

## ■ Original article

# 血管内留置カテーテルのバイオフィーム形成量評価のための 生体内模擬培養液組成の検討

森本翔太、梶浦 工、菅原えりさ、木村 哲

東京医療保健大学大学院

## Effects of the culture media simulating in vivo conditions on the biofilm formation in intravascular catheter

Shota Morimoto, Takumi Kajiura, Erisa Sugawara, Satoshi Kimura

Division of Infection Prevention and Control, Tokyo Healthcare University Postgraduate School, Faculty of Healthcare,  
Department of Healthcare

**【背景・目的】**カテーテルを対象としたバイオフィーム（以下 BF）形成能について複数の報告があるが、生体内を模擬した報告例は少ない。そこで、血管内に挿入されたカテーテル内腔及び外壁表面上での輸液、体液による曝露状態を想定し、BF 形成量に及ぼす模擬培養液成分の検討を行った。

**【方法】**表皮ブドウ球菌を供試菌とし、96 ウェルプレートに各培養液を添加し培養後、クリスタルバイオレット染色し BF 形成量を算出した。内腔を模擬した培養液は、ブドウ糖と種々のアミノ酸輸液製剤を精製水で希釈してそれぞれ 0～20%、0～4% とし、適宜混合して用いた。外壁模擬には Roswell Park Memorial Institute medium 1640(RPMI1640)培地でウマ血液（全血、脱線維血液、血清）を 0～100% の範囲で希釈して用いた。

**【結果】**内腔模擬培養液において、ブドウ糖 10% 以上では BF 形成の低下傾向が見られた。アミノ酸 0% では BF はほとんど形成されず、1～4% では濃度によらず同程度の形成量を示した。また、BF 形成量はアミノ酸輸液製剤の種類に依存した。一方、外壁模擬培養液において、血液濃度が高いほど BF 形成は低下傾向を示した。

**【結論】**内壁模擬においては、輸液成分中のブドウ糖またはアミノ酸の各濃度は BF 形成量に影響を与えた。外壁模擬においては、血清ならびに脱線維血液は BF 形成を低下させた。

Key words : 表皮ブドウ球菌・バイオフィーム形成量・アミノ酸輸液・ブドウ糖液・RPMI1640

### 1. はじめに

一部の細菌では、固液界面に付着し増殖する過程において、菌体外に多糖体を主成分とするグリコカリックスを産生し、粘着性のある強固な菌の集合体を形成する。これがバイオフィーム (biofilm、以下 BF) と呼ばれる菌の生存形態である。単一の浮遊菌と比較し、熱や薬剤に対して抵抗性を示すことは多数報告されており、外界からの刺激に対しての高い生体防御機構を持つ<sup>1)</sup>。

医療器具に定着した BF に起因する感染症が、医療領域において問題となっている。特にカテーテル等の体内に長期間留置する医療器具において、BF 感染症が疑われるケースが多い<sup>2,3)</sup>。

カテーテル関連血流感染 (catheter related blood stream infection : CRBSI) は、入院の長期化また治療費の増加を招くことが指摘されており、医療関連感染症の一つとして重要な問題である<sup>4)</sup>。米国においては、CRBSI は集中治療室で年間約 8 万例発生しているとされており<sup>5)</sup>、病院全体では年間約 25 万例が発生していると推計されて

いる<sup>6)</sup>。CRBSIの多くは、中心静脈カテーテル(中心静脈栄養)が由来であり、静脈内に挿入されているカテーテル部分に菌が付着しBFを形成するために引き起こされると言われている<sup>7)</sup>。この際、フィブリン、血清タンパク、血栓などの生体産生物質によりカテーテル表面に菌が定着しBFが形成され、菌の増殖及び血中への排菌が起こることでBF感染症が引き起こされると考えられている<sup>8)</sup>。高い抵抗性を持つBFの除去は困難であり、カテーテルの抜去以外に手段はないとされる。しかし、BFの形成に関する要因は必ずしも解明されていない。

現在までに、いくつかのカテーテル材料表面上でのBF形成に関する研究は行われているが<sup>9)</sup>、生体内を模擬した条件での研究事例は少ない。カテーテル内腔はブドウ糖、アミノ酸に代表される輸液成分、外壁は体内(血管内)に挿入されるため体液(血液)成分に曝露されることが想定される。そこで、本研究では血管内に挿入されたカテーテル外壁及び内腔の表面上における曝露状態を実験的に再現し血液由来の成分また輸液成分を含んだBF培養液組成を用いBF培養液組成とBF形成量評価系を確立することを目的とした。

## 2. 方法

### 2.1 供試菌

カテーテル関連血流感染の起原因菌として、コアグララーゼ陰性ブドウ球菌(*Coagulase negative staphylococci*)が31%、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)が20%を占めるとのデータが米国の研究により報告されている<sup>10)</sup>。また、ブドウ球菌による医療器具関連感染において、BF形成が確認された事例は多く、その関連性が強く示唆されている<sup>11)</sup>。これらの背景から、供試菌は*Staphylococcus epidermidis*とし、再現性を考慮して公的な微生物株保存機関より分与を受けたATCC35984、ATCC51625、ならびにJCM2414を選定した。ATCC35984株は*S. epidermidis*を用いたBF研究において繁用される菌株である<sup>12,13)</sup>。また、ATCC51625株はメチシリン感受性株、JCM2414株は基準株、である。

### 2.2 前培養と接種菌液調製

前培養培地としてsoybean casein digest(SCD)寒天培地(栄研化学)を用いた。菌株は、 $-80^{\circ}\text{C}$ 凍結保存ストックよりSCD寒天培地に画線し $36^{\circ}\text{C}$ で1~2日間培養を

行った。その後、平板上から菌体を掻きとり滅菌精製水に懸濁し、約 $10^7$ CFU/mLに調製した菌液を接種菌液とした。

### 2.3 培養条件(培養液組成)

#### 2.3.1 カテーテル外壁を模擬した培養液

体液模擬を目的とし、細胞培養用のRoswell Park Memorial Institute1640(RPMI1640)培地(wako)をベースに、ウマ血液(保存血液、脱線維素血液、血清)(コージンバイオ)をそれぞれ添加し、各血液濃度0~100%の培養液を調製した。

