〈平成15年度〉

精密ろ過膜を自力で通り抜ける細菌活性

松　山　東　平

（新潟大学大学院医歯学総合研究科）

1. はじめに

微生物を研究対象とする場合，単独菌株の純粋培養，また，その生理状態を再現性よく一定にしやすい液体培養が，近代実験科学の主要な培養法となっている。しかし，表面環境を好む微生物本来のライフスタイルは，微生物がバラバラに浮遊している状態ではなく，様々な微生物が混合した集団定住であろう。近年この微生物特有なライフスタイルに目を向けた研究が始まっている。その一つがバイオフィルムという概念の提唱である。

微生物が固体表面などの界面で寄り添い構築した集団生息状態を，我々はバイオフィルムと呼んでいる[1)]。バイオフィルムは，生態系で生物全体や地球環境を支える貴重な存在である。産業や医療の世界で多用されている種々の人工物もバイオフィルムの落ち着き先である。それ故，生産ラインや製品の不良化，カテーテル等による院内感染を招く厄介な存在と見なされている[2)]。浮遊状態の微生物と比べバイオフィルムは，集団として抗微生物剤に強い抵抗性を示し，対処し難い汚染源とされている。バイオフィルムは液体との界面で形成されるが，その液体中に浮遊している細菌も，バイオフィルム程ではないが抗生物質処理後に生残している[3)]。菌濃度が高い状態では，菌相互のコミュニケーションが活発になりシグナル物質が産生され菌の生理状態も変化する[4)]。バイオフィルムを浸す液体中にもそのシグナル物質が放出され，浮遊菌に作用し薬剤耐性にしている可能性を考えた。それを調べるべく，上下２つのチャンバーよりなる**図１**の装置を用意した。上部チャンバーの底部は，孔径0.45μmのろ過膜よりなり，２つのチャンバー間で溶液や溶質の通り抜けが可能である。細菌は通過不能でバイオフィルム構成細菌の移行はないだろうと想定した。上部チャンバーに緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）を接種し側面および底面にバイオフィルムを作らせ，下部チャンバーに拡散移行しているだろうシグナル物質を検索した。しかし，予測に反し，緑膿菌自体が検出された。同じ孔径のろ過膜で，加圧によるろ過をすると菌はろ液に検出されない。したがって，この緑膿菌が，0.45μm孔径のろ過膜に捕捉されるサイズであることに間違いはない。

図１の実験では，加圧処理はしていない。また，数秒で済む加圧ろ過法とは違い，２日間培養しての結果である。この長い期間に細菌が自力で

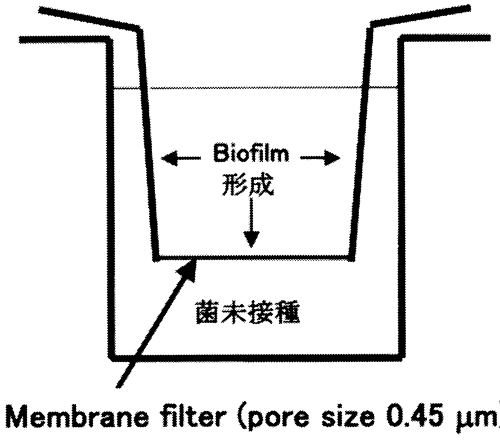

図１　ろ過膜を介した２チャンバー装置。上部に，菌を接種しバイオフィルムを形成させる。下部は，液体培地のみ，菌は接種していない。

ろ過膜をゆっくりと通り抜けた可能性を考え，以下に述べるような実験を行った。

2. 実験方法

1.5%寒天培地表面に滅菌したろ過膜を置き，その中央部に限局させ約10^8 CFU/m*l*の菌液10 μ*l*をスポット接種し培養する（**図2 A**）。時間をおいて（最低6時間ごと）ろ過膜を除去し，その後培地面のスポット直下部位に菌の生育が見られるかを調べ，菌のろ過膜通り抜け能を判定した（**図2 B**）。通り抜け時間は，最短のものをこの報告では記した。実験は最低3回行った。使用したろ過膜の無傷性は，ろ過膜メーカー（Millipore Corp.）記載のバブルポイント法および，使用済みろ過膜の加圧ろ過試験で調べた。多種の菌種，菌株を使用したがその菌種株名，また，使用したろ過膜（MF-MilliporeとADVANTEC）の孔径などは，結果のところで明記する。実験によっては，変異株を分離し使用した。その分子遺伝学的手法，および，使用培地や培養法，運動能検査法は発表済みの専門誌[5, 6]に詳記した。

