

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

上田 裕

福岡大学病院薬剤部 〒814-0180 福岡市城南区七隈7-45-1

Research for clinically applicable substances that inhibit biofilm formed by MRSA

Yutaka Ueda

Department of Pharmacy, Fukuoka University Hospital,
7-45-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan**Abstract**

Biofilm (BF) infections are a serious medical problem because BF removal is difficult and the infected sites are intractable. However, effective medical methods to prevent and treat BF formation have not yet been established. In this study, BF infections were comprehensively studied from the viewpoint of methods of preventing BF formation and methods of destruction and bactericidal treatment after BF formation.

Surfactants act on BFs, but their mode of action remains unknown. In this study, we investigated the inhibitory effect of four different surfactants on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) BF formation and found that a nonionic surfactant, polysorbate 80 (PS 80), was the most suitable. The BF inhibitory effects resulted from the inhibition of bacterial adhesion to substrates rather than BF disruption. These results indicate that PS 80 is effective to prevent BF formation by MRSA on tissues and foreign bodies. Therefore, PS 80 may be used in medical practice as a washing solution for wounds and/or pretreatment of indwelling catheters.

Silver sulfadiazine (SSD) is a chemical complex that is clinically used to prevent wound infections after injury. However, its effects on BFs remain unclear. In this study, we aimed to analyze the mechanisms underlying the action of SSD on BFs formed by MRSA. The antibacterial effects of SSD were a result of silver ions and not sulfadiazine. Ionized silver from SSD in culture media was lower than that from silver nitrate; however, SSD, rather than silver nitrate, eradicated mature BFs by killing bacteria. In SSD, sulfadiazine selectively bound to BFs, and silver ions were then liberated. These results indicate that SSD is an effective compound for the eradication of BFs; thus, SSD should be used for the removal of BFs formed on wounds.

keywords : biofilm, MRSA, polysorbate 80, silver sulfadiazine, surfactant

【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 [1, 2]。中心静脈カテーテルや人工関節など生体内留置の医療器具上に 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 [3-5]。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 [6]。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 [7, 8]。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

【目的】

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。

【実験方法】

高BF形成能を有するMRSA臨床株(ATCC BAA-2856)を用いた。菌はTryptic Soy Broth (TSB)を用い、37℃、閉鎖系環境下で24時間培養した。菌の増殖能は吸光度により測定し、生菌数はcolony forming unit (CFU) アッセイを用いた。BFはCrystal violet (CV) 染色およびAlcian blue (ALB) で染色し、形態観察および定量化を行った。界面活性剤は、陽イオン系: 塩化ベンザルコニウム (BZC)、陰イオン系: ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、両性イオン系: 3-(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio-1-propane-sulphonate (CHAPS) および非イオン系: PS80の4種類を用い、プラスチック、皮膚組織、シリコンおよびステンレス上でのBF形成量を検討した。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。

【結果/考察】

マウス3T3線維芽細胞に対する影響は、PS80は最大濃度0.5%においても、細胞生存率は50%低下しか示さず、4種の中で最も軽度の細胞毒性であった。生体細胞毒性効果は最小限に抑えられた。次に、ATCC BAA-2856に対するBF形成抑制効果を検討した (Fig. 1)。すべての界面活性剤において、BF形成抑制効果を示し、高濃度のBZCおよびSDSは菌毒性を示し、そのBF形成抑制効果のメカニズムは、殺菌によるBF形成抑制であった。一方で、CHAPS及びPS80は、菌毒性のない濃度で、BF形成抑制作用を認めた (Fig. 1)。

菌毒性を示さず、BF抑制効果の強かったPS80の作用機序を検討するために、少量の菌液を24時間中のBF形成期間の6時間までの1時間毎0.5%PS80を添加した (Fig. 2)。0.5%PS80のBF阻害効果は、培養開始直後から4時間目までの早期でのみ認められ、その後その効果は消失した (Fig. 2)。この結果から、PS80はBFの成熟期ではなく、基質への付着を含むBF形成早期にのみ作用することが示唆された。

様々な菌付着基質に対する効果を検討したところ、プラスチック基質のみならず、皮膚組織に対してもBF形成抑制効果を認めた (Fig. 3)。また、シリコン基質でも効果を認めたが、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。

