

2017年度SIAA委員会活動報告会

抗バイオフィルム試験法について

平成30年01月29日

バイオフィルム標準化委員会 検討試験分科会 分科会長

太田 知克

1.抗菌製品技術協議会の取り組み

2.標準試験法策定について

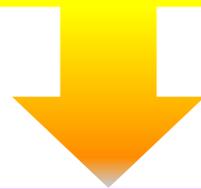
1.抗菌製品技術協議会の取り組み

バイオフィルムの発生(形成)場所

水が存在する場所で、様々な物質の表面を足場とすることによりバイオフィルムが形成される。

- ・台所のシンク, 排水パイプの内壁, エアコン内部や排水ダクト等
- ・口腔内(歯の表面, 歯周ポケット内の歯垢, 舌苔等)
- ・生体内で用いる医療用デバイス(義歯, ステント, 人工血管, 人工関節等)

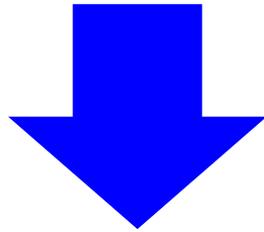
危害: むめり(汚れ)の発生, 送水配管の腐食やスライム状物質による詰り, 生体材料の汚染に伴う感染症等



- ・バイオフィルムの除去技術の開発
- ・バイオフィルムを付着させない/増殖させない 素材の開発

抗菌製品技術協議会として・・・

抗菌，防カビ，抗ウイルスに続く新たな
素材の評価（法）としての確立を目指す。



試験方法の開発から評価基準の設定へ
と進め、**新SIAAマーク**の制定を目指す。

これまでの取り組み①

2015年度:

- ・中期計画戦略委員会からの提言を受け、抗菌・防カビ・抗ウイルスに続く将来テーマとして「バイオフィルム」に取り組むこととなった。
- ・評価技術委員会に『バイオフィルム分科会』を設置し、有識者として鈴鹿高専 兼松教授，生貝教授(現在人間総合科学大学所属)との共同研究をスタートするとともに、各種情報収集を行った。

2016年度:

- ・抗バイオフィルム(バイオフィルム・ぬめりの形成抑制)性能を評価する試験法の作成に取り組むため『バイオフィルム標準化委員会』を発足させた。
- ・バイオフィルム形成法及びバイオフィルム定量試験法の開発について、鈴鹿高専との共同研究も併せ、基本検討を行った。

これまでの取り組み②

2017年度:

- ・『バイオフィルム標準化委員会』の中に試験機関を中心として『検討試験分科会』を発足させた。
- ・基本条件(菌種, 培養条件, 接触条件, 簡易定量法等)の検討を行い, バイオフィルム形成から定量までの基本的な試験フローの作成を行った。
- ・2017年日本防菌防黴学会第44回年次大会及びIBRG Autumn Meeting 2017 & Biofilm SymposiumにおいてSIAAの「抗バイオフィルム試験」に対する取り組みを紹介した。
- ・検討試験分科会にて, テストサンプルを用いることで試験データの収集を行い、標準試験方法としての確立を目指す。

2017バイオフィルムシンポジウム (奈良)