走査型電子顕微鏡による観察では，試料固定は通常通り行った。有機溶媒（エタノール等）はセルロース混合エステル製ろ過膜を溶解するので使用していない。臨界点乾燥は行わず，真空乾燥処理の試料を観察した。

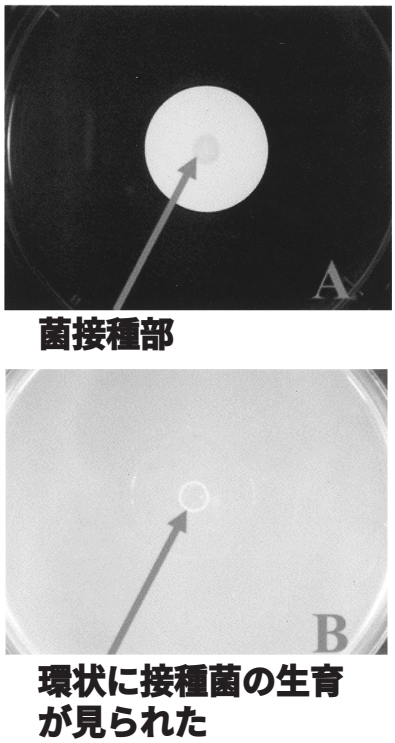

図2　細菌のろ過膜通り抜け能を調べる方法。寒天培地表面にろ過膜を置き，その上に菌液をスポットする（A）。一定時間ごとにろ過膜を除去し，残った平板を培養する。スポット直下部位だけに菌が生育してきたら（B），通り抜け陽性と判定する。陽性判定となった膜の除去までの期間を通り抜け所要時間とした。

3. 結果と考察

3.1　細菌のろ過膜通り抜け能の確認

ろ過膜を細菌が通り抜けていることを調べるのに，**図2**のような，単純な実験条件を設定した。ろ過装置といった器具類は使用していない。それ故，膜とは無関係な部位でのリークの可能性はない。

図2を見ると，菌液をスポット接種した部位に対応する培地面にだけ菌生育が認められる。但し，接種ろ過膜を数時間以上培地上に置いておかなければならない。膜の無傷性はバブルポイント法等で確認した。菌液が拡がって膜の縁から膜の下面に回り込んだ可能性や，膜にある傷を通って培地面に菌が移行した可能性は，生育菌の分布からも否定できる。培地面での菌生育がリング状なのは，ろ過膜上にスポットした半球状の菌液の辺縁部に菌が集積し，リング状に菌濃度が高くなる現象の反映と思われる。膜上面で，菌がリング上に分布していることは，膜をクリスタル・バイオレットで染める方法や走査型電子顕微鏡観察で確認してある。菌濃度が高いと通り抜けが早く見られるのでリング形成と話が合う。培地面に生育の菌が，スポットした菌と同一であり，後で混入した雑菌でないことは，接種菌株ごとに確認した。

