

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：54101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2023

課題番号：17K01442

研究課題名（和文）DNAとRNA情報を利用したバイオフィーム定量法構築と医療器材の感染症評価

研究課題名（英文）Development of quantitative analysis method for biofilm using DNA and RNA information, which is applied to evaluation of infection diseases about medical materials.

研究代表者

小川 亜希子 (Ogawa, Akiko)

鈴鹿工業高等専門学校・生物応用化学科・准教授

研究者番号：90455139

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：体内挿入型医療器具上のバイオフィーム形成は慢性感染症の主要因である。その予防対策として材料への抗バイオフィーム特性付与があり、本特性の定量的評価は非常に重要だ。本研究では、細菌のバイオフィーム形成に伴う遺伝子発現変動を指標としたバイオフィーム定量法の構築に取り組み、Escherichia coli K-12株をモデル細菌とし、浮遊状態時とバイオフィーム形成状態時との間でRNA発現量を網羅的に比較した。結果、バイオフィーム定量に遺伝子発現変動が利用可能であり、対象となる遺伝子群はバイオフィーム形成に関わる遺伝子群のみでなく、糖・アミノ酸・窒素代謝に関わる遺伝子群も有効なことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カテーテルなどの体内挿入型医療器具上では、バイオフィーム形成に端を発する感染症が生じやすい。バイオフィームは細菌と細胞外高分子基質で構成された膜であり、抗生物質耐性をもつ。そこで、医療器具にバイオフィーム形成抑制効果を付与が大切であり、その効果を定量的に評価する必要がある。本研究では、バイオフィーム定量法としてバイオフィーム形成に伴う細菌の遺伝子発現の変動を利用してきた。本法は医療器具の種類に依らずバイオフィーム定量が可能であり、バイオフィーム形成過程を多様な代謝系の動きとして捉えることが可能なため、新たなバイオフィーム形成抑制技術にもつながっていく。

研究成果の概要（英文）：Biofilm formation in body-inserted medical devices is a major cause of chronic infections. As a preventive measure, it would be beneficial to provide materials with a biofilm prevention function, and it would be extremely helpful to have a quantitative evaluation of this function. In this study, we endeavored to construct a biofilm quantification method using gene expression changes associated with bacterial biofilm formation as an indicator. We also sought to comprehensively compare RNA expression levels between the suspended state and the biofilm-forming state using the E. coli K-12 strain as a model bacterium. Our findings suggest that gene expression changes may be useful for biofilm quantification. Moreover, we observed that not only genes involved in biofilm formation but also those involved in sugar, amino acid, and nitrogen metabolism are effective.

研究分野：生物化学工学

キーワード：バイオフィーム 定量法 遺伝子発現 マイクロアレイ法 RNA-seq法

1. 研究開始当初の背景

カテーテルやステントは、血管・尿路・気道狭窄や閉鎖の場合に、ガスや液体の循環を確保する目的で使用される。カテーテルやステントは、体外と体内とを結ぶ境界に位置することも多く、皮膚常在菌などの混入による感染症発生のリスクが知られている。特に、治療中の患者にあっては、体内の免疫システムが低下している場合も多く、感染症が重篤化する(時に死亡につながる)ケースも少なくない。このように、カテーテルやステントが原因となる感染症では、抗生物質の投与が効かない(あるいは効果が大変弱い)ことがしばしば問題となる。さらに、カテーテルやステント内の回路が閉塞する問題もある。

これらの原因として、病原体となる細菌によるカテーテルやステント内でのバイオフィーム形成が挙げられる。バイオフィームとは、微生物とそれらが分泌する細胞外高分子基質(EPS)を主成分とする膜状の三次元構造物であり、微生物の生存戦略の一形態として知られている(図1)。厄介なことに、感染症治療に使用される抗生物質は、バイオフィーム中の微生物には効果が無い(非常に弱い)ことが知られている。したがって、カテーテルやステント内で生じるバイオフィーム形成の抑制は、感染症の発生抑制に極めて有効な手段だと考えられる。