Mini-symposium on Biofilm

Friday 17th November 2017

Nara Kasugano International Forum,
Japan

Hosted by IBRG & SIAA



Program

Friday 17th November

09:30 – 09:50 Arrival

09:50 – 10:00 Welcome / SIAA

Session Chair: Hideyuki Kanematsu

10:00 – 11:00 **Darla M. Goeres**

Title 1: About Center for Biofilm Engineering Montana State

University

Title 2: The methods of ASTM and US EPA guidelines for

testing the efficacy of antimicrobial products against

biofilm on hard, non-porous surfaces

11:00 – 11:30 **Hideyuki Kanematsu**

Title: The measurement methods of biofilms by using crystal

violet

11:30 -12:00 **Tomokatsu Ota**

Title: The draft measurement methods of anti-biofilm activity

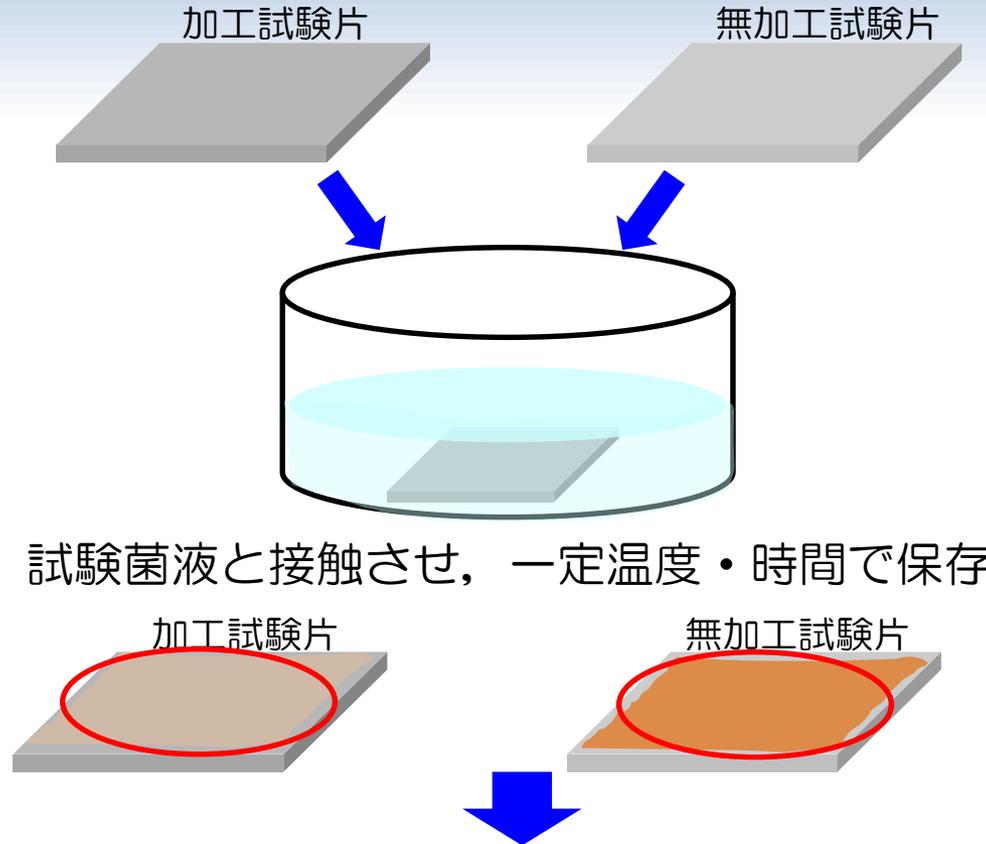
on non-porous surfaces by SIAA

検討試験分科会メンバー

氏名	所属
太田 知克(分科会長)	一般財団法人日本食品分析センター
吉田 育弘	三菱電機株式会社
堀内 智博	一般財団法人日本食品分析センター
中曽根 寿明	一般財団法人カケンテストセンター
射本 康夫	一般財団法人日本繊維製品品質技術センター(QTEC)
室巻 良彦	一般財団法人ボーケン品質評価機構大阪事業所
村田 貴洋	一般財団法人ニッセンケン品質評価センター
土屋 禎	一般財団法人日本食品分析センター

2.標準試験法策定について

試験方法のイメージ



試験片の形は？

試験菌株は？
菌液調製溶液(培地)は？
接触方法(静置/流水)は？
保存温度・時間は？

EPSの測定方法は？
試験片の測定場所は？
評価基準値は？

各試験片上に形成されたEPS*の量を測定
※細胞外重合物質 (Extracellular polymeric substance, **EPS**)

活性値のような評価値を設定

(例：【無加工試験片のEPSの量】－【加工試験片のEPS】)

