

クオラムセンシングを阻害する新規バイオフィルムコントロール剤

A novel biofilm control agent that inhibits quorum sensing

星光PMC株式会社
製紙用薬品事業部 五十嵐 亮二
久保 武

1. はじめに

産業、生活、医療環境等において、水が存在する環境は微生物の生育に適しており、そこで微生物が増殖してバイオフィルム(BF)と呼ばれる構造体を形成することはよく知られている¹⁾。BFは、細菌の集合体と、それらが産生する多糖類などの代謝物から構成される粘性を帯びた膜状の付着物であり、シンク、浴室、トイレ、排水管、医療器具、逆浸透膜(RO膜)、薬剤のストックタンク、冷却塔等の様々な固体表面上に発生する。これらは、生理的な不快感のみならず、金属部材の腐食や生産性の低下、製品汚染、悪臭や感染症の原因等、経済や衛生面において多大な実害を引き起こしている。例えば、BFの関与する金属腐食における経済損失は米国において年間約1.1兆ドルとの試算もあり、様々な分野において重要な課題と認識されている(2016, NACE International Institute データ)。

BFは、浮遊状態の細菌と比較して、殺菌剤等の薬剤や、物理的な洗浄が作用し難い状態のため、防除が困難であり、根本的な解決手段に乏しい。薬剤を用いる場合、従来の対策としては、「殺菌剤による菌の殺滅」や、「洗浄による剥離、除去」が挙げられる²⁾。しかしながら、これらが決定打となり得ていないのは明らかであり、とりわけ殺菌剤の使用に制限がある場合や、物理的な洗浄の行き届きにくい場合においては、BFの問題はより顕著に発生する。

一方で、BF対策の新たな方法として期待されているのが、「BFの形成そのものを抑制すること」である。近年の研究によって、BFの形成は、細菌間で行わ

れる化学物質のやり取り、すなわちクオラムセンシング(QS)と呼ばれるシグナル伝達によって誘導されることが明らかになってきており³⁾、QSを様々な方法で、阻害、攪乱することでBFの形成そのものを生理的に抑制するという試みが盛んに行われるようになってきている⁴⁾⁵⁾。

これまでに知られているQSを阻害する物質は、コストや安定性の面で利用の難しい生体物質や大量生産が難しい合成化合物が多く、ほとんどが実用化に至っていないのが現状である。しかしながら、当社では有効物質のスクリーニングを含めた基礎的な段階から開発を進め、QS阻害技術をいち早く実用レベルに高めた新しいタイプの薬剤(バイオフィルムコントロール剤:BFC剤)を上市させるに至った。本稿では、BFC剤の概要を紹介するとともに、様々な用途における実証事例を報告する。

2. バイオフィルムコントロール剤の概要

2-1. BFC剤の概要、特長

BFC剤は、殺菌効果に依存する従来の薬剤とは異なり、細菌の生理機能に作用することでBFの形成そのものを抑制する機能を有している。これは、QSシグナル物質の産生阻害によってBF形成を抑制する作用であり、従来の殺菌剤の課題を解消しつつBFの堆積を抑制することが可能である。QSとは、細菌間のシグナル伝達を介した生理機能で、BF形成菌が一定の密度に達すると、QSシグナル物質の濃度が閾値に達し、それが引き金となって、BFの形成が促進される。すなわち、BFC剤を使用することで、