#### 2.3.2 カテーテル内腔を模擬した培養液

自家調製60%ブドウ糖液(wako)と、以下5種類の市販アミノ酸輸液製剤(輸液A~E)をそれぞれ混合し、適当量の精製水で希釈することでブドウ糖0~20%、アミノ酸0~4%を含む培養液を調製した。市販アミノ酸製剤は総合アミノ酸輸液(輸液A、輸液B)、腎不全用アミノ酸輸液(輸液C)、肝不全用アミノ酸輸液(輸液D)、小児用アミノ酸輸液(輸液E)に大別し、それぞれ代表的な以下の輸液製剤を選定した。

各輸液の組成表を表1に示した。

### 2.4 96ウェルマイクロプレートを用いたBF形成量評価

O'Tooleらの方法<sup>14)</sup>を参考に、ポリスチレン製96ウェル平底マイクロプレート(IWAKI)を用いて評価を行った。各ウェル内に入れた培養液(100mL)に、接種菌液10mL接種後、 $36^{\circ}\text{C}$ で72時間静置培養した。培養終了後、培養液を取り除き、ウェル内を精製水で2回洗い流した。その後、0.1%クリスタルバイオレット液でウェル底面の付着物を約20分間染色し、染色液を取り除き、水で2回洗い流した。最後に、33%酢酸100mLを加え約20分間放置し付着物から色素を抽出したのち、その抽出液の吸光度(A570)を測定したものをBF形成量とした。本研究において、BF形成量評価は全てこの方法に従った。

### 2.5 培養液中の浮遊菌数測定

上記4の方法に従い、各培養液中に菌液を接種し、24時間、72時間培養後に、ウェル内の培養液をよくピペティングし、培養液を適宜希釈した液をSCD寒天培地

表 1. 市販アミノ酸輸液製剤の組成

輸液	アミノ酸(%)																		総アミノ酸	
	L-ロイシン	L-イソロイシン	L-バリン	L-リジン	L-スレオニン	L-トリプトファン	L-メチオニン	L-フェニルアラニン	L-システイン	L-システチン	L-チロシン	L-セチン	L-アルギニン	L-アラニン	L-プロリン	L-セリン	グリシン	L-アスパラギン酸		L-グルタミン酸
輸液A	1.40	0.80	0.80	1.05	0.57	0.20	0.39	0.70	0.10	-	0.05	0.50	1.05	0.80	0.50	0.30	0.59	0.10	0.10	10.00
輸液B	1.14	0.60	0.69	0.98	0.50	0.19	0.43	0.97	-	0.02	0.06	0.71	1.49	0.82	1.06	0.47	1.57	0.20	0.10	12.00
輸液C	1.40	0.90	1.00	0.51	0.35	0.25	0.30	0.50	0.10	-	0.05	0.35	0.45	0.25	0.30	0.30	0.00	0.10	0.10	7.21
輸液D	1.10	0.90	0.84	0.61	0.45	0.07	0.10	0.10	0.03	-	-	0.24	0.61	0.75	0.80	0.50	0.90	0.00	0.00	7.99
輸液E	1.60	0.80	0.60	0.48	0.24	0.12	0.15	0.25	0.15	-	0.06	0.25	1.00	0.52	0.60	0.40	0.20	0.08	0.08	7.58

輸液	電解質 (mEq/L)			pH	浸透圧比*
	Na <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>	Acetate <sup>-</sup>		
輸液A	約 2	-	約 120	6.5~7.5	約 3
輸液B	約 150	約 150	-	5.7~6.7	約 5
輸液C	約 2	-	約 45	6.5~7.5	約 2
輸液D	約 15	約 95	-	5.5~6.5	約 3
輸液E	約 3	-	約 80	6.5~7.5	2.3~2.8

\*生理食塩水に対する比

輸液 A…アミパレン輸液<sup>®</sup> (株式会社大塚製薬工場)  
 輸液 B…プロテアミン12注射液<sup>®</sup> (テルモ株式会社)  
 輸液 C…キドミン輸液<sup>®</sup> (株式会社大塚製薬工場)  
 輸液 D…アミノレバン点滴静注<sup>®</sup> (株式会社大塚製薬工場)  
 輸液 E…プレアミン-P注射液<sup>®</sup> (扶桑薬品工業株式会社)

で混釈培養を行った。2日間培養後、生育コロニーを計数し、培養液中の浮遊菌数を算出した。

## 2.6 統計解析

各条件でのBF形成量(累積)、また浮遊菌数の比較検討として、対応のあるt検定を用い(Microsoft Excel、2013)、有意水準は5%とした。

## 3. 結果

### 3.1 カテーテル外壁模擬条件におけるBF形成量

血清、脱線維素血液添加条件下、72時間培養後の各供試菌株のBF形成量(n=1)を図1に示した。

血清添加においては、いずれの菌株も血清濃度が高いほど形成量は低下し、例えばATCC35984株における血清0、1、5、15、30および100%でのBF形成量(A<sub>570</sub>値)は、順に0.232、0.110、0.056、0.023、0.022、0.001を示した。なお供試3株のBF形成量は、調べた限り、JCM2414株、ATCC35984株、ついでATCC51625株の順で高く、例えば血清1%での形成量は、順に0.211、0.110、0.068であった。

脱線維素血液添加においても、血清同様いずれの菌株も血液濃度に応じBF形成量は低下し、その形成量はJCM2414株、ATCC35984株、ATCC51625株の順となつ

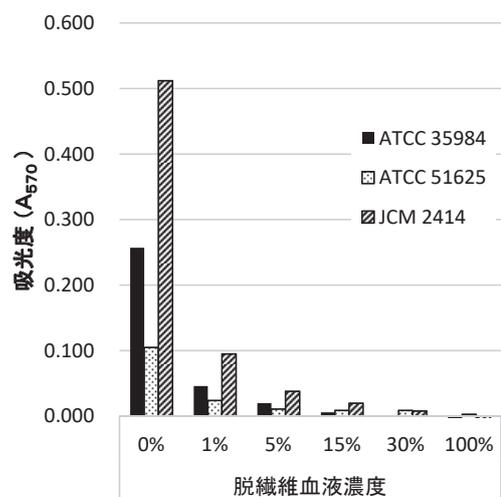
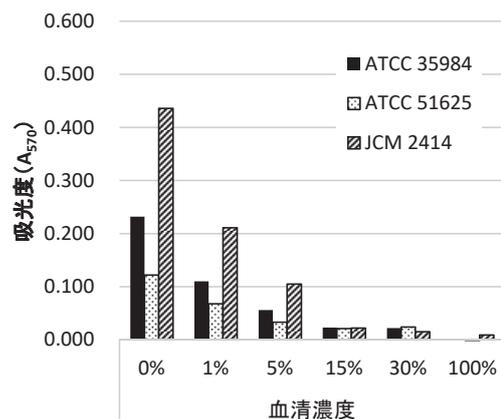


