

博士学位論文

2020 年度

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

Research for clinically applicable substances that inhibit  
biofilm formed by MRSA

上田 裕

Yutaka Ueda

## 目次

序論 .....	1
<b>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</b>	
<b>1 緒言 .....</b>	<b>3</b>
<b>2 実験材料ならびに実験方法 .....</b>	<b>5</b>
2-1. 界面活性剤.....	5
2-2. 細胞培養 .....	5
2-3. 細胞生存率.....	5
2-4. 菌株.....	5
2-5. 菌の増殖 .....	6
2-6. BF 形成能.....	6
2-7. 生菌数測定.....	6
2-8. BF 形成に対する界面活性剤の作用 .....	7
2-9. 生菌数に対する界面活性剤の作用 .....	7
2-10. 菌の付着性の検討.....	7
2-11. プラスチック基質上に形成される BF に対する CHAPS と PS80 の効果.....	8
2-12. PS80 添加時期による BF 形成抑制実験.....	8
2-13. 皮膚組織への細菌付着に対する PS80 の効果.....	9
2-14. 界面活性剤による様々な基質上の BF 形成抑制実験 .....	10
2-15. 倫理的承認.....	10
2-16. 統計学的解析 .....	11
<b>3 結果 .....</b>	<b>12</b>
3-1. 界面活性剤による細胞生存率の変化.....	12
3-2. プラスチック試験管内の BF 形成に対する界面活性剤の効果 .....	13
3-3. MRSA の BF 形成能とプラスチック基質への菌付着の比較.....	15
3-4. 界面活性剤による MRSA の付着抑制効果.....	17
3-5. PS80 の添加時期による BF 形成抑制効果.....	17
3-6. 皮膚組織への菌付着に対する PS80 の抑制効果.....	18
3-7. PS80 による様々な基質に対する BF 形成抑制効果 .....	20

4 考察および小括 .....	21
-----------------	----

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

1 緒言 .....	24
------------	----

2 実験材料ならびに実験方法 .....	25
----------------------	----

2-1. 菌株.....	25
2-2. BF チップの作成.....	25
2-3. 使用化合物.....	25
2-4. BF に対する各化合物の抗菌効果.....	25
2-5. Crystal Violet (CV) 染色法を用いた BF 量の測定.....	27
2-6. BF 内の生菌数の測定.....	27
2-7. 銀化合物から解離した銀イオンの測定.....	28
2-8. 半透膜を通した銀化合物の BF に対する抗菌効果.....	28
2-9. 半透膜を通した銀化合物から解離した銀イオンの測定.....	29
2-10. キレート剤を添加した銀化合物の抗菌効果.....	29
2-11. BF に対する SD の付着能.....	29
2-12. BF に対する各化合物の効果の形態学的解析.....	30
2-13. 倫理的承認.....	30
2-14. 統計学的解析.....	30

3 結果.....	31
-----------	----

3-1. AgNO <sub>3</sub> , SSD および SD の抗菌効果.....	31
3-2. AgNO <sub>3</sub> , SSD および SD による BF 内生菌に対する効果.....	33
3-3. 培養液中の SSD から遊離する銀イオン.....	34
3-4. 半透膜チャンバー内に SSD を入れた場合の抗菌効果.....	35
3-5. SSD を半透膜チャンバー内に入れた SSD から遊離する銀イオン.....	37
3-6. 銀化合物の抗菌効果に対する EDTA の影響.....	37
3-7. BF に対する各化合物の効果.....	38
3-8. 銀化合物の BF への付着性.....	40
3-9. SD の BF への付着特異性.....	42

4 考察および小括 .....	44
-----------------	----

総括 .....	47
----------	----

謝辭 .....	48
参考文献 .....	49
发表論文 .....	55

## 序論

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*: *S. aureus*) は、ブドウ球菌の一種の通性嫌気性のグラム陽性球菌であり、健常人の皮膚表面や毛孔に存在し、特に鼻腔内に多く生息している常在菌である。しかし、基礎疾患をもつなど免疫低下した状態では、この菌が表皮から侵入すると化膿性病変や肺炎、菌血症など重篤な感染症を引き起こす。*S. aureus* は、一般的に処方される抗菌薬に対して薬剤耐性を獲得し、1960年代からメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *S. aureus*: MRSA) が報告されて以降、徐々に増加し、現在においても、施設内感染の主要な起因菌として問題となっている<sup>1,2</sup>。

MRSA はバイオフィーム (Biofilm: BF) を形成する菌として知られている。BF とは、自然界に広く存在し、細菌が菌体外に分泌するマトリックスと細菌の集合体から構成され、三次元構造をとっている (図 1)<sup>3</sup>。マトリックスには、フィブリンなど様々な生体由来分子が含まれ、主に細菌自身が産生する細胞外高分子物質 (Extracellular polymeric substances: EPS) や<sup>4,5</sup>、ポリペプチド、レクチン、脂質、および菌由来の細胞外 DNA やクオラムセンシング物質 (菌密度感知因子) であるオートインデューサーなども包含しており、他の分子と相互作用する<sup>6-8</sup>。

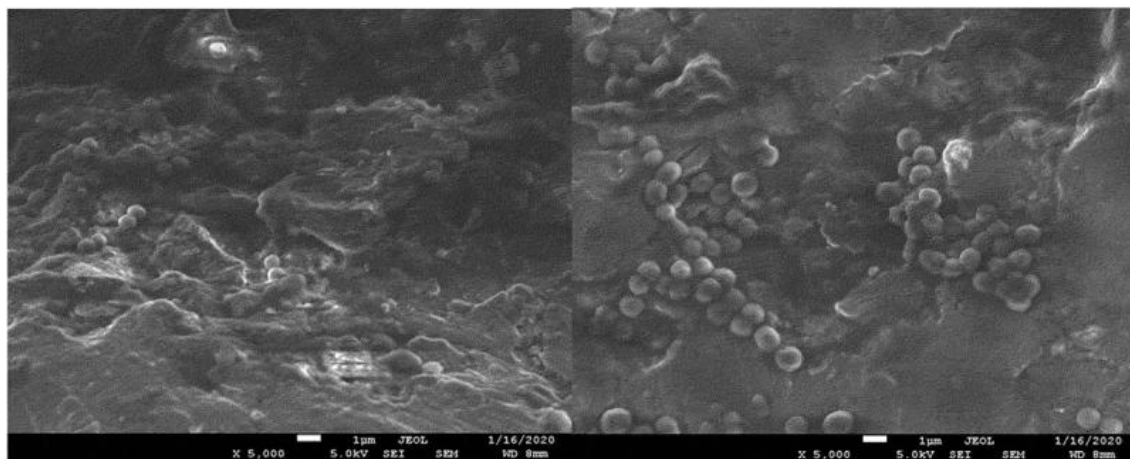


図 1. BF 走査電子顕微鏡像 (Palka, 他, 2020)<sup>3</sup>

医療現場においては、中心静脈の血管内留置カテーテルや人工心臓弁、人工関節など生体内留置の医療器具上や創部の壊死組織に MRSA などの菌が付着・増殖すると、BF が形成される<sup>9-11</sup>。MRSA によって形成された BF は、BF 関連感染の最も一般的な原因であり、デバイス関連感染の最も一般的な原因の 1 つである<sup>12</sup>。BF が形成されると、広域スペクトル

の抗生物質に対して薬剤耐性を示し、その薬剤耐性は、数十倍から数百倍に増加する<sup>13,14</sup>。これは、薬剤透過性の低下や、持続性細胞 (persister cells)といわれる休眠状態または静止状態に変化する細菌の亜集団の出現によって起こるとされる<sup>15-17</sup>。臨床研究において、慢性感染症を引き起こす要因として、最大 60%が BF の関与が確認されている<sup>18</sup>。そのため、抗菌薬は BF 内の細菌を死滅させることができず、感染が持続することとなる。近年、静止期に入った BF 内のグラム陽性菌に対し、殺菌効果が期待できるダプトマイシンが開発され、その有効性の報告<sup>19,20</sup>や、基礎研究でリネゾリドによる MRSA 形成 BF に対する抑制効果を示した報告<sup>21</sup>を散見するが、その効果はなお限定的である。

現在、BF 感染症において BF を除去する方法として、医療器具の抜去、創部のドレナージや外科的デブリドマンなど物理的な方法が有効であるが、医療器具の抜去が困難な場合も少なくない。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いまだ確立されていない。

このような背景から、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 阻害剤の探索を行った。第 1 章では、BF 形成予防物質候補として、界面活性物質を用いた検索、第 2 章では、殺菌物質として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

## 1 緒言

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。

BF の形成は一連のプロセスを取ることが知られている(図 2)<sup>22</sup>。その形成過程は、1) 細菌は液相内で浮遊しながら増殖する、2) 細菌同士が凝集し、集合体を作り、沈殿する、3) 細菌は固相面 (基質)と相互作用し付着する、4) BF 形成が開始される、5) BF は成長しながら成熟する過程をたどり、このサイクルを繰り返す。

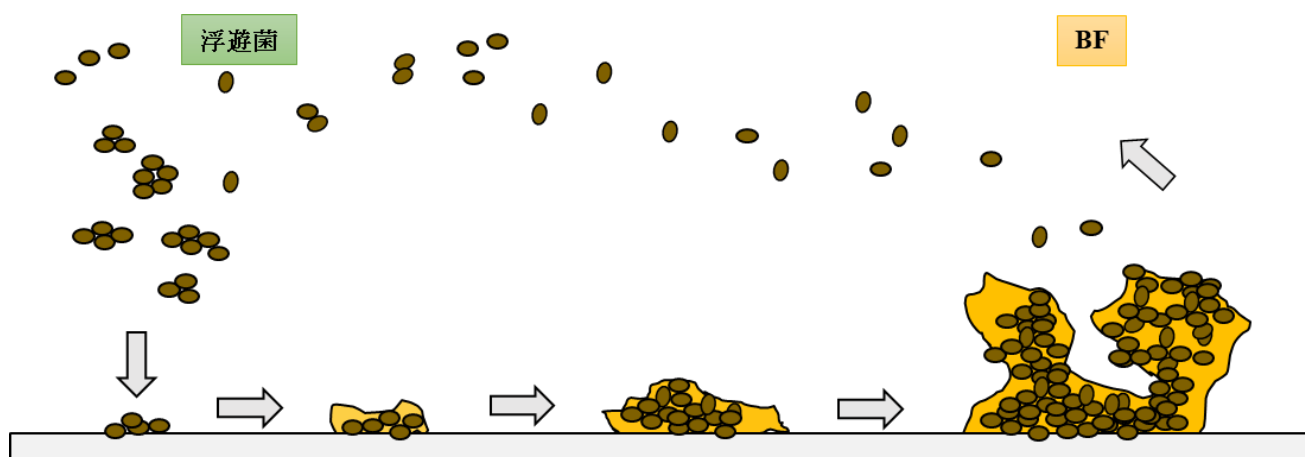


図 2. BF 形成過程

この形成過程で、細菌は基質に始めに弱く付着する、この時、細菌の細胞膜表面と、付着する基質は反発していることが多く、強固な結合は難しい。その後、基質と細菌が強固に付着する段階では、細胞表面に存在する表層分子が重要な役割を果たすことが知られている。その中で、細胞外に細菌自身が産生する EPS は、多糖類や菌体外 DNA からなる BF の主成分で<sup>5</sup>、特定の分子に特異的な結合能力は有していないが、ターゲットとなる基質表面に吸着し、細菌が結合する足場を作り、細胞表面の接着性タンパク質と共に、細胞と基質とを橋渡しする。細菌がもつ主な接着性タンパク質は、大腸菌などのグラム陰性菌に存在する三量体型オートトランスポーターアドヘシン (Trimeric autotransporter adhesion: TAA)<sup>23,24</sup>、*S.aureus* などのグラム陽性菌細胞表層に存在するセリンリッチリピートタンパク質 (Serine-rich repeat protein: SRRP)<sup>25,26</sup>、MSCRAMMs (Microbial surface components

recognizing adhesive matrix molecules)<sup>27,28</sup> と呼ばれるタンパク質などがあげられ、これらの因子は、コラーゲン、フィブロネクチンやビトロネクチン<sup>8</sup>などの生体組織内の細胞外マトリックス成分との接着に重要である。

その一方で、生体内留置物などの非生物材料への細菌の付着は、フィブリンなどの生体分子への直接的な付着の他に、基質表面の疎水性・親水性や静電気力などの直接的な分子間相互作用、または間接的な反応によって起こる<sup>6,27,28</sup>。

上述したことを踏まえ、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。そのため、菌の付着を予防する物質がその候補物質になるが、生体内で使用できる物質は多くない。その候補物質として、界面活性剤は、物質間の界面張力を低下させる化合物であり、洗浄剤、湿潤剤、形成剤、分散剤として作用する。界面活性剤の特徴は、一般的に疎水性と親水性部位を構成することから両親媒性であることが知られており<sup>29</sup>、陽イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、両性イオン界面活性剤、非イオン性界面活性剤に分類される。また、界面活性剤は、古くから化粧品・食品産業や医療分野で、洗浄剤として使用されており、中には殺菌剤として殺菌効果を有するものもある。その殺菌作用は、細菌の膜流動性の亢進による細胞膜破壊、細胞膜に存在する酵素群の不活化やタンパク変性による代謝障害などがその原因とされているが、実際はこれらの相乗的な作用と考えられている<sup>30</sup>。しかし、細菌が形成するBFに対する効果はまだ明らかにされていない。そこで著者らは、界面活性剤がBF自体を破壊、またはBF形成過程を阻害するのではないかと仮説を立てた。本章では、4種類の界面活性剤を用いてMRSAによるBF形成抑制の作用機序を探索し、最適化条件と臨床応用可能性の高い界面活性剤を見出す事を目的とした。



## 2 実験材料ならびに実験方法

### 2-1. 界面活性剤

界面活性剤は以下の4種類を用いた.

陽イオン系界面活性剤: Benzalkonium chloride (BZC: Sigma-Aldrich, 東京, 日本)

陰イオン系界面活性剤: Sodium dodecyl sulfate (SDS: Sigma-Aldrich)

両性イオン系界面活性剤: 3-(3-Cholamidepropyl) dimethylammonio-1- propane- sulphonate (CHAPS: Sigma-Aldrich)

非イオン系界面活性剤: Polysorbate 80 (PS80: Sigma-Aldrich)

4種類の界面活性剤は, Tryptic Soy Broth (TSB: 日本ベクトン・ディッキンソン株式会社, 東京, 日本)で希釈し, 最大濃度0.5%を調製後, 10倍希釈法によって0.0005%まで調製した濃度を使用した.

### 2-2. 細胞培養

マウス 3T3 胚線維芽細胞 (American Type Culture Collection ATCC: バージニア州, 米国) を10%のウシ胎児血清 (NICHIREI BIOSCIENCES INC., 東京, 日本)および1%ペニシリン-ストレプトマイシン (Thermo Fisher Scientific KK, 東京, 日本)を含むDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM: Thermo Fisher Scientific KK) で, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95%の加湿下で培養した.

### 2-3. 細胞生存率

10倍希釈法で希釈した各界面活性剤を3T3細胞 (96ウェルプレートの3×10<sup>3</sup> /well)に添加し, 37°C, 24時間培養した. 培養後, 20 μLのCellTiter 96 AQueous One Solution Reagent (Promega Co., Madison, ウィスコン州, 米国)の3-(4,5-dimethyl-2-yl)-5-(3-carboxymethoxy phenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS)を各ウェルに加え1時間培養した. 培養後, マイクロプレートリーダー (Sunrise Rainbow: Tecan Japan Co., Ltd., 神奈川, 日本)を使用し, 各ウェルの比色吸光度を490 nmで測定した. 各化合物の生存低下率 (%) は, 溶媒対照群の平均値に対して計算した. 一部の実験では, 24時間培養中に, 0, 1, 2, 8, 12 および24時間の各時間0.5% PS80を添加し, 培養後の生存率を測定した.

### 2-4. 菌株

臨床分離株であるBF形成能が高いMRSA菌株ATCC BAA-2856 (OJ-1) 株<sup>31-33</sup>と, 以前の研究で用いたBF形成能の低いMRSA菌株T109株を用いた<sup>34</sup>. 0.5% NaClを含有するTryptic Soy Agar (TSA: Becton Dickinson, Massachusetts, 米国) 40 gを超純水1 Lで溶解し, オートクレーブで滅菌後, シャーレ (栄研化学株式会社, 東京, 日本) 内で寒天培地を作製した. 解凍した保存菌株を寒天培地上に播種し, 37°C 培養室で一晩培養した. 増殖した寒天

上のコロニーを1つ採取し、12-mL ポリプロピレン製丸底遠心チューブ(プラスチック試験管: Sarstede KK, 東京, 日本) に入れた 3 mL の TSB に分散し, 37°C の恒温槽で培養した. 増殖菌液の濁度を分光光度計 (GENESYS 10S VIS: Thermo SCIENTIFIC, 東京, 日本)を用い, 吸光波長  $\lambda=578$  nm で吸光度 OD=0.57 ( $1.07 \times 10^5$  CFU/ $\mu$ L) まで菌液を増殖させたものを凍結保存した. 使用時に, 解凍し, TSA 上で増殖したコロニーを用いた. TSA から採取した1コロニーを 3 mL の TSB を入れたプラスチック製試験管に入れ, Vortex でよく分散し, 37°C 恒温水槽で培養した. 吸光度 OD=0.57 ( $\lambda=578$  nm)まで菌液を増殖させたものを“基本菌液”とした.

## 2-5. 菌の増殖

TSB 3 mL を入れたプラスチック製試験管に基本菌液 3  $\mu$ L を添加し, 37°C, 24 時間培養した. 培養後, 試験管を 3 回転倒混和し, 沈殿した菌培養液を均一にした後, 分光光度計を用いて, 波長  $\lambda=578$  nm で吸光度を測定した.

## 2-6. BF 形成能

### 2-6-1. BF の採取

1000 倍希釈した基本菌液 3 mL を入れたプラスチック製試験管で培養後, 試験管内で培養した菌液を捨て, 試験管を 10 mL の 0.8% NaCl 添加の pH7.4, 0.01 M リン酸塩緩衝液 (PBS) で 2 回洗浄した. 試験管の壁面に付着した BF に 10 mL の 99%エタノールを加え, 10 分間脱水固定した. 固定後, アルコールを廃棄し, 壁面の BF を 1 時間乾燥させた.

### 2-6-2. Crystal Violet (CV)染色法を用いた BF 形成量の測定

BF 形成量の測定は, 既報に従った<sup>35</sup>. 乾燥させた BF に, 1 mL の 0.41% Crystal Violet (CV) (Sigma Aldrich)染色液を入れ, BF 全体に馴染ませた後, 10 分間, 室温で染色した. 染色液を捨てた後, 水道水で染色液を 3 回粗洗いした後, 15 分間流水で余分な色素を除いた. 洗浄後, 染色された BF に 2 mL の 30% 酢酸を加え, 溶出された色素の吸光度 ( $\lambda=590$  nm) を測定し, BF 形成量とした.

