

# バイオフィルムを調べてみよう

森川 正章

私たちの日常生活において、流しや浴室など水回りで見られるヌメリが微生物の集合体であることは、微生物学の父と呼ばれるアントニー ヴァン レーウエンフック (1632-1723) の手製の顕微鏡により既に観察されていたと言われている。その後、研究の進展は遅々としたものであったが、やがて菌科学や水処理工学分野などにおいて微生物膜: microbial filmの重要性が認識されるようになった<sup>1,2)</sup>。またバイオフィルム: biofilmという言葉が最初に使われたのは今から35年ほど前の1977年であったらしい<sup>3)</sup>。近年では微生物工学の分野においても、バイオフィルムのユニークな特性が指摘されている。たとえば、納豆菌はダイズ表面に付着してバイオフィルム化したときに多くのメナキノンを生産し、養殖稚魚の食べ残しが沈積した底泥表面に形成されるバイオフィルムのプロテアーゼ生産性も浮遊細胞に比べて格段に高い。さらには、助走をつけた戦闘機がつぎつぎと航空母艦から発進するように、バイオフィルムが高度に活性化した

細胞を放出する現象も見られる<sup>4)</sup>。読者の方々の実験室に眠っている秘蔵の微生物でもいちどバイオフィルムをつくってみたらいかがでしょう。そこから新しい発見があるかもしれません。

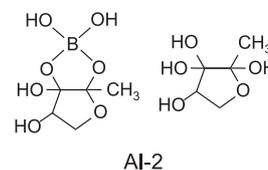
## バイオフィルムとは

狭義のバイオフィルムは固体表面あるいは界面に形成される微生物構造体を指すが、広義には、寒天平板上のコロニーや活性汚泥などで形成される凝集体 (フロックやグラニュール) もバイオフィルムの一形態と考えられている。バイオフィルムは微生物細胞およびその間隙や表層を覆うマトリクスから構成され巨視的には薄膜のいわゆるヌメリにしか見えないが、微視的にはキノコや舌のように見える三次元構造を形成する。マトリクスにはさまざまな生体由来分子が含まれていて、高分子として主要なものは多糖類、ポリペプチド、細胞外核酸、また低分子物質としては細胞密度感知因子 (クオラムセン

### 1. グラム陰性細菌群 (*Pseudomonas*, *Vibrio*, *Salmonella*)



### 3. グラム陰性・陽性細菌群共通



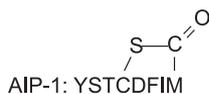
### 2. グラム陽性細菌 (*Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*)

#### オリゴペプチド系

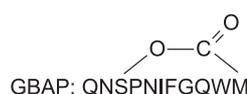
*Streptococcus* ComC: MKNTVKLEQFVALKEKDLQKIKGG/EMRLSKFFRDFILQRKK

*Lactobacillus* PlnA: MKIQIKGMKQLSNKEMQKIVGG/KSSAYSLQMGATAIKQVKKLFFKKGW

*Staphylococcus*



*Enterococcus*



*Bacillus*

CSF: ERGMT

ComX: GIFW\*EQ

ADPITRQW\*GD etc.

図1. 代表的な細胞密度感知因子 (QSS)。ペプチド配列中の (/), (\*)はそれぞれ、プロセシング部位とファルネシル基付加を示す。

シングシグナル, QSS) あるいはオートインデューサーと呼ばれる情報伝達物質やバイオサーファクタントと呼ばれる界面活性をもつ複合脂質などがある。バラバラの浮遊細胞にくらべて、バイオフィームではQSSなどが蓄積しやすく細胞間の情報伝達が効率良く行なわれ、通常の振とうフラスコ培養では見られない遺伝子発現制御や固有の細胞特性が発現する。図1に代表的なQSSを示したが、グラム陰性細菌ではアシルホモセリンラクトン系化合物が汎用され、グラム陽性細菌の場合はオリゴペプチド系が多いという傾向が見られる。また、これら両細菌群に共通して機能するいわゆるクロストークできるAI-2 (2種類) も発見され、微生物の巧妙な生存戦略が次々と明らかになりつつある。