図1 菌株別カテーテル外壁模擬条件におけるバイオフィル形成量

供試菌株: *S. epidermidis* ATCC35984株, ATCC51625株, JCM2414株 (n=1)

た。脱線維素血液においては培養後のマイクロプレートのウェル底面に血液成分の沈殿がみられたが、BF形成量は測定可能であった（本検討についてはいずれもn=1のため、統計解析は実施せず）。

なお、保存血液添加では血液成分の凝固が確認され、吸光度によるBF形成量は測定不能であった（データ未掲載）。

### 3.2 カテーテル内腔模擬条件におけるBF形成量

#### 3.2.1 ブドウ糖およびアミノ酸濃度を調整した市販輸液製剤におけるBF形成量

ブドウ糖と市販アミノ酸輸液製剤を混合し、ブドウ糖濃度として0、5、10及び20%、また総アミノ酸濃度として0、1、2及び4%に調整した各輸液製剤につき、72時間培養後のBF形成量を輸液製剤ごとに、図2(A)～(E)に示した。なおBF形成量はブドウ糖群、アミノ酸群に大別し各群の累積量として図示した。

輸液A（図2(A)）、ATCC35984株を例に、ブドウ糖ならびにアミノ酸のBF形成量に及ぼす影響を記述すると、ブドウ糖について、各濃度群における形成量は、ブドウ

糖濃度が低いほど高くなる傾向にあり、ブドウ糖0%群は10、20%群に比べ、また5%群は10、20%群に比べ、それぞれ有意に高値であった。一方、アミノ酸について、各濃度群における形成量は、アミノ酸濃度が低いほど低くなる傾向にあり、アミノ酸0%群は、1%、2%及び4%群に比べ有意に低値であった。アミノ酸1～4%では濃度に応じて形成量は増加傾向にあり、2%および4%群間は1%群に比べいずれも有意に高値であった。

BF形成量に関わるブドウ糖及びアミノ酸濃度の上述の傾向は、他2株（ATCC51625株、JCM2414株）においても概ね同様であったが、各株の形成量には相違がみられ、例えば、輸液A、ブドウ糖0%群におけるATCC51625株の形成量は同条件下のATCC35984株、JCM2414株に比べ有意に低値であった。

また他の輸液製剤におけるBF形成量に及ぼす、ブドウ糖ならびにアミノ酸濃度の影響傾向は、製剤Aと概ね共通していたが、BF形成量には製剤間で相違がみられ、輸液A、C、Eは輸液B、Dに比べ高い傾向にあった。例えばATCC35984株、ブドウ糖0%群における各輸液の形成量は、輸液A,C,E間では有意差はないものの、輸