→ 性能評価基準の設定

試験法策定手順

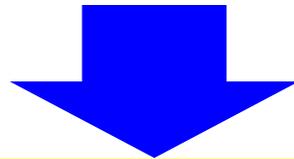
①試験菌種（菌株）の選定

②試験片へのバイオフィルムの形成

③形成したバイオフィルムの定量

①試験菌種（菌株）の選定

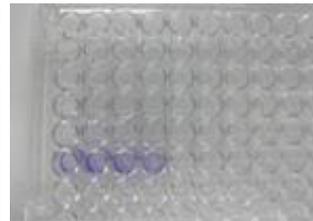
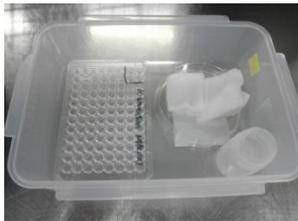
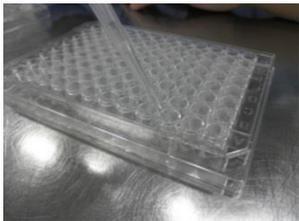
- 多量のEPS（バイオフィルム）を形成すること。
- 試験菌株として取り扱いが容易であること。
- 世界微生物株保存連盟（WFCC）に加盟している菌株分譲機関から入手可能であること。



文献等の情報（性状，分離源等）を基に菌株の選定を行い，**クリスタルバイオレット**による染色により様々な菌種・菌株のバイオフィルム形成能の確認を行う。

クリスタルバイオレットによる染色法

- 1) 試験菌を液体培地に接種・培養後、同じ液体培地を用いて約 10^3 個/mLとなるように調製
- 2) 96穴マイクロプレートに調製した試験菌液を100 μ L分注後、培養
- 3) 培養後、上澄みを取り除き、精製水で洗浄
- 4) 0.1 %クリスタルバイオレット溶液を100 μ L加え、30分間染色した後、それを取り除く
- 5) 精製水で洗浄した後、99.5 %エタノールを100 μ L添加してクリスタルバイオレットを溶出
- 6) マイクロプレートリーダーを用いて 吸光度(波長:570 nm)を測定



クリスタルバイオレットによる各菌種(菌株)の染色結果の一例

菌種(菌株)

溶出後の一例

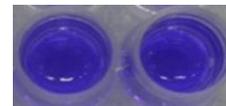
Pseudomonas aeruginosa NBRC 13275



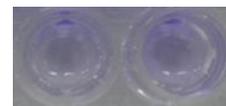
Pseudomonas fluorescens IFO 14160



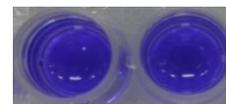
Brevundimonas diminuta ATCC 19146



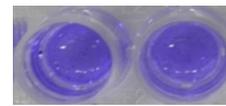
Alcaligenes faecalis IFO 13111



Staphylococcus epidermidis ATCC 35984



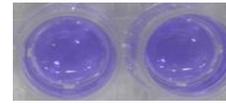
Rhodococcus rhodochrous JCM 3202



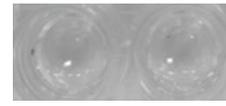
Rhodotorula mucilaginosa NBRC 0911



Rhodotorula mucilaginosa NBRC 0889



Methylobacterium radiotolerans NBRC 15690



試験菌株として・・・

Brevundimonas diminuta NBRC14213

*Brevundimonas*は非発酵性グラム陰性桿菌で、水や土壌等の自然界に広く分布している。*B. diminuta*は1994年に *Pseudomonas*から移行された種で、水や臨床からの分離例が報告されている。

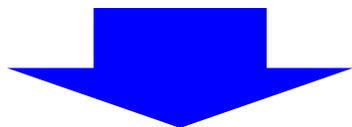
Staphylococcus epidermidis ATCC35984

*Staphylococcus*は通性嫌気性のグラム陽性球菌で、温血動物の皮膚や食品等から分離される。日和見感染症の原因となる菌種や、食品の腐敗原因となりうる菌種も知られている。*S. epidermidis*(表皮ブドウ球菌)は主にヒトの皮膚に存在している。

