

Eradication of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*-Forming Biofilm by Silver Sulfadiazine

Toyokazu TAJIRI¹⁾, Shiro JIMI²⁾, Keika TANG¹⁾,
Ken SHIGEMORI¹⁾, Shuuji HARA³⁾, Hiroyuki OHJIMI¹⁾

¹⁾ *Department of Plastic Surgery, Faculty of Medicine, Fukuoka University*

²⁾ *Central Lab for Morphology and Pathology, Faculty of Medicine, Fukuoka University*

³⁾ *Department of Drug Informatics, Faculty of Pharmaceutical Science, Fukuoka University*

Abstract

Biofilm (BF) is a unique habitat for bacteria, and reveal a tolerance to many kinds of drugs. *Staphylococcus aureus* forms BF in necrotic tissue and/or on indwelling medical devices. Due to the difficulties in eradicating BF, more effective bactericidal drugs are necessary. In this study, we examined the effect of silver sulphadiazine on BF. A clinically isolated MRSA strain, great BF former, was used. BF on a plastic chip were prepared by incubation of bacteria at 37°C for 18 and 36 hours, namely BF18H and BF36H, respectively. Bacteria in planktonic (PK) and BF were incubated in media containing serially diluted silver sulphadiazine (AgSD), AgNO₃ (Ag), or sulphadiazine (SD), and the minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), and minimum biofilm eradicating concentration (MBEC) were analyzed. The AgSD-MIC against PK, BF18H, and BF36H were the same level (125 µg/mL), although MBC level increased in BFs compared to PK, and, in MBEC, a further increment was detected in BF36H. When comparing AgSD with Ag and SD, the same levels of MIC were found in AgSD and Ag, however SD did not induce growth inhibition in any concentrations. Whereas, Ag itself induced higher MBC and MBEC levels than AgSD. Microscopically, AgSD alone accumulated on the BF. In a wound infection mouse model, bacterial colonies formed on the wound surface were effectively eliminated by AgSD, but tissue damage was minimal. In conclusion, the present results show that in accordance with BF maturation, drug resistance property increases. AgSD, as a complex of Ag and SD, accumulates on BF formed by MRSA, and manifests eradication property. AgSD may be thus a pharmacologically effective bactericidal drug for eradication of BF in wounds.

Key words: Biofilm, Silver sulfadiazine, MIC, MBC, MBEC, MRSA, Wound infection

MRSA 形成のバイオフィルムに対する スルファジジン銀の殺菌効果

田尻 豊和¹⁾, 自見 至郎²⁾, 譚 佳梁¹⁾,
重森 健¹⁾, 原 周司³⁾, 大慈弥裕之¹⁾

¹⁾ 福岡大学医学部形成外科学

²⁾ 福岡大学医学部病態構造系総研

³⁾ 福岡大学薬学部医薬品情報学

要旨: バイオフィルム (Biofilm: BF) は菌が生息するための独自の環境であり, 薬剤耐性遺伝子に関係のない耐性能を発揮する. 感染症の原因菌である黄色ブドウ球菌は, 壊死組織内や生体内留置の医療器具

表面にバイオフィルムを形成する。バイオフィルムはその除去の難しさから、有効な薬剤の出現が待たれている。そこで本研究では、スルファジアジン銀のバイオフィルムに対する効果を検討した。臨床分離 MRSA 株で高バイオフィルム形成能を有する菌株を用いた。プラスチックシートを BF 基質とし、少量の菌液とともに 37℃、18 時間および 36 時間培養し、このチップ上に形成させたバイオフィルムを“BF18H”と“BF36H”とした。また、BF36H と同数の浮遊菌 (planktonic: PK) も用いた。スルファジアジン銀 (silver sulphadiazine: AgSD), AgNO_3 (Ag), スルファジアジン (sulphadiazine: SD) を系列希釈したものを培養液に添加した。培養後、培養液中での菌液吸光度、培養液内浮遊菌およびバイオフィルムチップ上菌の生存性を確認し、最小発育阻止濃度 (MIC), 最小殺菌濃度 (MBC), 最小バイオフィルム形成阻止濃度 (MBEC) を検討した。PK, BF18H, BF36H とともに AgSD の MIC は同じだったが (125 $\mu\text{g}/\text{mL}$), MBC は PK に比べ BF 群で増加し、MBEC は BF36H でさらに増加していた。AgSD と Ag および SD を比較すると、MIC は AgSD と Ag では同濃度だったが、SD は最大濃度でも抑制効果はなかった。Ag 群に比べ AgSD 群では、MBC は 2 倍低濃度で、さらにバイオフィルムに対する MBEC は 4 倍以下となり、その効果は増強されていた。顕微鏡的に AgSD の付着形態を観察すると、AgSD は BF に特異的に付着能を有していた。マウスの背部に作製したコロニー形成の感染巣に対し、高濃度の AgSD は組織障害作用を示すものの、組織傷害を示さず殺菌作用を惹起できた濃度もあった。以上より、AgSD 複合体はバイオフィルムへの特異的付着能を有し、イオン化した銀に比べ強い殺菌効果を示した。様々な抗菌薬に数百倍の抵抗性を有するバイオフィルムに対し、AgSD の MIC の 8 倍以内で殺菌効果を認めた。バイオフィルムを有する慢性感染創傷に対する治療および管理に AgSD は有効であると考えられた。

キーワード：バイオフィルム, スルファジアジン銀, MIC, MBC, MBEC, MRSA, 感染創

はじめに

治癒の遷延があれば、他の要因を排除した上で、創部の感染症を疑わなくてはならない。慢性創傷の多くは異物や壊死組織を伴い、それを足場にバイオフィルムは形成され、その中に潜む細菌は抗菌薬剤や免疫細胞の攻撃から逃れることで創部感染は難治化し、治癒は遷延する¹⁴⁾。慢性創傷の治療では、創部洗浄などの処置に加え、バイオフィルムに対して効果がある薬剤が望まれている⁵⁾。近年、全身投与で用いられる抗菌薬の中に、バイオフィルムをターゲットとした薬剤⁶⁻¹⁰⁾も使用され始めている。しかし、これらの適応は感染創の急性増悪時でのもので、慢性期の創傷管理での適応ではない²⁾。

銀は何世紀にもわたり創傷管理や抗菌剤として使用されてきた¹¹⁾。銀イオンの作用は、菌細胞膜や細胞壁において他の陽イオンと競合的反応を起こすことで、細胞表面構造の破綻に加え、酵素阻害、呼吸阻害、DNA の転写抑制などの作用から殺菌効果を発揮すると考えられている¹²⁻¹⁴⁾。銀は細菌に対して広い抗菌スペクトルを有し、耐性菌を生じにくく、細菌以外にも真菌、ウイルス、原虫にも効果を発揮する¹³⁾。一方で、組織への障害性が低いことから外用剤として用いられている¹⁵⁻¹⁸⁾。しかし、生体内でイオン化した銀は、浸出液中の蛋白質や塩化物、リン酸塩、硫化物などと即座に結合することで抗菌作用は低下する^{12, 19)}。1943 年に Wruble²⁰⁾により

