

【解説】

バイオフィルムとオゾン(1)バイオフィルムの構成成分とその形成

立川真理子

日本医療・環境オゾン研究会会報, Vol.15, No.4, 95-97. (2008)

解説

バイオフィームとオゾン (1)

バイオフィームの構成成分とその形成

日本大学薬学部 立川 真理子

1. はじめに

水と接している固体表面の多くにはバイオフィーム (Biofilm) が存在しており、肉眼では判らないが、手で触るとヌルヌルとしてその存在に気づかされる。河川等の自然環境中でのバイオフィームの形成は、環境浄化に大きな役割を果たしている。一方このバイオフィームは水泳プールや温泉における水質管理および水を用いる種々の工業における衛生管理や設備維持において問題となっており、その除去あるいは殺菌の重要性が指摘されている。バイオフィームそのものが一つの変化に富む機能的な環境であり、環境中の微生物の多くはバイオフィームの形成により環境変化や殺菌剤に対する抵抗性が増強されることが知られている¹⁾。

バイオフィームの形成は細菌の様々な器物 (付着の対象となる個体) 表面への付着から始まり、主に多糖類からなる細胞外多糖類 (Extracellular polysaccharide) に包まれたマイクロコロニー、さらには他の微生物とも相互影響を及ぼしあう生活空間の形成へと進み、その環境の形成と維持にはヌルヌルの本体でもある細胞外多糖類が深く関与している。本報ではこの細胞外多糖類を中心にバイオフィームの構成成分とその形成について解説する。

2. 微生物のバイオフィーム形成

2.1. バイオフィームの構成成分

多くのバイオフィームにおいて、構成成分として水がその大部分 (>90 %、湿重量) を占めている。水は細胞表面と結合し、また種々の成分を溶かし込んでバイオフィーム内を流動する。これはバイオフィーム内における物質拡散にとって非常に重要であり、水がバイオフィームの細部構造を機能させ、それぞれのバイオフィームの違いを生み出していると考えられる²⁾。一般にバイオフィームの組成は菌体 (2-5 %)、細胞外多糖類 (1-2 %、これにはさまざまな高分子の分泌物や栄養物質が吸着する)、酵素類を含むタンパク質 (1-2 %)、DNA や RNA (1-2 %)、ペプチドグリカンおよび脂質、そして無機イオンなどによりバイオフィームが構成されている³⁾。しかし *Pseudomonas putida* のバイオフィーム抽出物においては、タンパク質含量が 75 % を占めた例も報告されている⁴⁾。

2.2. 細胞外多糖類

ヌルヌルの本体である細胞外多糖類は細菌と器物、細菌と細菌の接着に働き、バイオフィームの高次構造体維持に働いている。バイオフィームの構造維持には細胞外多糖類と先に挙げた微量成分であるタンパク質や無機イオンが強く関与しているものと思われる⁵⁾。すなわち細胞外多糖類は多くがウロン酸 (糖カルボン酸) からなる酸性多糖でありアニオンの性質を持つが、デキストランのような中性多糖、そして塩基性多糖の存在も知られている。細胞外多糖類には酢酸やピルビン酸などがエステル結合しており、*Klebsiella aerogenes* には *L*-グルタミン酸、*Escherichia coli* K40 にはセリンの存在が報告されている。無機物としては多くの細胞外多糖類にリン酸イオンが存在して細胞壁成分である高分子の形成に働き、硫酸イオンは真核生物の細胞外多糖類やプロテオグリカン中およびシアノバクテリア (Cyanobacteria) の外套膜などに含まれていることが明らかになっている。海藻成分であるアルギン酸は細菌にも細胞外多糖類成分として存在する。アルギン酸は *D*-マンヌロン酸と *L*-グルロン酸からなるが、細菌類のアルギン酸の特徴としてはアセチル化されたマンヌロン酸の存在が挙げられ、海藻アルギニンにくらべ柔軟性に富んでいる。また、ある種のアルギン酸では Ca、Ba、そして Sr などの 2 価の陽イオンが強く結合している⁶⁾。構成要素は同じでも、それぞれの細胞外多糖類構造は大きく異なる。細胞外多糖類は、器物と細胞表面がしっかりと付着しているカプセル多糖と、細胞との結合力は弱く細胞の周りに粘液状で存在しているスライム多糖にも分けられる。

