

実環境におけるバイオフィルムの構造解明と制御

Analyses and Regulation of Biofilms in Actual Environments

矢野 剛久^{1*}, 宮原 佳子¹, 横畑 綾治¹, 花井 淳也²,
松尾 申遼³, 平塚 絵美², 岡野 哲也², 久保田浩美¹
TAKEHISA YANO^{1*}, YOSHIKO MIYAHARA¹, RYOUJI YOKOHATA¹, JUNYA HANAI²,
SHINRYOU MATSUO³, EMI HIRATSUKA², TETSUYA OKANO², and HIROMI KUBOTA¹

¹ 花王株式会社安全性科学研究所 〒321-3497 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2606

² 花王株式会社ハウスホールド研究所 〒640-8580 和歌山県和歌山市湊 1334

³ ファブリック&ホームケア事業ユニット 〒103-8210 東京都中央区日本橋茅場町 1-14-10

* TEL: 0285-68-7445 FAX: 0285-68-7403

* E-mail: yano.takehisa@kao.co.jp

¹ Global R&D-Safety Science Research, Kao Corporation,
2606, Akabane, Ichikai-machi, Haga-gun, Tochigi 321-3497, Japan

² Global R&D-Household Products Research, Kao Corporation,
1334, Minato, Wakayama-shi, Wakayama 640-8580, Japan

³ Fabric & Home Care Business Unit, Kao Corporation,
1-14-10, Kayabacho, Nihombashi, Chuo-ku, Tokyo 103-8210, Japan

キーワード: 浴室ピンク汚れ, *Methylobacterium*, 塩化ベンザルコニウム, 抗菌機構

Key words: Pink biofilm, *Methylobacterium*, benzalkonium chloride, antimicrobial mechanisms

(原稿受付 2015 年 2 月 27 日 / 原稿受理 2015 年 3 月 5 日)

1. はじめに

企業においてもバイオフィルムは重要な研究対象であり、様々な研究が行われている。特にバイオフィルムを制御する立場から行われる研究としては、製品中で菌が増殖して製品の品質を低下させる現象を防ぐ為の研究と、バイオフィルム制御効果を有する製品を開発する為の研究がある。前者については、例えば工場のパイプライン等にバイオフィルムが形成されることで菌が製品に混入する原因となり得る為、バイオフィルム形成を防いだり除去したりすることを目的として、必要な防腐剤や適切な洗浄滅菌措置を見出すといった研究が行われる。また、後者については我々の身の回りで発生する多くの微生物汚れ、例えば浴室やトイレ、キッチン、衣類等に生じる微生物汚れがバイオフィルムとして存在する為、その効果的な制御法の開発を目的としてバイオフィルム状態の菌の特性を見出す研究が行われる。本総説においては、こうした研究の中で特にバイオフィルム制御効果を有する製品を開発する為に行ってきた浴室ピンク汚れの制御に向けた研究について述べる。

2. 浴室ピンク汚れの特徴

浴室で発生してピンク色に呈する微生物由来の汚れを浴室ピンク汚れ (Pink biofilms) と呼ぶ (図 1)。生活者

を対象とした実態調査から (2012 年弊社調べ, n = 283), 浴室ピンク汚れには他の汚れと比べて目立つ、擦らないと落ちない、すぐに再発するという特徴があることが明らかになり (data not shown), 多くの生活者が気にする汚れであることが分かった。一方、浴室ピンク汚れから

