

バイオフィームと酸化性殺菌剤；バイオフィームモデルを用いた殺菌・除去効果評価

立川真理子

Biofilms and Oxidizing Biocides; Evaluation of Disinfection and Removal Effects by Using Established Microbial Systems

Mariko Tachikawa

School of Pharmacy, Nihon University; 7-7-1 Narashinodai, Funabashi, Chiba 274-8555, Japan.

(Received October 31, 2016)

The formation of bacterial biofilms and their disinfection and removal have been important subjects in the maintenance of water quality in areas such as public spas, swimming pools, food processing lines, industrial water systems, and in the hygienic control of medical devices, hospital procedures, etc. Presented here is an outline of biofilm formation, as well as studies on the disinfection and removal of biofilms by oxidizing biocides using established biofilms. These studies using established biofilms may increase the understanding of the variable response of biofilms to planktonic bacteria, and the unique aspects of oxidizing biocides in the disinfection and removal of biofilms.

Key words——biofilms; disinfection; oxidizing biocides; chlorine; ozone; hydrogen peroxide

1. はじめに

環境において、微生物の多くは器物に付着して存在し、水気があるところでは複数の細菌の集合体であるバイオフィーム (biofilm) を形成している。バイオフィームでは菌体の付着だけでなく付着基質表面上で多糖類や菌体成分を含む細胞外ポリマーなどからなるバイオフィームマトリックスが形成され、さらには他の微生物とも相互影響をおよぼしあう共同的な生活空間となっている。¹⁾ バイオフィームの形成は自然環境において水や土壌の浄化などに大きな役割を果たしているが、その形成は様々な分野において熱交換率の低下、水供給率の低下、微生物腐食、そして微生物汚染等を引き起こす原因となっている。²⁾ したがって水の処理管理施設、食品や医薬品の製造ライン、プール水や温泉水の衛生管理、そして医療器具や病院の衛生管理などにおいて、バイオフィームの殺菌・除去が強く求められている。病院等の医療関連施設で発生する感染性疾患の多くはバイオフィームに起因すること、³⁾ バイオ

フィルム形成による疾患⁴⁾なども報告されている。さらにはバイオフィームの形成により微生物の環境変化や薬剤・殺菌剤に対する抵抗性が増すことから、^{2,4)} その制御が重要な課題となっている。

筆者らはこれまで、水の塩素消毒に際する溶存物質による影響、クロラミンの形成及びその反応性と殺菌効果などについて検討を行ってきたことから、⁵⁻¹³⁾ それら酸化性殺菌剤のバイオフィームに対する殺菌・除去効果に関心を持った。酸化性殺菌剤の効果は微生物種による抵抗性の違いだけでなく、水質等の環境条件にも影響を受けることから、バイオフィームに存在する細菌に対する各種殺菌剤の殺菌・除去効果の検討には実際にバイオフィームを用いた検討が必要と考えられた。しかしながら、実際の環境中のバイオフィームを用いた検討は再現性が乏しく、繰り返しや直接の比較が困難なことが多い。そこで数種の環境常在菌 (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) から調製したバイオフィームモデルを用いての種々の酸化性殺菌剤による殺菌・除去効果評価を試みた。¹⁴⁻¹⁷⁾

本報では微生物のバイオフィーム形成及びその特性について概説し、次に筆者らが行ったバイオフィームモデルを用いた各種ハロゲン系殺菌剤¹⁴⁾並びに

日本大学薬学部 (〒274-8555 千葉県船橋市習志野台 7-7-1)

e-mail: mrktachikawa@gmail.com

本総説は、平成 27 年度退職にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

オゾン水によるバイオフィーム殺菌・除去の効果評価,¹⁵⁾ 及びバイオフィームモデルを用いたオゾンと過酸化水素の連続使用による相乗的な殺菌・除去効果の検討,¹⁶⁾ そしてバイオフィームマトリックス除去試験の試み¹⁷⁾について概要を述べ、バイオフィーム及びその殺菌・除去効果評価に対する理解への一助としたい。

2. バイオフィームとは

2-1. バイオフィームの形成 バイオフィームの形成は浮遊細菌の基質表面への接着から始まる。基質表面は環境水中に溶存するイオンや有機物を吸着して細菌が接着し易い状態にコンディショニングされ,¹⁸⁾ 細菌は鞭毛や繊毛運動が加わって基質に付着する。¹⁹⁾ 付着に伴い細菌の形態や生理機能が変化し、細菌では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; AI) の産生などが始まり、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。²⁰⁾

基質に付着した細菌は基質表面上で分裂し、細胞間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ームへと成長するが、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。²¹⁾ 多くの場合バイオフィームは複数の細菌や真菌からなる微生物の共同体であり、菌体は細胞外多糖類の分泌とともに相互に接着して上方に伸び、水が通り易い構造 (water channel) を形成する。²⁰⁾ 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) 欠損株では基質表面に広がるだけで上方に伸びるバイオフィームが形成できないことが報告されている。²⁰⁾ 栄養状態とバイオフィーム構造は関連し、²²⁾ 一般に低栄養では薄くて基質表面にしっかりと接着したバイオフィームが形成し、²³⁾ 高栄養では厚くはがれ易く、さらには菌体が層状に積み重なったバイオフィームが形成し、歯垢などはこれに属する。²⁴⁾ 一方、純水システムなどでもバイオフィームの形成は認められることから、栄養の制限によるバイオフィームの形成防止は困難と考えられている。²⁵⁾ バイオフィー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。²⁾ バイオフィームの成長や剥離は環境

に強く影響されるが、菌体からは先に述べた AI が分泌され、その濃度により細胞の代謝、運動性そして菌体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。AI としてはグラム陰性細菌では homoserine lactone 誘導体、グラム陽性細菌では oligopeptide 誘導体、またグラム陰性菌と陽性菌の両方が産生する furanone 誘導体が知られている。^{26,27)} また細菌が産生する界面活性物質、バイオサーファクタントはバイオフィーム形成に関与し、緑膿菌が産生するラムノリピッドは浮遊細菌の付着、バイオフィーム中の水路の形成と維持及びバイオフィームからの菌体の離脱などに働くことが報告されている。^{28,29)}

基質表面の物理的な性質の違いによる菌体の接着やバイオフィーム成長などについても検討されている¹⁹⁾ が、細菌は基質表面のコンディショニング作用や自身の分泌する細胞外多糖類などの助けにより種々の基質表面への付着が可能となり、基質表面の材料の違いによるバイオフィーム形成への影響はわずかと考えられる。^{30,31)} 滑らかな表面より粗い表面の方が付着は多い。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ームは剥ぎ取られ難いためである。^{32,33)} 水流の強さはバイオフィー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、基質表面への細菌の付着を完全に防止することはできない。¹⁹⁾ また、カルシウムイオン (Ca^{2+}) は細胞外多糖類に架橋し細胞外多糖類に強度をあたえ、剥がれ難くする。³⁴⁾ このほか pH、イオン濃度、温度などの環境要因によってバイオフィームの形態、成長そして剥離などが影響を受ける。¹⁾

