

# 展望

バイオフィルムの形成と金属材料表面-2

## 金属材料におけるバイオフィルム研究の重要性

Significance of Investigation on Biofilm in Materials Engineering

菊地靖志

Yasushi Kikuchi

大阪市立大学 工学部 客員教授

大阪大学 名誉教授

### 1 はじめに

各種の金属材料によって作られた構造物が水が存在する環境下のいろいろな分野で利用されている。水が純水でない限り、それらの表面には必ず無機・有機物質が付着する。これらの付着物は時間の経過と共にその構成物・形を変化させる。その一連の過程で金属表面は付着物環境から大きな影響を受けることとなる。この付着物集合体はバイオフィルム(biofilm、微生物共同体、生物皮膜あるいはぬめり等と表現されている)と呼ばれ、形成挙動・作用等は未だ十分に解明されておらず注目を集めている。材料表面に作られた、バイオフィルムには光と影がある。光の部分では排水処理、環境浄化技術で、発酵に應用されて食品製造、その他で活用され大きなメリットをもたらしている。影としては給・排水管、熱交換機器では著しい効率の低下、船舶の外板にできると燃費の悪化、医療機材では感染症の、食品やその製造機械では食中毒等の原因にもなっていることが挙げられる。さらに金属材料(接合部を含む)腐食の分野でもバイオフィルムが関与した損傷事例が報告されて微生物誘起腐食(Microbiologically Influenced Corrosion略してMICまたはBiocorrosionとも表現)として注目されており<sup>1)</sup>、このBiocorrosionによる損害額は非常に大きいことが示されている<sup>2)</sup>。しかしこの現象は工学の分野で一般的な知識とまでには至っていないのが現状である。また、このようなバイオフィルムを除去するために大量の薬剤と労力が使われ、環境への負荷増大が指摘されている。本会ではバイオフィルムと鉄鋼材料との関わりを研究するグループがフォーラムの一つとして設置され、マイナーではあるが地道な活動を続けている。しかし“生物と金属”との組み合わせは今後興味ある研究対象となるのではないだろうか。バイオフィルムの研究は当然ながら生物系分野で主体的に進められ微生物生態、抗菌剤、環境衛生等の関連分野で高い関心が持たれており横に広がりをもちつ

つある。最近入門書<sup>3,4)</sup>も出ているが本格的な研究には日が浅いようである。本稿ではBiocorrosionの事例研究を切り口として、金属材料関連の研究者にとってもバイオフィルムが遠い存在でないことを示し、研究の重要性・面白さの一端を著者なりに紹介したい。前出の“生物と金属”というキーワードで研究課題を調べた結果を表1にまとめた。材料工学にも接点があることが分かっていただけるはずである。表の上から順を追って考えてみたい。

1. バクテリアリーチング<sup>5,6)</sup>を利用した貧鉱から有用金属回収は昭和40年代頃まで国内の非鉄鉱山で行われていたが、(主として銅)最近、廃棄された電子部品や焼却灰その他から金属を回収する技術として再び注目されてきた。海外の銅鉱山では現在も大規模に操業しており、米国での年間銅生産量の約15%を占めているとの報告もある。同手法ではランニングコストが安いメリットがあり、適用されている細菌は硫酸酸化細菌や鉄酸化細菌などでpH2~3の強酸性環境で活動できる。またMn、Zn、Niの回収などへの応用も検討されている。
2. 多くの生物種にみられる現象で生物の鉱物形成作用とも

表1 生物と金属とのかかわり

|   | 分 類                                   | 内 容                                                                                      |
|---|---------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | Bioleaching                           | 低品位鉱浸出への微生物の応用<br>・・・Cu, U 他                                                             |
| 2 | Bio-mineralization<br>(Biodeposition) | 生物が鉱物を作る<br>・・・サンゴ、真珠、海中の鉱物資源他                                                           |
| 3 | Biosorption                           | 微生物が金属イオンを吸着あるいは保持する能力<br>・・・金属の回収、環境浄化                                                  |
| 4 | Biomachining                          | 微生物の代謝反応を利用した無歪・微細除去加工<br>・・・鉄、ステンレス鋼、銅他                                                 |
| 5 | Biocorrosion<br>(Biodeterioration)    | 金属材料等の腐蝕・劣化                                                                              |
| 6 | Antibacterial Action<br>of Metal Ions | 抗菌性金属材料<br>・・・銀、銅、亜鉛、水銀等のイオンによる殺菌性                                                       |
| 7 | Biomaterials                          | 生体材料(人の細胞と接触して用いられる治療用材料)<br>金属系・・・ステンレス鋼(Niフリー化)、Co-Cr合金<br>Ti合金、Au-Ag合金、Ag-Su合金(アマルガム) |