細菌が精密ろ過膜を通り抜けていることは，間違いない事実である。但し，通り抜けには時間を

表1　各種細菌のろ過膜通り抜け活性

菌種		通り抜け最短時間（hr）				
菌株名	培養温度	孔径（MF-Millipore）			孔径（ADVANTEC）	備考
		0.45 μm	0.3 μm	0.22 μm	0.2 μm	
Pseudomonas aeruginosa						緑膿菌
PAO1 T	30℃	6	24	72	168	Twitching motility 陽性
PAO1 C	30℃	12	48	> 216	> 216	Twitching motility 陰性
ATCC 27853	30℃	10	24	72	ND	薬剤感受性試験管理用株
Serratia marcescens						霊菌（セラチア）
274	30℃	12	72	192	192	赤色色素産生ATCC由来株
NS 38	30℃	14	96	> 96	ND	色素産生臨床分離株
NS 45	30℃	24	96	ND	ND	色素非産生臨床分離株,
Listeria monocytogenes						リステリア菌
EGD	30℃	18	54	132	120	病原性解析株
CL101	30℃	30	48	132	132	臨床分離株
CL102	30℃	24	48	120	120	臨床分離株
F4	30℃	42	72	144	144	4b血清型株
Listeria innocua						リステリア属菌
93/65	30℃	18	30	96	120	非病原性
Escherichia coli						大腸菌
ATCC 25922	30℃	48	> 96	ND	ND	薬剤感受性試験管理用株
Klebsiella pneumoniae						肺炎桿菌（大型菌）
Fu1	30℃	> 96	> 96	ND	ND	莢膜あり
Fu1-m21	30℃	96	> 96	ND	ND	莢膜欠損変異株
Bacillus subtilis						枯草菌（大型桿菌）
ATCC 21331	37℃	108	ND	ND	ND	
Staphylococcus aureus						ブドウ球菌
ATCC 25923	37℃	132	ND	ND	ND	薬剤感受性試験管理用株
Brevundimonas diminuta						精密ろ過膜検定用
NBRC 14213	30℃	24	48	> 96	ND	ATCC 19146 株由来
Candida albicans						真菌（２形性発育の酵母）
NBRC 1385	37℃	72	> 96	ND	ND	コーンミール培地使用

ND, 調べていない。
> --, --時間以内に通り抜けが認められない。

要し，細菌のサイズ，ろ過膜の孔径によってその成否は変わってくる。

3. 2　ろ過膜孔径と細菌の通り抜け能

孔径0.1 μmのろ過膜を通り抜けた細菌種はなかった。通り抜け限界条件と判断した。**表1**に見られるよう，ろ過膜孔径が0.45 μmから0.2 μmへと小さくなるほど，通り抜けに時間を要している。細菌の通り抜けが細菌の能力に依存した生物学的現象であることを示唆している。ろ過膜の厚さは，150 μmほどあり，細隙が連なったその断面（**図3**）を見ると，この道のりをサイズ１ μm程の細菌が自力で通り抜けるのには，相応の時間を要すると思われる。

3. 3　細菌がろ過膜通り抜けている実像

桿菌の標準的な大きさは，長軸の長さが1.0－3.0 μmほど，横幅が0.5－1.0 μmほどである。**表1**に示した菌種もこの範囲内である。球菌なら直径１μmほどである。それなら，0.45－0.2 μmと表示されているろ過膜をこれらの菌がなぜ通り抜けられるのであろうか。この疑問は，走査型電子顕微鏡でろ過膜とそれを通り抜けつつある細菌（**図**