2-2. バイオフィームの構造と機能—細胞外高分子物質 (extracellular polymeric substances; EPS) の役割 バイオフィームは菌体とそれを取り囲む細胞外マトリックスからなり立っている。マトリックスの構成成分の大部分は水分 (<97%) であり、菌体 (2-5%)、細胞外高分子物質 (EPS) として細胞外多糖類 (1-2%)、タンパク質 (<1-2%)、及び DNA や RNA (<1-2%) が存在し、そして微量のイオン類が含まれている。¹⁾ 水は細菌の膜に結合して存在し、またバイオフィーム内を栄養や代謝物な

ど種々の成分を溶かし込んで流動し、バイオフィルムの微細な構造を保持する役割を果たしている。³⁵⁾ EPS の細胞外多糖類は細菌と基質、細菌同士の接着に働き、バイオフィルムの高次構造体を維持している。³⁶⁾ 同一株でのバイオフィルム形成時と浮遊状態時での細胞外多糖類の組成の違いはわずかで、細胞外多糖類はグルコースやガラクトースなどとウロン酸（グルクロン酸、グルロン酸そしてマンヌロン酸など）からなる。浮遊細菌時とバイオフィルム形成時では、アセチル化体の割合や分子の大きさが変わることにより粘度やゲルの硬さなどが変化すると考えられている。³⁶⁾ 細胞外多糖類のほか、マトリックスには鞭毛や繊毛、膜小胞、細胞外酵素、及び DNA や RNA などの高分子成分と AI や有機酸（ピルビン酸やコハク酸など）等の低分子成分が存在し、バイオフィルムの形成と保持に働いている。それらの由来は溶菌だけでなく菌体からの分泌にもよっている。²¹⁾ 膜小胞は AI や酵素タンパク質の細胞外への輸送に働き、³⁷⁾ 高濃度の細胞外 DNA はバイオフィルム構造の維持³⁸⁾そして遺伝子プールとなり遺伝子の水平伝播の場をあたえる。³⁹⁾ Flemming³¹⁾ は細菌のバイオフィルム形成の利点を以下のように挙げている。まず基質に付着し不動な状態でマイクロコロニーを形成し菌体同士が接着して高密度で存在することを可能にしている。そして EPS は①構造の安定、②微生物共同体の成長、③濃度勾配の形成、④細胞外酵素の保持、⑤多糖類と外来酵素の相互作用、⑥溶菌成分の損失防止、⑦水路をめぐる物質の運搬、⑧遺伝子プールによる遺伝子水平伝播、⑨シグナル物質の交換の場の提供など、重要な役割を担っている。次に集団となることにより①殺菌剤、金属及び毒物に対する耐性、②食菌作用に対する防御、③複合体形成による外来酵素に対する防御、④優勢生物に対する防御などを獲得し、さらに吸着体として①栄養分の蓄積、②水保持による乾燥防御、③汚染物質の蓄積などの機能を備える。

3. バイオフィルムモデルを用いた殺菌除去効果の検討

3-1. バイオフィルムモデルの調製及び観察¹⁴⁻¹⁷⁾

筆者らはバイオフィルムの殺菌除去における種々の殺菌剤の効果の比較検討を行うため環境常在菌の *Pseudomonas fluorescens* (JCM 2779), *Pseudomo-*

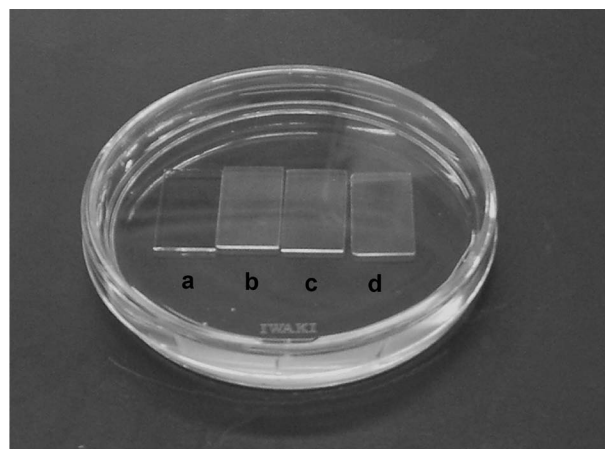


Fig. 1. Biofilm Formation of *P. fluorescens* on Glass Slides (b, c, d)

(a) is a glass slide before biofilm formation.

nas aeruginosa (緑膿菌, JCM 2776) 及び *Klebsiella pneumoniae* (肺炎桿菌, JCM 1662) を用いてガラス小片上にそれぞれのバイオフィルム調製を試みた。

P. fluorescens 及び *K. pneumoniae* でのバイオフィルムの調製にはグルコースと無機塩類からなる培養液 (G-I)⁴⁰⁾を用いた。*P. aeruginosa* バイオフィルムの作製には G-I 培養液に LB 培養液 (Luria-Bertani medium) を加えて用いた。ガラスシャーレ (ϕ 145 mm) にガラス小片 (1.4×2.6 cm) 16-17 枚を外縁に沿って並べ、中央にマグネット攪拌子を置き滅菌した。その後、培養液 150 mL と前培養菌液 0.3 mL とを加え、攪拌子をゆっくりと回転 (1 回転/秒) させながら $28 \pm 1^\circ\text{C}$ で培養し、ガラス小片上にバイオフィルムを形成させた。バイオフィルムが形成したガラス小片は生理食塩水中を 2 回通過させ、浮遊細菌を除去したのち実験に用いた。

ガラス小片上での *P. fluorescens* のバイオフィルム形成は Fig. 1 に示すように、ガラス小片上の曇りとして肉眼で観察されたが、*P. aeruginosa* と *K. pneumoniae* では肉眼では確認できなかった。ガラス小片上に付着したバイオフィルムの生菌数を計測したところ Fig. 2 に示すように、いずれの菌においてもガラス小片上に付着する生菌が認められ、バイオフィルムの形成が示唆された。24 時間後のガラス小片上に形成されたバイオフィルム中の生菌数 (cfu) は 10^6 – 10^8 個であった。培養時間が長くなると *P. fluorescens* のバイオフィルムでは菌数が徐々

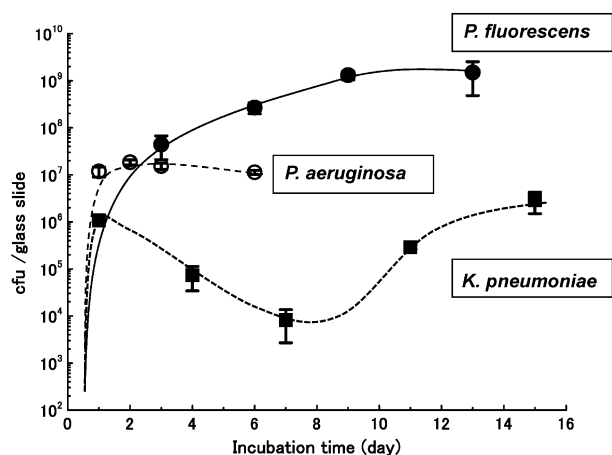


Fig. 2. Growth of Biofilms on Incubation at 28°C

Each point, *P. fluorescens* (●), *P. aeruginosa* (○) and *K. pneumoniae* (■), and bar represents mean ± S.D. of cfu on a glass slide ($n=3-6$).

