

マイクロプレートを用いた 新たなバイオフィーム評価方法

高橋 政孝, 高口 唯奈, 江藤 陽介, 中尾 美紀子

1 はじめに

1・1 バイオフィームとは

バイオフィームは、細菌などの微生物が産生する菌体外多糖が堆積して高次元構造体を形成したものであり、水が存在する様々な固体の表面などに発生する。微生物はバイオフィーム内に身を置くことで外環境から守られ、より生存しやすい環境を得ることができる(図1)¹⁾。

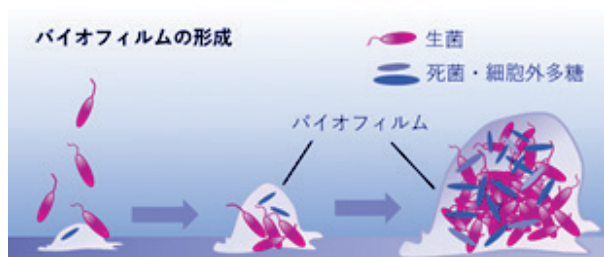


図1 バイオフィームの形成

1・2 近年のバイオフィーム研究の背景

近年、バイオフィームが要因となる感染症が報告されており²⁾³⁾、医療分野や歯科分野で問題視され始めている。これは、バイオフィームが感染症の原因菌などのバリアーとなることで、そのマトリックス内に存在する菌に対して高い薬物耐性を示すことが理由と考えられている。例えば、一度、バイオフィームが形成されると、菌にとっては頑丈な家の中に住むことになり、外敵(薬剤)が来ても何ら怖くないという状況になってしまうのである。

このため、バイオフィームの危険性が潜む様々な分野において、バイオフィームの形成阻害や分解のメカニズム解明に焦点を向けた研究が進められている。例えば、長期間患者の体内に埋め込まれる医療器具やカテーテルなど手術用医療器具、また歯科材料やその周辺器具などは、高度な感染症防止策が要求される。その他、私たちの生活に身近な浴室や台所など住環境および食品の衛生管理・向上を目指して、多くの研究機関や企業が研究を加速している。

2 バイオフィーム測定法

バイオフィーム内の菌やバイオフィーム形成量の評価には、その対象に応じて種々の方法が存在する。例えば、菌を測定対象にした手法では、コロニー形成法その他、顕微鏡やコールターカウンター、フローサイトメーターによる計数、代謝活性を指標にテトラゾリウム塩を用いた手法、ATP測定法などがある。また、総乾燥量やクリスタルバイオレット(以下、CV)法などはバイオフィーム形成量の評価に用いられる。いくつかの手法を表1に示すが、バイオフィームの分析手段は非常に多岐にわたっているために、標準化が進んでいないことが課題である。

一般的に微生物や菌の測定は、コロニー形成法のように操作が煩雑でトレーニングが必要とされている。一方、バイオフィーム評価で幅広く利用されるCV法は、比色試薬を用いた吸光度測定により結果が得られるため、コロニー形成法などの計数作業で発生しがちな属人的な測定誤差を抑えられるといった利点がある。しかし、CV法は万能ではなく、バイオフィーム形成後およびその後のCV染色後に洗浄の工程があるが、洗浄操作で物理的にバイオフィームが担体表面から剥離してしまうことでデータのバラつきを生じ易い。更に、検体数が増えると操作工程が多くなり測定に時間を要するため、慎重な操作と同時に効率性が要求される。このように、これらの操作はまだまだ煩雑で、また、そこから生じる測定誤差の問題は、多検体を処理する分析現場で用いるにはハードルとなり、このような課題はバイオフィーム研究の大きな妨げにもなっている。

表1 バイオフィーム評価方法の種類⁴⁾

直接的な方法	プレートカウント(コロニー計測)、顕微鏡による細胞計数、コールター細胞計数、フローサイトメトリー、蛍光顕微鏡など
間接的な方法	乾燥質量、全有機炭素、クリスタルバイオレット(CV)法、テトラゾリウム塩法、ATP生物発光法、総タンパク質測定法、水晶振動子(QCM)など

