

バイオフィルムの構造と特徴 ～バイオフィルム制御にむけて

関西大学 化学生命工学部 教授 松村 吉信

はじめに

近年の科学技術やバイオテクノロジーの進歩によって生命科学分野の微視的環境が短時間に簡単に結果を得ることができるようになった。例えば、様々な蛍光色素の開発やガラス表面処理技術、カメラなどの光学技術やLED技術の進歩は光学顕微鏡の大きな技術革新につながり、これまで観察が困難であった細胞の内部構造がリアルタイムで観察できるようになった。質量分析計の進歩は細胞の構成成分である脂質やタンパク質、代謝産物の定性分析や液体クロマトグラフィーやガスクロマトグラフィー技術の組み合わせによって分離・定量分析が可能となっている。これらの分析技術も動物細胞や植物細胞のような大きな細胞では1細胞分析が原理上可能な領域に達しており、個々の細胞の生理的状態の違いも確認できるようだ。遺伝子情報分析にフォーカスすれば、次世代シーケンサー技術の進歩によって短時間でゲノム塩基配列が解読可能となり、遺伝子データベースなどの生物情報のデータベースが整備されるにつれて個々の遺伝子のアノテーションだけではなく、遺伝子間の連携についても簡単に推測することができるようになってきている。さらに、この技術は遺伝子発現制御に関する情報やエピゲノミク的な情報も部分的に得ることができ、統合的なゲノム構造と機能解析ツールとして利用できるようだ。このような技術を組み合わせることで、新たな医薬品が開発され、治療困難であった様々な疾病に対して効果的な治療が提供可能となるのではと期待されている。さらに、これら強力なツールが比較的低コストで多くの研究者が利用できる

環境が整いつつあることも見逃すことはできない。一方で、一般環境における微生物細胞の挙動については詳細に把握できているとはいえない。これは最先端の分子生物学的手法が微生物制御分野で適用されにくい状況が依然と続いているためであろう。これは日本における食中毒の発生状況の統計データを見ても気付くことである。2018年度に全国で報告されているバクテリアやウイルスが原因となる食中毒事故¹⁾はそれぞれ467件と267件で、食中毒事故全体に対する割合では約40%と約50%となっており、この状況は直近約10年間でほぼ横ばいで、近い将来に微生物による食中毒事故の撲滅が期待できる状況ではない。これは人為的ミスや過誤によるものも多く含まれているとは予想されるものの、研究室での微生物細胞の研究結果が実際の環境で生育した微生物細胞には適応できず生じた事故も多く含まれているものと推察される。このような実際の環境の中での微生物の挙動は微生物生態学として近年数多く報告されるようになってきているものの殺菌や抗菌を意識した微生物制御分野の研究成果はまだ数少ない。本稿では実環境中でのバクテリア細胞集団と考えられるバイオフィルムの基本構造と基本的な形成過程について解説し、バイオフィルム制御につなげていきたい。

1. 一般的なバイオフィルム構造

バイオフィルムとは、バクテリアなどの様々な微生物細胞(場合によっては原生生物や小さな後生生物も含む)が集団を形成しながら生長する構造体で、フィルム状の形態を示すものが多いことからこの名前が定着したようだ²⁾。

一般には固形物表面に形成するものが多いが、気液界面に形成する場合³⁾や液体中で顆粒状態(微生物グラニュールや活性汚泥フロック)⁴⁾となっているものもある。それぞれの形成機構は少し異なるものの構成成分が大きく変わるものではないようだ。特にバイオフィルムが感染症や食中毒、食品変質、微生物劣化の原因となっていることから、ヒト社会で大きな問題であると認識されるようになってきている。一方原生生物などを含む集合体であるバイオフィルムは下水処理や有害物処理などヒト社会でも有効活用されており、また食酢の製造に用いられる酢酸菌では気液界面にバイオセルロースと呼ばれるバイオフィルムを形成することが知られ⁵⁾、バイオフィルムの除去や制御の必要性だけではなく、バイオフィルムが新しい微生物利用につながるものと期待されることから、バイオフィルム研究の重要性はその活用面・制御面の両面から高まっている。

