

展望

バイオフィルムの形成と金属材料表面-1

バイオフィルム理解のための三要素

Three Important Factors for Understanding of Biofilms

森崎久雄
Hisao Morisaki

立命館大学 理工学部化学生物工学科
教授

1 はじめに

自然環境中には莫大な数の多種多様な微生物が棲息している。これら微生物は離ればなれに存在するのではなく、多くが固体表面上の特徴ある構造の中で、他の微生物と相互作用し、バイオフィルムとよばれる微生物共同体を形成している。

ある物の表面が水と接するところ、そこには必ずバイオフィルムが存在すると言っても過言ではない。一例としてヨシの茎表面に形成されるバイオフィルムを写真1に示した。このような普遍的存在であるが故に、バイオフィルムは、水の浄化、有害物質の分解に役立ったり、逆に食品・医療器具の汚染、人工構造物の汚損を引き起こしたりする。このような様々な現象と関連するバイオフィルムの構造・機能は、周りの環境、時間経過とともに変化する。従って、個々の事例を並べてみても、バイオフィルムへの理解はなかなか進まない。

簡単には捉えられないバイオフィルムではあるが、その形成過程を見ると、どのバイオフィルムにも共通して見られる三つの要素があることに気付く。まず、1) バイオフィルムが形成されるためには、基質表面に微生物が付着する必要がある。次に、2) これら付着した微生物は基質表面で増殖し、細胞外ポリマーを生産し、ポリマーマトリックス内に特徴的な微視的環境を形成する。そして、3) バイオフィルム内では、

多様な微生物が高密度で棲息し、微生物同士が相互作用する共同体が形成されている。ここでは、これら三つの要素、1) 微生物付着、2) 微視的環境、および3) 微生物共同体について概観し、バイオフィルム理解のための視点を整理したい。

2 バイオフィルム形成の第1段階 —微生物細胞の付着—

微生物細胞がある固体表面に近づいていく時、どのような力を受けるであろうか？ 自然環境中では付着基質表面、微生物細胞表面ともに負に帯電している場合が多く、両者間には一般的に静電的斥力が働いている。一方、分子間力に基づくファンデルワールス引力が微生物細胞を付着基質に引きつける方向に働いている。このような微生物細胞と付着基質との間の相互作用に、両者の表面の性質が重要な影響を及ぼす。また、これら表面の性質は周りの環境（媒質のpH、イオン強度等）によって変化する。ここでは、微生物細胞、付着基質の表面の性質、および媒質の条件が微生物の付着にどのように関連しているかを見ていく。さらに、微生物の付着メカニズムに関する新たな展開を紹介する。

2.1 微生物細胞表面の性質

2.1.1 細胞表面荷電

コロイド粒子を水溶液中に懸濁して電場をかけると、静電気力により動きはじめ、やがて静電気力と溶液からの粘性抵抗がつり合い、粒子が一定速度で電気泳動するようになる（この電気泳動速度を電場の強さでわり算したものが、単位電場強さ当たりの電気泳動速度（電気泳動移動度：EPM, Electrophoretic Mobility）である）。大きさが μm オーダーの細菌細胞もコロイド粒子であり、電場中におくと電気泳動する。細菌細胞の電気泳動移動度はpHによって変化する。典型的な例を図1に示した。一般的にpH 7近傍では細胞表

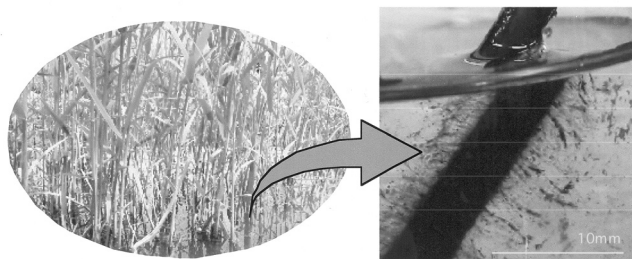


写真1 ヨシの水中部分の茎表面に見られるバイオフィルム

面が負に帯電していることが解る。pHを小さくしていくと負の電気泳動移動度はpH 4付近で絶対値が急に小さくなり、さらに酸性側では正の値を示す場合がある(図1)。細胞表面の負荷電は主にカルボキシル基やリン酸基の解離、正荷電はアミノ基へのプロトン付加によるものと推測されている。

2.1.2 細菌の増殖速度と細胞表面特性

環境中には莫大な数の種々の細菌が棲息している。これら細菌の増殖速度は広い範囲にわたっているが、寒天平板培地上でコロニーを形成するのに要する時間(tr)が長い程、その増殖速度が小さいことが解ってきた¹⁾。筆者らは寒天平板培地上でのコロニー形成時期を目安に、草地・水田から増殖速度別に数百の菌株を分離し、それらの細胞表面特性(表面荷電、親水性・疎水性)を調べた²⁻⁴⁾。その結果、図2に示すように増殖速度が小さいほど細胞表面のpH 7での負荷電が小さく(電気泳動移動度が負の値を示し、その絶対値が小さ