いう<sup>7,8)</sup>。生成した物質は多種多様であるが生体鉱物とも呼ばれている。装身具の真珠やサンゴは有名で、他には骨、歯および貝殻の形成なども含まれる。また走磁性細菌は体内にマグネタイトを合成する。この菌を体の一部に持つ大型動物も確認されており、動物の長距離移動をコントロールしていると理解されている。海底の金属資源 (Mn 団塊、鉄鉱石等) も生体鉱物の一つである。(この Biomineralization という表現は 1945 年代後半に我国の研究者によって初めて使われたともいわれている)

3. 微生物が金属イオン等を吸着保持する作用である<sup>9)</sup>。U、Cu、Au、Ni、Cr その他多種の金属は各種細菌、カビおよび酵母その他に吸着されることが知られており、このような吸着機能を利用した排水浄化技術も期待されている。
4. 微生物のもつ生化学的反応等を利用して金属を加工しようとする試みである<sup>10)</sup>。これらの反応はバイオフィームが形成された表面で行われる。加工温度が常温に保持でき、被加工材への変形などを与えることなく微細で選択的加工が可能となることが特長となる。詳細は本シリーズで報告される予定である。写真1は微生物腐食再現実験で得られたスケルトン構造体でこのような微細フィルターなども目標になると考えられる。
5. 微生物誘起腐食・劣化と呼ばれ、実用金属材料やその溶接部で多くの事例がある<sup>1)</sup>。腐食孔付近にはバイオフィーム・細菌が観察され、材料に対して比較的マイルドな水環境下で発生している。MICとは Microbiologically Influenced Corrosion の略字である。本シリーズで掲載予定である。
6. 金属イオンのもつ抗菌的な性質を材料機能化に応用することである。適用例としては Ag、Cu あるいは Mo などを合金元素として用いた抗菌ステンレス鋼があり<sup>11)</sup>、表面における微生物の増殖を抑制する殺菌作用を活かした

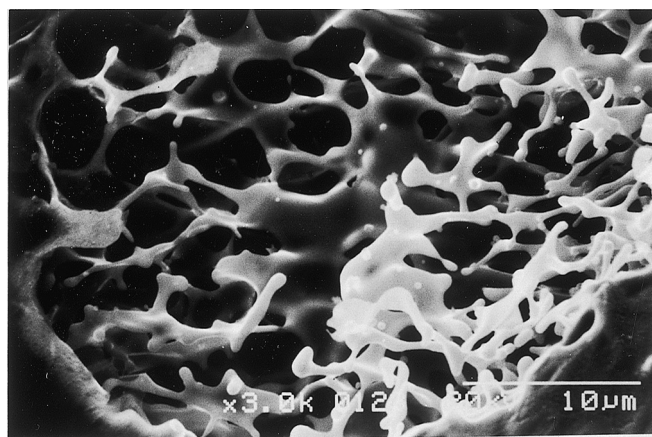


写真1 微生物腐食によるスケルトン構造 (SUS308 溶接金属)

ものである。またセラミックス (ゼオライト等) に抗菌金属を担持させた抗菌化セラミックスも事例として挙げられる。このように新しい開発と応用が活発に検討されている。

7. 生体材料の分野では金属材料・セラミックスは一部実用化されている<sup>12,13)</sup>。しかし材料側に解決を求められている課題は多く、アレルギー発症はその一例である。もはや Ni アレルギーのみでなく金属アレルギーと表現されている。このような背景により生体に friendly な表面改質などが特に求められている。一方、人間の老化と共に生体材料も経年的に劣化するものが良いのではないかと問われたことがある。従来、我々にはなかった材料開発のコンセプトである。

以上7項目をあげてみたがいずれも材料表面は微生物・生体組織・細胞あるいは有機物質等を含んだ水環境と接触しており、バイオフィームの形成は避けられない。これらの界面で何がどう変化していくのか関心が高まったのは対象により多少の差はあるが 1990 年半ばからである<sup>14)</sup> ため、まだ不明な点が多くある。