に増加したが、*P. aeruginosa* のバイオフィームでは2日を超えるとむしろ徐々に減少した。*K. pneumoniae* では1日目には10⁶ 個/小片であったが、時間の経過とともに減少し、7日目から再び増加した。これらガラス小片一枚あたりに付着している菌数のバラツキは小さく、均一なバイオフィームを形成していることが示唆された。

共焦点レーザー顕微鏡 [confocal laser scanning microscope (CLSM), Carl Zeiss LSM510] 観察はバイオフィームを LIVE/DEAD® BacLight™ (Invitrogen 製) で蛍光染色し、細胞膜損傷のない菌体 (緑色) と損傷のある菌体 (赤色) に分けて観察した。焦点距離を順次変えたスキャンにより平面画像を取り込み、コンピュータ処理により、バイオフィーム切断面のイメージ画像を作成した (Z stack 法)。またバイオフィーム中の多糖類層をレクチン (コンカナバリン A) 抱合の蛍光色素 Alexa Fluor® 633-Con A (Invitrogen 製) で染色し、CLSM で観察した。

3-2. ハロゲン系殺菌剤によるバイオフィーム殺菌効果試験¹⁴⁾ 水の衛生管理では、大量の水に対応でき、作用後は無機イオンになることから、オゾン、過酸化水素、次亜塩素酸及びクロラミン若しくはブロマミン等の酸化系殺菌剤が多く用いられてきた。中でもハロゲン系殺菌剤はその取扱いの簡易さから、水道のみならず、温泉、水泳プール等で繁用されている。ハロゲン系殺菌剤の反応性は、ハロゲンの種類 (塩素、臭素及びヨウ素) で異なり、さら

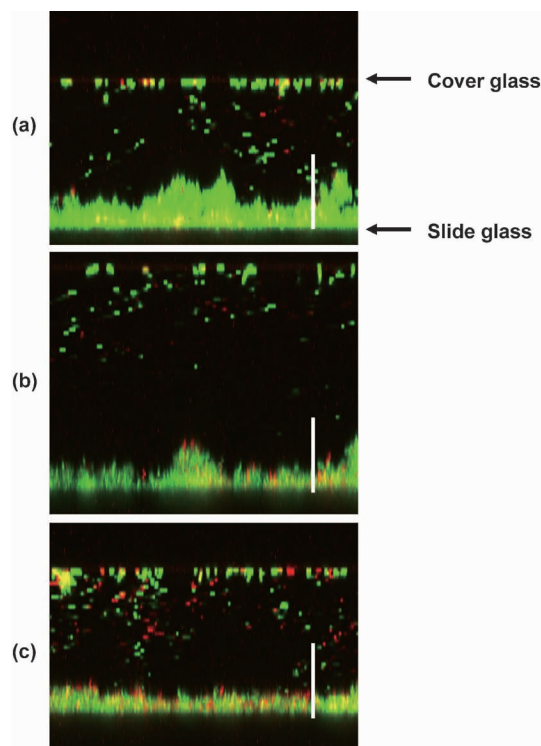


Fig. 3. CLSM Images of the Vertical Section of *P. fluorescens* Biofilms Exposed to HClO Solution (1.5 mg/L as available chlorine at pH 7.4)

Biofilms of *P. fluorescens* formed by 24-h incubation were exposed to the HClO solution for indicated times. Staining and observation under the CLSM were carried out as described in the text. The bar represents 20 μ m. (a) Control. A biofilm exposed to the medium without chlorine for 1 min. (b) Exposed to HClO for 1 min. (c) Exposed to HClO for 3 min.

にそれらと結合する窒素化合物によっても異なることから、^{5-7,9-13)} 浮遊細菌だけでなくバイオフィームに対する各殺菌剤による殺菌・除去効果の評価がもとめられている。

このようなことから、先に述べたバイオフィームモデルを用いて、数種のハロゲン系殺菌剤によるバイオフィームへの作用を、CLSMによる観察と生菌数測定により検討した。CLSMによる観察 (Figs. 3 and 4) はバイオフィームでの菌体の密度や分布を明瞭に示した。*P. fluorescens* バイオフィームは菌体密度が高く [Fig. 3(a)], 次亜塩素酸 (HClO, 有効塩素濃度 1.5 mg/L) 水溶液1分間の作用 [Fig. 3(b)] では菌体の剥落が生じ、ところどころ膜損傷を受けた菌 (赤色) が存在した。3分間作用すると、剥落は進み、付着細菌の中にも膜損傷を受けたものが増加していた [Fig. 3(c)]。 *P. aeruginosa* バイオフィームでは、菌体は分散して存在し [Fig. 4(a)], これは自ら産生する細胞外多糖類 (アルギン酸を多く含む)⁴¹⁾ に囲まれているため

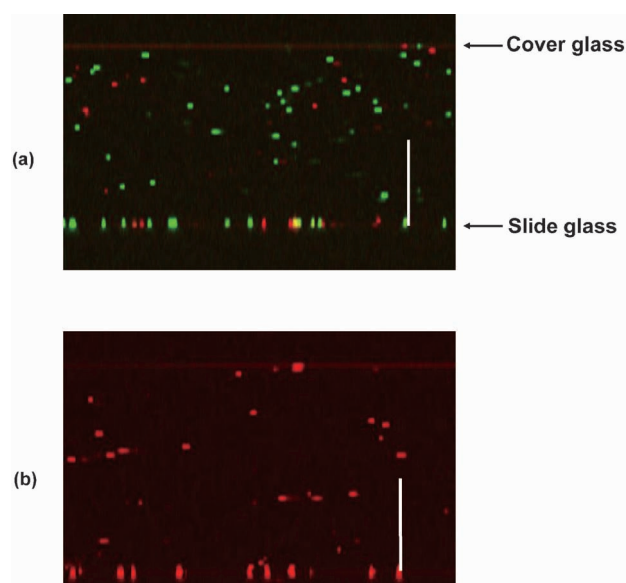


Fig. 4. CLSM Images of the Vertical Section of *P. aeruginosa* Biofilm Exposed to HClO (0.8 mg/L as available chlorine at pH 7.4)

Biofilms of *P. aeruginosa* formed by 120-h incubation were exposed to the HClO solution for 1 min. Staining and observation under the CLSM were carried out as described in the text. The bar represents 20 μ m. (a) Control. A biofilm exposed to the medium without chlorine for 1 min. (b) Exposed to HClO for 1 min.