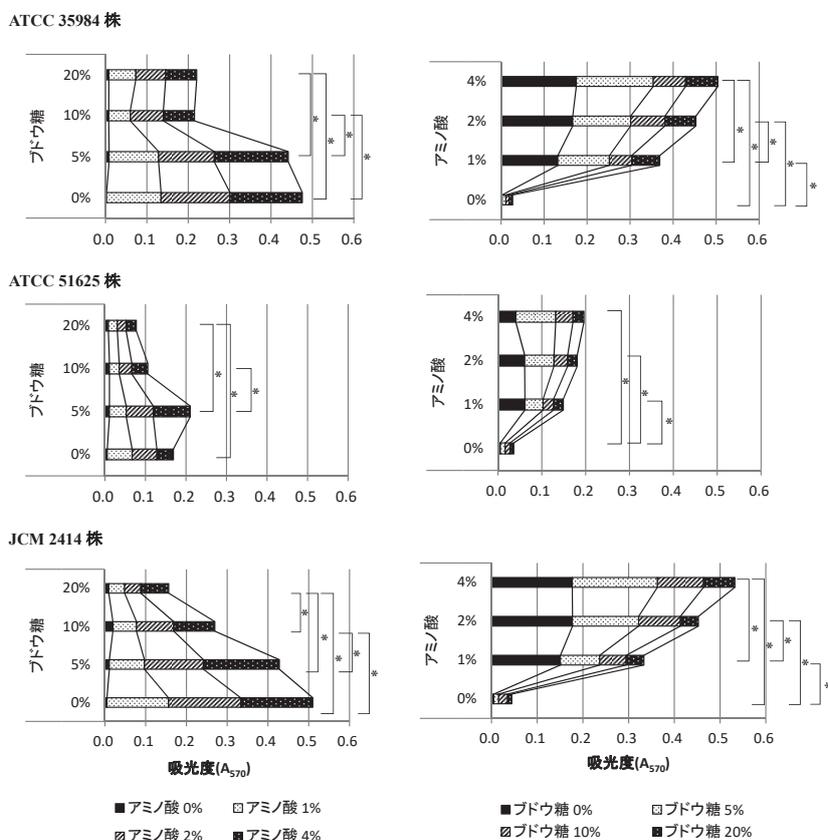


図2 (A) カテーテル内腔模擬条件における輸液A条件でのバイオフィーム形成量

左図：ブドウ糖群間のバイオフィーム形成量（累積）、右図：アミノ酸群間のバイオフィーム形成量（累積）  
輸液A…アミパレン輸液® (n=4) \*p<0.05

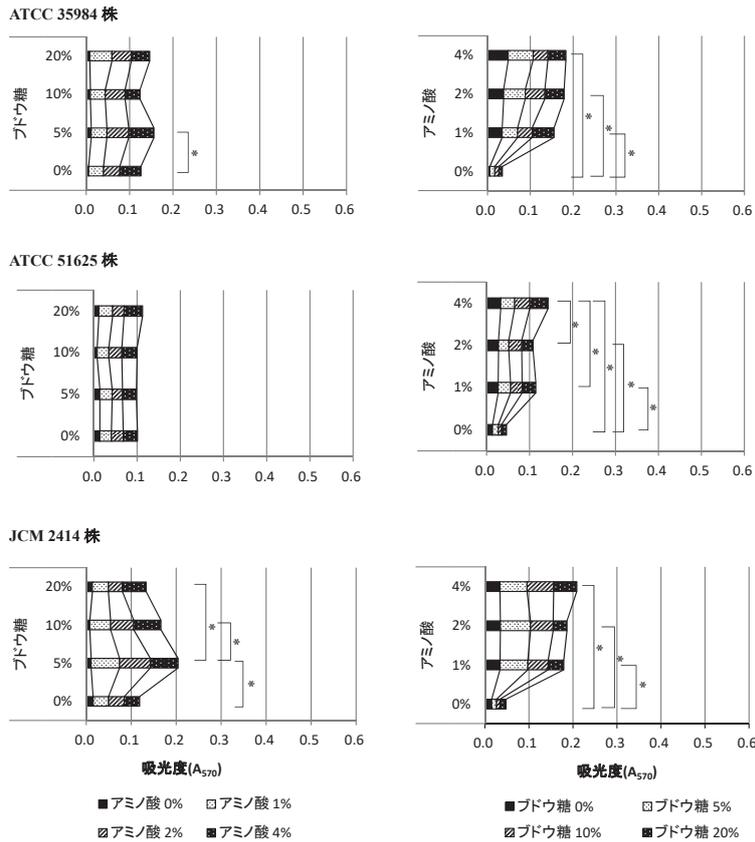


図 2 (B) カテーテル内腔模擬条件における輸液 B 条件でのバイオフィーム形成量

左図：ブドウ糖群間のバイオフィーム形成量（累積）、右図：アミノ酸群間のバイオフィーム形成量（累積）  
輸液 B…プロテアミン 12 注射液® (n=4) \*p<0.05

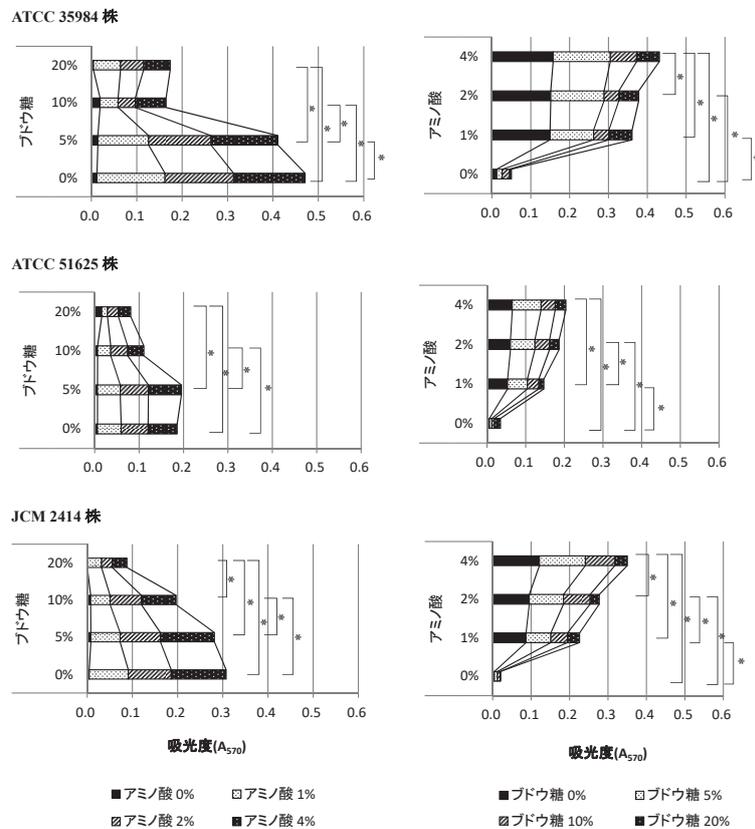


図 2 (C) カテーテル内腔模擬条件における輸液 C 条件でのバイオフィーム形成量

左図：ブドウ糖群間のバイオフィーム形成量（累積）、右図：アミノ酸群間のバイオフィーム形成量（累積）  
輸液 C…キドミン輸液® (n=4) \*p<0.05

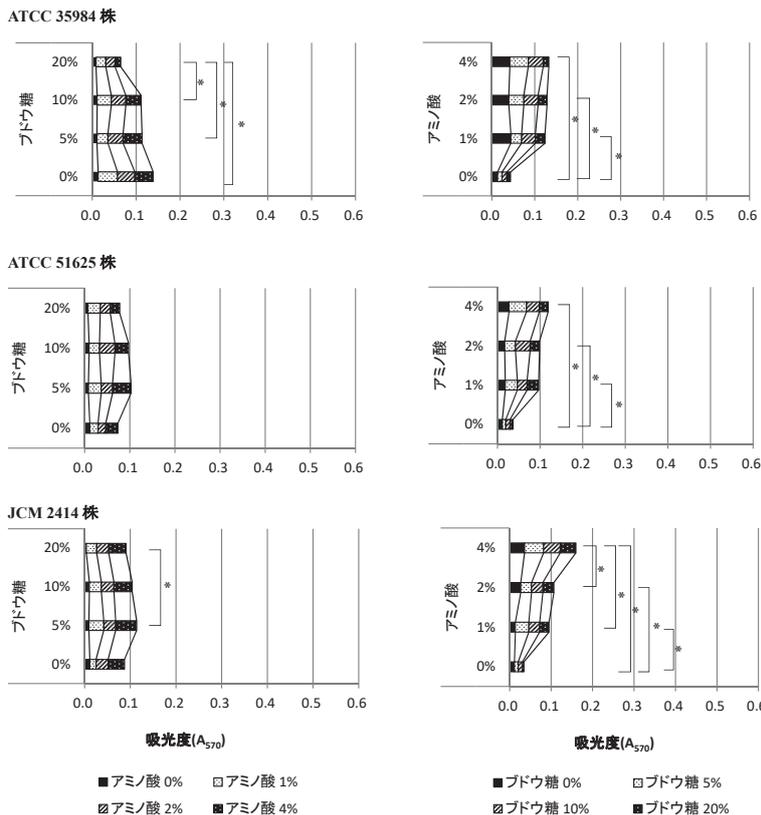


図 2 (D) カテーテル内腔模擬条件における輸液 D 条件でのバイオフィーム形成量  
 左図：ブドウ糖群間のバイオフィーム形成量（累積）、右図：アミノ酸群間のバイオフィーム形成量（累積）  
 輸液 D…アミノレバン点滴静注<sup>®</sup> (n=4) \*p<0.05