バイオフィルムの構造を大きく分けると微生物細胞(バイオフィルム細胞)と高分子有機物、無機物の集合体で図1に模式的に示した。また、表1には一般的なバイオフィルム成分を示した⁶⁾。バイオフィルム成分の機能面を強調して有機物を家やマンションの役割、バイオフィルム細胞がその住人のように例えられる場合もあるが、ほとんどが水で構成され、バイオフィルム細胞が2-5%、その他を高分子有機物(細胞外高分子基質、extracellular polymeric substances、EPS)である多糖類やタンパク質、核酸や脂質となっている。バイオフィルムが水を多く含む環境であることから、バイオフィルム内外の物質交換も比較的自由に行えるようで、その構造は“open

water channels”構造と呼ばれ、比較的小さなバイオフィームでは栄養の枯渇や細胞の排泄物による増殖阻害も生じにくいようだ。

バイオフィームが持つ特徴は、EPSに由来する部分が多い。多糖類やタンパク質は細胞同士や細胞と固形物との結合・接着に関わる。また、バイオフィームのキノコ状の三次元構造体構造体の付け根部部分に細胞外DNA (extracellular DNA、eDNA) が観察され、バイオフィームの成熟に重要となるのであろう。このようなEPSはバイオフィーム形成時に積極的に誘導合成されるようだが、一部の

eDNAはバイオフィーム外から取り込まれる場合も知られている。また、バイオフィームが抗菌剤や環境ストレスに高い耐性を示すのもこれらEPSの存在が重要であると考えられている。表2には緑膿菌におけるEPSの働きをまとめた⁷⁾。バイオフィーム内の細胞が本来備えている能力だけではなく、バイオフィームの構成成分が鎧の役割を果たし、抗菌剤や環境ストレスが直接バイオフィーム細胞に影響を及ぼさないようにしているようだ。

2. バイオフィームが形成される環境

バイオフィームは微生物細胞の増殖とともに生長するため、微生物細胞の生育環境で観察される。言い換えると、適度な栄養と十分な水分(湿度、水分活性0.7または湿度70%以上)、微酸性(pH5)から弱アルカリ環境(pH9)で(真菌類ではpH4以下でも生育可能、乳酸菌ではpH4で生育するものもある)、適度な温度(0-

40℃)と酸化還元環境が整うと生育可能な状態となる。一方で、よく見かけるバイオフィームはその一部が固形物表面に吸着しているものが多いため、水などの流れのある環境や表面に凹凸のない環境などでは形成されにくいと思わ

れがちではあるが、実際には、1m/秒程度の流れでも、流れに沿ってバイオフィームが形成し¹⁾、特に形成されにくい自然環境は見当たらない。一方で、研究室などで表面が高度に研磨された状態や高い親水性や疎水性はバイオフィーム形成が抑制されるが^{8, 9)}、環境中ではそのような特殊な表面も見当たらないだろう。他にもバイオフィーム形成に影響を及ぼす固形物表面の特徴を表3にまとめた。これによると細胞と固形物表面との結合しやすさがバイオフィームの初期形成に影響を及ぼすようだ。

生活環境に目を移すと、比較的衛生状態が清潔に保たれている住環境、例えばキッチンやサニタリースペース、窓やサッシなどでバイオフィームが容易に観察される¹⁰⁾。このような環境では常に微生物細胞が供給されるものの、洗浄剤や抗菌(殺菌)剤が比較的頻繁に使用されているため、微生物の増殖は限定的であると考えられてきたが、実際には比較的早くバイオフィームが形成されよう。これは形成したバイオフィームに洗浄剤や抗菌剤が効果的でないことを示しているのだろう。バイオフィームには休眠型細胞であるpersister cell(我々の研究室では「永生細胞」と呼んでいる)の存在も多く、バイオフィームの耐性にも寄与している¹¹⁾。またバイオフィームから脱離した直後の細胞はバイオフィーム脱離細胞と呼ばれ、浮遊細胞とは異なり、単独で存在しているもののバイオフィームと同等のストレス耐性を保持している場合があるようだ¹²⁾。

3. バイオフィームを構成する微生物細胞

環境中のバイオフィームは複合微生物系で構成される。これはバイオフィームが多様な機能を有していることを示すものであるが、それぞれのバイオフィーム細胞の生理状態を観察すると均一な生理状態であるとは言えないようだ。これはバイオフィーム内が外部環境と容易に物質交