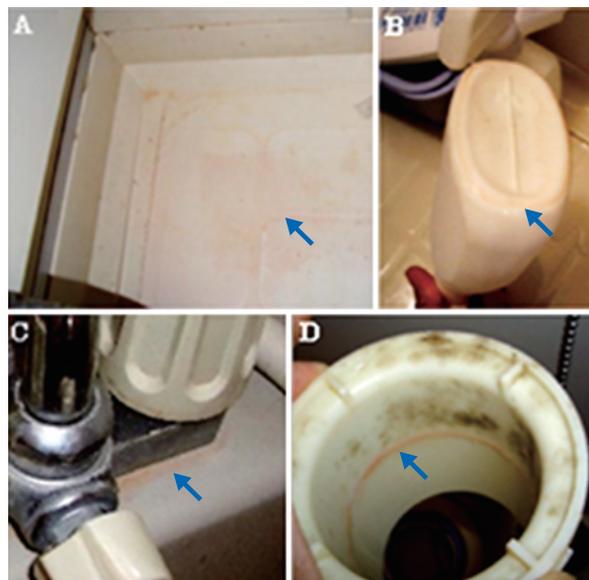


図 1. 浴室ピンク汚れ。

菌を分離した報告はこれまでもあるが^{2,3,9)}、どのような菌が汚れの中で最大面積を占有しているか調査した報告はなかった。最大面積を占める菌を特定することは、浴室ピンク汚れの効果的な制御技術を構築する上で必須と考えられた為、まず浴室ピンク汚れを構成する菌とその割合について解析した。

3. 浴室ピンク汚れの解析

浴室ピンク汚れを採集し、菌叢が変わることがないよう採集直後に固定処理を行ったサンプルを走査型電子顕微鏡で観察した。その結果、浴室ピンク汚れの殆どは石鹸カス汚れ等ではなく微生物様の構造体が占めていた。さらにその微生物様の構造体のうち、細菌大の構造体が最大面積を占めていた¹⁹⁾。浴室ピンク汚れからよく分離され、ピンク色に類する色を呈する菌として *Rhodotorula* 属酵母と *Methylobacterium* 属細菌が知られる³⁾。このうち、細菌である *Methylobacterium* 属細菌が浴室ピンク汚れの主要構成菌である可能性が考えられた為、Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) を用いた解析で検証した。

解析に向けたピンク汚れ付着サンプルの回収については、浴室からピンク汚れが付着した洗面器や椅子等を回収して直ぐに固定処理を行った後、付着面であるプラスチックごと切り取ることで行った。次に切り取ったサンプルが全て覆われるようにポリアクリルアミドゲルで包埋し、*Methylobacterium* 属細菌及びその他の細菌を検出する為に各々の 16S rRNA をターゲットとした蛍光プ

ローブ^{1,14)}を用いてハイブリダイゼーションを行った。また同時に、真菌が観察できるように、一般的な真菌の細胞壁に多く含まれる β 1,3-及び β 1,4-グルカンの蛍光染色剤である Calcofluor white¹²⁾を用いて染色した。共焦点レーザー顕微鏡 (META, Carl Zeiss) を用いて観察して COMSTAT2⁹⁾により占有体積を算出したところ、予想通り *Methylobacterium* 属細菌が汚れ全体の体積の半分以上を占めており、*Methylobacterium* 属細菌が浴室ピンク汚れの主要構成菌であることが示唆された (図2)。

尚、*Methylobacterium* 属細菌は pink-pigmented facultative methylotroph (PPFM) と呼ばれる菌群の一種であり、菌体がカロテノイドに起因するピンク色を呈し、メタノール等の C1 化合物を資化することが知られる⁹⁾。その特殊な代謝系及び植物との共生関係が注目されている⁵⁾一方で、免疫不全患者への感染に関する報告がある^{10,11,16)}為、公衆衛生的な観点からその有効な制御法の構築が求められている細菌でもある。

4. *Methylobacterium* 属細菌の分離とモデル汚れの作成

Methylobacterium 属細菌の諸性質をさらに詳しく解析する為、*Methylobacterium* 属細菌をピンク汚れから分離し、浴室ピンク汚れを模倣したモデル汚れを作成した¹⁹⁾。

分離については、浴室ピンク汚れから菌をサンプリング、培養して得られた細菌の一部を用いて 16S rRNA 配列による菌種の同定を行い、*Methylobacterium* 属細菌と同定された株を得た。