3 バイオフィーム測定法の改良

前述の通り、バイオフィーム評価方法に対する要望は、多検体処理、簡便さ、迅速さである。ここでは、これらの課題を克服した三つの異なる測定手法を紹介する。

まず、96穴マイクロプレート内でバイオフィームを形成する既存法を改良し、「バイオフィーム形成能」または「バイオフィーム内に存在する菌の代謝活性」を評価する二つの手法を解説する。これらは、主にバイオフィーム形成阻害剤や抗菌剤等の開発・評価に利用される。一方で、バイオフィームが形成する担体側に着目した研究アプローチも行われている。そこで三つ目の手法として、バイオフィームが形成しにくい（または形成しやすい）素材開発や素材の表面改良に対応できるよう、任意の素材を用いて評価ができる手法を紹介する。

3.1 ピンプレートを用いたバイオフィーム測定

菌がバイオフィームを形成する条件は菌種によって様々で、菌液の濃度や培養時間・培地組成などを検討する必要がある。そこで、96穴マイクロプレートを用いたバイオフィーム評価手法が、比較的簡便な操作で、複数の条件検討が同時にできることから普及し始めた。しかしながら、この手法はマイクロプレートのウェルに菌液を入れて菌を培養して、バイオフィームがウェルの内壁と底面に形成されるため、その後の工程で培養後の菌液や洗浄液およびCV染色液を各ウェルからピペット等を使用して出し入れする操作が必要になる。また、菌種や培養条件によっては、バイオフィームが内壁や底面から剥がれやすい場合があり、工程中のバイオフィームの剥離は吸光度測定に影響するため、洗浄工程では慎重な操作が要求される。

そこで、近年、ピン（またはペグ）と呼ばれる突起物を有する独特なマイクロプレートの蓋（以下、ピンプレート：図2）を利用する改良法（カルガリーバイオフィームデバイス法）が開発された⁵⁾。この手法では、96穴マイクロプレートの各ウェルに菌液を入れた後、ピンプレートで蓋をするとピンの先端から一部が菌液に