表1 一般的なバイオフィームの成分⁶⁾

成分	構成割合
バイオフィーム細胞	2-5%
多糖類	1-2%
DNA・RNA	< 1-2%
タンパク質	< 1-2%
水	Up to 97%

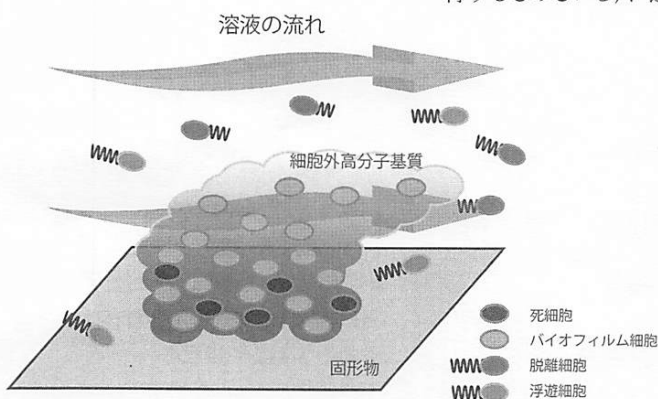


図1 バイオフィーム構造の模式図

バイオフィーム細胞は細胞外高分子基質(EPS)で覆われているものの、バイオフィームはその内部と外界とが容易に物質交換を行える“open water channels”構造を形成している。バイオフィーム細胞には増殖可能な細胞やpersister cellなどの休眠細胞が含まれ、死細胞も一部では観察される。バイオフィーム外には、浮遊細胞やバイオフィームから脱離した脱離細胞が存在している。

表2 緑膿菌の細胞外基質成分とその働き⁷⁾

EPS (細胞外高分子基質)	主な働き
Psl 多糖	抗生物質耐性、好中球やマクロファージの貪食作用からの回避、ポリソルベート 80 耐性、細胞の初期付着
Pei 多糖	アミノグリコシド系抗生物質耐性、細胞凝集
アルギン酸塩	IFN γ 産生白血球に対する貪食作用からの回避、フリーラジカル消去、抗生物質耐性、水や栄養の維持、宿主細胞の免疫応答回避、細胞凝集
eDNA (細胞外 DNA)	抗菌性ペプチドやアミノグリコシド系抗生物質耐性、栄養源
タンパク質 (adhesin など)	細胞凝集、BF 構造維持

表3 バイオフィーム形成に及ぼす表面特性

表面特性	バイオフィーム細胞への影響
1. 疎水性 / 親水性 [水の接触角, 表面自由エネルギー, 表面張力]	細胞の付着に適した親水性 / 疎水性表面がある。極端に高い親水性や疎水性表面ではバイオフィームは形成しにくい。高い親水性表面では細胞との結合力に水の層が形成され、細胞と固形物が直接結合しにくくなる。疎水性表面では固形物の自己洗浄効果で細胞との結合が弱い。
2. 表面電荷 [ゼータ電位]	負帯電した表面 (低いゼータ電位表面) では細胞は付着しにくい。ただし、抗菌性のポリカチオン性表面も細胞付着が抑制される。
3. 表面粗さ [roughness]	滑らかな表面は細胞との接触面が少なく (結合力が弱く) バイオフィーム形成しにくく、荒い (凹凸のある) 表面は接触面が広くバイオフィーム形成しやすい。
4. 表面構造 [topology]	μm 以下 (ナノスケール) の表面粗さになると細胞と表面の接触面が制限され、結合力が弱まり、細胞の初期付着は抑制される (サメ肌構造)。針状の構造の場合、細胞表面が物理的に傷つけられ、バイオフィーム形成が抑制される。
5. 表面硬さ [stiffness]	硬い表面より柔らかい表面でバイオフィーム形成が促進。柔らかい表面でのバイオフィームは抗菌剤耐性が高い。
6. 化学組成 [chemistry]	抗菌剤や抗バイオフィーム剤を吸着させた表面では細胞付着やバイオフィーム形成が抑制。