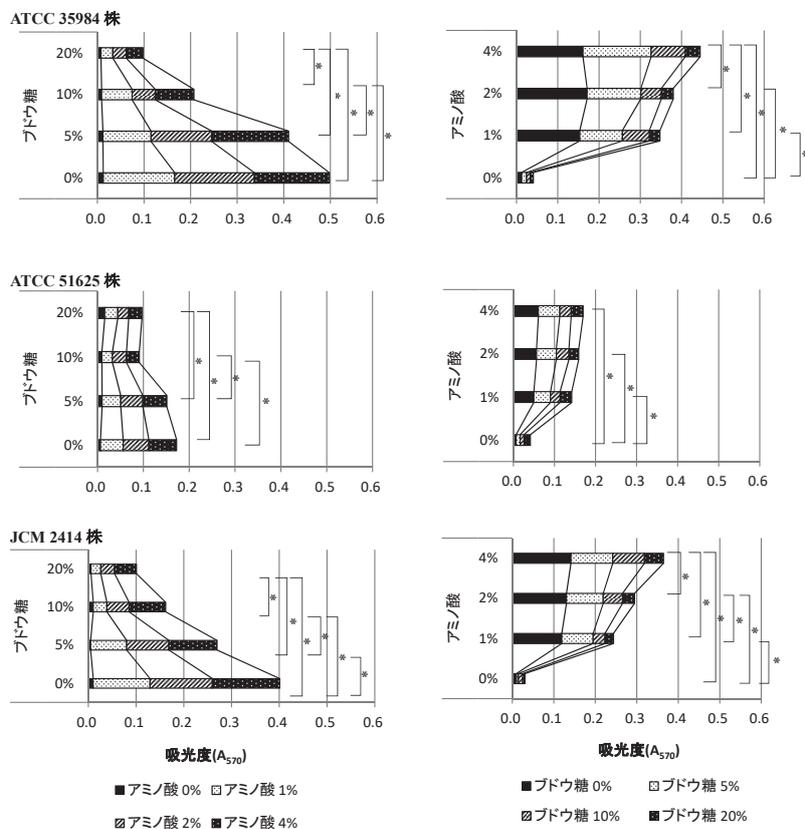


図 2 (E) カテーテル内腔模擬条件における輸液 E 条件でのバイオフィーム形成量  
 左図：ブドウ糖群間のバイオフィーム形成量（累積）、右図：アミノ酸群間のバイオフィーム形成量（累積）  
 輸液 E…プレアミン-P注射液<sup>®</sup> (n=4) \*p<0.05

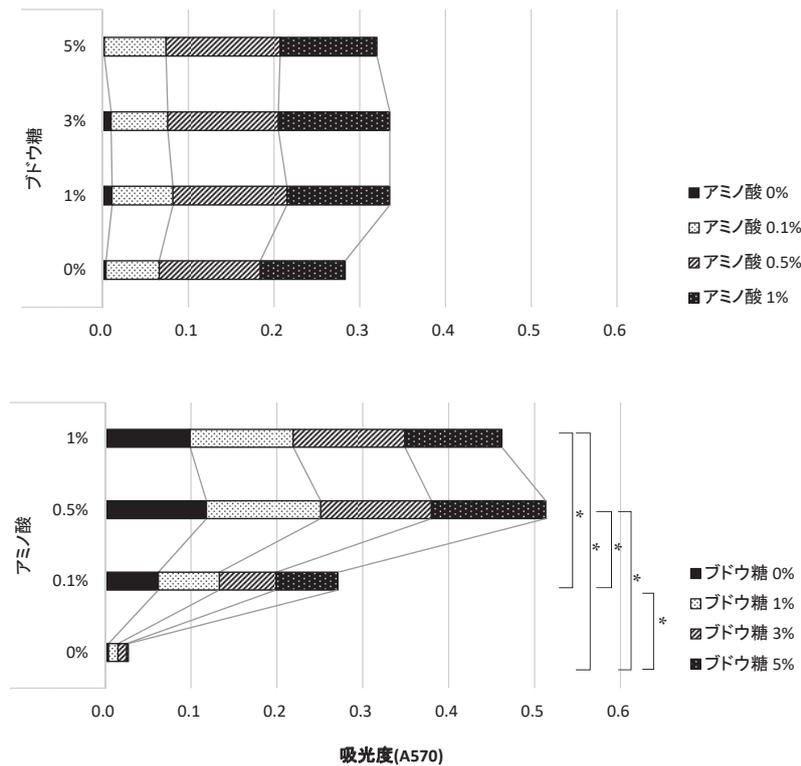


図3. グルコース・アミノ酸低濃度における ATCC35984 株のバイオフィーム形成量  
 上図:ブドウ糖群間のバイオフィーム形成量 (累積)、下図:アミノ酸群間のバイオフィーム形成量 (累積)  
 アミノ酸輸液製剤:輸液 A…アミパレン輸液® (n=3) \*p<0.05

液 B,D に比べ有意に高い値を示した。

### 3.2.2 ブドウ糖・アミノ酸低濃度領域における BF 形成量

2.1 の結果により、ブドウ糖の濃度は 0%・1%・3%・5%、アミノ酸の濃度は 0%・0.1%・0.5%・1% に絞り込み、各濃度となるように調整した輸液 A を用いて、ATCC35984 株における BF 形成量に関しさらなる検討を行った (n=3, 図 3)。

ブドウ糖 0～5% の BF 形成量は各群ともほぼ同程度を示し、当群間の形成量にはいずれも有意差はみとめられなかった。

他方、アミノ酸 0～1% においては、アミノ酸濃度の低下に伴う BF 形成量の減少傾向が観察され、アミノ酸 0% 群の形成量は 0.1、0.5、1% の各群、また 0.1% 群は 0.5%、1% の各群に比べ、いずれも有意に低値であった。なお 0.5% と 1% の両群の形成量には有意差は認められなかった。

### 3.2.3 ブドウ糖・アミノ酸濃度と培養液中の浮遊菌数の関係

ブドウ糖・アミノ酸濃度と培養液中の菌濃度を検討するため、アミノ酸 2% におけるブドウ糖濃度 (0、1、3、5、10 及び 20%)、またブドウ糖 5% におけるアミノ酸濃度 (0、0.1、0.5、1、2 及び 4%) の各濃度域の培養液を製し、ATCC35984 株を用いて 24 時間、72 時間培養後の培養液中の浮遊菌数を測定した (n=3)。