## 2 金属材料 (溶接・接合部) 表面に形成されたバイオフィームの諸例

前述したように水と接している固体表面には水が殺菌されていない限り、一連のプロセスを経てバイオフィームが形成される。それは身近な所で視覚ではなく感覚的に日常、体験している。例えば浴室、洗面室等の水回りの所を数日間清掃を怠るとぬめりが発生する。手で触れた時ぬめりとした感触、これはバイオフィームである。バイオフィームは生息している微生物の種により、わずかに発色する場合もある。このような環境下で基質は各種の影響を受け、それが金属であれば腐食の発生につながる。いわゆる微生物誘起腐食 (MIC, biocorrosion) である。筆者は biocorrosion の事例解析を実施し、研究室レベルでの再現実験も行った。その間に得られた微生物の金属表面への付着やバイオフィームの形状等について定性的な内容となるが、観察結果を紹介する。まず実験方法の概略を次に示す。微生物を培養した溶液を調製し、フラスコ等に一定量採取しその中へ金属試験片を浸漬し菌の培養温度で保持する。所定の時間が経過してから試験片を取り出し、リンスして微生物の固定化処理を行う。試料は乾燥状態にして走査型電子顕微鏡で、湿分を含んだ状態の試料は低真空型走査電顕により観察する。光学顕微鏡 (倍率最高 1000 倍) ではアクリジンオレンジ試薬で微生物を染色し、蛍光下で観察する。微生物や集団はオレンジ色に発色して鮮明に確認できる。詳しくは文献を参照いただきたい。

## 2.1 ステンレス鋼の場合

SUS304 ステンレス鋼で得られた表面状況を写真2および3に示す。写真2はシュードモナス菌（微生物腐食の原因菌の一種、以下用いた菌はいずれも腐食に関与した種である）培養液中に30日間浸漬させた時の表面である。筋状のものはエメリー研磨の痕である。コロニーを形成している菌や点在している菌、また培養液成分由来の物質も付着している。それらはバイオフィームと共に存在し、腐食孔も発生している<sup>15)</sup>。写真3は事例水中に約8ヶ月浸漬した304 ステンレス鋼溶接部に形成されたバイオフィームと微生物である。亀裂はバイオフィームのものであり、乾燥しているためである。このバイオフィームの下でしばしば腐食が発生する。バイオフィームの成分、厚さ、生息菌数等は未解析でその役割をその場観察手法を用いるなどして明らかにする必要がある。事例でもしばしばみられる316 ステンレス鋼の結果を写真4および5に示す。事例水は海水でラボテスト結果の例が写真4である。海水温度にセットされた恒温槽に56日間保持した

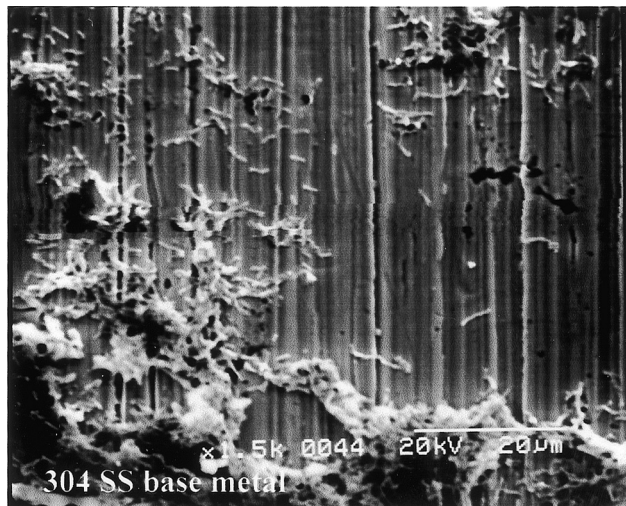


写真2 SUS304鋼表面に付着したシュードモナスとバイオフィーム

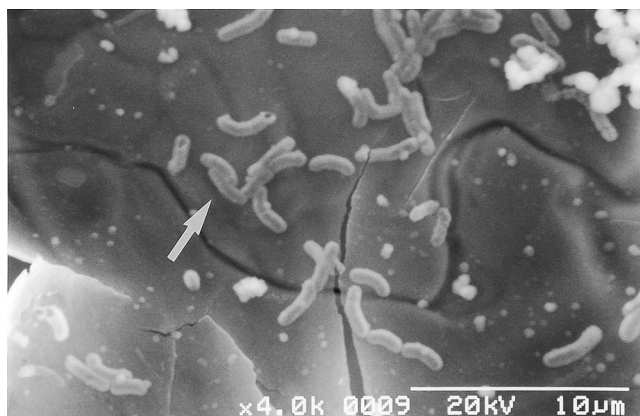


写真3 SUS308溶接金属表面に形成されたバイオフィームと付着微生物（事例水使用）

状態を示す。糸状微生物がバイオフィームと共に付着しており、右上方に腐食孔が観察できる。バイオフィームを拭きとった表面ではさらにはっきりと腐食状況を確認できる<sup>17)</sup>。次に硫酸還元菌（嫌気性菌で酸素を好まない）を含む事例地下水を用いた結果で写真5に示す。15日間浸漬でバイオフィームが形成され、菌も存在している。40日後の状態では多数の腐食孔が発生しており、バイオフィームは乾燥し固型物

