

| | | | | |
|---------|----------------------------------|------|-----|----------|
| 氏名・(本籍) | たじりとよかず 田尻豊和(福岡県) | | | |
| 学位の種類 | 博士(医学) | | | |
| 報告番号 | 甲第1538号 | | | |
| 学位授与の日付 | 平成27年3月24日 | | | |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当(課程博士) | | | |
| 学位論文題目 | MRSA形成のバイオフィルムに対するスルファジアジン銀の殺菌効果 | | | |
| 論文審査委員 | (主査) | 福岡大学 | 教授 | 大慈 弥 裕 之 |
| | (副査) | 福岡大学 | 教授 | 田中 正 利 |
| | | 福岡大学 | 教授 | 廣松 賢 治 |
| | | 福岡大学 | 准教授 | 高田 徹 |

内容の要旨

目的

慢性創傷の壊死組織などにはバイオフィルム(Biofilm: BF)が形成され、細菌が抗菌薬剤や免疫系から逃れ感染は遷延する。そのため除去し難い慢性創傷のBFに対して効果のある薬剤が望まれる。そこで本研究ではBFの薬剤耐性を明らかにする新たな検証方法を用い、広い抗菌スペクトルと耐性菌を生じにくい特徴を持つ銀の化合物であるスルファジアジン銀(silver sulphadiazine: AgSD)を用い、MRSA形成のBFに対する効果を検討した。

対象と方法

高BF形成能を有する臨床分離MRSA株を用い菌液を作成した。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℃で18時間および36時間培養し、そのシートから切り出した1x1cmのBFチップを“BF18H”と“BF36H”とした。

各チップ上のBF量の定量は、BFチップをアルコール脱水後、crystal violet (CV)で染色後に洗浄し、残存色素を酢酸で抽出し、その吸光度で評価した。一方、BFチップ上の生菌数は、チップ上の菌を超音波処理により分散、採取し、寒天培地を用いcolony forming unit (CFU)を算出した。こうして求めたBF量およびBF内の菌数から、BF内菌密度(CFU/CV)を算出しBF18HとBF36Hとの特徴を比較した。

また、AgSDとその構成成分であるAgおよびスルファジアジン(sulphadiazine: SD)のBFに対する抗菌効果を比べるために、BF18HとBF36H、およびBF36Hと同数の浮遊菌を用意し培養液を作り、同一モル濃度にしたAgSD、AgNO₃(Ag)、SDを系列希釈したものを各培養液に添加した。培養後、各培養液中の菌液吸光度、培養液内浮遊菌およびBFチップ上の菌の生存性を確認し、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。

また、AgSD の BF への付着性を見るために、チップ (BF なし)、および BF 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℃と 37℃で培養した。培養後、PBS で洗浄し、検体を UV 光に 1 時間照射し Ag の酸化的黒化を促進させた後、顕微鏡下で観察し評価した。

また、骨髄抑制したマウスの背部にコロニー形成を伴う感染巣を作製し、ここに AgSD を投与し、組織、細菌への作用を観察した。

結果

BF18H に比べ BF36H の 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。すなわち BF 内菌密度 (CFU/CV) は、BF18H に比べ BF36H で約 1.8 倍に増加しており、両者は明らかに成熟度の違った BF であった。

浮遊菌、BF18H、BF36H とともに AgSD の MIC は同じだったが (125 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、AgSD の MBC は浮遊菌に比べ BF 群で増加していた。また、AgSD の MBEC は BF18H よりも BF36H でさらに増加していた。

また AgSD の構成成分 (AgSD と Ag および SD) をそれぞれ評価すると、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。MBC は AgSD 群では Ag 群に比べ 2 倍低濃度で、さらに BF 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 BF への AgSD の付着形態を観察すると、AgSD は 37℃で培養した場合、黒色顆粒状の物質内容の要旨が特異的に BF に多く付着していた。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、BF への特異的な沈着は認められなかった。

AgSD のマウスの皮膚欠損感染創に対する効果として、高濃度 800 μg の AgSD は組織障害作用を示すとともに、肉芽表層のコロニー内の菌の数が減少していた。一方、320 μg の AgSD 投与群では組織障害性は示さないものの、BF 形成を伴うコロニー内菌数の減少を認めた。

結論

今回、薬剤の MIC、MBC、MBEC の同時検索および BF の成熟度を解析した。AgSD を用いて BF 群と浮遊菌を比較すると、両者とも増殖抑制は同程度にできたが、殺菌効果は BF 群では乏しかった。さらに BF36H は BF18H に比べ MBC と MBEC がともに増加したことから、BF の成熟度の増加で薬剤耐性が亢進することが示された。

バンコマイシン等の抗菌薬に対する BF の抵抗性は、浮遊菌よりも数百倍増加することが知られているが、AgSD に対しては、BF でも浮遊菌よりも数倍しか抵抗性が増加せず、AgSD は BF の薬剤耐性機序を効率よく解除できると考えられた。

また、AgSD と AgNO₃ および SD を比較した結果、SD には殺菌作用は認められなかった。また AgNO₃ では BF 内の菌は殺菌できないことが示された。AgNO₃ からの Ag が多量ならば浮遊菌に対して AgSD と同程度の殺菌効果を有するものの、Ag だけでは培養液中の蛋白質などと結合し活性化銀イオンの濃度が低下し BF 内の菌に到達できないと考えられる。AgSD の殺菌作用の本態は Ag であると考えられているが、SD が Ag の担体となっはじめて BF への殺菌作用が発揮できると考えられる。また今回顕微鏡的に確認した AgSD 複合体の BF への特異的付着能も AgSD の BF への作用機序として重要だと考えられる。