細胞外多糖類の機能として、①病原性決定因子、②宿主の免疫系に対する抵抗性の上昇、③乾燥および薬剤などに対する耐性や抵抗性の上昇、④重金属や有機溶媒の毒性からの保護、⑤ファージの溶菌作用、原生動物の食作用からの保護、⑥微量有機物や栄養素の濃縮、そして⑦低栄養時の栄養源となるなどがあげられ

る^{3,7)}。細胞外多糖類の組成は環境により影響を受け、同じ細菌においても栄養源やその濃度などによっても異なる⁸⁾。バイオフィルムの除去には殺菌だけではなく細胞外多糖類の分解や除去が重要であると考えられる。

2.3. バイオフィルムの形成

バイオフィルムの形成は浮遊細菌の器物表面への接着から始まる。器物表面は環境水中に溶存するイオンや有機物の吸着により、細菌が接着しやすい状態に短時間でコンディショニングされ⁹⁾、細菌は鞭毛や繊毛運動が加わって器物に付着する。付着に伴い細菌では以下に説明する細胞外多糖類の産生、鞭毛や繊毛運動の低下、菌体外酵素や微生物間情報伝達物質 (Auto inducer) の産生などが始まる。接着により遺伝子表現型が変化し、細菌のライフサイクルにおいて重要な役割を果たす形態や生理機能が変化し、薬剤や低栄養などの環境からの攻撃に対する抵抗性が増加すると考えられている¹⁰⁾。

器物に付着した細菌は細胞膜構造や運動性が変化し、器物表面上で分裂し細胞間での相互作用と細胞外多糖類産生によりマイクロコロニーを形成する。ここからさらにバイオフィルムへと成長するが、環境条件(栄養、溶存酸素、水流など)により密度や形態が異なる。多くの場合バイオフィルムは複数の細菌や真菌からなる微生物の共同体である。バイオフィルムでは、細胞は細胞外多糖類の分泌と共に相互に接着して上方に伸び、水が通りやすい構造が観察される¹¹⁾。緑膿菌 (*P. aeruginosa*) の繊毛欠損株や大腸菌 (*E. coli*) のコラン酸 (細胞外多糖類の一種) 欠損株では器物表面に広がるだけで上方に伸びるバイオフィルムが形成できないことなどが報告されている¹⁰⁾。一般に低栄養の環境では、薄くて器物表面にしっかりと接着したバイオフィルムが形成することが知られている。一方、高栄養の環境では、菌体が層状に積み重なったバイオフィルムも形成される。歯垢などはこれに属する¹²⁾。バイオフィルム表面と内部では溶存酸素濃度や pH が異なり、深部では嫌気的な環境に適した細胞が優占種となり、金属腐食などを引き起こす¹³⁾。バイオフィルムの成長や剥離は環境に強く影響されるが、細胞からは先に述べた微生物間情報伝達物質が分泌され、その濃度により細胞の代謝、運動性そして細胞密度などがコントロールされていることが明らかとなっており、クオラムセンシング (Quorum sensing) と呼ばれている。微生物間情報伝達物質としてはグラム陰性細菌ではホモセリンラクトン誘導体、グラム陽性細菌ではオリゴペプチド誘導体、またグラム陰性菌と陽性菌の両方が産生するフラノン誘導体が知られている¹⁴⁾。こうしたバイオフィルム内での調節や環境の悪化などによりバイオフィルムの一部の細胞は再び浮遊細菌に戻る。

バイオフィルムの成長に関与する物理的な因子についても検討されている。器物表面の材質による影響はほとんどないが¹⁵⁾、表面が粗い方は付着性が高い。これは粗い方が表面積は大きく、窪みに入ったバイオフィルムは剥ぎ取られ難いためである¹⁶⁾。水流の強さはバイオフィルムを剥ぎ取り成長に影響を与えるが、水流を強くしても壁面のごく近傍になると境界層が形成し流速がほとんどなくなるため、器物表面への細菌の付着を防止することはできない¹¹⁾。栄養環境の変化は先にも述べたようにバイオフィルムの形態、成長そして剥離などに影響を与えるが、その一方純水システムなどにおいても認められるように、栄養の制限によるバイオフィルムの形成の防止は困難であると考えられている¹⁷⁾。

