

微生物に優しい光濃縮技術の開発に成功

バブルを模倣した基板で乳酸菌を生きのまま
大面積捕集できる原理を世界で初めて発見！

大阪府立大学（学長：辰巳砂 昌弘）21 世紀科学研究センター LAC-SYS 研究所の研究チーム（林 康太（大学院理学系研究科 博士前期課程 2 年）、飯田 琢也 所長、床波 志保 副所長ら）は、従来の光発熱集合の際に発生する気泡と同程度の大きさである直径 100 μm のビーズ（擬似気泡）の上部を白金でコーティングしたバブル模倣基板にレーザーを照射することで、レーザーの出力を高めても乳酸菌を生きのまま（95%以上の高生存率を保持）かつ遠隔的に高密度で集積できる新原理を世界で初めて発見しました。

本研究成果は、光による生体サンプルへのダメージを極限まで抑制して高濃縮する新原理を発見したもので、迅速・高感度・簡便な細菌・ウイルスなどの微生物検査法の革新につながります。

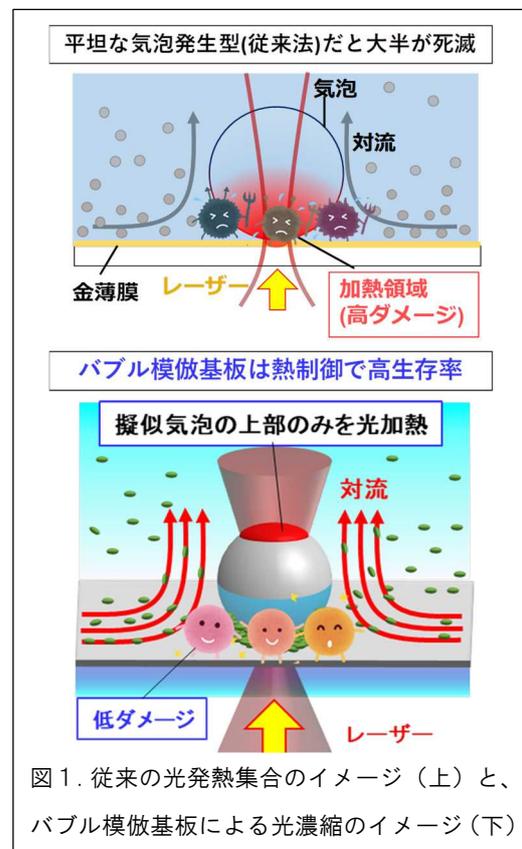
なお、本研究成果は国際科学誌「Communications Biology」に 3 月 22 日（月）19 時（日本時間）にオンライン掲載されます。

<研究概要>

食品中や飲料水中の細菌数の計測や細菌の機能評価には主に培養法が使われていましたが、数日単位の長い時間が必要でした。特に、密集した細菌の機能を迅速に評価する方法は、細菌間相互作用を効率的に研究する上で重要な課題でした。もし、多数の生きた微生物を遠隔的に濃縮してそれらの相互作用の解明や反応の制御・加速ができれば、数日を必要とする培養プロセスを省略でき、機能分析の劇的な時間短縮や高感度化、高効率化、低コスト化にもつながります。

今回、本研究チームが開発した、生存率向上と捕集効率向上、精度向上のトレードオフを克服できる革新的なバブル模倣型の基板を使用することにより、乳酸菌を生きのまま（95%以上の高生存率を維持）かつ迅速に集積することに成功しました。特に、トラップ領域（注1）のサイズのばらつきが少ない固液界面での光濃縮を実現し、わずか 300 秒間で 40000 cells を集積できる高い捕捉性能も示しました。

本研究成果は、光による生体サンプルへのダメージを極限まで抑制して高濃縮する新原理を発見したもので、迅速・高感度・簡便な細菌・ウイルスなどの微生物検査法の革新につながります。また、多様な生体サンプルのバイオ分析や、プロバイオティクス（注2）などで重要となる細菌間相互作用の理解の深化にも貢献でき、人類の健康増進につながる基礎研究における重要な知見を与えるものです。



