

96ピンマイクロプレートを用いた迅速かつ簡便なバイオフィルム形成阻害活性測定法

塚谷 忠之*1 坂田 文彦*1 黒田 理恵子*1

A Rapid and Simple Measurement Method for Biofilm Formation Inhibitory Activity Using 96-Pin Microtiter Plate Lids

Tadayuki Tsukatani, Fumihiko Sakata and Rieko Kuroda

バイオフィルムは慢性的な感染症の大きな要因となっているため、バイオフィルムの形成を未然に防ぐことは疾病予防の観点から重要視されている。このため、バイオフィルム形成阻害活性を有する素材の探索が進められているが、実用的なスクリーニング法がないことが探索の障壁となっている。本研究では、96ピンマイクロプレート（フタ）へのバイオフィルム形成法及びクリスタルバイオレット染色法を組み合わせたバイオフィルム形成阻害活性測定法を開発した。本法は、従来法と比較して操作性、迅速性、再現性が格段に優れており、バイオフィルム形成阻害活性を有する素材のスクリーニング法として有用であることが示された。また、本法を用いることでバイオフィルム形成阻害活性を有する食材（水抽出液）を5種類見出すことができた。

1 はじめに

微生物により産生されるバイオフィルムは、慢性的な感染症の大きな要因となっている。このため、バイオフィルムの形成を未然に防ぐ観点から、特に安全性の高い食材を中心にバイオフィルムの形成阻害作用を有する素材を探索する動きが活発化している。しかし、従来のスクリーニング法では、一度に多検体の試料を測定することができないため、有望な素材を探索する障壁となっている。従来法では、96ウェルマイクロプレートのウェルの底にバイオフィルムを形成させ、その形成量を評価する手法が用いられている。このため、ピペットで上清培地や洗浄液、染色液を除去・分注する操作が必要であり、操作が非常に煩雑で長時間を要する。また、ピペッティングによる操作で形成したバイオフィルムを破壊してしまう可能性が非常に高く、再現性に乏しいことも大きな問題点である。

そこで、本研究では96ピンマイクロプレート（フタ）へバイオフィルムを形成する手法を確立し、多検体試料の一斉測定が可能なバイオフィルム形成阻害活性測定法の開発を行った。さらに、各種食品添加物や食材の水抽出液へ本法を適用し、バイオフィルム形成阻害活性を有する素材の探索を行った。

2 研究, 実験方法

2-1 バイオフィルム形成及び形成量の測定

図1に示すように、96ウェルマイクロプレートへ微生物懸濁培地190 μ l及び試料（食材水抽出液）10 μ lを分注し、これに96ピンマイクロプレート（フタ）を被せて37 $^{\circ}$ Cで一定時間インキュベーションした。培養後、滅菌生理食塩水を分注したマイクロプレートへ96ピンマイクロプレート（フタ）を被せることにより洗浄した。次に、0.1%クリスタルバイオレット水溶液（200 μ l）を分注したマイクロプレートへ96ピンマイクロプレート（フタ）を被せ、1時間染色した。さらに、ピンを十分洗浄後、99.5%エタノール（200 μ l）を分注したマイクロプレートへ被せ、ピン上に染色された色素を抽出した。受けプレートの吸光度（595 nm）を測定し、バイオフィルムの形成量とした。

3 結果と考察

3-1 バイオフィルム形成条件の検討

バイオフィルム形成条件として、培地組成、菌体密度、培養時間、培地交換、培養温度、ピン素材の検討を行い、微生物（13種類）の96ピンマイクロプレート（フタ）への最適なバイオフィルム形成条件を確立した。