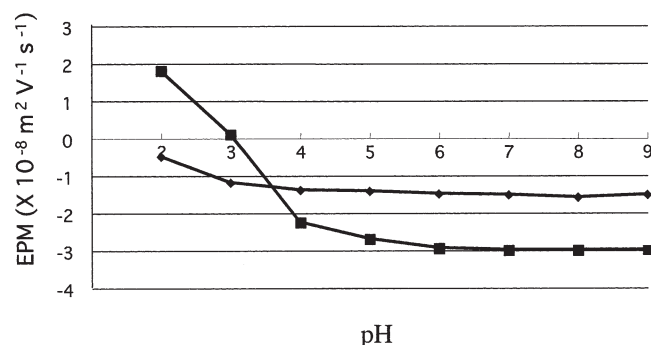


図1 細菌細胞の電気泳動移動度のpH依存性
多くの細胞について見られる典型的な二種類のパターンを示した。

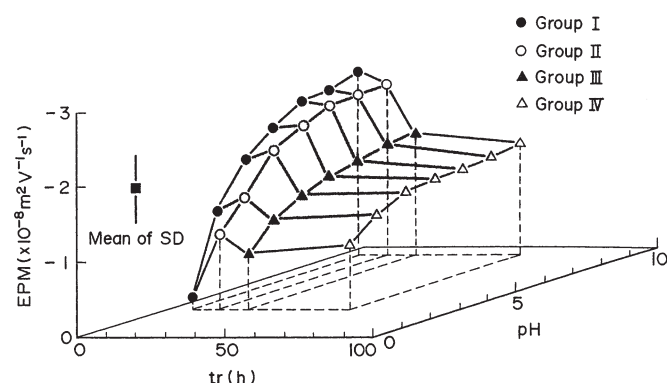


図2 草地から分離した4つのグループの細菌細胞の電気泳動移動度(EPM)のpH依存性
寒天平板培地上でのコロニー出現時期(tr)により、4つのグループに分けた(trが大きいほど、増殖速度が遅い)。(●)グループIに属する22菌株の平均値、(○)グループIIに属する23菌株の平均値、(▲)グループIIIに属する22菌株の平均値、(△)グループIVに属する34菌株の平均値。各グループ7つの異なるpHでの電気泳動移動度の標準偏差の平均値は $0.46 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であった(図中■で示した)。文献2)より許可を得て転載。

い)、またpHを変化させたとき荷電状態の変化が小さいこと(pHを変化させた時の電気泳動移動度の変化が小さい)が見出された。さらに増殖速度が小さいほど細胞表面がより疎水的である傾向が認められた(図3)。一方、川砂から分離するのに強い操作が必要な菌株ほど(川砂により強固に付着している菌株ほど)、増殖速度が小さいことが見出された⁵⁾。自然環境中で、増殖速度の小さな細菌は固体表面に強固に付着し、周囲環境の改善を待って生き残りを図っているのに対し、増殖速度の大きな細菌は付着状態から比較的容易に脱離し、他の環境に移動し、そこで増殖して生残を図っているのかもしれない。

2.1.3 微生物細胞は柔らかいコロイド粒子

水溶液中に懸濁した帯電コロイド粒子に電場をかけるとある速度で電気泳動する。水溶液のイオン強度を大きくしていくと、帯電コロイド粒子表面の電気二重層が圧縮され、粒子の電気泳動速度が小さくなっていく。ところが、最近になって、ある種のコロイド粒子では、溶液のイオン強度を大きくしても電気泳動速度が小さくならず、ゼロ以外のある値に漸近していくという奇妙な現象が知られるようになった。大島らは、コロイド粒子表面に溶液が浸透してゆけるポリマー層が存在し、そのポリマー層中の帯電したセグメントが非常に小さく、高いイオン強度下での電気二重層圧縮の影響をほとんど受けないために、このような現象が起これと考えてい

