

次世代ライフサイエンス技術開発プロジェクト

プロジェクトリーダー 石黒 斉

【基本構想】

本プロジェクトは国際評価技術センターとして、「感染症」、「未病」に関する評価サービスの提供による企業支援を推進していくとともに、新しい評価方法の提供に向けた研究開発を行っている。「感染症」に関しては、抗菌分野(JIS Z 2801)の ISO 17025 を取得・維持しており、高い品質による抗菌・抗ウイルス性能評価サービスの提供、各種団体の認証マーク取得に向けた性能評価サービスの提供等を通じて、企業の研究開発を推進できるように取り組みを続けている。更に、本プロジェクトによる性能評価サービスの特徴として、規格試験では対応できない抗菌・抗ウイルス材料について、応用的な性能評価方法を組み立てた性能評価サービスの提供を行っている。「未病」に関しては、食品成分の機能性を明らかにすることにより、各企業の製品の付加価値を高めるための機能性評価サービスを提供している。具体的には食品の成分分析や細胞や生体に食品成分を作用、摂取させることによって起こる遺伝子発現の変動を明らかにすることで、食品成分の機能性を評価するサービスであり、「ワンストップ型食品機能性評価サービス」として神奈川県未病ブランドの認定を受けている。上記に加えて、新しい評価系技術の構築への取り組みとして、「再生・細胞医療」に関して、細胞の特性を理解し、品質を評価するサービスの提供に向けた取り組みを開始している。2023 年度は間葉系幹細胞(MSC)のロット間における細胞集団と血管新生因子の発現量の違いを明らかにしており、細胞品質特性マーカーによる MSC の品質管理の手法を確立している。また、iPS 細胞についての品質特性マーカーの探索を進めており、神経前駆細胞へ分化しやすい iPS 細胞株を予測できるマーカーを明らかにしている。現在は、これらの技術を更に展開することで、新しい品質特性マーカーの探索や各企業の製品開発の品質特性を評価できるサポート体制を整えているところである。

1. 2023 年度の研究目的

2023 年度の取り組みとして、以下について重点的に取り組みを進めた。

1-1. 各種抗微生物材料・製品の性能評価サービスの提供

昨年度に引き続き、ISO 17025 の維持と技術の向上に向けた取り組みを行うとともに、各種材料による抗微生物性能評価サービスの提供を行う。特に、規格外の材料や製品について、適切な試験方法を組み立てた性能評価方法を提供していく。これにより、各企業の研究開発を推進していく。また、2023 年度に、抗かび性能評価試験や抗バイオフィーム性能評価試験を新しい性能評価サービスとして提供すべく、性能評価サービス提供への整備を進めるとともに、更に安定した品質の高い評価サービスとするための検討を進めた。特に、抗バイオフィーム試験は ISO 4768 として、2023 年に標準化されており、市場において注目されている性能評価試験方法である。一方で、作業が煩雑な面もあり、安定した結果を出すための検討が今後必要と考えられる。今年度は静置培養時の条件による違いと試験結果に及ぼす影響について明らかにすることを目的とした検討を進めた。

1-2. 新たな評価サービスの提供に向けた取り組み

新たな評価サービスとして、①再生細胞医療に関わる細胞特性の理解と品質評価サービス、②実ウイルスを用いた光触媒の抗ウイルス性能評価試験方法の国際標準化の二つのテーマについて、取り組みを進めた。

再生細胞医療の細胞特性の理解と品質評価サービスでは、シングルセル解析による間葉系幹細胞(MSC)の有効性を評価する方法が研究や製品開発の重要な点になると考え、経済産業省「令和 4 年度第二次補正予算「再生・細胞医療・遺伝子治療の社会実装に向けた環境整備事業費補助金」の「東日本における再生・遺伝子細胞治療の社会実装基盤の構築(代表機関：学校法人藤田学園)」」に参画した中で、MSC の品質特性マーカー探索から品質評価方法確立の基盤整備として、シングルセル解析装置の導入を行った。また、シングルセル解析に用いる各種キットの比較を開始し、品質評価サービスに使用する適切な手法について検討を進めている。

実ウイルスを用いた光触媒の抗ウイルス性能評価試験方法の国際標準化では、光触媒工業会が経済産業省「令和 4 年度省エネルギー等に関する国際標準の獲得・普及促進事業委託費(省エネルギー等国際標準開発(国際標準分野))」の委託を受けて、2022 年度より 3 年間の計画で、実ウイ

ルスを用いた光触媒の抗ウイルス性能評価試験の国際標準化(ISO化)に向けた活動を行ってきた。2023年度は、2022年度に作成した評価試験方法案に基づいて、試験方法の妥当性等についての検討を進めた。また、国際標準化に向けては、北東アジア標準化フォーラム、ISO/TC206 WG9 やアジア光触媒標準化会議といった国際会議で実ウイルスを用いた性能評価方法の必要性や方法についての周知活動も行った。

2. 2023 年度の研究成果

2-1. 各種抗微生物材料・製品の性能評価サービスの提供

新型コロナウイルスの感染拡大時から数年が経ち、抗菌・抗ウイルス加工製品の研究開発も落ち着きを取り戻しつつある。一方で、今後も新たな菌やウイルスによる感染症の拡大が起きる可能性もあることから、新型コロナウイルスの感染を教訓として、人々の新しい生活環境の整備が重要である。このような背景のもと、抗菌・抗ウイルス加工製品の重要性は更に高まると考えており、2023 年度も積極的な抗菌・抗ウイルス性能評価サービスの提供を行い、多くの企業や研究機関の研究開発を推進することが出来た。また、2023 年度は防藻性能評価試験の需要が高くなっている傾向があり、抗菌・抗ウイルス性能評価試験だけではなく、様々な微生物を対象とした研究開発が進められていると考えられる。

