

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 30 日現在

機関番号：54101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24560914

研究課題名(和文)鉄鋼材料表面におけるバイオフィーム易形成機構の解明

研究課題名(英文)Study for mechanism of biofilm formation on carbon steel surfaces

研究代表者

生貝 初(Ikigai, Hajime)

鈴鹿工業高等専門学校・その他部局等・教授

研究者番号：60184389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：炭素鋼表面での緑膿菌のバイオフィーム(BF)形成と微生物腐食(MIC)の機構を研究した。BFが形成されやすい炭素鋼表面をリン酸亜鉛処理し鉄イオンの溶出を阻害すると、その表面にBFが形成されなかった。また培養液に硫酸鉄を加えてもこの炭素鋼表面にBFは形成されなかった。これらは炭素鋼表面から溶出した鉄イオンが緑膿菌のBF形成に必要であることを示している。緑膿菌培養液に30日間浸漬した炭素鋼を放射光でコンピュータ断層撮影し画像を3Dに再構成したところ、最表面にBF様構造物の形成、その直下の炭素鋼にMICが認められた。MICはBFの凹凸構造によって形成された酸素濃淡電池が原因である可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to clarify the mechanisms of how *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (PA01) induces biofilm formation and microbiologically influenced corrosion (MIC) on the surface of carbon steels. PA01 biofilm was not formed on a surface of carbon steel which was treated to inhibit elution of ferrous ions by zinc phosphate coating, even if iron sulfate () was included in the PA01 culture. Thus, these data imply that ferrous ions eluted from the carbon steel are required for formation of PA01 biofilm. In 3D-reconstruction of X-ray computed tomography images of the carbon steel after an incubation period 30 days with PA01, it is clearly shown that MIC is caused directly under biofilm. We speculate that MIC might be caused by oxygen concentration cells which were formed by the uneven surface structure of biofilm.

研究分野：微生物学

キーワード：緑膿菌 バイオフィーム 鉄イオン 鉄鋼材料 炭素鋼 微生物腐食 3D可視化 オートインデューサ

1. 研究開始当初の背景

水環境中に生息する浮遊細菌は、葦や水草、木などの水生植物以外に、水中に埋没している金属やコンクリートでできた構造物表面に吸着するとバイオフィーム (BF) と呼ばれるぬめりのある薄膜状の細菌集合体を形成する。このぬめり成分は細菌が分泌した多糖やタンパク質、DNA などの細胞外重合物質 (EPS) である。BF は構造物の汚染や性能低下、腐食を引き起こし、時に人に健康被害をもたらすこともある。BF による経済的損失や健康被害をなくすために、早急に金属材料表面における BF の形成機構の解明と BF の形成を阻害する方法を見つける必要がある。

本研究で用いる緑膿菌 PAO1 (以下 PAO1) は、種々の金属に比べて一般構造用圧延鋼材である炭素鋼 (SS400) に BF を形成しやすい性質を持っている。研究代表者はこの PAO1 の炭素鋼に対する BF の易形成機構とそれに続いて起きる微生物腐食 (MIC) を詳細に調べる計画を立てた。

2. 研究の目的

(1) 炭素鋼表面に PAO1 の BF が形成する機構の解明を本研究の目的とした。

(2) BF を形成させない金属材料の加工法や BF 形成阻害法の開発につながる成果を得ることも同時に目指した。

(3) SPring-8 の放射光を用いて BF が形成された炭素鋼をコンピュータ断層撮影 (CT) し、画像データから 3D に再構成し炭素鋼表面の MIC を解析した。

3. 研究の方法

(1) 金属試験片の作製

表面を鏡面加工した炭素鋼 SS400 やステンレス鋼 SUS304 等の金属試験片を 0.5x0.6x10mm のサイズに切断した。また、0.5xφ

10mm の円形に加工した SS400 の表面をリン酸亜鉛処理した試験片も作製した。

(2) BF の形成

PAO1 を普通ブイヨン (以下 NB) で前培養後、菌数が約 10^3 個/ml になるように増殖培地 (NB あるいは M9 最少培地 (以下 M9)) に接種・調製した菌液を V 底 96 穴マイクロプレート (ポリスチレン製) のウェル中に 100 μ l あるいは中試験管に 3ml ずつ分注し、指示された時間、35°C で好氣的に静置培養した。

