

氏名	上田 裕 <small>うへだ ゆたか</small>		
学位の種類	博士（薬学）		
報告番号	乙第1894号		
学位授与の日付	令和3年3月16日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当（論文博士）		
学位論文題目	MRSA 形成バイオフィルムを阻害する臨床応用可能な物質の探索		
論文審査委員	(主査) 福岡大学	教授	原 周司
	(副査) 福岡大学	教授	鹿志毛 信広
	福岡大学	教育嘱託	自見 至郎

## 内容の要旨

### 緒言

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA) は、皮膚常在菌である黄色ブドウ球菌由来菌で、院内で検出される薬剤耐性菌として最も分離頻度が高い。中心静脈カテーテルや人工関節など生体内留置の医療用器具上に MRSA など菌が付着・増殖すると、バイオフィルム (BF) が形成される。BF とは、生体内物質および細菌が分泌する多糖類などを含むマトリックス成分とそこに潜む細菌の集合体である。形成された BF は、薬剤に対する抵抗能亢進、免疫細胞浸潤に対しての阻止能を有する。それ故、BF 除去は困難で、感染巣は難治化するため、BF 感染症は深刻な医療上の問題となっている。しかし、医療上効果的な BF 形成阻止法および治療法は確立されていない。本研究は、BF 形成能の高い MRSA 菌株を用い、既存の安全性が担保された物質および薬剤を用い検討を行い、BF 形成予防物質としてある種の界面活性物質、殺菌物質としてある種の銀化合物を見出した。第1章では界面活性剤を用いた検索、第2章では銀化合物を用いた検索を行った。

### 第1章 皮膚組織を含む様々な基質上に形成された MRSA 形成 BF に対するポリソルベート 80 (PS80) の抑制効果

菌の生活環の中で、菌の固相への付着と増殖は最も安定化した生活期で、BF はその生活環境を与えるものとなることから、“BF” とはマトリックスおよび菌が形成するコミュニティ全体を表す言葉として使用されている。感染から BF 形成までの過程を考えると、菌付着の抑制は第一義的となる。しかし、生体内で使用可能な物質は少ない。本章では、界面活性剤をその候補物質として考え、その作用効果から最も可能性のあるものを検出した。

界面活性剤としては、陽イオン系の塩化ベンザルコニウム (BZC)、陰イオン系のドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、両性イオン系の 3-(3-Cholamidepropyl) dimethylammonio-

1- propane-sulphonate (CHAPS) および非イオン系の PS80 の 4 種類を用いた。生体細胞としてマウス 3T3 線維芽細胞を用い、細胞毒性効果も検討した。生体細胞毒性効果は最小限に抑えられ、明らかな BF 形成抑制効果を示したものとして PS80 が選出された。しかし、形成された BF に対し破壊効果はなかった。様々な菌付着基質に対する効果を検討したところ、一般に培養実験に用いられるプラスチック基質のみならず、皮膚組織やシリコン基質に対しても BF 形成抑制効果を認めたが、ステンレス基質に対しての効果はなかった。これらの結果は、PS80 は組織やシリコンまたはプラスチック上への MRSA の付着に対し抑制的に働き、結果的に BF 形成を阻止できることを示している。臨床的応用例としては、創傷部の洗浄液、生体内留置カテーテルの前処理液に PS80 を添加することにより、BF 形成抑制効果が得られると考えられた。

## 第 2 章 MRSA 形成 BF に対するスルファジアジン銀 (SSD) の効果

銀の抗菌効果は紀元前から知られ、外用剤として創傷管理や抗菌物質として長年使用されてきている。銀は、組織傷害性は低く、耐性菌を生じにくく、広い抗菌スペクトルを有している。銀化合物の中でも、サルファ剤の一種であるスルファジアジン (SD) と銀の結合体である SSD は、MRSA 形成 BF に有効であるとの報告はあるが、その BF に対する作用様式は不明である。本章では、SSD による MRSA 形成の BF に対する殺菌効果とその様式を明らかにするため、硝酸銀 (AgNO<sub>3</sub>) や SD の効果と比較検討した。

