

# シルクセリシンのメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 バイオフィルム形成抑制効果

西帯野智代, 馬場淳徳, 福重智子,  
藺牟田直子, 中村政敏, 西 順一郎, 金蔵拓郎

## シルクセリシンのメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 バイオフィルム形成抑制効果

西帯野智代<sup>1,2)</sup>, 馬場淳徳<sup>3)</sup>, 福重智子<sup>2)</sup>,  
藺牟田直子<sup>4)</sup>, 中村政敏<sup>5)</sup>, 西 順一郎<sup>4)</sup>, 金蔵拓郎<sup>2)</sup>

- 1) 鹿児島大学病院看護部
- 2) 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科皮膚科学分野
- 3) 鹿児島市立病院皮膚科
- 4) 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科微生物学分野
- 5) 鹿児島大学病院医療技術部

### Inhibitory effect of silk sericin on biofilm formation by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clinical isolates

Tomoyo NISHIOBINO<sup>1,2)</sup>, Atsunori BABA<sup>3)</sup>, Tomoko FUKUSHIGE<sup>2)</sup>, Naoko IMUTA<sup>4)</sup>,  
Masatoshi NAKAMURA<sup>5)</sup>, Junichiro NISHI<sup>4)</sup>, Takuro KANEKURA<sup>2)</sup>

- 1) Nursing department, Kagoshima University Hospital
- 2) Department of Dermatology, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences
- 3) Department of Dermatology, Kagoshima City Hospital
- 4) Department of Microbiology, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences
- 5) Clinical technology department, Kagoshima University Hospital

(Received 12 April 2024; Revised 16 August 2024; Accepted 3 October 2024)

\* Address to correspondence

Tomoyo NISHIOBINO

Nursing department, Kagoshima University Hospital

8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima Japan, 890-8520

Phone: +81-99-275-5111

e-mail: tmy-n28@m2.kufm.kagoshima-u.ac.jp

### Abstract

In chronic wounds such as bedsores, bacterial infection prolongs wound healing, and biofilms are a particularly important inhibitory factor in wound healing. Therefore, wound management requires inhibition of biofilm formation, and research is being conducted to develop products with anti-biofilm properties. Silk is composed of two types of proteins, fibroin and sericin, and it has been reported that fibroin promotes wound healing and sericin has antibacterial activity. Therefore, we wondered whether sericin could inhibit biofilm formation and investigated the inhibitory effect of sericin on the

biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from wounds in vitro. Two MRSA strains with high biofilm forming ability and a standard strain were used. Sericin was extracted from silk by high-pressure steam sterilization. Sericin was added to the biofilm forming process of MRSA strains and its inhibitory effect on biofilm formation was evaluated. Morphological observation showed that the pigment in the stained biofilm was attenuated. Biofilm assay using a microtiter plate showed that the mean biofilm index was significantly inhibited by 66.1% in the sericin 250 µg/mL group compared to the control group (0.417 vs. 1.231,  $p < 0.01$ ). These results show that silk sericin has an inhibitory effect on the biofilm formation by MRSA strains. Sericin contains many positively charged amino acids with hydrophilic amino acid residues, which are easy to combine with the negatively charged bacterial surface. The feature of molecular structure was thought to be related to its anti-biofilm properties.

**Key words:** chronic wound, biofilm, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), silk, sericin

### 抄録

褥瘡など慢性創傷において細菌感染は創傷治癒を遷延化させるが、特に創傷治癒の重要な阻害要因としてバイオフィルムの存在がある。そのため創傷管理では、バイオフィルムの形成を阻害することが求められ、抗バイオフィルム作用を有する製品開発が進められている。シルクは、フィブロインとセリシンの2種類のタンパク質で構成され、フィブロインは創傷治癒を促進し、セリシンは抗菌作用を有するとの報告がある。そこで、慢性創傷の難治化する要因であるバイオフィルムの形成をセリシンによって阻害できないかと考え、創傷から分離されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA) 株のバイオフィルム形成能に対する影響をin vitroで検討した。