スルファジアジン銀 (AgSD) は合成され、その構造はサルファ剤の一種であるスルファジアジンナトリウムと銀の結合体であるため、両者とも抗菌的に働く可能性を有する。Fox ら (1974 年) は、銀の担体との組み合わせを検証し、スルファジアジン (SD) と銀の結合体である AgSD が最も有効な合成化合物であると報告している²¹⁾。

AgSD の溶解性は低く、組織移行性も極めて弱いことから、海外はもとより本邦でも 1982 年より外用クリームとして長年使用されている²⁰⁾。また、近年ハイドロコロイドドレッシング材等の抗菌成分としても含有されるようになっている^{16, 22)}。これら臨床応用の拡大は、その安全性が基本となっていると考えられる。一方、その副作用として掻痒などの皮膚症状や銀皮症^{12, 23-25)}、また継続的大量使用により白血球減少症を来す^{25, 26)}ことも知られている。

現在まで、AgSD のバイオフィルムに対する正確な効果は明らかになっていない。本研究では、バイオフィルムの薬剤耐性を明らかにするために新たな検証方法を開発し、Ag と SD の複合化合物である AgSD の MRSA 形成のバイオフィルムに対する有効性を検討した。

材料と方法

MRSA 菌株

バイオフィルム形成能が高い臨床分離 MRSA 菌株

(OJ-1)²⁷⁾を用い、Tryptic soy ager (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社, 東京) で 37°C, 24 時間培養後, 増殖したコロニー 1 個を採取し, 10 mL の Tryptic soy broth (TSB) (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社, 東京) を入れた試験管 (型番 60.9922.936: ザルスタット株式会社, 東京) 内で分散し, 37°C で培養した. 増殖菌液の濁度は UV-VIS 分光光度計 (GENESYS 10S VIS: サーマフィッシャーサイエンティフィック株式会社, 東京) で測定し, 波長 578nm での吸光度を 0.57 に調整したものを基本菌液として用いた.

バイオフィームチップ

エチレングリコールとテレフタル酸のポリエステル重合化合物である OHP フィルムシート (スリーエムジャパン株式会社, 東京) をバイオフィーム基質として用いた. 基本菌液を 1000 倍希釈したものに, 1x1 cm のマス目をプリントした 1x9 cm の OHP シートを入れ, 37°C で 18 時間および 36 時間培養し, シート上に形成させたバイオフィームをそれぞれ BF18H および BF36H として用いた. 培養後, 試験管を氷の中で冷やししながら, 0.01M phosphate buffer saline (PBS) (pH 7.4) で 3 回洗浄後, ハサミで切断し, 1x1cm のバイオフィームチップとして用いた. バイオフィーム量の定量は, バイオフィームチップをアルコールで脱水後, 0.41% crystal violet (CV) 染色液でチップを 10 分間染色後, 15 分間流水洗, 残存色素を 30% 酢酸溶液で抽出し, その吸光度 ($\lambda=590$ nm) を測定した. バイオフィームチップ上の生菌数は, チップ上の菌を超音波処理 (SONIFIER 250: 日本エマソン株式会社, 神奈川) により分散, 採取し, 10 倍希釈法にて系列希釈した菌を寒天培地上に接種, 培養し, 形成されたコロニー数から colony forming unit (CFU) を算出した.

試薬の調整

AgSD (アルケア株式会社, 東京), AgNO₃ (シグマアルドリッチジャパン合同会社, 東京), スルファジアジン (SD) (和光純薬工業株式会社, 大阪) はガス滅菌したものを用いた. TSB 添加濃度が 1120 μ M (4000 μ g/mL) の溶液を最大濃度溶液として調整し, 2 倍希釈法で 4.375 μ M までの 9 系列の希釈を行った.

菌生存性と試薬濃度

各試薬に対する最小発育阻止濃度 (MIC), 最小殺菌濃度 (MBC), 最小 BF 形成阻止濃度 (MBEC) を検討した. AgSD, AgNO₃, SD の希釈溶液 5 mL を入れた試験管に BF18H または BF36H のバイオフィームチップ 1 枚ずつを入れるか, もしくは BF36H と菌数をそろえた浮遊菌液を入れた. 培養は, 暗所, 37°C, ローテータで

培養液を攪拌 (120 rpm) しながら 24 時間までの培養を行った. 培養直後に各試験管から培養液 20 μ L を採取し, 寒天培地上に置いた 1x1cm のろ紙にプロットングし, 24 時間培養で菌が増殖できない濃度を MBC とした. バイオフィームチップを各試験管から取り出し, 寒天培地上に置き, 24 時間後の菌の増殖のない濃度を MBEC とした. 試験管内の培養液は懸濁状態となっているため, 培養後に濁りが沈殿するまで静置し, 菌増殖のみによる懸濁度の吸光度 ($\lambda=578$ nm) を測定し, 菌増殖のない濃度を MIC とした. 対照として, バイオフィームチップ作製後に, アルコールで殺菌したバイオフィームを準備し, 同様な培養と吸光度測定を行い, 測定値から対照値を除した.

AgSD のバイオフィームに対する付着性

チップそのもの, およびチップ上にバイオフィームを形成させたバイオフィームチップ (BF36H) を準備し, それらを AgSD 添加の培養液に入れ, 暗所, 4°C と 37°C で培養した. 培養後, PBS で 3 回洗浄後に, チップを UV 光に 1 時間照射し, Ag の酸化的黒化を促進させたものを顕微鏡下で観察した.

マウス感染創への AgSD 投与

バイオフィームを伴ったマウス感染創の作成法は Makino 等の方法²⁷⁾に従った. C57BL/6N マウス (メス, 11 週令) (日本エスエルシー株式会社, 静岡) を用い, 直径 2 cm の円形, 皮膚全層欠損創の作製とともに, 5-fluorouracil (5-FU) の腹腔内投与を行い, 骨髄抑制による免疫機能低下を図った. 血中白血球数が最も低下する投与後 3 日目に, 創面に 4x10⁷ CFU の菌液を接種した. 創面でのコロニー形成のために 1 日間放置した. 一方, AgSD の組織障害性の検討では, 菌の接種は行わなかった. その後, AgSD 投与を行った (投与量: 0, 80, 320, 800 μ g/200 μ L/mouse). 投与 2 日後, 頸椎脱臼により安楽死させ, 創面の病理標本作製し, 顕微鏡観察を行った. 本動物実験は福岡大学アニマルセンター動物実験審議会の承認を得て実施された (承認番号 1210608).

統計学的解析

In vitro 実験においては, それぞれの実験を 5 回以上行い, 同様な結果が得られたものを用いた. 測定値は平均 \pm 標準誤差で表した. 2 群間の比較は, unpaired student-t test を用い, P 値が 0.05 以下のものを有意とした.

