

氏名	おおやま たくと 大山 拓人		
学位の種類	博士（医学）		
報告番号	甲第 1645 号		
学位授与の日付	平成 29 年 3 月 21 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	Biofilm-Forming Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Survive in Kupffer Cells and Exhibit High Virulence in Mice （マウス血液内に投与後クッパー細胞内で生存した MRSA の Biofilm 形成能と菌毒性の関係）		
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	廣松 賢治
	福岡大学	教授	今福 信一
	福岡大学	准教授	藤田 昌樹

内 容 の 要 旨

【目的】

黄色ブドウ球菌は皮膚常在菌としてよく知られているが、抗生物質の多用によりメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（methicillin-resistant *S. aureus* : MRSA）の出現をもたらす結果となった。MRSA はバイオフィルムを形成し、生体内留置異物感染症、菌血症、敗血症、軟部組織感染症、心内膜炎、骨髄炎などを引き起こし、時には生命を脅かすこともある。バイオフィルムは菌が産生する extracellular polysaccharides（EPS）が主な構成成分で、生体内タンパクや DNA なども含まれる。バイオフィルムが示す薬剤耐性には薬剤特異性はほとんどなく、その性質は物理学的特性（薬剤浸透性の低下）および生物学的特徴（quorum sensing や Persister の存在）から説明されている。しかし生体内での菌の感染動態やバイオフィルム形成メカニズム、及び細胞毒性、組織障害性の詳細は不明である。本研究は MRSA それぞれが持つバイオフィルム形成能に着目し、マウスにおよぼす細胞毒性、組織障害性を状態評価と病理組織学的評価を通して検討した。

【対象と方法】

MRSA 分離株は福岡大学病院形成外科学保有の潰瘍創面から採取された MRSA の 1 株と同大

学病院腫瘍血液感染症内科学保有の血液分離 MRSA コレクション 173 株を用いた。各菌株のバイオフィーム形成能の測定はクリスタルバイオレット (CV) 染色法を用い、試験管壁面に付着した色素を溶解させ、吸光度 (吸光波長 570nm) を分光光度計で測定した。吸光度の値の最も高いもの、最も低いものから 10 株ずつ選出し、バイオフィーム高形成菌株 (High-Biofilm : H-BF) とバイオフィーム低形成菌株 (Low-Biofilm : L-BF) に分類した。

各菌液をマウス尾静脈より 200 μ L ずつ投与後 1・3・6・12・24 時間後に義死させたマウスの各臓器 (肝臓、肺、脾臓、腎臓) を摘出し組織標本を作製した。

菌投与後のマウスの全身状態の評価は、4 段階評価 (1 : 正常、2 : 低行動性、3 : 無行動性、4 : 死亡) を用いスコア化した。

作成した組織標本はそれぞれ一般組織染色、酸性ムコ多糖の染色、中性ムコ多糖染色、免疫染色を行い、以下に示す①～③のごとく形態解析を行った。

①組織内グラム陽性スポット数の評価と測定：撮影写真を画像解析ソフトに取り込み、画像上でグラム陽性スポット数のカウント、および各スポットの面積計測を行った。また、スポット面積 $\geq 10 \cdot \text{m}^2$ の数も計測した。

②組織内グラム陽性スポットの面積サイズの関連性：肝臓組織内での MRSA 菌分布パターンを知るために、グラム染色写真上で陽性部位のスポットの数と面積を測定し、累積度数分布をヒストグラムで解析した。

③組織内アルシアンブルー陽性スポット数の測定：ALB 染色した組織写真を用い ALB 陽性スポットを肉眼的に計測した。異なった 3 人で評価し、その平均値を採用した。

さらに肝臓組織内生存菌数の計測として菌液 200 μ L をマウス尾静脈から投与し、24 時間後に眼窩から血液を採取、および肝臓組織を採取した。血液およびホモジナイザー処理した肝臓組織を用い、寒天培地に播種した後、37°C、24 時間培養後のコロニー数をカウントし、血液は μ L 当たり、肝臓組織は mg 重量当たりのコロニー数で表した。