MRSA株は、高バイオフィルム形成能を有する臨床分離株2株と標準株を用いた。シルクは高圧蒸気滅菌法でフィブロインとセリシンに分離させてセリシンを抽出した。バイオフィルム形成過程でセリシンを加え、バイオフィルム形成に対する阻害効果を形態学的に観察するとともに、マイクロタイタープレートを用いたバイオフィルムアッセイでbiofilm index (BI)を測定した。形態学的観察では染色したバイオフィルムの色素が減弱することを確認した。バイオフィルムアッセイでは、最終濃度250 µg/mLのセリシン添加群が対照群に比べて平均BIが66.1%低下しており(0.417 vs. 1.231,  $p < 0.01$ )、セリシンがMRSAによるバイオフィルム形成を阻害することが明らかになった。セリシンは正に荷電した親水性アミノ酸残基をもつアミノ酸を多く含有し、負に荷電している細菌表面と結合しやすいことが予想され、その分子構造がバイオフィルム形成阻害効果と関連していると考えられた。

### 諸言

褥瘡など慢性創傷では細菌が壊死組織中にバイオフィルムを形成し治癒が遷延化することが知られている<sup>1)</sup>。創傷面に付着した細菌は、菌体表面に多糖体を産生し膜状の構造物を形成しバイオフィルムとして存在する<sup>3,4)</sup>。バイオフィルムは慢性創傷の60%以上に存在し遷延化の重要な要因である<sup>2)</sup>。バイオフィルムは多糖類、蛋白質、糖脂質および細胞外DNA等から組成される細胞外高分子物質 (extracellular polymeric substances : EPS) によって形成され、内部あるいは下層に存在する細菌は、バイオフィルムを防御壁とし、炎症性細胞の貪食や抗菌薬・消毒薬に対する抵抗性を増すため、創傷管理においてはバイオフィルムの形成を阻害することが極めて重要である<sup>1)</sup>。

慢性創傷である褥瘡部の菌種調査では、数種の菌が検出され、特にmethicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) を含む黄色ブドウ球菌が多く<sup>5)</sup>、慢性下腿潰瘍の調査では、黄色ブドウ球菌が93.5%、緑膿菌が52.5%を占めていた<sup>6)</sup>。特にMRSAに感染した創傷は難治化し、

院内感染症の原因の一つとして徹底した対策が必要となる。

創傷のバイオフィルムに対して従来外用剤として、スルファジアジン銀、ポビドンヨード・シュガーが使用されていたが効果は限定的である<sup>7,8)</sup>。他にも、酢酸、蜂蜜、ヨウ素、ポリヘキサメチレンビグアニド (PHMB)、銀などの抗バイオフィルム剤としての可能性が報告されている<sup>14-18)</sup>。近年では抗菌成分のポリヘキサニド、界面活性剤のベタインが配合されたゲルが使用され一定の効果が得られるようになった<sup>19,20)</sup>。しかし、細菌が形成したバイオフィルムのため治療に難渋する褥瘡など慢性創傷の症例は多く、バイオフィルムを予防・治療するための新規戦略が必要とされている<sup>9)</sup>。

シルクはフィブロインとセリシンの2種類のタンパク質で構成される。セリシンは、フィブロイン繊維同士を接着させる粘着層に含まれる。シルクを絹糸として使用する場合、セリシンは精製処理時に取り除かれ、残った繊維部分のフィブロインが利用されている。シルクは外科手術の縫合糸として使用されているように生体適合性

に優れた素材である。軟膏、ゲル、スポンジやパウダーなど様々な形態に加工することが可能であり、この特性は医療機器開発において利点である。マウスの実験的潰瘍にフィブロインフィルムを貼付すると、真皮線維芽細胞の増殖と遊走、血管新生を促進し良好な肉芽組織を形成することが示されている<sup>10)</sup>。一方セリシンは、抗菌作用を有することが報告されている<sup>11,12,21,22)</sup>。セリシンは親水性アミノ酸残基をもつアミノ酸を多く含み、その構造と細菌細胞との相互作用によって、細菌細胞膜の透過性が変化し、細胞内タンパク質と炭水化物の漏出、細菌細胞の代謝の阻害、細胞圧の上昇を来し細菌の増殖抑制および細胞死につながると考えられている<sup>27)</sup>。