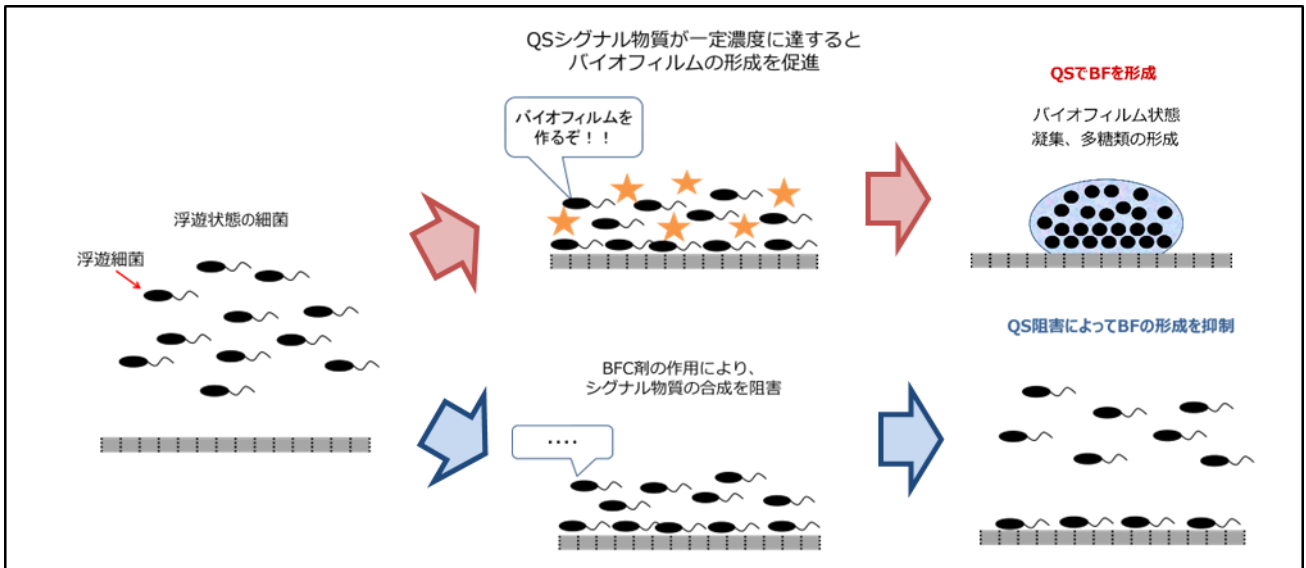


図 1. QS を介する BF 形成、および抑制機構(上段:無処理、下段:BFC 剤処理)

系に存在する細菌は、通常ではBFを形成するような環境においてもBF形成を促進せず、分散状態を維持するため、水流によって容易に排出されることになる(図1)。

このような設計のもとに開発したBFC剤の概要を表1に示す。BR-109は、QSを阻害する成分のみを有する製品で、界面活性剤の使用が忌避される用途や、種々の既存薬剤との併用、混合での使用を想定している。BR-110は、BFへの浸透性、剥離効果の高い界面活性剤を配合しており、BFの形成抑制と、除去効果を複合した設計となっている。いずれも既存の殺菌剤類と比較して、人体への安全性が高く、非酸化性成分のため部材を損傷させない、広範囲のpHで効果を発揮するなどの特長が挙げられる。

BFを形成することが知られている。この細菌は、QSが活性化されBFの形成が進行すると、緑色色素であるピオシアニンを分泌する性質がある⁶⁾。そのため、QSの阻害効果とBFの形成状態をモニタリングすることが可能であり、BF評価菌種として広く用いられている(図2)。液中に分泌されたピオシアニン濃度は、クロロホルムで抽出し、520nmの吸光度を測定することで定量化することができる(図3)。本検討ではピオシアニン生産率を細胞密度当たりのピオシアニン濃度として算出し、QSの阻害効果を評価した。表2のように、BFC剤処理によってピオシアニンの生産率が大幅に減少していることから、QSを阻害していることが確認できる。また、濁度(OD₆₃₀)として示される培養液の細胞密度はほとんど低下していないことから、BF形成抑制効果は、静菌や殺菌効果ではなく

表 1. BFC 剤の概要

品名	有効成分	効果
BR-109	芳香族窒素化合物 芳香族アルコール	BF 抑制
BR-110	芳香族窒素化合物 芳香族アルコール 界面活性剤	BF 抑制 BF 除去

2-2. BFC 剤の QS 阻害効果

BF 形成菌の一種である緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) は、様々な環境に出現し、除去困難な