病原菌によるバイオフィーム形成は治療の妨げになるやっかいな問題であるが、多剤耐性菌の出現抑制や環境への配慮から、殺菌剤や抗生物質を使わずにバイオフィーム形成を阻止あるいは制御する技術の要望も高く、新たな天然物の探索やQSSアナログの合成など精力的に研究されているなかで、D-ロイシン、D-メチオニン、D-チロシン、D-トリプトファンなど特定のD型アミノ酸がグラム陽性細菌/グラム陰性細菌を問わずバイオフィーム形成を阻害あるいは崩壊させるという現象は興味深い<sup>5)</sup>。バイオフィーム細胞の抗生物質耐性が浮遊細胞に比べて数十倍から数百倍まで高くなる主要因としては、マトリクスによる遮蔽効果や薬剤耐性遺伝子の発現ではなくバイオフィーム細胞の代謝活性および細胞分裂速度の低下、つまり休眠状態による不感症と考えられている。

### マトリクス

バイオフィームにおいて細胞間を埋める、いわゆるセメントや屋台骨に当る物質がマトリクスである。マトリクスは保水性の高い高分子物質を含むためにヌメリとなる。たとえば、納豆菌の場合は $\gamma$ ポリグルタミン酸を分泌してあの納豆のネバネバをつくる。粘性多糖であるアルギン酸はグルロン酸とマンヌロン酸の共重合体であり、嚢胞性線維症や日和見感染症と関連の深い緑膿菌の一部で細胞外に著量生産される。しかし、これら2種類のマトリクスは、高生産性株では高バイオフィーム形成能や高ストレス耐性をもつという相関関係はあるが、実はバイオフィームの形成に必須という訳ではない。

納豆菌 (枯草菌) の場合、*eps* 遺伝子群産物によって合成される構造未知の多糖と細胞外TasAタンパク質によって細胞同士が束のように集合してバイオフィームを形成することが知られている<sup>6)</sup>。緑膿菌では*psl* (polysaccharide synthesis locus) や *pel* (pellicle formation

locus) 遺伝子産物によって合成されるマンノースやガラクトースあるいはグルコースを主成分とする多糖がバイオフィーム形成の鍵を握っていると言われている<sup>7)</sup>。さらに、大腸菌やアシネトバクター属細菌、アクチノバチルス属細菌など多くのグラム陰性細菌や黄色ブドウ球菌ではPIA (polysaccharide intercellular adhesin) などと呼ばれる $\beta$ -1,6-*N*-アセチルグルコサミン多糖が広く分布し利用されている<sup>8)</sup>。また大腸菌は株によってさまざまな莢膜多糖を生産し、ガラクトース、グリセロール、リン酸などを含む多糖類は、黄色ブドウ球菌や腸球菌など複数のグラム陽性細菌や緑膿菌のバイオフィーム形成を阻害する<sup>9)</sup>。このように、過酷な環境を生存競争に有利なものにするために、微生物たちは趣向をこらしたマトリクスを使ってバイオフィーム化する<sup>10)</sup>。

マトリクスの高分子成分としてさらに興味深いのはeDNA (extracellular DNA) と呼ばれる細胞外核酸である<sup>11)</sup>。eDNAの起源は溶菌細胞であろうということは想像に難くないが、細胞外へ積極的に輸送していることを示唆する結果や死菌よりも生菌の微小コロニー周囲に多く存在することも報告されている<sup>12)</sup>。いずれにしても、バイオフィーム内が接合伝達だけでなく自然形質転換による水平伝播が起こり易い環境になっているのはeDNAによるところが大きいと思われる。実稼働している廃水処理槽の活性汚泥を調べた報告によると、VSS (揮発性浮遊物質) 1グラムあたりに4から50ミリグラムものeDNAが含まれていて、これをDNA分解酵素で処理すると活性汚泥フロック (広義のバイオフィーム) が崩壊することも確認されている。

