

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：87104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450123

研究課題名(和文)ハイスループットバイオフィルム薬剤感受性試験法の開発と抗バイオフィルム素材の探索

研究課題名(英文)Development of high-throughput method for the susceptibility testing of microbial biofilm and screening of biofilm eradication activity

研究代表者

塚谷 忠之(Tsukatani, Tadayuki)

福岡県工業技術センター・生物食品研究所・専門研究員

研究者番号：50463500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：水溶性テトラゾリウム塩を用いた微生物検出法とベグ付きマイクロプレートフタへのバイオフィルム形成法を組み合わせることでバイオフィルム薬剤感受性試験法を開発した。本法によりBiofilm MIC、MBC、MECの逐次的定量が可能になった。本法は従来法と比較して迅速性及び簡便性において格段に優れていた。さらに、本法を素材ライブラリーへ適用した結果、ローズマリー(葉)、ウド(皮)、メース、イロコ、レッドパインなどのエタノール抽出液において90%以上のバイオフィルム破壊活性が得られた。これらの素材は、 ϵ -ポリリジンと併用することで、幅広い菌種に対する抗バイオフィルム素材として利用できることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：High-throughput method for the susceptibility testing of microbial biofilm using a colorimetric microbial viability assay based on reduction of a water soluble tetrazolium salt and the biofilm formation method on 96 pegs on the lid of a microtiter plate was developed. By the proposed method, biofilm MIC, MBC and MEC were sequentially determined. The proposed method yields similar performance to conventional methods, but is faster and more easily implemented. The water and ethanol extracts of various materials (mainly foodstuffs) were investigated for the biofilm eradication activity using the proposed method. Among them, the ethanol extracts of rosemary leaf, udo peel, mace, iroko, and red pine showed potent biofilm eradication activity for both *S. mutans* and *S. aureus*. Furthermore, these materials combined with poly-L-lysine, which was used as a food additive, most effectively reduced the biofilm MECs for a wide variety of bacteria.

研究分野：微生物検出

キーワード：バイオフィルム 薬剤感受性試験 微生物検出 スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

バイオフィームは難治性・慢性感染症の大きな要因の1つであるため、形成されたバイオフィームの薬剤感受性を迅速かつ正確に把握することは投薬・治療上非常に重要である。バイオフィームの薬剤感受性試験法に関する報告は近年多数なされるようになっており、QuらはBiofilm MIC (最小発育阻止濃度)、Biofilm MBC (最小殺菌濃度) 及びBiofilm MEC (最小撲滅濃度) の測定の重要性を説いている¹⁾。

バイオフィーム薬剤感受性試験は、96 ウェルマイクロプレートの底にバイオフィームを形成させて評価する方法で行われてきたが、近年、ペグ付きのマイクロプレートフタにバイオフィームを形成させて評価する手法が報告されている²⁾。この手法は従来の手法と比べて洗浄工程が簡便であり、操作ミスでバイオフィームを崩してしまう恐れが格段に低いため有望な方法と考えられる。

しかし、この手法を用いて Biofilm MIC、Biofilm MBC 及び Biofilm MEC を逐次的に測定した報告はない。さらに、従来の試験法ではバイオフィーム内の生菌数が培養法 (寒天培地法) で測定されるが、生菌の抽出操作や長い培養時間が必要であるため、ハイスループット化は不可能である。

2. 研究の目的

本研究では、水溶性テトラゾリウム塩を用いた微生物検出法とペグ付きマイクロプレートフタへのバイオフィーム形成法を組み合わせることで Biofilm MIC、Biofilm MBC 及び Biofilm MEC の逐次的測定が可能なハイスループットバイオフィーム薬剤感受性試験法の開発を行う。

さらに、研究代表者らが保有する素材ライブラリーを本試験法へ適用し、抗バイオフィーム素材のスクリーニングを行う。本研究により、ハイスループットなバイオフィーム薬剤感受性試験法と抗バイオフィーム素材の提供が期待できる。

3. 研究の方法

(1) ハイスループットバイオフィーム薬剤感受性試験法

96 ウェルマイクロプレートへ最適な培地で調製したバイオフィーム産生菌懸濁液を分注し、これに 96 ペグ付きマイクロプレートフタを被せて 30 ~ 37 °C で一定時間インキュベーションし、ペグ上にバイオフィームを形成させた (図 1 ~)。