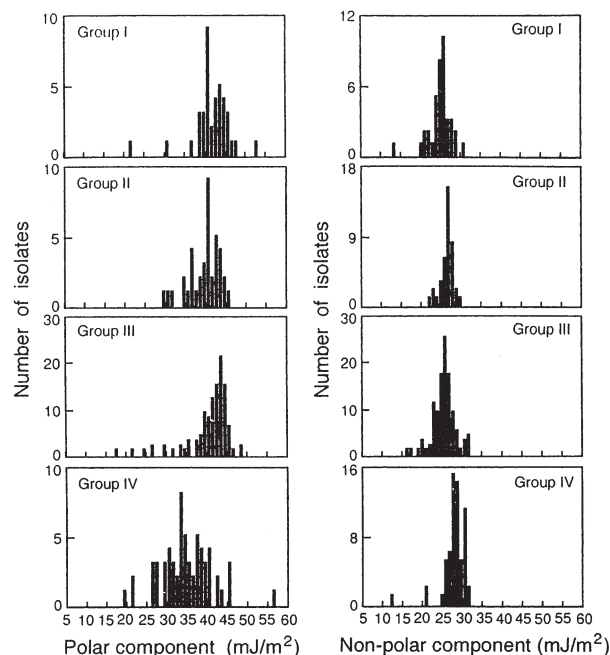


図3 草地から分離した細菌の細胞表面の親水性、疎水性
グループIからIVになるに従ってコロニー出現時期が遅くなっている(増殖速度が小さくなっている)。グループIからIVになるに従って、細胞の表面張力の非極性成分に変化はないが、極性成分が小さくなっていく(細胞表面が疎水的になっていく)ことに注意。文献3)より許可を得て転載。

る⁶⁾。表面にこのようなポリマー層を持つコロイド粒子を一般的に取り扱えるよう、大島らは「柔らかいコロイド粒子の理論」を提唱してきた⁷⁾。

筆者の研究室ではこれまで数百菌株の細菌細胞について、その電気泳動移動度のイオン強度依存性を調べてきた。その結果、全ての細胞がイオン強度を大きくしても電気泳動移動度がゼロにならず、ある一定の値に漸近していくパターンを示した。従来から細菌の細胞は「生きたコロイド粒子」といわれてきたが、図4に示すように細菌細胞は表面に帯電したポリマー層を持つ「柔らかいコロイド粒子」でもある、ということができる。細菌細胞が柔らかいコロイド粒子であることを考慮すると、後述するように、微生物の付着メカニズムに関し、これまでの考え方を改める必要が出てくる。

2.2 付着基質表面の性質

微生物細胞が付着する表面は元の清浄な表面ではない。なぜなら、環境中では、固体表面に、多かれ少なかれ有機物、無機物が吸着し、いわゆるconditioning film (CF) が形成されているからである⁸⁾。その生成は分子の拡散に依存し、比較的速いと言われている(15分以内にかんりの有機物が吸着したという報告がある)⁹⁻¹¹⁾。

CFの組成として、海水に浸漬した金属表面上に、アミド、芳香族化合物、アミン、カルボン酸などの官能基を持つ有機物が吸着したという例¹²⁾に見られるように、タンパク質、糖タンパクあるいは腐植酸などが吸着有機物の候補として挙げられている¹³⁻¹⁵⁾。

CFは微生物にとって濃縮された栄養源になるばかりでなく、数多くの報告に見られるように元の固体表面の物理化学的性質(表面荷電、ゼータ電位、表面張力等)にも様々な影響を与える。しかし、この改変を受けた表面への微生物の付着に関しては、未だ十分な解明がなされておらず、今後の課題である。

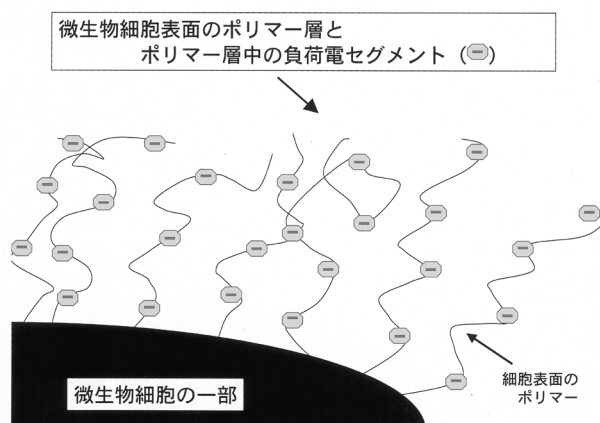


図4 柔らかいコロイド粒子「微生物細胞」の表面ポリマー層の概念図

2.3 付着メカニズムに関する新たな展開

前述したように微生物細胞は「生きた柔らかいコロイド粒子」である。この点を考慮し、微生物細胞の電気泳動移動度のイオン強度依存性を大島の理論で取り扱うと細胞の表面電位が旧来の取り扱いに比べ、桁違いに小さくなることを見出された¹⁶⁾。この値を用いると、負に帯電した微生物細胞が同じく負の荷電を持つ付着基質(例えばガラス表面)に近づいて行く時に受ける静電的反発エネルギーが、従来の考え方と比べ、図5に示したように、非常に小さいものとなる。