抗かび性能評価試験サービスについては、光触媒加工品を対象とした JIS R 1705 ¹⁾及び抗かび繊維製品を対象として JIS L 1921 ²⁾の JIS について、試験整備を進めた。その結果、8 月に JIS R 1705、12 月に JIS L 1921 の各抗かび性能評価試験サービスを開始し、企業の研究開発支援につなげることが出来ている。その他、ISO 4768 ³⁾に基づいた抗バイオフィーム性能評価試験サービスの提供も開始した。ISO 4768 ³⁾については、試験整備を進めていく段階より、安定した評価結果を出すための条件検討を続けており、2023 年度は静置培養時に使用する恒温器の使用頻度(ドアの開閉回数等の違い)とバイオフィーム形成能の変化について検討を行った。その結果、使用頻度の高い恒温器で形成されたバイオフィーム量は使用頻度の低い恒温器で形成されたバイオフィーム量と比較して、形成量が少なくなることが明らかとなった。また、使用頻度の低い恒温器で得られるバイオフィーム量が安定し、ばらつきも少ない傾向であった。この原因は不明であるが、ドアの開閉による振動や温度変化が影響している可能性があり、今後さらに検討を行う予定である。

2-2. 新たな評価サービスの提供に向けた取り組み

2-2-1. 再生細胞医療の関わる細胞特性の理解と品質評価サービス

MSC や iPS 細胞による再生細胞医療分野の研究開発、臨床応用が盛んに進められている中で、有効性及び安全性の評価方法が大きな課題となっている。特に、MSC に関しては細胞の不均一性により、治療に対する有効性のばらつきが非常に大きいことが考えられる。そのため、MSC の

細胞集団の不均一性を知り、品質特性の指標となるマーカーを明らかにすることにより品質特性を理解することで、どのような細胞集団を用いて有効性の高い製品開発につながると考えている。

我々は MSC の不均一性を分類するために、シングルセル解析を用いてクラスター分類を行った。また、虚血環境で培養した MSC から血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の産生能を確認し、細胞のクラスター分類と VEGF 産生を比較することで、VEGF 産生に関与する細胞集団及び遺伝子の同定を行った ⁴⁾。本検討結果から、MSC の治療有効性のばらつきの問題と考えられる不均一な細胞集団の中から目的とする細胞集団を同定し、またその品質特性マーカーの探索、それに基づいた評価方法の手法が確立された。本評価方法が普及することで、MSC を用いた再生細胞医療に関する研究及び製品開発が促進されることが期待される。そこで、経済産業省「令和 4 年度第二次補正予算「再生・細胞医療・遺伝子治療の社会実装に向けた環境整備事業費補助金」の「東日本における再生・遺伝子細胞治療の社会実装基盤の構築(代表機関：学校法人藤田学園)」の一環として、シングルセル解析装置や周辺機器の整備を進めた。また、MSC のロット間の増殖の違いと細胞の不均一性の関係をシングルセル解析で検討するとともに、シングルセル解析で使用するライブラリ作成キット間の違いを検討し、評価方法提供に向けた各種データの取得を行っている。また、iPS 細胞を対象とした品質評価方法の確立に向けた取り組みも開始しており、今後それらの評価方法を多くの企業や研究機関に提供していくことで、有効性の高い安全な再生細胞医療等加工製品の開発につなげていくことを考えている。



図 1：シングルセル解析を行うための機器(10x genomics 社製)

2-2-2. 実ウイルスを用いた光触媒の抗ウイルス性能評価試験方法の国際標準化

2022 年度より、光触媒工業会と共に実ウイルスを用いた光触媒材料の抗ウイルス性能評価試験方法の ISO 化について、活動が続けてきた。本検討では、バクテリオファージを用いた紫外光応答形光触媒の抗ウイルス性能評価試験方法である ISO 18061 ⁵⁾、可視光応答形光触媒を対象とした ISO 18071 ⁶⁾、プラスチック平板状の抗ウイルス加工製品を対象とした ISO 21702 ⁷⁾を組み合わせ、試験方

法を組み立てており、その妥当性についてインフルエンザウイルス、ネコカリシウイルス及びバクテリオファージQβを用いた試験検討を進めてきた。それらの結果をもとに、ISO案を作成することが出来ている。2024年度はISO TC206 (fine ceramics)の光触媒に関する working group (WG9)に、作成したISO案と共に新規提案を行い、国際標準化に向けて、引き続き取り組んでいく予定である。

【参考文献】

1. 日本規格協会. JIS R 1705:2016. ファインセラミックス - 光照射下での光触媒抗かび加工製品の抗かび性試験方法. 2016.
2. 日本規格協会. JIS L 1921:2015. 繊維製品の抗かび性試験方法及び抗かび効果. 2015.
3. ISO 4768:2023. Measurement method of anti-biofilm activity on plastic and other non-porous surfaces. 2023.
4. Miura T, Kouno T, Takano M, et al. Single-Cell RNA-Seq Reveals LRRC75A-Expressing Cell Population Involved in VEGF Secretion of Multipotent Mesenchymal Stromal/Stem Cells Under Ischemia. *Stem Cells Transl Med* 15;12(6):379-390, 2023.
5. ISO 18061:2014. Fine Ceramics (Advanced Ceramics, Advanced Technical Ceramics) - Determination of antiviral activity of semiconducting photocatalytic materials - Test method using bacteriophage Q-beta. 2014.
6. ISO 18071:2016. Fine ceramics (advanced ceramics, advanced technical ceramics) - Determination of antiviral activity of semiconducting photocatalytic materials under indoor lighting environment - Test method using bacteriophage Q-beta. 2016.
7. ISO 21702:2019. Measurement of antiviral activity on plastics and other non-porous surfaces. 2019.

