

崎村 俊之 論文内容の要旨

主 論 文

Biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* expressing
vancomycin resistance early after adhesion to a metal surface
(バイオフィーム形成表皮ブドウ球菌は
金属表面付着後早期にバンコマイシン抵抗性を発現する)

崎村 俊之、梶山 史郎、安達 信二、千葉 恒、米倉 暁彦、
富田 雅人、小関 弘展、宮本 俊之、弦本 敏行、尾崎 誠

BioMed Research International (2015年 In Press)

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

整形外科領域において金属製インプラントを使用した手術の重大な合併症の一つにインプラント周囲の感染があり、インプラント関連感染症と呼ばれている。インプラント関連感染症は難治性で、一旦発生すると複数回の手術も含め長期の治療を要する。感染の難治化には細菌が形成するバイオフィームが大きく関与しており、細菌はバイオフィームの形成とともに抗菌薬抵抗性を発現する。しかしインプラントに付着した細菌がバイオフィームを形成していく過程のどの時点から抗菌薬抵抗性を発現するのかは明らかでない。本研究の目的は金属表面に付着した細菌のバイオフィーム形成と薬剤抵抗性発現時期を検討することである。

対象と方法

インプラント関連感染症の代表的な起炎菌である表皮ブドウ球菌のうち、バイオフィーム形成標準株を対象菌種として使用した。抗菌薬として対象菌に感受性があるバンコマイシン (vancomycin: VCM) を使用した。対象菌の VCM に対する最小発育阻止濃度は $1 \mu\text{g/ml}$ であった。細菌を付着させる金属材料は直径 6.0mm のステンレススチールワッシャーを用いた。対数増殖期の菌液とワッシャーを 5 分間接触させワッシャーに細菌を付着させた。VCM の投与開始時期を 0, 2, 4, 8 時間の 4 群に分け、濃度を 0 から $1024 \mu\text{g/ml}$ までの 12 段階に調整し投与した。ワッシャー上のバイオフィーム

占拠率 (biofilm coverage rate: BCR) でバイオフィルムの形成量を評価した。また、生菌と死菌の分布を同時に観察可能な蛍光染色法 (LIVE/DEAD® BacLight™) でバイオフィルム内の細菌の生存性を視覚的に観察し、さらに希釈平板法でバイオフィルム内の生菌数を評価した。

結果

バイオフィルムの形成を評価した結果、0 時間群でコントロール (VCM 非投与) と比較して有意に BCR が低下した VCM 濃度は $4 \mu\text{g/ml}$ であり、2 時間群では $8 \mu\text{g/ml}$ 、4 時間群では $16 \mu\text{g/ml}$ 、8 時間群では $128 \mu\text{g/ml}$ であった。バイオフィルムの発育を完全に阻止できる濃度は 0 時間群で $16 \mu\text{g/ml}$ 、2 時間群で $64 \mu\text{g/ml}$ であった。4 時間群と 8 時間群では高濃度の VCM を投与してもバイオフィルムの形成を完全に阻止することはできなかった。

蛍光染色法で細菌の生存性を観察すると、VCM の効果により 0 時間群では $8 \mu\text{g/ml}$ から、2 時間群では $16 \mu\text{g/ml}$ から、4, 8 時間群では $32 \mu\text{g/ml}$ から生菌の占める割合が減少していた。希釈平板法によるバイオフィルム内の生菌数は 0, 2 時間群とも VCM 濃度 $16 \mu\text{g/ml}$ 以上では 10^3 CFU 以下と少数であり、4 時間群でも VCM 濃度 $32 \mu\text{g/ml}$ 以上で 10^2 CFU 以下と少数であった。一方 8 時間群では $1024 \mu\text{g/ml}$ の高濃度でも 2.4×10^4 CFU の生菌数を認めた。

考察

本研究では VCM 投与前後のバイオフィルム形成量の変化を評価した。表皮ブドウ球菌は金属に付着すると、浮遊菌に比べ抗菌薬抵抗性を示すことが明らかとなった。またインプラント表面で 4 時間以上バイオフィルムが形成されると、高濃度の VCM を投与してもバイオフィルムの完全な発育阻止はできなかった。バイオフィルム内の生菌数の変化を評価した結果、バイオフィルムが形成されても菌付着から 4 時間以内であれば高濃度の VCM により強い殺菌効果が得られた。しかし菌付着から 8 時間以上経過した場合、生菌数は減少するものの高濃度の VCM を投与してもバイオフィルム内に多くの菌が生存していた。金属に付着した表皮ブドウ球菌は付着後 4 時間から 8 時間で強い抗菌薬抵抗性が生じると考えられる。

本研究の結果より、インプラントに付着した菌はバイオフィルムの形成とともに早期に抗菌薬抵抗性を発現することが明らかになった。インプラント関連感染症においては、バイオフィルム形成と薬剤抵抗性の発現時期を念頭に置きできるだけ早期に治療を開始することが重要である。