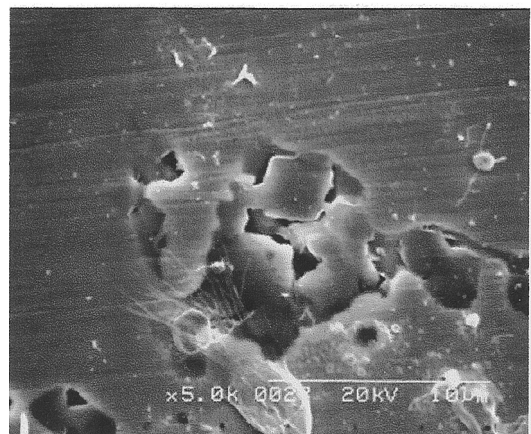
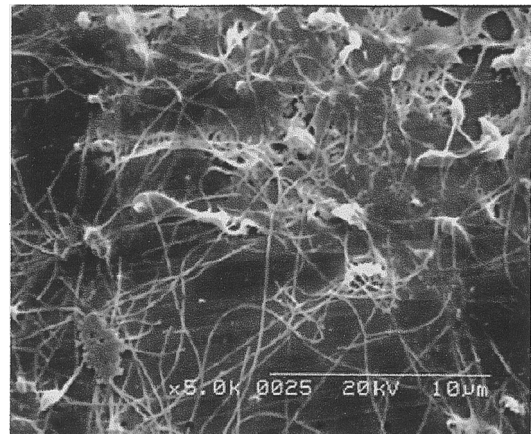


写真4 事例海水中でSUS316鋼表面のバイオフィームと糸状微生物（上）、バイオフィーム下での腐食孔（下）

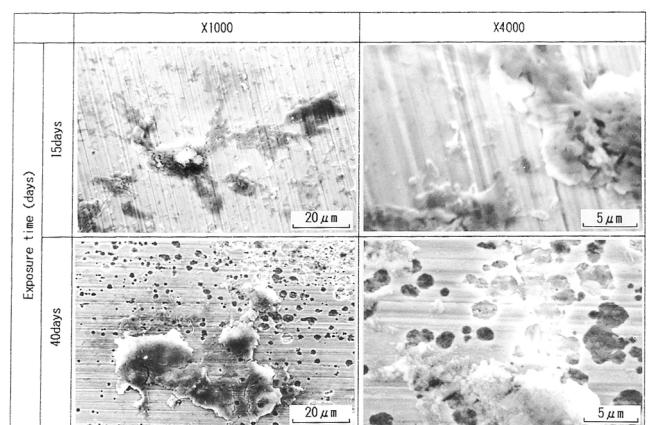


写真5 硫酸還元菌を含む事例水中でのバイオフィーム、付着微生物および腐食孔（SUS316鋼）

のようになり割れていることが確認できる。

## 2.2 その他の金属の場合

銅表面でのバイオフィルムの事例を示す。地下水を冷却水に用いた熱交換器の銅パイプの腐食例では原因菌としてスタフィロコッカス菌が特定された(ブドウ球菌の一種)。この菌の培養液中に一定期間試験片(無酸素銅)を浸漬し、取り出してSEM観察した。写真6に示すようにバイオフィルムと球菌が層状に見える。またクラックも発生している。バイオフィルムを拭きとった後の表面を観察すると多数の腐食孔がみえる。スタフィロコッカス菌はバイオフィルム中で生息し、蛋白質を栄養源として活動しアンモニアを産生する。このため銅管は腐食されたのである<sup>19)</sup>。アンモニアを含む試薬で銅(銅合金)をエッチングし組織観察を行っているのは周知の通りである。

次にMg合金(AZ31B)表面に付着したシュードモナス菌とバイオフィルムの状況を写真7に示す。培養液から取り出した試料をリンスしアクリジンオレンジ試薬で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。白く見えるのはコロニーである。時間の経過と共にコロニーは減少し付着量も少なくなる。これは