次世代ライフサイエンス評価事業の取り組み

次世代ライフサイエンス技術開発プロジェクト

永井 武、小林 慶一、石黒 斉

1. はじめに

次世代ライフサイエンス技術開発グループでは、ライフサイエンス分野における様々な性能評価サービスを提供することで、企業の技術支援を行っている。具体的には、光触媒製品、平板状製品、繊維製品及び液体製品などについて、抗菌、抗ウイルス、抗カビ、抗バイオフィーム及び防藻などの性能評価サービスを提供している。また、新しい性能評価試験方法の開発や国際標準化なども関係団体と協力しながら進めている。さらに、新規の性能評価サービスとして再生細胞医療分野の性能評価サービスも開始する予定である。本稿では、再生細胞医療分野における性能評価サービス提供に向けた活動及び動物ウイルスを用いた光触媒抗ウイルス試験方法の国際標準化事業の活動について報告する。

2. 再生細胞医療分野における性能評価方法の開発について

2-1 はじめに

現在、再生細胞医療の分野では、ES 細胞、iPS 細胞及び体性幹細胞を用いた臨床研究や治療が行われている。ES 細胞や iPS 細胞は、様々な細胞や組織に分化する能力がある多能性幹細胞として知られている。これらの細胞は、一部の疾患において、治療が行われており、今後様々な疾患の治療に応用されることが期待されている。一方、体性幹細胞は、血液、脂肪、軟骨、筋肉、血管などの組織の基になっており、特定の組織にしか分化しないことが知られている。臨床の現場では体性幹細胞が、主に自由診療で用いられており、一部は保険適用になっている治療法もある。

体性幹細胞は、多能性幹細胞から数段階分化が進んだ細胞であり、胎児期には体内に豊富に存在する。しかし、成長するにつれ、これらの体性幹細胞が分化し、体を成熟させていくため、徐々に細胞の数が減少し、増殖力も低下していく。そこで、体性幹細胞の一種である間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell、MSC)を単離及び培養し、体外で増やした細胞を再び体内に戻すことにより、本来持っていた再生能力を呼び起こし、様々な疾患の治療へ応用する研究が進められている。体性幹細胞のうち MSC は脂肪、骨髄及び歯髄などから比較的容易に単離することが可能であり、MSC を用いた再生細胞治療の範囲としては、心臓、腎臓、脳、関節、血管、免疫抑制、慢性疼痛及び美容など非常に広範囲に及んでいる。

MSC を用いた再生細胞治療のメリットとしては、自家細胞、他家細胞のいずれでも拒絶反応が起きにくいことが知られている。また、iPS 細胞のように腫瘍化する恐れ

がなく、安全性が高い。一方、デメリットとしては、自家細胞を用いる場合、細胞を採取してから培養を行うため、時間と手間がかかり、コストが高くなってしまいう点が挙げられる。また、他家細胞を用いる場合、一度に大量の細胞を培養しストックしておくことが可能なため、投与までの時間を短縮できるが、同じ品質の細胞を維持することが困難である。MSC を用いた再生細胞治療は、多くは自由診療で広く臨床応用されているが、培養した MSC の治療効果に大きな差があることが知られており、大きな課題となっている。その原因として、MSC がどのようなメカニズムで対象疾患に対して効果を発揮しているか不明確であることが挙げられており、MSC の品質特性の解析が急務となっている。MSC を単離する際、培養容器に付着した細胞を MSC としており、このように得られた MSC は不均一な細胞集団と考えられる。そこで、我々は MSC のシングルセル解析を行い、各ロット中の細胞集団のクラスター分類を行った。また、虚血環境培養下における MSC からの VEGF 発現を確認し、各ロットの細胞集団クラスター分類との VEGF 発現の相関性を検討した。その結果、あるクラスター及び遺伝子発現が VEGF の発現に重要であることを明らかとした。このように、MSC の特性を解明することで、対象とする疾患に適切な MSC を選択することが可能になると考えられる。

本プロジェクトでは、MSC における重要品質特性の評価サービスを提供することで、有効性の高い再生細胞治療の提供に貢献することを目的に、評価系の構築に取り組んだ。

2-2 方法と結果

4 ロットの研究用の骨髄由来 MSC(BM-MSC)を LONZA 社から購入し、同社指定の専用培地を用いて培養を行った。5000~6000 cells/cm² の濃度で培養を始め、3 日もしくは 4 日後に培地交換を行った。1 週間で継代を行い、継代回数 4 回でストックを作成し、継代回数 5 回目の細胞をシングルセル解析に使用した。培養した BM-MSC の顕微鏡下での写真及び細胞の濃度をそれぞれ図 1 と図 2 に示す。これらは、継代回数 5 回目で培養後 7 日目のものである。その結果、MSC のロットごとに増殖能が異なることが明らかとなった。BM-MSC1 が最も増殖が速く、BM-MSC2~4 はそれよりも遅い傾向にあった。また、BM-MSC1 は典型的な MSC の形状が見られ、コンフルエントになると繊維状に密集していた。一方で、BM-MSC3 及び 4 は、増殖が止まりコンフルエントになっても BM-MSC1 のような繊維状にはならず、隙間が空いて

いる状態で、形状は樹状様のものが多く見られた。また、培養後の細胞濃度を計測した結果、BM-MSC1 が最も高いことが示された。

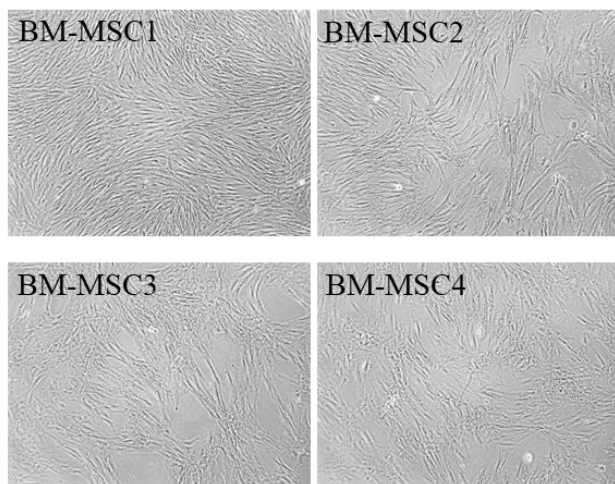


図 1 各 BM-MSC の培養後 7 日の顕微鏡写真(40 倍)