## 2-7. 生菌数測定

1000 倍希釈基本菌液 3 mL の入ったプラスチック製試験管を準備し, 37°C, 24 時間培養した. 培養後, 培養液を捨て, 試験壁面に形成された BF に 3 mL の PBS を入れた試験管を, 超音波発生装置 (Sonifier 250, Branson, US) のプローブを差込み, 超音波負荷 (Duty cycle 50%, output 1, 10 sec)により, BF 内の菌を採取した. この菌液を 10 倍希釈法で希釈系列を作り, 寒天培地上に 50  $\mu$ L 播種し, 一晚培養した. 形成されたコロニー数をカウントし, BF 内の colony forming unit (CFU)を算出した. 試験管内総菌数は, 培養後, 超音波負荷し, 浮遊菌と BF 内の菌を均一化し, CFU を算出した.

また、界面活性剤の細菌に対する毒性実験では、高密度定常状態 (confluent)まで増殖した細菌培養液に各界面活性剤を添加し、その細菌培養液の 50  $\mu$ L を TSA に播種し、37°C、24 時間培養した。培養後、コロニーが生えていれば細胞毒性(-)、コロニーがなければ細胞毒性(+)と判定した。

## 2-8. BF 形成に対する界面活性剤の作用

10 倍希釈法で希釈した各界面活性剤入り培養液 3 mL に ATCC BAA-2856 株の基本菌液を 3  $\mu$ L 添加したものをプラスチック製試験管に入れ、37°C、24 時間培養した。培養後、試験管内に形成された BF を CV 染色後、BF 形成量を測定した。

## 2-9. 生菌数に対する界面活性剤の作用

10 倍希釈法で希釈した各界面活性剤入り ATCC BAA-2856 株の 1000 倍希釈基本菌液 3 mL の入ったプラスチック製試験管を準備し、37°C、24 時間培養後、試験管壁面に形成された BF 内の CFU を算出した。試験管内総生菌数は、浮遊菌と BF 内の菌の CFU を算出した。

## 2-10. 菌の付着性の検討

ATCC BAA-2856 株と T109 株を用いて、1000 倍希釈基本菌液 10 mL の入ったプラスチック製試験管をそれぞれ準備し、37°C、24 時間培養した。培養後、高密度定常状態 (confluent)にしたチューブから、遠心分離機 (1920 g, 10 min, 4 °C)で培養液を除き、同量の新鮮培養液を加えた。その菌液の菌分散を図るために、超音波発生装置 (Sonifier 250, Branson, US) のプローブを差込み、超音波負荷 (Duty cycle 50%, output 1, 3 min)した。そこに BF 基質として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 Overhead projector (OHP) シート (スリーエムジャパン株式会社, 東京, 日本)を 1×8 cm の短冊上にして挿入し、37°C または氷上 (0°C)で 1 時間培養した (図 3)。培養後、OHP シートを取り出し、0.5%ホルマリン (pH7.4)で固定した。PBS で 3 回洗浄後、OHP シートをスライドガラスに貼り付け、200 倍希釈した FITC 標識 *S.aureus* 抗体 (ViroStat, Portland, ME)と反応させた後、PBS で 3 回洗浄後、カバーガラスで封入した。FITC に標識された菌を 20 倍対物レンズ装着の蛍光顕微鏡(Bio-zero, Keyence, 大阪, 日本)で撮影した。付着菌数の測定は、画像計測ソフト (VH-Analyzer: Keyence)を用い、2 値化した後、1 画像面積当たり付着菌数として表した。

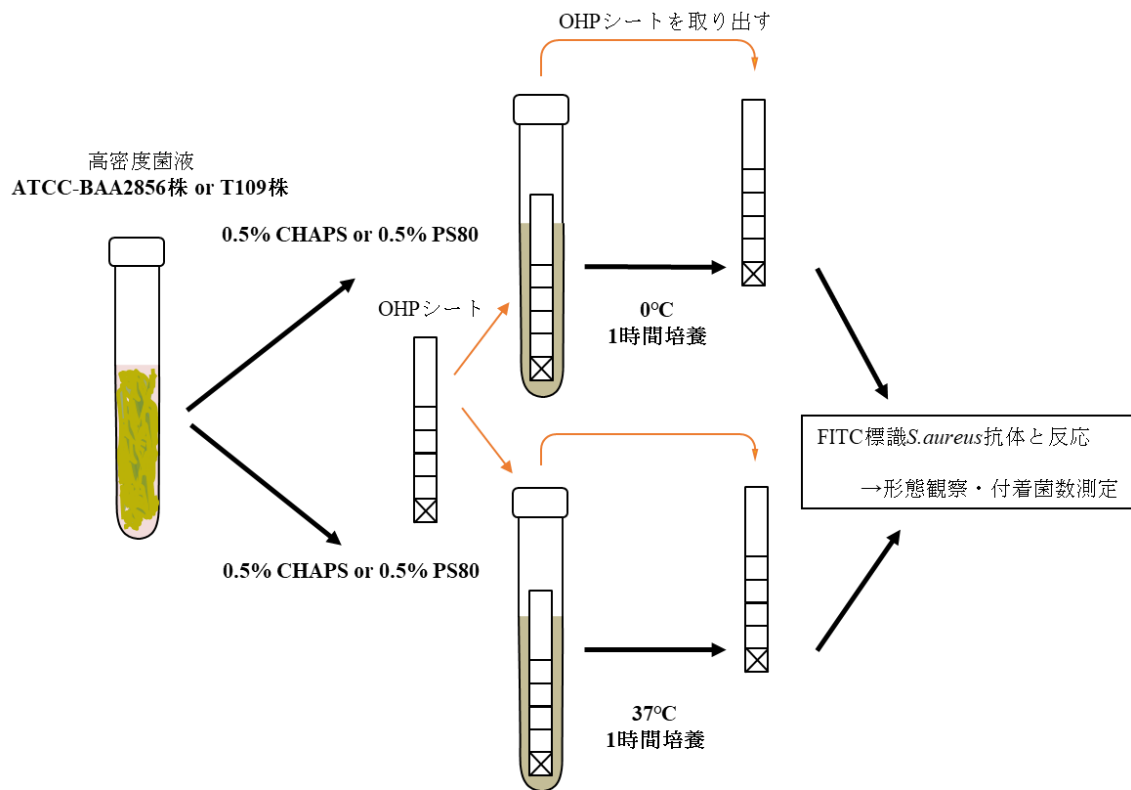


図 3. 菌の付着性実験操作

### 2-11. プラスチック基質上に形成される BF に対する CHAPS と PS80 の効果

ATCC BAA-2856 株または T109 株を一晩培養して、増殖が高密度定常状態 (confluent) に達した菌液 10 mL から、遠心法 (1920 g, 10 min, 4°C) で培養液を除き、同量の新鮮培養液を加えた。その菌液の菌分散を図るために、超音波発生装置のプローブを差込み、超音波負荷 (Duty cycle 50%, output 1, 3 min) した。BF 形成抑制効果が認められた濃度 (0.5%) の CHAPS または PS80 を添加/非添加したものに OHP シートを入れ、37°C または氷上 (0°C) で 1 時間培養した。培養後、OHP シートを取り出し、0.5%ホルマリン (pH7.4) で固定した。PBS で 3 回洗浄後、OHP シートをスライドガラスに貼り付け、200 倍希釈した FITC 標識 *S. aureus* 抗体と反応させた後、PBS で 3 回洗浄後、カバーガラスで封入した。付着菌数の測定は、画像計測ソフトを用い、2 値化した後、1 画像面積当たり付着菌数として表した。

### 2-12. PS80 添加時期による BF 形成抑制実験

1000 倍希釈基本菌液の培養開始から、0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 時間後に BF 形成抑制効果が認められた濃度 (0.5%) の PS80 を添加し、全体で 24 時間の培養を行った (図 4)。培養後に、それぞれの BF 形成量を CV 染色法で測定した。

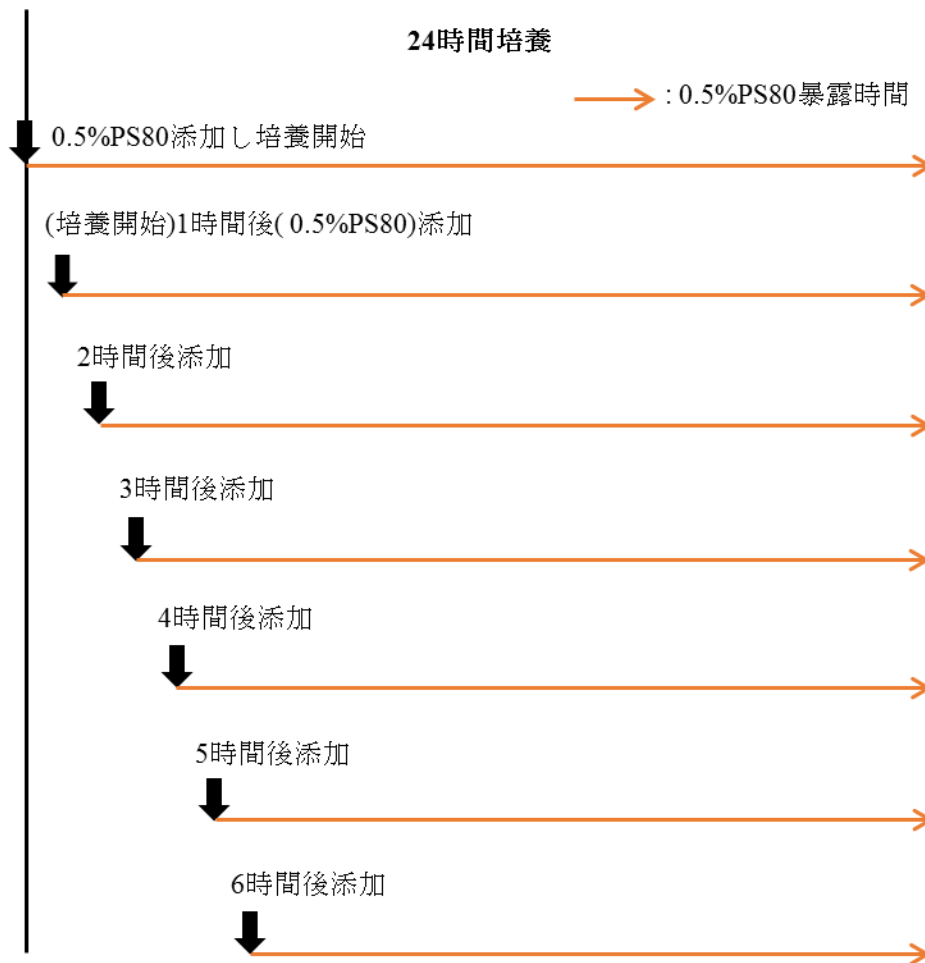


図 4. 0.5%PS80 添加時期

### 2-13. 皮膚組織への細菌付着に対する PS80 の効果

マウスの皮膚組織の採取法は, Jimi ら<sup>33</sup> の方法に従って作成した. C57BL/6N マウス (メス 11 週令) (日本 SLC 株式会社, 静岡) を用い, ソムノペンチル (共立製薬, 東京, 日本) による麻酔下で, 市販の除毛剤を用いて脱毛を行った. 頸椎脱臼により安楽死させ, 余分な脂肪と筋肉をピンセットで除去した後, 皮膚の内面を厚紙上に広げて接着し, 99%エタノール中で 24 時間固定し, 完全な皮膚組織を得た. 固定した皮膚をクリーンベンチ上で乾燥させ, 厚紙上の皮膚シートを 1×1cm の大きさに切断し, エチレンオキサイドガスを用いて滅菌した. これらの断片は, “ダーマルチップ”と名付け, 4°C で保管し, 3 ヶ月以内に使用した (図 5)<sup>33</sup>. ダーマルチップは, 皮膚構造が良好に保たれていた. 対照基質として, 1×1 cm の OHP シート (プラスチックチップ)を用いた.

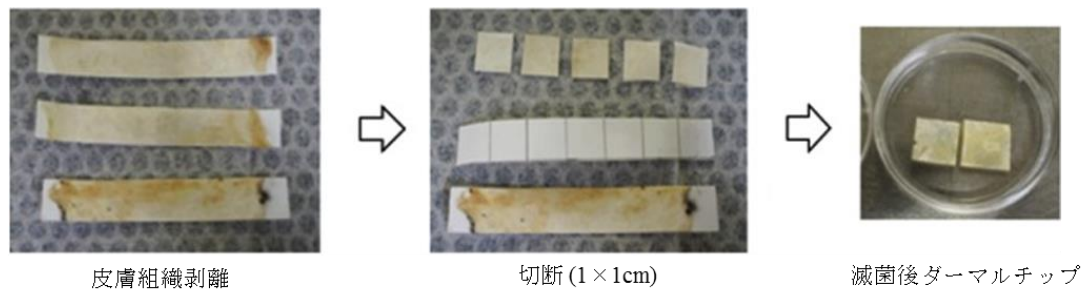


図 5. ダーマルチップ Jimi (2017)<sup>33</sup> 提示の図 (一部改変)

ATCC BAA-2856 株を一晩培養した高密度定常状態 (confluent)の細菌培養液を用いた。0.5%PS80 を添加/非添加した細菌培養液にダーマルチップおよびプラスチックチップを入れて、37 °C、1 時間培養した。培養後、ダーマルチップおよびプラスチックチップに付着した細菌を PBS で 3 回洗浄し、超音波発生装置 (Sonifier 250, Branson, US) のプローブを差込み、超音波負荷 (Duty cycle 50%, output 1, 3 min)し、得られた細菌懸濁液を CFU 解析した。

また、ダーマルチップを 5%ホルマリン (pH7.4)で固定し、パラフィンブロックに埋め込んだ。ブロックを 4 μm の薄切片に切断し、組織学的染色であるヘマトキシリン・エオシン (HE)染色、グラム (GM)染色および酸性ムコポリサッカロイド染色であるアルシアンブルー (Alb)染色 (pH2.5)を行った。20 倍対物レンズ装着の光学顕微鏡(Bio-zero)で形態観察を行った。

#### 2-14. 界面活性剤による様々な基質上の BF 形成抑制実験

生体内留置の医療器具素材であるシリコンとステンレスを用い、界面活性剤による基質上での BF 形成抑制効果を検討した。プラスチック試験管、シリコンコートしたガラス試験管 (AGC テクノガラス株式会社, 静岡, 日本)または、3×3 cm に切断したステンレス製シート(泰豊トレーディング株式会社, 東京, 日本)を入れたプラスチック製試験管を用い、ATCC BAA-2856 株 の 1000 倍希釈基本菌液に 0.5%PS80 を添加し、37 °C、24 時間培養後した。培養後、それぞれの基質表面に形成された BF 量を CV 染色で染色後、測定した。

#### 2-15. 倫理的承認

細菌の取り扱いを伴う全ての方法は、福岡大学実験規則の関連するガイドラインおよび規則に準拠して実施した。また、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した (承認番号 1210608)。

## 2-16. 統計学的解析

実験は全て2回以上行い、同様な結果が得られたものを用いた。2つの異なる実験群からの結果は、最初にF検定を用いた分布分析を行い、対応なしの student's t 検定または Mann-Whitney U 検定を行った。P 値が 0.05 以下のものを統計的有意とした。サンプル数およびデータは平均値±標準誤差で表示した。

### 3 結果

#### 3-1. 界面活性剤による細胞生存率の変化

3T3 繊維芽細胞に対する界面活性剤の効果を調べた。0.0005%~0.5%までの濃度の各界面活性剤を 96 ウェルプレートに添加し、24 時間培養した。BZC, SDS および CHAPS は急激な毒性を示したが、PS80 は最も軽度の毒性であった (表 1)。0.5%の PS80 は 50%の細胞生存率低下しか示さなかったため、さらに 0.5%PS80 の曝露時間の影響を調べた。細胞生存率は、最初の 8 時間培養で約 50%まで低下したが、その後は悪化せず、24 時間の培養まで変化しなかった (図 6)。

表 1. 3T3 繊維芽細胞に対する界面活性剤の効果 (n=16)

群	界面活性剤濃度(%)	3T3繊維芽細胞	
		MTS吸光度	生存減少率(%)
control	0	0.26 ± 0.01	0
BZC	0.0005	0.21 ± 0.01	19.2
	0.005	0	100
	0.05	0.03 ± 0.00	88.4
	0.5	0.02 ± 0.01	92.3
SDS	0.0005	0.29 ± 0.01	0
	0.005	0	100
	0.05	0.01 ± 0.01	96.2
	0.5	0.01 ± 0.00	96.2
CHAPS	0.0005	0.25 ± 0.01	3.8
	0.005	0.24 ± 0.01	7.7
	0.05	0.28 ± 0.01	0
	0.5	0	100
PS80	0.0005	0.25 ± 0.01	3.8
	0.005	0.25 ± 0.01	3.8
	0.05	0.25 ± 0.01	3.8
	0.5	0.13 ± 0.01	50.0



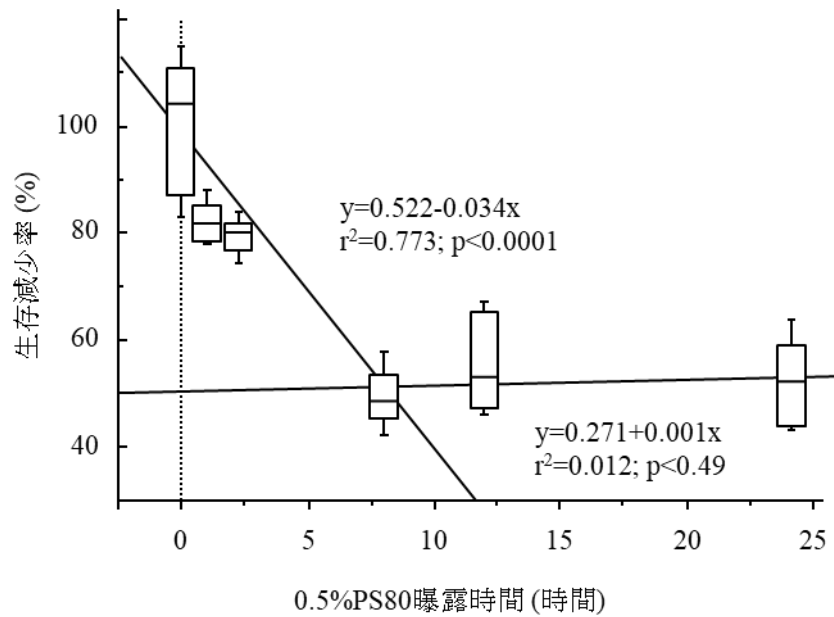


図 6. 0.5%PS80 による 3T3 細胞の生存率に及ぼす曝露時間の影響 ( $n=16$ )

### 3-2. プラスチック試験管内の BF 形成に対する界面活性剤の効果

ATCC BAA-2856 株の BF 形成中に, 0.0005%~0.5%の濃度の各界面活性剤をプラスチック試験管内に添加し, 37°C, 24 時間培養した. 培養後, 試験管内の BF を CV 染色し, 吸光度を測定し BF 形成量を算出した. また, 培養後, 試験管内の総生菌数および壁面に形成された BF 内の生菌数を CFU アッセイで検討した. BZC と SDS は, それぞれ 0.0005%と 0.05%を超える濃度で, BF 形成量の減少と総生菌数の低下を示した (図 7). CHAPS と PS80 では, BF 形成量の有意な減少が認められたが, 総生菌数の低下はなかった. しかし, BF および BF 中の生菌数の両方の有意な減少は, 0.5%PS80 でのみ認められた.