換可能な“open water channels”構造を示すものの、バイオフィームが成熟すると、局所的な環境では栄養の豊富でバイオフィーム細胞が増殖しやすい環境から栄養が制限され代謝産物が蓄積しやすい増殖に適さない環境まで含む非常に複雑な環境と言える。このようなことから、活発に増殖を繰り返す栄養細胞は外部環境に接する表面に存在し、内部には休眠細胞や一部は死細胞も含まれるようだ²⁾。休眠細胞には単に増殖を停止した定常期細胞だけではなく、芽胞や胞子、persister cell (永生細胞) が内包されている。また固形物表面には接着細胞 (接着活性の強い細胞) が存在し、細胞間の接着にもこれら接着細胞が関わっているだろう。さらにバイオフィーム崩壊時期にはプロテアーゼなどの高分子有機物分解酵素やバイオサーファクタントを誘導合成する細胞も現れることから、複雑な細胞の生理活性変化が生じていると考えられている。実際に固着段階では細胞内セカンドメッセンジャーであるcyclic-di-GMPなどによる生理活性の調節¹³⁾や細胞間の

コミュニケーションツールであるクオラムセンシングシステムによる細胞の協働も確認されている¹⁴⁾。

4. バイオフィーム形成過程

バイオフィーム形成過程を図2に示した。すでに多くの総説^{7, 15)}で述べられているように、固形物表面で形成されるバイオフィームは、まず、固形物表面にコンディショニングフィルムが形成される。このフィルムは特に定まった化合物を示すものではなく、その環境に存在する化合物が結合して微生物細胞が接着しやすい環境を提供するものである。言い換えると、表3で示したバイオフィームが形成されにくい表面をよりされやすい (細胞が不可逆的に接着しやすい) 表面への改変が行われる過程である。また、結合する化合物には周りに浮遊している微生物細胞の代謝物や成分も提供されているだろう。その後、運動している浮遊細胞はswimming運動で固形物表面に近づき、可逆的に接着を繰り返す。その過程では、細胞は固形物表面の横滑り運動 (swarming) も繰り返す。そ

の後、一部の細胞が不可逆的に接着へ移行するとバイオフィームの前段階であるマイクロコロニー形成へと移る。なお、マイクロコロニー形成では鞭毛運動であるswimmingやswarming運動は停止するとともに新たな鞭毛合成も抑制され、これらに変わり、4型線毛が中心となったtwitching運動でマイクロコロニーやバイオフィームの表面上の広がりを確保しているようだ¹⁶⁾。また、不可逆的に接着には細胞表面に露出したタンパク質や鞭毛・線毛タンパク質、アドヘリンなどが関与していると予想されている。さらに、マイクロコロニー形成では主に多糖類の合成と細胞増殖を繰り返す。このような変化はセカンドメッセンジャーであるcyclic di-GMPがシグナルとなっているようだ¹³⁾。次に、バイオフィームはキノコ状の成熟した3次元構造体に移行する。ここでは、細胞外DNA (eDNA) の存在が重要となり、キノコ構造の根元付近にeDNAが集中している観察結果が得られている¹⁷⁾。このeDNAはバイオフィーム外から供給される場合も観察されているが、多くの場合は

