

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26350543

研究課題名(和文)超音波エネルギーが細菌のバイオフィーム形成に及ぼす影響の研究

研究課題名(英文)Effect of ultrasonic irradiation on bacterial biofilms

研究代表者

鯉渕 晴美(Koibuchi, Harumi)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：20382848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：表皮ブドウ球菌が生成したバイオフィームに対し超音波を照射すると、これまで報告されてきた超音波強度よりも弱い強度でも、24時間照射すればバイオフィームは破壊されることがわかった。さらに、培養皿に表皮ブドウ球菌液と液体培地を混和し、ここに超音波を照射することによって、超音波照射はバイオフィーム生成阻害にも寄与することが判明した。また、バイオフィーム生成の初期段階に超音波を照射すれば、より短時間の照射でも(20分)バイオフィーム形成阻害効果があることが証明された。これらより、カテーテル関連バイオフィーム血流感染症の発症予防に超音波照射が有用でありさらに実現可能であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Ultrasonic irradiation (US) can decrease the amount of *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) biofilm when the duration of US irradiation is sufficiently long even if the acoustic intensity is low. In addition, US irradiation can inhibit the formation of *S. epidermidis* biofilm. And the inhibitory effect of US irradiation at the early stage can reduce the biofilm formation even if the duration time of US irradiation was short. The inhibitory effect of duplicated irradiation on biofilm effect had nearly twice as high as single irradiation, however, the single irradiation at early stage can also reduce the biofilm formation by 17.9 %.

研究分野：超音波、細菌学

キーワード：超音波 細菌 バイオフィーム 表皮ブドウ球菌 カテーテル関連血流感染症

1. 研究開始当初の背景

バイオフィームは、細菌が産生するマトリクスで、糖・たんぱく・核酸からなる。細菌がバイオフィームを産生すると細菌をくるむように存在するため抗菌薬の効果が低下する。また、カテーテル関連バイオフィーム血流感染症では、カテーテルに付着した細菌が自ら形成するバイオフィームに覆われるため、有効な治療方法は確立されておらず発症するとカテーテルを抜去せざるをえない。一方、超音波エネルギーにはその照射条件によっては有用な生体反応を惹起することが報告されている。そこで我々は超音波照射でバイオフィーム量を減少させることで、超音波照射がカテーテル関連バイオフィーム血流感染症の一助になりえないかと考えた。

2. 研究の目的

超音波照射で細菌が産生したバイオフィームを破壊あるいは産生を阻害することによって、超音波照射がカテーテル関連バイオフィーム血流感染症の治療方法となりえるか検討する。

3. 研究の方法

超音波照射強度の測定

<水槽式超音波照射装置>

振動子を脱気水中に沈め、ハイドロフォンを 40×40mm の範囲で縦横方向に動かし、音圧を測定した。

バイオフィーム破壊実験

<水槽式超音波照射装置>

培養皿に表皮ブドウ球菌バイオフィーム産生標準株 (ATCC 35984 RP62A) の菌液を入れバイオフィームを形成し、超音波を照射した。(周波数 1MHz、連続波、 $I_{SPTA}=1.66\text{mW}/\text{cm}^2$ 、照射時間 24 時間) 照射後、培養皿底面をクリスタルバイオレットで染色、クリスタルバイオレットを抽出し抽出液の吸光度を 595nm で測定しバイオフィームを定量した。

<Sound Cell Incubator (SCI)>

水槽式超音波照射装置のときと同様、培養皿に表皮ブドウ球菌の菌液をいれバイオフィームを形成し超音波を照射した。(周波数 1MHz、連続波、 $I_{SATA}=15\text{mW}/\text{cm}^2$ 、照射時間 24 時間)

バイオフィーム形成阻害実験 (連続波)

培養皿にブドウ球菌の菌液と培地を入れ超音波を照射した。(周波数 1MHz 連続波、超音波強度 $I_{SATA}=15\text{mW}/\text{cm}^2$ 照射時間 24 時間・12 時間) 照射後クリスタルバイオレット法でバイオフィーム量を定量した。

バイオフィーム形成阻害実験 (パルス波)