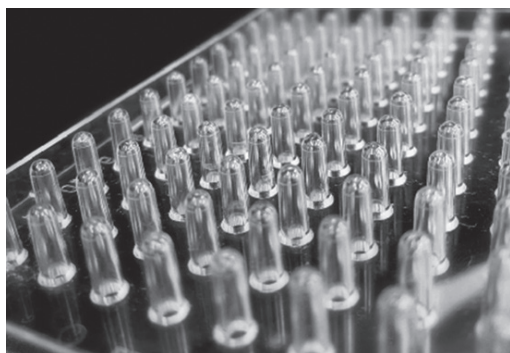


図2 ピン付きマイクロプレートの蓋

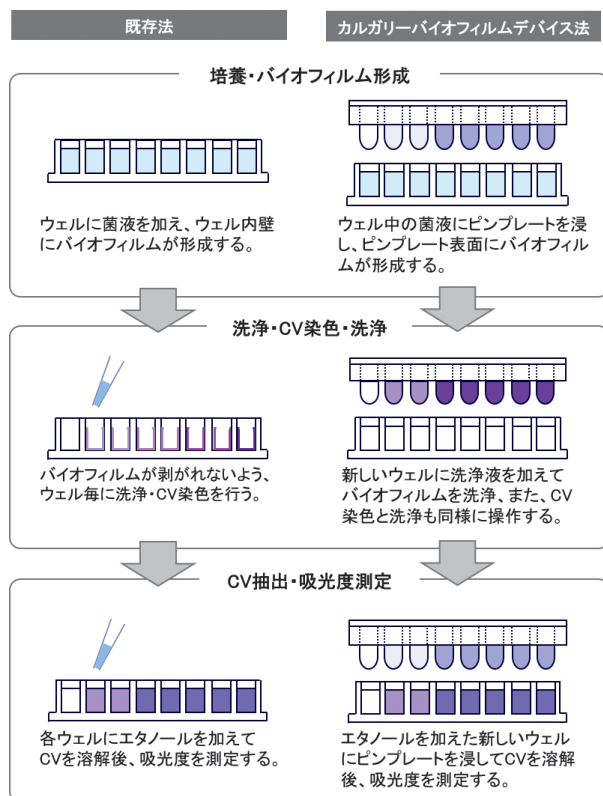


図3 バイオフィーム形成量評価方法の比較

浸されるため、培養後は各ピンの表面にバイオフィームが形成される。既存法と同様に、ウェルの内壁や底にもバイオフィームは形成されるが、カルガリーバイオフィームデバイス法ではピン表面のバイオフィームのみを測定に用いる。これによって、バイオフィーム形成後にバイオフィーム表面に付着する培地成分を洗浄する際に、あらかじめ、新しいマイクロプレートに洗浄液を入れたものを用意し、これにピンプレートを移してピンを洗浄液に浸すことで、一度にすべてのバイオフィームを洗浄することができる。前述した既存法の様にウェルごとに洗浄をする必要がないため、簡便性・迅速性向上に寄与する手法となった（図3）。

図4に黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）を用いて既存法とカルガリーバイオフィームデバイス法を比較した結果を示した。CV染色と洗浄操作を行った後のバイオフィームを観察したところ、既存法はバイオフィームが一部剥離したが（図4写真左）、カルガリーバイオフィームデバイス法では、ほとんど剥離しなかった（図4写真右）。また、染色後のCVをエタノールに抽出して吸光度を測定した結果、カルガリーバイオフィームデバイス法は既存法と比べて同一サンプルにおける吸光度のバラつきを抑えることができ、このことは洗浄操作の過程で生じるバイオフィームの剥離の少なさが寄与していると推察した（図4下図）。

実例として、黄色ブドウ球菌にε-Poly-L-lysineを作用させた場合の「最小バイオフィーム形成阻害濃度：minimum biofilm inhibitory concentrations (MBIC)」の測

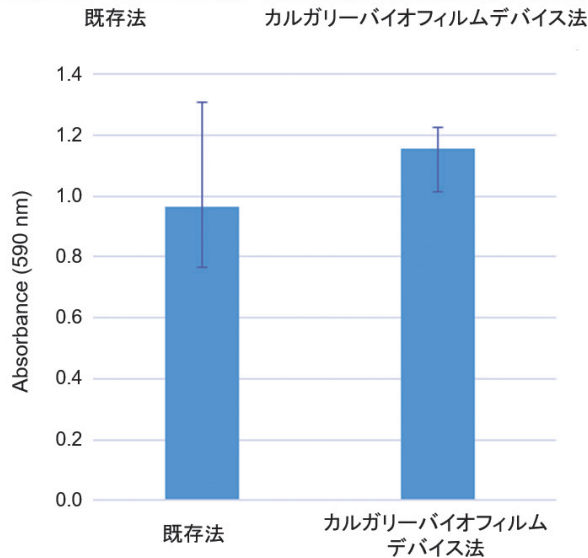
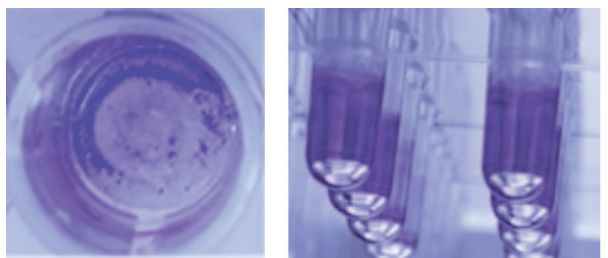


図4 バイオフィルム形成評価の比較
黄色ブドウ球菌の CV 染色後のバイオフィルム（既存法：写真左，カルガリーバイオフィルムデバイス法：写真右），CV 抽出後のエタノール溶液の吸光度比較（下図）。