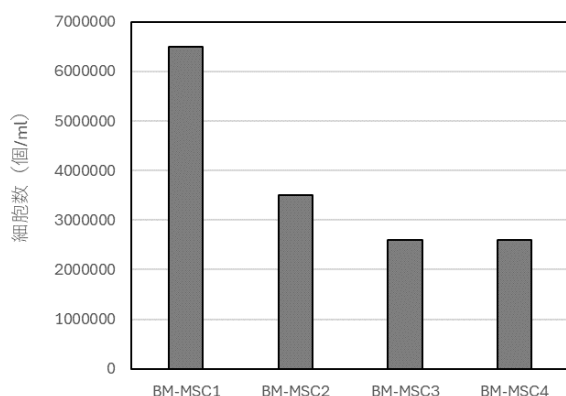


図 2 BM-MSC の細胞濃度(培養 7 日目)

次に、シングルセル解析を行うため、以下の 3 種類のキットを用いてライブラリー調製を行った。

1. Chromium NextGEM Single Cell 3' Reagent Kits v3.1 (10X Genomics 社)
2. Single Cell Gene Expression Flex Kits (10X Genomics 社)
3. Single Cell Library Preparation Kits (Scale Biosciences 社)

1 のキットは、感度が高く、対象とする生物種が豊富である一方、新鮮な細胞で調製する必要があり、複数の細胞サンプルを扱う場合は、それぞれのサンプリングのタイミングを合わせる必要がある。一方、2 及び 3 のキットは、細胞を固定してからライブラリー調整を行うため、固定後は長期間の低温保管が可能である。そのため、まとまった数の細胞サンプルが集まった段階でライブラリー調製を行えるため、非常に扱いやすいキットと言える。しかし、1 のキットに比べ、その後のシークエ

ンス解析ではやや品質が劣ってしまうことと、解析可能な生物種が限られてしまうことがデメリットである。現在、上記のキットによるデータセットの違いを検討しており、その結果から品質評価サービスに用いるのに最適なライブラリー調製キットを選定する予定である。また、MSC の品質特性解析を通じて、再生細胞治療に向けた MSC の品質評価サービスを提供できるように、性能評価方法の確立および基盤整備を行う予定である。

3 実ウイルスを用いた新規光触媒抗ウイルス試験方法の国際標準化事業について

3-1 はじめに

現在、光触媒製品の抗ウイルス性能評価試験方法については、紫外光応答形光触媒では ISO18061²⁾、可視光応答形光触媒では ISO18071³⁾が制定されており、供試ウイルスは比較的扱いやすいバクテリオファージ Q β を規定している。一方、他の抗ウイルス性能評価試験方法である ISO 規格(平板上製品を対象とした ISO21702⁴⁾、繊維製品を対象とした ISO18184⁵⁾)では、インフルエンザウイルスとネコカリシウイルスが規定されている。また、新型コロナウイルスの感染拡大の影響もあり、光触媒製品の製品開発においても、バクテリオファージ Q β ではなく、実ウイルスを用いた抗ウイルス性能評価試験の需要が高まり、その標準化が求められてきた。そこで、光触媒工業会の協力のもと、実ウイルスを用いた光触媒抗ウイルス性能評価試験方法を新たな国際標準規格として作成する取り組みを行った。

3-2 結果と展望

評価方法の作成にあたっては、光触媒製品の抗ウイルス性能評価法(ISO18061 及び ISO18071)及び平板状製品の抗ウイルス性能評価法(ISO21702)を組み合わせることで、新規評価方法案を作成した。表 1 にその概要を示す。また、光触媒の性能評価方法で用いられる光源の標準化が進められており、白色 LED に関しては既に ISO が制定されている。紫外光 LED に関しても現在 ISO 化が進められていることから、本評価方法の光源に加えている。

次に、この本案に基づいた試験が可能か検討するため、光触媒工業会と協力し、紫外光応答形及び可視光応答形の標準試験サンプルの作製と選定を行った。標準試験サンプルの選定後、実ウイルスを用いた性能評価試験を行い、本案によって抗ウイルス性能評価が可能であることを明らかとした。更に、標準試験サンプルを用いて、細かい試験条件を検討するとともに他の試験機関を含めた抗ウイルス性能評価試験を行うことで、本性能評価試験方法の妥当性の検証を行った。以上の結果をもとに、紫外光応答形及び可視光応答形の各光触媒材料に対してそれぞれ ISO 原案を作成し、ISO の作業部会に新規提案として申請している。今後は、作業部会での議論に対応しながら、ISO 化に向けて取り組みを続けていく予定である。また、ISO として発行された段階で、速やか

にこれらの性能評価サービスを提供して行く予定である。

表 1 新規評価方法概要

試験サンプル	紫外光応答形	可視光応答形
サンプル形状	平板状光触媒加工品	
供試体	A型インフルエンザウイルス ネコカリシウイルス	
感染価測定方法	ブランク法	
光源	BLB、BL、UV-LED	白色蛍光灯、白色LED

【参考文献】

1. Miura T, Kouno T, Takano M, et al. Single-Cell RNA-Seq Reveals LRRC75A-Expressing Cell Population Involved in VEGF Secretion of Multipotent Mesenchymal Stromal/Stem Cells Under Ischemia. *Stem Cells Transl Med* 15;12(6):379-390 (2023)
2. ISO 18061 Fine Ceramics (Advanced Ceramics, Advanced Technical Ceramics) — Determination of antiviral activity of semiconducting photocatalytic materials — Test method using bacteriophage Q-beta (2014)
3. ISO 18071 . Fine ceramics (advanced ceramics, advanced technical ceramics) — Determination of antiviral activity of semiconducting photocatalytic materials under indoor lighting environment — Test method using bacteriophage Q-beta (2016)
4. ISO 21702. Measurement of antiviral activity on plastics and other non-porous surfaces (2019)
5. ISO 18184 Textiles – Determination of antiviral activity of textile products (2019).