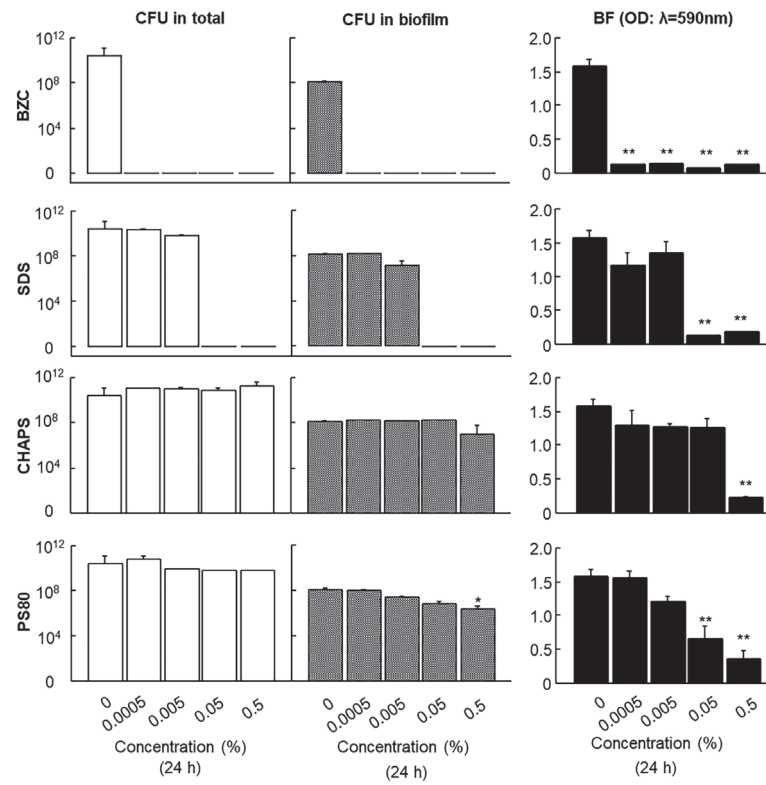


Fig. 1 Effects of different surfactants on CFU and biofilm formation values of ATCC BAA-2856 cultured in plastic tubes.

Data are presented as mean \pm SE, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. vehicle control.

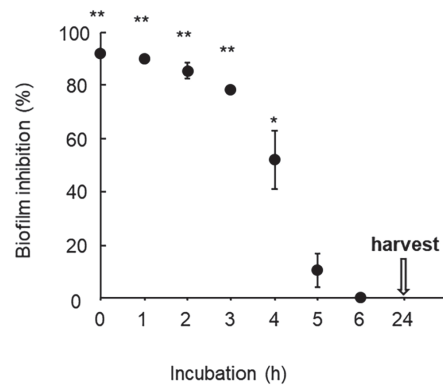


Fig. 2 Inhibitory effects of 0.5% PS 80 addition at different time points on biofilm formation during 24 h incubation.

Data are presented as mean \pm SE, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. vehicle control.

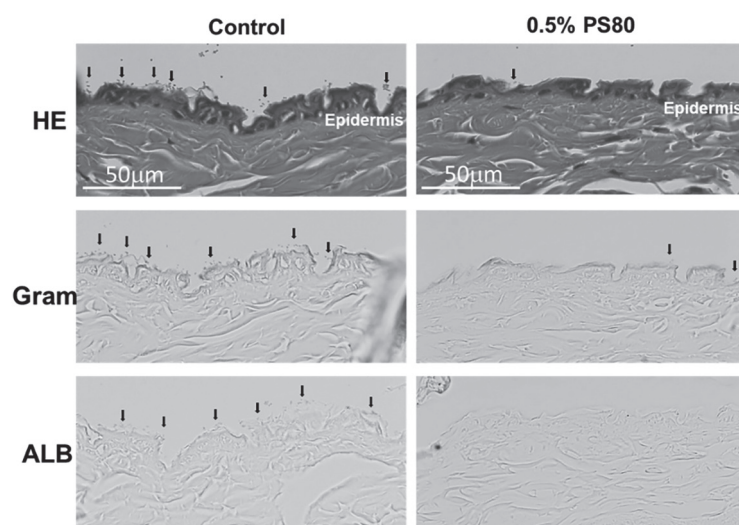


Fig. 3 Inhibitory effects of 0.5% PS80 on bacterial attachment to dermal chips. Serial sections of dermal chips were subjected to HE, Gram and ALB staining after incubation in confluent bacterial solutions.