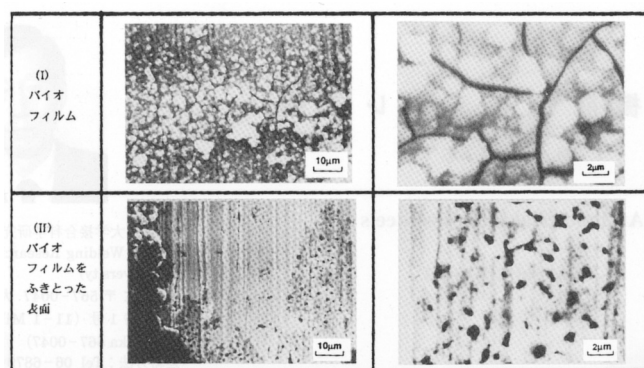


写真6 事例水中のスタフィロコッカスによる銅表面のバイオフィルムと腐食孔

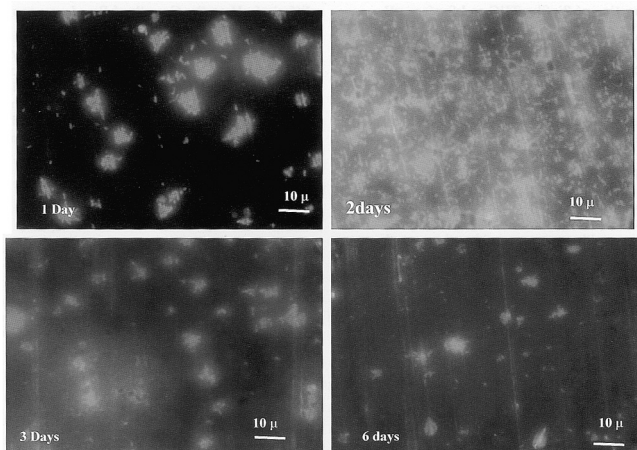


写真7 Mg合金表面でのシュードモナス菌の付着とバイオフィルム

Mgが水分と反応して培養液をアルカリ性にするためにシュードモナス菌が殺菌されるためである<sup>20)</sup>。以上のように金属材料表面に微生物が付着し、バイオフィルムを形成し、その中で生息していることを確認してきた。しかし、それらの金属はそれぞれ異った組成と組織からなっており、この基質の違いは影響しないのだろうか。組織と微生物の付着をミクロな目で観察すると、結晶粒界に優先的に付着する場合とむしろ粒内に優先的に付着する傾向とがみられる<sup>21-23)</sup>。また化学組成の効果も確認できている。このような現象は未解明で材料側からのさらなるアプローチが期待される。

## 2.3 抗菌機能化された金属の場合

本誌、2006年8月号Techno Scope<sup>24)</sup>にもあるように鉄鋼材料の抗菌化が注目されており、安心・安全・清潔・衛生などがキーワードになっている。セラミックスの分野ではAg、CuあるいはZn酸化物他を担持させた無機系抗菌剤が開発され実用に供されている。一方実用金属材料でもAgあるいはCuは古くから抗菌性をもつことが知られており、最近、このAg、Cuを合金元素としてステンレス鋼に応用し、実用化されている。抗菌機能は表面で要求されるのでメッキによる抗菌化もある。以下に抗菌ステンレス鋼表面での微生物の付着、バイオフィルム形成について述べる。Agを合金化した304ステンレス鋼表面への微生物付着とバイオフィルム形成を通常304鋼と比較して写真8に示す。アクリジンオレンジ試薬で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。(a)はシュードモナス菌である。1、2は通常材で全面にバイオフィルムが形成されている。3、4はAgで抗菌化されたもので付着が著しく抑制されすぐれた効果があることが示されている。(1・3は母材、2・4は溶接金属)(b)はバチラス菌を用いたCu含有ステンレス鋼の結果である。菌の付着はAM3のCuを合金化したもので抑えられている。いずれも溶接金属である。このような微生物制御機能という従来にない性質を付与した金属材料開発と実用化は今後の福祉型社会のニーズに合致するものと考えている。

バイオフィルムとは若干異なるが抗菌ステンレス鋼に付着した菌はどのように変化するのだろうか。Ag含有ステンレス鋼に付着している菌を表面から洗い出し、遠心分離操作によって集めて電子顕微鏡観察試料を作製した。透過型電子顕微鏡で観察した結果を写真9に示す。菌はシュードモナスであるが、細胞が破壊されている様子が分かる。さらに細胞膜周辺あるいは内部に折出物らしきものも観察できる。こうした変化の詳細は未だ明らかにはなっていない。電子顕微鏡観察に習熟している材料研究者が取り組める課題も多い。研究は本格的に始まって日が浅く、ましてや金属材料表面を試料とした研究は少ない。筆者も定性的に現象を示すだけの

