

論文要旨

Biofilm Formation by and Accessory Gene Regulator Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Recovered From Patients With Nosocomial Infections.

(院内感染症患者から分離されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成能と accessory gene regulator typing)

眞砂 州宏

【背景】

バイオフィームは尿道カテーテルや気管内チューブなどへの菌の強固な付着を促すため、院内感染の発症に重要な役割を果たしている。病院内で分離されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（以下 MRSA と略す）のバイオフィーム形成に関する広範な疫学的調査や関連遺伝子の検討はこれまで報告がない。

【目的】

MRSA 院内感染症患者から分離された MRSA について、バイオフィーム形成能およびバイオフィーム関連遺伝子の一つである accessory gene regulator (以下 *agr* と略す) typing を、保菌患者由来の株と比較し、その意義を検討した。

【対象】

2000 年 1 月から 2002 年 12 月までの 3 年間に、鹿児島大学病院で検出された MRSA を対象とした。MRSA 感染症サーベイランスで感染症と判断された入院患者の感染局所から分離された MRSA 121 株を感染症群、その他の入院患者の鼻腔・咽頭から分離され保菌と判断された MRSA 287 株を保菌群とした。

【方法】

バイオフィーム形成能は 96 穴ポリスチレン平底マイクロタイター・プレートで菌を一晚培養し、洗浄後底部に残ったバイオフィームをクリスタル紫で染色し、マイクロプレートリーダー(吸光度 595nm) で測定した。MRSA の遺伝子型は、*spa* typing、パルスフィールドゲル電気泳動、*mec*-hypervariable region の PCR および sequence typing、toxin genotyping によって分類し、同一クローンの株は除外した。*agr* typing は multiplex PCR 法で 4 型に分類した。

【結果】

同一遺伝子型の株を除いた結果、感染症群 91 株、保菌群 225 株を対象とした。バイオフィルム形成能は、感染症群では 0.384 ± 0.555 、保菌群では 0.226 ± 0.278 で、感染症群で有意に強かった ($p=0.0001$)。agr type 別では agr-1 の出現頻度は感染症群で有意に低く ($p<0.0001$)、agr-2 の出現頻度は感染症群で有意に高かった ($p<0.0001$)。agr-3 の出現頻度は両群とも低く有意差はなかった。agr-4 は両群とも検出されなかった。また、バイオフィルム形成能は、agr-1 では 0.087 ± 0.136 で、agr-2 の 0.365 ± 0.441 、agr-3 の 0.203 ± 0.201 に比べて有意に弱かった ($p<0.0001$)。

【考察】

感染症群のバイオフィルム形成能が保菌群に比べて有意に高く、バイオフィルム形成能の強い MRSA 株が院内感染の発症に関連していることが示唆された。一方、保菌群の中にも強いバイオフィルム形成を示す株もあり、このような株の保菌者が侵襲的な処置を受ける際は、院内感染の発症に注意が必要と考えられた。

agr は菌の密度を感知する quorum-sensing system を司る遺伝子の一つである。agr typing に関しては、agr-2 株、agr-3 株のバイオフィルム形成能が agr-1 株に比べて有意に強いことから、agr type がバイオフィルム形成能に関連していると考えられた。また、バイオフィルム形成能の強い agr-2 の出現頻度が感染症群で有意に高いことから、agr type が院内感染の発症に関連していると考えられた。

論文審査の要旨

報告番号	医論第 1437 号	氏名	真砂 州宏
審査委員	主査	小田 紘	
	副査	上村 裕一	高松 英夫

Biofilm Formation by and Accessory Gene Regulator Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Recovered From Patients With Nosocomial Infections.

(院内感染症患者から分離されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌のバイオフィルム形成能と accessory gene regulator typing)

MRSA は院内感染症の重要な原因菌であり、またバイオフィルムはカテーテルなどへの菌の強固な付着を促すため、院内感染の発症に重要な役割を果たしている。しかし、院内感染における広範な疫学的調査や関連遺伝子の検討はこれまで報告がない。今回の研究は、MRSA 院内感染症患者から分離された MRSA について、バイオフィルム形成能およびバイオフィルム関連遺伝子である accessory gene regulator (以下 agr と略す) typing を、保菌患者由来の株と比較、検討することを目的としている。

本研究では、2000 年から 2002 年までに鹿児島大学病院で検出された MRSA408 株を用いている。バイオフィルム形成能は、マイクロタイター・プレート上で菌を培養し、洗浄後プレートに付着した菌をクリスタル紫で染色し、吸光度を測定している。agr typing は multiplex PCR 法で分類している。同一遺伝子型の重複を避けるため、遺伝子型分類を行い、各遺伝子型からは 1 株のみを選択している。その結果、MRSA 感染症患者から分離された 91 株を感染症群、その他の入院患者の鼻腔・咽頭から分離され保菌と判断された 225 株を保菌群とし、バイオフィルム形成能と agr typing を比較検討している。

本研究で得られた新知見は次の 3 点である。

1. 感染症群のバイオフィルム形成能は、保菌群に比べて有意に高い。
2. agr-2、agr-3 株のバイオフィルム形成能は、agr-1 株に比べて有意に高い。
3. 感染症群では agr-2 の頻度が優位に高く、保菌群では agr-1 の頻度が有意に高い。

以上により、バイオフィルム形成能が院内感染に関連しており、agr type がバイオフィルム形成能と院内感染の発症に関連していることが証明された。

本研究は、MRSA 院内感染とバイオフィルム形成能、agr type との関連を明らかにし、MRSA 院内感染症の発生機序や発生予防についての新しい視点を与えた。よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

