

# 玉井 崇 論文内容の要旨

## 主 論 文

Biofilm deficiency in polysaccharide intercellular adhesin-negative variants of *Staphylococcus epidermidis* selected by subminimal inhibitory concentrations of Gentamicin

(最小発育阻止濃度のゲンタマイシンによって選択された polysaccharide intercellular adhesin 非産生表皮ブドウ球菌におけるバイオフィーム産生能低下)

玉井崇、弦本敏行、梶山史郎、安達信二、崎村俊之、進藤裕幸

Japanese Journal of Infectious Disease. vol.64, no.4, 304-308, 2011

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：尾崎誠 教授)

### 【緒言】

表皮ブドウ球菌（表ブ菌）を含む様々な細菌はバイオフィームを形成し、感染症の難治化・遷延化を生じるため、バイオフィーム産生の制御は感染症制圧の喫緊の課題である。表ブ菌のバイオフィームの主成分は *ica* 遺伝子が誘導する polysaccharide intercellular adhesin (PIA) であり、PIA 産生はバイオフィーム形成能と関連している。PIA 産生はコンゴレッド寒天培地法 (CRA 法) で検出可能であるが、本研究では、CRA 法と各種抗菌薬を用いた薬剤感受性テスト (ディスク法) を組み合わせることにより、抗菌薬が表ブ菌の PIA 産生に与える影響と、それにより得られた PIA 非産生表ブ菌のバイオフィーム産生能などを検討した。

### 【対象と方法】

PIA を産生しバイオフィームを形成する表ブ菌として、コントロール株 ATCC35984 と長崎大学病院の骨関節感染症例から検出された表ブ菌 8 株 (①～⑧) を使用した。

上記の 9 種類の PIA 産生表ブ菌を trypticase soy broth (TSB) 10ml 中で 3 時間培養し、10 倍希釈液をコンゴレッド寒天培地に塗布した (CRA 法)。さらに、ゲンタマイシン (GM)、アミカシン、アルベカシン、バンコマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、セファゾリン、ホスホマイシン、ミノサイクリン、リファンピシン、クラリスロマイシンの薬剤感受性テスト用ディスクをコンゴレッド寒天培地の中央に静置し (ディスク法)、CRA 法の原法に準じて培養を行った。なお、上記 9 種類の表ブ菌の親株は PIA 産生株であり通常のコンゴレッド寒天培地で黒色コロニーを形

成するが、PIA 非産生となった表ブ菌は赤色コロニーを形成する。薬剤により PIA 非産生となった表ブ菌についてはコロニーを採取し以下の実験に用いた。

PIA 非産生表ブ菌のバイオフィルム形成能は、滅菌ステンレスワッシャー表面に菌を付着させ 24 時間培養することでワッシャー表面にバイオフィルムを形成させ、その被覆率で評価した。また、PIA 非産生表ブ菌の PIA 産生株復帰を評価するため、TSB 中で 24 時間毎に継代培養し、各継代おきに CRA 法で PIA 産生能を判定することで PIA 産生株復帰を評価した。

### 【結果】

ATCC35984 株と臨床株 8 株中 6 株 (③、④、⑤、⑥、⑦、⑧) で、GM の発育阻止円 (最小発育阻止濃度) の周辺に PIA 非産生となった表ブ菌の赤色コロニーが出現し、さらにその外側には PIA 産生を示す黒色コロニーを認めた。臨床株 8 株中 2 株 (①、②) および、GM 以外の抗菌薬では発育阻止円の外側に PIA 産生表ブ菌である黒色コロニーのみ認めた。GM により PIA 非産生となった PIA 非産生表ブ菌コロニーを採取し以下の実験に用いた。

ATCC35984 株と臨床株③、④、⑤、⑥、⑦、⑧のそれぞれで、バイオフィルム被覆率を PIA 産生親株表ブ菌と PIA 非産生表ブ菌で比較すると、ATCC35984 株は 96.2%と 47.1%、臨床株③は 98.6%と 39.5%、臨床株④は 73.2%と 50.7%、臨床株⑤は 55.4%と 47.5%、臨床株⑥は 62.8%と 29.2%、臨床株⑦は 60.0%と 30.3%、臨床株⑧は 94.2%と 42.4%と、いずれの株も PIA 非産生表ブ菌でのバイオフィルム形成能は低下していた。PIA 非産生表ブ菌の PIA 産生株復帰を評価した結果、PIA 非産生表ブ菌は 4～13 回の継代培養により PIA 産生表ブ菌へ復帰した。

### 【考察】

CRA 法と薬剤感受性テストを組み合わせることにより、GM によってバイオフィルム産生能の低下した PIA 非産生表ブ菌が誘導されることが明らかとなった。PIA 非産生表ブ菌は、継代培養により PIA 産生表ブ菌に復帰するが少なくとも 4 回の継代培養を要したことから、PIA 非産生表ブ菌は PIA 産生を誘導する *ica* 遺伝子の欠損や単純な *ica* 遺伝子抑制以外の要因で生じた可能性が考えられる。バイオフィルムにより難治化する表ブ菌感染症において、GM がバイオフィルム産生を抑制する可能性が本研究により示唆された。