第2章 MRSA形成BFに対するスルファジアジン銀 (SSD) の効果

【目的】

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 [9]。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ナトリウム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 [10] 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_3) や SD の効果と比較検討した。

【実験方法】

高BF形成能を有するMRSA臨床株(ATCC BAA-2856)を用いた。培養菌液に幅1cmのプラスチックシート(OHPシート)を入れ、37℃、24時間培養により、表面にBFを形成させたものをBFチップ(1×1cm)とした。対象物質は、SSD、 AgNO_3 、スルファジアジン(SD)を用いた。様々な濃度に希釈した抗菌物質入り培養液にBFチップを沈め、37℃、24時間培養後の効果を、BF由来浮遊菌の最小増殖阻止濃度(bMIC)、最小殺菌濃度(bMBC)およびBF内根絶濃度(MBEC)として決定した。生菌数はCFUアッセイを用いた。また、抗菌物質入り培養液中の銀イオン濃度を銀イオン測定器を用いて測定した。BFはCV染色し、形態観察および定量化を行った。

【結果/考察】

SSD、 AgNO_3 、SDの中で、検討した濃度範囲において、SSDのみがBFに対し殺菌効果を示し、SDには殺菌効果は全くなかった(Table 1)。

その殺菌効果は銀イオンが重要であると考えた。しかし、培養液中のSSDから遊離した銀イオン濃度は、 AgNO_3 より700µM以上で優位に少なかった(Fig. 4)。

Table 1. Summary of antimicrobial threshold values.

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

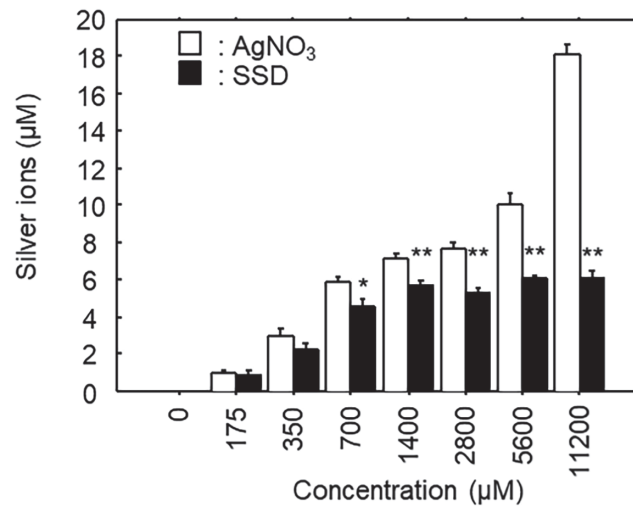


Fig. 4 Medial ionized silver concentrations.

Data are presented as the mean \pm SE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. AgNO₃.

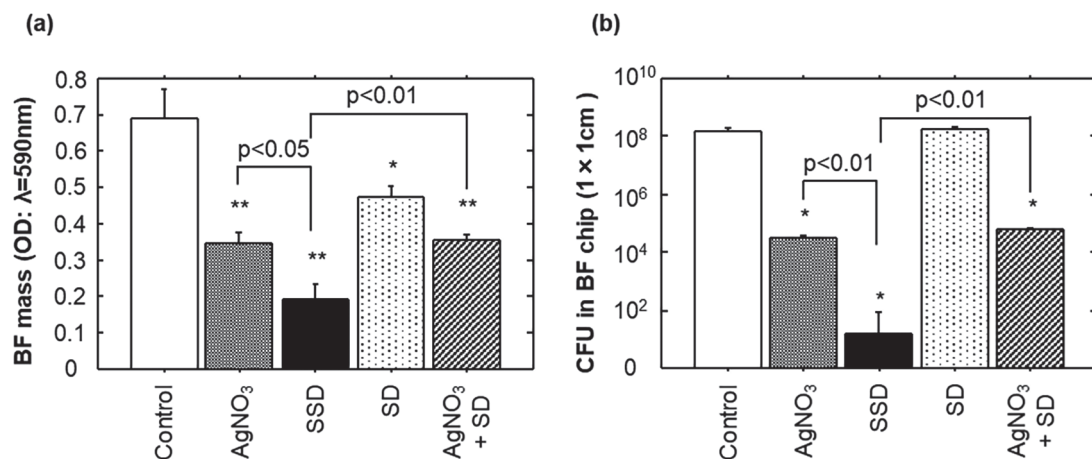


Fig. 5. Effects of the compounds on mature BFs formed on plastic chips.