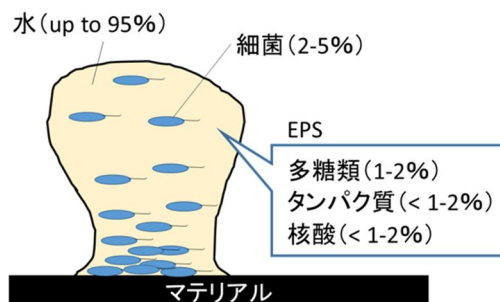


図1. バイオフィームの概要

ところで、バイオフィームは形成の進行度によって、その細胞数やEPS量、そして形状の変化が知られている。我々はこれまで、さまざまな材料を対象とし、それらの表面上で生じるバイオフィームの形成抑制を検討してきた。この過程において、バイオフィーム量が多かったサンプルと少なかったサンプルの材料表面を顕微鏡観察で比較したところ、どちらも細菌の付着が確認された。このことから、バイオフィーム形成度合いは、細菌量(数)との間には必ずしも相関は無く、細菌が産生するEPS量と相関があると推定された。しかしながら、バイオフィーム形成と細菌量(数)、EPS量とを同時に比較する簡便な手段が無いのが現状である。そのため、我々が取り組んできた材料(表面)の改変によるバイオフィーム抑制について、どのような材料(表面)がバイオフィーム形成抑制に「どの程度」効果があるのか、を数値化して比較することが困難で、研究の進行の妨げとなっている。

2. 研究の目的

本研究では、微生物の持つDNAとRNA発現情報を利用し、バイオフィーム中の細胞量(数)とEPS量とを簡便かつ同時に比較可能な検出法を構築していく。さらに、構築したバイオフィーム定量システムを利用し、我々がやっているカテーテル・ステント材料(表面)の加工によるバイオフィーム形成抑制効果を数値化して比較検討につなげる。これにより、バイオフィーム形成抑制に適した材料開発の加速が大いに期待できる。

3. 研究の方法

本研究では、バイオフィーム形成のモデル細菌として大腸菌(*Escherichia coli* K-12株)を選定し、細胞バンクから購入した。また、医療器具の中でも尿路カテーテルを想定し、その素材として利用されることの多いシリコン基板をモデル素材とした。さらに、シリコン基板上でのバイオフィーム形成を加速させる目的で、バイオフィーム形成加速装置(以下LBR)を設計・製作し、バイオフィーム形成試験を実施した。この時、バイオフィーム定量には既存のクリスタルバイオレット染色法を使用し、バイオフィームの同定にはラマン分光分析法によるバイオフィーム成分検出を利用した。

続いて *E. coli* K-12 株を一定時間で振とう培養あるいはLBR内で培養し、前者を浮遊状態(suspension state, S)、後者をバイオフィーム形成状態(biofilm formation state, B)とし、それぞれRNA抽出を行った。抽出したRNAは、一色マイクロアレイもしくはRNA-seq法にて網羅的に遺伝子発現を比較した。はじめに、マイクロアレイとRNA-seqの遺伝子発現データから発現が変動している遺伝子を抽出し、変動遺伝子についてScatter PlotやMA Plotを用いてどのような傾向があるのか観察した。次に、全体の遺伝子発現データと変動遺伝子群のみの発現データから、浮遊状態やバイオフィーム状態でデータ値が高かった遺伝子を10ずつ抽出し調査した。

4. 研究成果

4-1. バイオフィーム形成試験

フリーズストックした大腸菌を LB 培地 (10 mL) の入った試験管に植菌し、37 °C の恒温槽内で 100 rpm で 18 h 培養した。この培養液を LBR (1500 mL の LB 培地) に 100 倍希釈で加え、25 °C 雰囲気下でマグネチックスターラーにて攪拌しながら培養した。培養 22、23、24、25 h 後、LBR からシリコンプレートを 2 枚ずつ取り出し、それらをクリスタルバイオレット染色液中に 30 min 浸漬した。Scotch™ テープ (3M) を各シリコンプレートサンプルの 3 か所に貼りつけ、そのテープをスライドガラスに転写し、色差測定を行った (図 2)。LBR 培養の 22 h から 24 h の間でバイオフィーム量が増加し、培養 24 h で最大となり培養 25 h で減少していた。このことから、LBR 培養では、24 h の時点でバイオフィームが成熟し、大腸菌の死滅が始まっていたと考えられる。

