

走査型イオン伝導顕微鏡を用いた バイオフィルムの初期成長過程の観察

[1] 組織

代表者：平井 信充

(鈴鹿工業高等専門学校)

対応者：岩田 太

(静岡大学電子工学研究所)

分担者：

飯田 壮葵 (鈴鹿工業高等専門学校)

江口由祐 (静岡大学大学院 工学研究科)

[2] 研究経過

バイオフィルムとは菌垢や台所のヌメリなど、基質と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。生物由来の膜上物質であり、細菌の作用により材料表面に形成される。細菌は材料表面に形成されたバイオフィルム中に生息し、材料と相互作用を起し、腐食劣化や生物付着にともなう機能劣化などさまざまな現象を引き起こす。

バイオフィルムの構造として基質に付着した細菌が、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。しかしながらバイオフィルムの初期形成やその構造の詳細については光学顕微鏡では分解能が十分でなく、観察が困難である。また電子顕微鏡による観察では水分を含んだ本来の構造を観察することができない。原子間力顕微鏡を用いてバイオフィルムの形態を観察しようとした場合、カンチレバーによる探針との相互作用により軟らかいバイオフィルムを変形させながら観察している可能性があり、正しく観察評価できているとは言い難い。

走査型イオン伝導顕微鏡 (Scanning Ion Conductance Microscopy : SICM) は液中環境においてイオン電流を検出することによりプローブを制御し、試料の表面形状を取得できるバイオ分野で有効なイメージングデバイスである。プローブ先端が非接触で走査できることから、試料表面との相互作用力は原子間力顕微鏡に比べて非常に小さく、軟らかい試料でも形状を歪ませることなく観察できる。ま

た液中環境にて観察できるため、バイオフィルムが形成された環境を保った状態での観察が可能となる。さらにアスペクト比の高いナノピペットをプローブとしているため、液中において立体的に形成されたバイオフィルムの状態を高分解能で観察できることが期待できる。

本研究は電子工学研究所生体計測研究部門の岩田研究室にて開発している走査型イオン伝導顕微鏡を用いてバイオフィルムの観察を行い、バイオフィルムの研究におけるイメージングデバイスとしての走査型イオン伝導顕微鏡の可能性について検討することを目的として取り組んだ。バイオフィルムの観察で得られた知見をもとに、バイオフィルムの形成過程を観察するための SICM 原理を基礎とした顕微イメージングデバイス開発の可能性についても検討した。以下に、研究活動状況の概要を記す。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

(1) バイオフィルム試料の作製

鈴鹿工業高等専門学校の平井研究室にて実験室バイオフィルム加速生成試験機(以下 LBR)を用いて様々な初期成長過程のバイオフィルム試料を作製した。図1に示す LBR を用いて、ポンプにより1~2週間程度水道水を循環させることにより、substrate

部に設置した基板の上にバイオフィルムを形成した。経路の途中にある傾斜板上で fan により循環水に直接大気をあて、大気中の細菌を水中に巻き込む構造により、いくつかの条件におけるバイオフィルムの初期成長過程の試料を作製した。

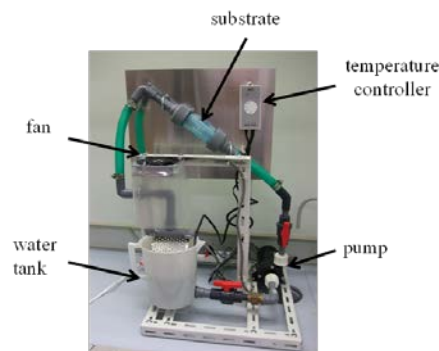


図1 LBR の外観写真

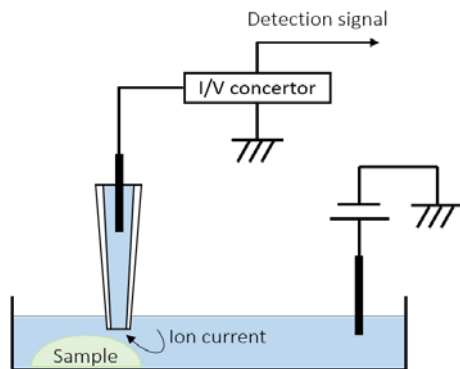


図2 SICMの原理

(2) SICMを用いたバイオフィーム観察

上記試料を静岡大学電子工学研究所の岩田研究室において走査型イオン伝導顕微鏡(SICM)を用いて観察しバイオフィーム成長における知見を得るとともに、バイオイメージングデバイスとしてのSICMを用いたバイオフィーム評価法の可能性を検討した。