と考えられた。HClO 水溶液（有効塩素濃度 0.8 mg/L）を 1 分間作用すると膜損傷を受けてはいるが、剥落はほとんど生じなかった [Fig. 4(b)]。図では示さぬが、*K. pneumoniae* バイオフィームでは *P. aeruginosa* バイオフィームに比べてさらにまばらな菌体の接着が観察された。

P. fluorescens と *P. aeruginosa* を用いてバイオフィーム中の細菌とそれを分散させて調製した浮遊細菌について HClO とアンモニアクロラミン

(NH_2Cl) による殺菌効果を比較した (Table 1)。いずれの菌においても NH_2Cl の浮遊細菌に対する殺菌効果は HClO に比べて明らかに劣るが、バイオフィーム細菌に対しては NH_2Cl は HClO とほぼ同等の効果を示した。*P. fluorescens* においてはバイオフィーム形成による HClO への抵抗性の著しい増加が示され、バイオフィームに対しては浮遊細菌に対する殺菌効果をそのまま適用できないことが示唆された。

5 種のハロゲン系殺菌剤 [①HClO, ② NH_2Cl , ③ブロムクロルジメチルヒダントイン (Br, Cl-DMH, 水中では一部解離して HBrO と HClO を生じる), ④スタブレックス (STABREX, 主成分はブロムスルファミン酸 BrNHSO_3H) 及び⑤ブロムクロラミン ($\text{NH}_4\text{Br} + \text{HClO}$, 主成分は NHBrCl と NH_2Cl の混合物¹⁴⁾] による *P. fluorescens* バイオフィームに対する殺菌効果を検討し、各殺菌剤水溶液の作用時間毎の生残率を Fig. 5 に示した。 NH_2Cl 水溶液及び NH_4Br と HClO との混合水溶液では作用時間中持続した生残率の低下を示したが、HClO 水溶液と Br, Cl-DMH 水溶液では作用初期で生残率の低下が観察されたが、その後生残率は横ばいとなって殺菌効果の低下が生じた。この原因として酸化力の高い HClO や HBrO はマトリックス成分と反応しバイオフィーム中への浸透が進まないことが考えられた。それに対し NH_2Cl や NHBrCl の低い反応性（安定性）が浸透性と重なり持続した殺菌効果を示したと考えられた。

3-3. オゾン水によるバイオフィーム殺菌効果¹⁵⁾

オゾンは強い酸化性を持ち、水処理において水中

Table 1. Comparison of the Biocidal Efficacy of HClO and NH_2Cl on Suspended and Biofilm Cells of *P. fluorescens* and *P. aeruginosa*

Microorganisms	Chlorine	cfu/plate ($\times 10^6$)				
		Control	Biofilm cells		Suspended cells	
			Treated	% ^a (std.)	Treated	% ^a (std.)
<i>P. fluorescens</i>	HClO	224	0.88	0.39 (0.39)	0.35	0.16 (0.14)
	HClO	704	44.7	6.35 (0.17) *,b	5.29	0.75 (0.65) *,b
	NH_2Cl	742	51.2	6.90 (5.60)	25.0	3.37 (0.32)
<i>P. aeruginosa</i>	HClO	20.3	0.088	0.43 (0.08) **,b	0.0015	0.01 (0.005) **,b
	NH_2Cl	13.1	0.079	0.60 (0.41)	0.0104	0.08 (0.13)

Since the suspended cells were prepared by ultrasonic dispersion of the biofilm formed in an aliquot volume of 0.5 mM phosphate buffer solution at pH 7.4, the number of control cells was common between the biofilm and suspended cells in the same line. The cells were exposed to the chlorine solutions of $1.7\text{--}2.4 \times 10^{-5}$ M as available chlorine at pH 7.4 for 5 min. Significant difference was examined by Student's *t*-test ($n=3$).

^a (cfu treated/cfu control) $\times 100$, ^b Significant difference ($p < 0.05$) between the same numbers of asterisks.

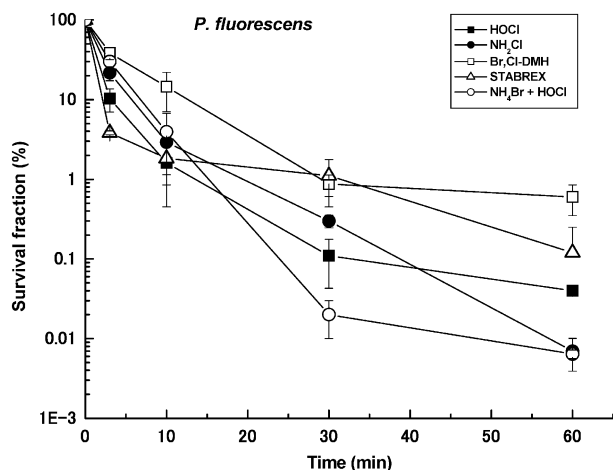


Fig. 5. Efficacy of Several Biocides on the Biofilms of *P. fluorescens*

The biofilms were exposed to the biocide solutions of $2.1\text{--}2.9 \times 10^{-5}$ M as available halogen at 20°C for indicated times. The pH of the test solutions was 7.4 and that of the mixed solution of NH_4Br and HClO was 8.5. Each point represents the mean value of 3 plates.

溶存物質の分解や殺菌に用いられており、バイオフィルムに対する殺菌効果についての検討が求められていた。

オゾン水は電解式オゾン水生成器（アイ電子工業製、AOD-TH）に活性炭フィルターを通して残留塩素を除いた船橋市水道水を通して調製した。オゾン水の半減期は数分⁴²⁾と短いので、ガラス小片上のバイオフィルム表面に直接水流が当たらないように工夫したガラス製の曝露装置（試験槽容量は 500 mL、試験水流速は通常 25 mL/s）を作製し、流水式での検討を行った。

P. fluorescens と *P. aeruginosa* から調製したバイオフィルムを少量の滅菌水中で超音波処理して得た菌浮遊液とバイオフィルムについて、バッチ式でオゾン水（1.6–1.7 mg/L）を 5 分間曝露させたときの

生残率を求めた（Table 2）。浮遊細菌に対するバイオフィルム細菌の生残率の比は *P. fluorescens* ではおよそ 4000、*P. aeruginosa* ではおよそ 20 であり、いずれの菌においてもバイオフィルム細菌の抵抗性は菌浮遊液に比べて増加していた。*P. fluorescens* バイオフィルムでのオゾン水に対する抵抗性の増加比は、前章での HClO での抵抗性の増加比よりも著しかった。