抗バイオフィーム活性測定試験の受託に向けた取り組み

「次世代ライフサイエンス技術開発」プロジェクト

小林慶一、永井武、石黒斉

1. はじめに

KISTEC では企業や研究機関等の研究開発支援の一環として、製品や材料の抗菌・抗ウイルス性能評価サービスを提供している。当該性能評価試験は、JIS や ISO 等の標準規格を基に実施しているが、性能評価試験の相談を受ける研究開発段階の製品や材料の形状や材質、また、標的として希望される菌等の微生物やウイルスの種類は依頼ごとに様々である。これらの種々の要望に対し、適切な評価方法を、時には標準規格を参考にその案件特有な方法を考案・提案し、可能な限り対応している。

年々多様化していく抗菌・抗ウイルス性能評価試験の相談に応えていくために、取扱い可能な JIS や ISO 等の標準規格を増やし、抗菌・抗ウイルス性能評価試験として請けられる範囲の拡張に努めている。例として、抗かび性能評価試験や 2023 年 7 月に制定・発行された ISO 4768 (Measurement method of anti-biofilm activity on plastic and other non-porous surfaces)¹⁾を基にした抗バイオフィーム活性測定試験の評価サービスの提供を昨年度より開始している。

バイオフィームとは、菌などの微生物やそれらが産生する物質などが集合して形成される膜状の構造体を指し、流し台、浴室・浴槽の内壁、池や川に浸かった石などにみられる「ぬめり」や歯の表面のプラーク(歯垢)など、身近な様々な場所に存在する。菌がバイオフィームを形成すると、菌への薬剤の効きが低下することもあり、バイオフィーム対策は注目されている分野の一つである。

本稿では、昨年度から受託を開始した抗バイオフィーム活性測定試験の概要と、より安定した結果を出すために検討した取り組みの一部を報告する。

2. 実験と結果

バイオフィームの評価に関する試験規格としては、一定の方法で形成されたバイオフィームに対する薬剤の効果を評価する ASTM E2871²⁾などが存在するが、昨年新たに制定された ISO 4768 ではプラスチックや非多孔質材料表面のバイオフィーム形成量を比較し、製品や材料に対するバイオフィームの付着しにくさを評価する方法が規定されている。そのため、コントロール(対照)となる無加工試験片に対してバイオフィームが安定して形成される環境で試験することが必須である。本検討では、無加工試験片上で安定したバイオフィーム形成を得るために実際の試験環境のうち、静置培養によりバイオフィームを形成させる際に利用する恒温器の違いとバイオフィーム形成能の差異を確認した。

(1) バイオフィーム形成量の測定¹⁾

試験は ISO 4768 に定められた手順に従い実施した。まず、1/5 濃度の TSB(Trypticase Soy Broth)内で 35℃、24~48 時間振盪培養した *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35984、表皮ブドウ球菌)の培養液を、菌濃度が $1.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^4$ cell/mL になるように調製する。評価する試験片のサイズは 30×30 mm を標準とし、40×40 mm サイズのガラス板に固定する。ガラス板に固定した試験片を滅菌された容器に入れ、サンプル表面から液面までの深さが少なくとも 5 mm 以上となるように菌濃度を調整した培養液を注ぎ、35℃、48 時間静置培養する(図 1)。

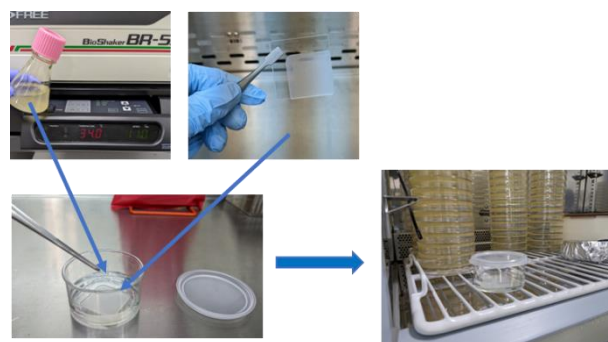


図 1 試験片への接種手順の概要

静置培養後、試験片を固定したガラス板ごと水で穏やかに洗浄し、クリスタルバイオレット溶液に浸し染色する。染色後、再び水で穏やかに洗浄し、試験片を水溶性不織布で拭き取り、不織布を SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)水溶液に溶解させて波長 590 nm での吸光度を測定する(図 2)。

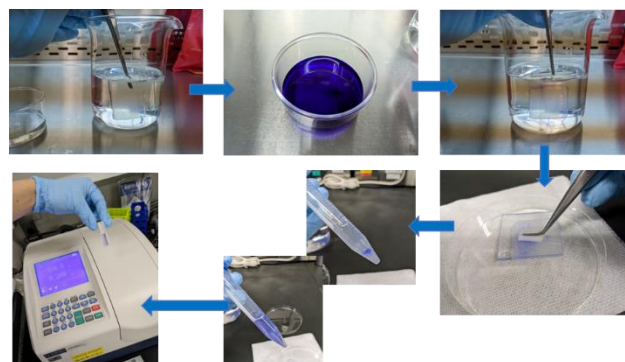


図 2 バイオフィーム形成量の測定手順の概要

ISO 4768 においてはこの計測した吸光度を用いて以下の式(1)により算出される値が抗バイオフィーム活性値 R と定義されている。

$$R = (1 - W_{\text{treated}} / W_{\text{untreated}}) \cdots \cdots \text{式(1)}$$

W_{treated} : 抗バイオフィーム加工された試験片から拭き取り調整した溶液の 590 nm の吸光度の平均値
 $W_{\text{untreated}}$: 抗バイオフィーム加工されていない試験片から拭き取り調整した溶液の 590 nm の吸光度の平均値

本検討では抗バイオフィーム加工されていない無加工試験片として 30×30 mm サイズのガラス板を使用した。また、静置培養によりバイオフィームを形成させる際に利用する恒温器としては、使用頻度・高(1 日 1 回以上本体扉の開閉がある)、中(2 日に 1 回程度本体扉の開閉がある)、使用頻度・低(静置培養中に本体扉の開閉が無い)の 3 種類を利用し、それぞれの場合での吸光度を比較した。