*1 生物食品研究所

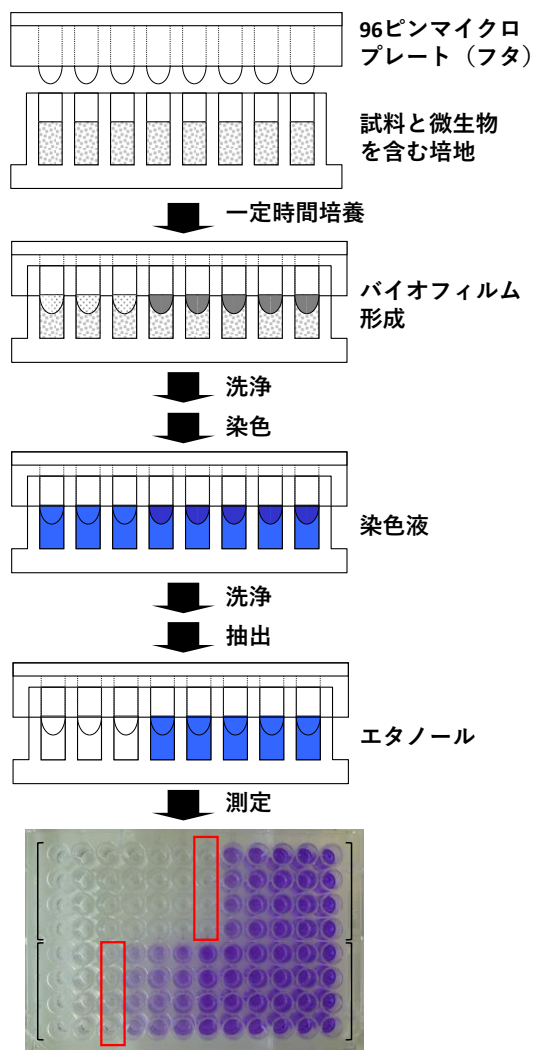


図1 バイオフィーム形成阻害活性測定法

3-2 バイオフィーム形成阻害活性測定法の確立

バイオフィーム産生菌として、黄色ブドウ球菌、大腸菌、う蝕菌、歯周病菌等を用いてバイオフィーム形成阻害活性測定法の確立を行った。

まず、ピン存在下における試料とバイオフィーム産生菌の接触・培養法について検討した。試料とバイオフィーム産生菌を24時間接触させた後、再び試料を含む新鮮培地と共に72時間培養する手法を採用することで、再現性の高い結果が得られた。変動係数 (n=32) はいずれの菌株についても10%以下であった。一方、従来法では変動係数が10%を超える菌株もあり、再現性の良い結果が得られなかった。

次に、ピンに形成されたバイオフィーム量を定量するために、クリスタルバイオレット染色法及び溶出法の最適化を行った。クリスタルバイオレット濃度は0.1%、染色時間は1時間が最適であった。また、種々の抽出溶媒を検討しところ、99.5%エタノールが幅広

い菌種のバイオフィームに対する色素の溶出に適していることが分かった。

図1に示すように、本法では受けの96ウェルマイクロプレート交換するだけで96ピンへ形成したバイオフィームの洗浄や染色が可能になるため、操作が飛躍的に簡便かつ迅速になり、多検体の一斉測定が可能となった。これにより、操作時間を従来法（ウェルの底にバイオフィームを形成させる手法）と比べて1/10以下に短縮することができた。また、本法では操作ミスによるバイオフィームの破壊の可能性も格段に低くなると考えられた。本研究により、従来法と比較して、操作性、迅速性、再現性が格段に優れたバイオフィーム形成阻害活性測定法を確立することができた。

3-3 バイオフィーム形成阻害活性を有する素材の探索

498種類の食材（水抽出液）をう蝕菌に対するバイオフィーム形成阻害スクリーニング試験に供した。その結果、バナバ、甜茶、グアバ、プアール茶、黄柏末の水抽出液が90%以上のバイオフィーム形成阻害活性を示した（図2）。

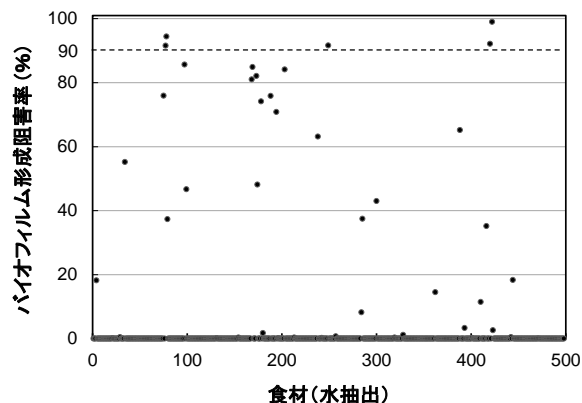


図2 バイオフィーム形成阻害活性のスクリーニング

4 まとめ

本法は、従来法と比較して操作性、迅速性、再現性が格段に優れており、バイオフィーム形成阻害活性を有する素材のスクリーニング法として有用であることが示された。

5 掲載論文

World Journal of Microbiology and Biotechnology, Vol. 36, No. 12, pp. 1-9 (2020)