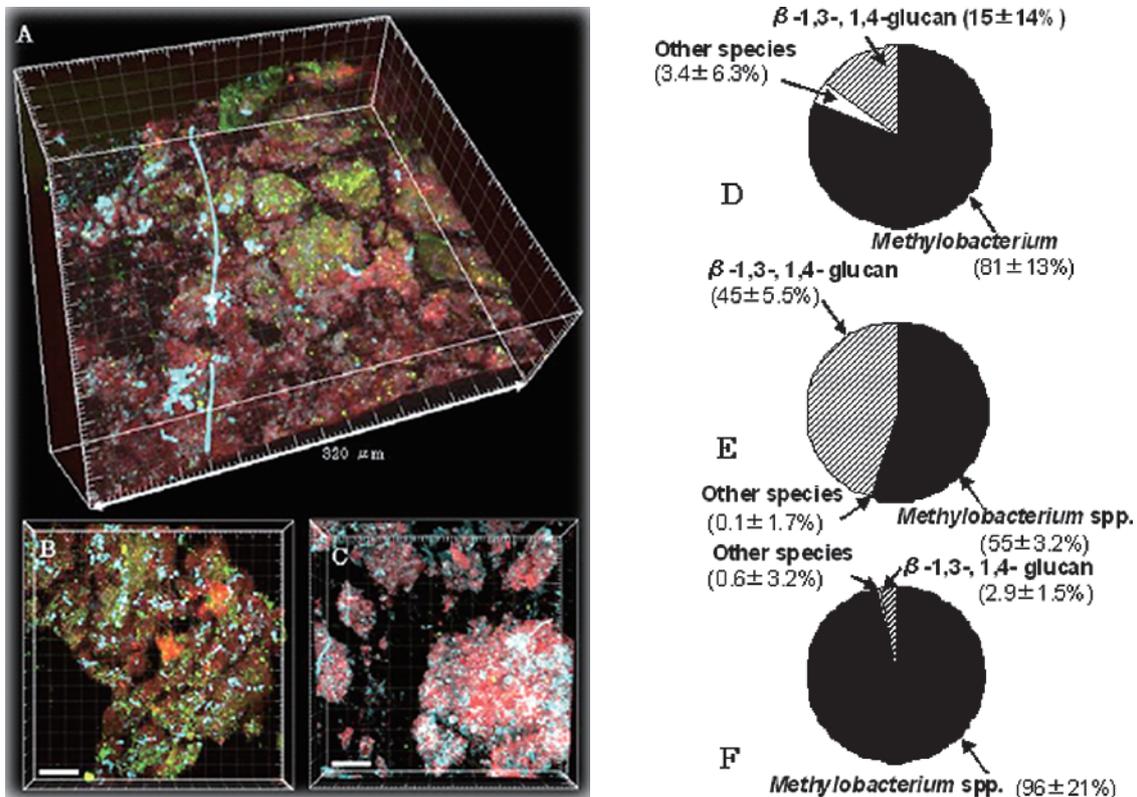


図2. FISH法で得られた画像 (A-C) と定量結果 (D-F) 画像中、赤色及び緑色は *Methylobacterium* 属細菌とその他の細菌の 16S rRNA をターゲットとした FISH の結果をそれぞれ示し、青色は Calcofluor white による染色結果を示す¹⁹⁾。

モデル汚れの作成については、日本の浴室の素材として汎用される繊維強化プラスチック板上に穴の開いたシリコンゴムを圧着させ、その穴に分離して得られた *Methylobacterium* 属細菌の菌液を滴下して 30°C で一晩静置した。その後、上清を除去してさらに一晩同じ条件で静置して乾燥させることでモデル汚れを得た。得られたモデル汚れの例を図 3 に示す。モデル汚れはピンク汚れと見た目が似ており、擦らないと落ちない、といった性質も確認された。また、*Methylobacterium* 属細菌の菌液を一晩静置すると菌の殆どが沈殿して強固なシート状の構造体を形成したことから、こうした性質も、ピンク汚れの形成に寄与した可能性が考えられた。