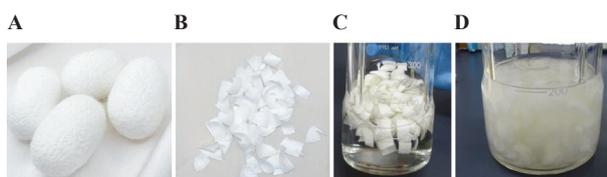
そこで、我々は、セリシンの抗菌作用に着目し、慢性創傷管理で難渋するバイオフィームへの影響について検討することとし、創傷から採取されたMRSA臨床分離株のバイオフィーム形成能に対する抑制効果を*in vitro*で検討した。

## 対象と方法

### 1. セリシンの抽出と定量

セリシンは高圧蒸気滅菌法（オートクレーブ法）で抽出した。シルク繭1.5gを1cm角程度に裁断し蒸留水60mLを加え、121℃で20分間の高圧蒸気滅菌を行い、繊維部分のフィブロインと溶液部分のセリシンに分離させ(Fig. 1)、滅菌ガーゼでろ過した。

抽出したセリシンのタンパク質濃度は、Bicinchoninic (BCA) 法に基づき、Pierce™ BCA Protein Assay Kits (Thermo Fisher Scientific)を用いて測定した。



**Figure 1** Extraction of sericin(High-pressure steam sterilization method) (a) Silk cocoons. (b) Cut silk cocoons into 1 cm squares. (c) Cut cocoons with distilled water in a medium bottle. (d) After autoclaving at 121°C for 20 minutes.

### 2. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

抽出されたセリシンの分子量は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)で確認した。分子量マーカーはDynaMarker® Protein MultiColor (BioDynamics Laboratory Inc.)を用い、CBB (Coomassie brilliant blue) 染色を行った。

### 3. 対象菌株

MRSA株は、2021～2022年に鹿児島大学病院で創傷

検体から分離された臨床分離株6株(#1～6)を使用した。対照株としてMRSA標準株(ATCC:33591)1株(#7)を使用した。

菌種同定は、VITEK-MS(バイオメリュー・ジャパン)で実施した。薬剤感受性試験は、VITEK-2 ブルー(バイオメリュー・ジャパン)またはIA40 MICi(栄研化学)を用いて実施した。MRSAの判定基準は、CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) M100 S-29の基準(oxacillin  $\geq 4 \mu\text{g/mL}$  または cefoxitin  $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ )に従った。

菌懸濁液は、スキムミルクで凍結保存した菌株を血液寒天培地に塗布し37℃で24時間培養し、それぞれの菌株をTSB液体培地で、37℃ 18時間振盪培養し作製した。

### 4. 菌増殖に対するセリシンの影響の評価

マイクロタイタープレートの各ウェルにおいて、セリシン濃度250  $\mu\text{g/mL}$  のTSB液体培地 200  $\mu\text{L}$ に18時間培養した菌株の菌懸濁液5 $\mu\text{L}$ をそれぞれ加え、37℃で静置培養し、濁度を吸光度595nm (OD595)で測定した。吸光度は開始時から3時間までは1時間毎に測定し、その後は6時間後、9時間後、12時間後、24時間後に測定した。セリシンを添加しないTSB液体培地における各株の増殖を対照とした。

### 5. バイオフィームアッセイ

バイオフィーム形成能の測定は、マイクロプレートで行った<sup>13)</sup>。96ウェルプレートの各ウェルに37℃で18時間振盪培養した菌懸濁液5 $\mu\text{L}$ と2%スクロースを加えたTSB液体培地200  $\mu\text{L}$ を添加し、37℃で18時間培養した。培養上清を破棄し水道水で静かに洗浄した後、ウェルの底面と側面に形成されたバイオフィームを0.1%クリスタルバイオレットで5分間染色し、再度洗浄した後、95%エタノール200 $\mu\text{L}$ を加えて溶解しOD595を測定し、培地だけの対照ウェルのOD595を減じた値をbiofilm index (BI)とした。