と同様に培養皿を準備し、超音波を照射した。(周波数 1MHz パルス波、PRT 10ms Duty 比 20% 超音波強度 $I_{SATA}=10\text{mW}/\text{cm}^2$ 照射時間

20 時間) 照射は、菌液と培地を培養皿に入れたあと、incubator 内に 1 時間静置し行った。照射回数は 1 回照射と 2 回照射を設定した。照射後一定時間おき、クリスタルバイオレット法でバイオフィーム量を定量した。

4. 研究成果

超音波強度の測定

<水槽式超音波照射装置>

音場全体に 4kPa のノイズを認めた。最大音圧は 14.2kPa であった。これらから計算すると、 $I_{SPTA}=1.66\text{mW}/\text{cm}^2$ であった。

バイオフィーム破壊実験

<水槽式超音波照射装置>

超音波照射した培養皿のバイオフィーム量は照射しなかった培養皿のバイオフィーム量より有意に減少しており、超音波照射によってバイオフィームが破壊されることが証明できた。

<SCI>

水槽式超音波照射装置と同様に、超音波を照射した培養皿のバイオフィームは照射しなかった培養皿のバイオフィーム量と比較して有意に減少しており、超音波照射によってバイオフィームが破壊されることが証明できた。

バイオフィーム形成阻害実験 (連続波)

<24 時間照射のとき>

バイオフィーム産生標準株 (RP62A)、臨床分離株ともに超音波照射によってバイオフィームの形成が阻害された。

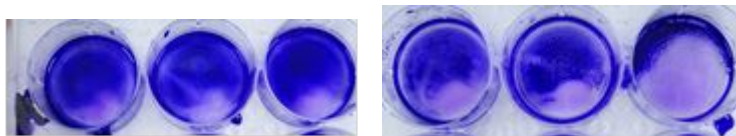
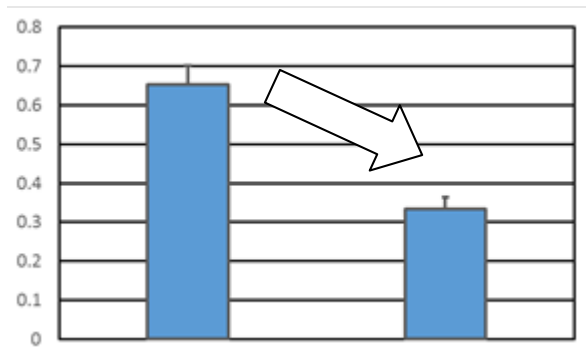
<12 時間照射のとき>

バイオフィーム産生標準株 (RP62A) では超音波照射によるバイオフィーム量に差がなかったが、臨床分離株では差があった。超音波照射によるバイオフィーム産生阻害効果は菌株によって異なった。

グラフは、実験 24 時間照射のときのバイオフィーム形成量、写真は培養皿底面の様子である。(紫色に染色されているものがバイオフィーム)

超音波照射した培養皿は照射しなかった培養皿よりも染色が弱く、バイオフィーム量が少ないことが示唆された。

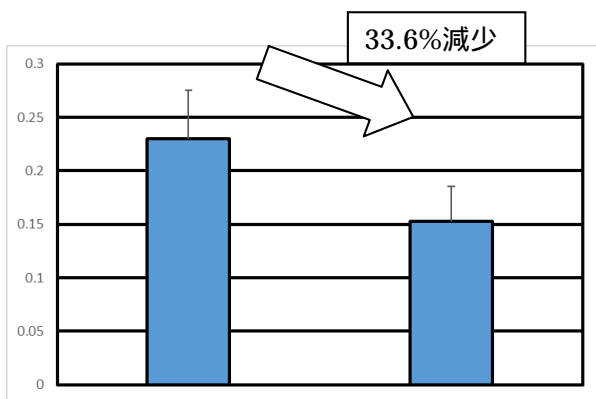
定量しても、超音波照射した培養皿に形成されたバイオフィームは、照射しなかったバイオフィーム量と比較して有意に少なく、超音波照射によってバイオフィームの形成が阻害されていることが証明された。