定結果を示した（図5）。 ϵ -Poly-L-lysine 濃度が高くなるに従って CV 由来の 590 nm の吸光度が減少したことで，黄色ブドウ球菌のバイオフィルム形成が阻害され，その MBIC 濃度は約 250 $\mu\text{g/mL}$ であることが確認された。

このようにカルガリーバイオフィルムデバイス法は，バイオフィルム形成評価において簡便性と正確性を向上した手法として利用され，様々な薬剤感受性試験の事例が報告されている⁶⁾⁷⁾。

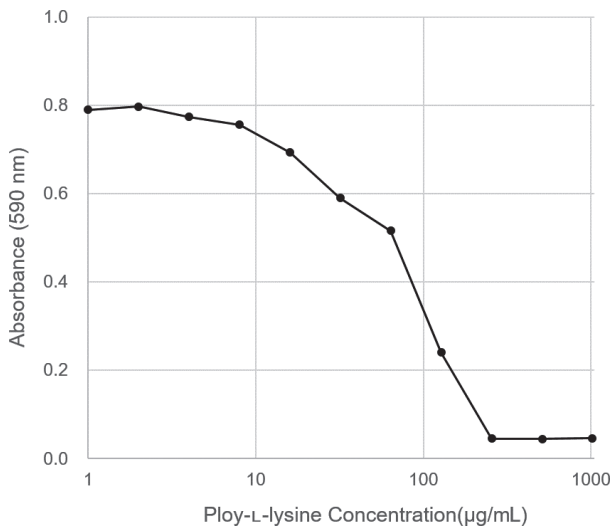


図5 *S. aureus* バイオフィルム形成阻害評価

3・2 バイオフィルム内の生菌代謝活性評価

次に，前述のカルガリーバイオフィルムデバイス法を応用し，バイオフィルム内の生菌の代謝活性を測定する技術を紹介する。

生菌の検出方法には，菌を培養し生じたコロニーを計数する寒天平板培地法，蛍光色素で菌を染色する蛍光染色法，増殖能を持つ菌を検出する DVC 法，特定の菌を検出する FISH 法や遺伝子増幅法等が存在し，目的に応じて使い分けられるが，ここでは菌のエネルギー代謝活動に関与する補酵素 NADH (NADPH) の還元能を利用した手法を採用した。還元性発色試薬と一種として知られるテトラゾリウム塩 WST-1 は，電子メディエーターと共存することで NADH (NADPH) から電子を受け取り還元され，ホルマザンと呼ばれる有色（橙色）の物質となる。そのため，生成したホルマザン量と吸光度には相関が有り，この吸光度を測定することで菌の代