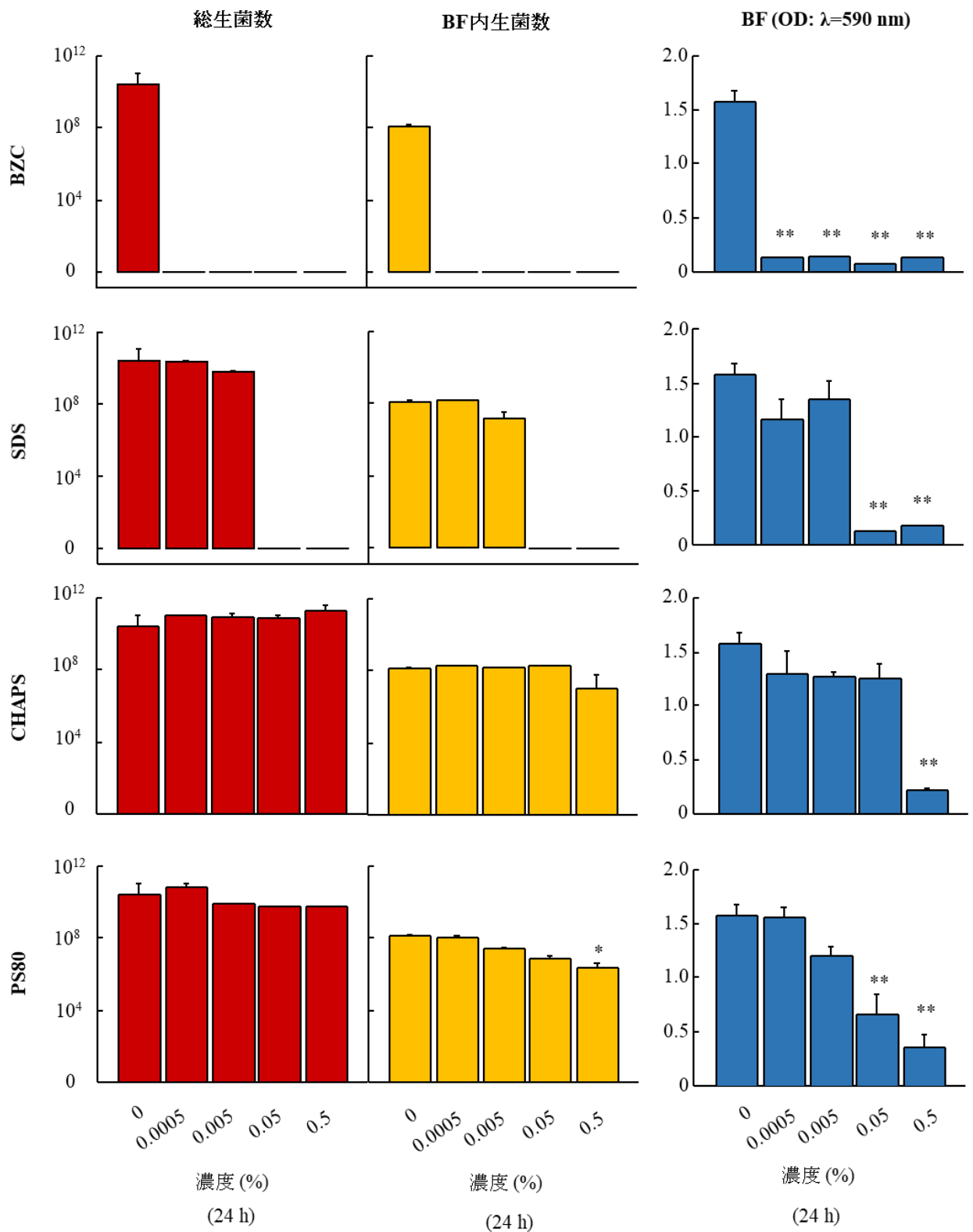


図 7. BF 形成量および生菌数に対する各界面活性剤の影響 ( $n = 3$ )

\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  vs vehicle control

### 3-3. MRSA の BF 形成能とプラスチック基質への菌付着の比較

#### 3-3-1. MRSA 菌株の生物学的特長

細菌の基質への付着と BF 形成能との関係を調べるために、T109 株と ATCC BAA-2856 株を比較した。T109 株と ATCC BAA-2856 株をそれぞれ入れた 1000 倍希釈基本菌液を、37°C で培養し、24 時間までの増殖度を濁度 (吸光度) で検討し、時間経過に伴う BF 形成を CV 染色し検討した (図 8)。T109 株は培養 24 時間目まで徐々に増殖し、ATCC BAA-2856 株は、培養 7 時間目でプラトーに達したが、増殖に差は見られなかった。一方で BF 形成量は有意に異なっており、24 時間で約 8 倍の差があった。その結果、本菌はそれぞれ低 BF 形成性 MRSA と高 BF 形成性 MRSA であることが明らかとなった。

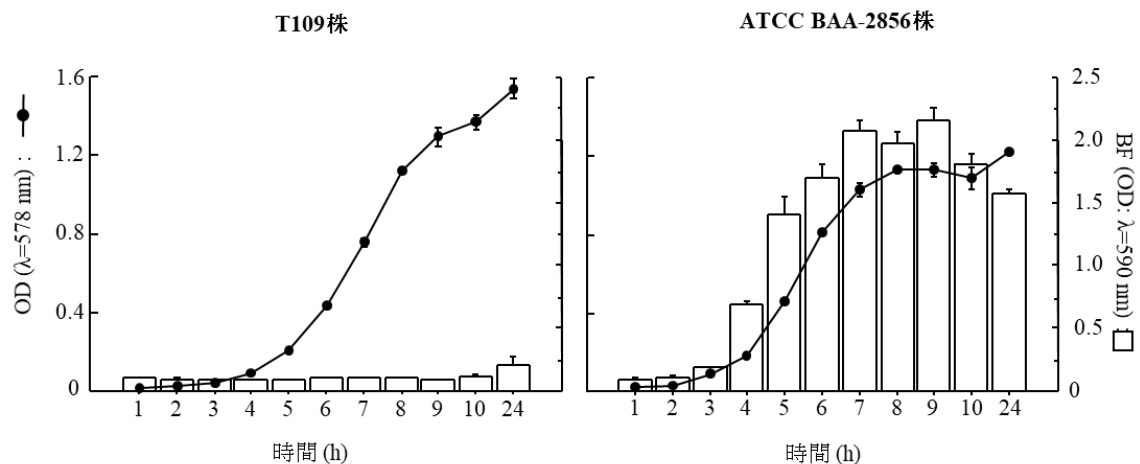


図 8. MRSA 菌株の増殖と BF 形成の経時変化 (n = 3)

#### 3-3-2. プラスチック基質への菌付着比較

低 BF 形成性 MRSA の T109 株と高 BF 形成性 MRSA の ATCC BAA-2856 株のプラスチック基質への付着能力を検討するために、氷上 (0°C) または 37°C で高密度定常状態 (confluent) に達した菌液にプラスチックチップ (1×1cm の OHP シート) を 1 時間浸漬し、表面に付着した菌を FITC 標識 *S. aureus* 抗体を用いて可視化し、形態観察した (図 9)。また付着した細菌数は方法 (実験の部. 2-10) に明記した菌数測定法を用いて計数した (図 10)。0°C では、ATCC BAA-2856 株は T109 株よりも約 7 倍有意に多く ( $p < 0.01$ )、37°C でも約 3 倍有意に多く ( $p < 0.01$ )、両温度において高 BF 形成能の ATCC BAA-2856 株の方がより多く付着した。付着した菌数は、両細菌において、付着菌数は温度の上昇とともに増加した。

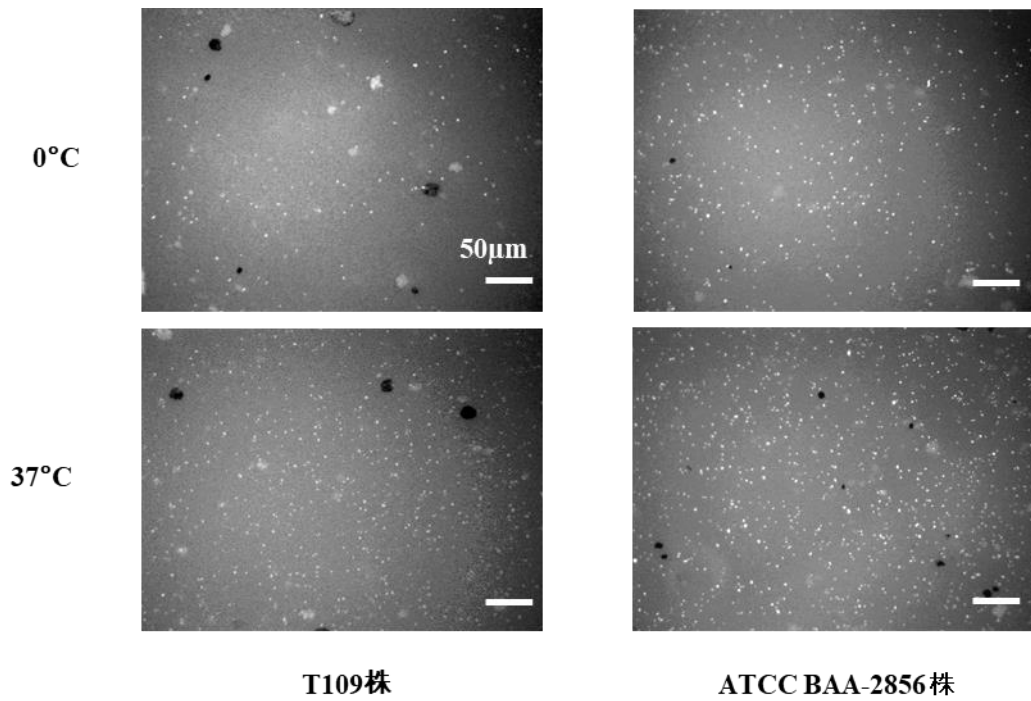


図 9. プラスチックチップ上の細菌付着の形態像

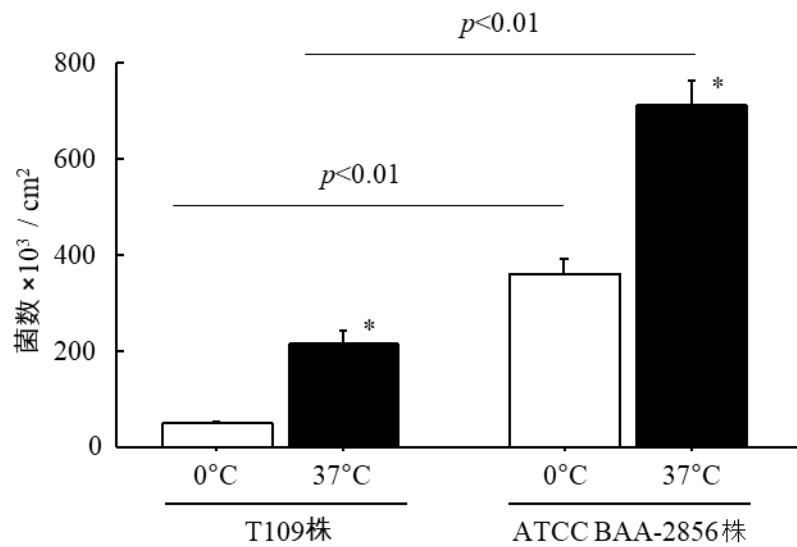


図 10. プラスチック基質への菌付着比較 ( $n = 9$ )

\*:  $p < 0.01$  vs 0°C

### 3-4. 界面活性剤による MRSA の付着抑制効果

殺菌効果はなく、抗 BF 効果を示した CHAPS および PS80 のプラスチック基質への細菌付着の効果について検討した。T109 株および ATCC BAA-2856 株の高密度定常状態 (confluent) に達した菌液に 0.5%CHAPS または 0.5%PS80 を添加し、プラスチックチップ (1×1cm の OHP シート) を氷上 (0°C) または 37°C で 1 時間浸漬し、表面に付着した菌を FITC 標識 *S. aureus* 抗体を用いて可視化し、付着した細菌数を方法 (実験の部. 2-11) に明記した菌数測定法を用いて計数した。これらの結果を表 2 に示した。両イオン性界面活性剤である CHAPS は基質への MRSA の付着抑制に有効であったが、PS80 は MRSA の種類および温度に関係なくより効果的に菌付着を抑制した。

表 2. プラスチック基質への低 BF および高 BF 形成能 MRSA の付着に及ぼす CHAPS および PS80 の影響 ( $n \geq 8$ )

菌株	温度	菌数 $\times 10^3 / \text{cm}^2$ プラスチックチップ				
		control	0.5%CHAPS	減少率 (%)	0.5%PS80	減少率 (%)
T109株	0°C	49.0 $\pm$ 5.4	30.7 $\pm$ 10.8	37	15.7 $\pm$ 4.1**	68
	37°C	215.8 $\pm$ 24.5	114.2 $\pm$ 17.1*	47	21.6 $\pm$ 3.5**	90
ATCC BAA-2856株	0°C	360.1 $\pm$ 31.2	223.6 $\pm$ 50.3*	38	15.2 $\pm$ 3.8**	96
	37°C	710.6 $\pm$ 51.2	142.8 $\pm$ 7.3**	80	23.4 $\pm$ 6.1**	97

\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  vs control

### 3-5. PS80 の添加時期による BF 形成抑制効果

ATCC BAA-2856 株の 1000 倍希釈基本菌液に 0.5%PS80 を培養開始後の 0, 1, 2, 3, 4, 5, および 6 時間に添加し、全体で 24 時間の培養を行い、試験管壁面に形成された BF 形成量を CV 染色で測定し、BF 形成に及ぼす影響を検討した。培養開始直後から 4 時間目までにおいて PS80 を添加したもので強い BF 形成抑制効果は見られたが、BF 形成が起こる 6 時間目までに添加した場合、その抑制効果は時間依存的に減弱した (図 11)。一方、BF が完成される直前のもの(6 時間後)に PS80 を添加しても BF 量の減少は認めなかった。

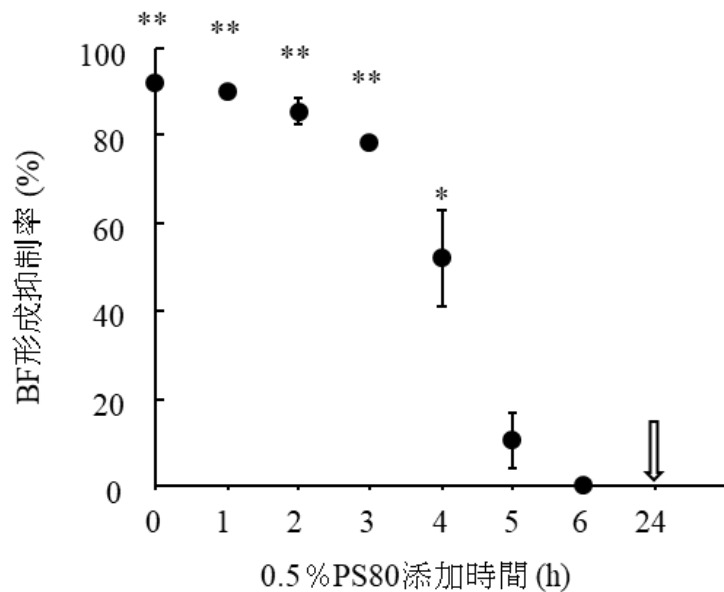


図 11. PS80 添加時期による BF 形成過程への影響 ( $n = 3$ )

\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  vs control

### 3-6. 皮膚組織への菌付着に対する PS80 の抑制効果

マウスの皮膚組織から作成したダーマルチップ ( $1 \times 1$  cm) とプラスチックチップ ( $1 \times 1$  cm) を基質として, ATCC BAA-2856 株の高密度定常状態 (confluent) に達した菌液に 0.5% PS80 を添加/非添加し, ダーマルチップまたはプラスチックチップを 1 時間浸漬し, チップに付着した細菌を CFU 分析で評価した. 0.5% PS80 の有無にかかわらずコンフルエントな細菌溶液に浸漬し,  $37^\circ\text{C}$  で 1 時間培養した後, チップに付着した細菌を CFU 分析で評価した. 0.5% PS80 の MRSA 付着抑制効果を CFU 分析と HE, Gram および ALB 染色を行い, 形態観察を行った.

CFU 分析では, プラスチックチップに比べてダーマルチップには 10 倍以上の細菌が付着しており, PS80 はダーマルおよびプラスチックチップへの付着をそれぞれ 46% および 91% 減少させ, 効果的に抑制した (図 12). ダーマルチップを形態観察したところ, MRSA に曝露されていないダーマルチップは, グラム陽性菌は認められなかった. MRSA 曝露後, グラム陽性菌は表面に付着して微細な球状構造を示し (図 13: 赤矢印), 表皮上の菌の周囲にも ALB 染色された EPS が認められた (図 13: 赤矢印). 0.5% PS80 を添加することで, ダーマルチップ上の付着菌や ALB 染色されたスポットの数が減少したことが明らかになった.