### バイオフィームの測定—一回分培養法—

1982年に Pedersen はさまざまなバイオフィームについて、クリスタルバイオレット色素の吸着量とバイオフィームの乾燥重量が一次相関することを示した<sup>13)</sup>。クリスタルバイオレット染色法 (以下、CV染色法) は細菌の分類において汎用されるグラム染色法の前半の工程である。クリスタルバイオレット (図2) はトリフェニルメタン骨格を有する塩基性の紫色色素であり、強酸 (pH<2) 中では黄色に呈色する酸性pH指示薬でもあるが、古くから細菌細胞壁を染色する目的で使われている。

具体的な CV 染色法の手順は以下の通りである。

1) バイオフィーム形成: 適当な材質の試験管やマイクロチューブあるいは96穴マイクロタイタープレートに前培養液を1%植菌し(後者の場合は培地量0.1 ml程度)、適当な温度で乾燥しないよう注意しながら静置培養する。つまり、ただ放置するだけでよい。

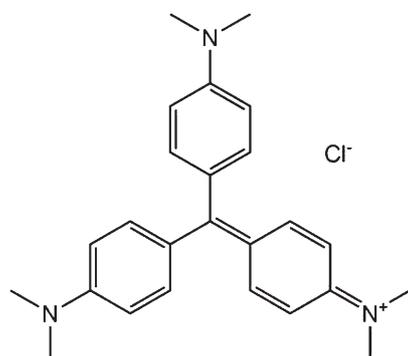


図2. クリスタルバイオレットの化学構造

2) 染色：培養器内壁に形成されたバイオフィルムを軽く水洗いし、0.1%程度のクリスタルバイオレット水溶液を添加する。数分から20分程度染色した後、過剰な色素を除き水でゆるやかに2-3度洗浄する。残った水滴をできる限りふり落としてから、風乾する。この段階で次の色素溶出まで暗所室温保存できる。また必要に応じて写真撮影する。

3) 色素溶出と測定：続いて、色素を定量するためにクリスタルバイオレットを室温で10-15分程度抽出する。ここで、抽出溶媒としては33%酢酸（黄色ブドウ球菌など）、95%エタノール（緑膿菌など）、あるいはDMSO（ビブリオやアグロバクテリウムなど）が使われる。溶出の効率は微生物種ごとに少しずつ異なるので検討するとよい。抽出した色素は分光光度計あるいはマイクロプレートリーダーを用いて、570-600 nm（多くは590 nm前後）の吸収を測定する。ここで、値のバラツキが比較的大きいので、最低3連、できれば5連の実験を行い平均値で評価することが重要である。

4) 付着菌数の測定：以上に述べたCV染色法は細胞外マトリクスも含めた定量法であり、付着した細胞数を正確に測定する場合にはコロニー形成単位 (colony forming units, CFUs) を計測する。具体的には、上記の方法によりバイオフィルムを水洗後、無菌水あるいは生理食塩水を加え、超音波発振装置により40-50%程度の出力で10秒程度処理し細胞を遊離させる。ただし、*Pseudomonas* 属細菌や *Staphylococcus* 属細菌など強固なバイオフィルムの場合は、過度の超音波処理で遊離分散させるよりも、単純に綿棒で擦り取る方法の方が生菌の回収率は高い<sup>4)</sup>。

また、定量法ではないが *Staphylococcus* 属細菌のバイオフィルム染色法としては、5%ショ糖と0.1%コンゴレッドを含むBHI寒天平板培養によるコロニー色の観察法 (CRA法) が知られている<sup>14)</sup>。