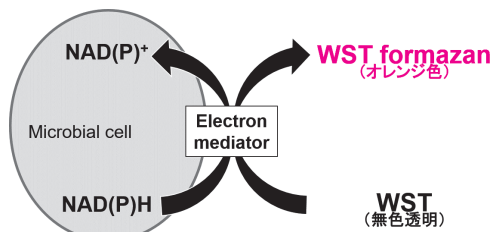


図6 微生物代謝活性の検出原理（WST 法）

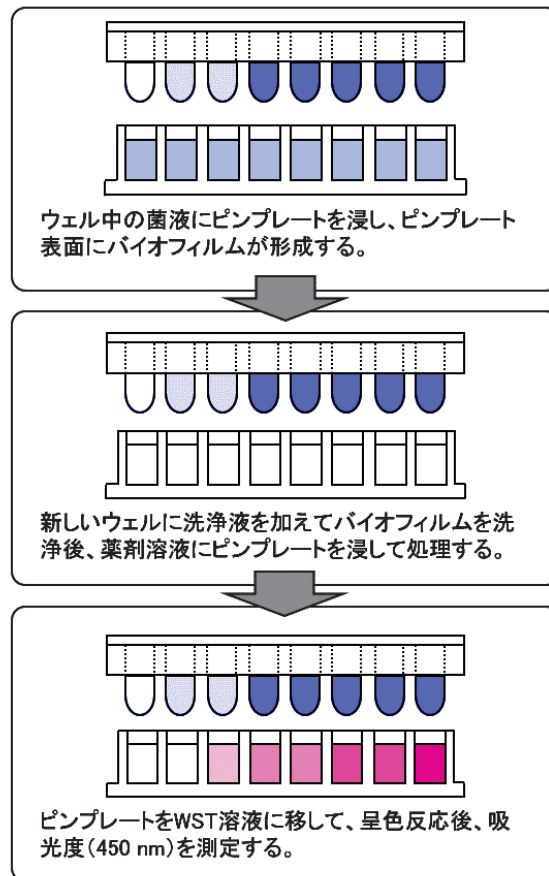


図7 微生物代謝活性の測定方法

謝活性を評価することができる (図 6)。

尚、この WST-1 ホルマザンは、水溶性が高いため培地中でも不溶化することが無く、また、発色後の退色もほとんど無いため、吸光度測定に適した試薬として知られ、動物細胞の代謝活性をはじめ種々な生体試料の測定試薬に幅広く採用されている。

本手法は、カルガリーバイオフィームデバイス法の CV 染色・洗浄工程が WST 溶液を用いた発色反応に替わる以外は、同様にピンプレートを移動させる操作を行う。そのため、バイオフィームの剥離を抑えられ、また、CV 法でも用いる比色のマイクロプレートリーダーを使用することができる (図 7)。

テトラサイクリン系抗生物質である minocycline が、バイオフィームを形成した黄色ブドウ球菌に与える薬剤効果を評価した結果を図 8 に示した。同一のマイクロプレートで minocycline 濃度および薬剤暴露時間を変えて、各条件における WST-1 ホルマザン由来の吸光度 (450 nm) を測定した。Minocycline 濃度が低い領域では薬剤暴露時間が長くなるに従って吸光度が高くなるが、これは minocycline が黄色ブドウ球菌の代謝活性に与える影響が弱く、薬剤暴露中も菌が生存して増殖し続けていると考えられる。この結果から黄色ブドウ球菌の代謝活性に影響を与える minocycline 濃度と暴露時間が判り、また、「最小バイオフィーム撲滅濃度 minimum biofilm eradication concentrations (MBEC)」は、約 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ということが確認された。

この手法は、生菌の代謝活性を評価することに便利であるが、前述の通り、バイオフィームはマトリックス内の菌を薬剤や外的要因から保護するため、試薬 (WST 溶液) も薬剤と同様、バイオフィームの内部に存在する菌に対して試薬が作用し難いことが推察される。そのため、バイオフィームの表面付近に位置する菌の代謝活性を反映している可能性には留意しなければならない。詳細な評価のためには、バイオフィームに超音波処理等を施してバイオフィーム内部の菌も分散した試料を用意し、WST-1 による代謝活性評価や寒天平板培地法など

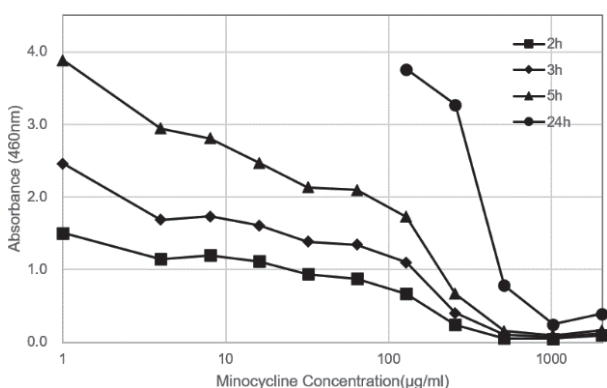


図 8 黄色ブドウ球菌由来バイオフィームに対する minocycline の MBEC 評価

の他の手法との併用を考慮する必要がある。

3.3 試験片を用いたバイオフィーム測定

ピンプレートを用いた手法は、バイオフィームが形成される担体 (ピン) の素材がポリスチレン (PS) であるため、バイオフィーム形成能を素材の性質で制御するような機能性素材開発のニーズに対応ができなかった。そこで、カルガリーバイオフィームデバイス法を改良して、任意の素材でもバイオフィーム形成能を評価できる手法をここで紹介する。