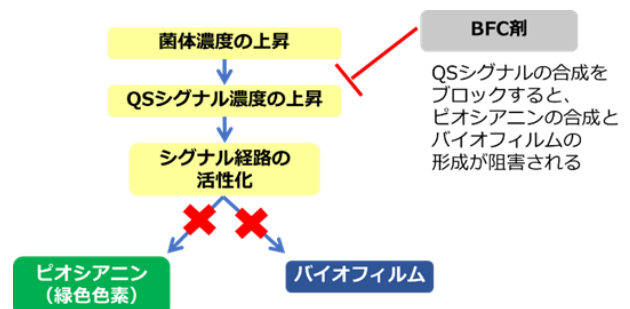


図 2. 緑膿菌のクオラムセンシング

QS の阻害による生理状態の変化に依存していることを示している。

表 2. ピオシアニン産生率

	無処理	BFC 剤
ピオシアニン産生率*	100 %	1.2 %
濁度 (OD ₆₃₀)	1.8	1.6

*無処理の濃度を 100 %とした相対値



図 3. ピオシアニン量の比較

2-3. バイオフィームの形成抑制、および除去試験

ポリスチレン製マルチウェルプレートを用いた BFC 剤の BF 形成抑制、および除去効果の評価結果を表 3 に示す。BF 抑制効果は、12 ウェルプレートを用いて、BR-110 を添加した培地で緑膿菌を培養し、器壁に形成した BF 量を無添加の系列と比較した(表 3-1)。BF 除去効果は、予め BF を器壁に形成させ、BR-110 を添加し、BF を剥離させた後に、器壁に残存する BF 量を無添加の系列と比較した(表 3-2)。い

ずれの評価においても、マイクロプレートの器壁に形成した BF は、クリスタルバイオレットで染色し、エタノールで溶出した液の 595 nm の吸光度を測定し、BF 形成率、残存率として算出した。その結果、BFC 剤を添加することで、BF の形成率は 12 %を示し(BF 形成抑制率は 88 %)、BF 残存率は 23 % (BF 除去率は 77 %)を示した。培養液の濁度 (OD₆₃₀)として測定される浮遊細菌の密度は、BR-110 の添加、無添加の系列でほとんど差異がないことから、BR-110 の作用は菌の増殖抑制や、殺菌性に依存しないことを示している。従って、BR-110 は予め添加しておくことで BF 形成を抑制することができるだけでなく、既に形成された BF を除去する効果も見込める。

また、BFC 剤による BF 抑制効果は、複数の主要

表 3-1. BF 抑制試験

	無添加	BR-110 (0.35 %)
BF 形成量 (吸光度 595 nm)	5.9	0.7
BF 形成率	100 %	12 %
濁度 (OD ₆₃₀)	1.7	1.5

表 3-2. BF 除去試験

	無添加	BR-110 (0.35 %)
BF 残存量 (吸光度 595 nm)	6.9	1.6
BF 残存率	100 %	23 %

表 4. BFC 剤による BF 抑制効果が確認された菌種

菌属種	上位分類(門)	グラム染色	主な分布場所
<i>Brevundimonas diminuta</i>	Alpha proteobacteria	陰性	水系全般、土壌、臨床
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Gamma proteobacteria	陰性	水系全般、土壌、臨床
<i>Klebsiella sp</i>	Gamma proteobacteria	陰性	水系全般、臨床
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gamma proteobacteria	陰性	水系全般、土壌、臨床
<i>Shewanella algae</i>	Gamma proteobacteria	陰性	海洋、臨床
<i>Vibrio harveyi</i>	Gamma proteobacteria	陰性	海洋、臨床
<i>Chryseobacterium sp</i>	Bacteroidetes	陰性	水系全般、土壌、臨床
<i>Microbacterium hominis</i>	Actinobacteria	陽性	臨床
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Firmicutes	陽性	臨床

な菌種に対しても有効であることを確認している(表4)。これは、多様な菌種に対して横断的な QS 阻害作用を有していると考えられ、広範な分野で BFC 剤を有効に活用できる可能性を示唆している。