ブドウ糖 0～5% では  $1 \sim 5 \times 10^7$  CFU/mL の菌数を示したが、10% および 20% では約  $5 \times 10^6$  CFU/mL と低下傾向を示し、ブドウ糖 10% での浮遊菌数は同 5% に比べ、有意に低値であった (図 4)。

アミノ酸 0.1%～4% では  $1 \sim 5 \times 10^7$  CFU/mL の菌数を示したが、0% では約  $5 \times 10^5$  CFU/mL に留まり、アミノ酸 0% での浮遊菌数は同 0.1% に比べ、有意に低値であった (図 5)。

なお検討した各ブドウ糖濃度およびアミノ酸濃度において、24 時間、72 時間培養の浮遊菌数はほぼ同等であった。

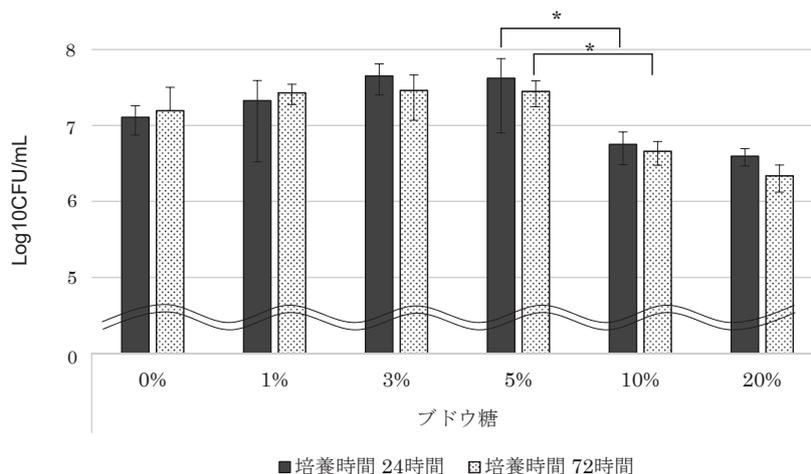


図4. 各ブドウ糖濃度での培養液中の ATCC35984 株の浮遊菌数 (アミノ酸濃度 2%)  
 アミノ酸輸液製剤：輸液 A…アミパレン輸液<sup>®</sup> (平均値 ± 標準偏差, n=3) \*p<0.05

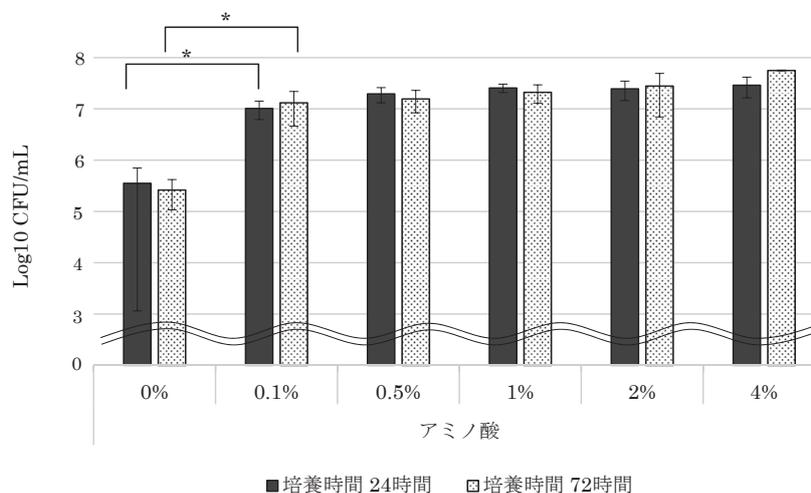


図5. 各アミノ濃度での培養液中の ATCC35984 株の浮遊菌数 (ブドウ糖濃度 5%)  
 アミノ酸輸液製剤：輸液 A…アミパレン輸液<sup>®</sup> (平均値 ± 標準偏差, n=3) \*p<0.05

#### 4. 考 察

血管内留置カテーテルにおける微生物侵入経路には、①不適切な挿入部の消毒・カテーテル挿入操作により、カテーテル経路に侵入<sup>15,16)</sup>、②カテーテルハブ (接続部) またはカテーテルの直接的な汚染<sup>17,18)</sup>、③他の感染病巣からの血行性の播種<sup>19)</sup>、④不適切な輸液管理による輸液汚染<sup>20)</sup>、の4つが考えられている。

本研究では、上記①～④の侵入経路より、BF はカテーテル外壁、内腔双方に形成しうることを考慮し、血管内に挿入されたカテーテル外壁及び内腔表面上における体液、輸液による曝露状態の実験的再現を目指し、それぞれ体液および輸液の模擬培養液成分について検討を行った。

カテーテル外壁模擬条件では、体液を模擬し血液を添加した培養液の検討を行った。血球・凝固因子が結果に与える影響を観察するため、血液成分を全て含む保存血液、凝固因子を除去した脱線維素血液、血球・凝固因子を除去した血清、の3種を供試した。なお、ヒト血液は入手困難であったため、代替として動物 (ウマ) 血液を供試した。

血清においては濃度が高いほど BF 形成量低下の傾向を示した。一方、脱線維素血液、保存血液添加条件においては、BF 形成量は測定不能であったことから、曝露状態の実験的再現は達成できなかった。血液成分の個別添加は静置下では沈殿が発生したことから、少なくとも当試験系での生体内模擬は困難であることが考えられた。特に血液に含まれるフィブリン等の凝固因子は、カテーテル表面上へ付着し BF 形成を促進すると考えられ

ているため<sup>21)</sup>、凝固因子を含んだ血液添加条件においても、BF 形成量評価が可能な試験系の再考が必要である。

カテーテル内腔模擬条件では、輸液成分であるブドウ糖・アミノ酸を添加した培養液の検討を行った。

ブドウ糖濃度に関しては、中心静脈による栄養投与(高カロリー輸液)での濃度を考慮し20%を上限とし、0～20%の濃度範囲でのBF形成量を比較した。ブドウ糖0～5%ではいずれも同程度のバイオフィーム形成量を示したが、10%以上では形成量の低下が見られた。アミノ酸濃度を2%に固定したブドウ糖濃度0～20%の調製培養液における菌数を測定した結果、0～5%では同程度の菌数を示したものの、10%以上では菌数は有意に低下した。これは、ブドウ糖高濃度では培養液の浸透圧が高くなり、*S. epidermidis*の発育を阻害したものと推測される。よってブドウ糖高濃度(10%以上)におけるBF形成量の低下は、*S. epidermidis*の発育阻害に伴う低菌数が要因の1つであることが示唆された。

