

Journal of Environmental Control Technique

環境管理技術

● **microbe · pestology**

vol.44
no. 3



新しいバイオフィルム国際規格 ISO4768 の 意義とアカデミアにおける研究

兼松 秀行*^{1,2}, 小川 亜希子³ 河合 里紗⁴, 中野 貴由²

*1: 株式会社 BEL

2: 大阪大学大学院工学研究科マテリアル生産科学専攻

*3: 国立高等専門学校機構鈴鹿工業高等専門学校生物応用化学科

*4: 奈良女子大学大学院 自然科学系・化学領域

The New International Biofilm Standard ISO 4768: Its Significance and Research in Academia

Hideyuki Kanematsu*^{1,2}, Akiko Ogawa³, Risa Kawai⁴, Takayoshi Nakano²

1. BEL Inc.

2. Division of Materials and Manufacturing Science, Graduate School of Engineering, The University of Osaka

3. Department of Chemistry and Biochemistry, National Institute of Technology, Suzuka College

4. Research Group of Chemistry, Division of Natural Science, Nara Women's University

1. はじめに

バイオフィルム研究は、1970年代末から1980年代初頭にかけて本格的に始まり[1, 2]、すでに半世紀の時を経ている。日本における研究活動は、欧米諸国と比べると必ずしも先進的とは言いがたい状況が続いていたが、COVID-19の流行を契機に、バイオフィルムに関連する市場が急速に拡大し、研究開発の動きも加速したように思われる。

こうした背景のもと、2023年に国際標準規格 ISO 4768 が誕生した。これは、バイオフィルム形成に対する材料の性能を評価するための世界初の ISO 規格であり、抗菌製品技術協議会 (SIAA) との密接な連携のもと、筆者らもアカデミックな立場から規格の策定に関わってきた。

ISO 規格は一般に産業界での実用的意義が強調されがちであるが、本規格は基礎研究においても極めて重要な意味を持つと筆者らは実感している。にもかかわらず、学術的な視点からその意義が十分に評価されていない現状があるのではないかと感じている。

そこで本稿では、この新しいバイオフィルム規格の概要を紹介するとともに、それがアカデミアにおける研究にどのような新たな可能性をもたらすのかについて、あらためて考察を試みるものである。

2. 材料科学の立場から見たバイオフィルム

バイオフィルムは様々な形で定義されている。たとえば、日本語版ウィキペディアでは「固

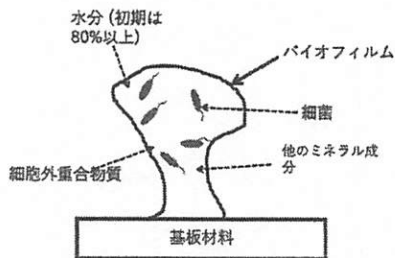


Fig.1. バイオフィルムの断面構造の模式図

体や液体の表面に付着した微生物が形成する「生物膜」とされている。どこでも大なり小なりこのような定義であるのだが、実用的には、微生物の作用で材料表面に形成される不均一なヌメヌメした水膜がバイオフィルムであることに違いはない。そしてそのぬめりこそがバイオフィルムの本質であり、それは細菌がバイオフィルムを形成する際に細菌から産生される有機物、特に多糖類 (polysaccharides) を主成分とする「細胞外高分子物質 (EPS: extracellular polymeric substances)」に起因している。Fig.1 にバイオフィルムの断面構造を模式的に示した。ここに各構成要素が示されている。

バイオフィルムの形成は静的な現象ではなく、時間依存性をもつ多段階の動的プロセスであると理解されている。まず、材料表面に環境中の有機物やイオンが吸着し、「コンディショニング膜」が形成される (初期段階) [3]。その後、遊泳性の微生物が表面に付着し、そこで増殖を始め、EPS を分泌することで、構造的な足場を構築しながらバイオフィルムが成熟していく (中期～後期段階)。最終的には、バイオフィルムが一部剥離し、新たな場所への微生物拡散と定着を促すというライフサイクルを持つ (Fig.2) [4]。こうした多段階に渡る時間依存の現象であることが、バイオフィルムが単なる抗菌性と異なること、そして抗菌性よりも