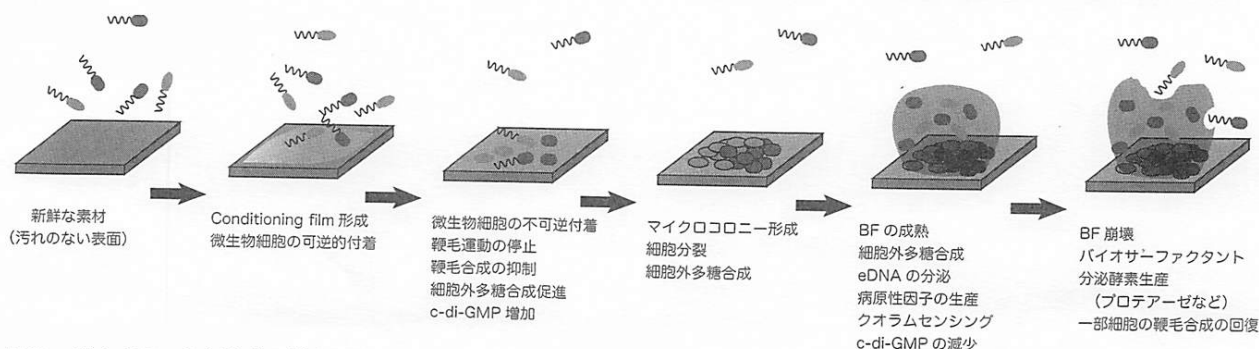


図2 バイオフィーム形成の模式図とバイオフィーム細胞の特徴

バイオフィルム細胞から提供されているようだ。さらに、バイオフィルム内の物質移動の潤滑剤となっているバイオサーファクタントの誘導合成、バイオフィルムの崩壊にも関わる分泌型プロテアーゼなどの高分子基質分解分泌酵素の生産などはクオラムセンシングシステムの働きが重要となっているようだ¹⁴⁾。また、このシステムは同時に病原性因子の誘導合成にも働くことからバイオフィルム形成が感染症発症にも大きく関わっており、バイオフィルム抑制が感染症対策にも重要となっている。

5. バイオフィルム制御・対策

バイオフィルム対策は大きく分けて二つ挙げられる。一つは「バイオフィルム形成環境制御」によるバイオフィルム形成抑制、もう一つは「バイオフィルム洗浄・殺菌」処理である。現状ではどちらも満足できる方法は開発されていない。そこで大切となるのは、「バイオフィルムの早期発見」と「早期対応」となる。発見では日頃の微生物検査が重要となるであろう。なお、現状でよく用いられる培養法は手間と時間を要することから短時間で結果が得られる方法の開発も重要となる。また、「早期対応」では「物理的な剥ぎ取り」と「化学的な殺菌・洗浄」が適当であると考えられるが、場合によっては複数の方法で対応することも重要であろう。特に界面活性剤¹⁸⁾やタンパク質分解酵素¹⁹⁾、多糖分解酵素²⁰⁾、DNA分解酵素²¹⁾、漂白剤²²⁾はバイオフィルム洗浄に有効であると思われるものの決定的な有効打にはなっていないようだ²³⁾。我々の研究室ではステンレス表面に形成したバイオフィルムを抗菌性ポリカチオン性タンパク質プロタミンのステンレス表面コーティング法で抑制できるのかを検証したが、一定の効果は示せたものの効果は限定的であり、持続性にも問題がある²⁴⁾。まだまだ、バイオフィルムを制御できる段階ではなく、様々なアイデアの融合が必要と思われる。例えば、バイオフィルム形成が問題視されている口腔内を観察してみると、ターンオーバーが活発な上皮細胞上ではバクテリアの接着が少なく、ターンオーバーが少ないあるいはない歯や義歯、インプラントではバイオフィルム

形成しやすいと報告されている²⁵⁾。これは、こまめな洗浄や表面再生がバイオフィルム生長を抑制できることを示すものであり、バイオフィルム制御のヒントとなるだろう。また、上述のようにc-di-GMPやクオラムセンシングシステムなどの細胞内外の情報が細胞の生理活性を変化させ、バイオフィルムの生長や脱離に関わっていることが明らかとなっている。これらの情報因子の活用が効果的かもしれない。今後の研究に期待される。

まとめ

バイオフィルム研究は1940年にHeukelekianとHellerらによる顕微鏡観察から始まったと言われている²⁶⁾。すでに80年が過ぎている。今だ、バイオフィルムの生態について解明されたとは言えず、当然のことながらバイオフィルム制御も道半ばである。また、バイオフィルムに起因する感染症や院内感染、食品劣化、集団食中毒事故なども後を絶たない。現状の打開、つまり、微生物制御技術のさらなる進歩は急務であるものの、多くの微生物研究者が殺菌はすでに確立された技術であり、現在の熱処理技術や抗菌剤技術は(現実的な対応という一面においては)十分な技術であると信じている。このような状況は実際の現場とは大きく乖離した解釈だと感じている。これからも多くの若い研究者が微生物制御技術の発展に関わっていただきたいと願う。