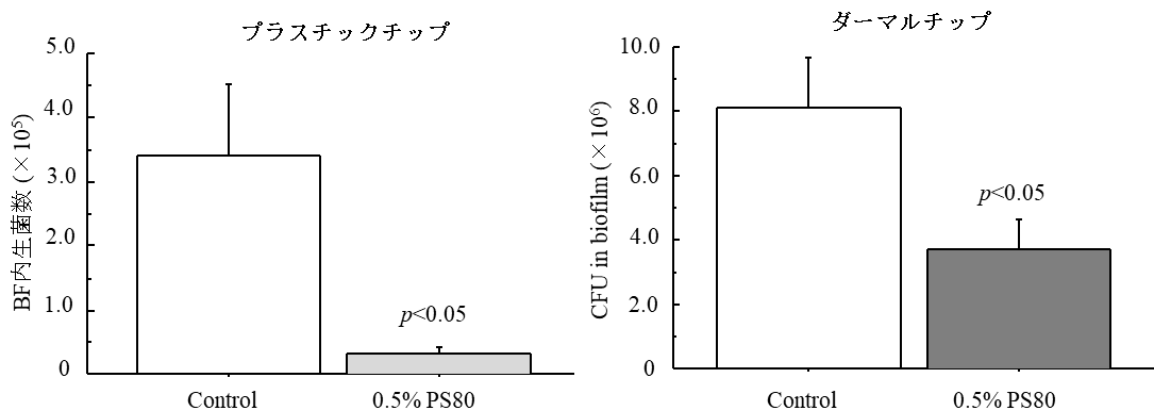


図 12. 0.5%PS80 によるプラスチックおよび皮膚組織への細菌付着抑制効果 ( $n = 5$ )

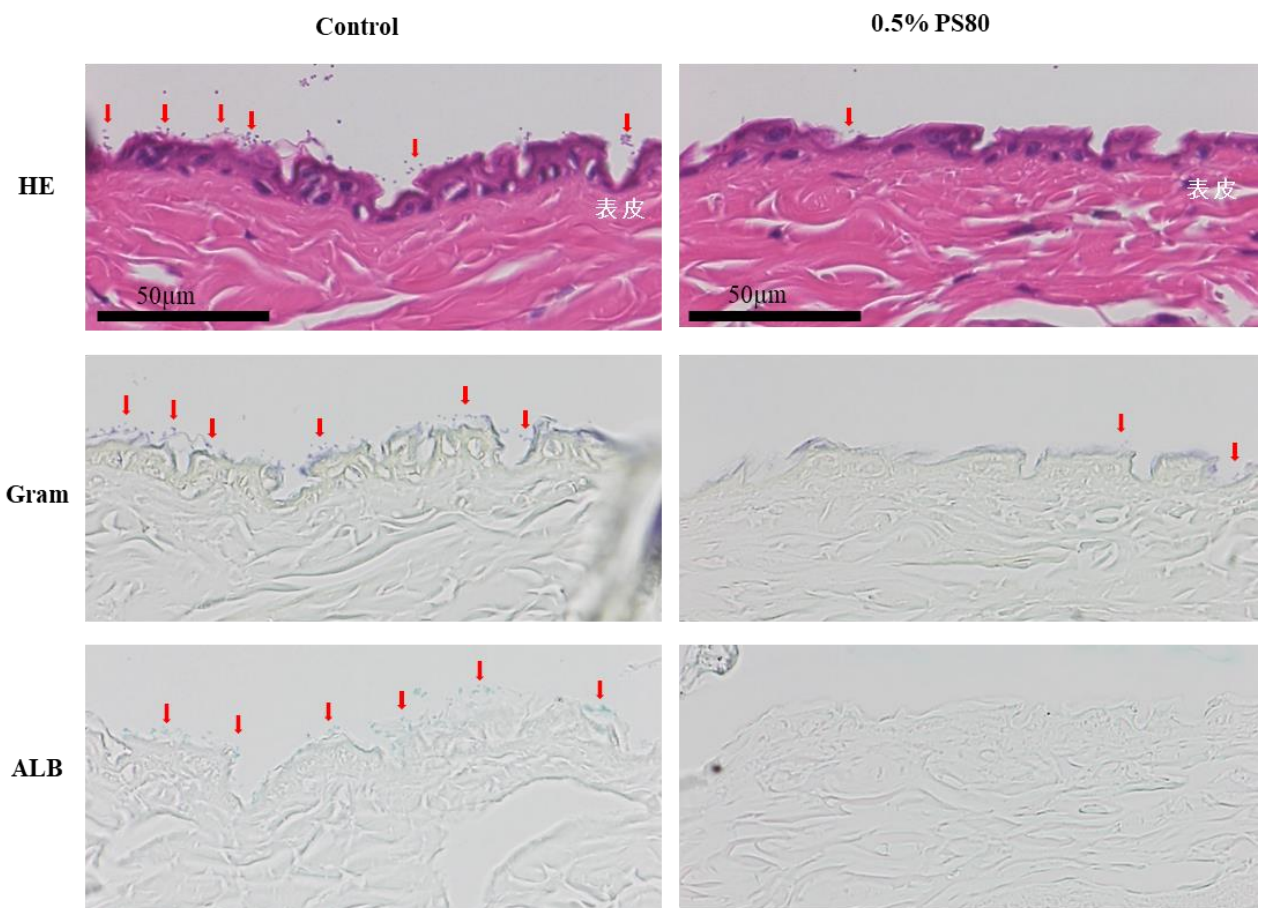


図 13. HE, Gram, ALB 染色後の BF 形態像 (ダーマルチップ)

### 3-7. PS80 による様々な基質に対する BF 形成抑制効果

生体内留置の医療器具の素材として、シリコンやステンレスがある。そこで、これら基質に対する界面活性剤の BF 形成に対する効果を検討するため、プラスチック試験管、シリコンコーティングされた試験管とステンレス板を用いた。ATCC BAA-2856 株の 1000 倍希釈基本菌液シリコンコーティングされた試験管に入れ、PS80 を添加/非添加し、37°C、24 時間培養した。また、ATCC BAA-2856 株の 1000 倍希釈基本菌液の入った試験管に、3×3cm に切断したステンレス板を浸漬し、PS80 を添加/非添加し、37°C、24 時間培養した。培養後、基質表面に形成された BF を CV 染色で測定した (図 14)。プラスチック基質、シリコン基質では PS80 が BF 形成を有意に抑制したのに対し、ステンレス基質では BF 形成が促進された。

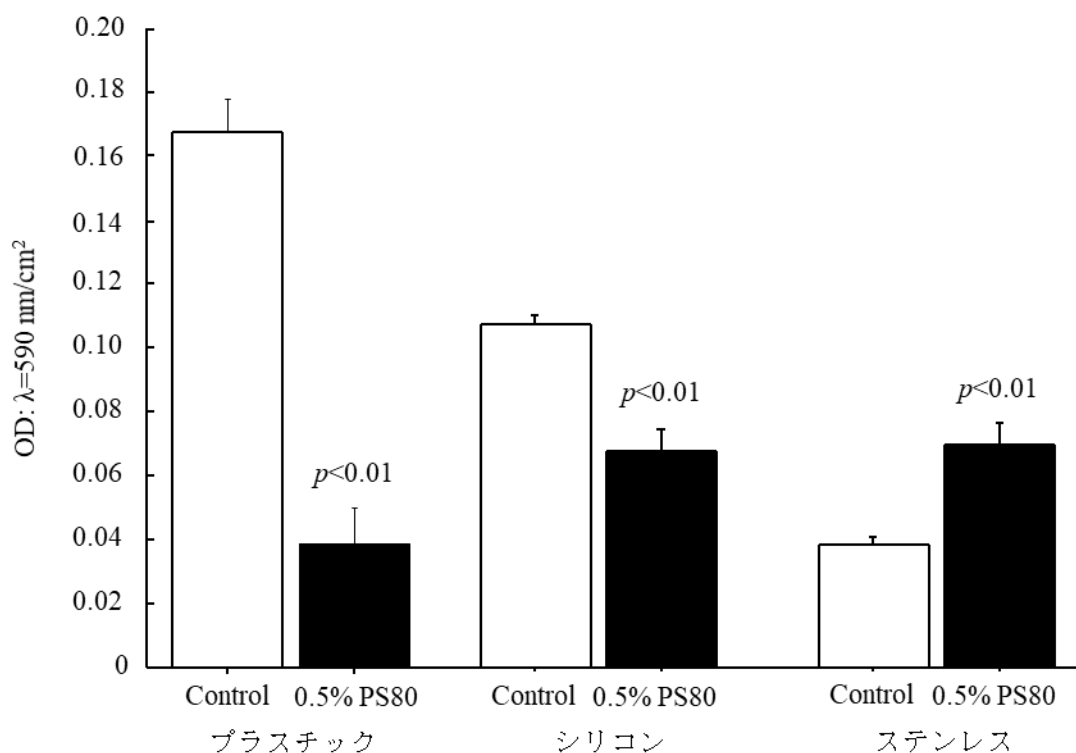


図 14. 0.5%PS80 によるプラスチック、シリコンおよびステンレス上での BF 形成抑制効果 ( $n = 10$ )



#### 4 考察および小括

これまで, MRSA の BF 形成に対する界面活性剤の効果を検討した研究はなかった. 第 1 章では, 生理的に安全な条件下で, BF 形成抑制や殺菌などの抗 BF 効果を有する界面活性剤を探索することを目的とした. そこで, 著者らは, 広範囲の濃度 (0.0005~0.5%) で 4 種類の界面活性剤を用いて, MRSA の BF 量および BF 内生菌数および 3T3 線維芽細胞の生存率解析を行った. プラスチック基質での BF 形成阻害は, 殺菌または殺菌を伴わない基質への付着の阻害から生じた (結果の要約を表 3 に示す). 殺菌は BZC および SDS で認められ, 基質への付着阻害は, CHAPS および PS80 で認められた. 3T3 細胞に対する細胞毒性効果は, BZC, SDS および CHAPS で認められたが, PS80 では認められなかった. この PS80 の BF 形成阻害効果は, プラスチック基材のみならず, 皮膚組織およびシリコン基質においても認められた. 一方で, ステンレス基材においては, BF 形成阻害効果は認められなかった. 以上の結果は, PS80 は臨床において BF 形成を抑制するための界面活性剤として使用できる可能性が示す.

表 3. 界面活性剤の効果のまとめ (プラスチック)

界面活性剤	濃度 (%)	MRSA (ATCC BAA-2856)			3T3 cell
		BF形成抑制	増殖抑制	毒性	毒性
BZC	0.0005	+	+	-	±
	0.005	+	+	-	+
	0.05	+	+	-	+
	0.5	+	+	+	+
SDS	0.0005	-	-	-	-
	0.005	-	-	-	+
	0.05	+	+	-	+
	0.5	+	+	-	+
CHAPS	0.0005	-	-	-	-
	0.005	-	-	-	-
	0.05	-	-	-	-
	0.5	+	-	-	+
PS80	0.0005	-	-	-	-
	0.005	-	-	-	-
	0.05	+	-	-	-
	0.5	+	-	-	±

基質への細菌の付着は、BF形成前の重要な初期段階である。生物学的基質への細菌の付着のメカニズムは、疎水性、親水性、または基質との電荷などによって非特異的な付着によって制御されると考えられている<sup>6,27</sup>。EPS、テイコ酸、および細菌の細胞外マトリックス成分/足場として知られている細胞外DNAは、接着と凝集を促進し、細菌同士の結合のための接着剤として機能する<sup>6</sup>。プラスチック基質には、MSCRAMMファミリーの共有結合型表面タンパク質であるBap (Biofilm associated protein)とSasC (*S. aureus* surface protein C)<sup>36,37</sup>。また、フィブロネクチン結合蛋白質やテイコ酸によって、組織構成物質にも付着している<sup>8</sup>。本研究では、173種の臨床分離株の中から、BF形成能の観点から、BF形成能が最も高い菌(ATCC BAA-2856株)と最も低い菌(T109株)を選択した。次に、生物学的作用のない氷中での付着能を調べた。その結果、ATCC BAA-2856株は、T109株に比べてプラスチック基材への付着能が高く、BF形成に関与する成分が細菌とプラスチックの付着に関与している可能性が示唆された。

BFの発達のメカニズムは、初期段階として、基質への細胞接着<sup>38,39</sup>、進行段階としての基質上での増殖とマトリックスの生成という特徴的なステップがある。初期段階を探るために、ATCC BAA-2856株とT109株を用いて、氷上または37°Cで、CHAPSまたはPS80の存在/非存在下で培養した。界面活性剤の非存在下では、ATCC BAA-2856株はT109株よりも強い細胞接着活性を示し(37°Cで約3倍、氷上で約7倍)、氷上では、37°C時よりも約半分に減少し、ATCC BAA-2856株の方がT109株よりも接着を大きく減少させた(約1/5)。ATCC BAA-2856株およびT109株におけるこのような細胞接着は、氷上および37°Cにおいて、PS80により、また37°CでのCHAPSにより強く抑制された。この結果は、氷中での生物学的活性が抑制された条件下においても、BF形成菌がプラスチック基質への強力な付着活性を有していることを明確に示している。このことから、PS80は、物理的な作用を介して細菌の基質への付着を抑制することが可能であると考えられる。この現象は、界面活性剤が、主に親油性の細胞膜や基質そのもの、あるいはその両方に作用していることが考えられる。以上の結果から、PS80がBF形成阻害の最も可能性の高い物質である。

次に、BF形成過程におけるPS80の阻害効果を調べた。培養4時間以内の早期添加ではBF形成が効果的に阻害されたが、細菌播種時(0時間)の同時添加では完全に阻害された。しかし、培養5時間後ではBFは成熟期に入り(図11)、いずれの阻害効果も認められなかった。これらの結果は、またPS80が細菌の付着を含むBF形成の早期段階でのみ作用することを示している。同様の現象は、*Escherichia coli* O104:H4のBFを用いたSloupら<sup>40</sup>によって報告されている。

本研究の最終的な目的は、BF形成を防ぐため医療現場での界面活性剤の使用である。潰瘍性創傷組織ではBFが頻繁に発生する。そこで、我々は以前の研究で用いたマウス真皮であるダーマルチップ<sup>33</sup>を用いて、皮膚組織基質での検討を行った。プラスチック基質と比較して、MRSAは真皮組織表面へより多く付着し、PS80はプラスチックと同様に真皮組織への細菌付着を抑制した。BFは、留置カテーテルやステンレスやチタンなどの金属にも

形成する<sup>39</sup>。このため、BFの基質としてシリコンとステンレスを選択した。興味深いことに、PS80はシリコン基板上でのみBFの形成を防止した。一方で、ステンレスでは防止しなかった。シリコンはステンレスと異なり疎水性の材料であるため、非イオン性のPS80が表面に接着し、細菌の付着を抑制することができる。また、菌の付着能は基質の影響を受けるため、今後、基質についても検討する必要がある。

本研究で検討した4種類の界面活性剤では、殺菌効果を伴うBF形成の阻害がBZCとSDSで認められたが、これらは組織細胞に対する毒性が高いため使用できない。一方、PS80は忍容性が高く、界面活性剤、乳化剤として化粧品、食品、製薬業界で0.1%から1%以上の濃度で使用されている<sup>41</sup>。今回の研究では、PS80の有効用量は0.05%以上であったが、添加物として使用されている濃度よりもはるかに低い値であった。また、PS80は、食品医薬品局(FDA)により、一般的に安全と認められた化合物に指定されている<sup>42</sup>。

結論として、MRSAによるBF形成に対する異なる種類の界面活性剤の効果を検討し、PS80がプラスチック、シリコン、皮膚組織などの異なる基質上でのBF形成を効果的に阻害することを示した。我々の知る限りでは、この研究は、MRSAのBF形成に対するPS80の効果メカニズムを初めて示したものである。PS80は忍容性が高く、潰瘍性創傷組織や生体内留置物の洗浄液や点滴に添加してBF形成を防止する可能性が示唆された。

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

### 1 緒言

銀の抗菌効果は紀元前から知られ<sup>43</sup>, その殺菌作用は, 次の3つの異なるメカニズムが複合的に作用しているとされる: 1) 銀イオンによる触媒活性により, 溶存酸素由来の活性酸素生成<sup>44,45</sup>, 2) DNA の二重鎖間の水素結合部位において銀イオンとの架橋を形成し, 細胞分裂阻止<sup>45,46</sup>, 3) 細胞内銀イオンによる細胞内の酵素活性阻害<sup>45,47</sup>. 銀は広域の抗菌スペクトルを示し, その物理学的作用から耐性菌の発生も少ない. さらに, 細菌だけではなく, 真菌, ウイルス, 原虫にも効果を示す<sup>48</sup>.そのため, 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. しかし, 生体内において, 活性のある銀イオンは, 浸出液中の蛋白質や塩化物, リン酸塩, 硫化物等に速やかに捕捉され不活化する<sup>49</sup>.

スルファジアジン銀 (SSD)は, 1943年にWrubleによって, サルファ剤に分類されるスルファジアジンナトリウムと銀によって合成された銀化合物である<sup>50</sup>. SSDは, 1960年代から外用抗菌薬として使用されており<sup>51,52</sup>, 感染予防のために部分的および全厚熱傷に使用されている<sup>53-57</sup>. 本邦でも, 1982年より外用クリーム剤として使用されており<sup>50</sup>, 現在では, 世界保健機関の必須医薬品リストに登録されている<sup>58</sup>. SSDの副作用は, 投与部位の掻痒感および疼痛, 白血球数減少, アレルギー反応, 皮膚変色および肝臓の炎症が報告されている<sup>59-62</sup>. しかし, Cochrane Systematic Reviewにおいては, 銀含有ドレッシング剤や外用剤が, 創傷治癒促進効果そして, 創傷感染予防効果について, エビデンスが不十分であるため, SSDの使用を推奨していない<sup>63</sup>.

これらの欠点を克服するために, SSDをナノ粒子化する新しい技術が多く用いられ, その抗菌活性を高めている<sup>64,65</sup>. しかしながら, そのナノ粒子化は, SSDの細胞毒性も増強された報告がある<sup>65</sup>. SSDは溶解性が低く, 皮膚への浸透性は限られており, 組織移行性は極めて低い<sup>66,67</sup>. 体液と接触すると, SSDから遊離されたスルファジアジン (SD) は全身に吸収され, 肝臓で代謝され<sup>68</sup>, 尿中に排泄される<sup>69</sup>.

現在までに, SSDのBFへの影響は広く研究されているが<sup>70,71</sup>, その作用機序については未だ明らかにされていない. また, 銀とSDのBFに対する効果を個別に検討した報告はない. 第2章では, SSDおよびAgNO<sub>3</sub>, SDを用いて, 抗菌作用, 特にBFに対する抗菌作用の根底にあるメカニズムを検討し, MRSAが形成したBFに対する銀化合物の効果を分析した.

## 2 実験材料ならびに実験方法

### 2-1. 菌株

臨床分離株である BF 形成能が高い MRSA 菌株 ATCC BAA-2856 (OJ-1) 株を用いた<sup>31-34</sup>. 0.5% NaCl を含有する Tryptic Soy Agar (TSA: Becton Dickinson, Massachusetts, 米国) 40 g を超純水 1 L で溶解し, オートクレーブで滅菌後, シャーレ (栄研化学株式会社, 東京, 日本) 内で寒天培地を作製した. 解凍した保存菌株を寒天培地上に播種し, 37°C 培養室で一晩培養した. 増殖した寒天上のコロニーを 1 つ採取し, 12-mL ポリプロピレン製丸底遠心チューブ(プラスチック試験管: Sarstedt KK, 東京, 日本) に入れた 3 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, 日本) に分散し, 37°C で培養した. 増殖菌液の濁度を分光光度計(GENESYS 10S VIS: Thermo SCIENTIFIC, 東京, 日本)を用い, 波長  $\lambda=578$  nm で吸光度  $OD=0.57$  ( $1.07 \times 10^5$  CFU/ $\mu$ L) まで菌液を増殖させたものを凍結保存した. 使用時に, 解凍し, TSA 上で増殖したコロニーを用いた. TSA から採取した 1 コロニーを 3 mL の TSB を入れたプラスチック製試験管に入れ, Vortex でよく分散し, 37°C 恒温水槽で培養した. 吸光度  $OD=0.57$  ( $\lambda=578$  nm)まで菌液を増殖させたものを“基本菌液”とした.

### 2-2. BF チップの作成

基本菌液を TSB で 1000 倍希釈した菌液を調製し, BF 基質として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 シートを 1×8 cm の短冊状シートにしたものを入れ, 37°C, 24 時間培養し, 基質上に付着したものを BF とした. 培養後, 培養液から OHP シートを取り出し, 10 mL の PBS で 3 回洗浄し, 浮遊菌を取り除いた. その BF が形成した OHP シートを 1×1 cm に切断したものを“BF チップ”として用いた.

### 2-3. 使用化合物

硝酸銀 ( $AgNO_3$ : 富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本), SSD (アルケア株式会社, 東京, 日本) および SD (富士フィルム和光純薬株式会社) を用いた. 3 種類の化合物は, TSB で希釈し, 最大濃度 11,200  $\mu$ M を調製後, 2 倍希釈法によって 43.75  $\mu$ M まで調製した. 無添加のものを含め 10 種類の濃度を使用した. また, いくつかの実験においては,  $AgNO_3$  と SD の混合溶液を SSD と比較するために調製した.