(2) 結果と考察

各条件での吸光度測定結果を表 1 に示す。使用頻度が高い恒温器ほど吸光度が低下していく、すなわちバイオフィームの形成量が減少していく傾向が確認された。また、今回は n 数 3 での検証であったが、使用頻度が低い恒温器で形成されたバイオフィームの方が、吸光度測定値のバラツキが小さい傾向が見られた。

表1 使用恒温器の違いによる吸光度の比較

使用頻度	低	中	高
吸光度 (590 nm)	4.54 ± 0.06	3.20 ± 0.30	2.13 ± 1.07

また、図 3 に示したクリスタルバイオレット溶液で染色した様子から、使用頻度が高い恒温器内で静置培養した試験片ほど染まり具合が薄く、付着している菌やバイオフィームは斑点状に不均一に付着している割合が増えてくる傾向が観察された。原因は検証中であるが、使用頻度が高く、恒温器の扉の開閉による振動がバイオフィーム形成に影響を与える可能性が考えられる。いずれにしても安定したバイオフィーム形成のためには使用頻度が低い恒温器を使用すべきであることが示唆された。

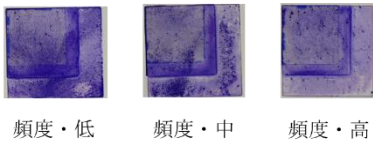


図 3 クリスタルバイオレット染色後の試験片

3. まとめと今後の予定

昨年度より新たな抗菌・抗ウイルス性能評価試験メニューとして、ISO 4768 を基にした抗バイオフィーム活性測定試験の提供を開始した。本試験は吸光度によるバイオフィームの定量を原理としているが、比較的バラツキが大きい実験であるため、より安定した結果を出すためには ISO 規格に記載された手順を忠実にトレースすることは勿論であるが、実際の実験環境に合わせ細かな点での調整や対応が必要で、今回記載した内容以外にも留意点が存在した。より安定した結果を提供できるように、抗バイオフィーム活性測定試験を実施する際にはこれらの点を踏まえて実施している。

抗バイオフィーム活性測定試験の受託件数は、少しずつ増加傾向にある。一般社団法人抗菌製品技術協議会(SIAA)が抗バイオフィーム加工製品の認証制度を 2024 年 7 月に開始したこともあり、今後もバイオフィームへの注目度は高くなると予想される。それに伴い抗バイオフィーム活性測定試験に関しても、冒頭で記した従前の抗菌・抗ウイルス性能評価試験の様に、様々なニーズが出てくることが予想される。これらのニーズに応じていくために備えた検討・検証も進めている。例えば、口腔ケア分野の研究開発では歯垢がターゲットの一つとなることから、口腔内細菌を用いたバイオフィーム形成方法や評価方法の検討にも取り組んでいる。

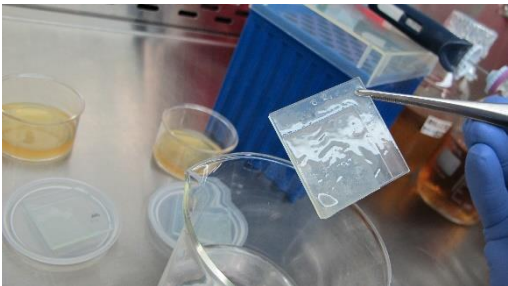


図 4 ガラス板上に *Streptococcus mutans* により形成させたバイオフィーム

今後も、抗バイオフィーム試験に限らず、抗菌・抗ウイルス性能評価試験として請けられる範囲拡張のための試行や、より安定した結果の提供のための検証に努めていく予定である。

【参考文献】

- 1. ISO 4768, Measurement method of anti-biofilm activity on plastic and other non-porous surfaces (2023)
- 2. ASTM E2871, Standard Test Method for Determining Disinfectant Efficacy Against Biofilm Grown in the CDC Biofilm Reactor Using the Single Tube Method (2021)