素材開発の現場では、対象の素材を任意の大きさに平板状に加工した「試験片」と呼ばれるものが使用されている。評価方法は、試験片をビーカー等の容器の底に平置きし、これに菌液を加えて試験片表面にバイオフィームを形成させ、その後、バイオフィームを剥離させないよう慎重に試験片を扱いながら測定する。また、対象となる素材は、業種や研究分野で様々あり、プラスチックのように成型し易いものばかりではなく、金属やセラミックなども存在する。そのため、カルガリーバイオフィームデバイス法のような 96 穴マイクロプレートに対応したピンプレートを対象の素材で作成することは、コスト面・技術面ともハードルが高く、実現の可能性は低かった。

そこで、任意の試験片を脱着可能な 24 穴プレート用の蓋 (以下、TestPiece Holder) を開発した (図 9)。TestPiece Holder に試験片を取り付けることで、カルガリーバイオフィームデバイス法と同様の洗浄・染色操作が可能となり、バイオフィームが剥がれにくく、多検体処理に対応した手法となった (図 10)。

本法と既存法を比較したところ、既存法は洗浄操作により試験片からのバイオフィームの剥離が発生し、試験片同士でも剥離の程度に差があることが確認された (図 11 写真左)。一方、本法は、洗浄操作を注意深く行うことは既存法と同様であるが、バイオフィームの剥離は抑えられ、試験片同士の差も殆ど見られなかった (図 11 写真右)。CV 抽出エタノール溶液の吸光度測定からも、そのバラつきが抑えられたことが確認された (図 11 下図)。