試験（学力確認）の結果の要旨

報告番号	医論第 1437 号	氏名	真砂 州宏
審査委員	主査	小田 紘	
	副査	上村 裕一	高松 英夫

主査および副査の3名は、平成18年9月20日、学位請求者・真砂 州宏に面接し、学位請求論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれも満足すべき回答を得ることができた。

質問1: 院内感染症の判定基準はCDCガイドラインのものか。対象株の選択基準は何か。

回答: CDCガイドラインを基に作成された院内の感染防止対策マニュアルによった。対象は、3年間に入院患者から分離した株(一人一株)とし、保菌株は鼻腔、咽頭から分離した株に限定し、感染症株では皮膚疾患など判定に難しい株は除外した。

質問2: バイオフィルムにおける polysaccharide intercellular adhesion(PIA)の実態は何か。

回答: 多糖体で形成され、MRSAが増殖、凝集する過程で分泌されるものである。

質問3: テーブルなどの表面に形成されたバイオフィルムを触った医療従事者が、患者に菌を移す可能性があるか。乾燥した状況下や、人の手にもバイオフィルムが形成されるか。

回答: バイオフィルムに触れることで、表面の菌株が患者へ移行する可能性はあると考えられる。乾燥した状況下でもバイオフィルムは形成され、手洗いが不十分ならば、手、とくに爪の生え際などに形成される。

質問4: *agr* quorum-sensing system で、*agr*が菌の密集度を感知する産物を作るのか。

回答: *agr*そのものが菌の密度を感知する遺伝子であり、同時に Autoinducer という密集度を示す物質を産生している。

質問5: バイオフィルムが作られると、症状が悪化するのか。

回答: 症状が強くなるというよりは、慢性的な感染症の状態になる。バイオフィルムが形成されると、生体との接触が少ないため、症状や炎症反応が出にくい場合もある。

質問6: バイオフィルム形成能と吸光度は相関するか。他の測定法はないか。

回答: 吸光度が必ずしもバイオフィルム形成能そのものではないが、ほぼ相関していると考えている。吸光度測定以外にも糖濃度を測定する方法などもあるが、吸光度を測定する方法は簡便な方法であり、比較的広く用いられている。

質問7: *agr* quorum-sensing system で *agr*B,D,C,A と *agr*1,2,3,4 の関係は? *agr*A, *agr*B, *agr*C, *agr*D ごとに検討する必要はないか。

回答: *agr*1,2,3,4 は、*agr*B,D,C の領域の遺伝子配列の違いで分類したものであり、*agr*B,D,C の有無をみているわけではないので、個別に調べる必要はないと考えるが、今後型ごとに個別の蛋白がどのように変化しているのかを検討する必要がある。

質問 8: *agr4* が検出されなかった理由は何か。

回答: *agr4* は市中型 MRSA に多いタイプで、今回の研究は院内感染症の株を対象としたためと考える。

質問 9: 保菌の状態に何らかの刺激が加わって、遺伝子、特に *agrB,D,C* の領域に変化が生じ、感染症に移行するのか。あるいは他の遺伝子型分類などにも関連するのか。

回答: 今回の研究では遺伝子操作は行っていないが、遺伝子が突然変異してバイオフィルム形成能に変化が生じる可能性もあると考える。また、quorum-sensing system は *agr* だけではなく、他のシステムもあり、それらを総合的に判断していかなければならない。

質問 10: 侵襲が加わると生体の抵抗力が落ちて、それにより制御が効かなくなり、感染症に移行すると考えているのか。

回答: 宿主の状況が最も重要と考える。中心静脈カテーテル、尿道カテーテル、気管内挿管などの侵襲的処置そのものが感染症を起こしやすくなる。

質問 11: 処置前にバイオフィルム形成能を調べることで、院内感染の予防に役立つとしているが、現実的に測定の期間などを考えると、実用性についてはどう考えているか。

回答: 緊急処置には間に合わない場合もあるが、2~3日で結果が得られるため待機手術などでは有用と考える。

質問 12: バイオフィルム形成が強い場合、菌の増殖が進んだ状態と考えるなら、菌の密度を感知し増殖を抑制する *agr* quorum-sensing system でのコントロールが弱かった、あるいは遅れたと考えるのか。

回答: 菌の増殖の速さ自体には差はないと考えるが、*agr* は本来バイオフィルム形成を抑える作用がある。*agr-2* の場合、菌の密度を感知する閾値が違うなどの理由で、その制御機能が失われているのかもしれない。

質問 13: SarA はどのような病原因子に関連するか。

回答: TSST-1 やエンテロトキシン B, C, D などの毒素や protein A などである。

質問 14: 培養条件 (温度や成分) によって、バイオフィルム形成能は影響を受けるものか。

回答: 培養条件は影響する。今回は院内感染の観点から、生体での反応を考えて 37°C で培養している。グルコースの濃度によっても影響を受けるが、今回の実験での 0.25% は過去の報告に基づいて行っているが、必ずしも生体内の濃度ではない。

質問 15: コロニーの形態やそのほかの産物などでの違いはなかったか。

回答: コロニーの形態に違いが認められなかったが、溶血素産生などの表現型の違いは株によってみられた。

質問 16: バイオフィルムと病原性の関連が問題であるが、臨床の場で他に病原性を判定する方法はあるか。

回答: 株によって病原性の違いはあると思われるので、今後新たな評価方法が開発されれば、院内感染症対策に有用であると考えます。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者と同等あるいはそれ以上の学力・識見を有しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。