The effects of the compounds (2800 μM) after 24 h incubation at 37°C on BF masses (a), and CFU values (b) were determined. Data are presented as the mean \pm SE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. negative control.

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AgNO₃を同時添加してもSSDと同等の殺菌効果とBF抑制効果はなかった (Fig. 5)。

最後に、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2800μMから>5600μMへ減弱した。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 (Fig. 6)。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。

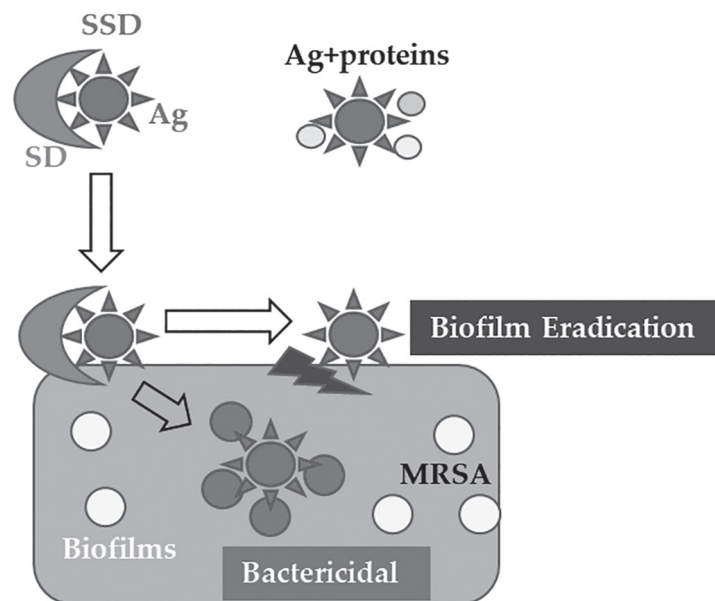


Fig. 6 Working hypothesis of the action of SSD on biofilms formed by MRSA

【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。

【参考文献】

1. DeLeo, F. R. & Chambers, H. F. Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. *J Clin Invest* **119**, 2464-2474, doi: 10.1172/JCI38226 (2009).
2. Jevons, M. P., Coe, A. W. & Parker, M. T. Methicillin resistance in staphylococci. *Lancet* **1**, 904-907, doi: 10.1016/s0140-6736(63)91687-8 (1963).
3. Otto, M. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu Rev Med* **64**, 175-188, doi:10.1146/annurev-med-042711-140023 (2013).
4. Kiedrowski, M. R. & Horswill, A. R. New approaches for treating staphylococcal biofilm infections. *Ann N Y Acad Sci* **1241**, 104-121, doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06281.x (2011).
5. Utsui, Y. & Yokota, T. Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **28**, 397-403 (1985).
6. Palka, L., Mazurek-Popczyk, J., Arkusz, K. & Baldy-Chudzik, K. Susceptibility to biofilm formation on 3D-printed titanium fixation plates used in the mandible: a preliminary study. *J Oral Microbiol* **12**, 1838164, doi: 10.1080/20002297.2020.1838164 (2020).
7. Evans, R. C. & Holmes, C. J. Effect of vancomycin hydrochloride on *Staphylococcus epidermidis* biofilm associated with silicone elastomer. *Antimicrob Agents Chemother* **31**, 889-894 (1987).
8. Prosser, B. L., Taylor, D., Dix, B. A. & Cleeland, R. Method of evaluating effects of antibiotics on bacterial biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* **31**, 1502-1506 (1987).
9. Alexander, J. W. History of the medical use of silver. *Surg Infect (Larchmt)* **10**, 289-292, doi: 10.1089/sur.2008.9941 (2009).
10. Agostinho, A. M. *et al.* An *in vitro* model for the growth and analysis of chronic wound MRSA biofilms. *J Appl Microbiol* **111**, 1275-1282, doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05138.x (2011).