微生物細胞が基質表面に近づく時、途中でエネルギー障壁が存在しないのであれば、ある時間内に微生物細胞が表面に衝突する回数が多い程、付着数が多くなると推測される。実際に、海洋細菌(*Vibrio alginolyticus*)のガラス表面への付着菌数が鞭毛運動速度に比例して大きくなる」という実験事実が得られており¹⁷⁾、「従来はあると考えられていたエネルギー障壁が実際には存在しない」という新しい付着メカニズムの考え方を適用できることが示されている。このように、イオン強度が大きな条件下で、ポリマー層の発達した微生物細胞の付着を考える際には、新しい付着メカニズムによる解析が有用と思われる。

3 微視的環境

微生物は μm オーダーの小さな生物である。一方、バイオフィルムは数十～数百 μm 以上の厚みを持ちうる。我々人間の目から見れば、薄い二次元の平面にしか見えないバイオフィルムも、微生物にとっては、十分な厚みを持った三次元

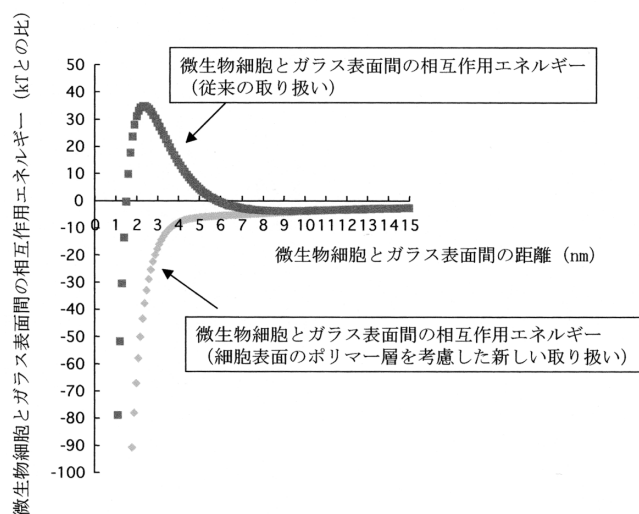


図5 微生物細胞がガラス表面に近づいていくときのエネルギー曲線(両者間の相互作用エネルギーを熱運動エネルギー kT で除した比で示してある)細胞表面のポリマー層を考慮すると、従来の取り扱いでは存在すると考えられていたエネルギー障壁が実際にはないことに注意。文献16)より改変。

的な生活空間と言える。この空間は次に述べるように外部環境と異なる種々の特徴を持っている。

3.1 バイオフィルムの構造

フィルムという言葉からバイオフィルムが平坦な薄い膜状の構造を持つと連想しがちであるが、このようなイメージは1990年代に一変した。即ち、レーザー顕微鏡を用いた観察により「付着基質上に細胞外多糖類から成るマトリックスに閉じこめられた細菌のマイクロコロニー（比較的少数の細胞からなる小さな細菌集落）が点在し、これらマイクロコロニー間を密度の低いポリマーが埋めており、そこは水が比較的自由に動ける水路（water channels）となっている」という三次元像が明らかにされた^{18, 19)}（図6にイメージ図を示した）。

バイオフィルムでは密度の低い（water channelsに見られる）あるいは密度の高い（微生物細胞が閉じ込められている）ポリマーマトリックスが観察されている。マトリックスの主成分は水であり、含水率が97%程度あるいはそれ以上という報告がある^{20, 21)}。このようなバイオフィルムの高い水分保持能力は、水分環境が変化する自然環境中で、致命的な乾燥から微生物を守る働きをしていると考えられる。

3.2 多様な微視的環境

バイオフィルム内には種々の環境因子が μm オーダーで変化する「微視的環境」が形成されている。De Beerら²²⁾の微小酸素電極を用いた測定結果に依れば、水路（water channel）では付着基質表面近傍でもかなりの酸素濃度が計測されるのに対し、channel から僅か100 μm 程しか離れていないマイクロコロニーでは表面から酸素濃度は急激に減少し、わずか数10 μm 内部でほとんどゼロになっている。硝化、脱窒が起こっているバイオフィルムにおいても、 NO_3^- 、 NO_2^- 、 O_2 等のバイオフィルム内での顕著な濃度勾配が観測されている²³⁾。バイオフィルム内では電位にも不均一性が予想され、金属腐食、物質拡散にも影響する可能性が示唆されている²⁴⁾。

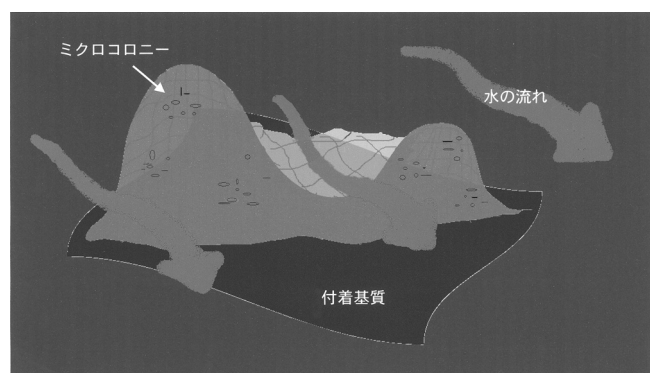


図6 バイオフィルム構造のイメージ図

このようにバイオフィルムでは種々の環境因子が μm オーダーで勾配を持って変化する微視的環境が形成され、その結果多様なニッチ（生態的地位）が生み出され、多様な微生物が同一のバイオフィルム内に共存できるようになると考えられる。