5. *Methylobacterium* 属分離菌のストレス耐性

次に、浴室ピンク汚れから分離された *Methylobacterium* 属細菌及び *Methylobacterium* 属細菌と似た色のコロニーが得られた各種分離菌を用い、浴室で曝露されると思われたストレスに対する耐性を評価した。まず一般的に洗浄剤に利用される界面活性剤に対する耐性を評価したところ、ピンク汚れから分離された他の分離株と比べて *Methylobacterium* 属細菌は高い耐性を示した (表 1)。同様の傾向がモデル汚れにおいても確認されるか解析する為、塩化ベンザルコニウム (BAC, benzalkonium



図 3. 分離した *Methylobacterium* 属細菌で作成したモデル汚れ¹⁹⁾。

chloride, サニゾール C) をモデル汚れに作用させて生残菌数を測定した。10⁷~10⁸ CFU/ml の菌を用いてモデル汚れを作成した後で水もしくは BAC を作用させ、生残した付着菌数を求めたところ、*Methylobacterium* 属細菌だけがどちらの系でも殆ど菌数が減少しなかった (表 2)。他の分離菌については、一部の菌は水を作用させただけでも菌が剥離した為に菌数が著しく減少し、水だけでは菌数が減少しなかった菌についても BAC の作用により菌数が著しく減少した (表 2)。この結果、モデル汚れの状態でも *Methylobacterium* 属細菌は他の菌に比べて BAC に対して高い耐性を示すことが示唆された。さらに、モデル汚れの状態でも菌を 10 日間静置した際の生残菌数を測定することで乾燥耐性を評価したところ、*Methylobacterium* 属細菌のみ殆ど生残菌数が減少しておらず、*Methylobacterium* 属細菌は他の分離株と比べて乾燥耐性も高いことが示唆された¹⁹⁾。

以上のように、*Methylobacterium* 属細菌は、浴室で菌が曝される様々なストレス種に対して耐性が高いことが明らかになった。同時に、浴室で曝されるこのようなストレスによって他の菌が淘汰される中で *Methylobacterium* 属細菌だけが生残し、ピンク汚れが発生した可能性が考えられた。さらに、*Methylobacterium* 属細菌を効果的に殺菌することができればピンク汚れを効率的に制御できる可能性も考えられた。

6. 界面活性剤と溶剤併用による殺菌

洗浄剤成分として用いられる界面活性剤を用いた *Methylobacterium* 属細菌の殺菌方法を探索する為、界面活性剤を用いて様々な濃度や時間で *Methylobacterium*

表 1. 浴室分離株の界面活性剤耐性

分離菌	ドデシル硫酸ナトリウム		ポリオキシエチレンオクタールフェニルエーテル		BAC	
	5 min*1	24 h*1	5 min*1	24 h*1	5 min*1	24 h*1
<i>Methylobacterium</i> 属細菌						
KMC10	>5	>5	>5	>5	>5	<0.1
KMC4	>5	>5	>5	>5	>5	1
KMC5	>5	>5	>5	>5	0.1	0.1
その他の分離菌						
KMC15	<0.1	<0.1	>5	1	<0.1	<0.1
KMC21	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
KMC14	<0.1	<0.1	>5	1	<0.1	<0.1
KMC20	<0.1	<0.1	>5	>5	<0.1	<0.1
KMC18	>5	1	>5	>5	1	<0.1
KMC17	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
KMC19	>5	1	>5	>5	<0.1	<0.1
KMC22	>5	1	>5	>5	<0.1	<0.1
KMC23	<0.1	<0.1	>5	>5	<0.1	<0.1
KMC13	<0.1	<0.1	>5	>5	<0.1	<0.1

* 表の値は、生残菌数が 10² CFU/ml 以上減少する為に必要な界面活性剤の最低濃度 (% (v/v))

* 菌種はそれぞれ KMC10: *M. mesophilicum*, KMC4: *M. fujisawaense*, KMC5: *M. radiotolerans*, KMC15: *Rhodococcus corynebacteroides*, KMC21: *Deinococcus grandis*, KMC14: *Chryseobacterium* sp., KMC20: *Burkholderia cepacia*, KMC18: *Rhodococcus qingshengii*, KMC17: *Rhodococcus* sp., KMC19: *Roseomonas mucosa*, KMC22: *Microbacterium arborescens*, KMC23: *Brevundimonas nasde*, KMC13: *Brevundimonas vesicularis*