【結果】

各臓器内 MRSA とバイオフィーム分布の経時的変化

菌投与後の組織内菌密度は、いずれの臓器でも時間経過とともに菌数減少が認められるものの、その残存性は肝臓で最も高かった。一方、ALB 陽性スポット数を見ると、肝臓でその数が最も多かったことから、肝臓内でのバイオフィーム形成が他の臓器に比べ高く、投与後 24 時間でも保持されていた。肝臓内での組織内分布を見ると、グラムおよび ALB 陽性スポットともに肝臓内にびまん性に分布しており、分布形態の詳細を知るため、ALB 染色と黄色ブドウ球菌の 2 重染色したものを強拡大で観察すると、ALB 陽性スポット内に数個～数十個の菌が存在していた。肝臓内での菌の存在は多くの場合、細胞内に見られ、そ

の細胞の形態と局在からクッパー細胞内に存在することが示された。

グラム陽性菌の肝臓内分布パターン

肝臓組織内での分布パターンを知るために、グラム染色写真上で陽性部位のスポットの数と面積の解析を行った結果、グラム染色で大きなスポット面積を有するものと、有さないものに分離することが分かった。大きなスポット面積を持たないものでは、ヒストグラムのスポットの面積分布は $10\mu\text{m}^2$ 以下に分布し、1 峰性を示していた。一方、広いスポット面積を有するものでは、スポット面積 $10\mu\text{m}^2$ を境に 2 峰性を示していたことから、菌の細胞内蓄積・集簇（増殖）が起こっていると考えられた。

肝臓内での MRSA の菌密度とバイオフィーム形成の経時的変化

静注後の肝臓組織内でのグラム陽性スポット数、 $10\mu\text{m}^2$ 以上のグラム陽性スポット数、および ALB 陽性スポット数の経時的変化を検討した。グラム陽性スポット数は 1 時間目では少なかったが、以後増加し、その数は 24 時間まで維持されていた。一方、 $10\mu\text{m}^2$ 以上の菌集簇を示したスポット数は 24 時間まで時間とともに増加していた。ALB 陽性スポット数に時間的変動はあるものの、3 時間以降ではほぼ維持され、大きな減少は認めなかった。以上のことから、血液内に投与された菌は、肝臓組織内で蓄積・集簇し、投与後 24 時間まで肝臓組織内で保持されていた。

しかし、菌の蓄積・集簇とバイオフィーム形成の関係性は明らかでないため、バイオフィーム形成能の異なる血液分離臨床菌株、L-BF 10 株と H-BF 10 株を用い、菌投与後 24 時間目の肝臓組織内での $10\mu\text{m}^2$ 以上の菌集簇スポット数と Biofilm 形成数（ALB 陽性スポット数）の相関性を検討した。H-BF 群では菌集簇スポット数の増加に伴い、バイオフィーム形成を表す ALB+スポット数の有意な増加を認めた ($p<0.04$)。この結果から、バイオフィーム形成能の高い菌の場合、菌の組織内集簇とバイオフィーム形成能に何らかの関連性があることが示唆された。

肝臓組織内のバイオフィーム形成能の比較

菌の静脈内投与 24 時間後の、L-BF 群と H-BF 群における肝臓内菌数とバイオフィーム形成性を比較した。肝臓組織内での菌のスポット数は両群間に差はなかったものの、 $10\mu\text{m}^2$ 以上の菌集簇スポット数は L-BF に比べ H-BF で明らかに多かった（約 2 倍）($p<0.001$)。また、バイオフィーム形成を示す ALB 陽性スポット数は、L-BF 群に比べ H-BF 群で有意に増加していた ($p<0.01$)。

MRSA 投与後のマウス全身状態

L-BF 群に比べ H-BF 群では有意に全身状態の悪化が認められた ($p<0.01$)。また、死亡したマウスの数で比較すると、L-BF 群では 8/30 匹 (27%)、H-BF 群では 16/30 匹 (53%) が死に至っていたことから、致死率は L-BF 群に比べ H-BF 群で 2 倍増加していた ($p<0.05$)。