P. fluorescens と *P. aeruginosa* のバイオフィルムについて、流水式で水道水及び種々の濃度のオゾン水に曝露し、曝露時間毎の生残率を調べた（Fig. 6）。*P. fluorescens* ではオゾン濃度 0.92 mg/L と 1.35 mg/L では生存率にはほとんど差がなかったが、3.2 mg/L になると曝露時間に伴う生残率の減少が観察された [Fig. 6(a)]。 *P. aeruginosa* のバイオフィルムではオゾン濃度 1.30 mg/L を超えると生残率の著しい減少が観察された。低濃度のオゾン水曝露では曝露時間が長くなるにつれて生残率の低下は遅くなり、バイオフィルム構成成分とオゾンとの反応により浸透阻害が生じていることが考えられた。ハロゲン系殺菌剤と同様にオゾン水によるバイオフィルムの殺菌・除去効果は曝露時間とは比例せず、従来の浮遊細菌での効果評価に用いられる CT 値（Concentration \times Time）は適用できないことが示された。

オゾン水作用（1.2–1.1 mg/L、1 分間）後の CLSM による観察では、*P. fluorescens* バイオフィルムではバイオフィルム層の剥落、*P. aeruginosa* バイオフィルムではアルギン酸層が薄くなり、層中の菌体の膜損傷を受けている割合が増加していた。

バイオフィルムを形成する細胞外多糖類に対するオゾン水の作用について CLSM により検討した。

Table 2. Disinfection Efficacy of Ozone Water on Biofilm and Suspended Cells of *P. fluorescens* and *P. aeruginosa* in a Batch Treatment for 5 Min

Microorganisms	Biofilm cells cfu/plate ($\times 10^6$)			Suspended cells ^a cfu/suspension ($\times 10^6$)		
	O_3 (mg/L)	Treated	(%) ^b	O_3 (mg/L)	Treated	(%) ^b
<i>P. fluorescens</i>	control	159 \pm 26				
	1.7	36.1 \pm 24.7	22.7 \pm 15.5	1.5	0.009 \pm 0.012	0.006 \pm 0.008
<i>P. aeruginosa</i>	control	23.8 \pm 9.7				
	1.6	0.03 \pm 0.01	0.13 \pm 0.04	1.4	0.002 \pm 0.001	0.008 \pm 0.004

Mean \pm S.D. ($n=3$). ^a Suspended cells were obtained by ultrasonic dispersion of biofilms established on glass plates prepared at the same time as described in experiments precisely. Therefore, the control fractions of biofilm and suspended cells are containing the same number of cfu, respectively. ^b (cfu treated/cfu control) \times 10.

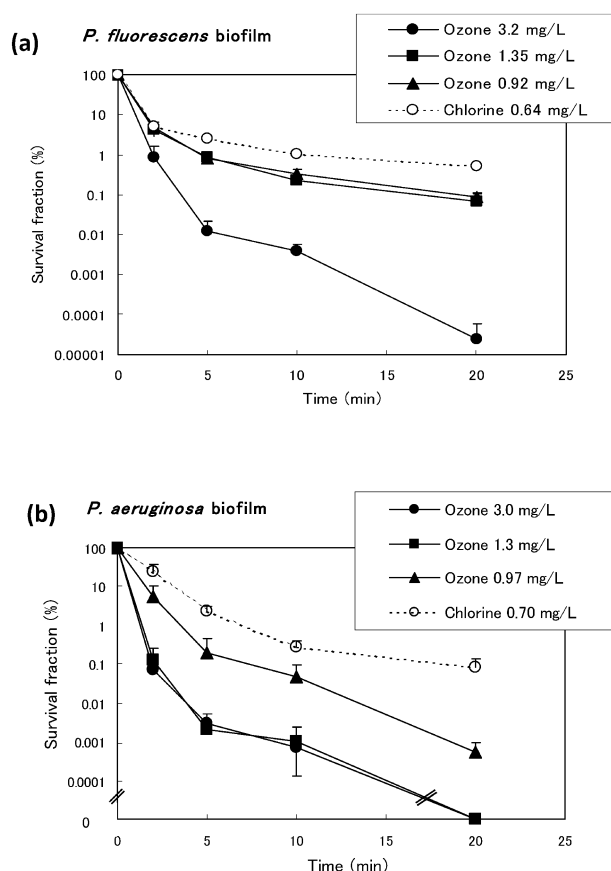


Fig. 6. Efficacy of Ozone Water (ozone, ●, ▲ and ■) and Chlorinated Tap Water (free chlorine, ○) on the Biofilms of *P. fluorescens* (a) and *P. aeruginosa* (b) Treated in the Flow-through System at Indicated Ozone Concentrations. Each point with a bar represents the mean cfu value and S.D. of 3 slides.

P. fluorescens バイオフィルムにオゾン濃度を変えて (1 及び 2 mg/L) 10 分間作用させ、曝露後にガラス小片に残る細胞外多糖類をレクチン抱合蛍光色素で染色し CLSM で観察した (Fig. 7). ガラス小片には細胞外多糖類の付着がみとめられ、オゾン濃度が高くなると残存する細胞外多糖類は減少し、オゾンによる細胞外多糖類の酸化分解が示された. Figure 6 との結果を考え合わせると、*P. fluorescens* バイオフィルムの効果的な殺菌・除去には細胞外多

糖類の分解が生じるオゾン濃度が必要であると考えられた.

3-4. バイオフィルム殺菌除去に対するオゾン水と過酸化水素水の連続曝露による相乗効果¹⁶⁾ 前章において、オゾン水によるバイオフィルムの殺菌において低濃度 (1–2 mg/L) では浸透阻害が生じ、オゾン濃度を高くして細胞外多糖類の分解を進めることが必要であることが示唆された. そこでより強い酸化力を持つヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$) を生成するオゾンと過酸化水素の混合による促進酸化法に注目した.⁴³⁾ しかし $\cdot\text{OH}$ の寿命は非常に短い (半減期: 10^{-7} s)⁴²⁾ ことから、通常の水処理で用いられるオゾン水と過酸化水素水の混合によるバイオフィルム曝露ではなく、器物表面に付着するバイオフィルム上 (若しくはバイオフィルム中) での $\cdot\text{OH}$ 生成を目的として、バイオフィルムへのオゾン水と過酸化水素水の連続的な曝露を検討した. Figure 8 に示すように、オゾン水と過酸化水素水の曝露順序を変えて *P. fluorescens* のバイオフィルムに連続的に曝露し、生残率を検討した. Figure 8 中の点線はオゾン水と過酸化水素水のそれぞれの単独曝露 (A と B) により得られた生残率の積である. 過酸化水素水→オゾン水の連続曝露 (C) ではそれぞれにおける生残率の相加的な効果であったが、オゾン水→過酸化水素水の連続曝露 (D) では生残率が著しく低下し相乗的な殺菌効果が認められた. 曝露 (D) と同条件で過酸化水素中に殺菌には影響を及ぼさない濃度のメタノール (1%) を添加すると相乗効果が弱まり、 $\cdot\text{OH}$ 生成による促進効果と考えられた. 曝露の順序を変えて曝露したバイオフィルムについて菌体と、細胞外多糖類の蛍光染色を行い CLSM により観察を行った (Fig. 9). オゾン水→過酸化水素水の連続曝露 [Fig. 9(b)] ではバイオフィルムを構成する細胞外多糖類や菌体 that 浮き上がった様子を示しており、この連続曝露によりバイ