*1: 接触時間

表 2. モデル系を用いた、浴室分離株の BAC 耐性

分離株	生残菌数 (log CFU/FRP sheet)	
	水	BAC
<i>Methylobacterium</i> 属細菌		
KMC10	7.15	7.3
KMC4	7.52	7.27
KMC5	7.78	7.68
その他の分離菌		
KMC15	2.6	<2.00
KMC21	2.78	<2.00
KMC14	2.9	<2.00
KMC20	7.18	<2.00
KMC18	6.58	<2.00
KMC17	2.9	<2.00
KMC19	<2.00	<2.00
KMC22	5.3	<2.00
KMC23	7.51	<2.00
KMC13	2.78	<2.00

* 菌種の略号は表 1 と同様

表 3. アルコールと BAC を併用した際の抗菌性¹³⁾

アルコール	減少菌数 (log CFU/mL)	
	0% BAC	0.01% BAC
—	—	0.09
Ethanol	0.03	0.17
2-Propanol	0.03	0.31
Butanol	0	0.42
Pentanol	0	>4.05
Butyldiglycol	0.03	0.19
Butylglycol	0.03	0.54
Isobutyldiglycol	0.12	0.21
Isobutylglycol	0.21	0.01
Benzylidiglycol	0.04	0.49
Benzylglycol	0.09	1.51
Benzylalcohol	0.05	2.47
Phenylethylalcohol	0.2	>4.05
Phenyldiglycol	0.06	0.82
Phenylglycol	0.13	>4.05