L-BF 群と H-BF 群における肝臓内生存菌数

菌毒性が出現しない条件で静脈内へ L-BF 群と H-BF 群の菌投与を行い、24 時間目の全身状態および血液内および肝臓内生存菌数の比較。両群ともに全身状態の悪化は求められず、血液内菌数も差はなかった。しかし、L-BF 群に比べ H-BF 群で有意に肝臓内の生存菌数は多かった ($p < 0.05$)。

【結論】

今回の研究では、バイオフィーム形成能が大きく違う 2 群を選出し、その菌液をマウスの静脈内へ投与し、そのバイオフィーム形成能と惹起される菌毒性の関係を検討した。

菌液投与 1 時間目から、多くの菌が肝臓、肺、脾臓の組織内に分布したが、腎臓内の分布は少なく、食系システムに依存すると考えられた。特にバイオフィーム形成の指標となる ALP 陽性のスポット数は肝臓でのみ多く保持され、肝臓内では、Kupffer 細胞内で菌に associate してバイオフィームが存在したことから、細胞内での菌の増殖も示唆された事より肝臓内にトラップされた菌がバイオフィームに関与する別のメカニズムで、さらに、細胞内での生存維持を果たしていることも考えられた。

細胞内に侵入した菌は small colony variants (SCVs) を発生させ、生存維持をはかるとされている。今回の肝臓組織内の菌分布様式をみると、菌は ALB 陽性の物質を伴うことから、バイオフィームを形成し、細胞内で variants を起こしているのかもしれない。

また、菌毒性が惹起された場合、敗血症状態に陥り菌の組織内感染が増悪する可能性がある。そこで、菌液投与 24 時間後の肝臓内での菌の生存の比較を行うと、L-BF 群に比べ H-BF 群の生存菌は 20 倍以上多く、組織内で菌が生存していることが示された。今回の研究により、菌は貪食された後、細胞内でバイオフィームを伴い、細胞内殺菌メカニズムから逃れていることが示唆された。これを克服するためには、抗菌薬は細胞内浸透を果たさなければならない、今後細胞内で生存した黄色ブドウ球菌除去のための有効な治療法の開発が必要と考える。

マウス菌血症モデルを用いた本研究により、MRSA が有するバイオフィーム形成能は生体内での菌の生存維持に重要であり、細胞内寄生が可能となり、結果的に慢性感染症を引き起こすことが示された。

審査の結果の要旨

本論文は、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) それぞれが持つバイオフィルム形成能に着目し、マウスにおよぼす細胞毒性、組織障害性を状態評価と病理組織学的評価を通して検討した。福岡大学形成外科学保有の潰瘍部創面から採取された MRSA1 株、同大学感染症内科学保有の血液分離 MRSA 173 株を用い、バイオフィルム形成度を計測し、各々の MRSA 菌のバイオフィルム形成能は異なる事を明らかにした。その後バイオフィルム形成能の高い菌株、低い菌株をそれぞれ 10 株ずつ計 20 株選出し、マウス尾静脈より血中に投与した。その結果、バイオフィルム形成能が高い菌は、形成能が低い菌よりも肝臓組織内のクッパー細胞で貪食された後も、細胞内で有意に生存維持できた事を明らかにした。

1. 斬新さ

MRSA のバイオフィルム形成能に注目し、バイオフィルム形成能が強い MRSA 菌株は、バイオフィルム形成能の低い菌株よりも、肝臓組織内でクッパー細胞に貪食された後も、クッパー細胞内で生存維持し、生体に対して強い毒性を示した事を世界で初めて証明出来た点で斬新である。

2. 重要性

同じ MRSA 菌株であっても、各々の MRSA 菌のバイオフィルム形成能は異なる事を実際の菌血症を呈した患者より採取した臨床分離株 173 株を用いて明らかにした。その内、バイオフィルム形成能の高い菌株、低い菌株をそれぞれ 10 株ずつ計 20 株セレクトし、マウス尾静脈より血中に投与した。バイオフィルム形成能が高い菌はマウス生体内で菌が貪食された後も貪食細胞内で有意に生存維持する事を証明しており、今後バイオフィルムを有する菌の治療戦略に一石を投じた点で重要である。