次に、素材の種類が異なる試験片 (ポリスチレン [PS], ポリプロピレン [PP], 繊維強化プラスチック

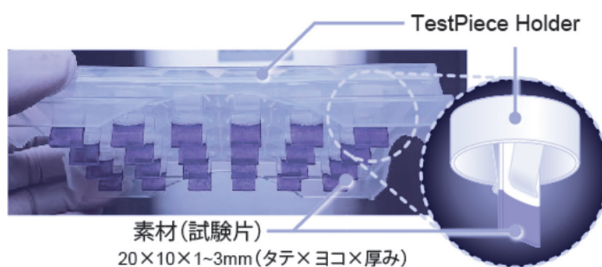


図 9 TestPiece Holder に固定した試験片

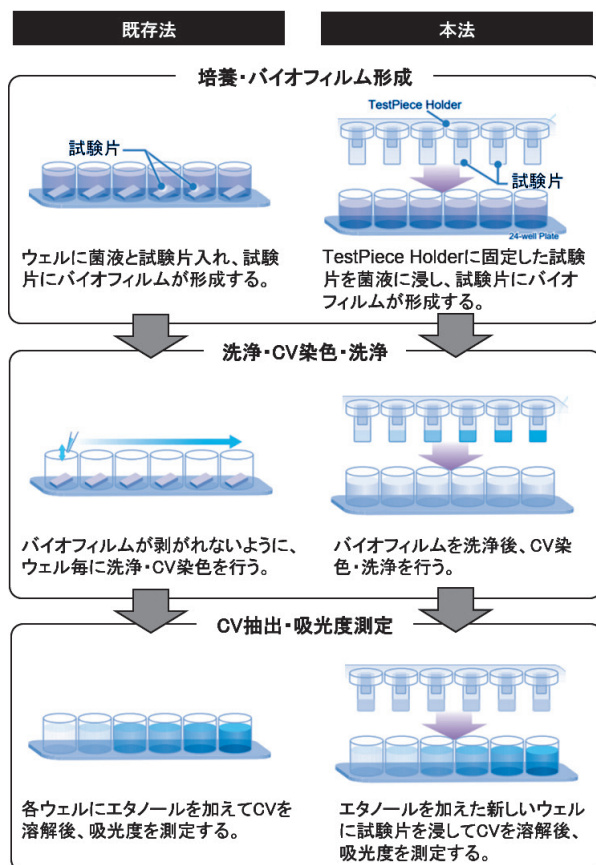


図 10 素材毎のバイオフィーム形成量評価
各素材表面に形成した黄色バイオフィームの CV 染色（上図写真）、CV 抽出後のエタノール溶液の吸光度比較（下図）。

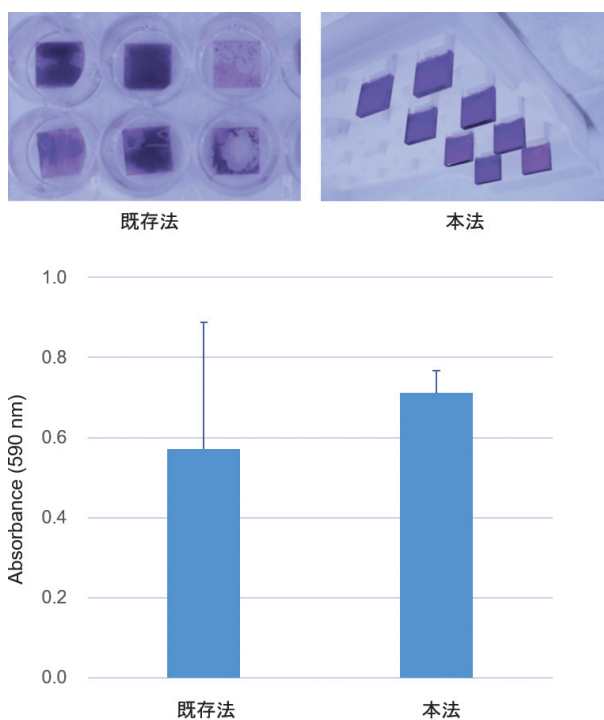


図 11 バイオフィーム形成評価（試験片）の比較
黄色ブドウ球菌の CV 染色後のバイオフィーム（既存法：写真左、本法：写真右）、CV 抽出後のエタノール溶液の吸光度比較（下図）。

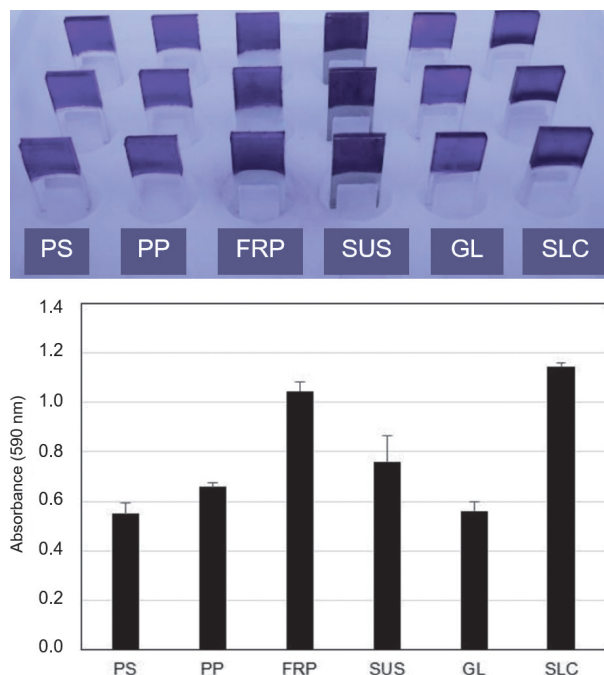


図 12 素材毎のバイオフィーム形成量評価
各素材表面に形成した黄色バイオフィームの CV 染色（上図写真）、CV 抽出後のエタノール溶液の吸光度比較（下図）。

[FRP], ステンレス [SUS], フロートガラス [GL], シリコンゴム [SLC]) を用いて黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成量を評価した。筆者らの培養および測定条件においては、FRP および SLC が他の素材と比較して、バイオフィームがより形成されたことが分かった（図 12）。このように、本法と試験片を用いることで、種々の素材評価を効率良くまた定量的に行うことが可能となった。