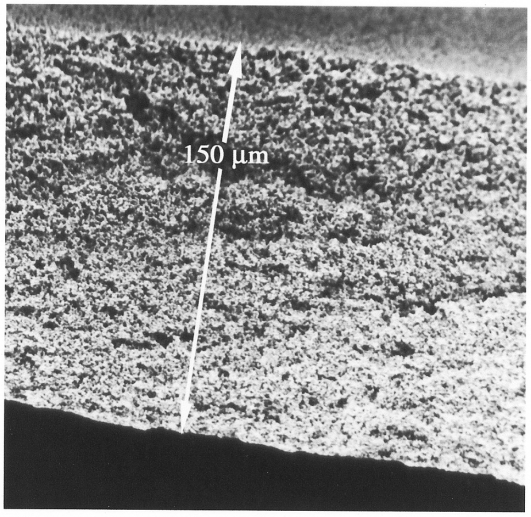

図3　孔径0.3 μm厚さ150 μmのMF-Milliporeろ過膜断面, 走査型電子顕微鏡写真。

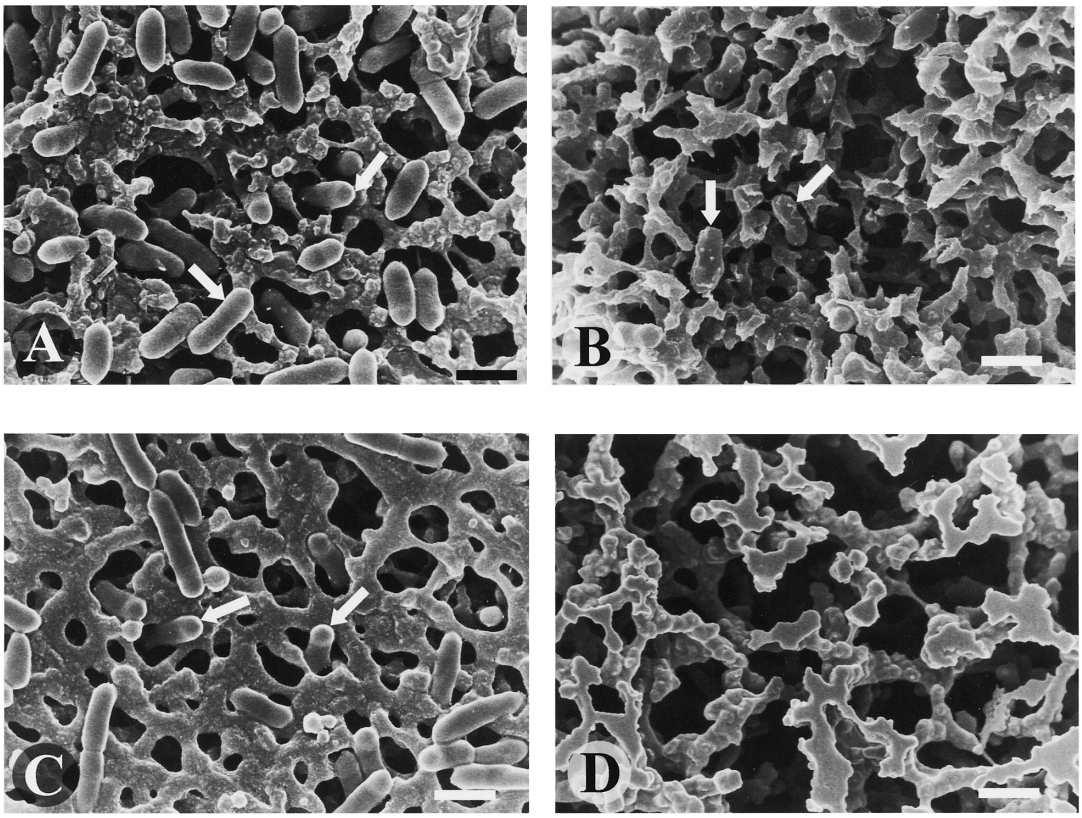

図4　リステリア菌EGD 株（矢印）のろ過膜通り抜け走査型電子顕微鏡写真。
A，接種面；B，ろ過膜内部；C，出口面；D，無接種のろ過膜表面。A，B，CはADVANTEC社製で孔径0.2 μmろ過膜。DはMillipore社製で孔径0.45 μmろ過膜。スケールバーは，1.0 μmを表示。