96 ウェルマイクロプレートに 2 倍希釈系列濃度の抗生物質溶液 180 μ l を分注し、これにバイオフィームを形成させた 96 ペグ付きマイクロプレートフタを被せ、20 時間インキュベーションした。インキュベーション後、受けプレートの吸光度測定 (660nm) を行い、吸光度が 0.1 以下のウェルを阻止と判定し、Biofilm MIC を測定した (図 1 ~)。

次に、抗生物質溶液に接触させた 96 ペグ付きマイクロプレートフタを洗浄後、新鮮な培地へ移し、24 時間インキュベーションした。回復培養後、同様に受けプレートの吸光度測定 (660nm) を行い、Biofilm MBC を測定した (図 1 ~)。

さらに、96 ペグ付きマイクロプレートフタを検出試薬含有培地へ移し、一定時間反応後、吸光度測定 (460nm) を行い、Biofilm MEC を測定した (図 1 ~)。

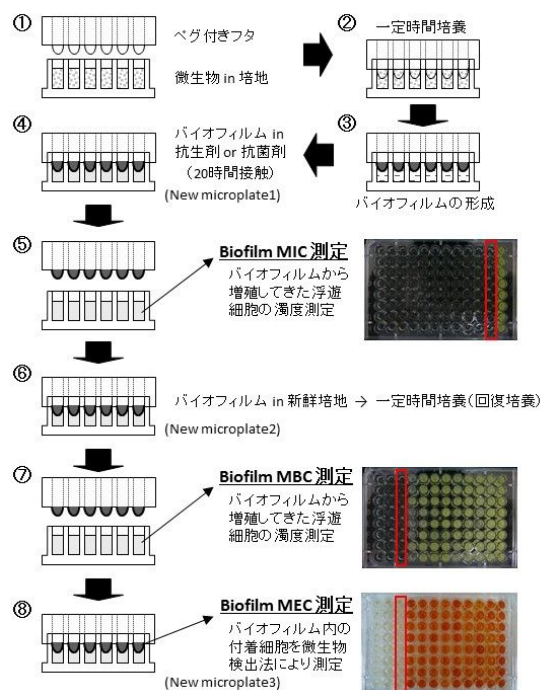


図 1 ハイスループットバイオフィーム薬剤感受性試験法

(2) 水溶性テトラゾリウム塩を用いた微生物検出法

水溶性テトラゾリウム塩 WST-8 と電子メディエータ 2-methyl-1,4-naphthoquinone (NQ) を 10% DMSO 水溶液に溶解し、検出試薬とした。

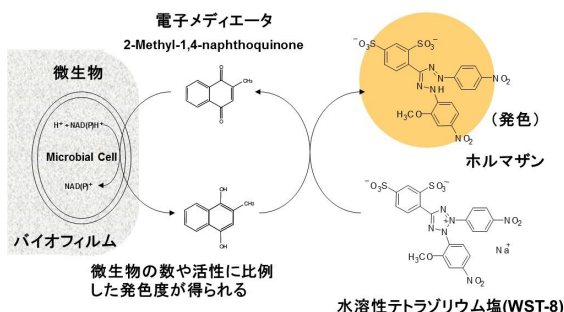


図 2 水溶性テトラゾリウム塩を用いた微生物検出法

外部から供給された 2-methyl-1,4-NQ はバイオフィーム中の微生物により還元を受け、ヒドロキノンが生成される。ここへ水溶性テトラゾリウム塩 WST-8 が共存すると、生成したヒドロキノンにより還元を受けてホルマ

ザン色素が生成・発色する。この一連の反応は微生物の代謝反応を介して起こることから、検出試薬を添加することで、バイオフィルム内微生物活性を測定することが可能である。

(3) 素材ライブラリー

農産物、海産物、木材を中心に収集した素材を凍結乾燥し、水あるいはエタノールで抽出した。抽出液をリスト化し、凍結保存したものを素材ライブラリーとした。

4. 研究成果

(1) ハイスループットバイオフィルム薬剤感受性試験法の確立

まず、バイオフィルム産生菌として緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* NBRC13276、黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* NBRC13276、カンジダ菌 *Candida albicans* JCM2085 など 11 種類のバイオフィルム産生微生物を対象として、ペグ付きマイクロプレートフタへのバイオフィルム形成法の確立を試みた。形成条件として、ペグ素材、菌体密度、前培養法、培地組成、形成時間、振とう有無、培養温度を検討し、各種微生物に最適な条件を確立した(表 1)。