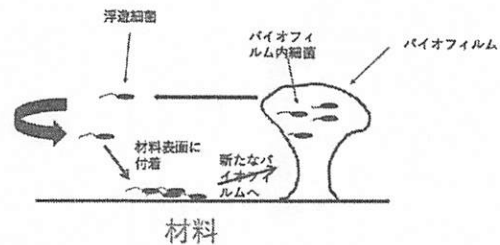


Fig.2 バイオフィルム形成・崩壊・形成プロセスの概略

はるかに、材料との相互作用が重要となる理由となっている (Fig.3)。

このようにバイオフィルムは段階的に進行するため、その各段階に応じた材料側の戦略が求められる。具体的には、初期段階では細菌付着の抑制、すなわち抗菌性が重要である。一方、中期から後期にかけては、一度形成されたバイオフィルムが材料表面に強固に定着しないようにする、つまり「剥がれやすさ (界面接着性の制御)」が重要となる。たとえば、基材が疎水性を有する場合、EPS との親和性が低く、自然に剥がれ落ちる可能性が高まることが知られている [5]。これらの現象は、材料科学的観点からの設計で制御可能である。

さらに、忘れてはならないのが、「流れ (flow)」という外的要因である [6]。実環境下では、多くの材料表面が流体に晒されており、バイオフィルムの形成・成長・剥離に大きな影響を与えている。流速や剪断応力といった動的因子は、バイオフィルムの安定性を左右するだけでなく、材料表面の構造設計やコーティングの最適化にも密接に関わってくる。このため、バイオフィルム評価には、静的条件だけでなく動的条件を取り入れた実験系の導入が今後ますます重要になると考えられる。

この流れの問題であるが、これを評価するためには、特殊な試験方法を考案する必要がある。これに関しては、様々な方法が提案されている

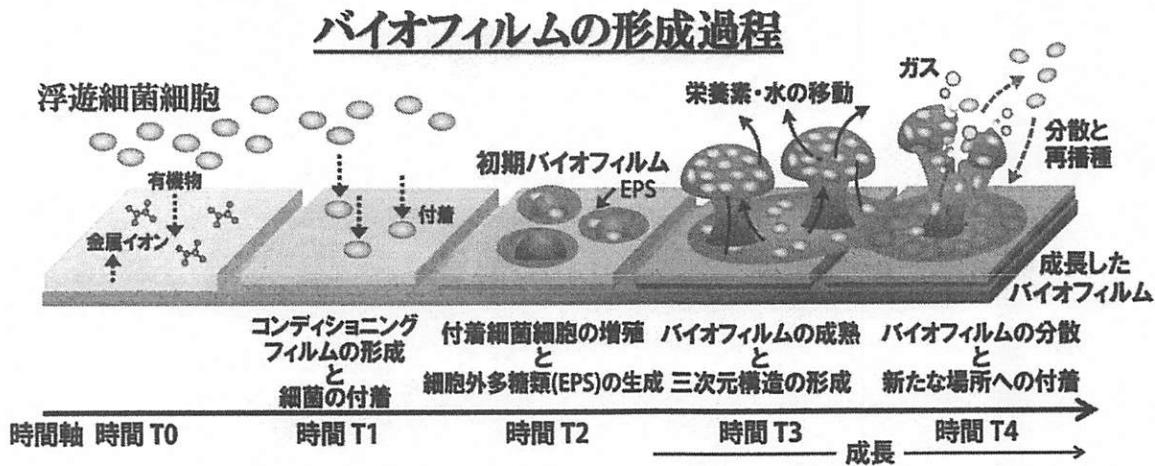


Fig.3 バイオフィルムの形成と成長過程

が、筆者らも以前に開発し、企業とともに実用化した装置がある。この点に関しては後述することとする。

いずれにせよ、バイオフィルム制御においては単に「抗菌性」だけでなく、時間とともに変化する微生物-材料間のインターフェースを的確に捉え、それに対応する材料設計が求められる。材料科学は、そのための重要な基盤を提供しており、バイオフィルム研究との融合によって新たな展開が期待される。