4ではリステリア菌［*Listeria monocytogenes* EGD 株］）を調べることで，氷解した。

ろ過膜の中央部断面を見ると，細菌は確かにろ過膜の細隙中に侵入しており（**図4B**），出口面からは，抜け出ようとしている姿（**図4C**）も認められる。それらの菌は，接種面に見られる細隙侵入前の細菌（**図4A**）と，サイズ的には大差がない。菌体のダウンサイズ化が起っていない所見である。見て欲しいのは，スケールバーとの比較である。1 μmのスケールバーが示されているが，0.2 μm（**図4A－C**）と0.45 μm（**図4D**）と製品表示のあるろ過膜に，直径1 μmより大きな細隙が見られる。細菌がこの間隙を通り抜けられるのは当然である。加圧ろ過法では，加圧による液流に乗った細菌を150 μmの厚さの膜に押し込むわけで，無数にある細隙に捕捉されてしまい，加圧ろ過の数秒間でろ液に細菌が出る可能性はほとんどない。但し，病院で使われる点滴ラインの途中にろ過膜を入れているものは，長時間に及ぶろ過なので注意が必要であろう[7)]。産業界で使用の連続運転大型装置でも同様である。

製品表示の孔径は，形態学的計測によるものではなく，加圧ろ過法を前提にした水銀ポロシメトリ法によるもので，圧計測から得られた計算推測値なのである。我々がそうだったよう，一般に誤解があるので，明記しておく。

3. 4　細隙構造通り抜けを可能にする細菌の自力とは

図3に示されている150 μmにわたる細隙を細菌はどのような推力を駆動して通り抜けているのだろう。自然界には，動植物の組織や土壌のなかに似たような構造の環境が多種ある（**図5**に，ソーセージ造りで使われている羊小腸粘膜下基底層の例を示す）。したがって，我々が見いだした現

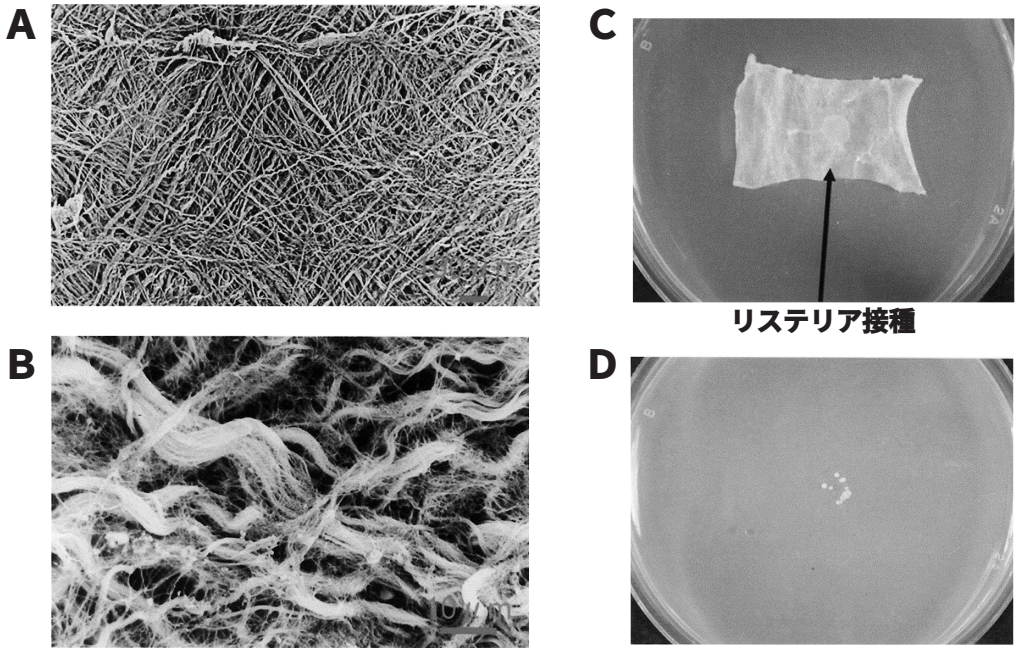

図5　羊小腸粘膜基底層を使ったリステリア菌通り抜け実験。A，Bは基底層走査型電子顕微鏡写真，AとBのスケールバーは，それぞれ100μmと10μm。Cは膜状の基底層に菌を接種した状態。Dでは，基底層を通り抜けたリステリア菌が生育してきている。