### 6. バイオフィームの形態学的観察

バイオフィームアッセイでウェル底面に形成されたバイオフィームを5分間染色、洗浄後、顕微鏡(キーエンス オールインワン蛍光顕微鏡)を用いて、位相差観察と明視野観察を行った。

### 7. バイオフィーム抑制試験

マイクロタイタープレートの各ウェルに、セリシン濃度250  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{g/mL}$ , 2  $\mu\text{g/mL}$ , 0  $\mu\text{g/mL}$ の2%スクロース添加TSB液体培地200 $\mu\text{L}$ と菌懸濁液5  $\mu\text{L}$ を加え、37℃で18時間培養した後、バイオフィームアッセイでBIを測定した。

## 8. 統計解析

バイオフィーム抑制試験において測定された吸光度は、平均値±標準誤差として表した。統計的比較は、滅菌蒸留水を対照群とし、一元配置分散分析と、それに続くTukeyの多重比較検定を実施した。菌増殖に対するセリシンの影響の評価では、Mann-Whitney U検定を実施した。統計解析ソフトは、Statcel ver.3 software (OMS,日本)を使用した。有意水準を0.01とし、 $p < 0.01$ を有意差ありとした。

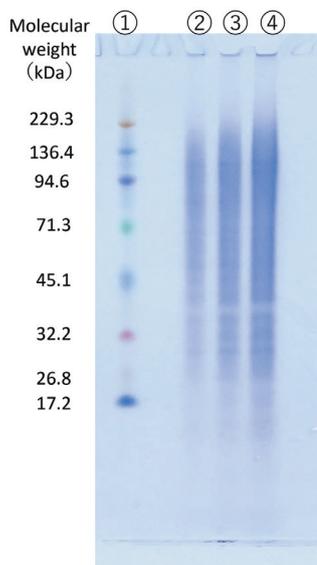
## 結果

### 1. セリシンの抽出

セリシンは抽出毎にBCA法でタンパク質濃度を測定した。抽出は3回行い、濃度は1回目10.8 mg/mL、2回目13.2 mg/mL、3回目14.4 mg/mLであった。

### 2. SDS-PAGE

14.4 mg/mLのセリシン溶液5  $\mu$ L, 10  $\mu$ L, 18  $\mu$ LをSDS-PAGEで展開した。分子量はおおよそ30 kDaから220 kDaに分布しており、連続性のあるスミア状に確認された (Fig. 2)。



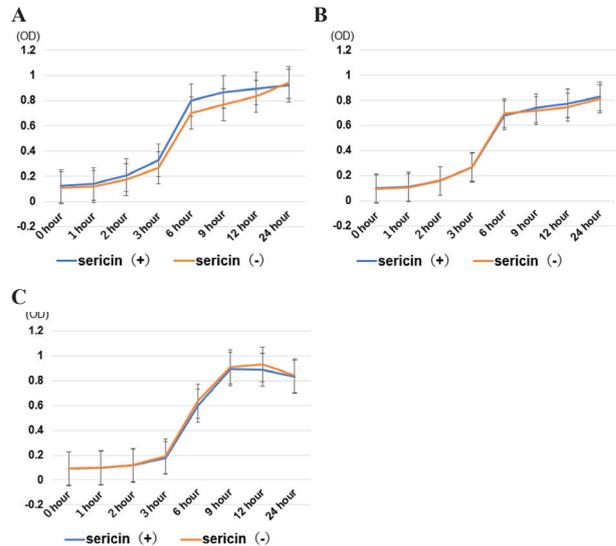
**Figure 2** SDS-PAGE of extracted sericin. Digital subtraction ① molecular marker. ② sample 5  $\mu$ L ③ sample 10  $\mu$ L ④ sample 18  $\mu$ L. Sericin was distributed from 30 kDa to 220 kDa like a smear.