3.3 バイオフィルム内は動的な世界

バイオフィルム内の環境形成には種々の要因が関与している。例えば、ある物質がバイオフィルム内でどの位の速さで生産されるか、逆に消費・分解されるか、外部への拡散速度はどの程度か、これら因子によってその物質のバイオフィルム内での濃度が決まってくると考えられる。ここで、ある物質のバイオフィルム内での動態について、簡単なモデルを基に考えてみよう。

バイオフィルム内の微小領域（質量bf）において、ある物質の質量の時間dt間の変化量をdmとおくと、次式が成り立つ。

$$\begin{aligned} dm/dt &= kp \cdot bf - ku \cdot bf - D(dc/dx)Su \cdot bf \\ &= (kp - ku - D(dc/dx)Su)bf \cdots \cdots \cdots (1) \end{aligned}$$

但し、

kp；ある物質の単位質量当たりのバイオフィルム内での生産速度

ku；ある物質の単位質量当たりのバイオフィルム内での消費（あるいは分解）速度

D；ある物質がバイオフィルムと外部環境の境界を移動する際の拡散係数

dc/dx；ある物質のバイオフィルム内外の濃度勾配

Su；バイオフィルムの比表面積（単位質量当たりの表面積）（角砂糖を細かく砕くと速く水に溶ける。砕くことによって、新たな表面が現れ、水との接触面積が増えるからである。このように小さな物体ほど、単位質量当たりの表面積（比表面積）は大きい。）

上式(1)によれば、仮にある物質の生産速度、消費・分解速度、拡散係数、濃度勾配が同じでも、形成初期のバイオフィルムでは比表面積Suが大きいので外部への拡散の寄与が大きく、バイオフィルム内でその物質が蓄積され難い（ dm/dt が小さい）と推測される。アシル化ホモセリンラクトンのようなシグナル物質がある濃度以上になると特定遺伝子が発現され、バイオフィルム内の微生物の性質が一変する（例えば、病原性を示すようになる）Quorum sensingという現象が多く細菌について認められているが²⁵⁾、このような現象は、物質が蓄積し難い形成初期のバイオフィルムでは起こり難いのかもしれない。

上述したように、バイオフィルム内の環境は動的なものと

して捉える必要がある。その駆動力となっているのは微生物の活動である。即ち、厚さ数十～数百 μm の水を含んだポリマーマトリックス内を物質が単に拡散しているのではない。そこには生きた微生物が存在し、様々な物質を生産、消費・分解し、時に増殖また死滅し、あるいは条件が良くなるまで生き残りを計っている。このように多様な微生物が棲息するバイオフィルム内の微視的環境は、微生物共同体が自ら創り

出したものとも言える。

4 微生物共同体

バイオフィルム内には周りの環境と比べ、桁違いに高密度で微生物が棲息している。例えば、琵琶湖の湖岸域に見られるヨシの表面に形成されたバイオフィルム内に、周りの湖水

図7-a)