3. バイオフィルム評価の問題

前節において説明したように、バイオフィルム研究、そしてその対策を立てるための研究開発において難しいのは、バイオフィルムが形成するプロセスをいかに実験室的に再現するか、そして、それをどのように的確に、定性定量的に評価するかという問題を解決し乗り越えていく必要がある点である。この点において、実環境での試験法と実験室的な手法との間に乗り越えがたい乖離があることが、課題として存在しており、問題となっていた。これはバイオフィルム研究の発展の歴史と深い関係があるものと筆者らは見ている。

バイオフィルムが引き起こす問題の多くは、材料あるいはそれが構成する製品の問題であることが多い。例えば、冷却水管や土管など流体が内部を流れる配管、あるいはエアコンのフィンや、加湿器、洗濯機の構成材料、生物付着が問題となる船を含む海洋構造物などなど、枚挙にいとまがないほどである。これらの材料の劣化はバイオフィルムが引き起こすのであるが、それには材料科学、材料工学的な要因（すなわち材料側の因子）が深く関与しているに違いない。しかし、材料科学者や技術者がこの問題にアプローチするようになったのは比較的遅く、当初は医学や細菌学の関係者がこの学問分野を主導していた[7]。その後環境科学的なアプローチが試みられるようになり、最近になって材料科学的なアプローチが試みられるようになった。そのため、蓄積されてきたアカデミックな研究論文というのは、細菌に注目し（過ぎて）いる、というのが筆者らの見解である。損傷あるいは劣化する材料の問題からバックキャスト的に考えると、筆者らの見解がある程度を得ているのが理解できると思う。すなわち材料はなぜ細菌によって損傷する、あるいは劣化するのか、その要因が直接細



Fig.4 バイオフィルムが社会に与える影響

菌の作用と考えると、例えば細菌が材料を食べるなど、センセーショナルではあるが、あたらずとも遠からずといえるかもしれぬが、科学的真実とは信じがたい記述が行われることになる。

Fig.4 にバイオフィルムによって引き起こされる日常の問題、産業上の問題、医療関係・衛生関係の問題を模式的にまとめた。この図に描かれていない問題もひょっとして細菌が、そしてその細菌の作用によって形成するバイオフィルムが関与しているかもしれない。それほどバイオフィルムは我々人類の生活と活動に関わっているものなのである。そのため、多くのネガティブな問題と同時にポジティブな効果を持つもの、例えば燃料電池への応用、魚礁や藻場への応用なども含めて、バイオフィルム形成を制御、促進する、ことは極めて重要である。様々な制御方法へのアプローチが考えられるが、特にバイオフィルムが形成される材料側からのアプローチが実際的であるが、その目的

の材料開発には、各種材料上のバイオフィルム形成の的確な評価が必要である。このような背景から、著者らや抗菌製品協議会の国際規格成立へ向けた活動が始まり、その成果としてISO4768 が 2023 年に成立を見ることとなった [8]。

4. 国際バイオフィルム規格 (ISO 4768) の概要

2023 年に発行された ISO 4768 は、プラスチックなどの非多孔質材料表面におけるバイオフィルム形成抑制能を評価するための国際規格である。これまで、バイオフィルムの評価には、共焦点レーザー顕微鏡 [9]、AFM (原子間力顕微鏡) [10]、電子顕微鏡 [11, 12]、さらには遺伝子解析など [13, 14] の高度な手法が用いられてきた。これらは精度が高く学術的価値の高い評価方法である一方、装置導入コストや操作の専門性が高く、実用材料の評価としては一般化が困難であった。一言で言えば、学術的には意味

