

超音波照射による酪酸菌の増減

福井県立武生高校

Abstract

We decided to study how the amount of Butyric acid bacteria increases due to supersonic waves. Our first result is that the lower the frequency of supersonic waves became, the more absorbance increased. Our second result is that when we apply supersonic waves of 400kHz, the absorbance increased the most. In conclusion, supersonic waves are not effective for the treatment of cancer or we may be able to use them if we use the proper frequency.

1 はじめに

(1)超音波による微生物の増減

超音波照射は大腸菌の増減に影響する(井上ほか、2022)では超音波照射が大腸菌の増殖を促進すると示した。超音波照射による乳酸発酵の促進と乳酸菌数の関係(増澤ほか、2004)では、乳酸菌に関して高周波数であるほど菌数が多いと示した。

(2)酪酸菌の増殖促進

多様な酪酸投与とその効果(宇佐美ほか、2018)では、酪酸が発がん抑制に効果的であると示した。

(3)問い

これらのことから、超音波照射により酪酸菌が増殖するとなれば、超音波を癌治療に利用することができるのではないかと、井上らの研究の今後の課題である超音波と大腸菌以外の微生物の関係について研究できるのではないかと考えた。超音波は実際にエコー検査、腹部超音波検査、心臓超音波検査など様々な医療現場で活用されている。このため、適切な振動数であれば身体への超音波照射は身体に問題がないと考えられる。そして超音波照射による酪酸菌の増減を研究していくことに決定した。

私達は井上らの研究を継続し、「超音波の周波数の変化によって酪酸菌はどのように増減するのか」という問いのもと、研究を行った。

(4)仮説

実験を進めていく上で「超音波の周波数を高くするに連れ、酪酸菌は増加する」という仮説を立てた。乳酸菌と酪酸菌にはどちらも嫌気性細菌であるという特徴がある。嫌気性細菌は酸素がない状態のみ生きることができる。増澤らの研究から、乳酸菌が超音波照射により増殖が促進されるのであれば超音波は酪酸菌にも同様に作用するのではないかと考えた。

超音波と微生物について研究した先行研究の実験方法を参考にして研究を進めていく。

2 検証方法

(1)吸光度

菌の増殖量を測定するのに吸光度を使用した。吸光度とは物体の光吸収の強さを表す数値(広辞苑)であり、分光光度計を用いて測定することができる。分光光度計は波長を550nmに設定して使用した。菌が増殖すると培地の光吸収が強くなって吸光度が増加することを利用して、吸光度の増加量の差を比較して菌の増殖量を評価した。なお、吸光度では培地中の菌の生死を確認することはできず、培地中の菌が死んでいる場合でも吸光度の値に影響する。

(2)コロニー形成

菌の生死を確認するために、吸光度の使用と合わせてコロニーの形成の有無を調べた。コロニーとは細菌・かび類・培養細胞などの、培地上の肉眼で見える集まり(広辞苑)である。培養後の菌を液体培地で100倍に希釈したものを寒天培地に移植し培養する。そこでコロニーが形成された時は培地中の菌が生きている、形成されない時は培地中の菌が死んでいると評価した。

(3)超音波照射装置

酪酸菌を培養すると同時に超音波を照射する実験装置は、ファンクションジェネレータと増幅器、スピーカーを導線でつなぎ、スピーカーを恒温器の中に設置したものである。周波数はファンクションジェネレータで設定し、増幅器で超音波の振幅を調整する。恒温器は3段構造になっており、上段と下段にスピーカーを中段に向くように設置し、中段にアネロパックに入った酪酸菌入りの滅菌チューブを置く。すなわち、酪酸菌の上下から超音波を照射して培養する。

(4)材料

酪酸菌(*butyric acid bacteria Clostridium butyricum*)、液体培地(GAMブイヨン)*、寒天培地(BL培地)**

*GAMブイヨン(pH7.3±0.1)

組成 41.7g(1L分)中

ペプトン 5.0g ダイズペプトン 3.0g プロテオゼペプトン 5.0g

消化血清末 10.0g 酵母エキス 2.5g 肉エキス 2.2g

肝臓エキス 1.2g ブドウ糖 0.5g 溶性デンプン 5.0g

L-トリプトファン 0.2g L-システイン塩酸塩 0.3g

チオグリコール酸ナトリウム 0.3g L-アルギニン 1.0g

ビタミンK1 5mg ヘミン 10mg リン酸二水素カリウム 2.5g
塩化ナトリウム 3.0g

**BL寒天培地(平板培地)(pH7.2±0.1)

115°C20分間高圧蒸気滅菌後、約50°Cに冷却した培地にウマ脱繊維血液を5%の割合で加え、シャーレに分注する。

組成 58.0g(1L分)中

肉エキス 2.4g プロテオゼペプトン 10.0g ペプトン 5.0g
ダイズペプトン 3.0g 酵母エキス 5.0g ブタ肝臓エキス 3.2g
ブドウ糖 10.0g 溶性デンプン 0.5g リン酸二水素カリウム 1.0g
リン酸一水素カリウム 1.0g 硫酸マグネシウム(七水塩) 0.2g
硫酸第一鉄(七水塩) 0.01g 塩化ナトリウム 0.01g
硫酸マンガン 0.007g 消泡剤(シリコン) 0.2g ポリソルベート80 1.0g
L-システイン塩酸塩 0.5g カンテン 15.0g