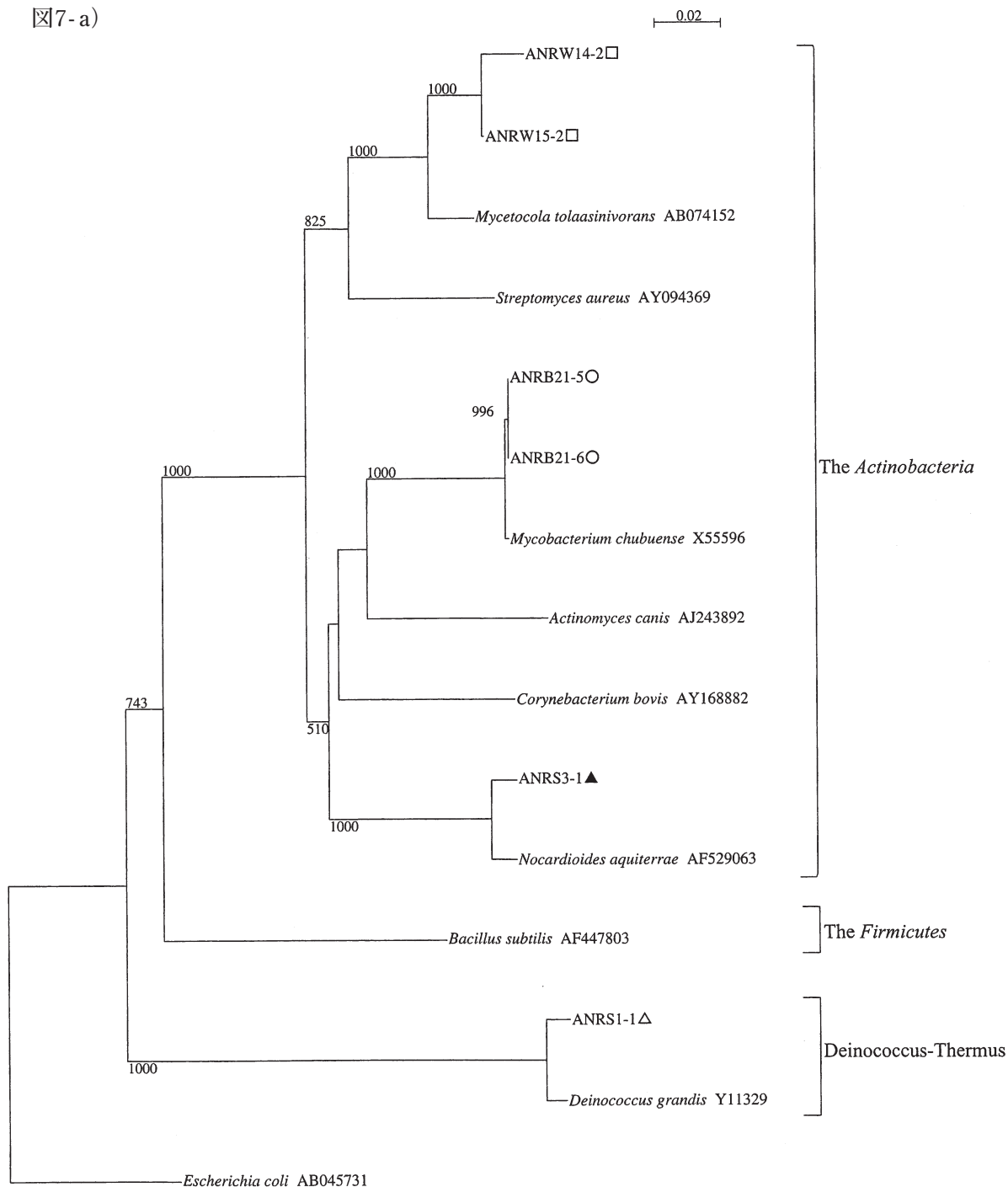


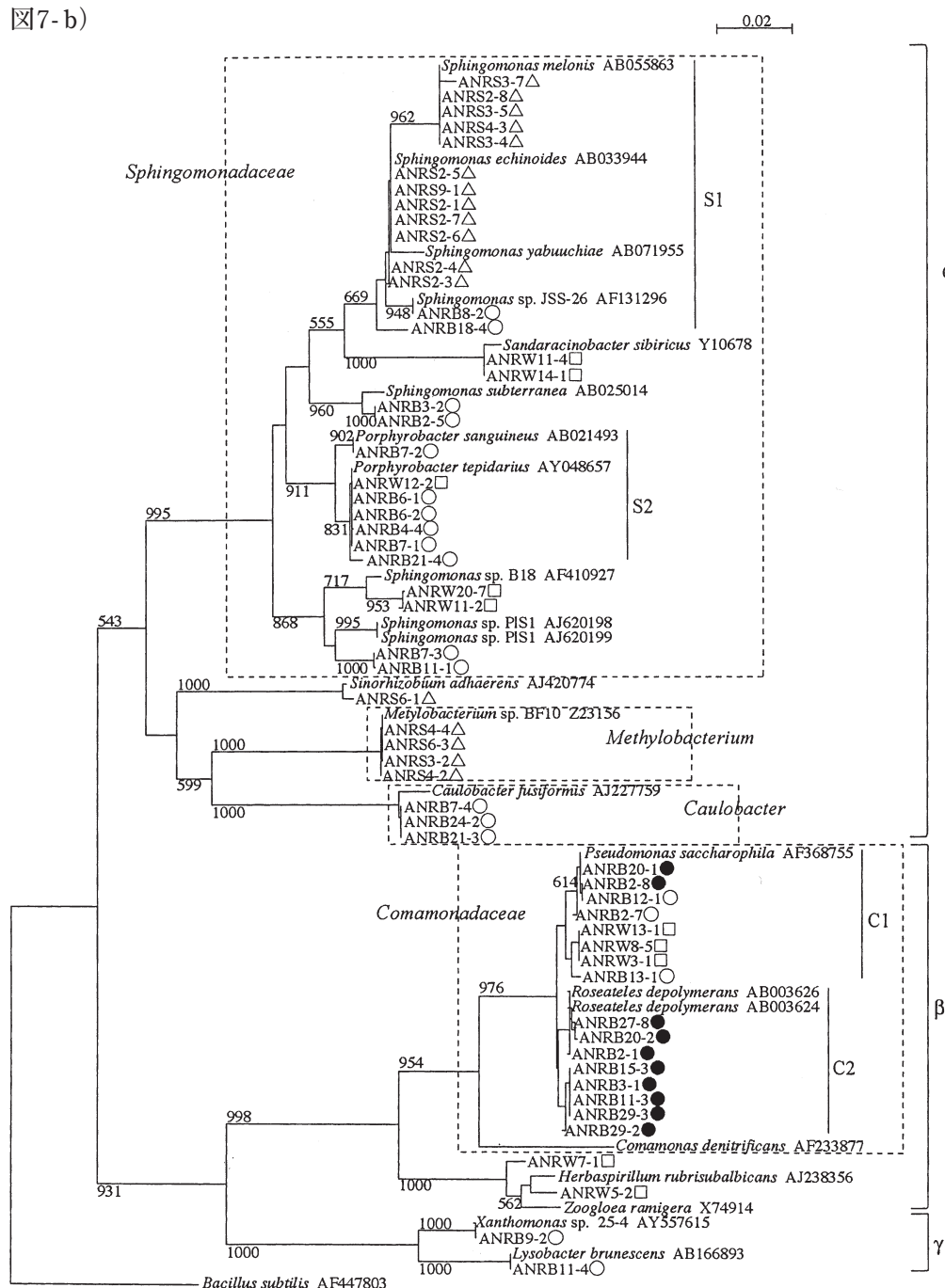
図7 ヨシの空気中表面(△)、水に浸かった部分に形成されたバイオフィルム(○)、周囲の琵琶湖湖水(□)から分離された細菌菌株の系統樹 (a) *Actinobacteria*、*Deinococcus-Thermus* 門に属する菌株；b) *Proteobacteria*門に属する菌株) 文献21) より許可を得て転載。b) は次ページに転載