## フローセルバイオフィルムの観察—連続培養法—

上記の静置培養法による回分バイオフィルム形成法は、多検体のスクリーニングや初期付着能の比較には有効な方法であるが、培養に伴う栄養の枯渇と老廃物の蓄積によりバイオフィルムを十分に成長させることが難しい。そこで、バイオフィルムの研究においては連続的に培地を供給できるフローセルを用いたバイオフィルム形成法も多用される。もちろん、この場合も形成されたバイオフィルム量をCV染色法によって定量することは可能であるが、この方法のさらなる利点は、ステージ上で薄いスライドガラス表面にバイオフィルムを形成させれば、バイオフィルム形成過程を顕微鏡下で生きたまま経時的に観察できることである。この場合、クリスタルバイオレット色素ではなくGFP (green fluorescent protein) など蛍光物質を指標とした共焦点レーザー顕微鏡法によって、高感度でバイオフィルムを三次元観察するのが一般的である。一方、デメリットとしては *gfp* 遺伝子などを発現する遺伝子組換え株を作製する必要があるため、宿主—ベクター系のない多くの環境微生物の観察には適用に制限がある。この場合はFISH (fluorescence In situ hybridization) 法を利用することになる。フローセルバイオフィルムの形成法は以下の通りである。

1) あらかじめ、オートクレーブ殺菌あるいは0.5%程度の次亜塩素酸溶液と1%過酸化水素水を流すことによって殺菌したフローセル培養装置を顕微鏡ステージに固定する。顕微鏡が正立型か倒立型かによってフローセル部分を上下観察しやすいようにセットする。薬剤殺菌の場合、流路を十分蒸留水で洗浄しておく。

2) ペリスタポンプを使ってフローセルを培地で満たした後に流路をクリップなどで一時的に止める。0.5 ml注射器と27G針を使って前培養液をフローセル入り口近くに注入植菌する。植菌量は大腸菌の場合、フローセル内の終濁度としてOD<sub>600</sub> = 0.01程度が一般的である。シリコンチューブに針を刺して植菌した場合は、ピンホールをシリコン系接着剤かテープで塞ぐ。

3) そのまま1時間程度静置培養して、フローセル内壁(上下面が特に重要)に細胞を付着させる。その後、1-3 ml/h程度の極低流速で培地を流し、バイオフィルムを成長させる。

4) また、流路の入り口側には気泡トラップを配置し、常にフローセルが培地で満たされるよう注意する。装置によってタイムラプス観察も可能であり、さらに観察結果をCOMSTAT<sup>15,16)</sup>など適当な画像解析ソフトウェアを用いれば、バイオフィルムの厚みや容積あるいは表面の

粗さや比表面積などを計測することができる。

5) 環境試料を用いた複合バイオフィーム形成実験などで、FISHなどにより識別観察する場合には、バラホルムアルデヒドにより固定化処理した後に、アクリルアミドゲルを流し込みバイオフィームを包埋する。フローセルチャンバーを分解し、バイオフィームを含むゲルを取り出す。プレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションと洗浄処理を終えたゲルを蛍光顕微鏡や共焦点顕微鏡で観察する。一般的なFISHのプロンプとしては、対象微生物に特異的な遺伝子断片配列にもとづく20塩基程度のオリゴヌクレオチドをCy3, Cy5, FITCなどの蛍光物質で標識したものが使われるが、DAPI染色による全細胞観察や、蛍光標識したレクチンや二次抗体を使ってマトリクスなどを観察することもできる。

### 支持固体の材質とバイオフィーム形成

バイオフィーム形成に関する細胞のメカニズムについては作用分子あるいは遺伝子レベルでかなり理解がすすんできているが、固体の材質と細胞の初期付着やバイオフィーム形成との関係についてはまだ不明な点が多い。細胞が固体表面に付着する力は、疎水結合、イオン結合、水素結合、分子間力結合などの複合作用によるものと考えられている。すなわち、細胞表層の構造や極性などが異なる細菌の種類ごとにバイオフィームを形成しやすい固体の材質が異なることが予想される。そこで、主要な細菌 (*Acinetobacter calcoaceticus* P23, *Bacillus subtilis* 168, *Escherichia coli* MG1655, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1) についてさまざまな材質の固体表面に形成される回分バイオフィーム量を CV 染色法により比較したと