3. 研究方法の正確性

使用した MRSA は過去の一連の研究で使用してきた患者の潰瘍面より採取したバイオフィルム形成能の高い臨床分離 MRSA 菌株 (OJ-1) を用いた。さらに菌血症を呈した実際の患者より分離した臨床分離 MRSA 株 173 株を用いた。本研究で用いられたアッセイ方法は新規に確立した方法であるが、十分な再現性を有しており、その正確性は論理的に裏打ちされ、信頼に足る方法である。

4. 表現の明確さ

正確でわかり易い文章で記載されており、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

Q1: バイオフィルムの高形成型、低形成型は環境の要素で決まるのか、それとも菌株にその性質があるのか。SCCmec などの遺伝子型はわかっているのか。

A1: バイオフィーム形成に関係する接着分子などのジェノタイプはいずれも差がなかった。しかし、さまざまな臨床分離 MRSA 株を通常培養で増殖させるとバイオフィーム形成能に差が見られ、本質的な違いがどのようなメカニズム（遺伝子発現）に由来するかは今のところ明らかとなっていない。

Q2: ファゴサイトーシスを受けた後も貪食細胞内で生存するのは消化酵素からもバイオフィームが菌体を守っていると考えて良いのか。

A2: バイオフィーム形成能の異なる菌を用いた今回の比較実験から考えると、貪食細胞内で生存維持する何らかのメカニズムが存在し、そこにバイオフィームが深く関与すると考えられる。その中には、物理学的因子または生物学的因子が考えられるが、本研究ではその点を明らかにできていない。今後の研究課題と考える。

Q3: 濃度別の菌数と全身状態の検討で、4 つに菌液濃度を設定し、0.5 以下のものではマウスの全身状態を正常に保つ事が出来ていたが、菌液濃度が 1 では全身状態に悪影響を与えていた。たった 2 倍の濃度差でこのモデルではクリティカルに全身状態が悪化したと考えるとよいか。

A3: この検索では、血液内へ投与した菌の、全身状態に対してクリティカルな濃度を知り、菌投与後 24 時間目で全身状態に影響のないぎりぎりの濃度を検出することを目的としている。血液内に投与された MRSA 菌量が多い場合、たとえ健康でも病的状態となることから、ご指摘のような非常にシャープな毒性発現があると考えられる。本研究では、クリティカルな全身状態悪化となるぎりぎりの条件で、肝組織内の菌の生存性を検討している。つまり、死亡してしまっただけではこの検索の信頼性が損なわれるからである。

Q4: バイオフィームは低栄養状態で発現するが、この実験の様に栄養が豊富な血液内では、菌はバイオフィームを発現しているのか。呼吸器関連でも臨床検体として血中より採取した時は殆どバイオフィームは発現していないことが多い。血中内でバイオフィームは発現しているのか。

A4: 循環血中内で菌が運ばれている状態はいわゆる“浮遊状態”と考えられ、バイオフィーム形成状態ではない。浮遊状態の菌は組織内のマトリックスタンパクなどに接着し、バイオフィーム形成がスタートする。そのため、生体組織内では免疫細胞の攻撃が少ない壊死組織などでバイオフィームが形成されると考えられている。

Q5: 方法論だが、多くのマウスに菌液を投与しているが、マウス尾静脈に菌液を注入するコツはあるのか。

A5: 尾をしっかりと張った状態で、尾静脈を暖めるライトで照らすと血管を判別し易かったが苦勞した。

Q6: $10 \mu \text{ m}^2$ 以上のスポット以外でも有意な結果が得られたのか。

A6: 肝組織内での MRSA は様々なサイズの菌凝集塊（スポット）を形成していた。本研究では、 $10 \mu \text{ m}^2$ 以上のスポットを増殖した菌凝集塊と考えた。組織内のスポット数のみで見ると、H-BF 群と L-BF 群には差はなかったものの、 $10 \mu \text{ m}^2$ 以上のスポット数は、L-BF 群に比べ H-BF 群で多かったことから、バイオフィーム形成能が高い菌は臓器内で増殖可能な環境を獲得していると考えた。

Q7: グラム陽性菌の肝臓内分布パターンでスポット面積が $10 \mu \text{ m}^2$ を境に 2 峰性を示したとの事だが、2 峰性が小さい様にみえるが。