マウス実験の結果、AgSD 高濃度投与群では組織障害に注意が必要であるものの、適正濃度の使用では BF に対して除去能を発揮しつつ組織障害は認められなかったことから、AgSD は BF を有する慢性

感染創傷に対する治療および管理に有効であると考えられた。

AgSD は他の抗菌剤と異なったメカニズムで BF に作用でき、BF を伴う病巣への有効な管理・治療法となると考えられる。

審査の結果の要旨

バイオフィーム感染は治療が困難で、有効な薬剤の出現が待たれている。本研究では、熱傷感染創に使用されてきたスルファジアジン銀のバイオフィームに対する効果を *in vitro*, *in vivo* で検討した。チップ上に作成したバイオフィームを、スルファジアジン銀 (AgSD) およびスルファジアジンの培養液に添加し培養した。バイオフィーム菌に対する最小発育阻止濃度 (MIC)、最小殺菌濃度 (MBC)、最小バイオフィーム形成阻止濃度 (MBEC) を測定したところ、AgSD 群は Ag 群に比べ、MBC が 2 倍低濃度で効果を示し、MBEC は 4 倍以下の低濃度でも効果を認めた。マウスの背部に作製したバイオフィーム感染巣に対し、AgSD は組織傷害をきたすことなく殺菌作用を惹起できた。以上より、AgSD はバイオフィームを有する慢性感染創傷に有効であると考えた。

1. 斬新さ

様々な抗菌薬に浮遊菌の数百倍の抵抗性を有するバイオフィーム菌に対し、AgSD 複合体がバイオフィー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すことを実験的に証明した点が斬新である。また、用いられたバイオフィームの殺菌効果のアッセイは今までにない新規の方法で、斬新である。

2. 重要性

バイオフィームを有する慢性感染創傷の治療に AgSD が有効であることを、*in vitro* および *in vivo* の研究で、細菌学的に証明し、そのメカニズムについて検討した本研究は、今後のバイオフィームを伴う創感染症に対する有効性が推測されることから、臨床上重要な研究といえる。

3. 研究方法の正確性

バイオフィーム菌は、過去の一連の研究で使用してきたバイオフィーム形成能の高い臨床分離 MRSA 菌株 (OJ-1)²⁷⁾ を用いている。また、本研究で用いられたアッセイ方法は本研究で新規に確立した方法であるものの、その正確性は論理的に裏打ちされ、十分再現可能であり、信頼しうる方法であるといえる。

4. 表現の明確さ

正確で解りやすい文章で記載され、病理学的用語や細菌学的用語も適切に使用されている。

5. 主な質疑応答

Q：マウス実験の組織像で、コロニーと BF の違いは何か？

A：ポリサッカライドに包まれたものがバイオフィームである。

Q：菌とバイオフィームに対する効果の違いを説明して欲しい。

A：菌への効果は MIC と MBC、バイオフィームへの効果は MBEC で判断できる。

Q：MIC を計る時の菌数は？

A：106 個。

Q：AgSD は persister（薬剤抵抗性休眠期）にも有効なのか？

A：AgSD作用に stationary phase（静止期）、persister phase（休眠期）という考え方は当てはまらない。

AgSD は菌に付着することで殺菌効果を発揮する。菌のある場所に到達しさえすれば、どの相でも効果を示す。

Q：AgSD は溶けにくいのであれば、AgSD 溶液はどのように作成したのか？

A：AgSD はアンモニアに溶解されるが水にも少しは溶けるので、MIC が得られたと考える。

Q：AgSD とバイオフィルムの親和性はよいのか？

A：AgSD のバイオフィルムチップへの付着を顕微鏡で見た実験で、37℃の時と4℃の時で差が生じていることから、親和性は環境温度に影響されると考える。

Q：AgSD が効果を及ぼす深達度、浸透性はどの程度か？

A：今回はそこまで検討していない。

Q：マウスで AgSD を使用した濃度と、市販薬であるゲーベンククリームの濃度が同じであるという根拠を説明してほしい。

A：ゲーベンククリームは1% AgSD 製剤である。一方、マウス背部の創面積は3.14 cm²となり、1mm厚で塗布したとすると AgSD は314 μg で、ゲーベンククリームの320 μg とほぼ等しくなる。

Q：従来のカルガリー・バイオフィルム・デバイス法と MBEC との違いは？

A：バイオフィルムチップを用いた MBEC であれば、直接バイオフィルムを観察できる点、およびチップ上の CFU、バイオフィルム量が検定できる点が異なる。

Q：菌が1種類では弱い。菌側の因子も様々あるので、MRSA の ATCC 標準株、耐性緑膿菌など、他にも数種類菌を検討してほしい。

A：今後ぜひ OJ1 以外の菌での研究も続けたい。

Q：AgSD は Ag イオンとして効いたのか、AgSD として効いたのか、浮遊菌相で効いたのか、BF 相で効いたのか、機序の検討が必要である。

A：BF 上での AgSD の作用について、今回の研究の結果、Ag を運ぶ担体として SD が重要な役割を果たしていることが示唆された。今後さらに機序に関する検討を進めたい。

以上の内容の斬新さ、重要性、研究方法の正確性、表現の明確さ、及び質疑応答の結果を踏まえ、審査員で討議の結果、本論文は学位に値すると評価された。