### 2-4. BF に対する各化合物の抗菌効果

BF 由来の細菌に対する各化合物の最小抗菌濃度である BF 由来浮遊菌最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration for planktonic cells from BFs: bMIC), BF 由来浮遊菌最小殺菌濃度 (minimum bactericidal concentration for planktonic cells derived from BFs : bMBC) および, 最小 BF 根絶濃度 (minimum BF eradication concentration: MBEC) は既報<sup>33,72</sup>をいくつか変更を加えて決定した (図 15).

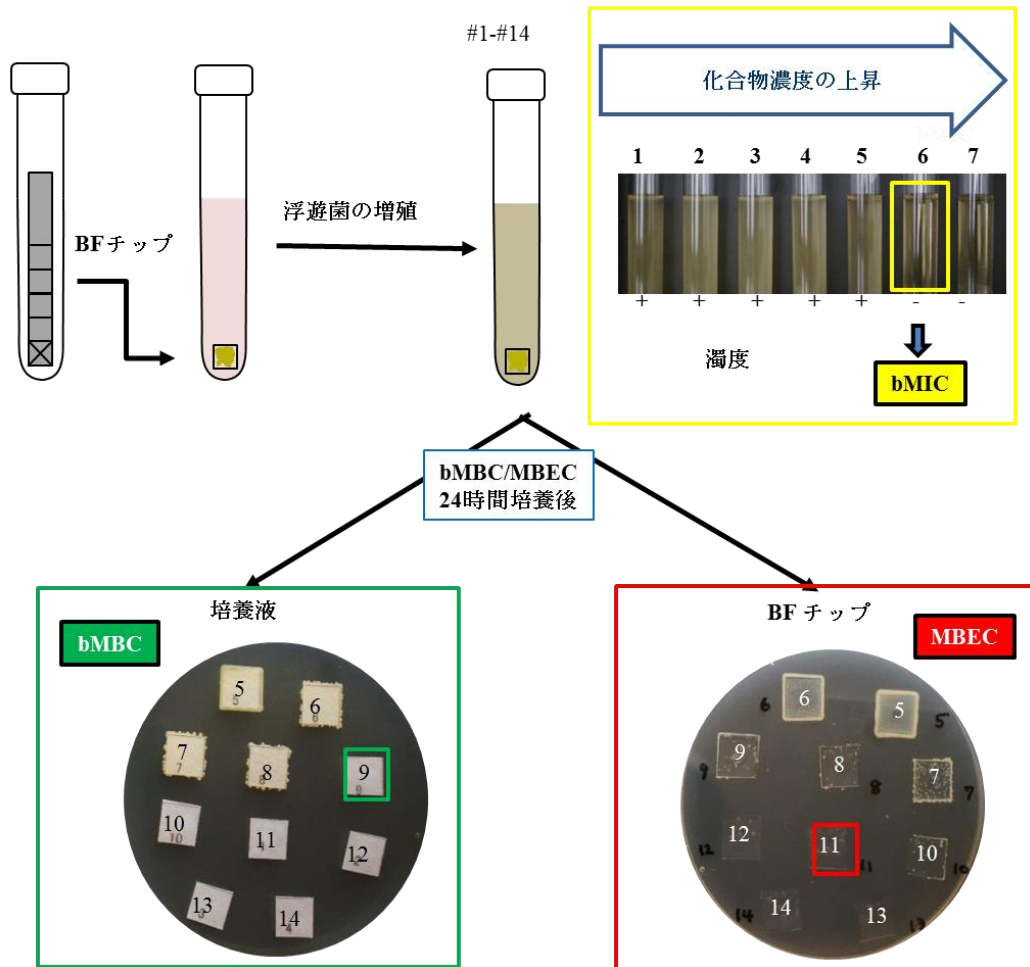


図 15. bMIC, bMBC および MBEC を決定するための BF チップ法の概要

#### 2-4-1. bMIC

各濃度の化合物を添加した TSB 10 mL の入ったプラスチック試験管に BF チップを入れ、暗所、37°C、ローテータ (G10 Gyrotory shaker: New Brunswick scientific 社, ニュージャージー州, 米国) で培養液を攪拌 (120 rpm) しながら 24 時間培養した. SSD と SD は懸濁状態であるため、沈殿による培養液中の濃度不均衡性をローテータによって攪拌し防いだ. 各化合物培養直後、プラスチック試験管内の培養液は懸濁状態となっているため、透明な

上清が分離するまで静置し、その吸光度 ( $\lambda=578$  nm) を測定し、細菌増殖がみられない濃度を bMIC とした。

#### 2-4-2. bMBC

bMIC 測定に使用した各化合物を含有した TSB を TSA 上に置いた 1×1 cm の 99%アルコールで滅菌し、乾燥させた濾紙 (Whatman, GE Healthcare Life Sciences Buckinghamshire, 東京, 日本) に 10  $\mu$ L ずつブロットし、37°C、一晩培養した。培養後、TSA 上にコロニー形成できなかった濃度を bMBC とした。

#### 2-4-3. MBEC

bMIC 測定に使用した各化合物を含有した TSB から BF チップを取り出し、PBS (pH7.4) で洗浄し、TSA 上に置き、37°C、一晩培養した。培養後、TSA 上にコロニー形成できなかった濃度を MBEC とした。

#### 2-5. Crystal Violet (CV)染色法を用いた BF 量の測定

1000 倍希釈した基本菌液 10 mL に、OHP シートを 1×8 cm の短冊状シートを入れ、37 °C、24 時間培養して BF を形成させた (BF シート)。BF シートを 2,800  $\mu$ M の各化合物を添加した TSB に入れ、37 °C、24 時間培養した。培養後、培養液を廃て PBS で洗浄し、10 mL の 5% 中性ホルマリン (pH7.4) で 1 時間固定した。BF 量の測定は、既報<sup>35</sup>に従って、いくつか変更測定した。ホルマリン固定した BF シートを、3.5-mL 栄研チューブ 2 号 (Eiken Chemical Co., Ltd., 東京, 日本) に入れ、1 mL の Crystal Violet (CV: Sigma Aldrich, 東京, 日本) 染色液を添加後、10 分間、室温で染色した。染色後、染色液を廃て、BF シートを水道水で 3 回粗洗い後、流水で 15 分間洗浄した。染色された BF に 1 mL の 30%酢酸を加え、色素溶出液の吸光度 ( $\lambda=590$  nm) を測定し、BF シート上での BF 形成量とした。

#### 2-6. BF 内の生菌数の測定

各種濃度の化合物を含有した 5 mL の TSB の入ったプラスチック試験管に BF チップを入れ、37 °C、24 時間培養した。培養後、5 mL の PBS (pH7.4) の入ったプラスチック試験管に BF チップを移し替え、超音波発生装置 (Sonifier 250; Branson Ultrasonics, Emerson Japan, Ltd., 神奈川, 日本) のプローブを差込み、超音波負荷 (Duty cycle 50%, output 1, 3 分) により、BF 内の菌を採取した。この菌液を 10 倍希釈法で希釈系列を作成し、TSA 上に 50  $\mu$ L 播種し、一晩培養した。形成されたコロニー数をカウントし、BF 内の colony forming unit (CFU) を算出した。

## 2-7. 銀化合物から解離した銀イオンの測定

各濃度に希釈した  $\text{AgNO}_3$  又は SSD を添加した 5 mL の TSB を入れたプラスチック試験管で、暗所、 $37^\circ\text{C}$ 、ローテータで培養液を攪拌 (120 rpm) しながら 24 時間培養した。培養後、プラスチック試験管を遠心分離機 (EX-136: 株式会社トミー精工, 東京, 日本) に  $4^\circ\text{C}$ 、474 g、10 分の設定で遠心分離を行い、上清を 0.45  $\mu\text{m}$  フィルター膜 (Merck Millipore, ダルムシュタット, ドイツ) でろ過した。ろ液 4.5 mL に超純水 15.5 mL を添加した (11,200  $\mu\text{M}$  のみ超純水 35.5 mL を添加)。この希釈液から 10 mL を採取し、銀イオン試薬 (NI- $\text{Ag}^+$ : 日本イオン株式会社, 東京, 日本) と反応させ、銀イオン測定器 (AGT-131: 日本イオン株式会社) で銀イオン濃度を算出した。ろ過後の銀イオン濃度測定の工程は、すべてプラスチック試験管を使用した。

## 2-8. 半透膜を通した銀化合物の BF に対する抗菌効果

不溶性の SSD が BF に直接接触することを避けるために、半透膜チャンバーを通して分離した。細胞間反応研究用カルチャーチャンバー (Intercell S: 倉敷紡績株式会社, 大阪, 日本) を用いた。Intercell S の吊り下げ部分を切り落とし、上部に 2.5-mL シリンジ (SS-02SZ: テルモ株式会社, 東京, 日本) のガスケットを装着し、密閉型チャンバーを作製し、ガス滅菌後に使用した (図 16)。TSB 500  $\mu\text{L}$  中の SSD が、最大濃度 11,200  $\mu\text{M}$  を調製し、2 倍希釈法で 43.75  $\mu\text{M}$  までの調製し、TSB のみを含め 10 種類の溶液を準備した。26 G 針付き 1-mL シリンジ (SS-01T2613S: テルモ株式会社) を用いて、ガスケットから密閉型チャンバー内に各溶液を 500  $\mu\text{L}$  注入した。その後、4.5 mL の TSB を入れたプラスチック試験管に BF チップを投入後、各濃度の SSD 溶液が入ったチャンバーを浮かべた。その試験管を暗所、 $37^\circ\text{C}$ 、ローテータで培養液を攪拌 (120 rpm) しながら 24 時間培養した。また、SSD 溶液 500  $\mu\text{L}$  を直接的に培養液に添加し、無添加のチャンバーを浮かべたものを対照とした。培養後、2-4 の方法に従って、bMIC, bMBC, MBEC を求めた。

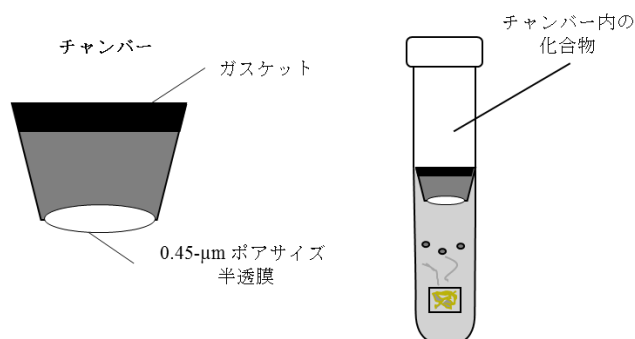


図 16. チャンバーの構造



## 2-9. 半透膜を通した銀化合物から解離した銀イオンの測定

2-8の方法で調製した各濃度のSSD溶液を入れた密閉チャンバーを、4.5 mLのTSBを入れたプラスチック試験管に浮かべ、暗所、37°C、ローテータで培養液を攪拌(120 rpm)しながら24時間培養した。培養後、プラスチック試験管内培養液を4.5 mL採取し、超純水15.5 mLに添加し、希釈した。この希釈液10 mLを銀イオン試薬と銀イオン測定器を用いて、銀イオン濃度を測定した。

## 2-10. EDTAを添加した銀化合物の抗菌効果

銀はEDTAと不溶性の銀錯体を形成することが報告されている<sup>73</sup>。そこで、2-4の方法を用いて、680 μMのエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物(EDTA、富士フィルム和光純薬株式会社)を添加して、培養液中の銀イオンを沈殿させ、AgNO<sub>3</sub>またはSSDの抗菌効果を評価した。

## 2-11. BFに対するSDの付着能

### 2-11-1. SD検量線の作成

SD量の測定は、津田試薬を用いた呈色反応後の吸光度に従った<sup>74</sup>。この方法の有効性を確認するため、SDの検量線の検定を行った。320 μLのSD溶液(0.14 g SD/1 M-HCl)を4.68 mLの1 M-HClで希釈し酸性状態にした後、2倍希釈法で9濃度およびSD不含のSD溶液を準備した。各SD溶液70 μLを入れたプラスチック試験管を氷冷しながら、10%亜硝酸ナトリウム(富士フィルム和光純薬株式会社)20 μLを添加し、混合後、2分間放置した。それにスルファミン酸アンモニウム(富士フィルム和光純薬株式会社)0.1 gを超純水4 mLに溶解したものを100 μL添加し、混合後、1分間放置した。次に、津田試薬(N,N-ジエチル-N'-1-ナフチルエチレンジアミンシユウ酸塩:富士フィルム和光純薬株式会社)を100 μLを添加後、混合した。調製した290 μL溶液を96穴ウェル用培養プレート(日本ベクトン・ディッキンソン株式会社)に移し、マイクロプレートリーダー(BIO-RAD Model680: バイオ・ラッドラボラトリーズ株式会社、カルフォルニア州、米国)で吸光度(λ=550 nm)を測定した。

### 2-11-2. SDのBFへの付着実験

1000倍希釈した基本菌液をプラスチック試験管に3 mL入れ、37°C、24時間培養し、試験管壁面にBFを形成させた。培養後、PBSで3回洗浄し、試験管壁面にBFが形成したBF試験管を作成した。TSBで希釈し、最大濃度11,200 μMを調製後、2倍希釈法によって43.75 μMまで調製し、無添加のものを含め10種類の濃度のSD溶液を準備した。各濃度のSD溶液をBF試験管に3 mL入れ、37°C、1時間、水浴で培養した後、PBSで3回洗浄し、BF上に

付着した SD 量を測定した。各試験管に 1 M-HCl を 500  $\mu$ L 添加し、酸性状態にした後、70  $\mu$ L を分取し、氷冷しながら 10%亜硝酸ナトリウム 20  $\mu$ L を添加し、混合後、2 分間放置した。それにスルファミン酸アンモニウム 0.1 g を超純水 4 mL に溶解したものを 100  $\mu$ L 添加し、混合後、1 分間放置した後、津田試薬を 100  $\mu$ L を添加し、混合した。反応液 290  $\mu$ L を 96 ウェル用培養プレートに移し、マイクロプレートリーダー (Sunrise Rainbow: Tecan Japan Co., Ltd., 神奈川, 日本) で吸光度 ( $\lambda=550$  nm) を測定した。

#### 2-12. BF に対する各化合物の効果の形態学的解析

1000 倍希釈した基本菌液 10 mL に、OHP シート (1 $\times$ 8 cm) を入れ、37 $^{\circ}$ C, 24 時間培養し、BF を形成させた。2,800  $\mu$ M の各化合物を添加した TSB に BF を形成した OHP シートを入れ、暗所、37  $^{\circ}$ C, 24 時間培養した。培養後、OHP シートを 5%中性ホルマリン (pH7.4) で 1 時間固定し、PBS (pH7.4) で 1 回洗浄後、CV 染色を行った。また、CV 染色していない OHP シートを 1 週間以上放置し、シート上に付着した銀を酸化的黒化したものを顕微鏡下で観察した。

#### 2-13. 倫理的承認

細菌の取り扱いを伴う全ての方法は、福岡大学実験規則の関連するガイドラインおよび規則に準拠して実施した。

#### 2-14. 統計学的解析

実験は全て 2 回以上行い、同様な結果が得られたものを用いた。2 つの異なる実験群からの結果は、最初に F 検定を用いた分布分析を行い、対応なしの student's t 検定または Mann-Whitney U 検定を行った。P 値が 0.05 以下のものを統計的有意とした。サンプル数およびデータは平均値 $\pm$ 標準誤差で表示した。

### 3 結果

#### 3-1. AgNO<sub>3</sub>, SSD および SD の抗菌効果

##### 3-1-1. bMIC

AgNO<sub>3</sub>, SSD, SD を用いて最大濃度 11,200 μM から 2 倍希釈法により 43.75 μM まで希釈し, 無添加も含めて 10 種類の培養液に BF チップを入れ, 37 °C, 24 時間培養した. 培養後, 菌の増殖性を見るため培養液の吸光度を測定した. AgNO<sub>3</sub> と SSD の BF 由来浮遊菌に対する最少発育阻止濃度である bMIC は, 700 μM だった. 一方, SD は 11,200 μM 以上であった (図 17).

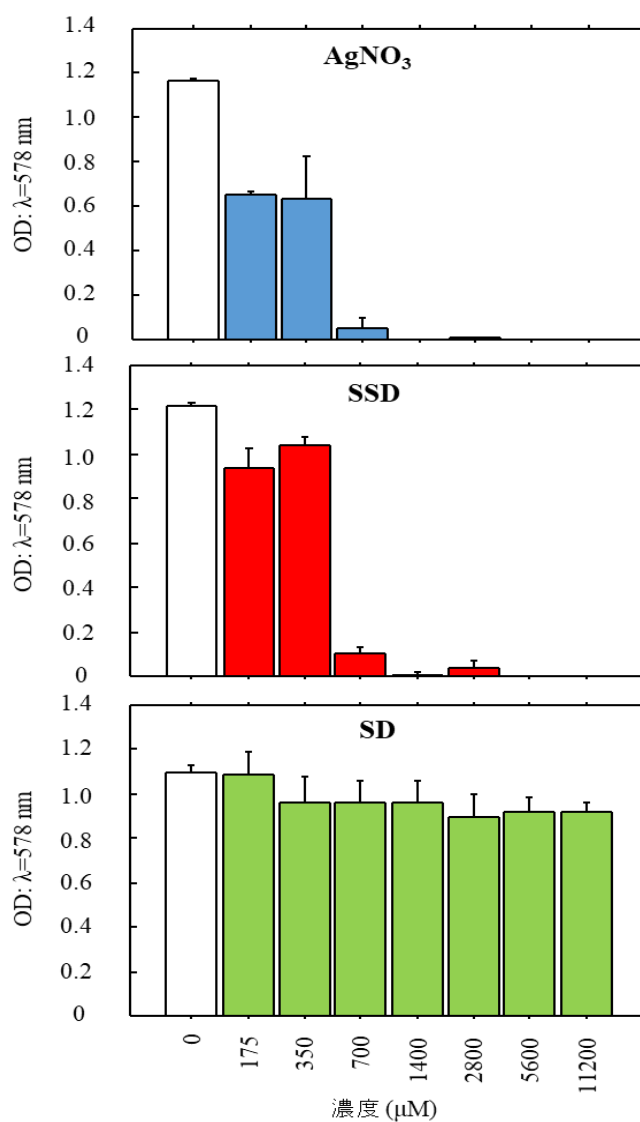


図 17. BF 由来浮遊菌に対する最少発育阻止濃度 (bMIC) (n=6)

bMIC 測定に使用した培養液を TSA 上に置いた濾紙へブロットイングし、一晚培養した。培養後、形成されたコロニーの有無から、BF 由来浮遊菌に対する最少殺菌濃度である bMBC を測定した。SSD の bMBC は 1,400  $\mu\text{M}$  だったが、 $\text{AgNO}_3$  は 2,800  $\mu\text{M}$  と増加していた。一方、SD は 11,200  $\mu\text{M}$  以上であった (表 4)。

表 4. BF 由来浮遊菌に対する最少殺菌濃度 (bMBC) ( $n=6$ )

	0	175	350	700	1,400	2,800	5,600	11,200 ( $\mu\text{M}$ )
<b>AgNO<sub>3</sub></b>	+	+	+	+	+/-	-	-	-
<b>SSD</b>	+	+	+	-/+	-	-	-	-
<b>SD</b>	+	+	+	+	+	+	+	+

-: 割合として 0/6 に菌増殖; -/+: 割合として 2/6 に菌増殖; +/-: 割合として 4/6 に菌増殖; +: 割合として 6/6 に菌増殖.