### 3. 対象菌株のバイオフィーム形成能

臨床分離株6株とMRSA標準株1株のバイオフィームアッセイを実施した。それぞれのBIは、#1が0.278, #2が0.858, #3が1.216, #4が1.679, #5が1.423, #6が0.906, #7 (標準株) が1.317であった。#7 (標準株) より高いBIを示した#4, #5, および#7 (標準株) の3株を用いてバイオフィーム抑制試験を行った。

### 4. 菌増殖に対するセリシンの影響

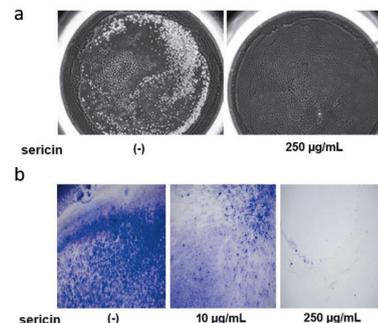
セリシンを添加していないTSB培地とセリシン濃度250  $\mu$ g/mLのTSB培地における増殖性を比較した。菌株#4, #5, #7全てにおいて両群で統計学的な有意差は認めなかった (Fig. 3)。



**Figure 3** Effect of sericin on growth of MRSA strains in liquid culture. The growth of MRSA strains in TSB liquid medium with sericin (250  $\mu$ g/mL) and without sericin was compared. Turbidity was measured over time at OD595. (a) strain #4. (b) strain #5. (c) strain #7. Data are presented as means  $\pm$  standard error and Mann-Whitney's U test was performed.  $n=3$ .

### 5. バイオフィームの形態学的観察

位相差顕微鏡では菌株#4のバイオフィームの構造体がセリシン濃度250  $\mu$ g/mLで破壊されていることが観察された (Fig. 4a)。菌株#5と#7も同様にセリシン濃度250  $\mu$ g/mLでは対照に比べてバイオフィームの構造体が著明に減少していた。明視野顕微鏡では、菌株#5のバイオフィームを染色したクリスタルバイオレットの色素が著明に減弱した (Fig. 4b)。菌株#4および#7も同様に、250  $\mu$ g/mL, 50  $\mu$ g/mL, 10  $\mu$ g/mLの濃度で減弱することが観察された。

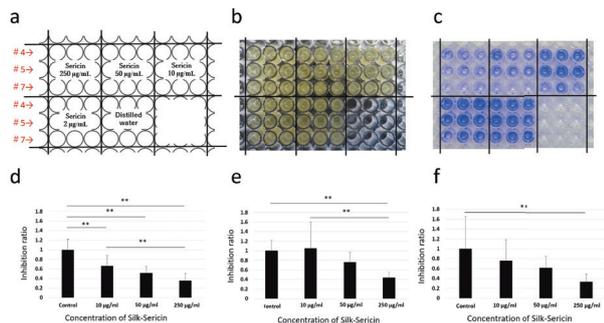


**Figure 4** Morphological observation (a) Phase contrast microscopy findings (#4). (b) Brightfield microscopy findings (#5). Biofilms were stained with crystal violet and observed.

## 6. バイオフィーム抑制試験

マイクロタイタープレートでの実験デザインをFig. 5aに、37°C 18時間で培養後の菌液をFig. 5bに、形成されたバイオフィームを0.1%クリスタルバイオレットで染色後に95%エタノールで溶解した状態をFig. 5cに、また各濃度のセリシン溶液中のBIをTable 1に示す。

菌株#4、#5、#7のセリシン濃度0 µg/mLのBIに対する各セリシン濃度でのBIの抑制率 (inhibition rate) をそれぞれFig. 5d~fに示す。菌株#4は対照と各濃度間で統計学的な有意差をみとめ、濃度依存的にバイオフィーム形成が阻害された(Fig. 5d)。菌株#5は対照と10 µg/mLの間に有意な差はなかったが、250 µg/mLでは有意に阻害されていた (Fig. 5e)。菌株#7は濃度依存的な阻害効果がみられ、250 µg/mLでは有意にBIが低下していた (Fig. 5f)。セリシン濃度250 µg/mLと対照との比較では、菌株#4が64.3% (平均値0.412 vs. 1.153,  $p < 0.01$ )、菌株#5が56.1% (0.466 vs. 1.061,  $p < 0.01$ )、菌株#7が74.8% (0.373 vs. 1.480,  $p < 0.01$ )、平均66.1% (0.417 vs. 1.231,  $p < 0.01$ )の抑制効果がみられた。



**Figure 5** Biofilm inhibition test on biofilm assay

(a) Experimental design on a 96-well microtiter plate. (b) Culture solution incubated at 37°C for 18h. (c) 95% ethanol solution of stained biofilm with crystal violet. (d~f) Inhibition rate of biofilm index by strain #4, #5, and #7, respectively. Data are presented as means  $\pm$  standard error, and one-way analysis of variance and subsequent Tukey's multiple comparison test were performed.  $n=3$ ,  $*p < 0.01$ .