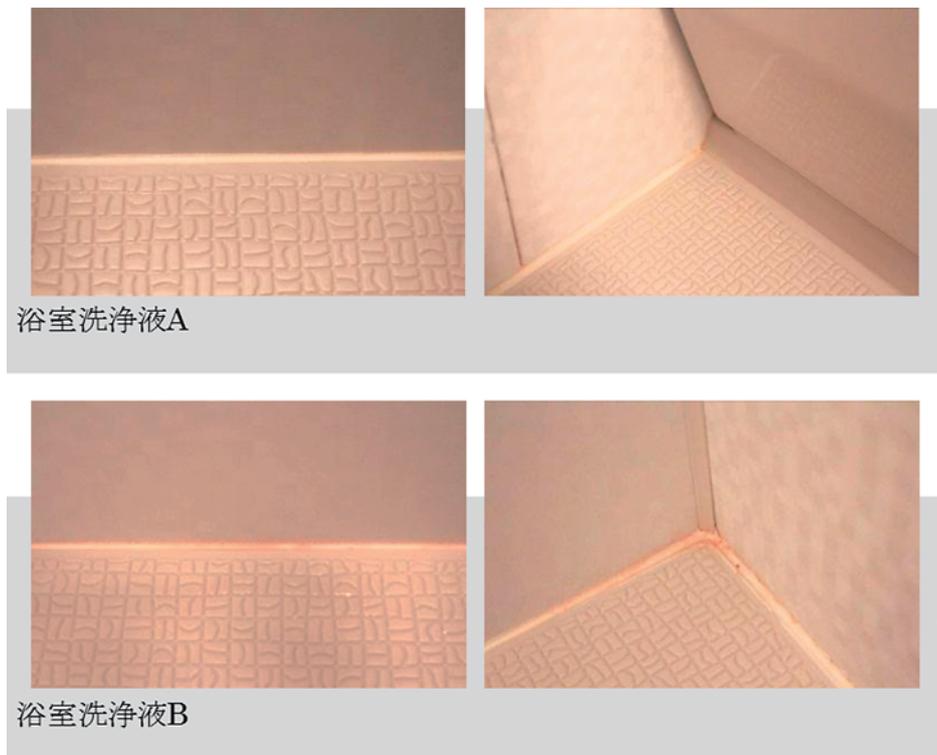


図 4. 実際の浴室で、浴室洗浄剤にアルコール類を添加した際（浴室洗浄液 A）と添加しなかった際（浴室洗浄液 B）の添加効果。

属細菌と接触させた際の生残菌数を比較した。その結果、高い BAC 濃度（例えば 2.0% (v/v)）でも 5 分間接触させた際には生残菌数の減少が確認出来なかったのに対して、より長い時間接触させることで低い濃度（例えば 0.1% (v/v)）でも有意な生残菌数の減少が確認された (data not shown)。そこで、BAC を素早く菌体に作用させることで低い濃度でも短時間で効果的に菌数を減られるのではないかと考えた。BAC の抗菌機構として、膜構造の破壊や膜タンパク質の変性等が知られる¹⁵⁾。従って、BAC を素早く細胞膜構造まで到達させられる

ような基剤を併用することが有用である可能性を考え、浸透促進剤¹⁸⁾として知られ、汎用性も高い短鎖のアルコールを BAC と併用することで *Methylobacterium* 属細菌を短時間で殺菌出来ないか試験した。様々な長さのアルキル鎖やベンゼン環、エーテル結合を有するアルコールを用いて検討を行った結果、幾つかのアルコールについて BAC と併用することで生残菌数が 10^4 CFU/ml 以上減少した (表 3)。実験に用いた濃度において、BAC は単独では殺菌性を示さないことから、アルコールの併用によって抗菌性が有意に上昇したと考えられた。

さらに、効果が発現したアルコールを添加した洗浄剤洗浄液 A と、そのアルコールを含まない洗浄剤洗浄液 B を調製し実際の浴室ピンク汚れに適用することで、浴室ピンク汚れに対しても同様の効果が得られるか試験した。即ち、浴室ピンク汚れを両洗浄液で洗浄して汚れを完全に除去し、1 ヶ月後の浴室の様子を観察したところ、洗浄剤洗浄液 A で洗浄した際のみ、ピンク汚れが再発生しなかった (図 4)。このことから、幾つかのアルコールと界面活性剤を併用することは、実際の浴室ピンク汚れの制御においても効果的である可能性が考えられた。

7. おわりに

実環境のバイオフィームを制御する為には、その実態を正確に把握することが欠かせない。例えば、次世代シーケンサーを用いた菌叢解析等は有用な実験手法ではあるが、対象のバイオフィーム中の菌の局在を捉えることが出来ない。従って、最大数を占めた菌が局所的に3次元的に大きく塊を作って存在していて視野全体では必ずしも大きな面積を占めていなかった場合や、バイオフィームが多層構造になっていた場合等は制御すべき菌を見誤る可能性がある。こうしたことからバイオフィームを視覚的に捉えることが出来る FISH 法を含む顕微鏡観察は、バイオフィームの実態解析において今もなお有用な方法と思われる。

また、現場で確かな効果を発現する技術を構築することも、実環境のバイオフィーム制御を考える上では重要である。即ち、バイオフィーム状態の菌で効果を発現し、さらに実環境で実使用と同条件で使用した際にも効果が発現する技術が必要である。実環境の条件に関して、例えば浴室で洗浄にかけられる時間は通常5分以内である為、浴室ピンク汚れの制御においては5分以内で有意な菌数の減少が確認出来る手法の構築を目指した。実験室でモデル系として人工的に調製するバイオフィームと比較すると、実環境におけるバイオフィームの方が多様であり、且つ一つ一つ複雑な形成メカニズムが存在すると思われる。従って、実環境におけるバイオフィームを制御する為には、それぞれのバイオフィームの実態を正確に把握して、その実態に即して技術を構築していくことが必要である。