結 果

バイオフィルムチップ

プラスチックチップ上に付着増殖した菌を CV 染色すると (図 1), BF18H では散在性に存在するのに対し, BF36H ではその密度が増加するとともに, 染色性が増し, 所々にバイオフィルムと考えられる菌の集塊が見られ, 時間とともにバイオフィルムは成長していた。

BF18H に比べ BF36H では, CV 抽出液の色素量は約 1.4 倍増加 ($p < 0.05$) するとともに, チップ上の生菌数は約 2.5 倍 ($p < 0.0001$) 増加していた (図 1)。CV 値をバイオフィルム量とした場合のバイオフィルム内菌密度 (CFU/CV) は, BF18H に比べ BF36H で約 1.8 倍に増加していた。以上から, BF18H と BF36H は明らかに成熟度の違ったバイオフィルムであった。

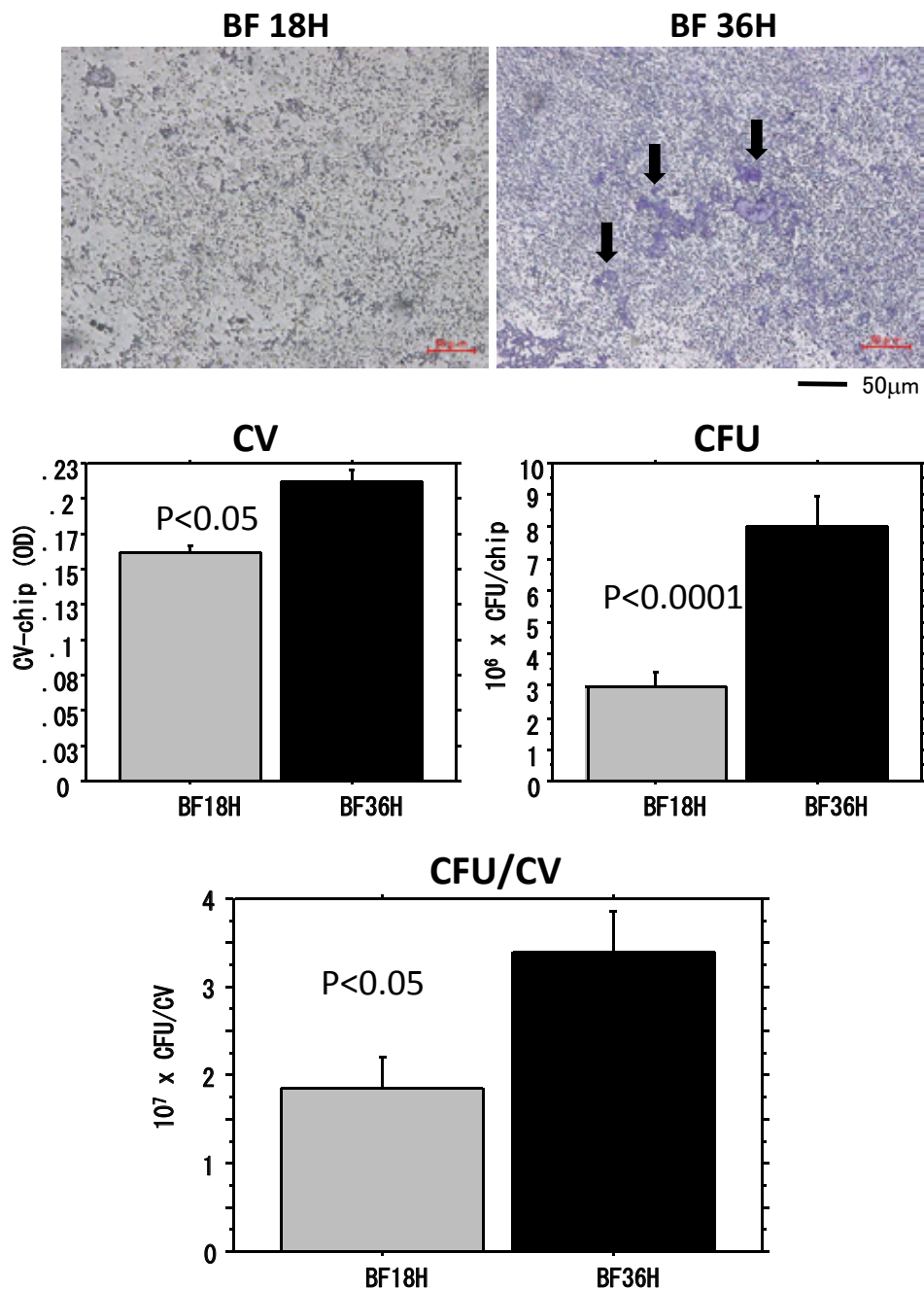


図 1 バイオフィルムチップの作製
バイオフィルム形成の MRSA 菌株 OJ-1 によりバイオフィルムチップを作製した。18 時間培養によるものを BF18H, 36 時間培養によるものを BF36H とした。CV 染色後の形態を見ると, BF36H では CV 染色陽性の凝集像 (矢印) が多く見られた。バイオフィルム量 (CV 染色) と生菌数を CFU 値で測定し, バイオフィルム内菌密度は CFU/CV で表した。

AgSD による増殖抑制効果 (MIC)

AgSD 最大濃度 4000 mg/mL から 2 倍希釈法で 9 系列に加え無添加の培養液に、バイオフィームチップ (BF18H, BF36H), および BF36H と同数の浮遊菌 (PK) を入れ, 37°C で培養した. 培養後の培養液の濁りを菌の増殖性として, 吸光度測定を行い, MIC を求めた. AgSD 添加による PK 群, BF18H 群, BF36H 群に対する増殖抑制効果は 125 $\mu\text{g/mL}$ (#5) から見られ (図 2), 3 群間に差はなかった.

AgSD による浮遊菌の殺菌効果 (MBC)

次に, 培養液中の生菌の存在を確認するため, 寒天培地に置いた濾紙へ AgSD 添加実験後の培地をプロッテン

グし, 培養後に形成されたコロニーの有無から, MBC を求めた. PK 群の MBC は 250 $\mu\text{g/mL}$ (#6) だった. 一方, BF18H 群, BF36H 群ともに MBC は 500 $\mu\text{g/mL}$ (140 μM) に増加したが, 両群間に差はなかった (図 3).

AgSD によるバイオフィームの殺菌効果 (MBEC)

最後に, AgSD 添加実験後の培養液から BF18H と BF36H を取り出し, それらバイオフィームチップを寒天培地上に置き, 増殖するコロニーの有無から, MBEC を求めた. BF18H の殺菌濃度は 500 $\mu\text{g/mL}$ (#7) だったが, BF36H のそれは 1000 $\mu\text{g/mL}$ (#8) まで増加していた (図 3).