データしか持っていないのが現状である。今後研究対象として多くの研究者が採り上げるようになるためにはバイオフィームの定量的な評価方法<sup>27)</sup>、測定装置の改良、実験手法の標準化などの努力が必要であろう。稼働中の熱交換器や復水器等での付着生物皮膜の実用的なトラブル対策等については他に事例があり<sup>28, 29)</sup>ここでは割愛させていただく。

### 3 本会での微生物・金属関連研究の取り組みと動向

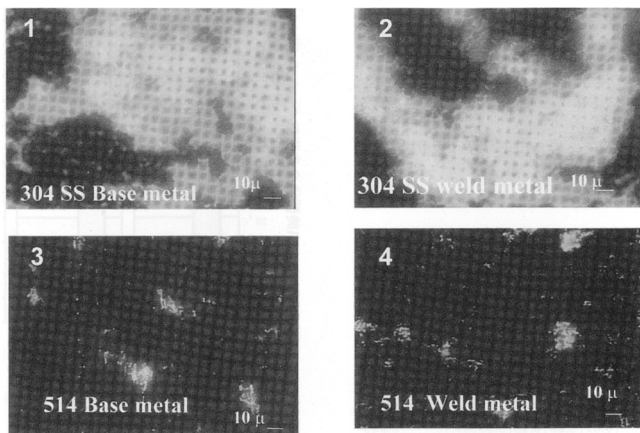
一見するとバイオフィームが会員にとって距離のある存在のように思われるが、決してそうでないことを述べてきた。この関連研究を本会ではフォーラムの活動として取り上げている。そのテーマ等を紹介したい。平成13年～平成15年：“抗菌機能化鉄鋼材料の開発とその応用”のテーマで自主フォーラムとしてスタートした。続いて平成15年～平成17年“バイオハザードおよびバイオコロージョン対策抗菌化鉄鋼材料の新展開”（フォーラム）、平成17年～平成19年“鉄鋼材料表面に形成されるバイオフィームの作用とその影響”（フォーラム平成19年5月終了予定）以上3件で6年間継続した。この間筆者が座長を務めた。春と秋の講演大会でシンポジウムを2回、討論会3回、研究委員会を7回開催し、会員

への情報提供も含め活動した。スタート時に比べるとこの分野への関心は高くなったと感じている。今後の動向であるが周知の通り、本会での研究会設立とその助成システムが平成19年度より大きく変更された。新分野を積極的に支援しようとする姿勢が示されたのである。現フォーラムのメンバーを中心に、関心ある生物系の研究者らの参加も得て、この分野の研究を続けさらなる発展を期待し、研究会を組織して活動することを計画した。鉄鋼関連新分野探索型（C型）のカテゴリーに申請を行い、幸いにも平成19年度スタートの研究会として承認された。その概要を紹介したい。

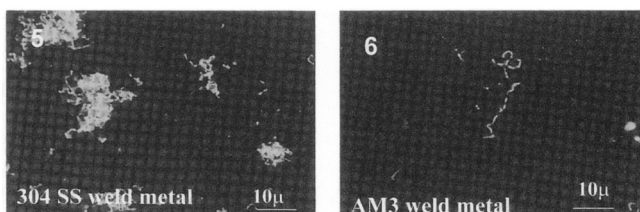
#### 研究会名称：バイオフィームと鉄鋼材料との相互作用

目的：金属材料学の研究手法と生物学的研究手法を融合させた新しい手法を開発し新たな切り口で研究する。焦点は“水と接する金属材料表面に形成されるバイオフィームの特徴とその作用の解明”である。バイオフィーム形成に及ぼす金属材料側の因子たとえば組織、化学成分、表面状況その他の影響、バイオフィームによる金属材料側の諸変化さらに人工バイオフィームの創製と材料加工への応

(a) *Pseudomonas* sp.



(b) *Bacillus* sp.