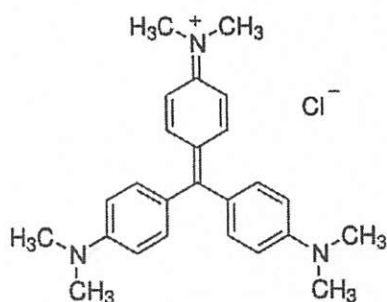


Fig.5 クリスタルバイオレットの化学構造

だけでなく、細菌も含めてバイオフィーム中のポリマーや分極性の分子全てが染まるのであるが、バイオフィームが複雑系であるため、複雑系を評価するためには、全てを染めるクリスタルバイオレット染色が逆に望ましい方法となっている。クリスタルバイオレット染色を基本とする ISO 4768 の概略を Fig.6 に示す。このクリスタルバイオレット (CV) 染色法を用いた吸光度測定を基本とした定量的評価は、試験の再現性と客観性を担保しつつ、比較的安価で

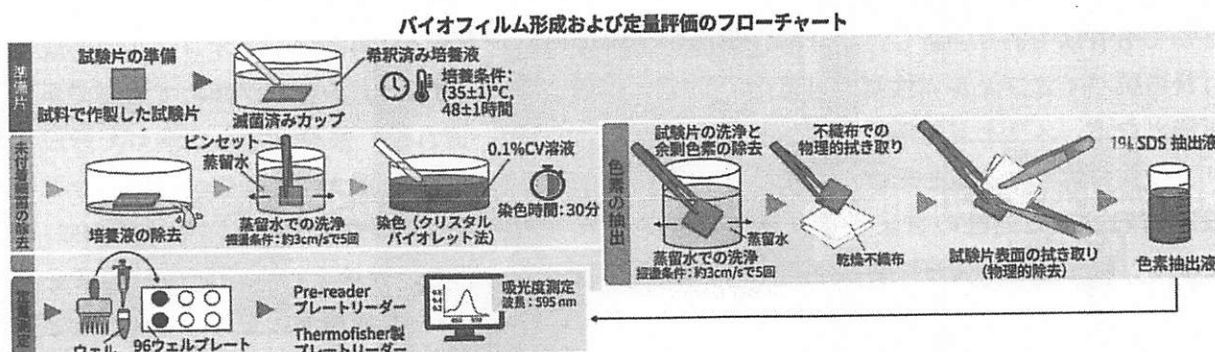


Fig.6 クリスタルバイオレット染色法(ISO4768)の基本概念

があるが、産業上、実用的には、評価技術としては扱いにくいもの、といえる。

このような背景から、抗菌製品技術協議会 (SIAA) と著者らは、評価技術を実用的な方向へと展開するために、様々な評価方法の中で、生物学的な評価方法の一つであるクリスタルバイオレットによる染色に着目した。クリスタルバイオレットは、Fig.5 に示すように、トリアリルメタン (トリフェニルメタン) 骨格をもつ有機カチオンと塩化物イオンからなるイオン性固体である。巨大分子である細胞外重合物質 EPS は必然的に構成各部においてある程度分極しているため、クリスタルバイオレットはその部分に特異吸着して発色する。ただし、細菌も巨大分子から構成されているため染まってしまう。つまり、EPS

操作も平易な評価手法として確立された。標準ガラス板に試験材料を装着し、特定の条件下でバイオフィームを形成させ、CV 染色後に吸光度を測定することで、抗バイオフィーム性能を数値的に表す「抗バイオフィーム指数 (R 値)」(式1) が得られる。

$$R = \{1 - (\text{対象となる試験片の吸光度}) / (\text{コントロールとなる試験片の吸光度})\} \times 100 \quad (1)$$