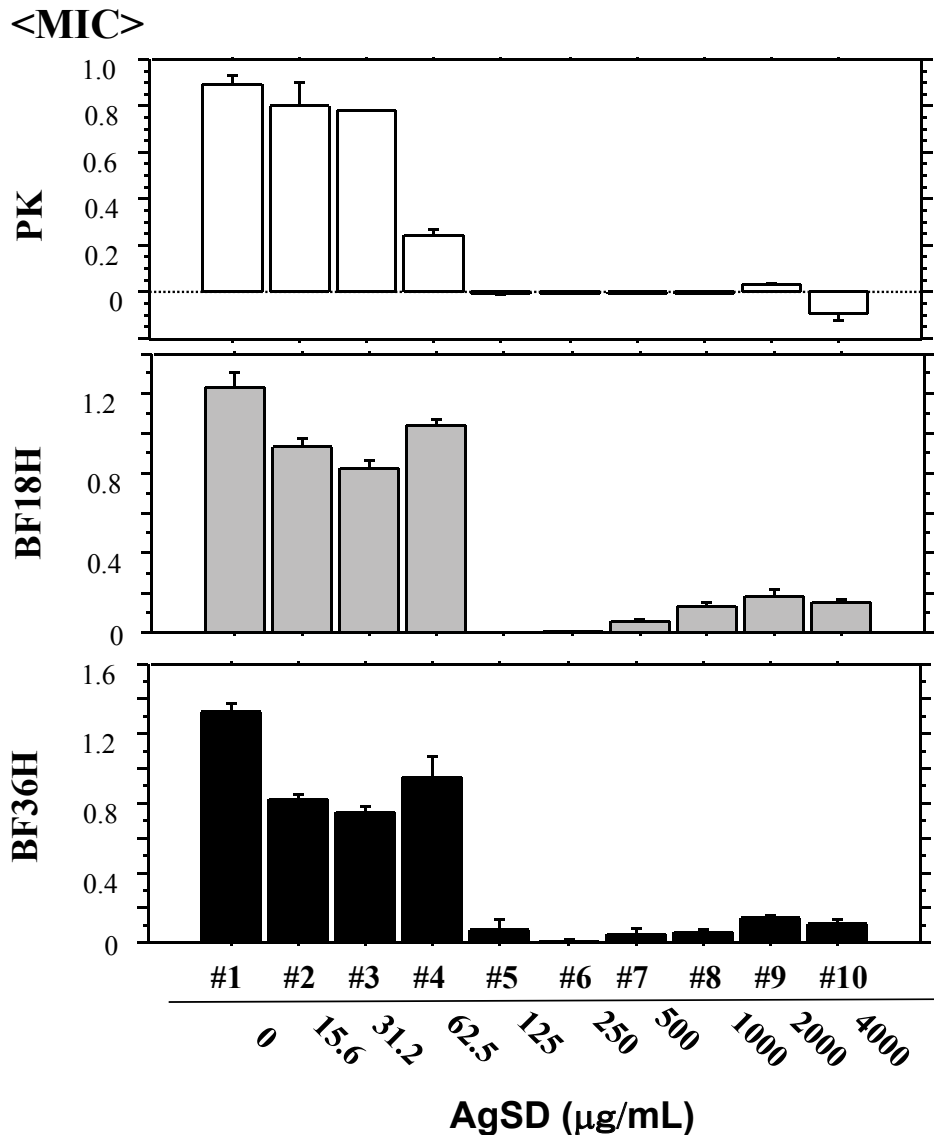


図 2. 異なった状態の菌に対する AgSD の静菌作用
様々な濃度の AgSD に対する静菌効果 (MIC) を, 浮遊菌 (PK) およびバイオフィーム菌 (BF18H, BF36H) を用い, 検討した.

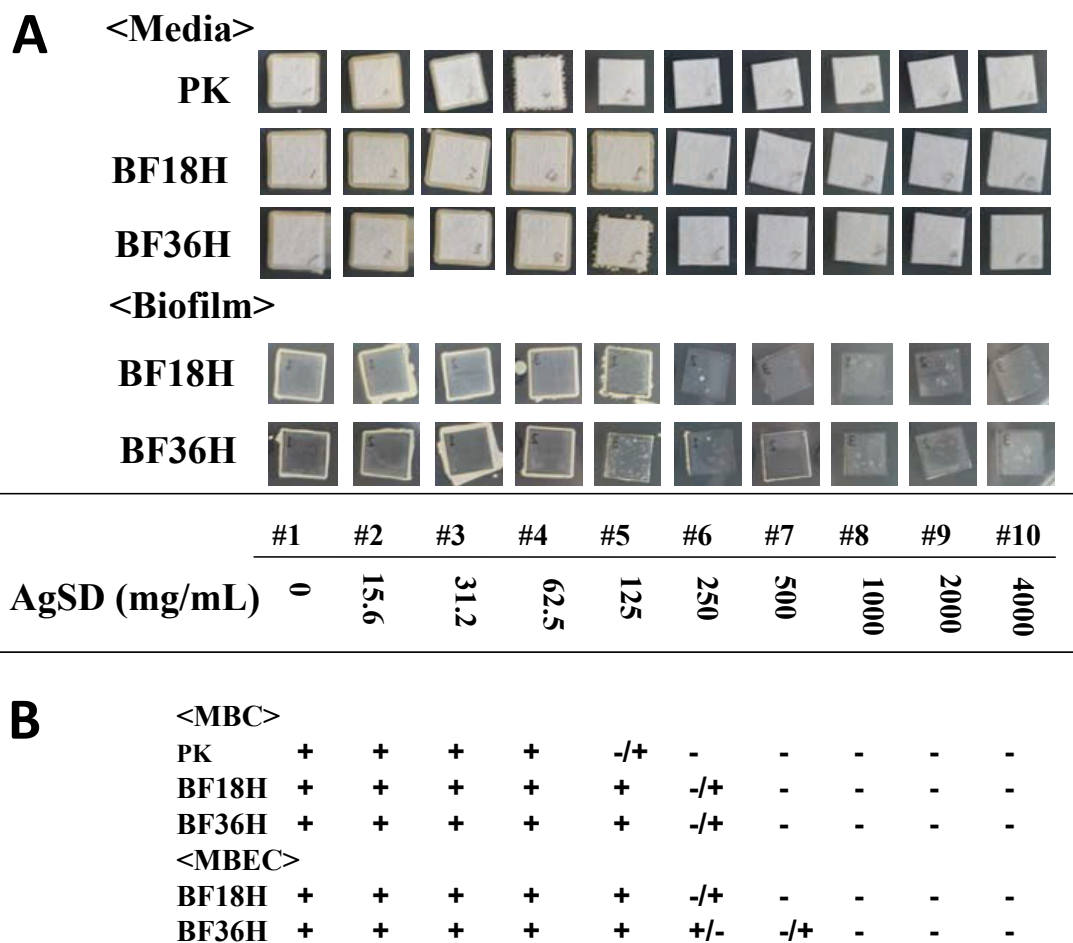


図 3. 異なった状態の菌に対する AgSD の殺菌効果
 様々な濃度の AgSD に対する培養液内浮遊菌に対する殺菌効果 (MBC) およびバイオフィーム形成菌に対する殺菌効果 (MBEC) について、浮遊菌 (PK) およびバイオフィーム菌 (BF18H, BF36H) を用い検討した。
 + (割合として 3/3 に菌増殖), +/- (割合として 2/3 に菌増殖), -/+ (割合として 1/3 に菌増殖), - (割合として 0/3 に菌増殖)。