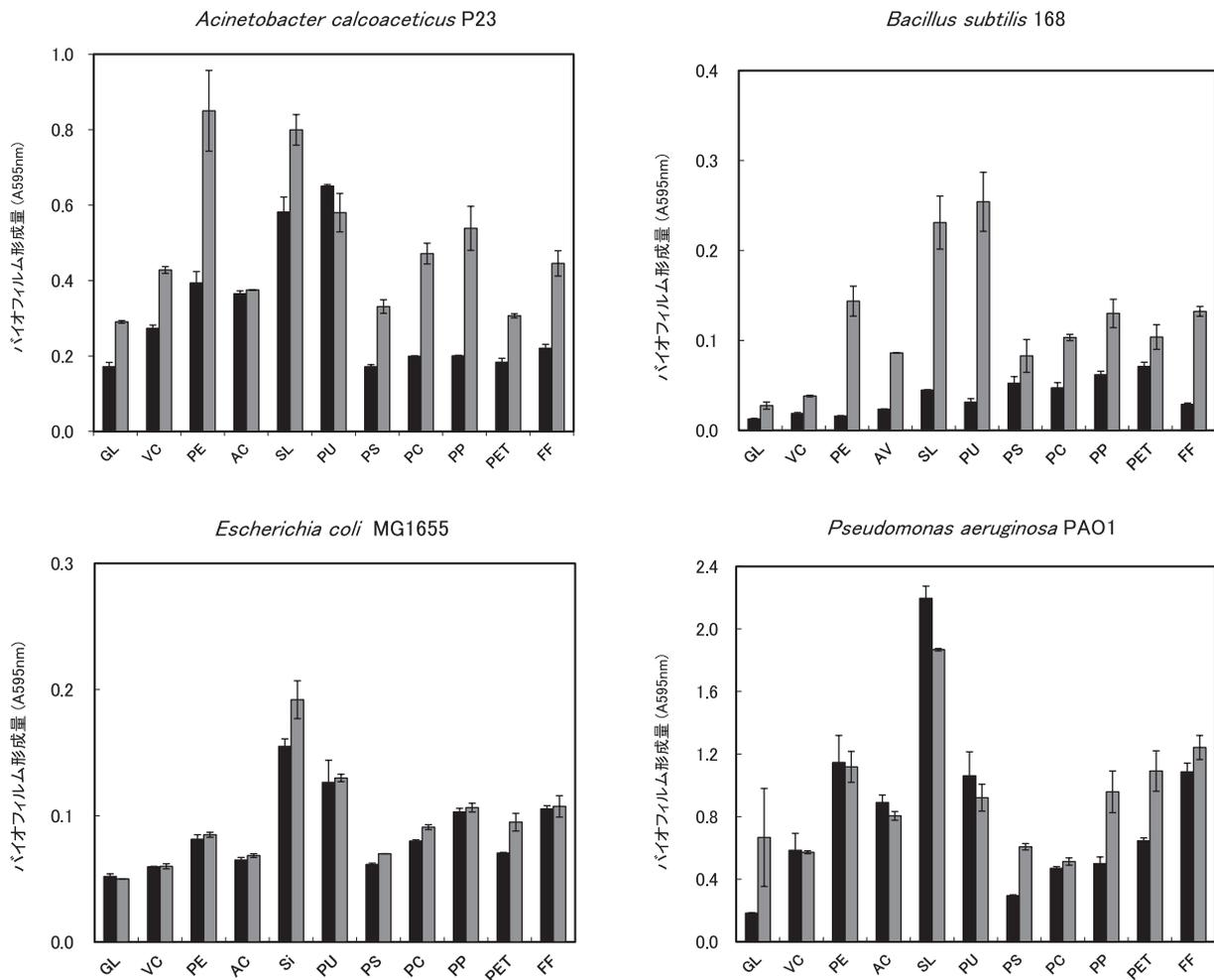


図3. さまざまな材質の固体表面でのバイオフィーム形成量. 37°C, 12時間 (■) および24時間 (■), GL: ガラス, VC: 塩化ビニル, PE: ポリエチレン, AC: アクリル, SL: シリコン, PU: ポリウレタン, PS: ポリスチレン, PC: ポリカーボネート, PP: ポリプロピレン, PET: ポリエチレンテレフタレート, FF: フッ素樹脂.