【本研究に関するお問い合わせ】大阪府立大学 LAC-SYS 研究所

所長 飯田琢也 TEL:072-254-8132 (t-iida [at] p.s.osakafu-u.ac.jp)

副所長 床波志保 TEL:072-254-9824 (tokonami [at] chem.osakafu-u.ac.jp)

【JST 事業に関するお問い合わせ】科学技術振興機構 未来創造研究開発推進部 水田寿雄

TEL : 03-6272-4004 (kaikaku_mirai [at] jst.go.jp)

※ [at] の部分を@と差し替えてください。

<発表雑誌>

本研究は2021年3月22日(月)19時(日本時間)に、英国 Nature Research が刊行する学術雑誌「Communications Biology」にオンラインで公開されます。

<雑誌名>

Communications Biology

<論文タイトル>

Damage-free Light-induced Assembly of Intestinal Bacteria with a Bubble-mimetic Substrate

<著者>

林康太^{1,2,3}、山本 靖之^{1,2,3}、田村 守^{1,3}、床波 志保^{2,3,*}、飯田 琢也^{1,3,*} (*責任著者)

¹大阪府立大学 大学院理学系研究科 物理科学専攻

²大阪府立大学 大学院工学研究科 応用化学分野、³大阪府立大学 LAC-SYS 研究所

<DOI 番号>

DOI: 10.1038/s42003-021-01807-w

<SDGs 達成への貢献>

大阪府立大学は研究・教育活動を通じて SDGs17 の目標への貢献および地球全体の持続可能な発展に貢献しています。本研究は SDGs17 の目標のうち、「3:すべての人に健康と福祉を」「6:安全な水とトイレを世界中に」「9:産業と技術革新の基盤をつくろう」「14:海の豊かさを守ろう」「15:陸の豊かさを守ろう」等に貢献しています。



<研究助成資金等>

本研究は、主に JST 未来社会創造事業 探索加速型「共通基盤」領域の課題「低侵襲ハイスルーブット光 濃縮システムの開発(研究開発代表者:飯田琢也、共同研究者:床波志保、中瀬生彦)」(JPMJMI18GA)の下で実施され、科学研究費助成事業(科研費)基盤研究(A)(JP17H00856)、基盤研究(B)(JP18H03522)、新学術領域(JP16H06507)、若手研究(JP20K15196)、国立研究開発法人 日本医療研究開発機構(AMED) ウイルス等感染症対策技術開発事業(JP20he0622017)、公益財団法人 村田学術振興財団、大阪府立大学キーププロジェクトからの支援を受けて行われました。

【本研究に関するお問い合わせ】 大阪府立大学 LAC-SYS 研究所

所長 飯田琢也 TEL:072-254-8132 (t-iida [at] p.s.osakafu-u.ac.jp)

副所長 床波志保 TEL:072-254-9824 (tokonami [at] chem.osakafu-u.ac.jp)

【JST 事業に関するお問い合わせ】 科学技術振興機構 未来創造研究開発推進部 水田寿雄

TEL: 03-6272-4004 (kaikaku_mirai [at] jst.go.jp)