SICMは開口径100 nm程度のナノピペットをプローブとして用いた。電極をピペット内部と外部に挿入し、電圧を印加するとナノピペット開口をイオン電流が流れる。このイオン電流はナノピペット-試料間距離に依存している。ナノピペットが試料表面へとアプローチしていくとナノピペット開口が試料表面によって閉塞されることによりイオン電流が減衰していく。このイオン電流を検出することで距離制御を行い、試料表面の形状像を取得することが可能である。SICMの測定方法として、ナノピペットを試料から十分に離れた場所から振り下ろし、イオン電流が閾値よりも減衰した時点での高さ情報を1画素ずつ取得して画像化を行う方法をバックステップモードという。これにより起伏の激しい試料に対してナノピペットが試料と接触することなく走査可能となる。本研究ではこの手法を用いてバイオフィームを測定した。

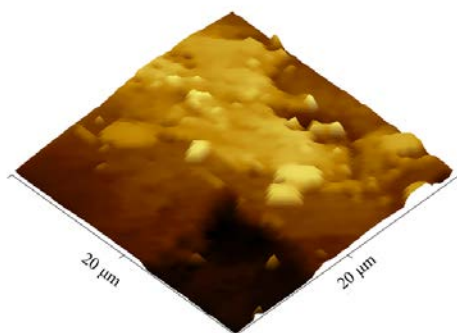


図3 SICMを用いて観察したバイオフィーム

図3にSICMで観察したバイオフィームについて示す。基板上に初期成長している様子について観察できていることがわかる。生理食塩水中におけるやわらかい生のバイオフィームの状態について観察できていることが分かる。本研究では緑膿菌の観察も実現しており、生のバイオフィームや細菌類などを観察する上でSICMの有効性を示すことができた。また観察を行ううえでの測定パラメータの最適化やSICM観察に適した試料の作製条件など重要な知見を得ることができた。

(3-2) 波及効果と発展性など

バイオフィームは身の回りのさまざまなところに存在しており、材料表面において相互作用し、腐食劣化や生物付着にともなう機能劣化などさまざまな現象を引き起こすことが知られている。しかしながらその構造や形成メカニズムについて観察手法が十分でなく、明らかになっていないことが多かった。

本研究成果は負荷効果が極めて少ないバイオイメージングデバイスであるSICMを用いたバイオフィーム観察であり、これまでの観察が困難であった生のバイオフィーム構造を高分解能で観察可能であることを示すことができた。将来的には成長の様子や機能発現などをその場観察できる可能性があり、学術的意義は極めて大きい。本プロジェクトは、日本鉄鋼協会 評価・分析・解析部会「バイオフィーリング、バイオフィーム評価分析解析研究」フォーラムにおいて発表した際、学外研究者に大変興味と関心をもっていただいた。また次年度に向けて関連テーマで科学研究費を申請しており、今後の発展が期待できる。

[4] 成果資料

- (1) 岩田 太、“走査型プローブ顕微鏡マニピュレータの開発とバイオ試料への応用”，日本鉄鋼協会 評価・分析・解析部会、「バイオフィーリング、バイオフィーム評価分析解析研究」フォーラム，平成27年12月22日（鈴鹿工業高等専門学校）
- (2) 飯田 壮葵、平井 信充、生貝 初、岩田 太、“各種顕微鏡による海洋性ビブリオフィームの観察”，第21回高専シンポジウム in 香川，平成28年1月23日（丸亀市民会館）

出張報告

氏名：平井 信充

所属：鈴鹿工業高等専門学校

期間：平成27年6月3日～平成27年6月4日

用務先：静岡大学

用務内容：走査型イオン伝導顕微鏡を用いたバイオフィルム観察に関する実験を行う。

主たる対応者：岩田 太

氏名：飯田 壮葵

所属：鈴鹿工業高等専門学校

期間：平成28年9月24日～平成28年9月25日

用務先：静岡大学

用務内容：走査型イオン伝導顕微鏡を用いたバイオフィルム観察に関する実験を行う。

主たる対応者：岩田 太

氏名：平井 信充

所属：鈴鹿工業高等専門学校

期間：28年9月24日～平成28年9月25日

用務先：静岡大学

用務内容：走査型イオン伝導顕微鏡を用いたバイオフィルム観察に関する実験を行う。

主たる対応者：岩田 太