業績

【原著論文】

1. Ochiai T, Nagai T, Hamada K, Tobe T, Aoki D, Sunada K, Ishiguro H. Estimating the Anti-viral Performance of Photocatalytic Materials: The Correlation Between Air Purification Efficiency and Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Inactivation. *Catalysts*. 14: 163, 2024.
2. Nakane R, Kiribayashi R, Sunada K, Mochizuki Y, Isobe T, Matsushita S, Nagai T, Ishiguro H, Nakajima A. Degradation of 2-naphthol in water and antibacterial/antiviral activity by Zn_2SnO_4 , $\text{ZnSn}(\text{OH})_6$ and $\text{Y}_2\text{Sn}_2\text{O}$. *Ceramics International*. 50: 7 Part A, 10797-10805, 2024. 表紙掲載, 優秀論文賞
3. Hirai T, Kataoka K, Yuan Y, Yusa K, Sato Y, Uchida K, Kono K. Evaluation of next-generation sequencing performance for *in vitro* detection of viruses in biological products. *Biologicals*. 85: 101739, 2024.
4. Kuroda T, Yasuda S, Matsuyama S, Miura T, Sawada R, Matsuyama A, Yamamoto Y, Morioka MS, Kawaji H, Kasukawa T, Itoh M, Akutsu H, Kawai J, Sato Y. ROR2 predicts human-induced pluripotent stem cell differentiation into neural progenitor cells. *Scientific Reports*. 14: 690, 2024.
5. Iwakura S, Ito T, Sakai T, Sunada K, Mochizuki Y, Isobe T, Matsushita S, Nagai T, Ishiguro H, Nakajima A. Processing of cerium molybdates by solid phase process and their antiviral activity *Journal of the Japan Society of Colour Material*. 96: 96-103, 2023.
6. Abe K, Sunada K, Mochizuki Y, Isobe T, Matsushita S, Nagai T, Ishiguro H, Nakajima A. Preparation of rare earth iodates and their antibacterial and antiviral activities. *Ceramics International*. 49: 14681-14688, 2023.
7. Shinozaki F, Kamei A, Shimada K, Matsuura H, Shibata T, Ikeuchi M, Yasuda K, Oroguchi T, Kishimoto N, Takashimizu S, Nishizaki Y, Abe K. Ingestion of taxifolin-rich foods affects brain activity, mental fatigue, and the whole blood transcriptome in healthy young adults: a randomized, double-blind, placebo - controlled, crossover study. *Food and Function*. 14: 3600-3612, 2023.
8. Kiribayashi R, Sunada K, Mochizuki Y, Isobe T, Matsushita S, Nagai T, Ishiguro H, Nakajima A. Decomposition of 2-naphthol in and its antibacterial and antiviral activities by LaMnO_3 and LaCoO_3 in the dark. *Journal of the Ceramic Society of Japan*. 131: 117-125, 2023. 表紙採用
9. Miura T, Kouno T, Takano M, Kuroda T, Yayamoto Y, Kusakawa S, Morioka MS, Sugawara T, Hirai T, Yasuda S, Sawada R, Matsuyama S, Kawaji H, Kasukawa T, Itoh M, Matsuyama A, Shin JW, Umezawa A, Kawai J, Sato Y. Identification of biomarker of angiogenic potential of mesenchymal stem cells using single cell transcriptome analysis. *Stem Cells Translational Medicine*. 12: 379-390, 2023.
10. Hirai T, Kono K, Kusakawa S, Yasuda S, Sawada R, Morishita A, Hata S, Wakita A, Kageyama T, Takahashi R, Watanabe S, Shiraishi N, Sato Y. Evaluation of the reproducibility and positive controls of cellular immortality test for the detection of immortalized cellular impurities in human cell-processed therapeutic products. *Regenerative Therapy*. 21: 540-546, 2022.
11. Ogawa N, Sato K, Sunada K, Ishiguro H, Kojima H, Ito T. Polymeric Antibacterial Surface with Nano-pillar Array Mimicked of Cicada Wing. *Journal of Photopolymer Science and Technology*. 35: 213-217, 2022.
12. Okamoto T, Onaga C, Matsuoka I, Ozaki A, Matsuda C, Kasai T, Xiong Y, Harada Y, Sato T, Nakano Y, Mano Y, Miyazaki S, Ishiguro H, Sato K, Tamori S, Sasaki K, Ohno S, Akimoto K. High *SLC20A1* expression indicates poor prognosis in prostate cancer. *Cancer Diagnosis and Prognosis*. 3: 439-448, 2023.
13. Sakai T, Sunada K, Mochizuki Y, Isobe T, Matsushita S, Nagai T, Ishiguro H, Nakajima A. Antiviral and antifungal activities of tin molybdenum solid solution oxide prepared using mechanochemical processing. *Journal of the Ceramic Society of Japan*. 131: 482-487, 2023.
14. Kobayashi N, Sunada K, Mochizuki Y, Isobe T, Matsushita S, Nagai T, Ishiguro H, Nakajima A. Decomposition of 2-naphthol in water and antiviral activity of CoO_x modified ($\text{Ce}_{0.8}$, $\text{Bi}_{0.2-y}$, La_y) $\text{O}_{2-\delta}$ in the dark. *Journal of the Ceramic Society of Japan*. 131: 590-594, 2023.

【総説】

1. Ludwig TE, Andrews PW, Barbaric I, Benvenisty N, Bhattacharyya A, Crook JM, Daheron LM, Draper JS, Healy LE, Huch M, Inamdar MS, Jensen KB, Kurtz A, Lancaster MA, Liberali P, Lutolf MP, Mummery CL, Pera MF, Sato Y, Shimasaki N, Smith AG, Song J, Spits C, Stacey G, Wells CA, Zhao T, Mosher JT. ISSCR standards for the use of human stem cells in basic research. *Stem Cell Reports*. 18: 1744-1752, 2023.
2. 河合 純. 核酸医薬とゲノム・RNA データベース. *Clinical Neuroscience*. 41: 643-646, 2023.
3. 落合 剛, 濱田 健吾, 小林 慶一, 石黒 斉. 抗菌・抗ウイルス効果から空気清浄機まで～光触媒評価総合サポート～. *Colloid & Interface Communication*. 48: 10-13, 2023.
4. 砂田 香矢乃, 畑山 靖佳, 永井 武, 石黒 斉. 金属酸化物の新型コロナウイルスに対する抗ウイルス活性. *JETI*.

71: 30-33, 2023.

- 5.石黒 斉. 光触媒による抗微生物効果. 防菌防黴学会誌. 51(7): 455-458, 2023.

【書籍】

- 1.Ishiguro H, Yao Y, Kubota Y. TiO₂-Ag antibacterial coatings for biomedical uses. *Handbook of Self-Cleaning Surfaces and Materials*, ed. Fujishima A, Irie H, Zhang X, Tryk DA. Wiley-VCH, 2023.