2-4. 共焦点顕微鏡による BF 抑制効果の可視化

BF 抑制効果を可視化するため、共焦点顕微鏡を用いた観察を行った(図4)。BF を形成させる部材として RO 膜を用いた。BFC 剤に一定時間浸漬し、有効成分を膜表面に吸着させる処理を行った後、BF の形成状態を経時的に共焦点顕微鏡で観察した。RO 膜表面の緑膿菌は緑色蛍光で示されており、無処理の系列では 17 時間の経過で BF が大幅に肥厚化していることがわかる。一方で、BFC 剤を処理した系列については、膜表面への付着量は増加しているものの、高さ方向への成長が大幅に抑制されている。これは QS の阻害により、BF の構成成分である細胞外多糖類の合成が減少しているためと推測される。両系列を比較すると、BFC 剤処理によって約 90 % の BF 抑制効果が認められた。

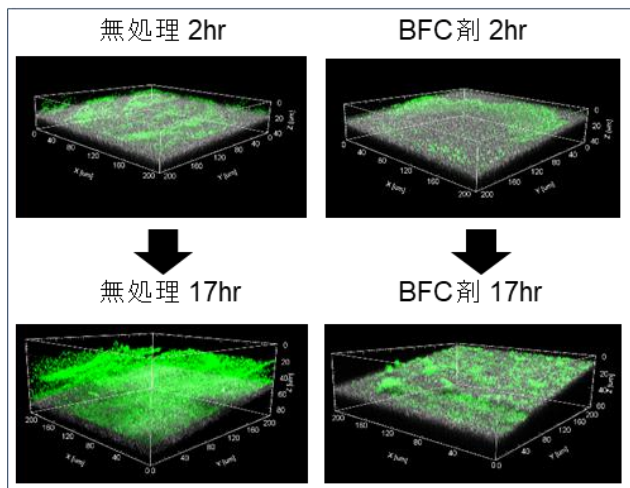


図4. RO 膜に形成した BF の共焦点顕微鏡観察

3. RO 膜に発生する BF の抑制

RO 膜は工業的に使用される高純度の水の精製や、海水の淡水化、排水リサイクルなどの造水装置に利用されており、水資源確保のための世界的に重要な技術的要素である。一方で、ろ過膜表面に BF

が形成され、処理効率が悪化する現象(バイオフィームリング)に対する解決手段に乏しいことが主要な課題として挙げられる。例えば、一般的によく利用される殺菌剤の次亜塩素酸塩は、RO 膜や部材の劣化を引き起こすことから通常の RO 膜には使用できず、有機系殺菌剤類は総じて安全性の低さが懸念される。これらに対し、BFC 剤は部材への影響や安全面の課題をクリアしつつ BF の形成を抑制することが可能である。

本検討では、BF 形成によって短期間で膜の閉塞が生じる実機 RO 膜装置で BFC 剤の効果 (RO 膜の閉塞抑制) を検証した。RO 膜の入口圧力の上昇を膜閉塞の指標とし、定期的な BFC 剤処理を行い、RO 入口圧力が閉塞の管理値である 0.8 MPa 以上になるまでの挙動を追跡した(図5)。造水運転は、スパイラル型 RO 膜を用いて、供給水は地下水を使用した(表5)。BF 形成抑制効果を高めるために、前処理として、使用前の RO 膜に BR-110 を 3.5 % 濃度で通液後、3 時間静置して膜面に有効成分を吸着さ

