) 近接して回転する2本の細菌べん毛の流体解析

2体の細菌が近接する場合の相互作用を調べるため、軸周りに回転するらせん型べん毛モデルを近接させて流体解析を行った。モデルは剛体とし、菌体の代わりにべん毛の一端に固体壁を設け、べん毛間に働く力を調査した。

4. 研究成果

(以下の各項目は、上記3. 研究の方法(1)(2)(3)と対応。)

(1) 2方向からの顕微鏡観察により、細菌の遊泳軌跡が界面により影響を受ける様子を捉えることができた。2方向の顕微鏡映像から、菌体の3次元位置および姿勢を自動計測するプログラムを開発した。2方向観察法では対物レンズを固定しているた

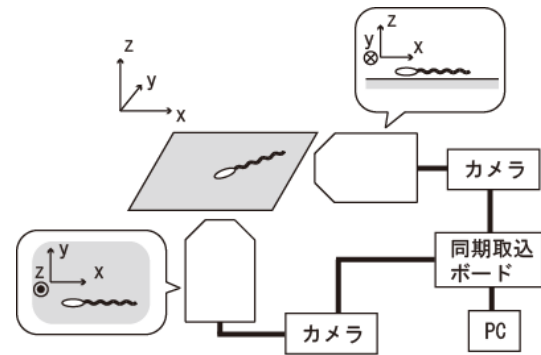


図1：三次元観察装置の概念図。

め、俵型の菌体の輪郭は映像中ではぼやけている。そこで、画像処理により輪郭を抽出し、楕円曲線で近似した。位置については $0.5\mu\text{m}$ の精度で推定可能となり、回折限界近くの大きさの対象物が3次元計測可能なことを示した。姿勢角については数十度の誤差が生じた。

また、3次元的に動き回る微生物を拡大して長時間観察するための、対象物自動追跡顕微鏡を開発した。現有の2方向観察顕微鏡の試料台を電動ステージにし、対象物の動きに合わせてステージをコントロールした。これにより、2方向観察法において対象物が動くときでもピントがずれずに観察可能である。現段階では1秒以内に視野から外れる $10\mu\text{m}$ 程度の対象物を追跡し続けることが可能である(図2)。上記2のプログラムを適用すれば、遊泳する細菌の追跡も可能となる。

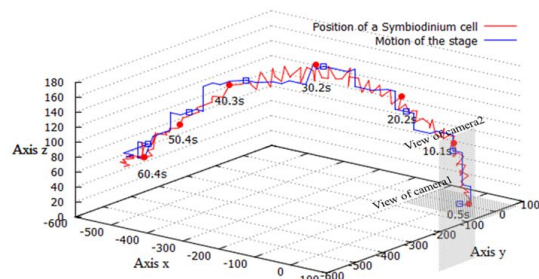


図2：微生物（渦鞭毛藻）の顕微鏡下での3次元追跡。

(2) 細菌の集団運動の定量化を行った。細菌は単体では直進運動するのに対して、半流動培地のような密集して遊泳する状態では集団行動 (swarming) して $10\mu\text{m}$ スケールの渦を形成する。顕微鏡観察により、swarming は細菌どうしの平均距離が $5\mu\text{m}$ 以下になると起こることが分かった。また、個々の速度ベクトルの相関を計測し、同様な数密度でも swarming 状態とランダムな遊泳状態では相関に差が出る事が分かった(図3)。

(3) 2本の細菌べん毛が近接して回転する

場合の流体力の数値解析を、剛体モデルを用いて行った。べん毛が同方向に回転するとき、べん毛の付け根(菌体近く)で引力が生じることが分かった。ただし、べん毛先端では離れる方向に作用するため、周毛性細菌のべん毛のバンドル化や複数の細菌のクラスター化を説明できるまでには至っていない。

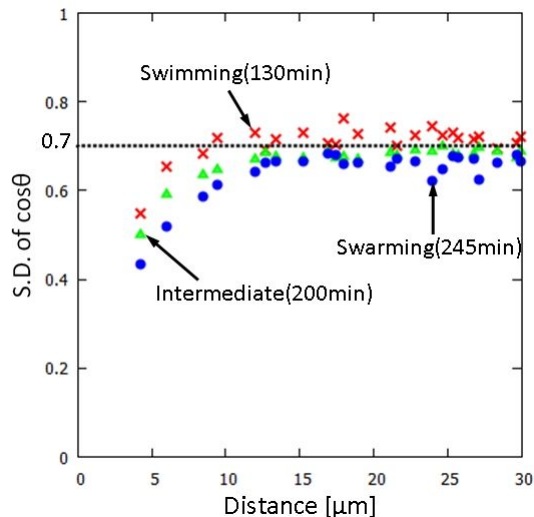


図 3：細菌集団における速度相関の計測。

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 5 件)

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*", Journal of Aero Aqua Bio-mechanisms Vol. 3, No. 1, pp. 79-84 (2013), 査読有, https://www.jstage.jst.go.jp/article/jabmech/3/1/3_79/_article
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 Vol. 3, No. 1, pp. 2-7 (2013), 査読有, https://www.jstage.jst.go.jp/article/jabmech/3/1/3_2/_article
 後藤知伸, 中井唱, "細菌の泳ぎと流体力学", 油空圧技術 2012 年 7 月号(637. Vol. 51., No. 7), pp. 38-44, 査読無.

〔学会発表〕(計 19 件)

日本機械学会 中国四国支部第 52 期講

演会(2014/3/7 鳥取大学)"二方向同時観察法を用いた微生物の三次元自動追跡"植木裕太, 中井唱, 後藤知伸

日本機械学会 中国四国学生会第 44 回学生員卒業研究発表講演会(2014/3/6 鳥取大学)"細菌の集団運動による物質輸送の粒子画像解析"小寺広起, 中井唱, 後藤知伸

日本機械学会 中国四国学生会第 44 回学生員卒業研究発表講演会(2014/3/6 鳥取大学)"近接して回転する二本のらせん型べん毛の流体解析"神田将志, 中井唱, 後藤知伸

日本機械学会 2013 年度年次大会(2013/9/10 岡山大学)"細菌の速度の解析による集団運動の定量化"毛利佳裕, 中井唱, 後藤知伸

The 7th Asian Pacific Conference on Biomechanics (2013/8/31 KIST, Seoul, Korea) "Analysis of Velocity Correlation in Bacterial Swarming" Tonau NAKAI, Yoshihiro MOURI, Tomonobu GOTO.

日本機械学会 中国四国支部第 51 期講演会(2013/3/8 高知工科大学)"同期した二方向映像の輝度変化に対応した細菌の三次元位置及び姿勢の自動推定"三上和博, 中井唱, 後藤知伸

The 23rd International Congress of Theoretical and Applied Mechanics (ICTAM2012) (2012/8/20, China National Convention Center 北京, 中国) "BOUNDARY ELEMENT ANALYSIS OF PROPULSIVE FORCE AND TORQUE OF A DINOFLAGELLATE SYMBIODINIUM" Tonau Nakai, Ikuko Shihira-Ishikawa, Atsushi Miyawaki, Tomonobu Goto.

〔産業財産権〕

取得状況(計 1 件)

名称: 三次元顕微鏡装置及び同装置を用いた観察・測定法

発明者: 後藤 知伸、中井 唱、菊田 誠之
 権利者: 国立大学法人鳥取大学

種類: 特許

番号: 特許第 5300522 号

取得年月日: 平成 25 年 6 月 28 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中井 唱 (NAKAI, Tonau)

鳥取大学・工学研究科・助教

研究者番号: 8 0 4 5 2 5 4 8