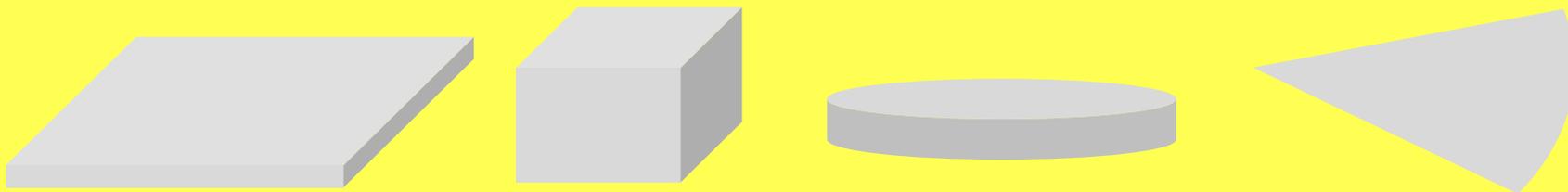
②試験片へのバイオフィルムの形成

想定される試験片

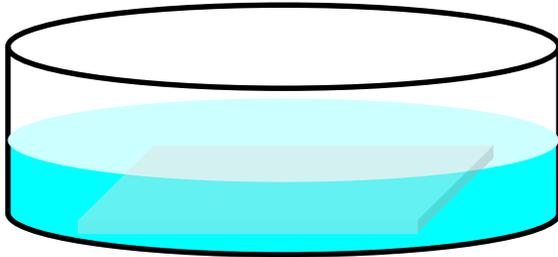
- バイオフィルムの形成を抑制・阻害する剤が塗布/練り込みがされたもの
- バイオフィルムの形成を抑制・阻害する目的で物理的な表面加工がされたもの



形・大きさ・厚さ

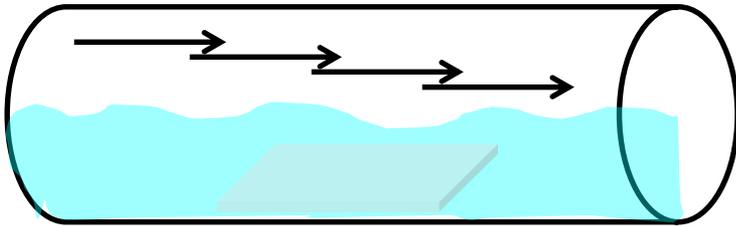


- ・ **静置**状態で形成されるバイオフィォルムを想定



浮力の大きい試験片は？
試験対象面は？

- ・ **流水**状態で形成されるバイオフィォルムを想定



試験対象面は？
試験片の固定は？
水流の強さ・方向は？
試験片を入れる容器は？
流水を作る装置は？

➡ 流水での試験系は様々な面で検討が必要

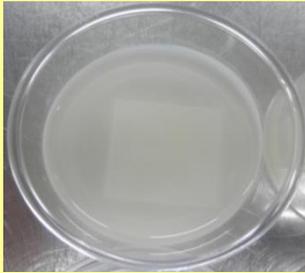
静置状態における試験方法の検討



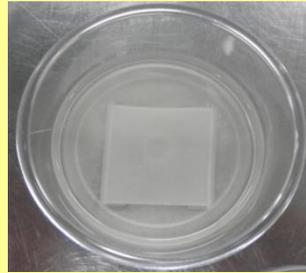
試験片

- ・ポリプロピレン製の平板
- ・大きさ: 3cm × 3cm(厚さ1mm)

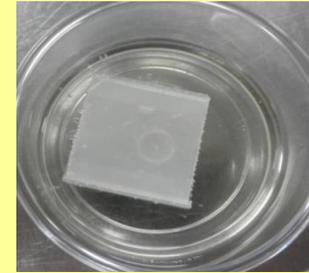
↓ ½倍濃SCD培地, 30~35°C, 2日間培養



S.epidermidis

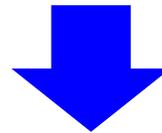


B.diminuta

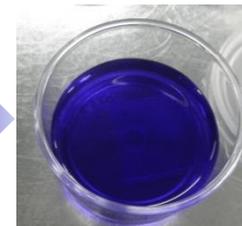
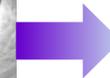


