

# (梶山 史郎) 論文内容の要旨

主 論 文

Quantitative Analysis of Staphylococcus epidermidis Biofilm on the Surface of Biomaterial

(生体材料表面に形成された表皮ブドウ球菌バイオフィルムの定量的解析)

(梶山史郎 弦本敏行 尾崎 誠 柳原克紀 進藤裕幸)

(Journal of Orthopaedic Science: Volume14 No.6. 769-75 2009)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻

(主任指導教員：進藤裕幸教授)

## 緒 言

インプラント関連感染症の生体材料表面には、菌体をマトリックスが取り囲んだ構造であるバイオフィルムが形成される。バイオフィルム中の細菌はさまざまなメカニズムで抗菌薬抵抗性を示し、感染症遷延化の重要な原因のひとつになると考えられている。*icaADBC* 遺伝子にコードされた polysaccharide intercellular adhesin (PIA) は、表皮ブドウ球菌バイオフィルムの機能的な構成要素であるとされているが、生体材料表面におけるバイオフィルム形成および成熟過程と *ica* 遺伝子の発現量との関係は明らかでない。われわれはこれまでに非透光性生体材料表面に形成される細菌バイオフィルムの定量が可能な測定法である biofilm coverage rare (BCR) を用いてバイオフィルムを定量化してきた。本研究の目的は、BCR と、従来用いられてきた viable cell count (VCC) および ATP-bioluminescence (ATP) によるバイオフィルム定量法を用いて生体材料 (ステンレス) 表面におけるバイオフィルムの形成過程を定量的に評価したうえで、バイオフィルム形成の時間経過と *ica* 遺伝子の発現量との関係を reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) を用いて明らかにすることである。

## 対象と方法

バイオフィルム標準株である表皮ブドウ球菌 RP62A を液体培地 trypticase soy broth (TSB) 中で培養しそれぞれの評価方法に使用した。超音波洗浄後、滅菌処理したステンレス製のワッシャーを一定の菌量に調整した培養液に暴露した。菌体の付着したワッシャーを新鮮な TSB 中で 0-8、24、48 時間培養後、ワッシャー表面に形成

されたバイオフィルムを BCR、VCC、ATP で定量化した。ステンレス表面に付着したバイオフィルムを固定後、クリスタルバイオレットにて染色し、デジタル実態顕微鏡でワッシャー上の任意の 8 箇所をデジタル画像として保存した後、画像解析ソフト Scion Image を用いて BCR を算出した。VCC と ATP においては、ワッシャーに付着したバイオフィルムを超音波および Vortex にて破碎後、それぞれ Compact Dry “Nissui” および Lumitester PD-10 をもちいて計測した。一方、上記と同様の条件下で、2, 4, 6, 8, 24 および 48 時間培養したステンレス製プレート上のバイオフィルムより total RNA を抽出し、*ica* 遺伝子の RT-PCR を行った。Internal standard として *gyr-B* を用い、アガロースゲル電気泳動をおこなってその発現量を推定した。それぞれの結果を比較検討した。

## 結 果

同様の培養条件下でステンレスワッシャーおよびプレート表面に形成されたバイオフィルムを、4 つの異なる方法で定量および評価した。BCR は時間経過とともに増加し、特に 5-6 時間培養後に著しく増加した。培養開始後 8 時間で BCR は 92.79% に達し、24 および 48 時間後にはほぼ 100% であった。一方、VCC と ATP は BCR と同様増加したが、その増加は比較的緩徐で 8 時間までの増殖曲線は対数的ではなかった。ところが、24 時間後と 48 時間後には飛躍的に増加していた。BCR で認められた 5-6 時間での著しい増加は VCC および ATP では検出されなかった。培養 8 時間までにおいては、BCR と VCC、ATP は有意な相関関係が認められた。6 時間までの BCR の著明な増加は RT-PCR による *ica* 遺伝子発現量の推移とも矛盾しない結果であった。

## 考 察

それぞれのバイオフィルム定量法を用いた測定結果を考慮すると、生体材料表面における二次元的なバイオフィルムの成熟は細菌の付着後 6-8 時間のうちに急速に起こることが示唆された。細菌バイオフィルムはまずマトリックスを産生しながら平面的に拡大し、徐々に立体的に成長し成熟していくことが推察された。インプラント関連感染症予防を目的としてさまざまな生体材料の使用が試みられているが、その評価を行うにあたり菌およびマトリックスの増加を検出可能な BCR を検討することが有用と考えられた。