特にこの R 値がコントロールと比較して 20% 以上異なる場合、バイオフィーム抑制効果が顕著であると判断される。

本規格の最大の特長は、材料そのものを対象にしている点である。米国 [15] や欧州における既存のバイオフィーム関連規格 [16] は、主に医薬品や生体材料に関する抗菌・抗バイオフィーム薬剤の評価に主眼が置かれていたのに対し、

ISO 4768 は製品材料表面に形成されるバイオフィルムの評価に特化しており、世界的にも稀な規格である[8]。

本規格の策定においては、筆者らが中心となり、抗菌製品技術協議会 (SIAA) と協働する形で、アカデミアと産業界が連携して進められた。筆者自身、バイオフィルム研究の基礎に長年携わってきた立場から、アカデミックな視点と実用評価のギャップを埋める重要性を強く感じていた。ISO 4768 はその橋渡しとして、大きな意義を持つと考えている。

さらに、この規格は材料開発における評価指標としても有効であり、新しい高分子材料や複合材料の抗バイオフィルム性能の可視化・比較が可能となる。スライド資料にも示されている通り、複数の試料の R 値を比較することで、材料設計における方向性のフィードバックが可能となり、研究開発の加速に寄与することが期待される。

5. 今後の問題点と将来展望

2023 年に ISO 4768 が成立したことにより、バイオフィルム研究においては、学術的には共通の評価ツールが得られ、産業的には実用性と普遍性の高い評価法が確立されたといえる。これは材料表面に形成されるバイオフィルムを対象とした研究開発にとって極めて大きな前進である。一方で、本規格に基づく評価法にはなお未解決の課題が内在しており、今後の研究展開に向けて検討すべき重要な問題点が残されている。

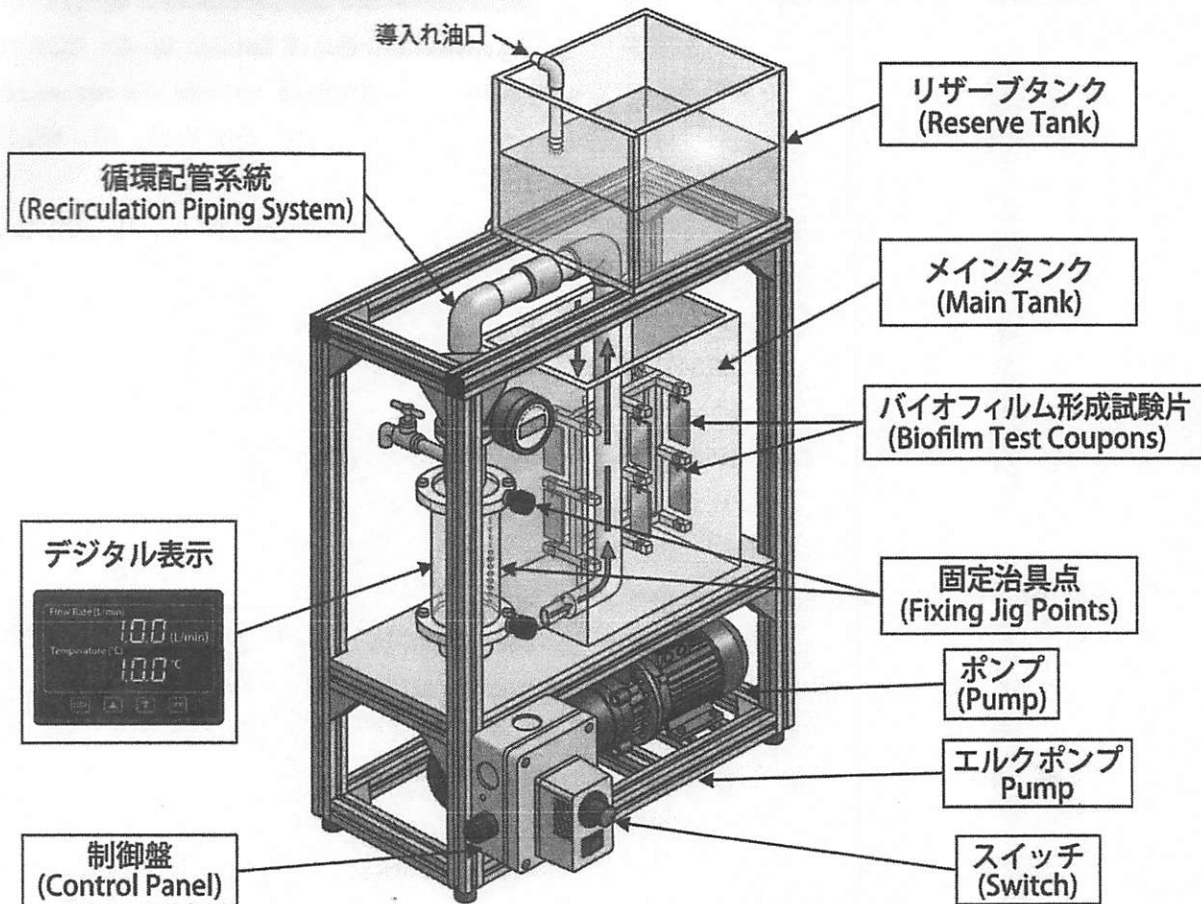
第一に、実際にバイオフィルムが形成される環境と、本規格における試験条件との間に存在する差異である。本法では試験菌種として表皮ブドウ球菌を用いているが、実環境は極めて複雑であり、単一菌種のみでその全てを再現でき