実際には水道敷設管、廃水処理施設、浴場水やプール水のろ過装置、純水製造装置そして医療用機器などにおけるバイオフィルム形成が問題となっている。また、生体においても口腔、消化管、肺、胆管そして尿管などにおけるバイオフィルム形成が知られ、健康と疾病の両方に関与している。これらバイオフィルムの形成は周囲の環境に強く影響を受けるだけでなく、複数の微生物から構成されるためバイオフィルム形成による微小環境変化が内部からも生じており、その形成はさらに複雑で変化に富むことが予想される。

3. 文献

- 1) Characklis W.G. (1990) Microbial fouling, In Biofilms, ed. Characklis, W.G., Marshal, K.C., pp.528-529. Wiley, NY.
- 2) Schmitt, J., Flemming, H.C. (1999) Water binding in biofilms. Water Sci. Technol., **39**, 77-82.
- 3) Sutherland, I.W. (2001) The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment. TRENDS in Microbiol., **9**, 222-227.
- 4) Jahn, A., Griebe, T., Nielsen, P.H. (1999) Composition of *Pseudomonas putida* biofilms:

- accumulation of protein in the biofilm matrix. *Biofouling*, **14**, 49-57.
- 5) Sutherland, I.W. (2001) Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, **147**, 3-9.
 - 6) Sutherland, I. W. (1990) Introduction and definition. In *Biotechnology of microbial exopolysaccharides*, pp.1-11, Cambridge Univ. Press, UK.
 - 7) 岩淵範之 (2005) 浄化とバイオフィルム-EPSの機能に着目して, バイオフィルム入門, pp.17-42, 日科技連出版社.
 - 8) Kives, J., Orgaz, B., SanJose, C. (2006) Polysaccharide differences between planktonic and biofilm-associated EPS from *Pseudomonas fluorescens* B52. *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces*, **52**, 123-127.
 - 9) Marshall, K.C. (1986) Adsorption and adhesion process in microbial growth at interfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, **25**, 59-86.
 - 10) O'Toole, G., Kaplan, H.B., Kolter, (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.*, **54**, 49-79.
 - 11) Korber, D.R., Lawrence, J.R., Lappin-Scott, H.M. Costerton, J.F. (1995) Growth of microorganisms on surfaces. In *Microbial Biofilms*, ed. Lappin-Scott, H.M. Costerton, J.F., pp.15-45. Cambridge Univ. Press, UK.
 - 12) Marsh P.D. (1995) Dental plaque. In *Microbial Biofilms*, ed. Lappin-Scott, H.M. Costerton, J.F., pp.282-300. Cambridge Univ. Press, UK.
 - 13) Hamilton, W.A. (1995) Biofilms and microbially influenced corrosion. In *Microbial Biofilms*, ed. Lappin-Scott, H.M. Costerton, J.F., pp.171-182. Cambridge Univ. Press, UK.
 - 14) 舘田和弘, 山口恵三 (2005) 細菌世界の情報ネットワーク : Quorum-sensing 機構, *分子呼吸器病*, **9**(1), 5-11.
 - 15) Van der Kooij, D., Veenendaal, H.R., Baars-Lorist, C., Van der Klift, D.W., Drost, Y.C. (1995) Biofilm formation on surfaces of glass and Teflon exposed to treated water. *Water Res.*, **29**, 1655-1662.
 - 16) Pederson, K. (1990) Biofilm development on stainless steel and PVC surfaces in drinking water. *Water Res.*, **24**, 239-243.
 - 17) Mittelman, M.W. (1995) Biofilm development in purified water system. In *Microbial Biofilms*, ed. Lappin-Scott, H.M. Costerton, J.F., pp.133-147. Cambridge Univ. Press, UK.

会告

第14回オゾン療法セミナーの予告

主催 : 日本医療・環境オゾン研究会
 日時 : 2009年3月22日(日) 9:00~17:00
 場所 : セミナー会場 : 西宮市民会館(兵庫県西宮市) 予定
 最寄り駅 : 阪神西宮、JR西宮、昼食後実技会場へ移動)
 : 実技会場 : 杉原医院(兵庫県西宮市上甲東園)
 受講資格 : 日本医療・環境オゾン研究会 会員のみ
 (なお、入会は日本医療・環境オゾン研究会ホームページから申し込んで下さい。
 日本医療・環境オゾン研究会ホームページは、<http://ozone.fixa.jp>)
 定員 : 医師・看護師 : 15名程度
 問い合わせ : 杉原伸夫 (Fax : 0798-57-5529、E-Mail : sugiclin@hcc5.bai.ne.jp)