の1000倍にも達する密度の細菌が観察されている²¹⁾。バイオフィーム内では密度が高だけでなく、多様な微生物が棲息している。図7に示したように厚さ数十 μm に過ぎないヨシ表面バイオフィーム内に幾つもの門にまたがる多様な微生物が確認されている²¹⁾。このように多様な微生物が高密度で棲息している空間では必然的に微生物間に多様な相互作用が生じ得る。従って、バイオフィームに棲息する微生物全体が示す生理的性質は個々の微生物の性質を単に足し算したものではなく、それまで持ち得なかった特性を持つようになる場合がある。物質だけでなく、遺伝子までもが交換され、

バイオフィームはある種の多細胞生物としての性格を持つようになると言われる由縁である²⁶⁾。

バイオフィーム内には多様な微視的環境が形成されているが、外部環境とまったく無縁であるわけではない。例えば、ヨシBFの厚みは図8に示すように、毎年ほぼ同じパターンで季節とともに変動し²¹⁾、ヨシ群落内の日射量と相関していることが解っている。そこに棲息している微生物の種類がどのように変動しているかは、今後の課題であるが、このような基礎的なデータの集積が、種々の環境中のバイオフィームの理解につながると考えられる。

図7-b)



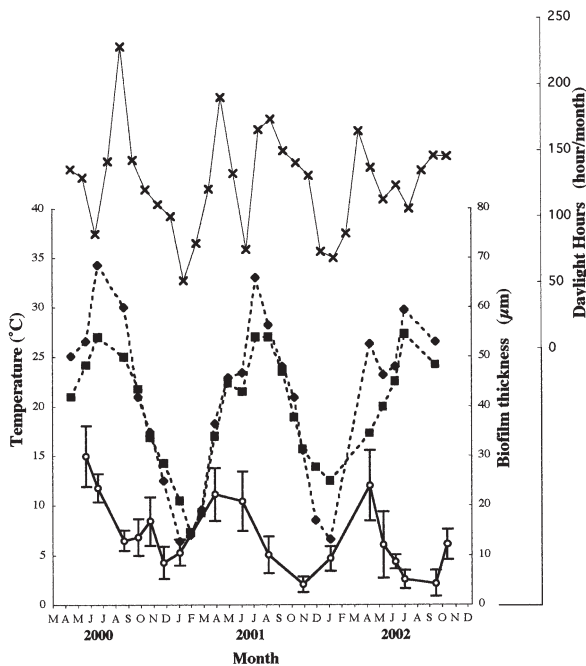


図8 琵琶湖沿岸域に見られるヨシの水中部分表面に形成されたバイオフィルムの厚みの季節変動
(○) バイオフィルムの厚み、(◆) 気温、(■) 水温、(X) 一ヶ月当たりの日照時間。文献21) より許可を得て転載。