A7: 臓器内に菌が定着・増殖する場合、そのスポット分布は 1 峰性の正規分布すると考えられる。しかし、H-BF 群では 2 峰性を示したことから、別の因子の関与が示唆された。その因子の一つがバイオフィームであると考えた。つまり、2 つ目の山は小さいものの、その中で菌が増殖しているスポットと考えられ、確かに、そのスポット数は BF-L 群に比べ BF-H 群で有意に増加していた。

Q8: MRSA を生体内に注入した後のカイネティクスはどうなるのか。

A8: 正確なカイネティクスは本実験ではわからないものの、血液から各臓器に分布し、特に残存性は肝臓で多いことが示された。しかし、その後の菌の移動、分布は本実験では検討していない。

Q9: クリスタルバイオレットアッセイ法の原理はどういったものか。

A9: 世界的にバイオフィームの定量法にクリスタルバイオレット染色が用いられている。その染色原理は、Gram 染色の前半部分であり、基本的には様々な生体物質を染色する。しかし、グラム陰性菌のバイオフィームも本染色が用いられている。調べた限り、その原理を示したものはなく、経験的に使用されてきたようである。

Q10: 生体内のバイオフィームを染色するためにアルシアンブルー染色や鉄コロイド染色を行っているが、それぞれがどういう意味があるのか。

A10: バイオフィームは細胞外多糖からできていることは知られている。そこで本研究では、病理組織染色に用いられる一般多糖類染色を用い、検証した。酸性ムコ多糖染色であるアルシアンブルー染色や鉄コロイド染色によりバイオフィームマトリックスを検出できることが分かった。この、MRSA のバイオフィームマトリックスを検出する方法は我々が世界で初めて見出したもので、病理組織内のバイオフィーム検出に用いることができることが期待できる。

Q11:試験管内でのクリスタルバイオレット染色された MRSA は中性ムコ多糖染色で染色されるのか。

A11:染色されなかった。

Q12:MRSA が産生するバイオフィームは酸性ムコ多糖がメインなのか。

A12:そうだと考える。

Q13:本当に生体内でバイオフィームが形成されているのか、重要なポイントだと思う。

バイオフィーム形成能が高い MRSA の方がクッパー細胞内で生存出来たと言う事なのか。

A13:そのように考えている。クッパー細胞内に分布する菌を酸性ムコ多糖染色で染色すると、明らかに菌体周囲にアリシアンブルー陽性物質が分布していることから、細胞内で菌がバイオフィームを形成し、生存維持を図っていると考えている。

Q14:クッパーの中で生存維持したというエビデンスはどこにあるのか。

A14:細胞内で生存維持を直接的に証明することはできていない。しかし、電顕、CFU アッセイなどから考えると、細胞内で生存維持が図られていると考えている。

Q15:クッパー細胞内に存在している菌は電子顕微鏡で確認出来たが、その時にバイオフィームはどこに存在しているのか。

A15:本研究では透過電顕を用いて検討している。そのため、バイオフィームマトリックスを直接観察することはできていない。

Q16:クッパー細胞に貪食された後も菌体が生き残る事自体がすごい発見だと思う。クッパー細胞内で生存、増殖しクッパー細胞がコントロール出来なくなるとバーストし、腎臓など多臓器に行くのかと思ったが。

A16:今回の実験は 24 時間実験だが、これをさらに一週間おくと肝臓内で大きなバイオフィームが形成される。その後、腎臓内に菌は出現し、尿細管内で増殖、バイオフィームを形成し、腎不全状態となり死亡する。先ほどのカイネティクスにもつながるが、一連としてはその様な変化が起こっていると考えられる。

Q17:MSSA でも同様の様式がみられるのか。

A17:MSSA では検討していない。

Q18:バイオフィーム形成能に関わる遺伝子はわかっているのか。

A18:直接的に関わる遺伝子はまだわかっていない。

以上、内容の斬新さ、重要性、研究方法の正確性、表現の明確さ、質疑応答の結果を踏まえ、審査員で協議した結果、本論文は学位論文に値すると評価された。