※ [at] の部分を@と差し替えてください。

<研究内容>

【1. 研究の背景】

細菌などの微生物間の相互作用の理解は人間の健康と環境問題にとって重要な課題です。なかでも、微生物のクオラムセンシングとプロバイオティクスは大きな注目を集めています。クオラムセンシングは、細菌間の相互作用から生じる物質産生メカニズムとして知られており、発光バクテリアに起因するイカの発光の原因や、低濃度では病原性を発現しない日和見細菌に起因する感染の原因であるとも考えられています。このような細菌間相互作用はシグナル伝達分子を介して高密度条件下で遺伝子発現を決定すると考えられ、病原性を抑制するためにクオラムセンシングを阻害する薬剤の研究開発も行われています。また、アレルギー性疾患の抑制など腸内細菌叢とヒトの健康に密接にかかわるプロバイオティクスの研究も活発であり、腸の状態を整える乳酸菌を含む飲料や薬なども広く普及しています。これらの細菌間相互作用で使用されるシグナル伝達分子の濃度 (nM (=10⁻⁹ モル/リットル)) は、従来の分析方法で検出するには低過ぎるため、人工的にシグナル伝達分子を含む細菌をサンプリング液体に添加したり、1日以上かけて培養して細菌数を増やしたり、遺伝子操作で発光するようにした細菌を使うなど、多工程かつ長時間の前処理を行った後ようやく本格的な研究が始められるといった状況でした。

このような課題から、生きた微生物を培養などの前処理なしで迅速かつ高密度に濃縮・集積をおこなうことができれば、様々な微生物間の相互作用や生体サンプル間の相互作用を加速して制御できるため、バイオ分析の大幅な高感度化と時間短縮につながるものが期待されます。生体サンプルの制御技術の例として、光ピンセット (注3) が知られており、少数の生体サンプルの空間配置と運動を正確に操作するには優れた技術ですが、作用範囲がレーザーのスポット近傍に限定されるなどの制約がありました。また、誘電泳動などの方法では電極が必要で、密度も稼げず、従来の金属ナノ薄膜 (注4) を用いた光発熱集合 (注5) では、生体サンプルにダメージを与えてしまうことが課題でした。これらの背景から本研究の着想に至りました (図2)。

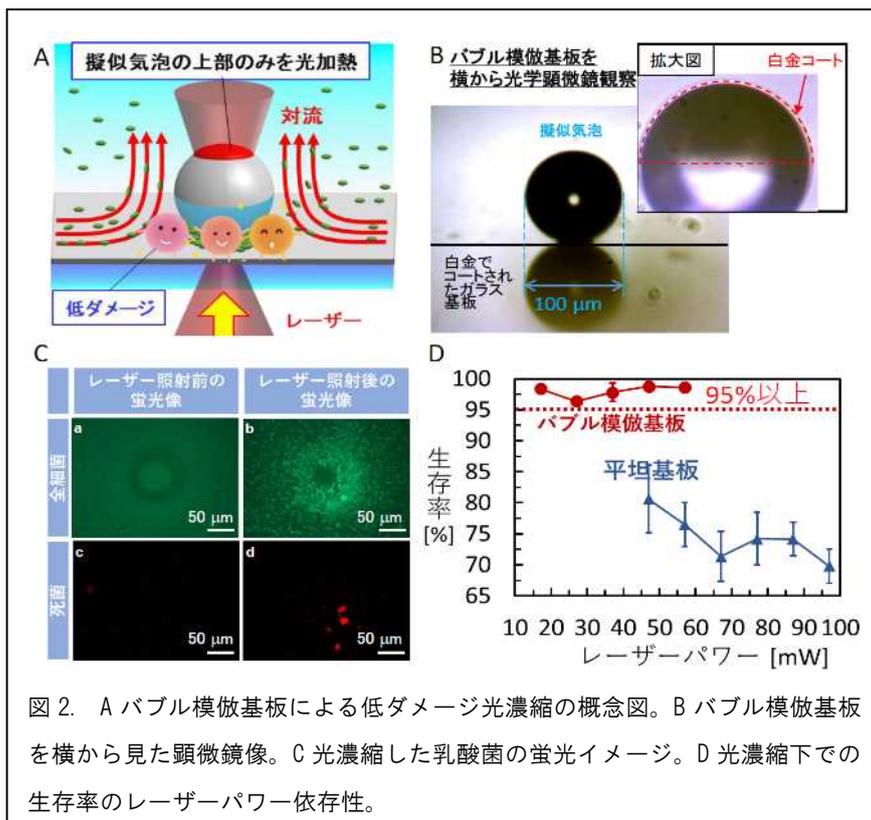


図2. A バブル模倣基板による低ダメージ光濃縮の概念図。B バブル模倣基板を横から見た顕微鏡像。C 光濃縮した乳酸菌の蛍光イメージ。D 光濃縮下での生存率のレーザーパワー依存性。