SSD、SD、AgNO<sub>3</sub> の中で、SSD のみが BF に対し殺菌効果を示した。しかし、SD には殺菌効果は全くなかった。その殺菌効果は銀イオンが重要であると考えた。しかし、SSD の培養液内イオン化銀量は AgNO<sub>3</sub> より少なかった。SD の BF に対する付着性をプラスチック基質とで比較検討したところ、SD は BF に選択的に結合した。しかし、SD と AgNO<sub>3</sub> を同時添加しても殺菌効果の増幅はなかった。次に、SSD の効果は BF への直接接触が重要であると考え、SSD が通過できない半透膜チャンバー内に密閉したところ、BF に対する殺菌効果は減弱した。銀と SD 結合体である SSD は銀を BF まで運搬し、BF に付着後に銀イオンが放出され、BF 内の菌を殺菌すると考えた。以上の結果から、SSD は BF が形成された感染創に対し、BF 選択的殺菌効果を発揮できる有効な薬剤と結論した。

## 総括

BF 形成は医療上に多くの問題を引き起こすものの、それを解決する有効な手段は少ない。本研究は、BF 感染症を総合的にとらえ、BF 形成を阻止する方法と BF 形成後の破壊・殺菌法についての両面から検討を行った。特に、用いた物質、薬剤は医療の中で長年用いられてきたものを採用し、医療現場で最も頻繁に遭遇する MRSA による BF 形成に対する効果を検討した。BF 形成抑制物質として、界面活性剤である PS80 を見出した。本研究により、BF 形成が危惧される皮膚組織やプラスチック、シリコン基質などの医療器具を PS80 で前処理することで、菌の付着および BF 形成を阻止できる予防的対処法の可能性を示した。しかし、PS80 は形成された BF には殺菌効果は望めない。そこで次に、形

成されてしまったBFを破壊・殺菌できる薬剤としてSSDの効果を検討した。SSDは長年創部の二次感染予防剤として用いられてきているが、銀イオンが有する単純だが有効な殺菌効果に裏打ちされている。本研究により、SSDが有する銀のドラッグデリバリー様のユニークな作用様式が明らかとなった。現在、BF内分子をターゲットとし抗菌薬開発が進んでいるものの、なお有効な薬剤開発に至っていない。その医療上の背景から、SSDの使用はより現実的なBF破壊方法であると考えられる。

## 審査の結果の要旨

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）は、皮膚常在菌である黄色ブドウ球菌由来菌で、院内で検出される薬剤耐性菌として最も分離頻度が高い。中心静脈カテーテルや人工関節など生体内留置の医療用器具上に MRSA など菌が付着・増殖すると、バイオフィーム（BF）が形成される。形成された BF は、薬剤に対する抵抗能亢進、免疫細胞浸潤に対しての阻止能を有する。それ故、BF 除去は困難で、感染巣は難治化するため、BF 感染症は深刻な医療上の問題となっている。しかし、医療上効果的な BF 形成阻止法および治療法は確立されていない。本論文は、BF 形成能の高い MRSA 菌株を用い、①皮膚組織を含む様々な基質上に形成された MRSA 形成 BF に対する界面活性剤の抑制効果および②MRSA 形成 BF に対する銀化合物の効果についての研究成果である。

① 菌の生活環の中で、菌の固相への付着と増殖は最も安定化した生活期で、BF はその生活環境を与えるものとなることから、“BF”とはマトリックスおよび菌が形成するコミュニティ全体を表す言葉として使用されている。感染から BF 形成までの過程を考えると、菌付着の抑制は第一義となる。しかし、生体内で使用可能な物質は少ない。そこで、注射剤などの溶解剤として用いられている界面活性剤をその候補物質として考え、その作用効果から最も可能性のあるものを検出している。

界面活性剤としては、陽イオン系の塩化ベンザルコニウム（BZC）、陰イオン系のドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、両性イオン系の 3-(3-Cholamidepropyl) dimethylammonio-1-propane-sulphonate（CHAPS）および非イオン系の PS80 の 4 種類を用いている。生体細胞としてマウス 3T3 線維芽細胞を用い細胞毒性効果を検討し、生体細胞毒性効果は最小限に抑えられ、明らかな BF 形成抑制効果を示したものとして PS80 が選出された。しかし、形成された BF に対し破壊効果はなかった。様々な菌付着基質に対する効果を検討したところ、一般に培養実験に用いられるプラスチック基質のみならず、皮膚組織やシリコン基質に対しても BF 形成抑制効果を認めたが、ステンレス基質に対しての効果はなかった。これらの結果は、PS80 は組織やシリコンまたはプラスチック上への MRSA の付着に対し抑制的に働き、結果的に BF 形成を阻止できることを示している。臨床的応用例としては、創傷部の洗浄液、生体内留置カテーテルの前処理液に PS80 を添加することにより、BF 形成抑制効果が得られると考えられた。