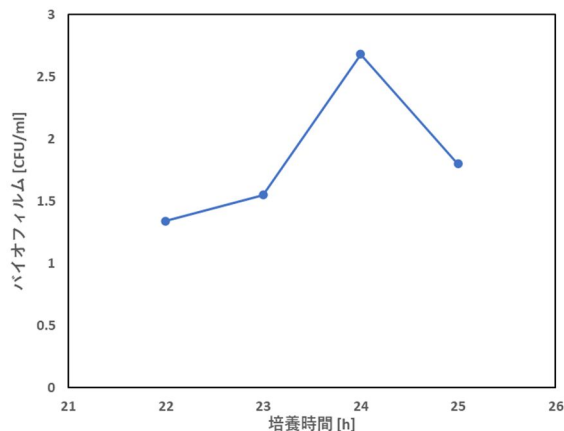


図 2. 培養時間とバイオフィーム量の継時変化

4-2. S 状態と B 状態の遺伝子発現比較

前項にて、LBR 内でのバイオフィーム成熟培養時間は 24 h と推定された。そこで、大腸菌の死滅している可能性が低く、かつ得られるバイオフィーム量が多いと考えられる 23 h 培養し、そこから B 状態の RNA 抽出を行った。S 状態と B 状態の RNA サンプルを利用しマイクロアレイ解析および RNA-seq 解析を行った。なお、RNA 発現解析に利用した RNA 試料は浮遊状態時の RNA 分解が進んでいたため発現変動の程度に不確実性はあったものの、どちらの解析法の場合でも S 状態の方が B 状態と比較して発現している遺伝子の種類が約 2.5 倍多い結果となった。一方、B 状態で S 状態に比べて遺伝子発現が上昇した遺伝子には、マイクロアレイ法では一種のアミノ酸合成に関わる遺伝子がみられ、RNA-seq 法では尿素サイクルや TCA サイクル、リン脂質合成に関わる遺伝子が含まれていた。以上、バイオフィームの定量には遺伝子発現変動が利用可能なこと、対象となる遺伝子群はこれまでに報告されているバイオフィーム形成に関わる遺伝子群のみでなく、糖・アミノ酸・窒素代謝に関わる遺伝子群の有効性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件 / うち国際共著 8件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Ogawa, Akiko Hosaka, Shoya Kanematsu, Hideyuki Yoshitake, Michiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Marine Biofilm Model Comprising a Loop-Type Biofilm Reactor and a Halomonas Strain HIG FST4 1, an Active Biofilm-Forming Bacterium	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Coatings	6. 最初と最後の頁 1605-1614
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/coatings12101605	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ogawa, Akiko; Takakura, Keito; Hirai, Nobumitsu; Kanematsu, Hideyuki; Kuroda, Daisuke; Kougo, Takeshi; Sano, Katsuhiko; Terada, Satoshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Biofilm Formation Plays a Crucial Role in the Initial Step of Carbon Steel Corrosion in Air and Water Environments	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 923-945
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ma13040923	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ogawa, Akiko Takakura, Keito Hirai, Nobumitsu Kanematsu, Hideyuki Kuroda, Daisuke Kougo, Takeshi Sano, Katsuhiko Terada, Satoshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Biofilm Formation Plays a Crucial Role in the Initial Step of Carbon Steel Corrosion in Air and Water Environments	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 923, 946
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ma13040923	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka, Nobuyuki Kogo, Takeshi Hirai, Nobumitsu Ogawa, Akiko Kanematsu, Hideyuki Takahara, Junko Awazu, Akane Fujita, Nobuko Haruzono, Yoshihide Ichida, Shunji Tanaka, Yo	4. 巻 9
2. 論文標題 In-situ detection based on the biofilm hydrophilicity for environmental biofilm formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8070, 8081
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-44167-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hideyuki Kanematsu, Yuta Sakagami, Dana M. Barry, Michiko Yoshitake, Akiko Ogawa, Nobumitsu Hirai, Takeshi Kogo, Daisuke Kuroda, Yoshimitsu Mizunoe	4. 巻 MS&T18
2. 論文標題 Evaluation for Immunity of Biomaterials Based on Raman Spectroscopy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of Materials Science and Technology 2018 (MS&T18), Columbus, Ohio, the USA	6. 最初と最後の頁 1482-1489
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7449/2018mst/2018/mst_2018_1482_1489	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kanematsu Hideyuki, Oizumi Atsuya, Sato Takaya, Kamijo Toshio, Honma Saika, Barry Dana, Hirai Nobumitsu, Ogawa Akiko, Kogo Takeshi, Kuroda Daisuke, Sano Katsuhiko, Tsunashima Katsuhiko, Lee Seung-Hyo, Lee Myeong-Hoon	4. 巻 8