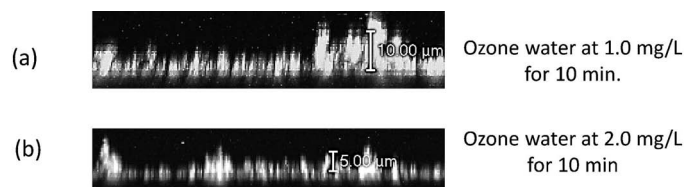


Fig. 7. Decrease of Extracellular Polysaccharide in the *P. fluorescens* Biofilm Matrix by Treatment with Ozone Water

Extracellular polysaccharide attached on the glass slide was stained with concanavalin A, Alexa Fluor® 633 conjugate after the treatment. The bars represent 10 μm in (a) and 5 μm in (b).

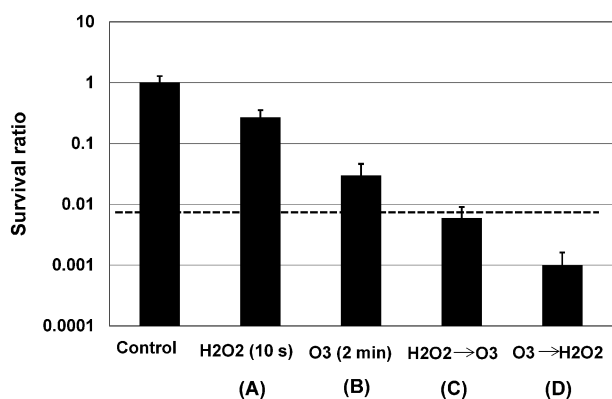


Fig. 8. Disinfection Efficacy of H_2O_2 and O_3 in Their Single and Sequential Two-step Treatments of the Biofilms of *P. fluorescens*

(A) Biofilms were treated with H_2O_2 for 10 s; (B) treated with O_3 for 2 min; (C) treated first with H_2O_2 for 10 s followed by O_3 for 2 min; (D) first with ozone for 2 min followed by H_2O_2 for 10 s. The concentrations of O_3 and H_2O_2 were 1.3 mg/L and 1.1%, respectively. Survival ratios were expressed as means \pm S.D. ($n=3$). The dotted line indicates an estimated additive survival ratio of H_2O_2 and O_3 , obtained by multiplying the survival ratio of H_2O_2 (A) by that of O_3 (B); $0.27 \times 0.03 = 0.0081$.

オフィルムの剥離や菌体損傷が増加していた。またこの現象はバイオフィルム底部から観察されることから、殺菌剤のバイオフィルムへの浸透が示唆された。オゾンの曝露温度を下げる ($25^\circ\text{C} \rightarrow 8^\circ\text{C}$) と相乗効果は強まり、オゾンのバイオフィルム浸透の増加よりバイオフィルム中での $\cdot\text{OH}$ 生成が増加した

ためと考えられた。オゾン→過酸化水素曝露により細胞外多糖類の分解が進んでいることから、バイオフィルムの殺菌・除去における細胞外多糖類、さらには細胞外高分子物質 (EPS) の分解の重要性が強く示唆される結果であった。また、ここで示した殺菌剤の連続処理による殺菌効果の増強はバイオフィルム殺菌に対する新手法を提案するものと考えられる。

3-5. 酸化性殺菌剤によるバイオフィルムマトリックスの分解除去¹⁷⁾ 前章からもバイオフィルムの制御には殺菌のみならずバイオフィルムマトリックスの分解・除去が重要であることが示唆されたことから、オゾン水、次亜塩素酸ナトリウム (NaClO) 水溶液及び過酸化水素 (H_2O_2) 水溶液によるマトリックス分解除去効果について比較検討した。

P. fluorescens と *E. coli* のバイオフィルムはそれぞれ G-I 培養液⁴⁰⁾ と LB 培養液を用いて 24 穴のマイクロプレートに調製した。バイオフィルムを形成したマイクロプレートは培地を捨て超純水で濯いだ後、それぞれの試験水中に一定時間浸した。0.01 M チオ硫酸ナトリウム水溶液に浸けて中和したのち、マイクロプレートに残る EPS 量をクリスタルパイ

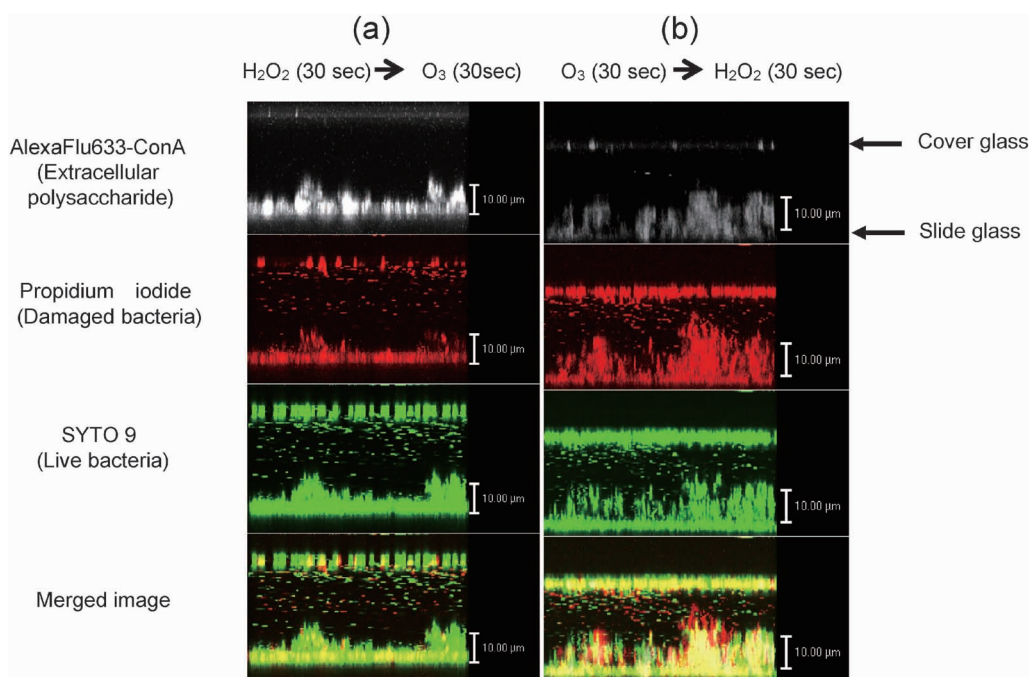


Fig. 9. Observation of the Biofilms of *P. fluorescens* Treated with O_3 and H_2O_2 Sequentially by CLSM after Staining with Alexa Fluor® 633-Con A, and Live/Dead BacLight™, an Equal Volume Mixture of Propidium Iodide and SYTO 9 Solutions

(a) Biofilms were first treated with H_2O_2 for 30 s followed by O_3 for 30 s; (b) first with O_3 for 30 s followed by H_2O_2 for 30 s. The concentrations of O_3 and H_2O_2 were 1.2 mg/L and 1.1%, respectively. The bars represent 10 μm .