表 1 バイオフィルム形成条件(抜粋)

Microorganism	Medium	Peg materials	Incubation time (h)
Gram-negative			
<i>Acinetobacter baumannii</i> JCM6841	MHB	PP	24
<i>Cronobacter sakazakii</i> NBRC102416	MHB	PP	24 + 48
<i>Escherichia coli</i> NBRC15034	BHI	PS	24 + 48
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NBRC13275	MHB	PP	24
<i>Serratia marcescens</i> NBRC102204	TSB	PP	24
Gram-positive			
<i>Corynebacterium xerosis</i> NBRC16721	BHI	PP	24 + 48
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	MRS	PS	24 + 48
<i>Staphylococcus aureus</i> NBRC13276	MHB	PS	24 + 48
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC35984	MHB	PS	24 + 48
<i>Streptococcus mutans</i> NBRC13955	TSB+2%Suc	PS	24 + 48
Yeast			
<i>Candida albicans</i> JCM2085	YNB+Glu	PS	24 + 48

次に、*P. aeruginosa*、*S. aureus*、*C. albicans* の形成したバイオフィルム内の微生物を検出するために、電子メディアータ及び発色検出試薬である水溶性テトラゾリウム塩 WST シリーズの中から最適な組み合わせを選抜した。微生物による代謝効率や培地成分による影響を考慮したところ、電子メディアータ 2-methyl-1,4-NQ と水溶性テトラゾリウム塩 WST-8 の組み合わせが最適であった(図 2)。

さらに、バイオフィルム形成法及び微生物検出法を組み合わせることでバイオフィルム薬剤感受性試験法の確立を試みた。*P. aeruginosa*、*S. aureus*、*C. albicans* が形成したバイオフィルムを対象として、Biofilm MIC、Biofilm MBC 及び Biofilm MEC の逐次的測定を行うことが可能となった(図 1)。本法は、従来法(マイクロウェルプレー

トの底に形成する方法)と比較して、洗浄などの操作性において格段に簡便な手法であった。また、Biofilm MEC の検出時間は 2~5 時間程度であり、従来法の 24 時間を大幅に短縮することが可能であった。

(2) バイオフィルム薬剤感受性試験法の精度評価

代表的な抗生物質及びバイオフィルム産生菌を用いて、本試験法の精度評価を行った。*P. aeruginosa*、*S. aureus*、*C. albicans* のバイオフィルムを対象として、各種抗生物質単独の Biofilm MIC、Biofilm MBC 及び Biofilm MEC の逐次的測定を行った。*P. aeruginosa* では、シプロフロキサシンやレボフロキサシンなどのニューキノロン系抗生物質が有用であった。また、*S. aureus* では、グリコペプチド系抗生物質であるバンコマイシン(VCM)や、グリコサイクリン系、テトラサイクリン系抗生物質が単独で有効であった(表 2)。*C. albicans* に対しては単独で有効な抗生物質は見つからなかった。

表 2 黄色ブドウ球菌バイオフィルムに対する各種抗生物質の Biofilm MIC、Biofilm MBC 及び Biofilm MEC

Antibiotics	Proposed method			Conventional method
	Biofilm MIC	Biofilm MBC	Biofilm MEC	Biofilm MEC
Azithromycin	16	1024<	1024<	1024<
Cefazolin	<1	1024<	1024<	1024<
Chloramphenicol	32	1024<	1024<	1024<
Ciprofloxacin	<1	1024	1024<	1024<
Clarithromycin	8	1024<	1024<	1024<
Clindamycin	<1	1024<	1024<	1024<
Daptomycin	8	1024<	1024<	1024<
Doxycycline	<1	16	1024	1024
Erythromycin	64	1024<	1024<	1024<
Gentamicin	<1	16-32	1024<	1024<
Imipenem	<1	1024<	1024<	1024<
Kanamycin	4	1024<	1024<	1024<
Linezolid	8-16	1024<	1024<	1024<
Meropenem	<1	1024<	1024<	1024<
Minocycline	<1	8	1024	1024
Oxacillin	1-2	1024<	1024<	1024<
Phosphomycin	8-16	1024<	1024<	1024<
Rifampicin	128-256	256	1024<	1024<
Streptomycin	8	1024<	1024<	1024<
Teicoplanin	2	16-32	1024<	1024<
Tigecycline	<1	64	1024	1024<
Tylosin	8	1024<	1024<	1024<
Vancomycin	4	256	512	512