未接種

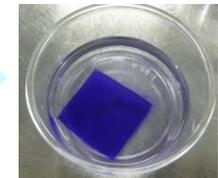
培養後の試験菌液の生菌数測定も行い, 増殖度合いの確認も行う。



試験片を取り出し水洗・乾燥後, 0.1%クリスタルバイオレット溶液にて染色・水洗



×3回

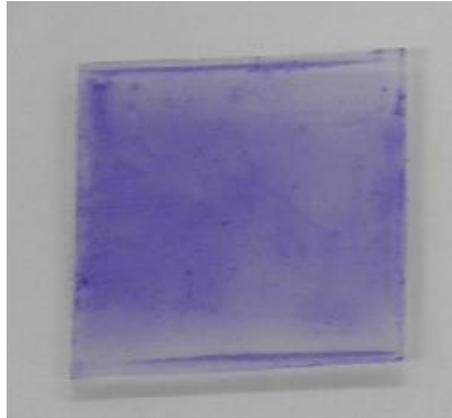


静置状態における試験方法の検討

染色・水洗後の試験片の一例



S.epidermidis



B.diminuta



未接種



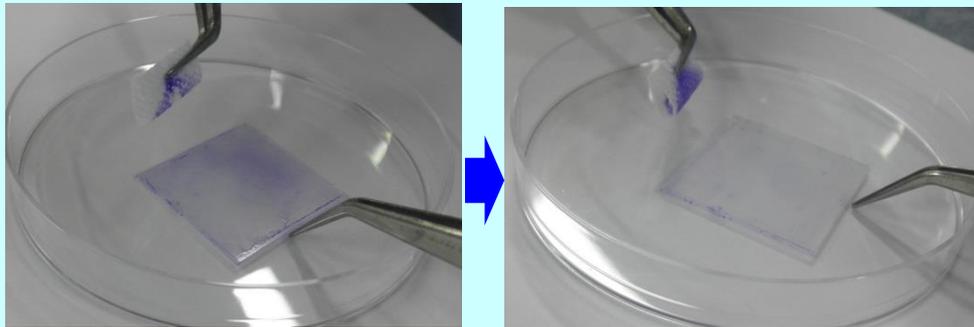
クリスタルバイオレットを溶出させ、溶出液の吸光度を測定することでバイオフィルムの量を**定量的**に測定する。

③形成したバイオフィルムの定量

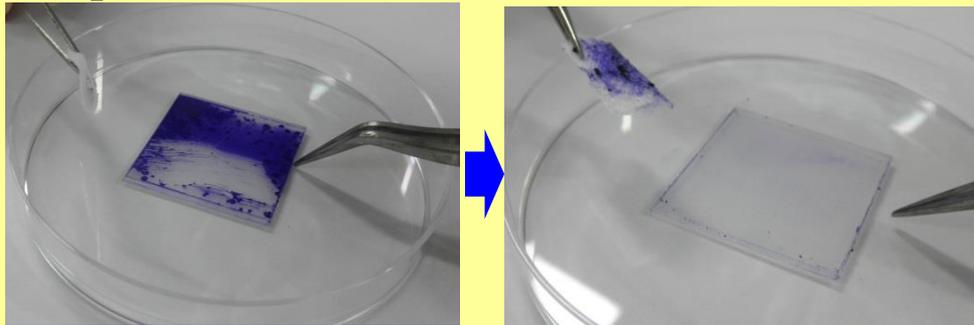
水溶性の繊維を用いたふき取り法による定量法の検討

水溶性の繊維(クラロンK-II [クラレ])を用いて、クリスタルバイオレットで染色された試験面をふき取り、溶解させる。

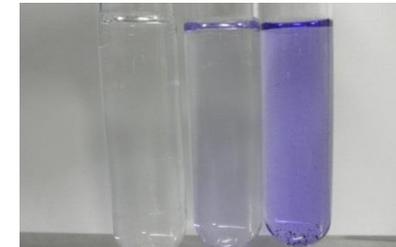
B. dimimuta



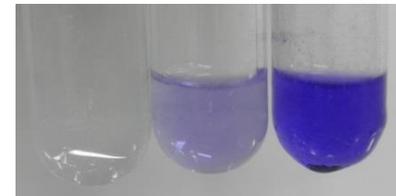
S. epidermidis



精製水10mlに溶解



精製水2mlに溶解



左より

- ブランク
- *B. dimimuta*
- *S. epidermidis*

今後の活動

- 複数の試験機関による試験法の確認
- 試験系（静置／流水）の確立
- 加工サンプルを用いた試験法の確認
- 国際規格（ISO）への試験法提案
- 性能評価基準の設定

ご清聴ありがとうございました。