**Table 1.** Biofilm inhibition test

strain	Sericin concentration					
	250 µg/mL	50 µg/mL	10 µg/mL	2 µg/mL	0 µg/mL	
# 4	mean biofilm index	0.412	0.597	0.767	1.079	1.153
	standard error	0.049	0.043	0.072	0.086	0.073
# 5	mean biofilm index	0.466	0.806	1.119	1.091	1.061
	standard error	0.034	0.064	0.164	0.095	0.067
# 7	mean biofilm index	0.373	0.743	1.059	1.216	1.480
	standard error	0.040	0.110	0.168	0.120	0.230

## 考察

本研究では、高圧蒸気滅菌法で得られたセリシンがMRSA株によるバイオフィーム形成を阻害する作用を有することを明らかにした。今回バイオフィーム抑制効果がみられたセリシン濃度は、褥瘡の治療に軟膏として用いた場合には十分達成可能な濃度であり、本研究の結果

は、抗バイオフィーム作用を有する製品としての開発の基礎的データとなると考えられる。

セリシンは、加熱処理、アルカリや酸、尿素を用いる化学処理などの方法でシルクから抽出されることが知られているが、最も一般的に行われている抽出法は加熱処理法である。アルカリ、酸、尿素を用いた抽出では化学的汚染等により透析など追加の精製手順が必要となる。さらに、尿素による抽出では尿素によってセリシンが加水分解された結果高い抗菌作用をもつとされ、アルカリあるいは酸による抽出ではセリシンが尿素よりも分解され構造が大きく変化することで抗菌作用が減弱するという報告<sup>21)</sup>があることから、今回は高圧蒸気滅菌法によるセリシンの抽出を試みた。高圧蒸気滅菌法で抽出したセリシンをSDS-PAGEで展開したところ分子量おおよそ30-220 kDaの領域にスミア状に確認された。この結果は、セリシンは17種類のアミノ酸で構成される水溶性のタンパク質で、抽出後の分子量は24-250 kDaに分布する<sup>12,23)</sup>という過去の報告と合致した。高圧蒸気滅菌法で問題なくセリシンを抽出できたと判断した。

**Table 2.** Amino acid composition of sericin

abbreviation	amino acid name	mol%	polarity
Ser	serine	31.0	<b>hydrophilic</b>
Gly	glycine	19.1	hydrophobic
Asp	aspartic acid	17.8	<b>hydrophilic</b>
Thr	threonine	8.0	<b>hydrophilic</b>
Glu	glutamic acid	4.4	<b>hydrophilic</b>
Arg	arginine	3.9	<b>hydrophilic</b>
Ala	alanine	3.8	hydrophobic
Val	valine	3.1	hydrophobic
Lys	lysine	2.7	<b>hydrophilic</b>
Tyr	tyrosine	2.2	<b>hydrophilic</b>
His	histidine	1.0	<b>hydrophilic</b>
Pro	proline	0.4	hydrophobic
Ile	isoleucine	0.4	hydrophobic
Leu	leucine	0.2	hydrophobic
Phe	phenylalanine	0.2	hydrophobic
Cys	cysteine	<0.05	<b>hydrophilic</b>
Met	methionine	<0.05	hydrophobic

セリシンにはアミノ酸としてセリンが31%、グリシンとアスパラギン酸がそれぞれ19.1%、17.8%と多く、次いでスレオニン、グルタミン酸など17種類が含まれる<sup>23)</sup>、多くが親水性アミノ酸残基である (Table 2)。アミノ酸の立体構造には、アミン基 (-NH<sub>2</sub>) があり、条件によってプロトン化されアミノ基 (-NH<sub>3</sub>) に変換され正に荷電する。親水性アミノ酸残基が多くを占めるセリシンは、このアミノ酸の立体構造によって抗菌作用をもつと考えられている<sup>21,27)</sup>。