象は，ろ過膜の問題に留まらない。感染菌の組織侵入機構とも関連してくる。細隙サイズやその厚さが規格化されているろ過膜の使用は，微生物の細隙侵入能を解析する格好の実験系として有用である。

細菌の中には，液体中や濡れた固体表面を動き回れるものがある。それら固有運動能のある細菌を使い，運動の担い手である鞭毛，線毛を欠損させた変異株では通り抜けがどうなるかを調べた。**図6**に，リステリア菌の親株 EGDe（A），その鞭毛喪失変異株（B，C）と復帰株（D）の鞭毛染色像を示す。これらの菌株がろ過膜を通り抜けるのに違いがあるのであろうか。

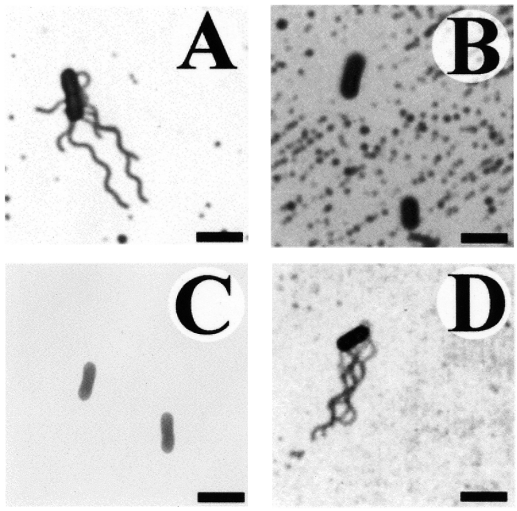

図6　レイフソン鞭毛染色で見たリステリア菌。A，EGDe野生株；B，EGDe鞭毛欠損変異株（Δ*flaA*）；C，EGDe鞭毛欠損変異株にコントロールプラスミド（pCON1）を入れた株；D，EGDe鞭毛欠損変異株に*flaA*遺伝子を荷うpCON1を入れた復帰株。

（1）　鞭毛の働き　鞭毛の有無は，通り抜け時間に大きな影響を及ぼす。食品媒介で重篤な感染症を起こすリステリア菌と院内感染症で知られる霊菌（*Serratia marcescens*）での解析例を**表2**に示す。両菌は，**図6**に見るような螺旋状の周毛を持っておりその周毛を束ねて回転させ移動する。両菌とも，0.45μm孔径のろ過膜通り抜けでは，鞭毛を持つ菌株が速くに通り抜けている。しかし，0.22μm孔径のろ過膜では，長時間要する通り抜けに違いがなくなっている。鞭毛は有用であるが，孔径が0.22μmと小さい細隙環境では，鞭毛を伸ばしての回転が不都合のようで，有効に機能出来ていない結果になっている。

（2）　線毛の働き　緑膿菌は，type IV線毛と

表2　細菌鞭毛の有無とろ過膜通り抜け活性

菌種	通り抜け最短時間（hr）	
菌株名	孔径 0.45 μm	0.22 μm
Listeria monocytogenes		
EGDe（野生株）(A)*	24	120
DH－1042（鞭毛欠損変異株）(B)	78	156
DH－1042/pCON1FlaA（鞭毛回復株）(D)	24	144
DH－1042/pCON1（コントロールプラスミド挿入株）(C)	78	168
Serratia marcescens		
274（野生株）	12	192
274－AB1（鞭毛欠損株）	132	192
274－AB1/pTH18krhag（鞭毛回復株）	24	> 216
274－AB1/pTH18kr（コントロールプラスミド挿入株）	168	> 216

全て30 ° C 培養，ろ過膜は，MF-Millipore
*, **図6, A, B, C, D** を参照
> --, --時間以内に通り抜けが認められない。