4 ま と め

バイオフィームの評価方法は、これまでに試行錯誤を経ながら、カルガリーバイオフィームデバイス法などの改良が進められてきたが、今回、筆者らは実際の測定現場の声を元に、検体数や測定条件の検討数の多さ、煩雑な操作、測定値のバラつき等の既存法が抱える課題を克服する測定手法の開発および実用化を行った。

ここで紹介した実施例は、特定の菌を用いた基礎的な評価であり、実際には、私たちの体の中や生活環境中に存在する菌の種類は非常に多く、また、それらが混在した状態で存在する。そのため、バイオフィームが形成される環境を実験室で如何に再現できるかは、バイオフィームの評価を行う方々にとって重要な要素であり、様々な条件検討が要求される。このために、今回紹介した測定手法が、この分野の研究・開発に役立ち、多くの産業の発展に寄与できることを期待している。

謝辞

本技術を開発するにあたり、甚大なるご協力を賜りました福

岡山工業技術センター 生物食品研究所 塚谷忠之氏、坂田文彦氏に深く感謝いたします。

文 献

- 1) H. C. Flemming, J. Wingender, U. Szewzyk, P. Steinberg, S. A. Rice, S. Kjelleberg : *Nat Rev Microbiol.*, **14**, 563 (2016).
- 2) L. Hall-Stoodley, P. Stoodley, S. Kathju, C. Moser, J. W. Costerton, A. Moter, T. Bjarnsholt : *FEMS Immunol Med Microbiol.*, **65**, 127 (2012).
- 3) T. Coenye, HJ. Nelis : *J Microbiol Methods.*, **83**, 89 (2010).
- 4) C. Wilson, R. Lukowicz, S. Merchant, H. Valquier-Flynn, J. Caballero, J. Sandoval, M. Okuom, C. Huber, T. D. Brooks, E. Wilson, B. Clement, C. D. Wentworth, A. E. Holmes : *Res Rev J Eng Technol.*, **6**, 4 (2017).
- 5) H. Ceri, M. E. Olson, C. Stremick, R. R. Read, D. Morck, A. Buret : *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 1771 (1999).
- 6) A. L. S. Antunes, D. S. Trentin, J. W. Bonfanti, C. C. F. Pinto, L. R. R. Perez, A. J. Macedo, A. L. Barth : *APMIS*, **118**, 873 (2010).
- 7) T. Tsukatani, T. Kawaguchi, H. Suenaga, M. Shiga, T. Ikegami : *J. Microbiol. Biotechnol. Food sci.*, **6**, 677 (2016).



江藤陽介 (Yosuke ETO)
株式会社同仁化学研究所 (〒861-2202
熊本県上益城郡益城町田原 2025-5).
E-mail : eto@dojindo.co.jp



高口唯奈 (Yuina KOGUCHI)
株式会社同仁化学研究所 (〒861-2202
熊本県上益城郡益城町田原 2025-5).
E-mail : y-kouguchi@dojindo.co.jp



中尾美紀子 (Mikiko Nakao)
株式会社同仁化学研究所 (〒861-2202
熊本県上益城郡益城町田原 2025-5).
E-mail : u-mikiko@dojindo.co.jp



高橋政孝 (Masataka TAKAHASHI)
株式会社同仁化学研究所 (〒861-2202
熊本県上益城郡益城町田原 2025-5).
E-mail : m.takahashi@dojindo.co.jp

会社ホームページ URL :

<https://www.dojindo.co.jp/>

関連製品ページ URL :

<https://www.dojindo.co.jp/products/B601/>

<https://www.dojindo.co.jp/products/B603/>

<https://www.dojindo.co.jp/products/B606/>