### 3-1-3. MBEC

bMIC 測定に使用した培養液から取り出した BF チップを TSA 上に置き、一晚培養した。培養後、増殖するコロニーの有無から、最小 BF 根絶濃度である MBEC を測定した。SSD の MBEC は 2,800  $\mu\text{M}$  であった。一方、 $\text{AgNO}_3$  と SD の MBEC は 11,200  $\mu\text{M}$  以上であった (表 5)。

表 5. 最小 BF 根絶濃度 (MBEC) ( $n=6$ )

	0	175	350	700	1,400	2,800	5,600	11,200 ( $\mu\text{M}$ )
<b>AgNO<sub>3</sub></b>	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>SSD</b>	+	+	+	+/-	-/+	-	-	-
<b>SD</b>	+	+	+	+	+	+	+	+

-: 割合として 0/6 に菌増殖; -/+: 割合として 2/6 に菌増殖; +/-: 割合として 4/6 に菌増殖; +: 割合として 6/6 に菌増殖.

### 3-1-4. AgNO<sub>3</sub>, SSD および SD の抗菌効果のまとめ

表 6 に AgNO<sub>3</sub>, SSD および SD の抗菌効果を比較したものを示す. 今回検討した濃度範囲では SD はすべてにおいて抗菌効果を示さなかった. 一方で, AgNO<sub>3</sub> と SSD は bMIC と bMBC を認めたが, MBEC は SSD のみ認められた.

表 6. AgNO<sub>3</sub>, SSD および SD の抗菌効果

	bMIC	bMBC	MBEC
AgNO <sub>3</sub> (μM)	700	2,800	>11,200
SSD (μM)	700	1,400	2,800
SD (μM)	>11,200	>11,200	>11,200

### 3-2. AgNO<sub>3</sub>, SSD および SD による BF 内生菌に対する効果

AgNO<sub>3</sub>, SSD および SD 添加した培養液に BF チップを入れ, 37°C, 24 時間培養した. 培養後, BF 内の生菌数を CFU アッセイで比較した. AgNO<sub>3</sub> は, 培養後の BF チップの生菌数と比較すると大幅に減少していたが, 培養前の BF チップの生菌数 ( $3.6 \times 10^5$  CFU) と変わらなかった. 対照的に, SSD では, 濃度依存的に生菌数は低下し, 特に 2,800 μM 以上の濃度では, 培養前の BF チップの約 1/100 及び 24 時間培養後の約 1/100,000 に減少した. SD では, いずれの濃度でも, 無添加対照群とほぼ変わらず, 菌の増殖抑制は見られなかった (図 18).

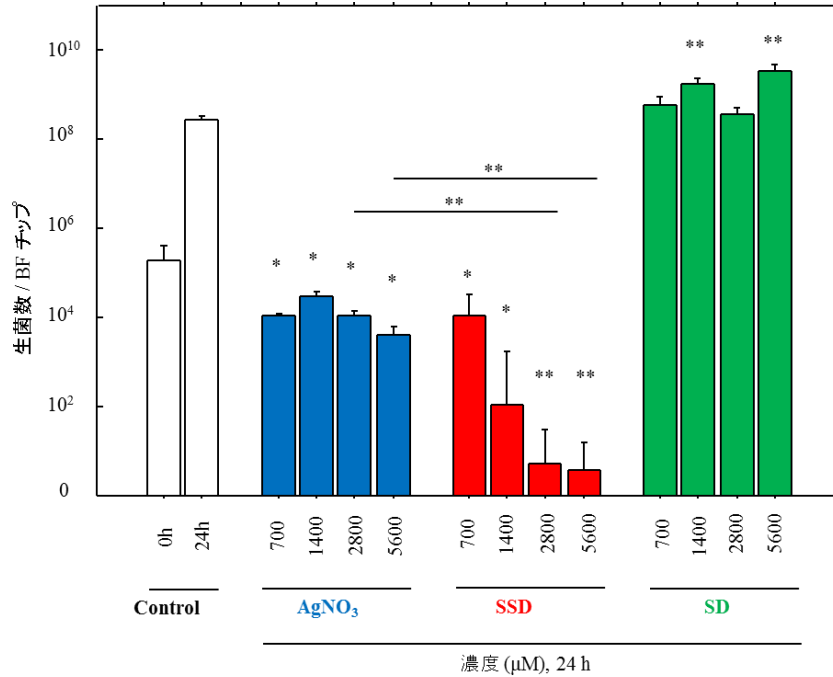


図 18. BF 内の CFU 値 ( $n=5$ )

\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$  vs 24 時間培養後または異なる化合物

### 3-3. 培養液中の SSD から遊離する銀イオン

SSD の抗菌効果は、イオン化した銀の作用によるものと考えられる。そのため、培養液中に  $\text{AgNO}_3$  と SSD から遊離した銀イオンを測定した。いずれの場合も、遊離した銀イオンは用量依存的に増加した (図 19)。培養液中の  $\text{AgNO}_3$  から遊離した銀イオンは直線的な増加パターンを示した。しかしながら、培養液中の SSD から遊離した銀イオンでは、対数的な増加パターンを示した。また、700  $\mu\text{M}$  以上の濃度では、有意な差が認められた (図 19)。700  $\mu\text{M}$  の濃度では、銀イオンは  $\text{AgNO}_3$  では 5.91  $\mu\text{M}$ 、SSD では 4.64  $\mu\text{M}$  まで増加した。最大濃度 11,200  $\mu\text{M}$  では、 $\text{AgNO}_3$  から遊離した銀イオン量は、SSD の約 3 倍に増加した (図 19)。

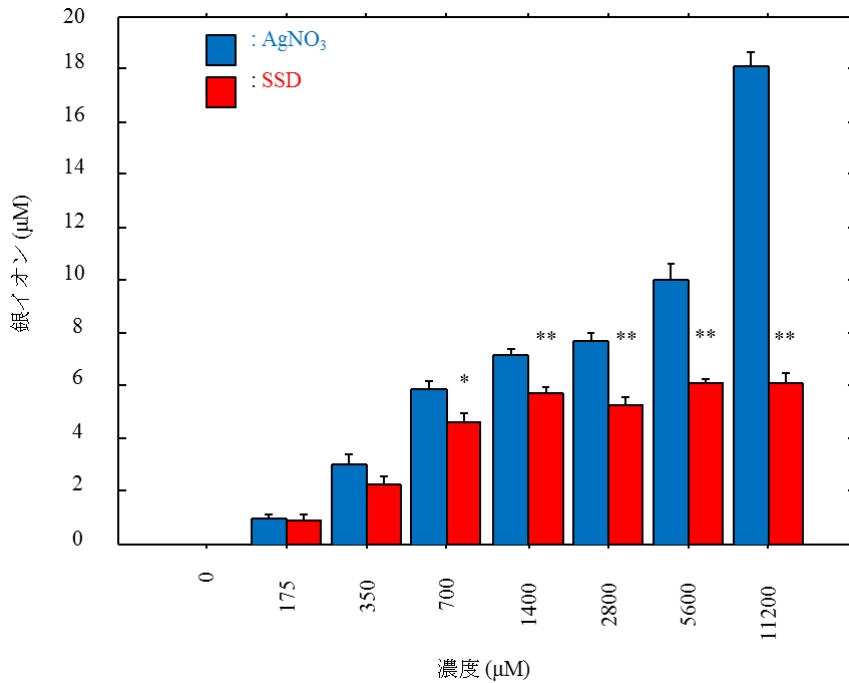


図 19. 培養液中の各銀化合物から遊離した銀イオン濃度 ( $n=3$ )

\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$  vs AgNO<sub>3</sub>

### 3-4. 半透膜チャンバー内に SSD を入れた場合の抗菌効果

#### 3-4-1. 0.45 μm 滅菌フィルターによる SSD の濾過

著者は, SSD の抗菌効果が BF に直接付着していることに起因するのではないかと仮説を立てた. このメカニズムを検討するため, 始めに最大濃度 11,200 μM の SSD 添加培養液を, チャンバー膜と同ポアサイズ (0.45 μm) の滅菌フィルターで濾過した. SSD と TSB に添加すると, SSD は不溶性のため, 白濁して懸濁状態となり, 吸光度は測定不能であった ( $OD > 3$ ). この SSD 添加培養液を, 滅菌フィルターで濾過すると, 不溶性の SSD を取り除くことができ, チャンバー膜が半透膜として機能することを確認した (図 20).

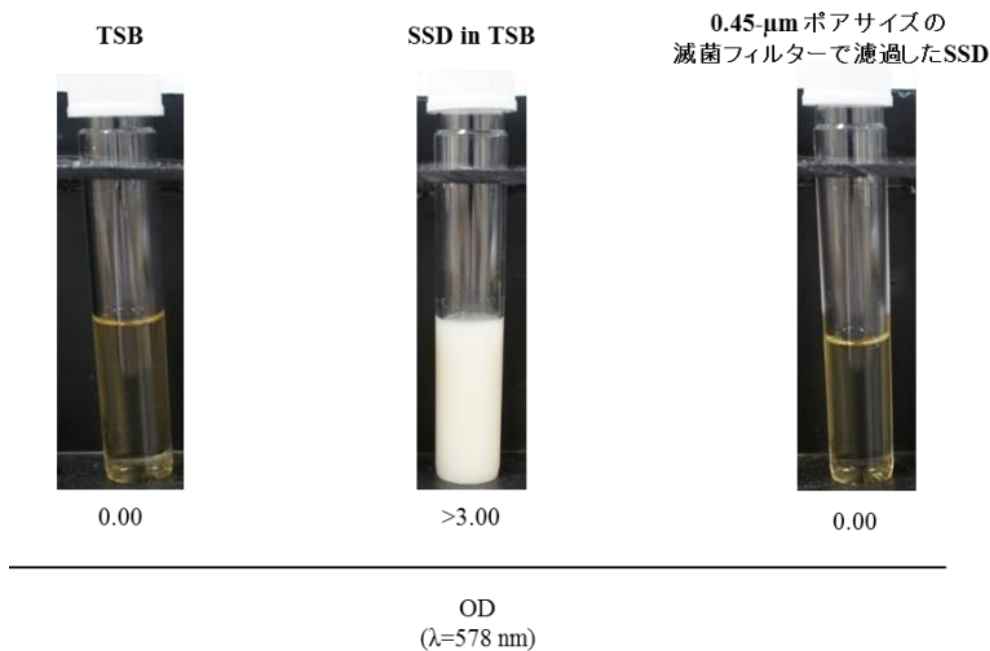


図 20. TSB, SSD 懸濁液および半透膜を通した SSD 懸濁液の吸光度

### 3-4-2. SSD の BF に対する直接的・間接的な殺菌効果

SSD の BF に対する抗菌効果が直接/間接的であるか検討した。間接作用を検討するため、半透膜を有する密閉チャンバー内に SSD を入れ、BF チップの入った培養液に浮かべ、37°C、24 時間培養した。培養後、チャンバーを取り除き、BF に対する抗菌効果を測定した。チャンバー内に SSD を封入した(chambered)場合の bMIC は、1,400  $\mu\text{M}$  であり、SSD を直接添加した (direct)場合と比較して 2 倍に増加した (表 7)。SSD chambered の bMBC は、5,600  $\mu\text{M}$  以上に増加し、SSD direct と比較して 4 倍以上に増加した。同様に、MBEC も 5,600  $\mu\text{M}$  以上に増加し、SSD direct と比較して、SSD chambered では 2 倍以上に増加した (表 7)。

表 7. SSD の直接作用・間接作用の抗菌効果比較

		bMIC	bMBC	MBEC
直接	SSD direct ( $\mu\text{M}$ )	700	1,400	2,800
間接	SSD chambered ( $\mu\text{M}$ )	1,400	>5,600	>5,600



### 3-5. SSD を半透膜チャンバー内に入れた SSD から遊離する銀イオン

半透膜チャンバー内に SSD を入れ, TSB 入りのプラスチック試験管に浮かべたもの (chambered) と SSD を直接添加したもの (direct) を用いて, 37°C, 24 時間培養した. 培養後, 培養液中に SSD から遊離した銀イオンを測定した (図 21). SSD をチャンバー内に入れたものに比べて, 直接添加した SSD の方が, 銀イオン濃度が高かった (最大約 2 倍).

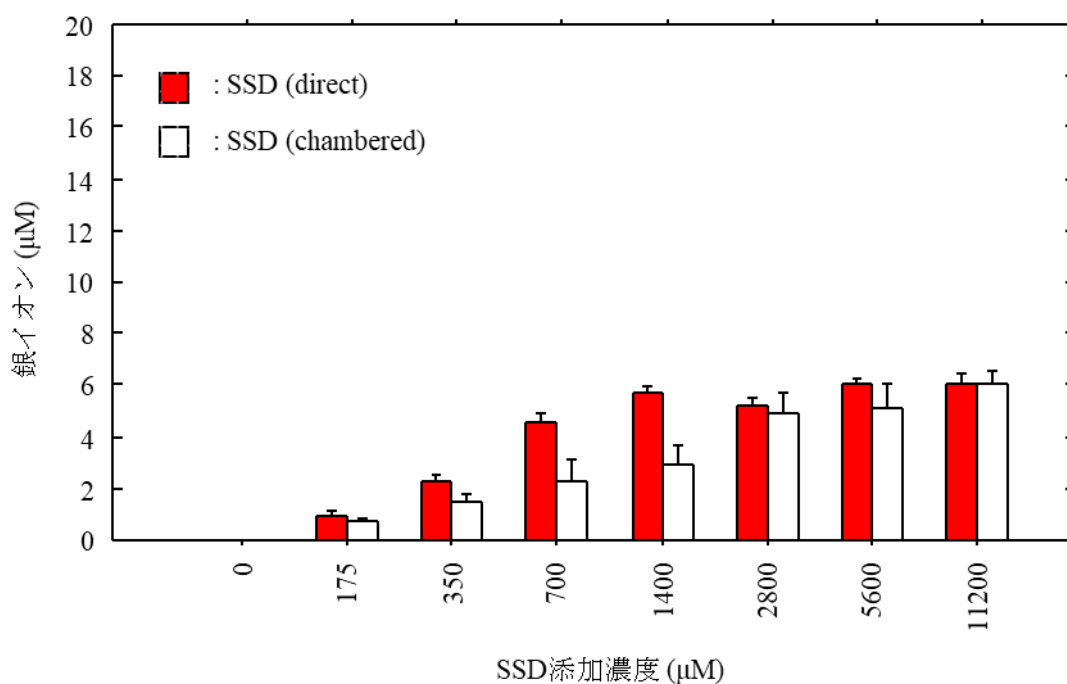


図 21. SSD を直接添加した場合と SSD をチャンバー内に入れた場合の銀イオン濃度比較 ( $n=3$ )

### 3-6. 銀化合物の抗菌効果に対する EDTA の影響

銀は EDTA と不溶性の銀錯体を形成することが報告されている<sup>73</sup>. 銀イオンの抗菌効果への影響を解析するために, 640 μM の EDTA を銀化合物に添加して, AgNO<sub>3</sub>, SSD を用いて最大濃度 5,600 μM から 2 倍希釈法により 43.75 μM まで希釈し, 無添加も含めて 10 種類の培養液に BF チップを入れ, 37°C, 24 時間培養した. 培養後, bMIC, bMBC, MBEC を求めた. AgNO<sub>3</sub> において, EDTA の添加は bMIC, bMBC, MBEC に影響がなかった (それぞれ 700 μM, 2,800 μM, >5,600 μM, 表 8). しかし, SSD では, すべての値が EDTA の添加により増加した (それぞれ 700 μM → 1,400 μM, 1,400 μM → 2,800 μM, 2,800 μM → >5,600 μM, 表 8).

表 8. EDTA 添加による銀化合物の抗菌効果の比較

	bMIC		bMBC		MBEC	
	(+ EDTA)		(+ EDTA)		(+ EDTA)	
AgNO <sub>3</sub> (μM)	700	(700)	2,800	(2,800)	>5,600	(>5,600)
SSD (μM)	700	(1,400)	1,400	(2,800)	2,800	(>5,600)

### 3-7. BF に対する各化合物の効果

#### 3-7-1. 各化合物の BF 量への影響

SSD が BF を根絶させた濃度である 2,800 μM (表 6) を用いて, BF に対する効果を検討した. 各化合物 (AgNO<sub>3</sub>, SSD, SD, AgNO<sub>3</sub>+SD) を添加した培養液に BF シートを入れて, 37°C, 24 時間培養した. 培養後, BF シートを取り出し, CV 染色で BF を定量化した. すべての群で, 無添加対照群と比較して有意に低下した. 各化合物の効果は, SSD>AgNO<sub>3</sub>=AgNO<sub>3</sub>+SD>SD となり, 他の群に比べて SSD は有意に低下した (図 22). また, 形態的比較においても同様に Control>SD>AgNO<sub>3</sub>>SSD の順で濃く染色されていた (図 23).