文 献

- Amann, R.I., L. Krumholz, and D.A. Stahl. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172: 762-770.
- Feazel, L.M., L.K. Baumgartner, K.L. Peterson, D.N. Frank, J.K. Harris, and N.R. Pace. 2009. Opportunistic pathogens enriched in showerhead biofilms. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 16393-16399.
- Furuhata, K. and A. Matsumoto. 1992. Some bacteriological studies on the pinkish slimy films formed on tiles using bathrooms and washstands. *Annu. Rep. Tokyo Metrop. Res. Lab. Public Health.* 43: 197-204.
- Gilbert, P. and L.E. Moore. 2005. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J. Appl. Microbiol.* 99: 703-715.
- Hanson R.S. and T.E. Hanson. 1996. Methanotrophic bacteria. *Microbiol. Rev.* 60: 439-471.
- Heydorn, A., A.T. Nielsen, M. Hentzer, C. Sternberg, M. Givskov, B.K. Ersbøll, and S. Molin. 2000. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology.* 146: 2395-2407.
- Huang, W.E., R.I. Griffiths, I.P. Thompson, M.J. Bailey, and A.S. Whiteley. 2004. Raman microscopic analysis of single microbial cells. *Anal. Chem.* 76: 4452-4458.
- Huang Y.S., T. Karashima, M. Yamamoto, and H.O. Hamaguchi. 2005. Molecular-level investigation of the structure, transformation, and bioactivity of single living fission yeast cells by time- and space-resolved Raman spectroscopy. *Biochemistry* 44: 10009-10019.
- Kelly, S.T., U. Theisen, L.T. Angenent, A.St. Amand, and N.R. Pace. 2004. Molecular analysis of shower curtain biofilm microbes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 4187-4192.
- Lai, C.C., A. Cheng, W.L. Liu, C.K. Tan, Y.T. Huang, K.P. Chung, M.R. Lee, and P.R. Hsueh. 2011. Infections caused by unusual *Methylobacterium* species. *J. Clin. Microbiol.* 49: 3329-3331.
- Lee, C.H., Y.F. Tang, and J.W. Liu. 2004. Underdiagnosis of urinary tract infection caused by *Methylobacterium* species with current standard processing of urine culture and its clinical implications. *J. Med. Microbiol.* 53: 755-759.
- McLennan, M.K., D.D. Ringoir, E. Frirdich, S.L. Svensson, D.H. Wells, H. Jarrell, C.M. Szymanski, and E.C. Gaynor. 2008. *Campylobacter jejuni* biofilms up-regulated in the absence of the stringent response utilize a calcofluor white-reactive polysaccharide. *J. Bacteriol.* 190: 1097-1107.
- Miyahara, Y., T. Yano, J. Hanai, R. Yokohata, S. Matsuo, E. Hiratsuka, T. Okano, and H. Kubota. 2013. Development of novel strategies to control pink biofilms in bathrooms. *Bacterial Adherence Biofilm.* 27: 55-58.
- Pirttilä, A.M., H. Laukkanen, H. Pospiech, R. Myllylä, and A. Hohtola. 2000. Detection of intracellular bacteria in the buds of Scotch Pine (*Pinus sylvestris* L.) by *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3073-3077.
- Russell, A.D. 2002. Mechanisms of antimicrobial action of antiseptics and disinfectants: an increasingly important area of investigation. *J. Antimicro. Chemother.* 49: 597-599.
- Sanders, J.W., J.W. Martin, M. Hooke, and J. Hooke. 2000. *Methylobacterium mesophilicum* infection: case report and literature review of an unusual opportunistic pathogen. *Clinic. Infect. Dis.* 30: 936-938.
- Singhal, D., S. Boase, J. Field, C. Jardeleza, A. Foreman, and P.J. Wormald. 2012. Quantitative analysis of *in vivo* mucosal bacterial biofilms. *Int. Forum Allergy Rhinol.* 2: 57-62.
- Williams, A.C. and B.W. Barry. 2004. Penetration enhancers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56: 603-618.
- Yano, T., H. Kubota, J. Hanai, J. Hitomi, and H. Tokuda. 2013. Stress tolerance of *Methylobacterium* biofilms in bathrooms. *Microbes Environ.* 28: 87-95.