(3) BF の定量評価

V 底 96 穴マイクロプレートのウェル内で PAO1 を培養後、0.1% クリスタルバイオレット (CV) 液を加えて BF を染色した。非特異的に結合している CV を洗浄除去し、99% エタノールで BF から CV を抽出した。マイクロプレートリーダー (570nm) で測定した抽出液の吸収を BF 量として評価した。

(4) 菌数測定

PAO1 の菌数は、コロニー形成法で測定した。

(5) 放射光を用いた試験片の MIC の解析

PAO1 の培養液に浸漬した SS400 や SUS304 の表面を超臨界二酸化炭素法によって乾燥させ、SPring-8 のビームライン (BL20XU) の回転ステージに試験片を設置し CT 写真を撮像した。約 2,000 枚の写真をもとに金属試験片を 3D に再構成した。

4. 研究成果

(1) BF の成長を高める鉄イオンの作用

PAO1 の BF の成長に及ぼす金属イオンの作用を明らかにするために、各種金属塩を添加した NB 中の PAO1 の BF 形成能を調べた。硫酸鉄 (II) あるいは硫酸鉄 (III) を添加した NB で培養した PAO1 はいずれも BF 形成量

が増加した(図1)。しかしながら、培養液中のPAO1は添加した金属塩の種類や濃度による影響は受けず、すべて約 10^9 個/mlの菌数を維持し増殖していた。これらの結果はBFの形成や成長に鉄イオンが作用していることを示している。

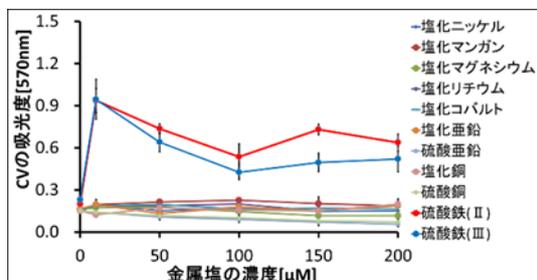


図1. 各種金属イオン存在下でのPAO1のBF形成について BFは96穴マイクロプレートのウェル内壁面に形成されたものをCVで染色後、エタノールで溶出されたCVを570nmの吸光度で定量したものをBF形成量として評価した。

NBは動植物由来の抽出物を成分とし、元々鉄が含まれている。そこで鉄の含量を原子吸光分析によって調べたところ、本実験で調製したNBの中にすでに約 $7\mu\text{M}$ の鉄が含まれていた。PAO1が増殖可能で鉄を含まない人工培地を調べ、M9がPAO1の増殖性も良くBFの形成量も多いことがわかったので、以後これを使用した。

M9に硫酸鉄を添加し、BFの形成に対する鉄イオンの作用を検討した。NBで行った実験結果と同様に鉄イオンがM9に存在するとBFの形成は高まった(図2)。しかしながら、NBよりもM9を用いる方が鉄イオンによるBF形成の増強作用が $50\mu\text{M}$ を最大とする一過性の反応であることがわかった。