1・2・5……通常材、3・4・6……抗菌機能化材

写真8 抗菌化ステンレス鋼への微生物の付着とバイオフィームの状況

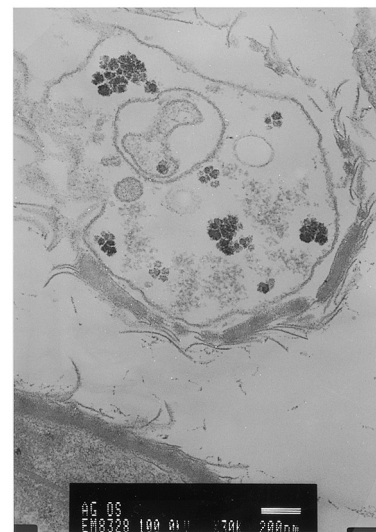


写真9 Ag含有ステンレス鋼表面に付着したシュードモナス菌の変形のTEM写真

用などを検討する。従来より材料研究者が培ってきた優れた、各種の顕微鏡観察技術等も活用できる生物－金属境界領域の研究課題の開拓なども取り扱う。次に研究スキームを参考図として図1に示す。正三角形の中心に金属表面に形成されたバイオフィーム①を置く。これは頂角に向うと材料損傷の原因となり金属では腐食・劣化②である。この事例を解析し関与する微生物の種と作用を明らかにする。有効利用可能な微生物も得られるであろう。他に院内感染等研究テーマがいくつかある。バイオフィームの制御を目的とした研究が左側角に位置③する。金属の持つ抗菌性の応用を考え、関連したテーマも示した。右側角にはバイオフィームの有効利用・応用である④を設置した。バイオプロセッシングと呼んでいるが材料加工への試みである。それぞれの角にある項目は相互に関連し合い、成果を共有し利用できる研究推進体制を構築していく。その先に“バイオと金属とが関連した新しい研究分野”が拓けるのである。期待される成果の例として、

1. 微生物制御機能をもった金属材料開発のための指針、
2. バイオフィームおよび金属の抗菌性の定量的評価法の提案、
3. 人工バイオフィームによる人間にやさしい材料表面創製および応用技術、
4. 生物系研究者と材料系研究者等とのネットワーク作り、などを挙げたい。

参加予定者：本会会員を中核とし生物系研究者（約40％）

研究期間：平成19年～平成23年（報告書作成期間1年を含む）

研究会主査：佐藤嘉洋（大阪市立大学大学院教授）

以上が主な内容である。春、秋の講演大会ではシンポジウム、討論会、講演発表等により情報提供をする予定である。

## 4 おわりに

金属材料・微生物・バイオフィーム・抗菌性などをキーワードとして金属工学と生物学との境界領域にある研究の面白さ、重要性の一端を紹介した。しかし内容は筆者の研究グループでの実験結果を多く使用しており、偏りがあることをお断りしたい。結果も定性的で現象を語ることのみで深い考察に欠けている。これは研究に携わった日が浅いこと、筆者の勉強不足に由来する点をご了承願いたい。後日、より明確な解析を示すことができる事を願っている。金属材料学との多くの接点があることが明らかになってきたので、バイオフィーム研究を生物系の研究者にすべて委せてしまうのではなく、今後は材料研究者に活躍をお願いしたい。今さら言うまでもないが異分野と交流・協力してこそ新しい展開が生まれる。そこでは先人から受け継いできた材料研究の多くの知識も十分に活用できるはずである。本稿を纏めるにあたり、意見を交換した方々、文献として記載しなかった論文著者等の各位に深くお礼申し上げます。なお、バイオフィームを細菌社会として紹介したNHKテレビ放送番組もある<sup>30)</sup>ので参考にしていただきたい。