るとは限らない。たとえば著者らは、海洋環境における生物付着評価に対して、より適切な別種細菌を提案してきた経緯がある[16]。したがって、クリスタルバイオレット染色という基本骨格は維持しつつも、対象環境に応じて細菌種を柔軟に変更した単一菌種モデル、あるいは実環境浸漬暴露によって形成された複合バイオフィルムを対象とした CV 染色評価へ展開するなど、ISO 4768 を参照しながらもフレキシブルに適用する運用が有効であると考えられる。

第二に、本規格が基本的に静的浸漬法に基づいている点である。実際のバイオフィルム形成では、「流れ (flow)」の存在が極めて重要である[17, 18]。流れは、栄養供給を促進して形成を加速する一方で、過大な剪断応力はバイオフィルムの崩壊や剥離を誘起する。このように、流れは形成促進と破壊という相反する要素を同時に含み、さらに流路形状や乱流・層流などの複雑なパターンと相まって、バイオフィルム形成挙動を大きく左右する。したがって今後は、静的評価法を基盤としつつ、流れを制御可能な動的試験法や、剪断応力を定量化できる評価装置の導入が不可欠である。筆者らはこれについて様々な検討を産学連携により行ってきた。Fig. 7 にその一例を示す。これは山本鍍金試験器が筆者らのコンセプトを基に実際のバイオフィルム加速形成試験器として実装したものである。

第三に、CV 法そのものの改善・改良、さらには新たな評価法の展開可能性である。もともとバイオフィルムは単一の評価法のみでその全体像を十分に把握することが難しく、材料科学的観点からは複数の手法を併用して定性・定量の両面から評価することが望ましい。その意味で、CV 法は実用的かつ有用な手法である一方、それのみで全てを記述できるものではない。著

山本鍍金試験器 バイオフィーム製造装置 技術図面



YAMAMOTO-MS
ANALYZER FOR A WIDE RANGE OF PLATING SOLUTIONS

YAMAMOTO-MS CO., LTD.