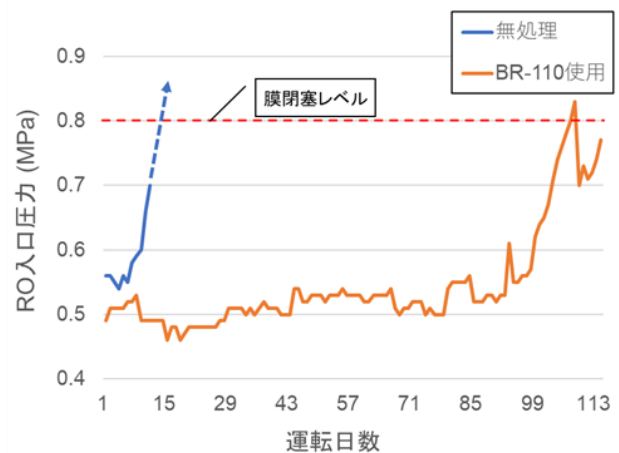


図5. RO 膜装置における BF 抑制試験

表5. BFC 剤を使用した RO 膜装置の運転条件

供給水	地下水
流量	(給水)9300 L/hr、(処理水)6000 L/hr
BFC 剤処理	(前処理) 未使用 RO 膜に BR-110、3.5%液を 3 時間接触 (定期処理) BR-110、0.35%液を週 1 回通液、1 時間の浸漬

せてから造水運転を開始した。運転開始後は、週 1 回の頻度で造水運転を停止し、0.35 %濃度で BR-110 を RO 膜に通液し 1 時間静置する定期処理を継続した。結果として、BR-110 を使用することによって無処理の運転に対して、膜閉塞に至るまでの期間が約 7 倍に延長された。

本検討の結果から、BFC 剤は実機 RO 膜装置の膜の閉塞を抑えることが可能であることが示された。とりわけ薬注工程を自動化することで、大幅なメンテナンスコストの削減および効率化が期待できる。

4. 薬剤ストックタンクに発生する BF の抑制

工業的に使用される薬剤の希釈タンクは、内部に BF が発生することで様々な問題を生じることがある。これらには、反応性のある酸化系の殺菌剤はもちろんのこと、安全性の観点から有機系の殺菌剤の使用量が限られることもあり、対策手段に乏しい。例えば、切削油やダイカスト離型剤については、滞留時間に応じて希釈タンク内に BF が発生し、薬剤性能の劣化やリサイクル性の低下、臭気の発生、流路の閉塞等が進行し、トータルコストの悪化を引き起こすことが知られている。

本検討では、事前に有機系殺菌剤が 20 ppm 添加されている水系エマルジョンのタンクに対し、BR-109 を 100 ppm になるように併用し、BF の形成抑制効果を評価した。結果として、有機系殺菌剤のみ含有するタンクについては、2 週間で内壁全体に目視できる BF が形成されたのに対し、BR-109 を併用した系列については 3 週間で降も清浄な状態を維持することができた(図 6)。一般的に殺菌剤類は浮遊細菌に対しては比較的低濃度でも殺菌効果を発揮するが、BF の形成が進行すると効果が大幅に低下することが知られている。本検討では、BR-109 がタンク内の菌の BF 形成を抑制しつつ、殺菌剤が浮遊細菌に対して本来の殺菌効果を発揮したため、良好な併用効果が認められたと考えられる。本検討の結果は、種々の薬剤タンクにおけるトラブルの低減に加え、殺菌剤類の減量など、環境や安全性に配慮した応用

