

西村 誠介論文内容の要旨

主 論 文

Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms isolated from infected Total Hip Arthroplasty cases

人工股関節感染例の分離菌によるバイオフィルムの抗菌薬抵抗性の検討

西村誠介, 弦本敏行, 米倉暁彦, 安達耕一, 進藤裕幸

(Journal of Orthopaedic Science 第11巻1号 2006年)

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

人工関節に伴う感染は、術後の重篤な合併症の一つであり、発症すれば、治療に難渋し、未だ有効な治療法はなく、最終的に人工関節の抜去に至る例も少なくない。したがって、この難治化のメカニズムを解明することは、治療法の開発において、非常に重要なことである。近年の研究により、細菌が人工関節の表面にバイオフィルムを形成し、人体の感染防御システムや抗菌薬に対し、抵抗を示すことが解明されてきた。

今回、我々は人工股関節(THA)感染例により分離した *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* によるバイオフィルム生成の過程を観察した。また、溶液中に浮遊する菌 (planktonic bacteria) と biofilm bacteria の minimum bactericidal concentrations(MBC)を比較、検討した。

対象と方法

THA 感染例より同定されたのち冷凍保管されていた *S. aureus* および *S. epidermidis* の各3株、およびバイオフィルム形成コントロール株 *S. aureus*, ACTT 25923 を用いて in vitro の実験を行った。TSB (Trypticase Soy Broth) 20ml を注入した滅菌チューブに菌液 2ml を注入し、37°Cで菌を増殖させた。10時間後、対数増殖期にある菌を 1.0×10^6 CFU/ml に調節し、96well titer plate に 200μl ずつ注入し、バイオフィルム生成を開始した。TSB は 24 時間おきに新鮮なものと交換した。この操作を 7 日間行い、バイオフィルムを生成させた。

まず、ACTT25923 株を用いて以下の方法でそのバイオフィルムの走査電子顕微鏡像を取得した。TSB20ml を入れた滅菌シャーレに細菌液 2ml を注入し、37°Cで増殖させた。TSB は 24 時間おきに新鮮なものと交換した。この菌液中にステンレス製ワッシャーを挿入し、その表面にバイオフィルムを生成させた。直後、24 時間後、7 日後に取り出して、PBS で洗浄後、2.5%グルタルアルデヒドで 1 時間固定、電顕試料作製を行ない、走査電子顕微鏡で観察した。

次に臨床分離株に関して Planktonic bacteria およびバイオフィルム中の菌の抗菌薬に対する MBC を測定比較した。使用した抗菌薬は CAM (clarithromycin), CMZ (cefmetazol), CTX (cefotaxime), EM (erythromycin), PCG (benzylpenicillin), VCM (vancomycin) の 6 種類であった。Mueller Hinton Broth の 2 倍希釈系列を作製し(16, 8, 4, 2, 1, 0.5μg/ml)、各 100μl を 96well titer plate に注入した。その後、 1.5×10^4 CFU に調整した菌液 5μl を各 well に接種した。24 時間後、濁りのない well 内の液体を綿棒でぬぐい、血液寒天培地に塗布した。24 時間後、コロニー形成のない最小の抗菌薬濃度を Planktonic bacteria の MBC とした。ついで 96 well titer plate 内の溶液を除去し、生理食塩水で洗浄後、各抗生剤の 2 倍希釈系列 (64, 128, 256, 512, 1024mg/ml) を 200μl 注入した。3 時間後、この溶液を滅菌綿棒で血液寒天培地に塗布した。24 時間後に観察し、コロニー形成がない最小の濃度を MBC とした。

結 果

1. 走査電子顕微鏡

ACTT 25923 株がステンレス製ワッシャー表面に付着し、経時的にバイオフィルムが形成されていく過程が観察された。

2. MBC

臨床分離株の planktonic bacteria は各抗菌薬に対して感受性を示したが、biofilm bacteria は著しい抵抗性を示した。この結果は全ての細菌に認めた。

考 察

バイオフィルム中の細菌の MBC は著しく高く、抗菌薬単独による治療が困難であることを示唆した。インプラント関連の感染症の制圧にあたっては、抗菌薬単独の投与は無効であり、バイオフィルムを除去する方法を開発する必要があると考える。