【口頭発表】

- 1.Ito T, Ogawa N, Sato K, Shimizu T, Shingubara S, Kojima H, Ishiguro H. Fabrication of polymeric film with nano-pillar array to mimic 3D nanostructures on cicada wing. The 39th International Conference of Photopolymer Science and Technology. 2022 年 6 月 29 日. オンライン.
- 2.伊藤 健, 松本 寛佳, 柳沢 雄志, 小川 夏輝, 三村 爽馬, 岩木 宏明, 小嶋 寛明, 石黒 斉, 砂田 香矢乃, 永尾 寿浩, 田中 重光. 生物模倣技術を用いた新しい抗微生物材料～ナノ・マイクロ構造と抗菌～. 日本防菌防黴学会 第 49 回年次大会, 2022 年 9 月 26 日. 東京.
- 3.小林 夏美, 加藤 千尋, 望月 泰英, 磯部 敏宏, 松下 祥子, 中島 章, 砂田 香矢乃, 永井 武, 石黒 斉. CoO_x 修飾した(Ce_{0.8}, Bi_{0.2-x}, La_x) O_{2-δ} の可視光下と暗所下における水中での 2-naphthol 分解活性および抗ウイルス活性. 公益社団法人日本セラミックス協会 2023 年会. 2023 年 3 月 10 日. 神奈川.
- 4.境 辰矩, 望月 泰英, 磯部 敏宏, 松下 祥子, 中島 章, 砂田 香矢乃, 永井 武, 石黒 斉. 各種モリブデン系複合酸化物の作製とその抗菌・抗ウイルス・抗真菌活性. 公益社団法人日本セラミックス協会 2023 年会. 2023 年 3 月 10 日. 神奈川.
- 5.猿渡 輝良, 望月 泰英, 磯部 敏宏, 松下 祥子, 中島 章, 砂田 香矢乃, 永井 武, 石黒 斉. モリブデン酸セリウム薄膜の作製とその抗ウイルス活性. 公益社団法人日本セラミックス協会 2023 年会. 2023 年 3 月 10 日. 神奈川.
- 6.川路 英哉, 加藤 匠矢, 伊藤 昌可, 須田 互, 村川 泰裕, 河合 純. 標準ゲノム・RNA 塩基配列データベース D3G の更新. 日本核酸医薬学会第 8 回年会. 2023 年 7 月 12 日. 名古屋.
- 7.石黒 斉. KISTEC における光触媒研究開発と支援サービス. 環境浄化光触媒研究会. 2023 年 6 月 15 日. 東京. (招待)
- 8.石黒 斉. Antivirus test using animal viruses. 第 21 回北東アジア標準協力フォーラム. 2023 年 7 月 25 日. 東京.
- 9.森下 美紀子, 久保田 曙, 倉本 幹也, 高木 洋二, 石黒 斉, 岡山 誠史. JIS R 1712 光触媒防菌性試験における発光測定法の適用. 防菌防黴学会 第 50 回年会. 2023 年 8 月 29 日. 大阪.
- 10.Ishiguro H. SARS-CoV-2 inactivation by the photocatalytic materials. International Congress on Pure and Applied

Chemistry Bali 2023. 2023 年 9 月 22 日. インドネシア. (招待)

- 11.Ishiguro H. Test for antiviral activity using animal virus. ISO TC206/WG9. 2023 年 10 月 5 日. 京都.
- 12.Ishiguro H. Test for antiviral activity using animal virus. Committee of Asian Standardization for Photocatalytic Materials and Products 2023. 2023 年 10 月 3 日. 京都. (招待)
- 13.中根 陸, 桐林 龍寿, 砂田 香矢乃, 磯部 敏宏, 望月 泰英, 永井 武, 石黒 斉, 中島 章. スズ酸亜鉛・スズ酸イットリウム合成とその抗菌・抗ウイルス活性. 公益社団法人日本セラミックス協会. 第 36 回秋季シンポジウム. 9 月 7 日. 京都. 奨励賞
- 14.亀井 飛鳥. ～未病と食品機能性の評価システムの確立への挑戦. 2023 年度第 2 回機能性食品研究会. 9 月 22 日. 東京.
- 15.亀井 飛鳥. 未病と食の機能性評価. キングスカイフロンティアフォーラム. 2023 年 11 月 2 日. 神奈川.
- 16.小林 慶一. 新型コロナウイルスを含む各種抗菌・抗ウイルス試験サービスの提供. キングスカイフロンティアフォーラム. 2023 年 11 月 2 日. 神奈川.
- 17.阿部 和也, 砂田 香矢乃, 永井 武, 石黒 斉, 望月 泰英, 磯部 敏宏, 中島 章. 希土類ヨウ素酸化合物の紫外線照射下における抗ウイルス活性. 2023 年度色材研究発表会. 2023 年 11 月 7 日. 大阪. 優秀ポスター賞.
- 18.亀井 飛鳥. 未病と食の機能性評価研究. 2023 年第 17 回 TKF オープンフォーラム. 2023 年 11 月 22 日. 東京.
- 19.Kiribayashi R, Sunada K, Mochizuki Y, Isobe T, Nagai T, Ishiguro H, Nakajima A. Antiviral and antibacterial activity of La₂Sn₂O₇, Mg₂SnO₄ and MgSn(OH)₆. MRM2023/IUMRS-ICA2023 Grand Meeting. December 13, 2023, Kyoto, Japan.
- 20.阿部 和也, 砂田 香矢乃, 望月 泰英, 磯部 敏宏, 永井 武, 石黒 斉, 中島 章. 希土類ヨウ素酸化合物の抗菌・抗ウイルス活性に及ぼす光照射の影響およびポリマーとの複合化. 第 62 回セラミックス基礎科学討論会、1E04 (2024)、1 月 7 日. 東京.
- 21.落合 剛, 永井 武, 濱田 健吾, 青木 大輔, 砂田 香矢乃, 石黒 斉. 新型コロナウイルスに対する光触媒材料の抗ウイルス性能のスクリーニング試験法. 2024 年 3 月 14-16 日. 電気化学会第 91 回大会. 名古屋.
- 22.砂田 香矢乃, 永井 武, 小林 慶一, 中野 竜一, 中島 章, 石黒 斉. 可視光照射・暗所下でのモリブデン酸化物材料の抗ウイルス活性. 第 28 回シンポジウム「光触媒反応の最近の展開」. 2024 年 3 月 6 日. 東京.
- 23.濱田 健吾, 落合 剛, 青木 大輔, 永井 武, 砂田 香矢乃, 石黒 斉. RPA の光触媒性能評価への応用. 第 28 回シンポジウム「光触媒反応の最近の展開」. 2024 年 3 月 6 日. 東京.
- 24.桐林 龍寿, 望月 泰英, 磯部 敏宏, 中島 章, 砂田 香矢乃, 永井 武, 石黒 斉. 希土類銅系複合酸化物の抗菌・抗ウイルス活性. 公益社団法人日本セラミックス協会 2024 年年会. 2024 年 3 月 14-16 日. 熊本.

【特許】

国内特許出願 3 件