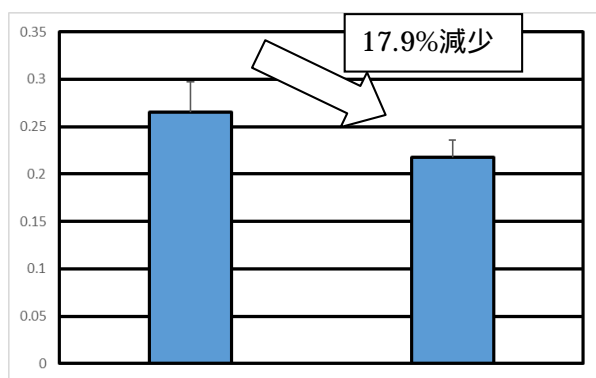
US(-) US(+)
24時間連続波照射

バイオフィーム形成阻害実験（パルス波）
1回照射 2回照射ともに、超音波照射によってバイオフィーム形成量は減少した。1回照射より2回照射のほうがバイオフィーム形成阻害効果は大きかった。

グラフは、パルス波照射のときのバイオフィーム形成阻害効果をあらわしたものである。



2回照射
US(-) US(+)



1回照射
US(-) US(+)

超音波照射により、バイオフィームが破壊されるのみではなく、生成そのものも阻害できることが証明された。

実験より、超音波照射時間は短時間でも、バイオフィーム生成初期に照射すれば阻害効果が期待できることがわかった。

超音波照射のバイオフィーム生成阻害効果の機序は今後検討していく予定だが、これまでの研究の結果より、バイオフィーム生成阻害の初期段階、すなわち細菌が培養皿底面に付着する段階を阻害している可能性が示唆された。今後、細菌が培養皿底面に付着するためのたんばくの発現量を測定することによってそれを証明していく。

さらに、超音波照射強度や照射時間を変化させることで、バイオフィーム形成阻害に最適な照射条件を検討していく。

照射条件が決定したら、実際に臨床の現場で使用されている中心静脈カテーテルに超音波を照射し、カテーテルへのバイオフィーム形成阻害効果を確認する。

今後、超音波照射のカテーテル関連バイオフィーム血流感染症の治療への応用の可能性についてさらに検討を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計1件)

Harumi Koibuchi, Yasutomo Fujii, Yoshikazu Hirai, Takashi Mochizuki, Kohji Masuda, Kazuhiko Kotani, Toshiyuki Yamada, Nobuyuki Taniguchi Effect of ultrasonic irradiation on bacterial biofilms. Journal of Medical Ultrasonics (査読あり) 2018, 45: 25-29 DOI: s10396-017-0801-x

〔学会発表〕(計6件)

鯉淵 晴美 藤井 康友 平井 義一（他4名）超音波エネルギーが細菌のバイオフィーム破壊に及ぼす影響 第88回日本超音波医学会学術集会, 2015

鯉淵 晴美 山田 俊幸, 藤井 康友（他3名）*Staphylococcus epidermidis* のバイオフィーム作成方法と超音波エネルギーがバイオフィームに及ぼす影響 第62回日本臨床検査医学会学術集会, 2015

鯉淵 晴美 山田 俊幸, 藤井 康友（他4名）超音波エネルギーが細菌のバイオフィームに与える影響（第2報）第89回日本超音波医学会学術集会 2016

鯉淵 晴美 藤井 康友 望月 剛 (他4名) 超音波エネルギーが細菌のバイオフィルムに及ぼす影響 日本超音波医学会関東甲信越地方会 2017

鯉淵 晴美 藤井 康友, 佐藤 祐介 (他7名) 超音波エネルギーが細菌のバイオフィルムに及ぼす影響 日本臨床検査医学会学術集会 2017

Harumi Koibuchi, Yasutomo Fujii, Yusuke Sato 'o (他5名) Inhibitory effect of ultrasonic irradiation on bacterial biofilm formation International Conference on Biomedical Ultrasound 2017

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鯉淵 晴美 (HARUMI, Koibuchi)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号：20382848

(2) 研究分担者

藤井 康友 (YASUTOMO, Fujii)
京都大学大学院・医学研究科・教授
研究者番号：00337338