AgSD とその構成成分のバイオフィームに対する抗菌効果

同一モル濃度にした AgSD, AgNO₃, SD を添加した培養液に BF36H を入れ、培養した。AgSD と AgNO₃ の培養液中の浮遊菌の増殖に対する MIC 濃度は 35 μM (#5) から認められ、両者は同一濃度だった (図 4 A)。その培養液中の生菌の存在を検討すると (MBC), AgSD 群では MIC に対し 4 倍増加しているものの (140 μM: #7), AgNO₃ 群では 8 倍増加していた (280 μM: #8) (図 4 B)。さらに、バイオフィームの殺菌効果 (MBEC) を検討すると、AgSD 群での殺菌効果は 280 μM (#8) から認められたのに対し、AgNO₃ 群では今回用いた最大濃度 1120 μM 以上に増加していた (図 4 B)。

AgSD のバイオフィーム付着性

AgSD のバイオフィームに対する付着性を見るため、AgSD, AgNO₃ および SD をモル濃度で合わせ、バイオフィームチップまたはチップのみので、37℃ と 4℃ で培養した。培養後に顕微鏡で観察すると、AgSD は 37℃

の培養で黒色顆粒状の物質が特異的に多く沈着していた (図 5)。しかしその沈着はチップのみや 4℃ の培養では認められなかった。一方、AgNO₃ 添加培養では、いずれの条件でも微細な黒色顆粒が散在性に分布していたものの、バイオフィーム特異的な沈着は認められなかった。

AgSD の感染創に対する治療効果

マウス皮膚の全層欠損創へ AgSD を投与し、肉芽組織への影響を検討した。投与量 320 μg まで明らかな組織障害作用を認めなかったものの、800 μg 投与したものでは創表層に形成される肉芽組織内で増殖した線維芽細胞の消失が認められた (図 6)。次に、創面に MRSA を接種すると、肉芽表層に存在するヘマトキシリンで染色された菌の分布は、80 μg では明らかな変化はなかったが、320 μg 投与ではコロニー内の菌の数が徐々に減少していた。800 μg 投与では、さらにその減少が進んでいた。

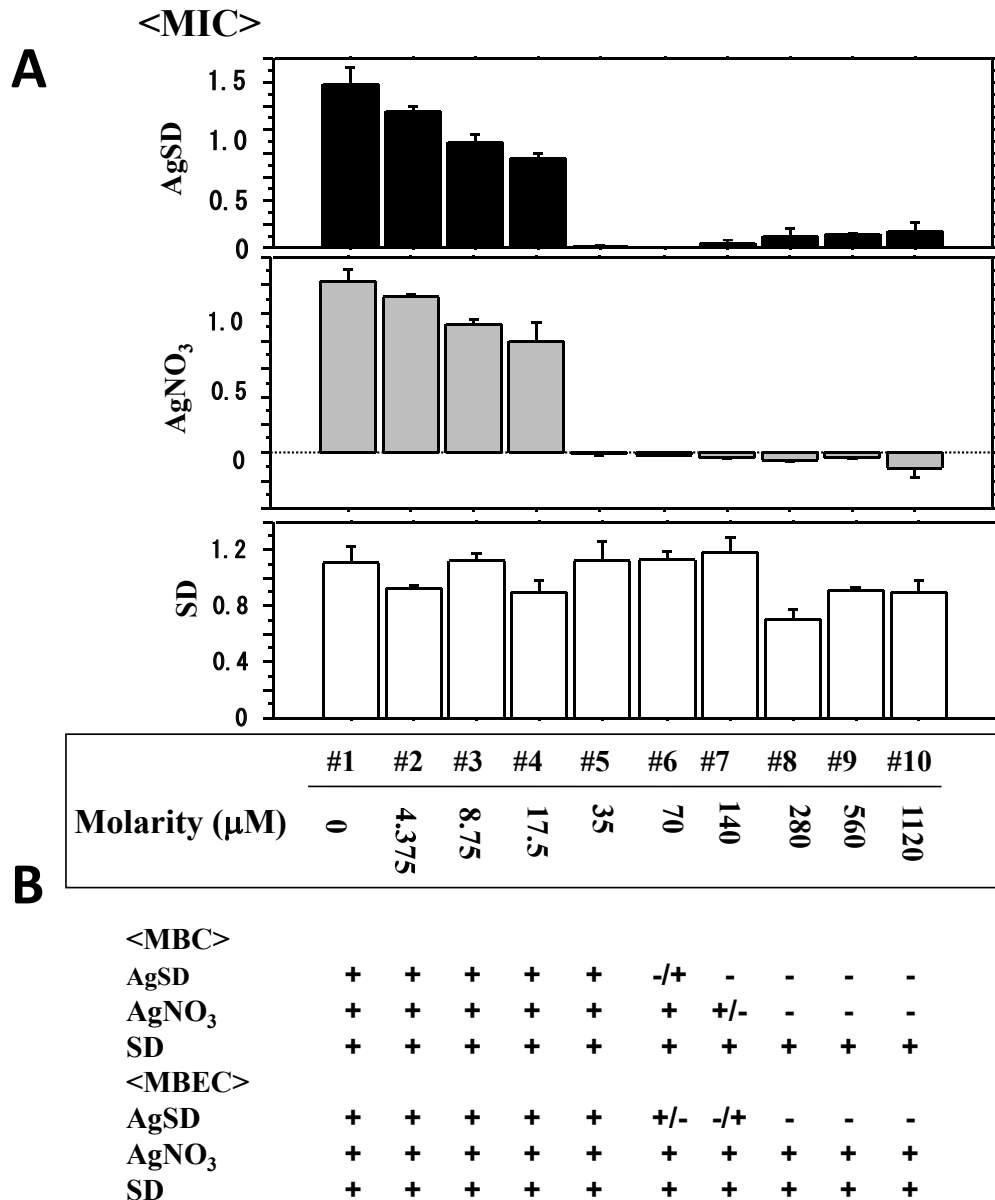


図4 AgSDの構成成分によるバイオフィルムに対する抗菌効果

バイオフィルムチップ (BF36H) に対する同一モル濃度にした AgSD, AgNO₃ および SD 添加培地で培養した後の, 培養液内浮遊菌の静菌作用 (A) を培養液濁度から検索した (MIC). また, バイオフィルムに対する殺菌作用 (B) として MBC および MBEC も検討した.