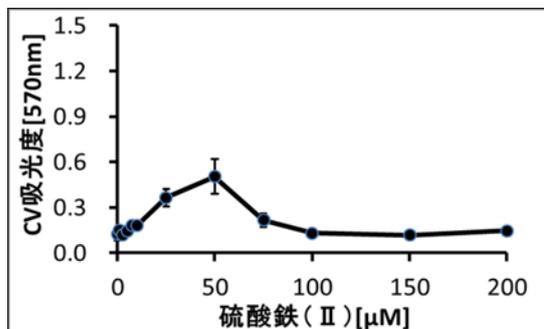


図2. M9中に形成されたPAO1のBF

次に炭素鋼表面のPAO1のBF形成においてM9中に鉄イオンが含まれているとどのよ

うな影響があるか調べた。24穴マイクロプレートウェルにPAO1を接種した硫酸鉄添加M9に炭素鋼SS400、ステンレス鋼SUS304、Snの試験片をそれぞれ浸漬し、48時間後に各試験片表面に形成されたPAO1のBFを定量した。SS400は硫酸鉄を添加しなくても大量のBFが形成されたが、SUS304とSnは硫酸鉄を加えてもBFは形成されなかった(図3)。さらに硫酸鉄を $50\mu\text{M}$ 添加した培地に炭素鋼を浸漬すると約1.5倍もBFの形成量が増加した。一方、SUS304やSnの表面にはBFは形成されなかった。これらの結果は、SS400から溶出した鉄イオンがBFの形成を高めるために使われていることを示唆している。

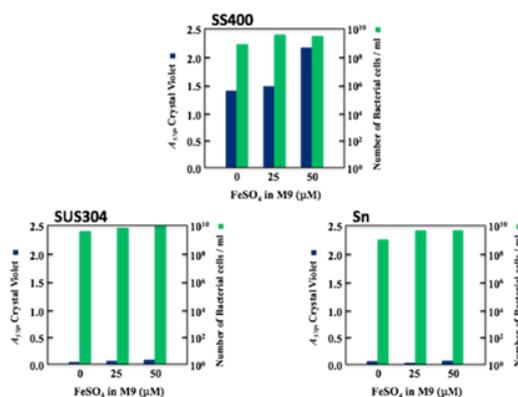


図3. M9に浸漬したSS400、SUS304、Snの表面に形成されたBFの鉄依存性 青のバーはBF、緑のバーは菌数をそれぞれ示した。

(2) 炭素鋼の鉄イオン溶出を阻害する表面処理とBF形成との関係

炭素鋼SS400の表面は、ステンレス鋼SUS304やガラスに比べてコンディショニングフィルムが形成されやすい性質があるかどうか調べた。アルコール消毒した各試験片を0.4%のグルコースを含むM9に24時間浸漬し、液中に蛍光顕微鏡の対物レンズを浸けて各試験片表面の形態を観察した。その結果、SS400表面のみに不溶性の沈殿物が形成され、SUS304とガラスの表面は平滑のまま沈殿物は形成されなかった。

次にPAO1を接種した0.4%グルコース添加M9の中にこれらの試験片を浸漬し1日お

よび2日それぞれ培養後、水中で各試験片の表面構造を直接調べた。SS400のみPAO1のBFと思われる構造物が観察された。これらの結果は、BF形成の初期過程で炭素鋼の表面にコンディショニングフィルムが形成されやすいことを示している。

さらにSS400の表面をリン酸亜鉛で防錆処理しPAO1のBF形成を調べた。その結果、培地中に $10^7 \sim 10^9$ 個/mlの大量のPAO1が増殖しているにも係わらず、リン酸亜鉛処理したSS400の表面にはBFが形成されないことがわかった(図5B、青バー)。さらにPAO1のBFがSS400表面に形成されるためにはグルコースが必要であることもわかった(図5A、青バー)。

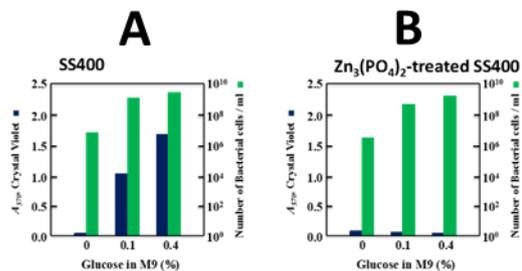


図5. BF形成におけるM9に含まれるグルコースと炭素鋼表面の防錆処理の影響 A, 表面未処理SS400; B, リン酸亜鉛処理したSS400

以上の結果からPAO1はBFの形成に際し、SS400表面から溶出した鉄イオンを利用しているように思われた。したがって、鉄構造物表面のBF形成を阻害するために、構造物から鉄イオンの溶出を阻止する方法が有効であると考えられた。