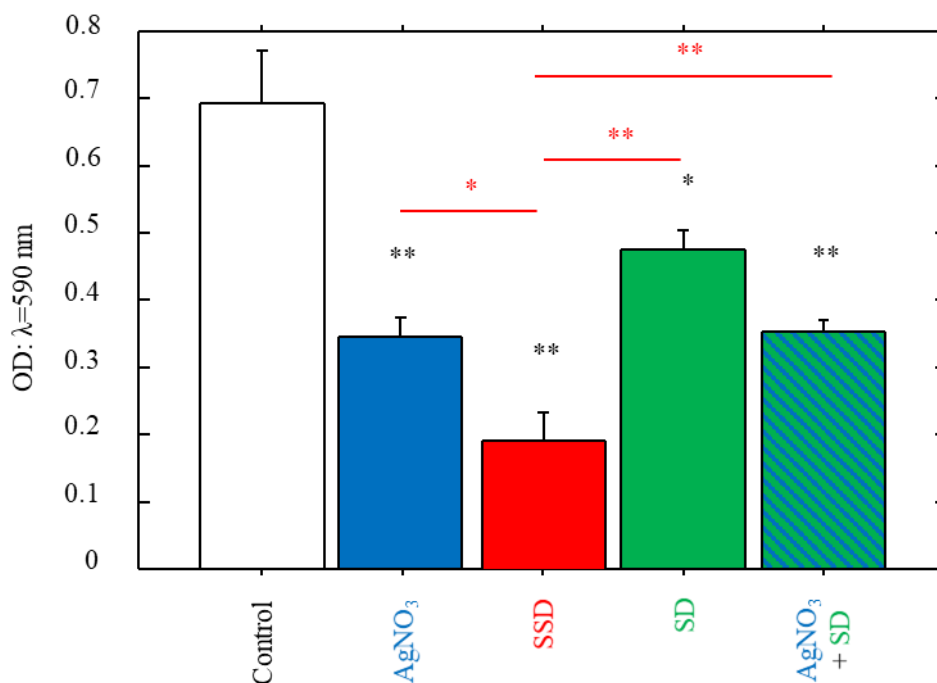


図 22. 各化合物の BF mass への効果 (n=5)

\* : p < 0.05, \*\* : p < 0.01 vs control (黒), vs SSD (赤)

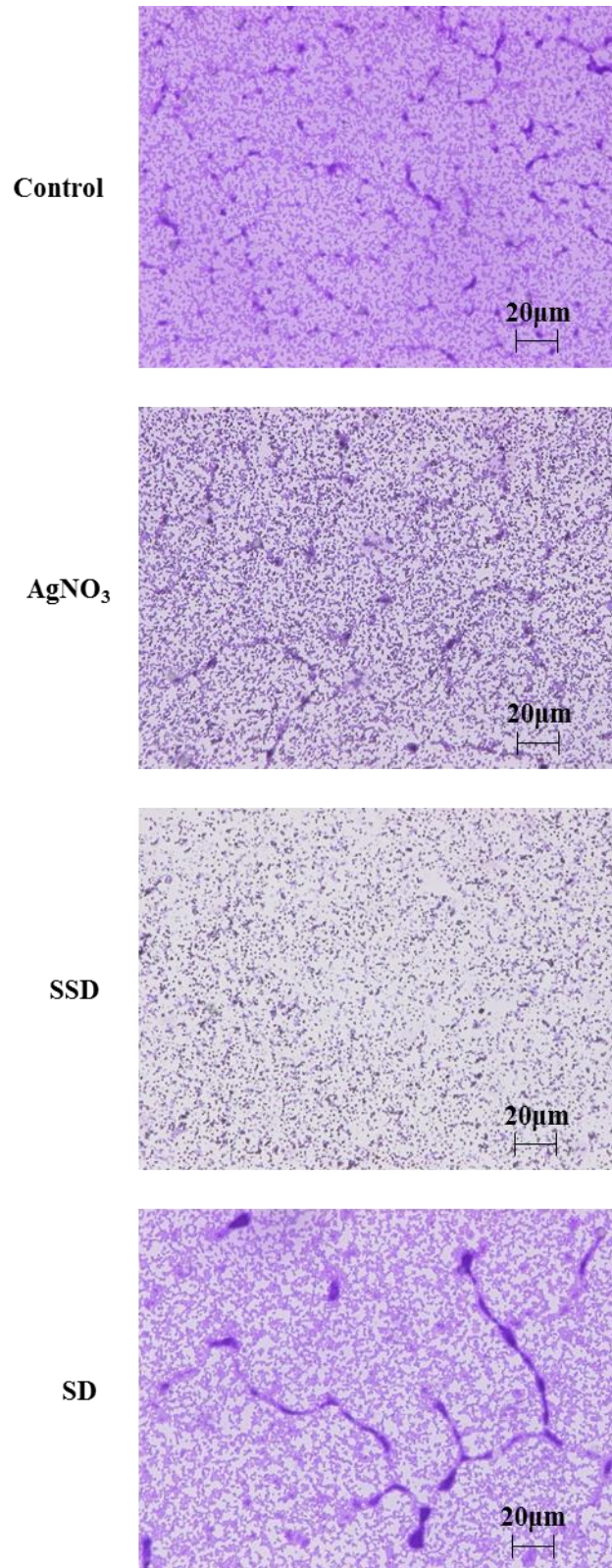


図 23. 各化合物の BF に対する効果の形態的比較

### 3-7-2. 各化合物による BF 内生菌に対する効果

SSD が BF を根絶させた濃度である 2,800  $\mu\text{M}$  (表 6)を用いて, BF 内の生菌数を比較した. 各化合物 ( $\text{AgNO}_3$ , SSD, SD,  $\text{AgNO}_3+\text{SD}$ ) を添加した培養液に BF チップを入れて, 37  $^\circ\text{C}$ , 24 時間培養した. 培養後, BF チップを取り出し, CFU アッセイを行った. 生菌数も BF 量と同様に,  $\text{SSD} > \text{AgNO}_3 = \text{AgNO}_3 + \text{SD} > \text{SD}$  の順で生菌数は減少した(図 19). また,  $\text{AgNO}_3$  と  $\text{AgNO}_3 + \text{SD}$  に差はなかった(図 24).

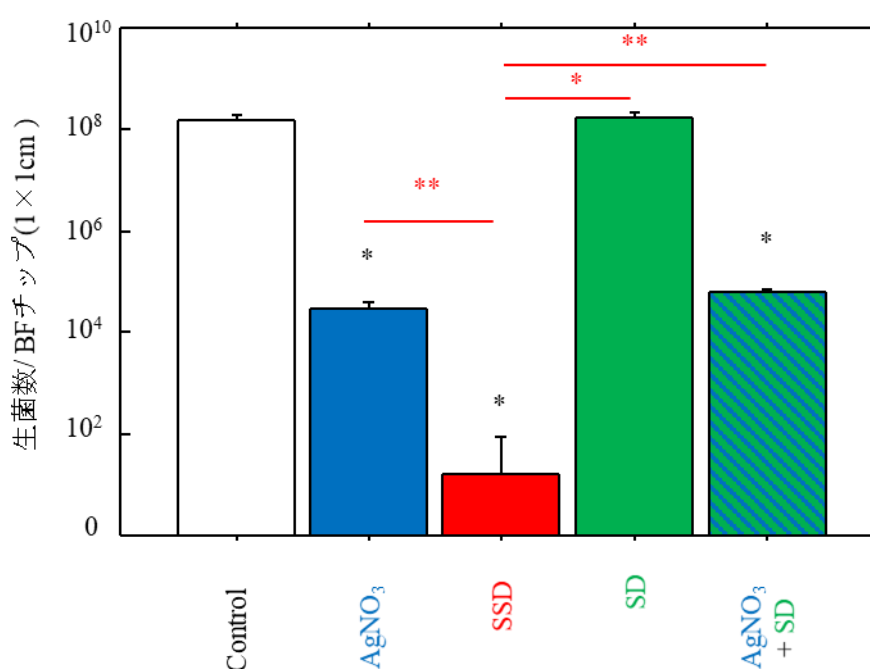


図 24. 各化合物の生菌数比較 ( $n=5$ )

\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  vs control (黒), vs SSD (赤)

### 3-8. 銀化合物の BF への付着性

SSD が BF を根絶させた濃度である 2,800  $\mu\text{M}$  (表 6)を用いて, BF への付着性を検討した. 各化合物 ( $\text{AgNO}_3$ , SSD, SD) を添加した培養液に BF シートを入れて, 37 $^\circ\text{C}$ , 3 時間培養した. 培養後, 5%中性ホルマリン (pH7.4) で 1 時間固定し, 銀の BF への付着を酸化的黒化として観察した (図 25). 黒化した銀は  $\text{AgNO}_3$  と SSD で認められたが, その量は SSD がより多く認めた.

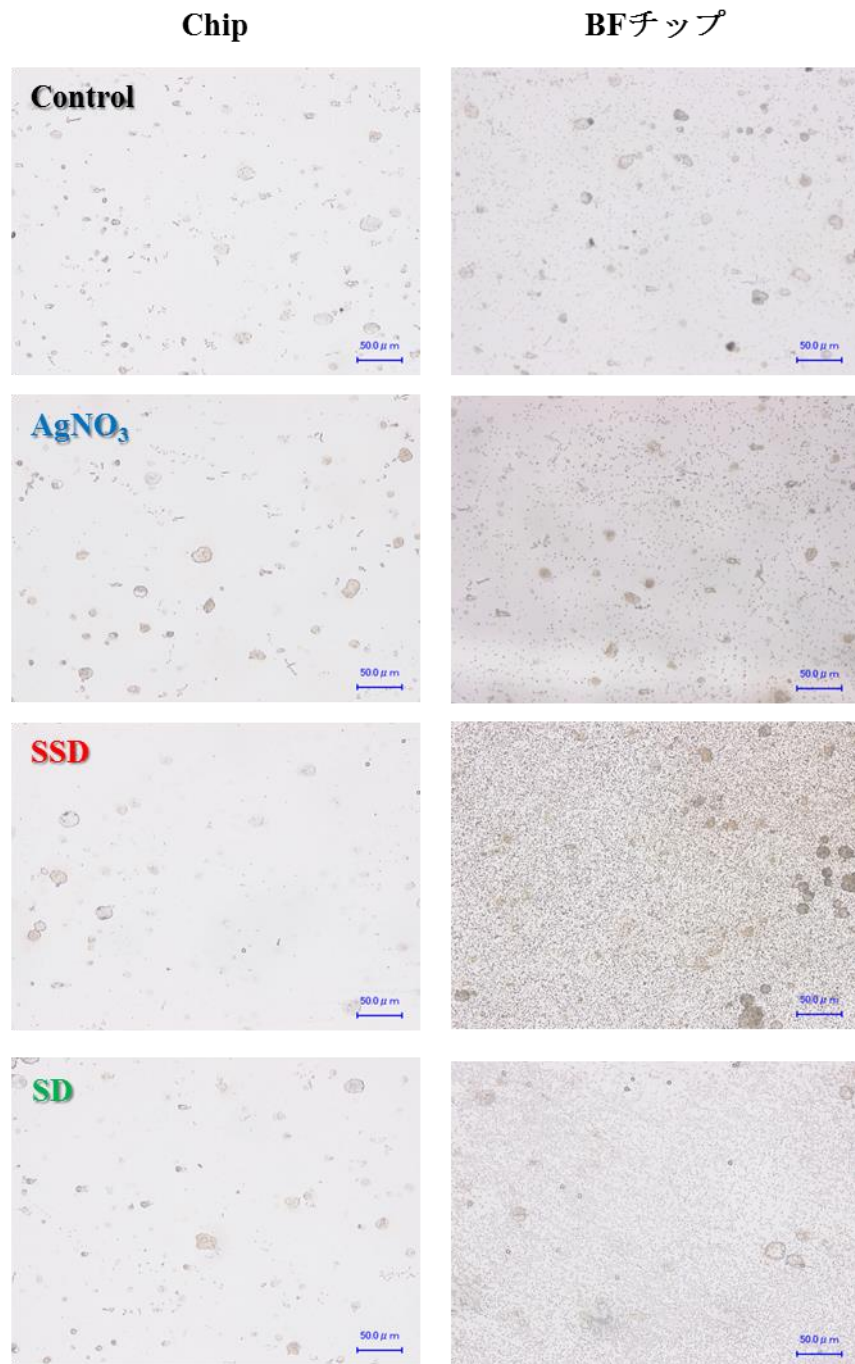


図 25. 各化合物の BF 上への付着

### 3-9. SD の BF への付着特異性

#### 3-9-1. SD の検量線作成

BF に対して SD に付着特異性があるか検討するために、津田試薬を用いた SD の定量法を試みた。7 種の濃度の SD を用いて、その反応液の吸光度の測定を行った。用いた濃度範囲 (2.9125~186.4  $\mu\text{g}/\text{tube}$ ) では直線性が示され、定量化が可能であることが分かった (図 26)。

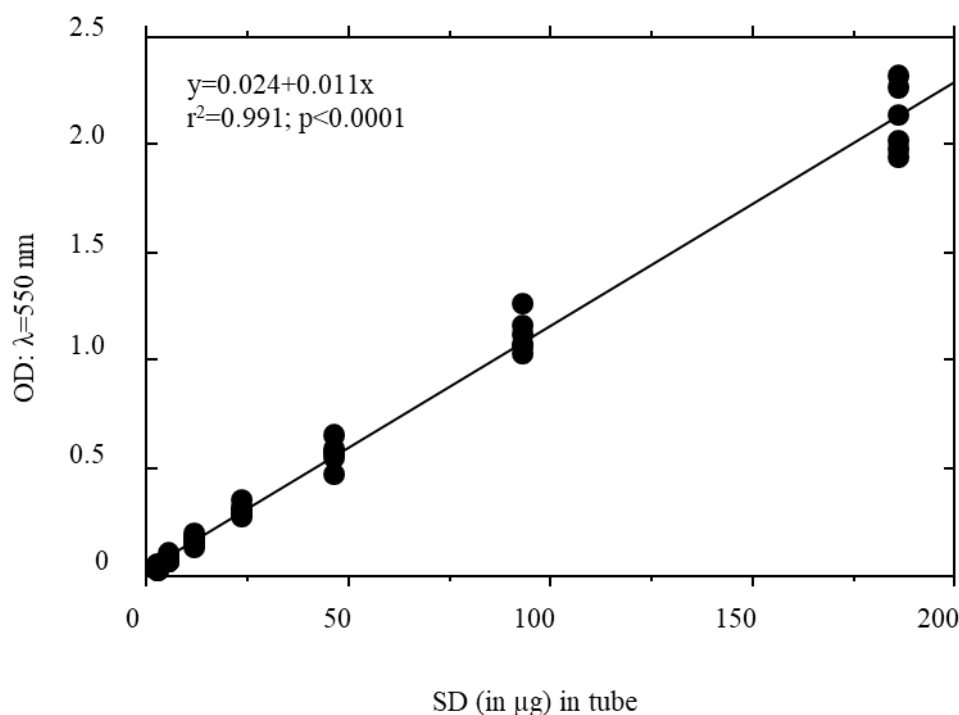


図 26. 津田試薬を用いた SD の検量線 ( $n=5$ )

#### 3-9-2. プラスチック基質と BF 基質への SD の付着の比較

プラスチック試験管壁面に BF を形成させた試験管に対し、様々な濃度の SD 添加培養液で 1 時間培養した。培養後、付着した SD の定量化を行った。BF が無い対照群は、SD の付着量に変化はなかったものの、BF 存在下では、SD 濃度が 1,400  $\mu\text{M}$  以上の濃度で SD 付着増加を認めた (図 27)。

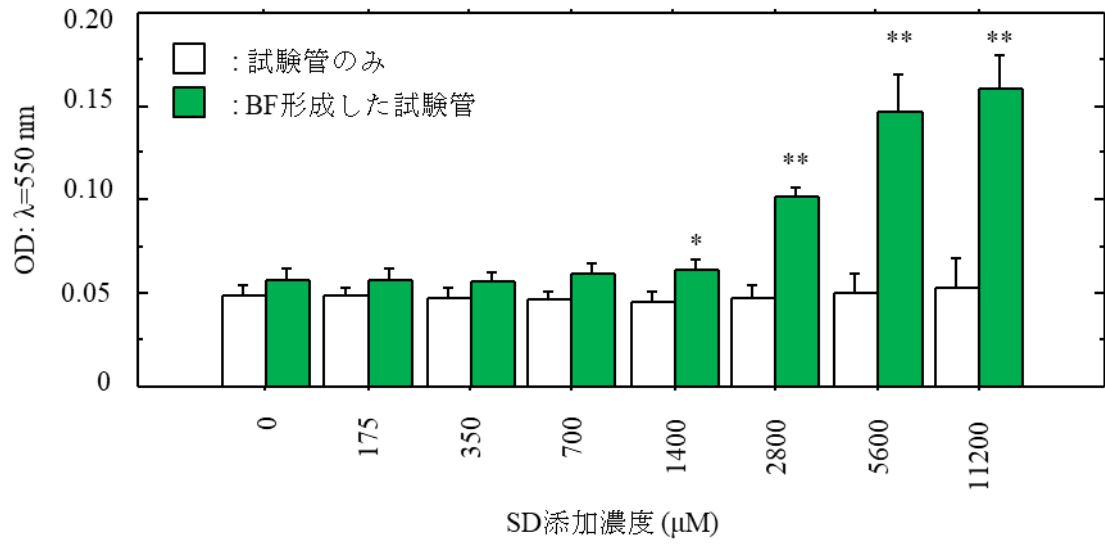


図 27. BF に対する SD の付着性 ( $n=5$ )

\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  vs BF-free tube



## 4 考察および小括

BF は、塊状の EPS を含む細菌によって形成され、薬剤の浸透性の低下<sup>15,75</sup> および休眠細胞(すなわち persister cells) 出現<sup>15,16,76</sup> によって薬剤耐性を獲得することが報告されており、BF の根絶は困難な問題である。本章では、MRSA が形成した BF に対する SSD の効果を検討した。医療用医薬品であるゲーベン®に含まれる SSD の濃度は 1% (10,000 µg/mL)であり、塗布後に傷口から滲出する組織液で希釈されることが想定される。今回使用した最高濃度は 4,000 µg/mL (0.4%: 11,200 µM)であり、臨床現場で使用される医薬品に比べてやや低濃度であった。

銀化合物の調査の際、SSD は、その広範な殺菌効果のために、様々な化合物の中で選択されてきた<sup>52,55-57</sup>。今回、我々は SSD が MRSA に対して、特に成熟した BF に有効であることを示したが、SD 自体には効果がなかった。

今回検討した化合物の中で、SSD は BF 量と生菌数を有意に減少させたが、これは AgNO<sub>3</sub> と比較してかなり大きな差であった。この現象は、BF チップへの銀の析出によって裏付けられた。また、SSD の代わりに、AgNO<sub>3</sub> と SD を同時に添加においても、AgNO<sub>3</sub> 単独と同等ではあるが、SSD よりも有意に低いことから、銀による BF 破壊を示すためには SSD の分子形態が重要であることが示唆された。

一方、SSD と AgNO<sub>3</sub> は、bMIC と bMBC において同様の抗菌効果を示したが、これらはいずれも BF 由来の浮遊菌に対してのみ認められた。銀イオン濃度は、それらの閾値レベルに応じて、5 µM 以上に達した。いずれにしても、この濃度は、増殖抑制や浮遊菌の殺菌に必要な濃度である可能性がある。しかし、有効用量の範囲では、AgNO<sub>3</sub> 条件では SSD 条件に比べて高濃度の銀イオンが遊離していた。これは SSD の殺菌効果の矛盾を反映しており、銀イオンの単純な拡散以外の何らかの要因が関与している可能性を示唆している。

MBEC は、BF 内の細菌根絶濃度の値である。今回検討した濃度範囲内では、AgNO<sub>3</sub> や SD には効果がなく SSD でのみ示されており、これは BF 内の生菌数も相関していた。このことから、AgNO<sub>3</sub> は BF 内の細菌を効率的に死滅させることができず、その効果は増殖抑制に留まっていることが明らかになった。一方、SSD は成熟した BF 内の生菌数を強くかつ用量依存的に抑制し、700 µM (bMIC に相当) の濃度では、24 時間培養後の BF 内生菌数を 1/10,000 に抑制し、2,800 µM (MBEC に相当) の濃度では 24 時間培養後の BF 内生菌数は、初期の BF 内生菌数の 1/300、コントロールの 1/30,000 になっていた。これらの結果は、培養液中の銀イオン濃度が SSD の直接的な影響因子ではないことを示唆している。

この作用機序を明らかにするために、SSD を密閉チャンバー内に閉じ込めることで、SSD が分離され、細菌は膜を越えて侵入できないが、イオン化された銀は自由に通過することができる。その結果、チャンバーの有無にかかわらず、培地中の銀イオン濃度は同程度であった (図 21)。しかし、密閉チャンバー内の SSD (chambered)の bMBC と MBEC は、SSD



直接添加 (direct)に比べて高くなった (表 8). これらの結果は, SSD の抗菌効果は, 銀イオンの濃度だけでなく SSD が菌に直接接触する必要がある事が示唆された.