2. 論文標題 Biofilm Formation of a Polymer Brush Coating with Ionic Liquids Compared to a Polymer Brush Coating with a Non-Ionic Liquid	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Coatings	6. 最初と最後の頁 398 ~ 398
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/coatings8110398	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Makama, Zakari, Celikkol, Sukriye, Ogawa, Akiko, Gaylarde, Christine, Beech, Iwona	4. 巻 135
2. 論文標題 The issue with using DNA profiling as a sole method for investigating the role of marine biofilms in corrosion of metallic materials	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Biodeterioration & Biodegradation	6. 最初と最後の頁 33-38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ibiod.2018.09.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Akiko Ogawa, Keito Takakura, Katsuhiko Sano, Hideyuki Kanematsu, Takehiko Yamano, Toshikazu Saishin, Satoshi Terada	4. 巻 7
2. 論文標題 Microbiome Analysis of Biofilms of Silver Nanoparticle-Dispersed Silane-Based Coated Carbon Steel Using a Next-Generation Sequencing Technique	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 antibiotics (MPDI)	6. 最初と最後の頁 91-100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antibiotics7040091	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hideyuki Kanematsu, Kodai Shindo, Dana M. Barry, Nobumitsu Hirai, Akiko Ogawa, Daisuke Kuroda, Takeshi Kogo, Katsuhiko Sano, Hajime Ikegai and Yoshimitsu Mizunoe	4. 巻 85
2. 論文標題 Electrochemical Responses of Graphene with Biofilm Formation on Various Metallic Substrates by Using Laboratory Biofilm Reactors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ECS Transactions	6. 最初と最後の頁 491-498
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1149/08513.0491ecst	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hideyuki Kanematsu, Atsuya Oizumi, Takaya Sato, Toshio Kamijo, Saika Honma, Dana M. Barry, Nobumitsu Hirai, Akiko Ogawa, Takeshi Kogo, Daisuke Kuroda, and Katsuhiko Tsunashima	4. 巻 85
2. 論文標題 Polymer Brush Made by Ionic Liquids and the Inhibition Effects for Biofilm Formation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ECS Transactions	6. 最初と最後の頁 1089-1095
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1149/08513.1089ecst	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 de Azambuja, Aline O., Cazarolli, Juciana C., de Quadros, Patricia D., Bucker, Francielle, Correa, Camila, Casagrande, Juliano C., Ferrao, Marco F., Celikkol, Sukriye, Ogawa, Akiko, Bonifay, Vincent, Sunner, Jan A., Beech, Iwona B., Bento, Fatima M.	4. 巻 31
2. 論文標題 Effect of Sulfur Content on Microbial Composition and Biodegradation of a Brazilian Diesel and Biodiesel Blend (B10)	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Energy & Fuels	6. 最初と最後の頁 12305-12316
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.energyfuels.7b02287	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 小川亜希子	4. 巻 95
2. 論文標題 微生物が関わる金属腐食	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 608-611
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Akiko Ogawa, Sukriye Celikkol-Aydin, Christine Gaylarde, Jose Antonio, Baptista-Neto, Iwona Beech	4. 巻 74
2. 論文標題 Microbiomes of Biofilms on Decorative Siliceous Stone: Drawbacks and Advantages of Next Generation Sequencing	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Current Microbiology	6. 最初と最後の頁 848-853