呼ばれる鞭毛より細い運動装置を持っている。回転させて働くのではなく，伸ばしてその先端を何かに付着させ，その線毛を短くすることで菌が前進する[8)]。プラスチックシャーレに固めた寒天培地とプラスチック面の間を菌が拡がる活性（twitching motility）でその働きを見ることが出来る（**図7**）。左（1）がtwitching motility陽性の緑膿菌のPAO1 T株。右（2）が陰性のPAO1 C 株である。この両菌をそれぞれ0.22 μm孔径のろ過膜上にスポット接種し96時間後にろ過膜を除去すると，下にあった培地面に特徴あるリング状生育がでてくる。しかし，それが認められるのは，twitching motility陽性のPAO1 T株だけである（**図8**）。0.22 μm孔径といった小さな細隙を通り抜けるのに，線毛が働いていると判断した。

（3）　その他の自力能　**表1**や**表2**には，本来鞭毛やtype IV線毛を持っていない菌（*S. aureus*や*K. pneumoniae*）や，突然変異でそれらを欠損した菌株も通り抜け陽性と記されている。但し，通り抜けに要する時間は長い。増殖する菌は，時間を追ってその集団サイズが増大し，肉眼で見れるコロニーと呼ばれるものになる。それが，細隙のなかでも進行し，集団圧の力でろ過膜通り抜けが起っていると，考えられる。単純な原理だが，増殖だけをしない変異株を用意しなければならず，その実証は，かえって難しい。

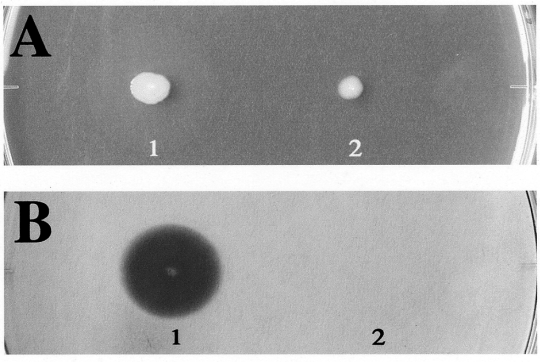

図7　緑膿菌PAO1株のtwitching motility. PAO1 T株（1）とPAO1 C株（2）を，1.0%LB寒天に穿刺接種し，24時間培養後（A），寒天培地を除去し，残ったプラスチックシャーレをクリスタルバイオレット処理し菌を染色した（B）。紫に染まって見える部位でtwitching motilityが陽性である。

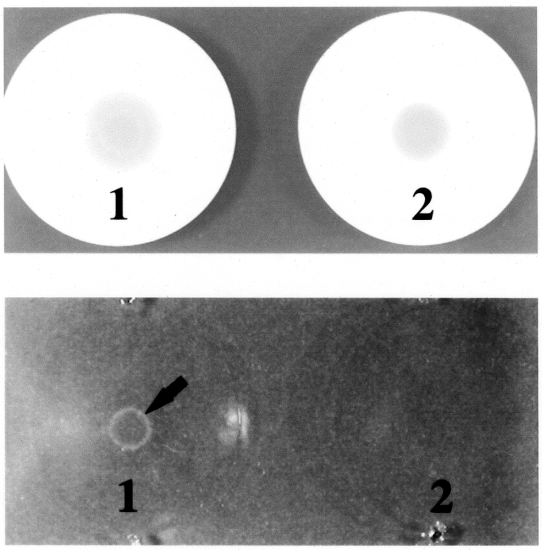

図8　緑膿菌PAO1 T株（1）とPAO1 C株（2）で比較したろ過膜（孔 径0.22 μm，MF-Millipore）通 り 抜 け 能。Twitching motility陽性のPAO1 T株が陽性である。

4. おわりに

浮遊菌とバイオフィルムとの関係を調べる仕事が契機となって，細隙構造への細菌の侵入能を明らかにすることができた。なお，バイオフィルムと共存の浮遊菌が薬剤抵抗性を示した理由は，共存菌が抵抗性になったというよりは，バイオフィルムを浸す液体中の抗生剤力価が低下したためであった。バイオフィルムが抗生剤を吸着し薬剤濃度が下がったか，抗生剤の分解・不活化が起ったのであろう。また，本研究の遂行中，緑膿菌を嫌気培養し，この菌集団が炭酸ガス依存性に薄く伸び拡がる活性を示すことを見いだした。不思議な細菌能力の発見であり，その機構解明に現在取り組んでいる。