さらに本研究において, SD 自体が BF に結合する性質を持っていることを示した. SSD の BF への正確な結合機構は未だ不明であるが, SSD の BF への直接的な結合は殺菌効果を誘導するために重要である. したがって, 近い将来, SSD の BF への結合部位が特定されれば, MRSA が形成する BF の標的分子の発見につながると考えられる.

SSD の抗菌効果における銀イオンの役割を検証するために,  $\text{AgNO}_3$  と SSD を添加した培養液中で遊離した銀イオンの約 40~100 倍の濃度である  $680 \mu\text{M}$  の EDTA を添加した. EDTA を添加した場合,  $\text{AgNO}_3$  では, bMIC, bMBC, MBEC に変化は見られなかった. 一方, EDTA の添加では, SSD はすべての値が上昇した.  $\text{AgNO}_3$  と SSD の抗菌作用のメカニズムは不明であるが, 両者の反応様式は異なっている可能性がある. また,  $\text{AgNO}_3$  からの銀イオンは, SSD に比べて負に帯電した成分と結合しやすく, 結合と遊離が繰り返される可能性があると考えられた. また, SSD の銀イオン保持能は  $\text{AgNO}_3$  の銀イオン保持能よりも高く, SSD が BF に到達する可能性があることがわかった. このことは,  $\text{AgNO}_3$  を添加した場合には, 銀が BF チップに付着した部位が特定できなかったのに対し, SSD を添加した場合には, 銀が BF チップに付着した部位が特定できたことから, SSD が BF に選択的に作用していることを示唆している. 以上の結果から, SSD が付着した後, 銀イオンが BF 内の微小環境に放出されることで, 細菌の死滅機会が増加し, BF の構造に大きな歪みが生じた可能性がある (図 28).

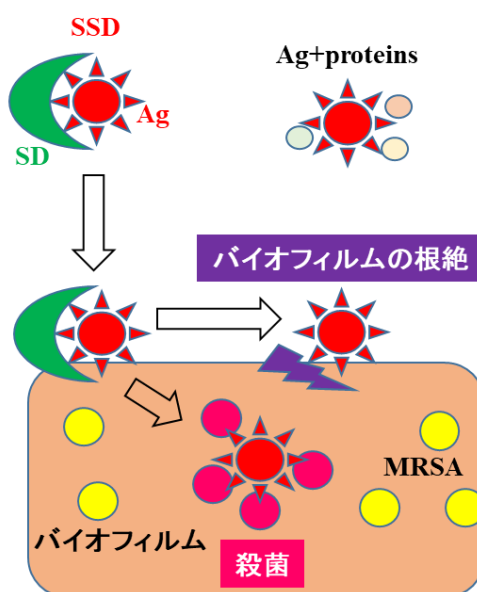


図 28. MRSA 形成 BF に対する SSD の作用機序の仮説

SSD は信頼性の高い抗菌剤であるため、近年では、留置カテーテルのコーティング材として使用されている<sup>77,78</sup>。しかし、今まで、BF に対する SSD の作用機序はまだ不明であった。本章の結果は、BF に対する SSD の効果の背後にあるメカニズムを解明した最初の研究である。結論として、SSD が選択的に BF に結合し、銀イオンを放出することで、微小環境下で BF に定着した細菌を死滅させている可能性が考えられる (図 28)

## 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。

第一章では、BF 形成抑制物質として、4 種の界面活性剤の中から PS80 を見出した。PS80 は、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。

そこで第二章では、形成されてしまった成熟した BF を破壊・殺菌できる薬剤として SSD の効果を検討した。SSD は長年外用剤として、創部の二次感染予防剤として用いられてきている。その効果は、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。今後、SSD が BF に結合する部位を特定するためには、さらなる分子レベルでの研究が必要ではあるが、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。BF 感染創部における SSD の使用については、二次感染予防のためではなく、BF 感染症での治療薬として臨床現場での体系的な検討が必要である。

本研究の成果で見出した PS80 と SSD の効果は、臨床現場における BF 感染症に対して、予防と治療において適切かつ有効な物質である可能性を示すものと思われる。

## 謝辞

本研究は、福岡大学医学部医学科病態構造系総合研究室の自見 至郎特任教授，同大学薬学部医薬品情報学教室の原 周司教授に研究をする機会を与えて頂くとともに，終始暖かいご指導，ご鞭撻のもとに行われました。謹んで感謝の意を表します。併せて，本研究の遂行にあたり，多大な御助言・御協力をしていただいた福岡大学薬学部微生物薬品化学教室の鹿志毛 信広教授，同大学薬学部実務薬剤学の宮崎 元康氏，福岡大学病院薬剤部の真島 宏太氏に深く感謝致します。また，ともに実験を行ってくださった高橋 里奈女史，谷 星斗氏，大城 優衣女史，仁田 有咲女史をはじめとする福岡大学薬学部医薬品情報学教室の皆様にも深く感謝申し上げます。さらに，日々の業務をともにし，研究生活を温かく見守り，理解し，応援していただきました，福岡大学病院薬剤部の皆様にも深く感謝致します。最後になりましたが，理解を示し，また励まし，誰よりも健康面・精神面においての支えとなりました家族に感謝の意を表して，私の謝辞とさせていただきます。

## 参考文献

- 1 DeLeo FR, Chambers HF. Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. *J Clin Invest* 2009; **119**: 2464-74.
- 2 Jevons MP, Coe AW, Parker MT. Methicillin resistance in *staphylococci*. *Lancet* 1963; **1**: 904-7.
- 3 Palka L, Mazurek-Popczyk J, Arkusz K *et al*. Susceptibility to biofilm formation on 3D-printed titanium fixation plates used in the mandible: a preliminary study. *J Oral Microbiol* 2020; **12**: 1838164.
- 4 Dragoš A, Kovács Á. The peculiar functions of the bacterial extracellular matrix. *Trends Microbiol* 2017; **25**: 257–66.
- 5 Flemming HC. The perfect slime. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2011; **86**: 251–9.
- 6 Kline KA, Fälker S, Dahlberg S *et al*. Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell Host Microbe* 2009; **5**: 580–92.
- 7 Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell* 2015; **6**: 26–41.
- 8 Roche FM, Downer R, Keane F *et al*. The N-terminal A domain of fibronectin-binding proteins A and B promotes adhesion of *Staphylococcus aureus* to elastin. *J Biol Chem* 2004; **279**: 38433 – 40.
- 9 Otto M. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu Rev Med* 2013; **64**: 175–88.
- 10 Kiedrowski MR, Horswill AR. New approaches for treating staphylococcal biofilm infections. *Ann N Y Acad Sci* 2011; **1241**: 104–21.
- 11 Utsui Y, Yokota T. Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; **28**: 397-403.
- 12 Vinh DC, Embil JM. Device-related infections: a review. *J Long Term Eff Med Implants* 2005; **15**: 467-88.
- 13 Evans RC, Holmes CJ. Effect of vancomycin hydrochloride on *Staphylococcus epidermidis* biofilm associated with silicone elastomer. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; **31**: 889–94.
- 14 Prosser BL, Taylor D, Dix BA *et al*. Method of evaluating effects of antibiotics on bacterial biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; **31**: 1502-6.
- 15 Stewart PS. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol* 2002; **292**: 107-13.

- 16 Singh R, Ray P, Das A *et al.* Role of persisters and small-colony variants in antibiotic resistance of planktonic and biofilm-associated *Staphylococcus aureus*: an in vitro study. *J Med Microbiol* 2009; **58**: 1067–73.
- 17 Garcia LG, Lemaire S, Kahl BC *et al.* Antibiotic activity against small-colony variants of *Staphylococcus aureus*: review of in vitro, animal and clinical data. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**: 1455–64.
- 18 Chen L, Wen YM. The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies. *Int J Oral Sci* 2011; **3**: 66-73.
- 19 Leite B, Gomes F, Teixeira P *et al.* In vitro activity of daptomycin, linezolid and rifampicin on *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Curr Microbiol* 2011; **63**: 313-7.
- 20 Mascio CT, Alder JD, Silverman JA. Bactericidal action of daptomycin against stationary-phase and nondividing *Staphylococcus aureus* cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 4255–60.
- 21 Fernández-Barat L, Ferrer M, Sierra JM *et al.* Linezolid limits burden of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in biofilm of tracheal tubes. *Crit Care Med* 2012; **40**: 2385-9.
- 22 Ranganathan V. Biofilms: microbial cities of scientific significance. *Journal of Microbiology & Experimentation* 2014; **1**: 84-98.
- 23 Hoiczky E, Roggenkamp A, Reichenbecher M *et al.* Structure and sequence analysis of Yersinia YadA and Moraxella UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO J* 2000; **19**: 5989-99.
- 24 Scarselli M, Serruto D, Montanari P *et al.* Neisseria meningitidis NhhA is a multifunctional trimeric autotransporter adhesin. *Mol Microbiol* 2006; **61**: 631-44.
- 25 Bensing BA, López JA, Sullam PM. The *Streptococcus gordonii* surface proteins GspB and Hsa mediate binding to sialylated carbohydrate epitopes on the platelet membrane glycoprotein Ibalph. *Infect Immun* 2004; **72**: 6528-37.
- 26 Blomberg C, Dagerhamn J, Dahlberg S *et al.* Pattern of accessory regions and invasive disease potential in *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 2009; **199**: 1032-42.
- 27 Heilmann C. Adhesion mechanisms of staphylococci. *Adv Exp Med Biol* 2011; **715**: 105-23.
- 28 Clarke SR, Foster SJ. Surface adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Adv Microb Physiol* 2006; **51**: 187-224.
- 29 Rosen MJ, Kunjappu J, T. Characteristic features of surfactants. *in, Rosen, MJ & Kunjappu, JT (ed) Surfactants and Interfacial Phenomena. 4th edit* 2012: pp.1-37, John Wiley & Sons (New York).
- 30 渡辺昭一郎. 抗菌性界面活性剤の現状と動向. *油化学* 1980; 第 29 卷: 14-20.

- 31 Makino T, Jimi S, Oyama T *et al.* Infection mechanism of biofilm-forming *Staphylococcus aureus* on indwelling foreign materials in mice. *Int Wound J* 2015; **12**: 122-31.
- 32 Haraga I, Abe S, Jimi S *et al.* Increased biofilm formation ability and accelerated transport of *Staphylococcus aureus* along a catheter during reciprocal movements. *J Microbiol Methods* 2017; **132**: 63–8.
- 33 Jimi S, Miyazaki M, Takata T *et al.* Increased drug resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms formed on a mouse dermal chip model. *J Med Microbiol* 2017; **66**: 542-50.
- 34 Oyama T, Miyazaki M, Yoshimura M *et al.* Biofilm-forming methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* survive in kupffer cells and exhibit high virulence in mice. *Toxins (Basel)* 2016; **8**.
- 35 Bendouah Z, Barbeau J, Hamad WA *et al.* Use of an in vitro assay for determination of biofilm-forming capacity of bacteria in chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol* 2006; **20**: 434-8.
- 36 Cucarella C, Tormo MA, Knecht E *et al.* Expression of the biofilm-associated protein interferes with host protein receptors of *Staphylococcus aureus* and alters the infective process. *Infect Immun* 2002; **70**: 3180-6.
- 37 Schroeder K, Jularic M, Horsburgh SM *et al.* Molecular characterization of a novel *Staphylococcus aureus* surface protein (SasC) involved in cell aggregation and biofilm accumulation. *PLoS One* 2009; **4**: e7567.
- 38 Götz F. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol* 2002; **43**: 1367-78.
- 39 Veerachamy S, Yarlalagadda T, Manivasagam G *et al.* Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: a review. *Proc Inst Mech Eng H* 2014; **228**: 1083-99.
- 40 Sloup RE, Cieza RJ, Needle DB *et al.* Polysorbates prevent biofilm formation and pathogenesis of *Escherichia coli* O104:H4. *Biofouling* 2016; **32**: 1131-40.
- 41 NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Polysorbate 80 (CAS No. 9005-65-6) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Feed Studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser* 1992; **415**: 1 – 225.
- 42 Swidsinski A, Loening-Baucke V, Herber A. Mucosal flora in Crohn's disease and ulcerative colitis - an overview. *J Physiol Pharmacol* 2009; **60 Suppl 6**: 61-71.
- 43 Alexander JW. History of the medical use of silver. *Surg Infect (Larchmt)* 2009; **10**: 289–92.
- 44 Lansdown AB. Silver. I: Its antibacterial properties and mechanism of action. *J Wound Care* 2002; **11**: 125–30.
- 45 Marx DE, Barillo DJ. Silver in medicine: the basic science. *Burns* 2014; **40 Suppl 1**: S9–18.

- 46 Russell AD, Hugo WB. Antimicrobial activity and action of silver. *Prog Med Chem* 1994; **31**: 351–70.
- 47 Slawson RM, Lee H, Trevors JT. Bacterial interactions with silver. *Biol Met* 1990; **3**: 151–4.
- 48 Lansdown AB. Silver in health care: antimicrobial effects and safety in use. *Curr Probl Dermatol* 2006; **33**: 17–34.
- 49 由良二郎. Silver sulfadiazine に関する細菌学的検討. *日本化学療法学会雑誌* 1980; **28** 巻: 1163-70.
- 50 田辺三菱製薬株式会社. *ダ ーベン<sup>®</sup> クリーム 1%*, Vol. 2013 年 7 月改訂 (第 8 版) : 田辺三菱製薬株式会社. 1982.
- 51 Carr HS, Wlodkowski TJ, Rosenkranz HS. Silver sulfadiazine: in vitro antibacterial activity. *Antimicrob Agents Chemother* 1973; **4**: 585–7.
- 52 Fox CL, Modak SM. Mechanism of silver sulfadiazine action on burn wound infections. *Antimicrob Agents Chemother* 1974; **5**: 582–8.
- 53 Heyneman A, Hoeksema H, Vandekerckhove D *et al.* The role of silver sulphadiazine in the conservative treatment of partial thickness burn wounds: A systematic review. *Burns* 2016; **42**: 1377–86.
- 54 Percival SL, Bowler PG, Russell D. Bacterial resistance to silver in wound care. *J Hosp Infect* 2005; **60**: 1–7.
- 55 Fuller FW, Parrish M, Nance FC. A review of the dosimetry of 1% silver sulfadiazine cream in burn wound treatment. *J Burn Care Rehabil* 1994; **15**: 213–23.
- 56 Hoffmann S. Silver sulfadiazine: an antibacterial agent for topical use in burns. A review of the literature. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1984; **18**: 119–26.
- 57 Miller AC, Rashid RM, Falzon L *et al.* Silver sulfadiazine for the treatment of partial-thickness burns and venous stasis ulcers. *J Am Acad Dermatol* 2012; **66**: e159–65.
- 58 WHO. *World Health Organization model list of essential medicines*. In. Geneva. 2019.
- 59 Fuller FW. The side effects of silver sulfadiazine. *J Burn Care Res* 2009; **30**: 464–70.
- 60 Abedini F, Ahmadi A, Yavari A *et al.* Comparison of silver nylon wound dressing and silver sulfadiazine in partial burn wound therapy. *Int Wound J* 2013; **10**: 573–8.
- 61 Chaby G, Viseux V, Poulain JF *et al.* [Topical silver sulfadiazine-induced acute renal failure]. *Ann Dermatol Venereol* 2005; **132**: 891–3.
- 62 Muller MJ, Hollyoak MA, Moaveni Z *et al.* Retardation of wound healing by silver sulfadiazine is reversed by Aloe vera and nystatin. *Burns* 2003; **29**: 834–6.
- 63 Carter MJ, Tingley-Kelley K, Warriner RA. Silver treatments and silver-impregnated dressings for the healing of leg wounds and ulcers: a systematic review and meta-analysis. *J Am Acad Dermatol* 2010; **63**: 668–79.



- 64 Adhya A, Bain J, Ray O *et al.* Healing of burn wounds by topical treatment: A randomized controlled comparison between silver sulfadiazine and nano-crystalline silver. *J Basic Clin Pharm* 2014; **6**: 29–34.
- 65 Liu X, Gan H, Hu C *et al.* Silver sulfadiazine nanosuspension-loaded thermosensitive hydrogel as a topical antibacterial agent. *Int J Nanomedicine* 2019; **14**: 289–300.
- 66 Dellera E, Bonferoni MC, Sandri G *et al.* Development of chitosan oleate ionic micelles loaded with silver sulfadiazine to be associated with platelet lysate for application in wound healing. *Eur J Pharm Biopharm* 2014; **88**: 643–50.
- 67 Kumar PM, Ghosh A. Development and evaluation of silver sulfadiazine loaded microsphere based gel for partial thickness (second degree) burn wounds. *Eur J Pharm Sci* 2017; **96**: 243–54.
- 68 Winter HR, Unadkat JD. Identification of cytochrome P450 and arylamine N-acetyltransferase isoforms involved in sulfadiazine metabolism. *Drug Metab Dispos* 2005; **33**: 969–76.
- 69 Nouws JF, Firth EC, Vree TB *et al.* Pharmacokinetics and renal clearance of sulfamethazine, sulfamerazine, and sulfadiazine and their N4-acetyl and hydroxy metabolites in horses. *Am J Vet Res* 1987; **48**: 392–402.
- 70 Agostinho AM, Hartman A, Lipp C *et al.* An in vitro model for the growth and analysis of chronic wound MRSA biofilms. *J Appl Microbiol* 2011; **111**: 1275-82.
- 71 Lemire JA, Kalan L, Bradu A *et al.* Silver oxynitrate, an unexplored silver compound with antimicrobial and antibiofilm activity. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; **59**: 4031-9.
- 72 田尻豊和, 自見至郎. 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. *福岡大学医学紀要* 2015; **42**: 119 - 29.
- 73 Saran L, Cavalheiro E, Neves EA. New aspects of the reaction of silver(I) cations with the ethylenediaminetetraacetate ion. *Talanta* 1995; **42**: 2027-32.
- 74 Negoro H. Colorimetric estimation of PAS using tsuda reagent. *YAKUGAKU ZASSHI* 1951; **71**: 209–10.
- 75 Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U *et al.* Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* 2016; **14**: 563-75.
- 76 Harms A, Maisonneuve E, Gerdes K. Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. *Science* 2016; **354**.
- 77 de Sousa JKT, Haddad JPA, de Oliveira AC *et al.* In vitro activity of antimicrobial-impregnated catheters against biofilms formed by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Appl Microbiol* 2019; **127**: 1018-27.

- 78 Mohseni M, Shamloo A, Aghababaie Z *et al.* A comparative study of wound dressings loaded with silver sulfadiazine and silver nanoparticles: In vitro and in vivo evaluation. *Int J Pharm* 2019; **564**: 350-8.

## 発表論文

本研究の成果は、下記の学術雑誌に掲載されている。

1. Ueda Y, Mashima K, Miyazaki M, Hara S, Takata T, Kamimura H, Takagi S, Jimi S. Inhibitory effects of polysorbate 80 on MRSA biofilm formed on different substrates including dermal tissue. *Scientific Reports*. 2019; 9(1):3128.
2. Ueda Y, Miyazaki M, Mashima M, Takagi S, Hara S, Kamimura H, Jimi S. The Effects of Silver Sulfadiazine on Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Microorganisms*. 2020 Oct 8; 8(10):E1551.