(µg/ml)

本試験法で得られた Biofilm MEC 値を、従来法(ペグに形成されたバイオフィルムから生菌を抽出し、平板寒天培地で培養後、コロニーカウントする方法)で測定した値と比較したところ、両者は良好に一致した(表 2)。この結果から、本法の信頼性が確認された。また、従来法では 96 ペグ(プレート 1 枚分)を処理するのに約 5 時間、さらに培養に 24 時間が必要とされる。このため、1 日に処理可能なプレートは 1 枚が限界であるのに対して、本法では 12 枚程度の処理が可能であり、測定の迅速性及び操作性が格段に向上した

と考えられる。

次に、*S. aureus* NBRC13276 のバイオフィルムを対象として、抗生物質の組み合わせの効果を検証した。抗生物質単独では VCM が有効であったため、各濃度の VCM と他の抗生物質の組み合わせの効果を検討した。その結果、ダプトマイシン (DAP) との組み合わせが効果的であった。さらに、VCM と DAP に第 3 抗生物質の組み合わせを検討したところ、テイコプラニン (TCP) との組み合わせが最適であった。VCM 単独では Biofilm MEC=512 µg/ml であるのに対して、VCM=8、DAP=4、TCP=8 µg/ml と低い濃度で併用効果を示すことが明らかとなった。さらに、この組み合わせは MRSA を含む他の *S. aureus* へも有効であった (表 3)。

表 3 黄色ブドウ球菌バイオフィルムにする抗生物質の併用効果 (最小バイオフィルム撲滅濃度)

Antibiotics	Vancomycin / Daptomycin			
	8/4	16/4	32/4	64/4
<i>S. aureus</i> NBRC13276				
Ciprofloxacin	32<	32<	32<	8
Gentamicin	32<	32<	32	2
Minocycline	32<	32<	32<	32<
Rifampicin	32<	32<	32<	32
Tigecycline	32<	32<	32<	32<
Teicoplanin	8	4	4	1
<i>S. aureus</i> ATCC29213				
Teicoplanin	32<	32<	32<	32
<i>S. aureus</i> NBRC14462				
Teicoplanin	32<	32<	32<	32
<i>S. aureus</i> ATCC43300 (MRSA)				
Teicoplanin	32<	32<	32	16

(µg/ml)

(3) 抗バイオフィルム素材の探索

素材ライブラリー (エタノール抽出液 983 種類、水抽出液 872 種類) を本試験法へ適用し、*S. aureus* 及び *Streptococcus mutans* のバイオフィルムに対する破壊活性をスクリーニングした (図 3)。

S. aureus、*S. mutans* のバイオフィルムに対しては、それぞれ 15、30 素材が 90% 以上の破壊活性を示した。選抜された素材の中で、*S. aureus* 及び *S. mutans* いずれのバイオフィルムに対しても 90% 以上の破壊活性を示したのは、ローズマリー (葉)、ウド (皮)、メース、イロコ、レッドパインなどのエタノール抽出液であった。

しかし、これらの素材は *E. coli* 及び *P. aeruginosa* などのグラム陰性菌のバイオフィルムに対しては破壊活性を示さなかった。そこで、グラム陰性菌のバイオフィルムに対する様々な食品添加物の破壊活性をスクリーニングしたところ、ε-ポリリジンが 90% 以上の破壊活性を示した。ε-ポリリジンは逆にグラム陽性菌のバイオフィルムに対する破壊活性が低かった。選抜した素材と ε-ポリリジンの併用を試みたところ、幅広い菌種のバイオフィルムに対して破壊活性が認