【本研究に関するお問い合わせ】大阪府立大学 LAC-SYS 研究所

所長 飯田琢也 TEL:072-254-8132 (t-iida [at] p.s.osakafu-u.ac.jp)

副所長 床波志保 TEL:072-254-9824 (tokonami [at] chem.osakafu-u.ac.jp)

【JST 事業に関するお問い合わせ】科学技術振興機構 未来創造研究開発推進部 水田寿雄

TEL : 03-6272-4004 (kaikaku_mirai [at] jst.go.jp)

※ [at] の部分を@と差し替えてください。

【2. 研究方法】

直径 $100\ \mu\text{m}$ のポリスチレンビーズを擬似気泡として化学的にガラスボトムディッシュに固定し、その上からイオンパッタにより白金 (Pt) 薄膜をコーティングしてバブル模倣基板を作製しました (図 2A, B)。特に、乳酸菌の一種である *Lactobacillus casei* (以下、*L. casei*) を対象とし、生死判定を行うために生きた細菌を含む全細菌を染色する緑色の蛍光色素 (SYTO 9) と死菌だけを染色する赤色の蛍光色素 (PI) を用いました。実験に用いた光学系は、倒立型の顕微鏡で下方からレーザーを直径 $100\ \mu\text{m}$ のビーズの頂上にコートされた Pt 薄膜にデフォーカスして照射し、15~60 mW 程度の出力範囲で光濃縮を行いました。また、光発熱効果と対流のシミュレーションによる評価も行いました。

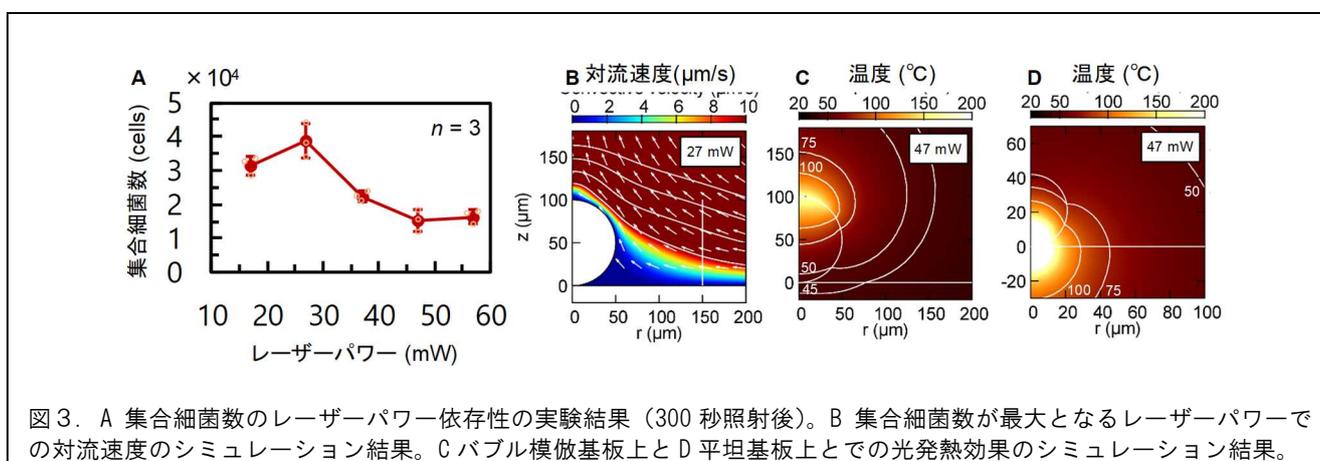
【3. 研究成果】

図 2C, D は蛍光染色した *L. casei* の光濃縮の主な実験結果ですが、光発熱効果による対流を利用しつつも 95% 以上の生存率を維持し、図 3A のように数分間で $10^4 \sim 10^5$ 個オーダーの高い集合数を実現しました。