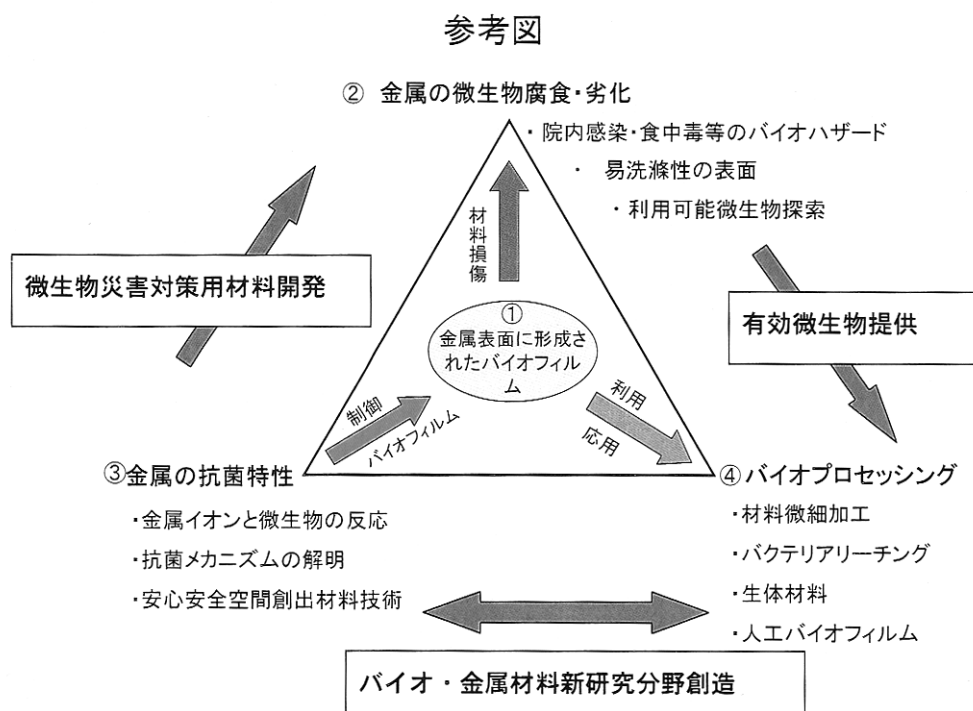


図1 研究会の活動内容を示す参考図

## 参考文献

- 1) 菊地靖志, K.R. スリクマリー: 鉄と鋼, 88 (2002) 10, 620-628.
- 2) D. Walsh: Corrosion/99, NACE International, Houston, U.S.A. Paper, No.88, (1999)
- 3) バイオフィルム入門, 日本微生物生態学会・バイオフィルム研究部会編著, 日科技連出版社, 東京, (2006)
- 4) 森崎久雄, 大島広行, 磯部賢治編著: バイオフィルムその生成メカニズムと防止法のサイエンス, (株)サイエンスフォーラム, 東京, (1998)
- 5) 特異な機能を有する微生物とその応用, 高分子学会, バイオ・高分子研究会編, 学会出版センター, 東京, (1989), 208.
- 6) 微生物資源工学, 千田侑編著, コロナ社, (1996), 55.
- 7) 渡辺哲光: バイオミネラライゼーション 生物が鉱物を作ることの不思議, 東海大学出版会, (1997)
- 8) 文献6), 157.
- 9) 文献6), 146.
- 10) 宮野泰征, 四方真治, 小澤正義, K.R. スリクマリー, 坪沼剛史, 大森明, 菊地靖志: 鉄と鋼, 92 (2006) 4, 274-294.
- 11) 菊地靖志: 熱処理, 43 (2003) 2, 79-86.
- 12) 生体材料学, 日本機械学会編, オーム社, (1993)
- 13) 金属系バイオマテリアルの基礎と応用, 角田方衛, 筏美人, 立石哲也編著, アイピーシー, (2000)
- 14) 磯部賢治: 防菌防黴, 33 (2005) 11, 617-625.
- 15) K.R. Sreekumari, K. Nandakumar, K. Takao and Y. Kikuchi: ISIJ Int., 43 (2003) 11, 1799-1806.
- 16) Y. Kikuchi, F. Matsuda, K. Tomoto and M. Nishimura: Transaction of JWRI, 24 (1995) 1, 63-67.
- 17) 宮野泰征, 山本道好, 渡辺一哉, 大森明, 菊地靖志: 溶接学会論文集, 22 (2004) 3, 443-450.
- 18) 菊地靖志, 小澤正義, 塔本健次, 大西秀人, 板根健, 安斉敏雄: 鉄と鋼, 88 (2002) 10, 658-663.
- 19) 菊地靖志, 塔本健次, 金丸剛, 坂根健: 材料と環境, 47 (1998) 7, 468-475.
- 20) K. Nandakumar, K.R. Sreekumari and Y. Kikuchi: Biofouling, 18 (2002) 2, 129-135.
- 21) K.R. Sreekumari, K. Nandakumar and Y. Kikuchi: Biofouling, 17 (2001), 303-316.
- 22) K.R. Sreekumari, M. Ozawa, K. Tohmoto and Y. Kikuchi: ISIJ Int., 40 (2000) Supplement, s54-s58.
- 23) K.R. Sreekumari, K. Takao, T. Ujio and Y. Kikuchi: ISIJ Int., 44 (2004) 5, 858-864.
- 24) ふえらむ: 11 (2006) 8, 490-494.
- 25) 菊地靖志: まてりあ, 41 (2002) 8, 549.
- 26) 菊地靖志: 熱処理, 43 (2003) 2, 79-86.
- 27) 前田拓也, 高麗寛紀他: CAMP-ISIJ, 19 (2006), 1030.
- 28) 川辺允志: 防菌防黴, 29 (2001) 12, 769-777.
- 29) 川辺允志: 配管技術, 48 (2006) 10, 57-64.
- 30) NHK教育テレビ サイエンスZERO, バイオフィルム—細菌社会の脅威—, 平成16年3月10日放送

(2007年2月13日受付)