Fig.7 バイオフィーム加速形成試験機の一例

者らはこれまでに、画像データに対するトポロジカルな観点からの解析の有効性について検討を進めており、バイオフィームの不均一性や時間的変化を新たな側面から評価できる可能性を示してきた。今後は、ISO 4768に基づく定量評価を基盤としつつ、画像解析、ラマン分光、FTIR マッピングなどの各種情報を相補的に活用することにより、バイオフィーム形成の時間発展をより多面的に理解できる段階へ進むも

のと考えられる。さらに、これらの知見を将来的にデジタル技術と連携させることにより、材料表面におけるバイオフィーム形成挙動の理解深化や、機能維持に関する予測的評価へ発展する可能性がある。

このように ISO 4768 は、現時点で極めて有効な国際標準であると同時に、その限界を起点として新たな材料科学的研究、データ科学的研究、さらにはデジタル科学との融合研究を生み

出す基盤でもある。今後は、本規格を出発点として、実環境適合性、動的条件、マルチモード解析を包含した次世代バイオフィーム評価法へ発展させていくことが、アカデミアと産業界双方にとって重要な課題となるであろう。

参考文献

- [1] Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *science*, 284(5418), 1318-1322.
- [2] Characklis, W. G., & Marshall, K. C. (1990). *Biofilms*. Wiley-Interscience, New York.
- [3] Flemming & Wingender, *Nat. Rev. Microbiol.* 2010
- [4] Stoodley et al., *Annu. Rev. Microbiol.* 2002
- [5] 河合里紗, 小川亜希子, 兼松秀行. "抗バイオフィーム性塗料開発とその基本的な考え方." *塗装工学* 58 (2023): 141-51.
- [6] Stoodley et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 1999
- [7] Donlan, *Emerg. Infect. Dis.* 2002
- [8] 一般社団法人抗菌製品技術協議会 (SIAA). 抗バイオフィーム加工製品 (付着抑制) のマーク登録制度. SIAA, 東京. <https://www.kohkin.net/> (参照: 2026年4月).
- [9] Reichhardt, C., & Parsek, M. R. (2019). Confocal laser scanning microscopy for analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm architecture and matrix localization. *Frontiers in microbiology*, 10, 677.
- [10] James, S. A., Powell, L. C., & Wright, C. J. (2016). Atomic force microscopy of biofilms- imaging, interactions, and mechanics. *Microbial biofilms- importance and applications*, 95-118.
- [11] Kanematsu, H., & Barry, D. M. (Eds.). (2015). *Biofilm and materials science* (Vol. 169). New York, NY, USA:: Springer.
- [12] Kanematsu, H., Barry, D. M., Ikegai, H., & Mizunoe, Y. (2023). Biofilm control on metallic materials in medical fields from the viewpoint of materials science- from the fundamental aspects to evaluation. *International Materials Reviews*, 68(3), 247-271.
- [13] Pratt, L. A., & Kolter, R. (1999). Genetic analyses of bacterial biofilm formation. *Current opinion in microbiology*, 2(6), 598-603
- [14] Karballaei Mirzahosseini, H., Hadadi-Fishani, M., Morshedi, K., & Khaledi, A. (2020). Meta-analysis of biofilm formation, antibiotic resistance pattern, and biofilm-related genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical samples. *Microbial Drug Resistance*, 26(7), 815-824.
- [15] ASTM E2799, ASTM E2871
- [16] Ogawa, A., Celikkol-Aydin, S., Gaylarde, C., Baptista-Neto, J. A., & Beech, I. (2017). Microbial communities on painted wet and dry external surfaces of a historic fortress in Niterói, Brazil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 123, 164-173.
- [17] Cowle, M.W., Babatunde, A.O., Rauen, W.B., Bockelmann-Evans, B.N., & Barton, A.F. (2022). The role of shear dynamics in biofilm formation. *npj Biofilms and*

Microbiomes, 8, 30.

[18] Kurz, D.L., Secchi, E., Matter, J.M., Whalen, M.L., Bhatt, M., & Stocker, R. (2022). Competition between growth and shear stress drives intermittency in

preferential flow paths in porous medium biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(30), e2122202119.