アミノ酸濃度に関しては、中心静脈による栄養投与(高カロリー輸液)での濃度を考慮し4%を上限とし、0～4%の濃度範囲でのBF形成量を比較した。アミノ酸0.5%～4%でのBF形成量には大きな違いは見られなかったが、0.1%では形成量は約半量に低下し、0%においてはBFの形成はほぼ見られず、アミノ酸の濃度低下に伴う形成量の減少が確認された。また、ブドウ糖濃度を5%に固定したアミノ酸濃度0～4%の調製培養液における菌数を測定した結果、0%では有意な菌数低下がみられたものの、0.1～4%では同程度の菌数を示したことから、BFの形成には一定量の菌数が必要と考えられたが、その形成量は、菌数のみならず他の要因も関係していると考えられた。

アミノ酸添加については5種の市販アミノ酸輸液製剤を用いた。輸液B,Dに比較し、輸液A,C,EにおけるBF形成量は高かった。輸液B,Dは輸液A,C,EよりもpHが1程度低く、また電解質の陰イオンとして、輸液B,Dは酢酸イオン、輸液A,C,Eは塩化物イオンがそれぞれ遊離している。これら液性や電解質成分の違いが供試菌のBF形成量に影響していた可能性があり、輸液の種類によってカテーテルにおけるBF形成に差異があることが示唆された。

また、本研究では*S. epidermidis*3株を用いBF形成量を比較した。内腔模擬条件において、3株の形成量は異なったが、ブドウ糖・アミノ酸の各添加量とBF形成量

との関係は3株ともほぼ同様の傾向を示した。今回の供試菌株以外の*S. epidermidis*株においても、同様の傾向を示す可能性が考えられるが、より多くの菌株を用いたさらなる検証が必要であろう。また、BF研究で汎用されるATCC35984株のBF形成量は、内腔模擬条件下でJCM2414株と同程度、外壁模擬条件下(血清、脱線維素血液存在下)においてはJCM2414株のほうが高かった。これら結果から、当培養条件においてJCM2414株はATCC35984株と同等以上のBFを形成し、JCM2414株がBF研究供試株として追加しえる可能性も示唆される。

本研究では培養液組成の検討を主目的としたため、マイクロプレートアッセイを使用した静置培養でBF形成量を評価した。当方法は、最も汎用されているBF研究技術の一つであり、BF形成に与える因子のスクリーニング等に広く用いられている。多条件を同時に比較しやすく、手順も簡便であるのがメリットである。その他の培養評価系として、BFリアクター等の連続培養が挙げられる<sup>22)</sup>。連続培養は一定の流速で培地を供給することで、培養環境を一定にし、また流水による物理的な条件も検討可能である点で静置培養と異なる<sup>23)</sup>。今回の検討では主にBFの形成量を評価したが、その構造的特徴を観察することも重要である。近年では、共焦点レーザー顕微鏡での三次元構造観察が主流となり<sup>24)</sup>、連続培養法を組み合わせ経時的に観察する方法も開発されている。本研究においても、連続培養法や三次元的構造観察を行なって、培養液組成とBF形成との関連をさらに検討する必要があると考える。

さらに本研究は、カテーテル内腔および外壁を模擬した培養液の組成と、実際に形成されたBF形成量との関係を、静置培養系を用いて比較する実験系である。しかし、実使用条件のカテーテル内腔は一定の速度で輸液が流れ、カテーテル外壁は血液が流れている状況であり、本研究の実験系では実使用条件を模した実験系には至っていない。それらの模擬には連続的に培養液が供給される連続培養による評価がより適している。今回の検討で得られた知見をもとに、BFリアクター等の連続培養により物理的な条件への展開、さらには、カテーテル素材がBF形成の1つの重要な因子であることも示唆されていることから<sup>25-27)</sup>、表面素材による影響も検討課題に追加するべきである。このような検討の蓄積により、実使