参考文献

- 1) 2019年3月13日 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食中毒部会配付資料平成30年食中毒発生状況 (<https://www.mhlw.go.jp/content/11121000/000488494.pdf>)
- 2) L. Hall-Stoodley, J. W. Costerton & P. Stoodley: *Nature Rev. Microbiol.*, **2**, 95-108 (2004)
- 3) K. Kobayashi: *J. Bacteriol.*, **189** (13), 4920-4931 (2007)
- 4) T. W. Seow, C. K. Lim, M. H. Md Norb, M. F. M. Mubarak, C. Y. Lam, A. Yahya & Z. Ibrahim: *Int. J. Appl. Environ. Sci.*, **11** (1), 111-126 (2016)
- 5) C. Campano, A. Balea, A. Blanco & C. Negro: *Cellulose*, **23** (1), 57-91 (2016)
- 6) M. Jamal, U. Tasneem, T. Hussain & S. Andleeb: *Res. & Rev. J. Microbiol. Biotechnol.*, **4** (3), 1 (2015)

- 7) Q. Wei & L. Z. Ma: *J. Mol. Sci.*, **14** (10), 20983-21005 (2013)
- 8) I. Yoda, H. Koseki, M. Tomita, T. Shida, H. Horiuchi, H. Sakoda & M. Osaki: *BMC Microbiol.*, **14**, 234 (2014)
- 9) X. Shia & X. Zhu: *Trends Food Sci. Technol.*, **20** (9), 407-413 (2009)
- 10) T. Yano, H. Kubota, J. Hanai, J. Hitomi & H. Tokuda: *Microb. Environ.*, **28** (1), 87-95 (2013)
- 11) K. Lewis, *Annu. Rev. Microbiol.*, **64**, 357-372 (2010)
- 12) J. R. Chambers, K. E. Cherny & K. Sauer: *Antimicrob. Agents Chemother.*, **61** (12), doi:10.1128/AAC.00846-17 (2017)
- 13) D.-G. HA & G. A. O'Toole: *Microbiol. Spec.*, **3** (2), doi:10.1128/microbiolspec.MB-0003-2014 (2015)
- 14) C. Solano, M. Echeverez & I. Lasa: *Curr. Opin. Microbiol.*, **18**, 96-104 (2014)
- 15) G. Girard & G. V. Bloemberg: *Future Microbiol.*, **3** (1), 97-106 (2008)
- 16) G. A. O'Toole & R. Kolter: *Mol. Microbiol.*, **30** (2), 295-304 (1998)
- 17) M. Allesen-Holm, K. B. Barken, L. Yang, M. Klausen, J. S. Webb, S. Kjelleberg, S. Molin, M. Givskov & T. Tolker-Nielsen: *Mol. Microbiol.*, **59** (4), 1114-1128 (2006)
- 18) H. Gibson, J. H. Taylor, K. E. Hall & J. T. Holah: *J. Appl. Microbiol.*, **87** (1), 41-46 (1999)
- 19) C. Leroy, C. Delbarre, F. Ghillebaert, C. Compere & D. Combes: *J. Appl. Microbiol.*, **105** (3), 791-799 (2008)
- 20) B. Craigen, A. Dashiff & D. E. Kadouri: *Open Microbiol. J.*, **5**, 21-31 (2011)
- 21) R. Nijland, M. J. Hall, & J. G. Burgess: *PLoS ONE*, **5** (12), e15668 (2010)
- 22) S. Shakeri, R. K. Kermanshahi, M. M. Moghaddam & G. Emthiaz: *Biofouling*, **23** (2), 79-86 (2007)
- 24) Y. Matsumura, K. Yamada, M. Takahashi Y. Kikuchi & T. Tsuchido: *Biocontrol Sci.*, **12** (1), 21-29. (2007)
- 25) P. D. Marsh, A. Moter & D. A. Devine: *Periodontology 2000*, **55** (1), 16-35 (2011)
- 26) H. Heukelekian & A. Heller: *J. Bacteriol.*, **40** (4), 547-548 (1940)

著者略歴

松村 吉信(まつむら よしのぶ)

1994年 大阪大学大学院工学研究科博士後期課程修了

1994年 関西大学工学部(生物工学科)

2007年 関西大学化学生命工学部(生命・生物工学科)

現在、同学部教授

研究テーマ: 微生物の活用と殺菌のトータルコーディネート

微生物による環境浄化やバイオエネルギー生産にも興味あり。