められた。

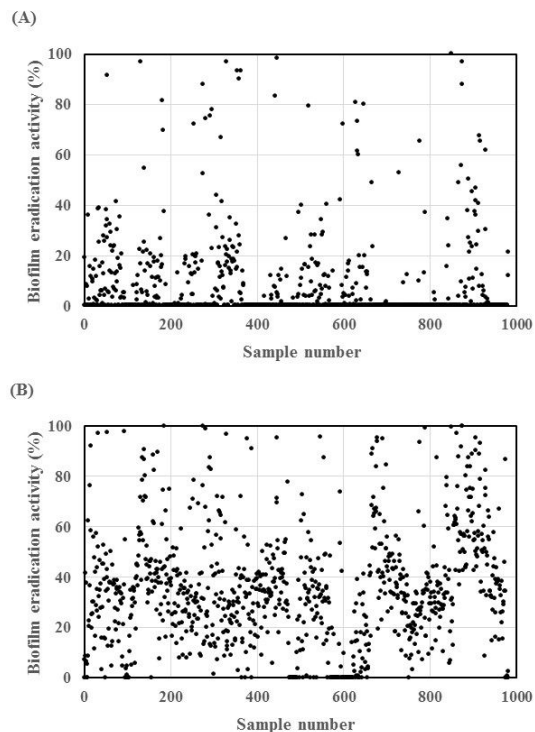


図 3 抗バイオフィルム素材 (エタノール抽出液) のスクリーニング

(A) *S. aureus*, (B) *S. mutans*

(4) 結論

本研究では、まず、水溶性テトラゾリウム塩を用いた微生物検出法とペグ付きマイクロプレートフタへのバイオフィルム形成法を組み合わせることで、Biofilm MIC、Biofilm MBC 及び Biofilm MEC の逐次的測定が可能なバイオフィルム薬剤感受性試験法の開発を行った。本試験法は、従来法と比較して操作性 (簡便性) 及び迅速性において格段に優れた手法であり、大量の試料の一斉分析が要求される抗バイオフィルム素材のスクリーニング法として適用可能であった。

さらに、本試験法を素材ライブラリーへ適用した結果、ローズマリー (葉)、ウド (皮)、メース、イロコ、レッドパインなどのエタノール抽出液において 90% 以上のバイオフィルム破壊活性が得られた。これらの素材は、ε-ポリリジンと併用することで、幅広い菌種に対する抗バイオフィルム素材として利用できることが示唆された。

< 参考文献 >

- 1) Qu et al., J. Antimicrob. Chemother., 65 (2010) 1405-1411.
- 2) Harrison et al., Nature Protocols, 5 (2010) 1236-1254.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Tadayuki Tsukatani, Tomoaki Kawaguchi, Hikaru Suenaga, Takashi Ikegami, Masanobu Shiga, Rapid and simple determination of minimum biofilm eradication concentration by a colorimetric microbial viability assay based on reduction of a water-soluble tetrazolium salt and combined effect of antibiotics against microbial biofilm, The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 査読有, 6(1), 2016, in press. <http://www.jmbfs.org/>

Tadayuki Tsukatani, Hikaru Suenaga, Masanobu Shiga, Kiyoshi Matsumoto, A rapid microplate method for the proliferation assay of fungi and the antifungal susceptibility testing using the colorimetric microbial viability assay, Letters in Applied Microbiology, 査読有, 59(2), 2014, 184-192. DOI: 10.1111/lam.12264

〔学会発表〕(計 3 件)

塚谷 忠之、川口 友彰、末永 光、池上天、志賀 匡宣、抗バイオフィルム活性スクリーニング法の開発：バイオフィルム形成法の検討と適用性の評価、日本食品科学工学会第 62 回大会、平成 27 年 8 月 29 日、京都大学吉田キャンパス（京都市）

塚谷 忠之、川口 友彰、末永 光、池上天、志賀 匡宣、松本 清、水溶性テトラゾリウム塩を用いた微生物検出法：ハイスループットバイオフィルム薬剤感受性試験への適用、日本農芸化学会 2015 年度大会、平成 27 年 3 月 28 日、岡山大学津島キャンパス（岡山市）

塚谷 忠之、水溶性テトラゾリウム塩を用いた微生物検出法の開発と食品分野への応用、日本食品科学工学会第 61 回大会、平成 26 年 8 月 29 日、中村学園大学（福岡市）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

塚谷 忠之（TSUKATANI Tadayuki）
福岡県工業技術センター生物食品研究所・
専門研究員
研究者番号：50463500

(2)研究分担者

（ ）

研究者番号：

(3)連携研究者

川口 友彰（KAWAGUCHI Tomoaki）
福岡県工業技術センター生物食品研究所・
主任技師
研究者番号：90455337