用条件におけるカテーテル表面のBF形成に関するさらなる知見が得られると考えられる。

#### ■利益相反自己申告

筆頭者は吉田製薬株式会社の社員であり、試験材料の提供を受けた。

#### ■引用文献

- 1) Mah TF, O' Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 2001;9:34-39
- 2) Ryder MA. Catheter-Related Infection: It's All About Biofilm. *Topics in Advanced Practice Nursing.* 2005
- 3) A.Simon Lynch and Gregory T. Robertson. Bacterial and Fungal Biofilm Infections. *Annual Review of Medicine* 2008; 59: 415-428
- 4) Blot SI, Depuydt P, Annemans L, et al. Clinical and economic outcomes in critically ill patients with nosocomial catheter-related bloodstream infections. *Clin Infect Dis.* 2005; 41:1591-8.
- 5) Mermel LA. Prevention of intravascular catheter-related infections. *Ann Intern Med.* 2000; 132:391-402.
- 6) Maki DG, Kluger DM, Crnich CJ. The risk of bloodstream infection in adults with different intravascular devices: a systematic review of 200 published prospective studies. *Mayo Clin Proc.* 2006; 81:1159-71.
- 7) CDC: Guidelines for the Prevention of Intravascular Catheter-Related Infections. 2011
- 8) Morales M, Mendez-Alvarez S, Martin-Lopez JV, Marrero C, Freytes C: Biofilm: the microbial "bunker" for intravascular catheter-related infection. *Supportive Care in Cancer.* 2004;12(10):701-707.
- 9) Treter J, Macedo AJ. Catheters: A suitable surface for biofilm formation. Science against Microbial Pathogens: *Communicating Current Research and Technological Advances.* 2011; 835-842
- 10) Hilmar Wisplinghoff, Nosocomial Bloodstream Infection in US Hospitals :Analysis of 24,179 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. *Clinical Infectious Diseases* 2004;39:309-17
- 11) Otto M. *Staphylococcal* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008;322:207-228.
- 12) Pérez-Giraldo C1, Cruz-Villalón G, Sánchez-Silos R, Martínez-Rubio R, Blanco MT, Gómez-García AC. In vitro activity of allicin against *Staphylococcus epidermidis* and influence of subinhibitory concentrations on biofilm formation. *J Appl Microbiol.* 2003;95:709-11.
- 13) Pettit, R.K.; Weber, C.A.; Kean, M.J.; Hoffmann, H.; Pettit, G.R.; Tan, R.; Franks, K.S.; Horton, M.L. Microplate alamar blue assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005, 49, 2612-2617.
- 14) O'Toole, G.A., Pratt, L.A., Watnick, P.I., Newman, D.K., Weaver, V.B., and Kolter, R. Genetic approaches to study of biofilms. *Methods Enzymol.* 1999;310, 91-109.
- 15) Safdar N, Maki DG. The pathogenesis of catheter-related bloodstream infection with noncuffed short- term central venous catheters. *Intensive Care Med* 2004; 30:62-7.
- 16) Maki DG, Weise CE, Sarafin HW. A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *N Engl J Med* 1977; 296:1305-9.
- 17) Raad I, Costerton W, Sabharwal U, Sacilowski M, Anaissie E, Bodey GP. Ultrastructural analysis of indwelling vascular catheters: a quantitative relationship between luminal colonization and duration of placement. *J Infect Dis* 1993; 168:400-7.
- 18) Dobbins BM, Kite P, Kindon A, McMahon MJ, Wilcox MH. DNA fingerprinting analysis of coagulase negative *staphylococci* implicated in catheter related bloodstream infections. *J Clin Pathol* 2002; 55:824-8.
- 19) Anaissie E, Samonis G, Kontoyiannis D, et al. Role of catheter colonization and infrequent hematogenous seeding in catheter-related infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995; 14:134-7.
- 20) Raad I, Hanna HA, Awad A, et al. Optimal frequency of changing intravenous administration sets: is it safe to prolong use beyond 72 hours? *Infect Control Hosp Epidemiol* 2001; 22:136-9.
- 21) Mehall JR, Saltzman DA, Jackson RJ, Smith SD. Fibrin sheath enhances central venous catheter infection. *Crit Care Med.* 2002; 30:908-12.
- 22) Goeres DM, Loetterle LR, Hamilton MA, Murga R, Kirby DW, Donlan RM. Statistical assessment of a laboratory method for growing biofilms. *Microbiology.* 2005; 151:757-762
- 23) Gu W, Xu D, Sun S. In Vitro Models to Study *Candida Albicans* Biofilms. *J Pharm Drug Devel.* 2015; 3(3): 301
- 24) De Kievit, T.R., M.D. Parkins, R.J. Gillis, R. et al. Storey. Multidrug efflux pumps: expression patterns and contribution to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2001; 45: 1761-1770.
- 25) Katsikogianni M, Missirlis YF. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and techniques used in estimating bacteria-material interactions. *European Cells and Materials.* 2004;8:37-57.
- 26) Darouiche RO. Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence. *Clinical Infectious Diseases.* 2001;33:1567-1572.
- 27) Pascual A. Pathogenesis of catheter-related infections: lessons for new designs. *Clinical Microbiology and Infection.* 2002;8:256-264.

## Effects of the culture media simulating in vivo conditions on the biofilm formation in intravascular catheter

Shota Morimoto, Takumi Kajiura, Erisa Sugawara, Satoshi Kimura

Division of Infection Prevention and Control, Tokyo Healthcare University Postgraduate School, Faculty of Healthcare, Department of Healthcare

**Background and Introduction.** Biofilm (BF) formed by infectious bacteria cause catheter-related bloodstream infection (CRBSI). This infectious disease is a problem in medical setting. BF formed on the surface of the catheter prevent the penetration of antibacterial drugs and have a high protection against immune system. The treatment of CRBSI is therefore difficult. It is important to obtain information on the BF formation and to develop methods to effectively prevent its formation.

Several groups reported the methods for assessing the amount of BF targeted at the catheter. However, there were few reports that accurately simulate the in vivo conditions.

**Objective.** In the present study, we prepared a series of simulated culture media consisting of various components to simulate the conditions of the lumen and outer wall surface of the vascular catheter and examined the influence of these simulated culture media on the amount of BF formed.

**Methods.** Three strains of *Staphylococcus epidermidis* (ATCC35984, ATCC51625, JCM2414) were used for the following experiments. The various simulated culture media were added to 96-well plates and bacteria were cultured at 36 °C for 72 hours in the wells. The BF was stained by crystal violet and the amount was measured at A570. The culture media simulating the composition of liquid in contact with the vascular catheter lumen and outer wall were used. The simulated culture media for the lumen were prepared using glucose and five kinds of the commercially available amino acid infusion solutions (0-20% glucose and 0-4% total amino acid were prepared). We examined the effect of each culture medium on the amount of BF and also examined whether there is a difference in the BF formation between the five kinds of amino acid infusion solutions or *S. epidermidis* strains. In the simulated culture media for the outer wall, horse

blood (defibrinated blood or serum) was added to RPMI 1640 medium with a blood concentration of 0-100%, respectively. We examined the influence of blood on the BF formation by the method described above.

**Results.** The results on the simulated culture media for the catheter lumen showed a tendency that the lower the glucose concentration and the higher the amino acid concentration, the higher the amount of BF was. The similar levels of BF were formed in the culture media with glucose concentrations of 0-5%. In the culture media containing 10% or more of glucose, the amount of BF decreased. In the culture medium with 0% amino acid, the BF formation was undetectable. BF formation was detected in the culture medium containing 0.1% or more of amino acid, and the similar levels of BF were formed in the range of 0.5-4%. The amount of BF varied depending on the kind of amino acid solution and *S. epidermidis* strains. The results on the simulated culture media for the outer wall showed that the higher serum concentration and blood concentrations, the lower the amount of BF was.

**Conclusions.** We examined the relationship between the composition of the simulated culture media for the catheter lumen / outer wall and the amount of *S. epidermidis* BF formed. The results on the simulated culture media for the catheter lumen suggest that the concentration of glucose or amino acid in the infusion solution has an influence on the amount of BF. In the experiments of the simulated culture media for the catheter outer wall, serum and defibrinated blood inhibited BF formation.

### Key words

*S. epidermidis* • biofilm formation • amino acid infusion • glucose solution • RPMI1640