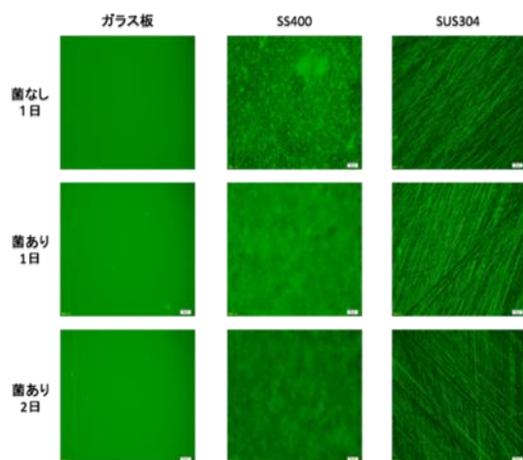


図4. PAO1培養液に浸漬したSS400, SUS304, ガラス板表面の液中観察

(3) PAO1の運動性に対する鉄イオンの作用

鉄イオンがPAO1のBF形成を高める作用があることはSingh等によって2004年に報告されていた(1)。彼らはこのBF形成量の増加はPAO1の運動性を鉄イオンが阻害するためであると推測した。ところがSingh等は実験によって鉄イオンによるPAO1の運動性阻害を確認していなかった。そこで研究代表者は硫酸鉄を添加した0.6%グルコース添加M9(1%)を作製し、寒天培地上でのコロニーの広がり方を検証した(図6)。その結果、PAO1の運動性は鉄濃度の増加と共に高まり、鉄イオンはPAO1の運動性を阻害しないことがわかった。

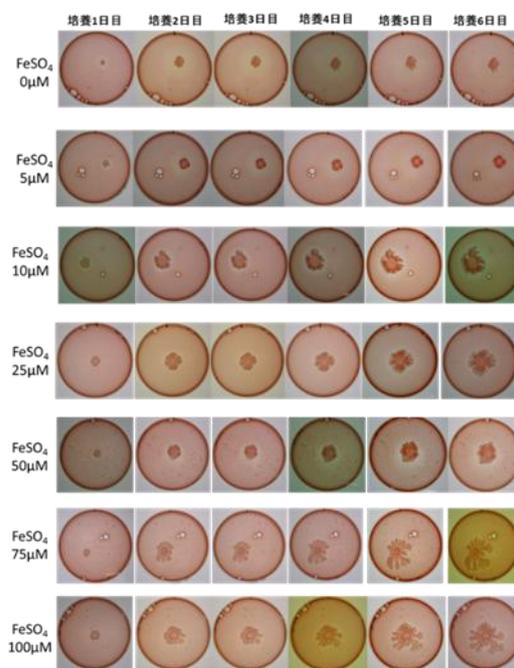


図6. 硫酸鉄を添加したM9寒天培地上で培養した緑膿菌PAO1の運動性 運動性によって広がったコロニーを観察するために、0.01%のコンゴレッドと5~100μMのFeSO₄を0.6%グルコース添加M9寒天培地(1%)に添加し、35°Cで指示された時間好氣的に培養した。

(4) 炭素鋼表面で生じたMICの3D可視化

当初、PAO1に対する多価抗体に金コロイドを標識したものを試験片に結合させてX線CT実験を行っていたが、X線吸収係数が大きい金コロイドの結合の有無に係わらずBF様構造体が炭素鋼SS400表面に観察できることがわかった。そこで金コロイド標識抗体を使わずそのまま観察した。図7は、SS400