5 終わりに

以上見て来たように、conditioning filmへの微生物付着にはじまる一連の過程を経てバイオフィルムは成熟していく。

形成初期には比表面積が大きいため外部環境との物質のやり取りが大きいバイオフィルムも、成熟とともに比表面積が小さくなり、独自の微視的環境を形成し、多様なニッチを創り出すようになる。それに伴い、多様な微生物が棲息し、それらが総体として示す特性も変遷していくと考えられる。バイオフィルムがこのような種々の要因によって動的に形成・維持されているという視点に立てば、バイオフィルムを理解するための道筋が見えてくる。ここでは、微生物付着、微視的環境、および微生物共同体という三要素からバイオフィルムを概説した。これら三要素を基軸に、先ずバイオフィルムの一般的性質を理解し、その上に特定の外部環境因子がバイオフィルム形成に及ぼす影響を解析していけば、種々の環境中のバイオフィルムに対し、より深く理解できるようになると期待される。

参考文献

- 1) Y. Kasahara and T. Hattori : FEMS Microbiol. Ecol. ,
86 (1991) , 95.
- 2) H. Morisaki, Y. Kasahara and T. Hattori : J. Gen.

- Appl. Microbiol., 39 (1993), 65.
- 3) Y. Kasahara, H. Morisaki and T. Hattori : J. Gen. Appl. Microbiol., 39 (1993), 381.
- 4) R. Shingaki, K. Gorlach, T. Hattori, K. Samukawa and H. Morisaki : J. Gen. Appl. Microbiol., 40 (1994), 469.
- 5) H. Morisaki and H. Toda : Microbes and Environments, 13 (1998), 9.
- 6) 大島広行 : 生物物理, 36 (1996), 295.
- 7) H. Ohshima : Adv. Colloid Interface Sci., 62 (1995), 189.
- 8) M. G. Brading, J. J. Jass and H. M. Lappin-Scott : Microbial Biofilms, ed. by H. M. Lappin-Scott and J. W. Costerton, Cambridge University Press, (1995), 46.
- 9) J. D. Bryers : Biotechnology Progress, 3 (1987), 57.
- 10) W. G. Characklis, G. A. McFeters and K. C. Marshall : Biofilms, ed. by W. G. Characklis and K. C. Marshall, New York, Wiley, 1990, 341.
- 11) G. I. Loeb and R. A. Neihof : Advances in Chemistry Series, 145 (1975), 319.
- 12) G. T. Taylor, D. Zheng, M. Lee, P. J. Troy, G. Gyananath and S. K. Sharma : Biofouling, 11 (1997), 31.
- 13) K. C. Marshall, R. Stout and R. Mitchell : J. Gen. Microbiol., 68 (1971), 337.
- 14) R. E. Baier : Adsorption of microorganisms to surfaces, ed. by G. Bitton and K. C. Marshall, New York, Wiley, (1980), 59.
- 15) K. H. Rittle, C. E. Helmstetter, A. E. Meyer and R. E. Baier : Biofouling, 2 (1990), 121.
- 16) H. Morisaki, S. Nagai, H. Ohshima, E. Ikemoto and K. Kogure : Microbiology, 145 (1999), 2797.
- 17) K. Kogure, E. Ikemoto and H. Morisaki : J. Bacteriol., 180 (1998), 932.
- 18) D. E. Caldwell, D. R. Korber and J. R. Lawrence : Adv. Microb. Ecol., 12 (1992), 1.
- 19) J. R. Lawrence, D. R. Korber, B. D. Hoyle, J. W. Costerton and D. E. Caldwell : J. Bacteriol., 173 (1991), 6558.
- 20) X. Q. Zhang, P. L. Bishop and M. Kupferle : Water Sci Technol., 37 (1998), 345.
- 21) M. Yamamoto, M. Murai, A. Takeda, S. Okunishi and H. Morisaki : Microbes and Environments 20

- (2005), 14.
- 22) D. De Beer, P. Stoodley and Z. Lewandowski :
Biotech. Bioeng., 44 (1994), 636.
- 23) D. De Beer, A. Schramm, C. M. Santegoeds and M.
Kuhl : Appl. Environ. Microbiol., 63 (1997), 973.
- 24) J. W. Costerton and H. M. Lappin-Scott : Microbial
Biofilms, ed. by H. M. Lappin-Scott and J. W.
Costerton, Cambridge University Press, 1995, 1.
- 25) 紙野 圭：バイオフィルム入門，日科技連，(2005)，
113.
- 26) 森崎久雄：バイオフィルム入門，日科技連，(2005)，1.
- (2007年1月12日受付)