細菌細胞の表面は、水環境中で表面に露出している分子のカルボキシル基やリン酸基などが解離して負に帯電している場合が多く、付着表面も水中では負に帯電して

いることが多い。細菌は、ブラウン運動や鞭毛運動などによって負に帯電した表面に近づき、van der Waals引力と静電反発力の両方が働くことで可逆的な付着と脱離を繰り返している(DLVO理論)<sup>24,25)</sup>。ある菌体が固体表面に付着した際、生体活動に伴うEPSの生成とともに不可逆付着が起こり、その菌体の増殖や多層吸着を繰り返すことでバイオフィームが発達する。

グラム陽性菌の細胞壁は、ペプチドグリカン層にタイロコ酸を含み、脂質を有するリポタイロコ酸は細胞質膜と結合している。タイロコ酸は負に荷電し、グラム陽性菌の細胞壁の電荷を負に保っている<sup>26)</sup>。このように細菌細胞は液体培地中において負に帯電しているため、セリシンの親水性アミノ酸残基がもつ正に荷電したアミノ酸と結合しやすい。この相互作用によって細菌の増殖抑制および細胞死を引き起こすことでセリシンは抗菌作用を有する<sup>11,22,27)</sup>。そこで、セリシンが菌の増殖を抑制するかどうかについて液体培地での増殖性を検討したが、セリシン濃度250 $\mu$ g/mLではMRSA株の増殖は抑制されなかった。しかし、バイオフィーム抑制試験ではセリシンが同じ濃度でバイオフィーム形成を抑制する結果となったことから、セリシンのバイオフィーム形成抑制効果は、抗菌活性とは異なるメカニズムによることが示唆される。今後さらに検討が必要であるが、正に荷電したセリシンのアミノ基が負に荷電する細菌細胞と結合し、菌体が固体表面に付着できなかつた可能性、もしくはセリシンがEPSの形成を抑制した可能性が考えられる。

本研究の制限として、使用したMRSA菌株が3株と少なく、さらなる抑制効果を確認するために多くの菌株で検証する必要がある。また、MRSA以外の褥瘡の創傷治癒を遷延化させる病原菌に対しても同様の作用がみられるか検討が必要と考える。

## 結論

高圧蒸気滅菌法によって得られたセリシンが褥瘡から分離されたMRSA株によるバイオフィームの形成を阻害することを明らかにした。褥瘡など慢性創傷におけるバイオフィーム形成はいまだに臨床上克服すべき課題である。シルクは生体適合性に優れ安全性の高い素材であり、今回得られた結果はセリシンを原材料とする創傷治療外用剤の開発の可能性を示すものである。