+ (割合として 3/3 に菌増殖), +/- (割合として 2/3 に菌増殖), -/+ (割合として 1/3 に菌増殖), - (割合として 0/3 に菌増殖).

考 察

現在まで, 専門機関が指定したバイオフィルムに対する薬剤感受性試験の標準法はない. それに順ずる方法として 1999 年に発表されたカルガリー・バイオフィルムデバイス法²⁸⁾ が広く用いられているが, この方法では, MIC, MBEC は得られるが, MBC の情報は得られない. 一方, 本研究で新たに開発した方法の特徴は, バイオフィルムチップを希釈した薬剤で培養することで

MIC を得た後, 菌の生存性の確認である MBEC のみならず MBC を寒天培地上で同時に得ることが可能となっている. また, 透明なプラスチック上にバイオフィルムを作らせることで, その形態変化の観察もできる. さらに, バイオフィルムの成熟度の違いによる比較も可能である. 本方法はバイオフィルムに対する抗菌効果のある薬剤の MIC, MBC, MBEC の同時検索とバイオフィルム自身の成熟度などを考慮した複合的アプローチもできることから, 複雑なバイオフィルム内の因子を解析でき

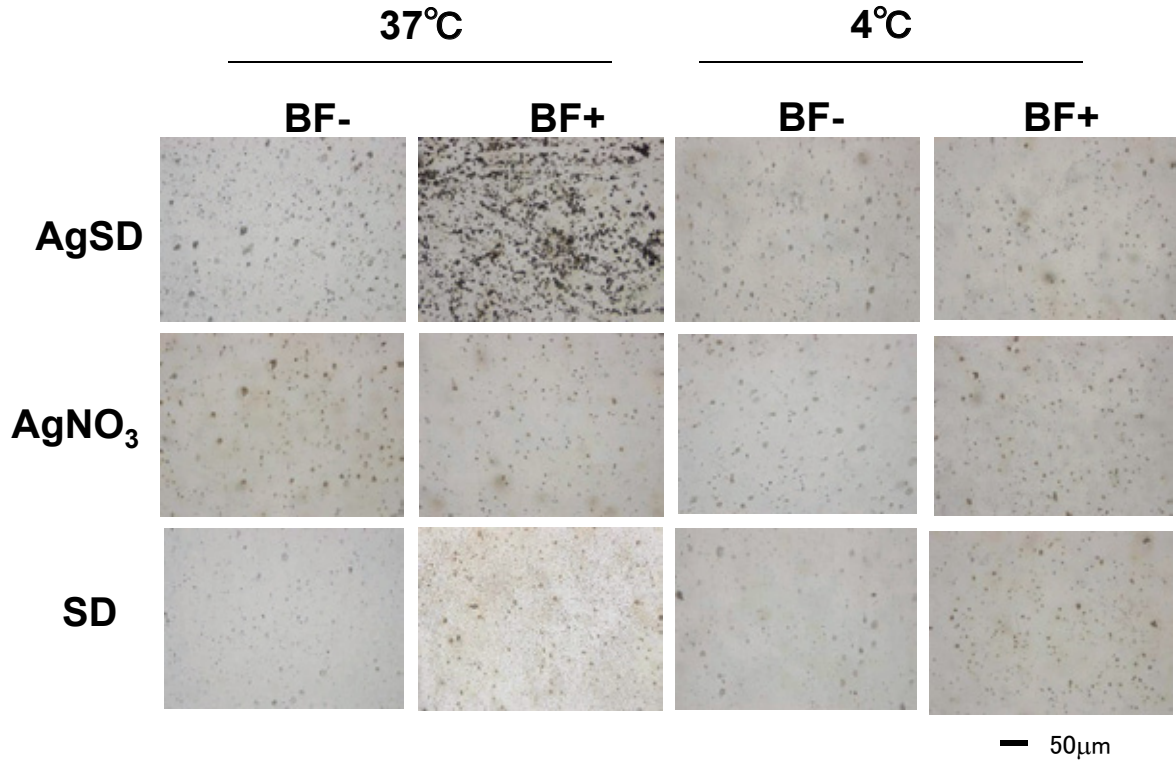


図5 AgSD, AgNO₃, SDのバイオフィルム上への付着
 バイオフィルムチップ (BF36H) を AgSD, AgNO₃, SD 添加培地で 37°C または 4°C で培養後の形態像。AgSD 添加培地では 37°C で培養した場合のみ、バイオフィルムチップ上に銀由来の黒色の顆粒の集積が見られるが、他の条件では見られない。

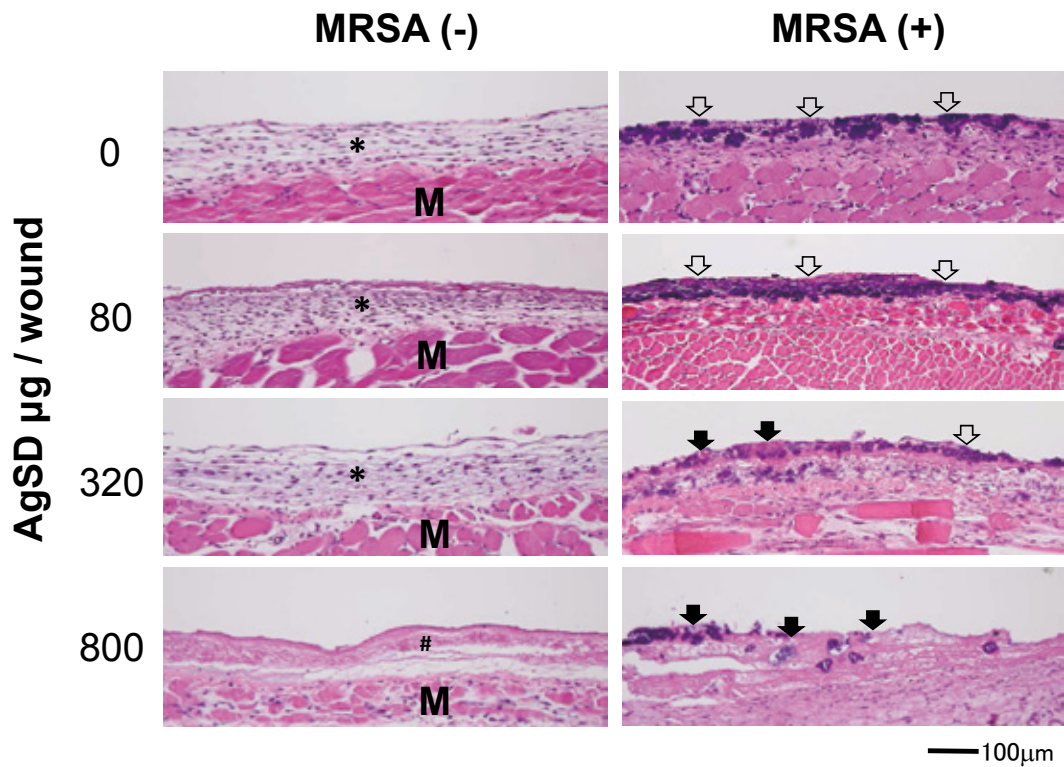


図6 マウス感染創に対する AgSD の治療効果
 5-FU で骨髄抑制したマウスの背部に皮膚全層欠損創を作成した。左は、様々な濃度の AgSD 投与後の組織像：筋層 (M) 上に形成された肉芽内での線維芽細胞の通常の増殖像 (*) とその消失 (#)。右は、創作製後に MRSA 接種を行い、コロニー形成を特徴とする感染創に対する AgSD による治療効果を示した組織像：創表面に形成された通常の菌のコロニー (open arrows) と菌密度が減ったコロニー (closed arrows)。