また、電磁気学と熱流体力学を融合したシミュレーションで評価した対流速度 (図 3B) に基づいて、擬似気泡周囲に流入する細菌数が約 5 万個となることを示し、実験でトラップされた細菌数のオーダーと整合することも示しました。従来の光発熱集合は浮力対流と水平対流に加えて、気泡の発生とその表面でのマランゴニ対流 (注 6) が分散質の輸送における重要なファクターであると考えられてきました。しかしながら、擬似気泡としてのサブミリメートル大のビーズ表面の固液界面ではマランゴニ対流ゼロの極限で物質輸送ができることを示したことも学術的に重要なポイントです。

また、図 3C のようにバブル模倣基板では熱源とトラップサイトを空間的に分離することでレーザー出力を高めても生体サンプルにダメージを与えず、微生物を高生存率で生きたまま高密度に集めることができたと考えています。一方で、図 3D のように従来の平坦基板表面に気泡を発生する方式はレーザー照射点近傍が高温となり微生物へのダメージが避けられません。

これらの例が示すように、物理と化学、生物の異分野横断的なアプローチで実験を遂行したところ予想以上の高生存率が得られることを解明でき、気泡の発生無しに高捕集率と両立できる条件を見出すことができたことが重要なブレイクスルーとなりました。



【本研究に関するお問い合わせ】 大阪府立大学 LAC-SYS 研究所

所長 飯田琢也 TEL: 072-254-8132 (t-iida [at] p.s.osakafu-u.ac.jp)

副所長 床波志保 TEL: 072-254-9824 (tokonami [at] chem.osakafu-u.ac.jp)

【JST 事業に関するお問い合わせ】 科学技術振興機構 未来創造研究開発推進部 水田寿雄

TEL: 03-6272-4004 (kaikaku_mirai [at] jst.go.jp)

※ [at] の部分を@と差し替えてください。

なお、本研究は飯田琢也所長と床波志保副所長が共同で研究デザインを行い、その指導の下、林康太氏（博士前期課程2年）、山本靖之氏（平成30年度博士後期課程修了）はバブル模倣気泡基板の作製と細菌の光誘起集合の実験を遂行しました。また、林康太氏、田村守特認助教は飯田の指導下で理論計算を行いました。

<社会的意義、今後の予定>

本研究で得られた原理を利用すると、今回研究対象とした *L. casei* などの乳酸菌以外にも、有害細菌やウイルスを対象として微生物数の培養フリーでの迅速計測が可能となり、薬剤添加時の光濃縮下での生存率に基づいて薬効評価にも利用できる可能性があります。さらに、将来的には細菌のみならず、血液など体液中や食品中の様々な生体サンプル（タンパク質、核酸など）へのダメージを極限まで低減して機能維持したまま光濃縮ができ、幅広いバイオ分析技術の高感度化・迅速化への展開が期待されます。

今後、解明した低ダメージ光濃縮の原理に基づいて、より面積かつ高密度に低ダメージな濃縮を行うことができる基板や光学系の開発、ターゲットに選択的に結合するプローブとの併用、従来のバイオ分析技術との融合などを行うことで、光濃縮検査システムのハイスループット化を促進し、ヘルスケアや薬剤開発などの新機軸構築にも貢献できると期待されます。

<用語解説>

注1) トラップ領域：光発熱集合においては、レーザー光により誘起される対流によって分散質（微粒子や微生物）を輸送する際に、照射点に向かう水平対流がせき止められて流速がゼロとなる領域が構造体（気泡や今回の論文で報告した擬似気泡）と基板との間に生じます。このような領域は流体力学的には淀み領域と呼ばれることもありますが、液中に分散する微粒子や微生物を捕捉（トラップ）できる領域ということで分かり易く「トラップ領域」と呼んでいます。