を M9 に 30 日間浸漬し、試験片の X 線 CT 後 3D に再構成したものである。PAO1 の培養液に炭素鋼を浸漬すると炭素鋼表面を被う凹凸状の構造物が形成された (図 7C、赤色で塗抹した部分)。しかしながら、M9 のみに浸漬した SS400 は対照 (図 7A) と同様に表面に形態変化は認められず平滑であった (図 7B)。一方、ステンレス鋼 SUS304 の表面は、SS400 と同様に PAO1 培養液に 30 日間浸漬しても変化はなかった。

さらに画像処理によって図 7C の表面を被う構造体を除去し SS400 基板の最表面を露出させると MIC と思われる線状の窪みが表面全体に形成されていた (図 7D)。興味深いことに線状の窪み (図 7F の白線) は図 7E の白線で示された凹部分に沿って形成されているように見えることであった。また培養液中に約 10^9 個/ml の PAO1 が生存しているにもかかわらず、BF 様構造体が形成されている SS400 表面において PAO1 は SEM による観察でも認められなかった。

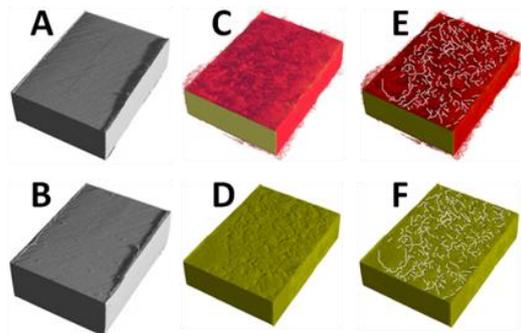


図7. SPring-8の放射光によるMICの3次元解析 A, 未処理のSS400; B, M9に30日間浸漬したSS400; C, 表面にBFが形成されたSS400; D, 画像処理によってBFを取り去ったSS400; E, Cの試験片表面のBFの凹部分に沿って白線を引いた3D画像; F, Eの試験片に引いた白線をDの画像に重ね合わせた画像。

(5) クオラムセンシングを制御する auto inducer の産生に対する鉄の作用

鉄イオンがクオラムセンシング (QS) を制御する auto inducer (AI) の産生に影響しているかどうか調べた。多くのグラム陰性菌に働く AI は N-アシル-L-ホモセリンラクトン (AHL) 類である。そこで硫酸鉄を含む PAO1 培養液から N-butyryl-L-homoserine

lactone (C4-HSL) と N-dodecanoyl-L-homoserine lactone (C12-HSL) の検出を試みた。鉄非存在下であっても C4-HSL と C12-HSL は菌数が約 $10^8 \sim 10^9$ 個/ml に達していたため、QS が働くように既に AI は産生されていた。硫酸鉄を $75 \mu\text{M}$ まで添加してもこれらの AHL の産生量は変わらなかった。しかしながら、硫酸鉄を $100 \mu\text{M}$ 添加すると、C4-HSL の産生が減少した。一方、C12-HSL の産生量は変化しなかった。鉄イオンは BF の形成を高める作用があるが、添加量が約 $50 \mu\text{M}$ 以上になると逆に BF の形成を減少させる傾向があった。

(6) 炭素鋼の MIC の機構

これまで BF による MIC の発生機構として、酸素が透過しにくい凸部分の直下の金属面を陽極、酸素が透過しやすい凹部分直下の金属面を陰極とし、これら間で形成された酸素濃淡電池の陽極から金属イオンが溶出し腐食が起きると考えられてきた (図 8A、Ref. 2)。しかしながら、図 7 で示した実験結果は凹部分の付近で酸素濃淡電池が形成され腐食が進行していく可能性があることを示唆していた (図 8B)。