## 利益相反

本研究に関して開示すべき利益相反はありません。

## 謝辞

シルク繭の扱いについてご教示いただいた株式会社アーダンの平田美信氏に深謝致します。

## 文献

- 1) 秋山尚範, 多田譲治, 荒田次郎. バイオフィーム (biofilm). 臨床皮膚科 1999; 53: 59-63.
- 2) James GA, Swogger E, Wolcott R, et al. Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen* 2008; 16: 37-44.
- 3) Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ. The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *J Bacteriol* 2007; 189: 7945-7947.
- 4) Percival SL. Importance of biofilm formation in surgical infection. *Br J Surg* 2017; 104: e85-94.
- 5) 真田弘美, 大西美千代, 北山幸枝, ほか. 褥瘡を有する高齢者の創周囲皮膚における石鹸洗浄の有効性の検討. *日本褥瘡学会誌* 2000; 2: 32-39.
- 6) Gjødtsbøl K, Christensen JJ, Karlsmark T, Jørgensen B, Klein BM, Kroghfelt KA. Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study. *Int Wound J* 2006; 3: 225-231.
- 7) 中尾裕史, 坪井良治, 小川秀興. 白糖・ポビドンヨード混合製剤の創傷治癒促進メカニズム — 培養細胞および動物モデルを用いた解析. *Therapeutic Research* 2002; 23: 1625-1626.
- 8) 山崎 修, 秋山尚範, 大野貴司, 岩月啓氏. 黄色ブドウ球菌のバイオフィームに対する白糖・ポビドンヨード配合軟膏 (ユーパスタ®) の効果. *Therapeutic Research* 2002; 23: 1619-1622.
- 9) Cooper R, Bjarnsholt T, Alhede M. Biofilms in wounds: a review of present knowledge. *J Wound Care* 2014; 23: 570, 572-574, 576-580.
- 10) Baba A, Matsushita S, Kitayama K, et al. Silk fibroin produced by transgenic silkworm overexpressing the Arg-Gly-Asp motif accelerates cutaneous wound healing in mice. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2019; 107: 97-103.
- 11) Xue R, Liu Y, Zhang Q, et al. Shape changes and interaction mechanism of *Escherichia coli* cells treated with sericin and use of a sericin-based hydrogel for wound healing. *Appl Environ Microbiol* 2016; 82: 4663-4672.
- 12) Hazeri N, Tavanai H, Moradi AR. Production and properties of electrosprayed sericin nanopowder. *Sci Technol Adv Mater* 2012; 13: 035010.
- 13) Manago K, Nishi J, Wakimoto N, et al. Biofilm formation by and accessory gene regulator typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains recovered from patients with nosocomial infections. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006; 27: 188-190.
- 14) Lenselink E, Andriessen A. A cohort study on the efficacy of a polyhexanide-containing biocellulose dressing in the treatment of biofilms in wounds. *J of Wound Care* 2011; 20: 534, 536-539.
- 15) Bjarnsholt T, Alhede M, Jensen P, et al. Antibiofilm properties

- of acetic acid. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2015; 4: 363-372.
- 16) Halstead FD, Webber MA, Rauf M, Burt R, Dryden M, Oppenheim BA. In vitro activity of an engineered honey, medical-grade honeys, and antimicrobial wound dressings against biofilm-producing clinical bacterial isolates. *J Wound Care* 2016; 25: 93-94, 96-102.
- 17) Hoekstra MJ, Westgate SJ, Mueller S. Povidone-iodine ointment demonstrates in vitro efficacy against biofilm formation. *Int Wound J* 2017; 14: 172-179.
- 18) Thorn RM, Austin AJ, Greenman J, Wilkins JP, Davis PJ. In vitro comparison of antimicrobial activity of iodine and silver dressings against biofilms. *J Wound Care* 2009; 18: 343-346.
- 19) Andriessen AE, Eberlein T. Assessment of a wound cleansing solution in the treatment of problem wounds. *Wounds* 2008; 20: 171-175.
- 20) Durante CM, Greco A, Sidoli O, Maino C, Gallarini A, Ciparandi G. Evaluation of the effectiveness of a polyhexanide and propyl betaine-based gel in the treatment of chronic wounds. *Minerva Chir* 2014; 69: 283-292.
- 21) Aramwit P, Napavichayanum S, Pienpinijtham P, Rasmi Y, Bang N. Antibiofilm activity and cytotoxicity of silk sericin against *Streptococcus mutans* bacteria in biofilm: an in vitro study. *J Wound Care* 2020; 29: S25-S35.
- 22) Sonnleitner D, Sommer C, Scheibel T, Lang G. Approaches to inhibit biofilm formation applying natural and artificial silk-based materials. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2021; 131: 112458.
- 23) 加藤範久. セリシンの機能特性とその利用. 製糸夏期大学 2001; 54: 25-32.
- 24) 大島広之. 生体コロイド粒子間の相互作用のモデル. *オレオサイエンス* 2016; 16: 71-80.
- 25) 堀克敏, 石川聖人. 細菌ナノファイバーによる微生物の表面付着. *環境バイオテクノロジー学会誌* 2010; 10: 3-7.
- 26) Gross M, Cramton SE, Götz F, Peschel A. Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infect Immun* 2001; 69: 3423-3426.
- 27) Schäfer S, Avani F, Köpf M, et al. Silk proteins in reconstructive surgery: Do they possess an inherent antimicrobial activity? A systematic review. *Wound Repair Regen* 2023; 31: 99-110.