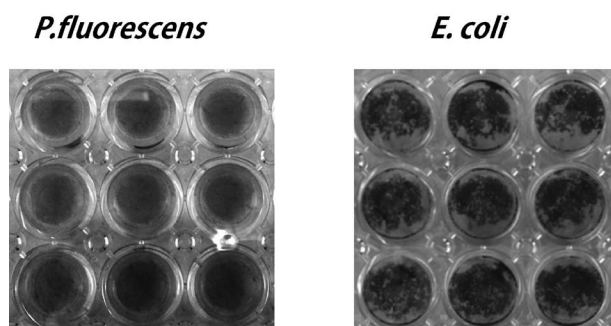


Fig. 10. Crystal Violet (CV) Staining of Biofilm Matrices of *P. fluorescens* (a) and *E. coli* (b) Formed in 24-Well Microplates

Biofilms of *P. fluorescens* were prepared in glucose-mineral growth medium⁴⁰⁾ for 24 h incubation at 30°C, and those of *E. coli* were in diluted LB medium for 48 h at 30°C. After the incubation, growth medium in wells were discarded and the matrices formed in wells were rinsed with water and dried, then followed by staining with 0.1% CV solution for 30 min. Excess CV on matrix was washed out with water and the matrix in wells were air dried.

オレット (CV) 染色により測定した.^{44,45)} それぞれのマトリックスに吸着した CV を 70% エタノール水溶液で溶出し、溶出液の 595 nm での吸光度 (C_t) を求めた。酸化剤水溶液の代わりに純水を用いたときの吸光度 (C_0) を対照とし、その比 (C_t/C_0) をマトリックス残留率とした。

調製した各バイオフィルムマトリックスの CV 染色像を Fig. 10 に示した。 *P. fluorescens* のマトリックスは CV で均一に染色（実際は青色）され、大腸菌のマトリックスはやや不均一でウロコ状に染色され、両者のバイオフィルム構造の違いが示唆された。両バイオフィルムマトリックスに対するオゾン水による除去効果を Fig. 11 に示した。グルコースを主成分とする培地で調製した *P. fluorescens* のマトリックスはオゾン水 (2.7 mg/L) によりプレートからの剥離が進み 30 分後にはほぼ消失した。一方ペプトンを主成分とする培地で調製した *E. coli* のマトリックスの分解には高濃度 (10 mg/L) を要し、マトリックス構造と組成の違いにより除去効果は大きく影響を受けることが示唆された。NaClO 水溶液では 1000–1500 mg/L で分解・除去が観察され、 H_2O_2 水溶液（室温）では濃度 1% でもマトリックス除去効果は得られなかった。これらのことから、酸化性殺菌剤によるマトリックス除去には殺菌に比べ高濃度を要することが示された。

4. まとめ

本報ではバイオフィルムとそのマトリックスの形

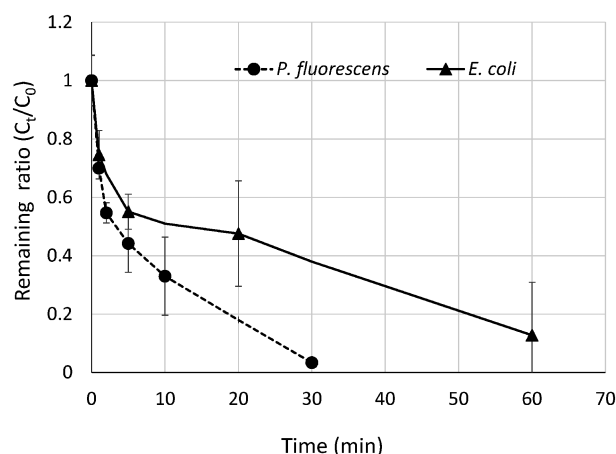


Fig. 11. Removal of Biofilm Matrices of *P. fluorescens* and *E. coli* by the Treatment with 2.7 and 10.0 mg/L of Ozone Water, Respectively, for Indicated Times

The amounts of matrices remained in wells were determined by the crystal violet staining method^{44,45)} as described in Fig. 10. Adsorbed CV on the matrix was eluted with 70% ethanol and the OD of elute was determined at 595 nm. Remaining ratio of matrix was obtained by dividing OD of treated matrix by those of not-treated. Points and bars represent means \pm S.D. of 3 plates of 16 wells/plate.

成と構成成分について概説し、そして各種酸化性殺菌剤によるバイオフィルム殺菌の実際、オゾン水と過酸化水素水との併用によるバイオフィルム殺菌効果の促進、そしてバイオフィルムマトリックス除去について、これまで行ってきた研究結果を基に述べてきた。これらの研究から酸化性殺菌剤によるバイオフィルムの殺菌・除去に対して以下のようなことが明らかとなったと考える。

I. 本研究で用いたバイオフィルムモデルは簡易な調製法でありながらも、バイオフィルムの特徴を備えており、CLSM 観察と併せることが可能で、多様な殺菌剤における作用効果の評価に有効と考えられる。

II. 浮遊細菌を対象とした殺菌効果試験結果をそのままバイオフィルム殺菌に適用することはできない。バイオフィルム形成による抵抗性の増加はマトリックスや含有成分と酸化性殺菌剤との反応により殺菌剤濃度が減少し、浸透障害が生じ、深部への到達に時間を要することが考えられる。酸化力が高いオゾンや次亜塩素酸などではこの影響が強く、むしろ酸化力が弱いとされるクロラミン (NH_2Cl) やブロムクロラミン ($BrClNH$) などにおいては浸透障害は小さく、持続したバイオフィルム殺菌効果を示すと考えられた。

III. バイオフィルムマトリックスの除去には殺

菌に比べて高濃度のオゾンや HClO が必要であった。またバイオフィルムマトリックス構成成分の違いにより、影響をうけることが示された。

IV. 殺菌・除去においては濃度に頼るだけでなく、酸化性殺菌剤の連続暴露などの有効手法開発の可能性が示唆された。

今後は、形成したバイオフィルムの殺菌除去だけでなく、その形成の予防や伸展を遅らす検討がさらに重要となり、オゾンを始めとする環境残留性の小さい酸化性殺菌剤の応用利用が期待される。