る新規性のある方法であると言える。

現在、AgSDは臨床で長年使用されている薬剤で、様々な菌種に対する抗菌作用があることが明らかにされている²⁹⁾。AgSDの抗菌のメカニズムは銀が細胞壁や細胞膜に結合することで殺菌作用を発現できると考えられている²⁶⁾。しかし、抗菌薬耐性を示すバイオフィームに対する効果は分かっていない。以前のAkiyamaらの研究(1998)³⁰⁾では、AgSDとAgNO₃を用い、浮遊菌とimmatureなバイオフィーム状態の黄色ブドウ球菌の殺菌効果の比較を行い、浮遊菌に対してはAgNO₃に比べAgSDの殺菌効果は強いものの、37℃、24時間培養で作製したimmatureなバイオフィームに対してはAgNO₃の方が強いという結果を示しているが、その矛盾点や合理的解釈は不明のままである。

バイオフィームの耐性メカニズムは、バイオフィームが有する構造的/環境的特異性³¹⁾と、その中に潜む菌の増殖活性や代謝活性の低下^{2,5)}がその要因と考えられている。今回我々は、バイオフィームの形成時間によりBF18HとBF36Hを作製した。バイオフィームの染色法であるCV染色の原理については今なお明らかではないが、経験的にバイオフィームのバイオマスとの相関性があることから^{32,33)}、バイオフィーム研究では最も良く用いられている。BF18Hに比べBF36HはCV染色量が増え、生菌数(CFU)も増えるが、CFU/CVでみた菌密度も増加したことから、BF18Hに比べBF36Hの方がバイオフィームとしての成熟度は高いと考えられる。これらバイオフィームチップと浮遊菌を比較すると、AgSDに対する浮遊菌の最小阻止濃度であるMICは両者とも同程度であったが、殺菌濃度はバイオフィームで増加し、さらにBF18Hに比べBF36HではMBCとMBECともに増加したことから、バイオフィームの成熟度の増加により薬剤耐性が亢進することが示された。報告されている黄色ブドウ球菌の浮遊菌に対するMICは25~50 µg/mL²⁰⁾で、今回の結果では35~70 µg/mLで、ほぼ同程度になっている。今までのバイオフィームに対する様々な抗菌薬の効果は、浮遊菌に対し100~1000倍増加することが知られている^{3,8,34-36)}。確かに、代表的な抗MRSA薬であるバンコマイシンに対する抵抗性をバイオフィームチップと浮遊菌で比較してみると、1000倍以上の抵抗性の増加を認めた(data not shown)。一方、AgSDの場合、浮遊菌に比べてBF16Hでは2倍、BF36Hでも8倍までの増加しかなく、AgSDはバイオフィームが有する薬剤耐性機序を効率よく解除できると考えられた。

AgSDの殺菌作用の本態はAgであると考えられている^{19,30,37)}。そこで、AgSDとAgNO₃およびSDを比較すると、今回用いた濃度範囲内では、SDには全く抗菌および殺菌作用はなかったが、AgSDに比べAgNO₃で

はMBECに対する殺菌作用は極めて弱かった。つまり、AgNO₃が溶解し、イオン化した銀が多量に培養液中に存在する場合、浮遊菌に対してAgSDと同程度の殺菌効果を有するものの、バイオフィーム内の菌は殺菌できないことが示された。その違いとして、遊離銀イオンだけでは培養液中の蛋白質や塩化物、リン酸塩、硫化物などと結合し、活性化銀イオンの濃度が低下し^{12,19)}、バイオフィームに到達できないと考えられる。そのため、AgSDの殺菌作用は、バイオフィームに付着後に発揮されている可能性がある。そこで、銀が有する酸化による黒化を利用し、顕微鏡下での観察を行ってみると、AgSDとともに37℃で培養したバイオフィーム上に多量の黒色凝集体が沈着し、バイオフィームに特異的な沈着であることが示された。4℃ではそのような顆粒が認められなかったことから、バイオフィームの生物学的動態と何らかの関連性があるのかもしれないが、どのような様式で付着しているかは分からない。今後、バイオフィームでのAgSDの付着とそれに続く作用メカニズムの詳細を解明しなくてはならない。

最後に、実際の創面に形成されたバイオフィームに対するAgSDの治療効果を動物実験で検証した。高濃度投与群では肉芽内の線維芽細胞の消失が認められ、抗菌作用とともに組織障害も起こす可能性が示された。しかし、320 µgのAgSD投与群ではそのような組織障害性は示さないものの、バイオフィーム形成を伴うコロニー内菌数の減少を認めたことから、AgSDはバイオフィームに対しては除去能を発揮でき、臨床的にバイオフィーム治療に有効である可能性があると考えられる。

臨床での感染創の治療においては、菌生息の場となるフィブリンや壊死組織を完全に取り除くことは容易ではない。近年、生理食塩水や水道水で創洗浄が行われるようになってきているものの、組織内に潜む菌を除去することは不可能である。慢性創傷の組織には多くの場合、壊死組織が存在し、それを足場に感染菌はバイオフィームを形成する³⁸⁾。バイオフィームは通常の抗菌薬に対し耐性能を発揮する。このような感染巣の治療薬またはドレッシング剤として他の抗菌剤と異なったメカニズムを持ち、バイオフィームに特異的に作用できるAgSDの使用は、バイオフィーム形成菌の定着を伴う慢性感染巣の有効な管理・治療法となると考えられる。

謝 辞

本研究を行うに当たり、研究費補助および試薬の提供と様々な実験的示唆を頂いたアルケア株式会社の久保貴史氏に心から感謝します。また、多大なる技術的な援助を頂いた福岡大学形成外科学の川口恭子氏、福岡大学薬学部医療構造学の田中理子氏に深く感謝します。