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00284-017-1257-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ogawa, Akiko, Celikkol-Aydin, Sukriye, Gaylarde, Christine, Baptista-Neto, Jose Antonio, Beech, Iwona	4. 巻 123
2. 論文標題 Microbial communities on painted wet and dry external surfaces of a historic fortress in Niteroi, Brazil	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Biodeterioration & Biodegradation	6. 最初と最後の頁 164-173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ibiod.2017.06.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Akiko Ogawa, Katsuhiko Sano, Masaki Iino, Hideyuki Kanematsu
2. 発表標題 Applying the zinc nanoparticles and copper suboxide nanoparticles for siloxane-based coated aluminium plates to inhibit biofilm formation under a seawater condition
3. 学会等名 INTERFINISH2020 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小川亜希子、田中礼土、鈴木賢紀、平井信充
2. 発表標題 製鋼スラッグの組成とバイオフィルムを形成する細菌叢との関連
3. 学会等名 日本鉄鋼協会秋季大会シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H.Miura, K.Yokoi, H. Kanematsu, N.Hirai, T.Kogo, A.Ogawa, D.Kuroda, N.Wada, K.Sano
2. 発表標題 Staphylococcus epidermidis biofilm formation in radio frequency alternating electromagnetic field
3. 学会等名 MRS-J 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田堀 朱音、佐野 勝彦、小川 亜希子、矢野 真弓、廣部 峻馬、寺田 聡
2. 発表標題 バイオフィーム形成に対するシランコーティングの影響
3. 学会等名 第21回化学工学会学生発表会東京大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小川亜希子
2. 発表標題 細菌叢または遺伝子発現情報からバイオフィームを解析する
3. 学会等名 第5回SUMS-NITS医工連携研究会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akiko Ogawa, Akane Tahori, Mayumi Yano, Ryouma Hirobe, Satoshi Terada, Daisuke Kuroda, Katsuhiko Sano, Hideyuki Kanematsu
2. 発表標題 Application of Silane-Based Coating to Biomaterials for Inhibiting Biofilm Induced Infection
3. 学会等名 The 31rd Annual and international meeting of the Japanese association of animal cell technology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大泉敦也、兼松秀行、佐藤貴哉、上条利夫、本田彩夏、平井信充、小川亜希子、幸後健、黒田大介、佐野勝彦、網島克彦、Dana Barry
2. 発表標題 ポリマーブラシ コーティングとそのバイオフィルム形成挙動
3. 学会等名 第28回 日本MRS年次大会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐野勝彦、兼松秀行、平井信充、黒田大介、小川亜希子、幸後健
2. 発表標題 異なる構造を持つシラン系樹脂へのバイオフィルム付着性
3. 学会等名 第28回 日本MRS年次大会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 兼松秀行、小川亜希子、平井信充、幸後健、黒田大介、佐野勝彦、Dana Barry
2. 発表標題 5種類の細菌とそれを作るバイオフィルム形成の差異について
3. 学会等名 第28回 日本MRS年次大会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮本康太郎、小川亜希子
2. 発表標題 定量PCRを利用した バイオフィルム定量系の構築
3. 学会等名 新領域創成研究会2017 おおさか
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小川亜希子、矢野真弓、佐野勝彦、兼松秀行
2. 発表標題 生体材料のバイオフィルム感染症とコーティング剤によるその抑制
3. 学会等名 化学工学会第49回秋季大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宇佐美将誉、小川亜希子
2. 発表標題 LBRによる材料上でのバイオフィルム作製と解析
3. 学会等名 日本鉄鋼協会第174回秋季大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宇佐美将誉、小川亜希子
2. 発表標題 大腸菌のバイオフィルム形成と遺伝子発現との関連
3. 学会等名 日本鉄鋼協会第174回秋季大会「鉄鋼スラグ等各種材料上へのバイオフィルム形成挙動の評価・分析とその有効利用」
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮本康太郎、小川亜希子
2. 発表標題 表皮ブドウ球菌を用いた遺伝子発現情報利用によるバイオフィルム定量系の構築
3. 学会等名 異分野融合シンポジウム 微生物を基軸とした環境と電気と金属（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 H. Kanematsu, A. Ogawa, T. Kogo, D. Kuroda, N. Hirai
2. 発表標題 Atmospheric Corrosion of Various Spray Coated Specimens and Biofilms
3. 学会等名 Annual Meeting of Japan Thermal Spray Society. 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関