注2) プロバイオティクス：人体に良い影響を与える微生物のことを指します。または、それらを含む製品、食品のことを指すこともあり、身近な例では発酵食品や乳酸菌飲料などが知られています。

注3) 光ピンセット：その名の通り、光でピンセットの様に小さな物質を光で摘む技術のことです。レーザー光は進む方向に物質を押し作用である「光圧」を発生することが知られていますが、レンズで強く絞ると、強度が高くなる焦点付近に、ナノからマイクロサイズの物質を捕捉（トラップ）することもできます。光圧は光が物質に当たり散乱や吸収されると、運動量が物質に受け渡されることで作用しますが、専門的には散乱や吸収によるエネルギー散逸を伴うため散逸力とも呼ばれます。また、捕捉のためのトラップ力の成分は光強度の勾配に比例するため勾配力とも呼ばれます。前述のようにレンズで急峻な強度勾配を発生することで、この勾配力が散逸力を上回る状況を作り、微小な物質をトラップできます。

【本研究に関するお問い合わせ】大阪府立大学 LAC-SYS 研究所

所長 飯田琢也 TEL:072-254-8132 (t-iida [at] p.s.osakafu-u.ac.jp)

副所長 床波志保 TEL:072-254-9824 (tokonami [at] chem.osakafu-u.ac.jp)

【JST 事業に関するお問い合わせ】科学技術振興機構 未来創造研究開発推進部 水田寿雄

TEL : 03-6272-4004 (kaikaku_mirai [at] jst.go.jp)

※ [at] の部分を@と差し替えてください。

注4) 金属ナノ薄膜：典型的には金属から成る100ナノメートル (nm: ナノメートルは100万分の1ミリメートル) 以下の厚さの薄膜を指します。金属はその内部を電子が自由に走り回ることができるため高い導電性を示すことは良く知られています。一方で、金属をナノサイズ化すると、このような自由電子が走り回れるバルクの領域が狭くなり、ナノサイズ物質の表面に強く束縛されます。このような表面に束縛された自由電子の状態を「表面プラズモン」と呼びます。この表面プラズモンが光を吸収することで光照射領域とその近傍を局所的に加熱することができます。

注5) 光発熱集合：物質が光を吸収した際に局所的に発生する光発熱効果を利用して液中の分散質（マイクロ物質やナノ物質など）が集合する現象を指します。近年では、集光レーザー照射下での局所的な光発熱効果により発生した対流やバブルなどの流体现象を利用して、対象とするナノ物質やマイクロ物質を遠隔的に集合させる研究が盛んに行われています。このような光発熱効果による流体现象を利用した新分野のことを「フォトサーマル・フルイディクス」とも呼びます。

注6) マランゴニ対流：表面張力が場所によって異なる場合に発生する流れであり、表面張力の低い領域から高い領域に向かって流れが生じます。たとえば、液体と気体の界面での初期の温度勾配による分子密度の不均一性が原因となって生じるため、光発熱効果で発生した気泡の表面で顕著に発生し、光発熱集合においても重要な役割を果たすことが我々のこれまでの研究で明らかとなっています。

<参考 URL 等>

大阪府立大学 研究推進機構 LAC-SYS 研究所 Web サイト

<http://www.p.s.osakafu-u.ac.jp/~t-iida/LAC-SYS/index.html>

【本研究に関するお問い合わせ】大阪府立大学 LAC-SYS 研究所

所長 飯田琢也 TEL:072-254-8132 (t-iida [at] p.s.osakafu-u.ac.jp)

副所長 床波志保 TEL:072-254-9824 (tokonami [at] chem.osakafu-u.ac.jp)

【JST 事業に関するお問い合わせ】科学技術振興機構 未来創造研究開発推進部 水田寿雄

TEL: 03-6272-4004 (kaikaku_mirai [at] jst.go.jp)

※ [at] の部分を@と差し替えてください。