② 銀の抗菌効果は紀元前から知られ、外用剤として創傷管理や抗菌物質として長年使用されてきている。銀は、組織傷害性は低く、耐性菌を生じにくく、広い抗菌スペクトルを有している。銀化合物の中でも、サルファ剤の一種であるスルファジアジン（SD）と銀の結合体である SSD は、MRSA 形成 BF に有効であるとの報告はあるが、その BF に対する作用様式は不明である。ここでは、SSD による MRSA 形成の BF に対する殺菌効果とその様式を明らかにするため、硝酸銀（AgNO<sub>3</sub>）や SD の効果と比較検討している。

SSD、SD、AgNO<sub>3</sub> の中で、SSD のみが BF に対し殺菌効果を示した。しかも、SD には殺菌効果は全くなかった。その殺菌効果は EDTA 添加で減弱したことから、銀イオンが重要で

あると考えられが、SSD の培養液内イオン化銀量は  $\text{AgNO}_3$  より少なかった。SD の BF に対する付着性をプラスチック基質で比較検討したところ、SD は BF に選択的に結合した。しかし、SD と  $\text{AgNO}_3$  を同時添加しても殺菌効果の増幅はなかった。次に、SSD の効果は BF への直接接触が重要であると考え、SSD が通過できない半透膜チャンバー内に密閉したところ、BF に対する殺菌効果は減弱した。銀と SD 結合体である SSD は銀を BF まで運搬し、BF に付着後に銀イオンが放出され、BF 内の菌を殺菌すると考えられた。以上の結果から、SSD は BF が形成された感染創に対し、BF 選択的殺菌効果を発揮できる有効な薬剤と結論している。

この研究における BF に対する抗菌効果の指標に、BF 由来浮遊菌最小発育阻止濃度 (bMIC)、BF 由来浮遊菌最小殺菌濃度 (bMBC)、および最小 BF 根絶濃度 (MBEC) を用いて評価している点は特筆できる。

BF 形成は医療上に多くの問題を起こすものの、それを解決する有効な手段は少ない。本研究は、BF 感染症を総合的にとらえ、BF 形成を阻止する方法と BF 形成後の破壊・殺菌法についての両面から検討を行っている。特に、用いた物質、薬剤は医療の中で長年用いられてきたものを採用し、医療現場で最も頻繁に遭遇する MRSA による BF 形成に対する効果を検討し、BF 形成抑制物質として、界面活性剤である PS80 を見出している。本研究により、BF 形成が危惧される皮膚組織やプラスチック、シリコン基質などの医療器具を PS80 で前処理することで、菌の付着および BF 形成を阻止できる予防的対処法の可能性を示しているが、形成された BF には殺菌効果は望めない。

そこで次に、形成されてしまった BF を破壊・殺菌できる薬剤として SSD の効果を検討している。SSD は長年創部の二次感染予防剤として用いられてきているが、銀イオンが有する単純だが有効な殺菌効果に裏打ちされている。本研究により、SSD が有する銀のドラッグデリバリー様のユニークな作用様式を明らかにしている。現在、BF 内分子をターゲットとし抗菌薬開発が進んでいるものの、なお有効な薬剤開発に至っていない。このような医療上の背景から、SSD の使用はより現実的な BF 破壊方法であると考えられる。

以上の研究は、①BF 形成が危惧される皮膚組織やプラスチック、シリコン等の医療器具を前処理することで菌の付着及び BF 形成を阻止できる予防的対処法の可能性を示し、臨床応用可能な研究として評価できる。②BF 感染症の治療薬としての可能性を示した極めて重要な知見を提供するものである。また、公聴会における申請者の質疑応答は、学位を授与するに応分の能力を証明するものと結論した。