謝　辞

本研究は，本学大学院自然科学研究科の長谷川裕之，中澤健太郎，谷川太一朗院生らの実験研究によっている。共同研究者（本学教官仲川洋治，寺尾通徳）を代表し，謝意を表したい。菌株は，Drs. D. E. Higgins, J. Kato, E. Yabuuchi, and R. M. Harsheyより分与を受けた。羊腸管の基底膜は，本学教官西海理之氏より頂いた。ポロシメトリーに関しては，北越製紙株式会社の下越典彦氏にご教示頂いた。諸氏のご協力に深謝する。

最後に，浦上食品・食文化振興財団による平成15年度研究助成が，本研究遂行への大きな支えでした。厚くお礼申し上げます。

文　献

1） 松山東平.「バイオフィルムの生物学」，Microbes and Environments，14，163-172，1999.

2） 松山東平.「医学分野におけるバイオフィルム」，『バイオフィルム入門　―環境の世紀の新しい微生物像―』，日科技連，2005，pp. 145-179.

3） 長沼　孝多ら．バイオフィルム及び共存浮遊菌の薬剤感受性変動，日本細菌学雑誌，56，339，2001.

4） 紙野　圭.「バイオフィルムと微生物間情報伝達」，『バイオフィルム入門　―環境の世紀の新しい微生物像―』，日科技連，2005，pp. 113-144.

5） H. Hasegawa, et al. Membrane filter（pore size, 0.22-0.45 μm; thickness, 150 μm）passing-through activity of *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species with indigenous infiltration ability. FEMS Microbiol. Lett. 223, 41-46, 2003.

6） K. Nakazawa, et al. Factors influencing the ability of *Listeria monocytogenes* to pass through a membrane filter by active infiltration. Appl. Environ. Microbiol. 71, 7571-7574, 2005.

7） S. Rusmin, et al., Consequences of microbial contamination during extended intravenous therapy using inline filters. Am. J. Hosp. Pharm. 32, 373-377, 1975.

8） J. M. Skerker and H. C. Berg, Direct observation of extension and retraction of type IV pili. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98. 6901-6904, 2001.

Membrane filter pass-through by bacteria with indigenous infiltration ability

Tohey Matsuyama

(Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences)

Bacterial infiltration activity was demonstrated by inoculation of bacteria on a membrane filter placed on a solid agar medium. These membrane filters (pore size, 0.45-0.2 μm; thickness 150-110 μm) were usable for preparation of sterile solution by the ordinary pressure filtration method. However, bacteria were able to infiltrate reticulate structure of the membrane texture and pass through these filters during a long time incubation (6-120hr). Ten species of microbes examined so far (e.g., ***Escherichia coli, Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Candida albicans***) demonstrated distinct pass-through activity. Time required for pass-through became longer when pore size was smaller reflecting presumable difficulty of bacterial translocation through a narrower pathway. Scanning electron microscopic examination of the membrane filter pass-through by bacteria visualized infiltrating bacteria in the reticulate structure of the membrane. No remarkable changes in the size of bacterial cells were recognized. It is noteworthy that void spaces in the reticulate structure of the membrane filter are larger than the diameter of the bacterial cell body. In other words, the pore size described by the manufacturers is not a morphologically determined size, rather an estimated value from the pressure data in mercury porosimetry.

By mutational studies using isogenic mutants, flagella-dependent motility of ***Listeria monocytogenes*** and ***Serratia marcescens***, and type IV pili-dependent twitching motility of ***Pseudomonas aeruginosa*** were shown as an important driving force for membrane filter pass-through activity. Since non-flagellated and non-pilated bacteria (e.g., ***S. aureus***) also demonstrated filter pass-through activity (although it was slower), expansive pressure generated by the growing bacterial population was indicated as the basic driving force of infiltration.