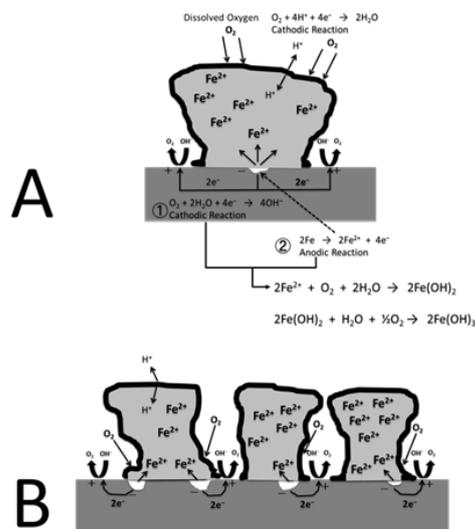


図8. BFによって形成された酸素濃淡電池が引き起こすMICの機構 A, Hamiltonによって提案されたMICモデル (2); B, X線断層撮影の3D解析をもとに提案されたMICモデル。

また図 7C の試験片の表面についてのエネルギー分散型 X 線分析や結晶化部分の X 線回

折を行ったところ、培地由来のリン酸イオンと炭素鋼 SS400 から溶出した鉄イオンの化合物が生成されていることがわかった。おそらくこの化合物が BF 内部全体に形成され、X 線吸収係数が大きくなり、X 線 CT によって BF 様構造体の画像が撮影されたのではないかと考えられた。

<引用文献>

① Singh, PK, Iron sequestration by human lactoferrin stimulates *P. aeruginosa* surface motility and blocks biofilm formation, *BioMetals*, 17, 2004, 267-270

② Hamilton, WA, *Microbial Biofilms. Biofilms and microbially influenced corrosion. in Microbial biofilms.* eds. Lappin-Scott, HM, J.W. Costerton, JW, Cambridge University Press, Cambridge, 1995, 171-182

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

① 生貝 初 (単著)、緑膿菌バイオフィルムを用いた微生物腐食モデル、*Bacterial Adherence & Biofilm*、査読有、Vol.27、2013、pp.5-9
ISSN : 1348-6071

② 生貝 初、小林正和、飯村兼一、細川明秀、上杉健太郎、黒田大介、兼松秀行、戸田裕之 (1 番目)、放射光による炭素鋼表面に形成されたバイオフィルムと微生物腐食の 3D 可視化、*Bacterial Adherence & Biofilm*、査読有、Vol.28、2014、pp.67-70
ISSN : 1348-6071

[学会発表] (計 12 件)

① 神崎拓也、生貝 初、緑膿菌のバイオフィルム形成における金属の作用、第 86 回日本細菌学会、平成 25 年 3 月 18~20 日、幕張メッセ (千葉)

② 生貝 初、他 1 名、緑膿菌バイオフィルムの形成制御、日本防菌防黴学会 第 40 回年次大会、平成 25 年 9 月 10 日、千里ライフセンター (豊中)

③ 生貝 初、他 2 名、鉄鋼材料表面における緑膿菌のバイオフィルム形成とその制御、日本鉄鋼協会 第 166 回秋季講演大会 微生物が促進する鉄鋼材料の腐食自主フォーラム「微生物が促進する鉄鋼材料の腐食」、平成 25 年 9 月 18 日、金沢大学 (金沢)

④ 生貝 初、他 7 名、鉄鋼材料表面に形成されたバイオフィルムと微生物腐食の 3D 可視化、日本防菌防黴学会 第 41 回年次大会、平成 26 年 9 月 24 日、きゅりあん (大井町)

⑤ 生貝 初、他 6 名、放射光による微生物腐食の解析、日本鉄鋼協会 第 168 回秋季講演大会 微生物が促進する鉄鋼材料の腐食自主フォーラム「微生物が促進する鉄鋼材料の腐食」、平成 26 年 9 月 25 日、名古屋大学 (名古屋)

[図書] (計 1 件)

① 兼松秀行、生貝 初、黒田大介、平井信充、米田出版、バイオフィルムとその工業利用、2015、156 頁 (9-24 頁)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

生貝 初 (IKIGAI, Hajime)

鈴鹿工業高等専門学校・生物応用化学科・教授

研究者番号 : 60184389

(2) 連携研究者

兼松秀行 (KANEMATSU, Hideyuki)

鈴鹿工業高等専門学校・材料工学科・教授

研究者番号 : 10185952