(5)器具

オートクレーブ、分光光度計、ファンクションジェネレータ、増幅器、スピーカー、恒温器、クリーンベンチ、ピペット・ディスペンサー、シャーレ、滅菌チューブ、マイクロチューブ、ボルテックスミキサー、キューベット、アネロパウチ・ケンキ、パウチ用袋

(6)方法

酪酸菌を液体培地に1:100の割合(酪酸菌0.04ml、液体培地4ml)で移植した。以後滅菌チューブに小分けして入れた状態で冷凍保存し実験のたびに解凍して使用するものとする。

- ①分光光度計を用いて培養前の酪酸菌の吸光度を測る。
- ②滅菌チューブ5本をアネロパックに入れ嫌気状態(酸素がない状態)にする。
- ③アネロパックを恒温器の中に入れる。(恒温器にはファンクションジェネレータ、増幅器と繋いだスピーカーが設置されている。)
- ④周波数を設定し超音波を14時間発生させ、酪酸菌に当てる。
- ⑤分光光度計を用いて培養後の酪酸菌の吸光度を測る。
- ⑥培養後の酪酸菌を液体培地で100倍に希釈する。
- ⑦希釈した酪酸菌を寒天培地に移植し24時間培養する。この際37度の嫌気状態を保つためアネロパック、恒温器の中に入れる。
- ⑧培養後、寒天培地に出現したコロニーを観察する。
- ⑨①～⑧までの操作を超音波の周波数を200kHzごとに変えて0Hz～1000kHzまで行う。

3 結果

グラフの縦軸は、超音波を当てる前と当てた後の吸光度の差の5本の平均値となっている。超音波を当てずに培養した酪酸菌でコロニーが生成された。図のグ

ラフから400kHzの超音波を当てたとき最も吸光度の差が大きくなることが分かった。

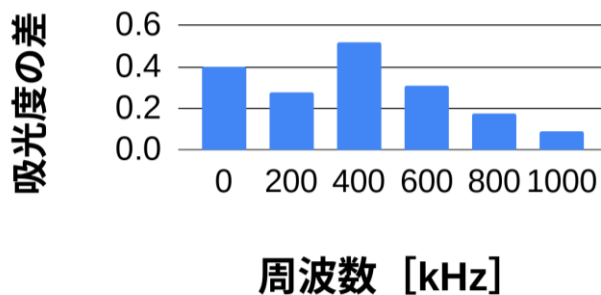


図 吸光度の増加量と周波数の関係

4 考察

実験結果から、400kHzの超音波を当てたとき最も吸光度の増加量が多いことがわかる。また、このときにコロニーが形成されたことからこの値の吸光度の増加量は生きた菌によるものだと判断できる。そのため、400kHzが最も酪酸菌の増殖を促進すると推測される。

ただし、菌は個体差があるため実験結果に幅が出やすい。そのため、より正確な実験値を得るため実験回数を重ねること、400kHz付近の周波数をより細かい周波数で実験し、酪酸菌の増減を調べることが必要である。また、吸光度を測定した分光光度計がかなり古く正確性に欠け、実験値が安定しなかったことも問題として挙げられる。

5 まとめ

「超音波照射によって酪酸菌はどのように増減するのか」という問いを明らかにするため実験を行った。

その結果、本研究の周波数の範囲では、400kHzの超音波を当てた時最も酪酸菌の増殖量が大きくなることがわかった。これより、400kHzの超音波が最も酪酸菌の増殖を促進すると考えた。

これを受けて、適切な周波数の超音波を治療に活用できるかもしれないと考えた。

謝辞

本研究を行うにあたりご協力いただいた福井大学前田榊夫様、Noster株式会社 久景子様、福井工業技術センター 辻堯宏様に感謝を申し上げます。

参考文献

増澤信義、島田忠幸、大平悦三(2004)「超音波による乳酸発酵の促進と乳酸菌数の関係」
宇佐美眞、三好真琴、西本幸子、戸田明代、吉原勢津子(2018)「多様な酪酸投与とその効果