ころ、予想とは異なり細菌種を越えてシリコンやポリウレタンあるいはポリエチレンやポリプロピレンで高いバイオフィーム形成が確認された(図3)。実験に使用した樹脂シートのゼータ電位や接触角を測定したが、バイオフィームを形成しやすいこれらの材質に共通する物理化学的特性はまだ判っておらず、細胞表層と固体表面との相互作用の理解は今後の課題である。なお余談ではあるが酢酸菌と同様に納豆菌は静置培養しておく、ペリクルと呼ばれる菌膜(気液界面バイオフィーム)を形成する。これには酸素を求める走気性(aerotaxis)が関わっていると考え、攪拌やバブリングしないで通気する方法を思案した末に濃縮還元ジュースの製造に使われる多孔質フッ素樹脂チューブ(Poreflon™)をフラスコに入れて静かに通気したところ、見事にペリクル形成が阻害された<sup>17)</sup>。さらに実験がおわって通気を止めると今度はチューブ表面に著量のバイオフィームを形成しはじめ、納豆菌がフッ素樹脂と親和性が高いという予期していなかったことが判った。

#### おわりに

バイオフィームの形成は微生物本来の生態と言っても過言ではなく、湖沼や海洋では付着する固体がないのでしかたなく浮遊しているようにも見える。また、付着表面を提供する固体は無機物に限らず動物や植物など生物であっても構わないし、むしろそのほうが双方にとって利点となることもある。ヒト成人の全身の細胞数は約60兆個であるが、腸内細菌数は実に100兆個にも達すると推定されていて、健康への影響の大きさが予想され

る。ヒト体表の細菌叢を解析した研究からは、乾燥しやすいヒジと湿っぽいワキに棲む細菌では、砂漠と熱帯雨林の細菌ほどの系統的距離があることや、人種によっても菌叢が異なることが示されている。一方、植物の根表面にもバイオフィームが形成されていて、リンの可溶化作用やオーキシンをはじめとする多様な植物成長因子の生産などさまざまな利点をもたらしている<sup>18)</sup>。微生物—微生物間はもちろんのこと、動物—微生物間や植物—微生物間の未知の世界を拓くツールとしてもバイオフィームは今後益々その重要性を増すことであろう。

#### 文 献

- 1) Green, M. B. *et al.*: *Air Water Pollut.*, **9**, 807 (1965).
- 2) Newman, H. N.: *Microbios.*, **9**, 247 (1974).
- 3) Harremoës, P.: *Vatten.*, **33**, 122 (1977).
- 4) Shimada, K. *et al.*: *Chemosphere*, **87**, 226 (2012).
- 5) Kolodkin-Gal, I. *et al.*: *Science*, **328**, 627 (2010).
- 6) Chai, Y. *et al.*: *Mol. Microbiol.*, **67**, 254 (2008).
- 7) Ryder, C. *et al.*: *Curr. Opin. Microbiol.*, **10**, 644 (2007).
- 8) Rohde, H. *et al.*: *Eur. J. Cell Biol.*, **89**, 103 (2010).
- 9) Valle, J. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 12558 (2006).
- 10) McDougald, D. *et al.*: *Nat. Rev. Microbiol.*, **10**, 39 (2011).
- 11) Hitchcock, C. B. *et al.*: *Science*, **295**, 1487 (2002).
- 12) Sanchez-Torres, V. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **401**, 197 (2010).
- 13) Pedersen, K.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 6 (1982).
- 14) Freeman, D. J. *et al.*: *J. Clin. Pathol.*, **42**, 872 (1989).
- 15) <http://comstat.dk>
- 16) Heydon, A. *et al.*: *Microbiol.*, **146**, 2395 (2000).
- 17) Morikawa, M. *et al.*: *Microbiol.*, **152**, 2801 (2006).
- 18) Yamaga, F. *et al.*: *Environ. Sci. Technol.*, **44**, 6470 (2010).