引用文献

1. 秋山尚範, 多田譲治, 荒田次郎: バイオフィルム. 医学のあゆみ 188 (9): 843-846, 1999.
2. 公文裕巳: Biofilm 感染症総論. 化学療法の領域 10 (8): 1477-1485, 1994.
3. Jones SM, Morgan M, Humphrey TJ, Lappin-Scott H: Effect of vancomycin and rifampicin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Lancet* 357 (6): 40-41, 2001.
4. Percival SL, Bowler PG: Biofilms and their potential role in wound healing. *Wounds* 16 (7): 2004.
5. Walters MC, Roe F, Bugnicourt A, Franklin MJ, Stewart PS: Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother* 47 (1): 317-323, 2003.
6. 畝村泰樹, 加藤久美子, 野呂拓史, 山崎洋次: 一般外科領域における MRSA 感染症の治療. 化学療法の領域 17 (11): 53-61, 2001.
7. 二木芳人: 抗 MRSA 薬の使い方, 使い分け. 日本内科学会雑誌 101 (4): 1085-1091, 2012.
8. Cha JO, Park YK, Lee YS, Chung GT: In vitro biofilm formation and bactericidal activities of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones prevalent in Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 70 (1): 112-118, 2011.
9. Mascio CT, Alder JD, Silverman JA: Bactericidal action of daptomycin against stationary-phase and nondividing *Staphylococcus aureus* cells. *Antimicrob Agents Chemother* 51 (12): 4255-4260, 2007.
10. Raad I, Hanna H, Jiang Y, Dvorak T, Reitzel R, Chaiban G, Sherertz R, Hachem R: Comparative activities of daptomycin, linezolid, and tigecycline against catheter-related methicillin-resistant *Staphylococcus bacteremic* isolates embedded in biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* 51 (5): 1656-1660, 2007.
11. Alexander JW: History of the medical use of silver. *Surg Infect* 10 (3): 289-292, 2009.
12. Maillard JY, Denyer SP: Demystifying silver. European Wound Management Association. Position Document: Management of wound infection: 7-10, 2006.
13. Lansdown AB: Silver in health care: antimicrobial effects and safety in use. *Curr Probl Dermatol* 33: 17-34, 2006.
14. 伊地知睦郎, 小澤真希: 入浴施設のレジオネラ対策に銀イオン殺菌. 建築設備と配管工事 41 (7): 16-17, 2003.
15. Burd A, Kwok CH, Hung SC, Chan HS, Gu H, Lam WK, Huang L: A comparative study of the cytotoxicity of silver-based dressings in monolayer cell, tissue explant, and animal models. *Wound Repair Regen* 15: 94-104, 2007.
16. 久保貴史, 岩寄徹治, 武田啓: スルファジアジン銀配合コロイドドレッシングの開発—スルファジアジン銀が衛生状態維持性能と創傷治癒に及ぼす影響の検証—. 日本褥瘡会誌 14 (2): 134-140, 2012.
17. Cochrane CA, Walker M, Bowler P, Parsons D, Knottenbelt DC: The effect of several silver-containing wound dressings on fibroblast function in vitro using the collagen lattice contraction model. *Wounds* 18 (2): 29-34, 2006.
18. Paddle-Ledinek JE, Nasa Z, Cleland HJ: Effect of different wound dressings on cell viability and proliferation. *Plast Reconstr Surg* 117 (7S): 110S-118S, 2006.
19. 由良二郎, 品川長夫, 石川周, 松垣啓司, 花井拓美: Silver Sulfadiazine に関する細菌学的検討. 日本化学療法学会雑誌 28 (9): 1163-1170, 1980.
20. 田辺三菱製薬: ゲーベンクリーム医薬品インタビューフォーム. 第 4 版: 2004.
21. Fox CL Jr, Modak SM: Mechanism of silver sulfadiazine action on burn wound infections. *Antimicrob Agents Chemother* 5 (6): 582-588, 1974.
22. 鈴木敏彦, 山下理絵, 田中正英ら: スルファジアジン銀配合ハイドロコロイド型創傷被覆材の開発—多施設臨床試験評価—. 薬理と治療 28 (7): 621-633, 2000.
23. 鈴木晶子, 松田ミチコ, 阿形千恵子, 重松昭世: Silver sulfadiazine のラットにおける吸収, 分布, 代謝および排泄に関する研究. 薬理と治療 8 (10): 85-109, 1980.
24. 宮山貴光, 荒井裕太, 平野靖史郎: 生活環境における銀暴露とその健康影響. 日本衛生学会誌 67: 383-389, 2012.
25. 佐野進, 富士森良輔, 高島真知子, 糸川嘉則: Silver sulfadiazine の経皮吸収, 臓器内分布および排泄に関する実験的研究. 熱傷 5 (2): 36-43, 1980.
26. 吉岡敏治, 杉本侃: 広範囲熱傷における Silver Sulfadiazine 療法. 救急医学 4 (4): 421-427, 1980.
27. Makino T, Jimi S, Oyama T, Nakano Y, Hamamoto K, Mamishin K, Yahiro S, Takata T, Ohjimi H: Infection mechanism of biofilm-forming *Staphylococcus aureus* on indwelling foreign materials in mice. *Int Wound J*: 2013. [Epub ahead of print]
28. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D,

- Buret A. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol.* 37(6):1771-1776, 1999.
29. Carr HS, Wlodkowski TJ, Rosenkranz HS: Silver sulfadiazine: in vitro antibacterial activity. *Antimicrob Agents Chemother* 4 (5): 585-587, 1973.
30. Akiyama H, Yamasaki O, Kanzaki H, Taba J, Arata J: Effect of sucrose and silver on *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Antimicrob Chemother* 42(5): 629-634, 1998.
31. 小林宏行, 小林治, 神谷茂: バイオフィーム研究の歴史と将来. *Bacterial Adherence & Biofilm* 24: 7-16, 2010.
32. O'Toole GA, Kolter R: Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 30(2): 295-304, 1998.
33. Narisawa N, Furukawa S, Ogihara H, Yamasaki M: Estimation of the biofilm formation of *Escherichia coli* K-12 by the cell number. *J Biosci Bioeng* 99(1): 78-80, 2005.
34. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP: Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318-1322, 1999.
35. Leite B, Gomes F, Teixeira P, Souza C, Pizzolitto E, Oliveira R: In vitro activity of daptomycin, linezolid and rifampicin on *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Curr Microbiol* 63 (3): 313-317, 2011.
36. Bjarnsholt T, Ciofu O, Molin S, Givskov M, Hoiby N: Applying insights from biofilm biology to drug development – can a new approach be developed? *Nat Rev Drug Discov* 12: 791-808, 2013.
37. 塚田貞夫, 山本正樹, 亀井康二, 小島正嗣, 石倉直敬: Silver Sulfadiazine クリーム (T-107) による熱傷の治療. *日本災害医学会会誌* 28 (5): 325-330, 1980.
38. Manabe T, Jimi S, Iwasaki H, Ohjimi H: *Staphylococcus aureus* infection induces an accumulation of dibromotyrosine in the thickened superficial layer of chronic cutaneous wounds. *Med Bull Fukuoka Univ.* 39: 79-86, 2012.

(平成 26. 9. 9 受付, 平成 26. 10. 9 受理)