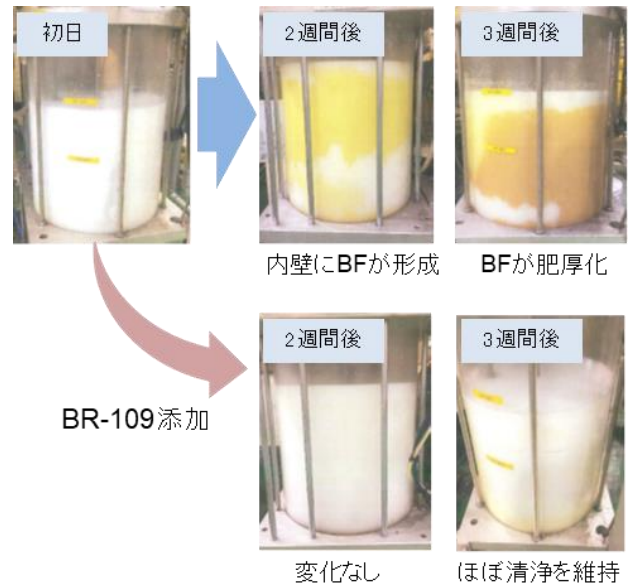


図 6. 水系エマルジョンタンクの BF 抑制

の可能性を示すものと言える。

5. BFC 剤のコーティング用途への応用

近年、抗菌製品技術協議会では、抗菌、防カビ、抗ウイルスに続く新たな認証制度として、抗バイオフィームへの取り組みを進めている⁷⁾。抗バイオフィーム性能を有する素材や、同様の性能を長期的に付与するコーティング剤に対する需要は大きく、例えば空調機内部や、ハウスホールドの水回りの部材など、装置の性能や衛生面に影響し、日々の洗浄等が行き届きにくい用途についても、BFC 剤の適用を目指し、検討を進めている。

図 7 は、BR-109 を配合したコーティング剤を塗布したテストピースを用いた BF 形成抑制試験である。テストピースを菌液に接触させ BF を形成させた後、

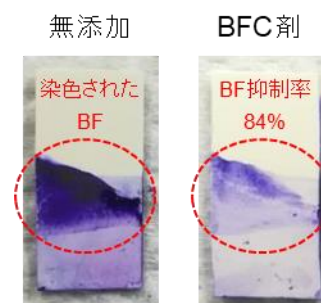


図 7. BFC 剤塗布テストピースの BF 抑制効果

クリスタルバイオレットで染色、定量化した。BFC 剤コーティングを行ったテストピースは、無処理の系列と比較して、84 %もの BF 形成抑制効果が認められた。コーティング剤としての応用は、液剤としての使用と比較して、対象の部材表面に有効成分を局在させることができるため、少ない使用量で効果を発現しうることが利点として挙げられる。一方で、効果の持続性が求められるため、引き続き、実証試験等を通じた性能評価や改良にも注力したい。

6. 終わりに

本稿では、殺菌剤とは異なる新しいメカニズムで BF の発生を抑制する BFC 剤の概要、および適用事例を紹介した。BFC 剤のニーズは多岐にわたり、本稿で紹介した造水膜や薬剤のストックタンク、コーティング剤の他、冷却塔や、医療機器の洗浄など、様々な用途に向けた検討も行っている。BF に起因するトラブルは、使用する水質が悪い場合や、管理が行き届いていない環境で著しく増加するため、国内と比べ、海外の市場規模は大きく、成長性も大いに期待することができる。引き続き、様々な課題を顧客と共有し、将来的には水資源やエネルギー、衛生における問題の有効な改善策として広く BFC 剤を提案していきたい。

<参考文献>

- 1) 岡部聡: バイオフィームの理解・制御から共存へ、日本海水学会誌、第 66 巻、第 4 号、p191~197、(2012)。
- 2) K.Sauer: バイオフィームを退治する、日経サイエンス、3 月号、p68~73、(2018)
- 3) M. Juhas, L. Eberli, B. Tummli : Quorum sensing: the power of cooperation in the world of Pseudomonas. *Appl. Env. Microbiol.*, 7, 4, 459~471, (2005)。
- 4) 寺田昭彦、高橋恵理加、片山美伶、細見正明: 水・排水処理分野におけるバイオフィームの形成を抑制する材料の進展、環境バイオテクノロジー学会誌、第 14 巻、第 2 号、131~137、(2015)。
- 5) 池田宰、諸星知宏: Quorum Sensing 制御に基づくバイオフィーム形成抑制、環境バイオテクノロジー学会誌、第 10 巻、第 1 号、15~18、(2010)。
- 6) Y Dessaux, E Chappelle, D Faure : Quorum Sensing and Quorum Quenching in Soil Ecosystems. *Biocommunication in Soil Microorganisms*, p339~367、(2011)。
- 7) 中津川直樹: 抗バイオフィーム加工製品の認証制度構築に向けて、表面技術、第 72 巻、5 号(2021)。

研究者プロフィール



星光 PMC 株式会社
製紙用薬品事業部
技術統括部
市原研究所
課長 五十嵐 亮二
(Ryoji Igarashi)



星光 PMC 株式会社
製紙用薬品事業部
技術統括部
市原研究所
主任 久保 武
(Takeshi Kubo)