謝辞 本稿の終わり際して、塩素等の酸化剤による水の消毒作用の研究への道を開いてくださった故澤村良二先生、バイオフィルムへの応用研究を示唆くださった岡田昌二先生、多くの助言と励ましを頂いた諸先生方、そしてともに研究に携わってくださった学生の方々に深く感謝いたします。また、研究の場を与えてくださった日本大学薬学部、並びに本稿執筆の機会を与えてくださった日本薬学会に深く感謝いたします。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Sutherland I. W., *Trends Microbiol.*, **9**, 222–227 (2001).
- 2) Characklis W. G., “Biofilms,” ed. by Characklis W. G., Marshall K. C., Wiley, New York, 1990, pp. 528–529.
- 3) Bryers J. D., *Biotechnol. Bioengineer.*, **100**, 1–18 (2008).
- 4) Costerton J. W., Stewart P. S., Greenberg E. P., *Science*, **284**, 1318–1322 (1999).
- 5) Tachikawa M., Tezuka M., Sawamura R., *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **39**, 202–206 (1993).
- 6) Tachikawa M., Tezuka M., Sawamura R., *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **39**, 297–302 (1993).
- 7) Tachikawa M., Saita K., Tezuka M., Sawamura R., *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **39**, 560–565 (1993).
- 8) Tachikawa M., Saita K., Tezuka M., Sawamura R., *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **39**, 572–576 (1993).
- 9) Tachikawa M., Matsuno A., Tezuka M., Sawamura R., *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **43**, 230–236 (1997).
- 10) Saita K., Tachikawa M., Tezuka M., Sawamura R., *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **44**, 442–450 (1998).
- 11) Tachikawa M., Sayama C., Saita K., Tezuka M., Sawamura R., *Water Res.*, **36**, 2547–2554 (2002).
- 12) Tachikawa M., Sayama C., Tezuka M., Sawamura R., Seki H., *J. Water and Waste*, **47**, 695–701 (2005).
- 13) Tachikawa M., Aburada T., Tezuka M., Sawamura R., *Water Res.*, **39**, 371–379 (2005).
- 14) Tachikawa M., Tezuka M., Morita M., Isogai K., Okada S., *Water Res.*, **39**, 4126–4132 (2005).
- 15) Tachikawa M., Yamanaka K., Nakamuro K., *Ozone: Sci. Eng.*, **31**, 3–9 (2009).
- 16) Tachikawa M., Yamanaka K., *Water Res.*, **64**, 94–101 (2014).
- 17) Tachikawa M., Yamanaka K., Proceedings of the 25th Annual Conference on Ozone Science and Technology in Japan, Kyoto, May 2016, p. 166.
- 18) Characklis W. G., McFeters G. A., Marshall K. C., “Biofilms,” ed. by Characklis W. G., Marshall K. C., Wiley, New York, 1990, pp. 341–393.
- 19) Korber D. R., Lawrence J. R., Lappin-Scott H. M., Costerton J. W., “Microbial Biofilms,” ed. by Lappin-Scott H. M., Costerton J. W., Cambridge University Press, Cambridge, 1995, pp. 15–45.
- 20) O’Toole G., Kaplan H. B., Kolter R., *Annu. Rev. Microbiol.*, **54**, 49–79 (2000).
- 21) Branda S. S., Vik Å., Friedman L., Kolter R., *Trends Microbiol.*, **13**, 20–26 (2005).
- 22) Wimpenny J. W. T., Colasanti R., *FEMS Microbiol. Ecol.*, **22**, 1–16 (1997).
- 23) Walker J. T., Mackerness C. W., Rogers J., Keevil C. W., “Microbial Biofilms,” ed. by Lappin-Scott H. M., Costerton J. W., Cambridge University Press, Cambridge, 1995, pp. 196–204.
- 24) Marsh P. D., “Microbial Biofilms,” ed. by Lappin-Scott H. M., Costerton J. W., Cambridge University Press, Cambridge, 1995, pp.

- 282–300.
- 25) Mittelman M. W., “Microbial Biofilms,” ed. by Lappin-Scott H. M., Costerton J. W., Cambridge University Press, Cambridge, 1995, pp. 133–147.
- 26) Taga M. E., Bassler B. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100** (Suppl. 2), 14549–14554 (2003).
- 27) Camilli A., Bassler B. L., *Science*, **311**, 1113–1116 (2006).
- 28) Davey M. E., Caiazza N. C., O’Toole G. A., *J. Bacteriol.*, **185**, 1027–1036 (2003).
- 29) Pamp S. J., Tolker-Nielsen T., *J. Bacteriol.*, **189**, 2531–2539 (2007).
- 30) Van der Kooij D., Veenendaal H. R., Baars-Loris C., Van der Klift D. W., Drost Y. C., *Water Res.*, **29**, 1655–1662 (1995).
- 31) Flemming H.-C., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **59**, 629–640 (2002).
- 32) Pedersen K., *Water Res.*, **24**, 239–243 (1990).
- 33) Faille C., Membre J.-M., Ussier J.-P., Bellon-Fontaine M.-N., Carpentier B., Laroche M.-A., Benezech T., *Biofouling*, **15**, 261–274 (2000).
- 34) Applegate D. H., Bryers J. D., *Biotechnol. Bioeng.*, **37**, 17–25 (1991).
- 35) Schmitt J., Flemming H. C., *Water Sci. Technol.*, **39**, 77–82 (1999).
- 36) Sutherland I. W., *Water Sci. Technol.*, **43**, 77–86 (2001).
- 37) Schooling S. R., Beveridge T. J., *J. Bacteriol.*, **188**, 5945–5957 (2006).
- 38) Whitchurch C. B., Tolker-Nielsen T., Ragas P. C., Mattick J. S., *Science*, **295**, 1487 (2002).
- 39) Molin S., Tolker-Nielsen T., *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14**, 255–261 (2003).
- 40) LeChevallier M. W., Cawthon C. D., Lee R. G., *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 2492–2499 (1988).
- 41) Davies D. G., Chakrabarty A. M., Geesey G. G., *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 1181–1186 (1993).
- 42) Hoigné J., Bader H., Haag W. R., Staehelin J., *Water Res.*, **19**, 993–1004 (1985).
- 43) U.S. Environmental Protection Agency (EPA), EPA Guidance Manual, “Alternative Disinfectants and Oxidants Guidance Manual,” EPA 815-R-99-014, 1999: <http://nepis.epa.gov/Exe/ZyPURL.cgi?Dockkey=2000229L.TXT>, cited 24 April, 2017.
- 44) Peeters E., Nelis H. J., Coenye T., *J. Microbiol. Methods*, **72**, 157–165 (2008).
- 45) Narisawa N., Furukawa S., Ogihara H., Yamasaki M., *J. Biosci. Bioeng.*, **99**, 78–80 (2005).