

論 文 要 旨

Quantitative analysis of biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains from patients with orthopaedic device-related infections

整形外科領域デバイス関連感染症発症患者から
分離されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌株に
おけるバイオフィーム形成能の検討

川村 英樹

【序論および目的】

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)は院内感染の原因として重要な薬剤耐性菌であり、整形外科領域感染症における主要起炎菌の一つである。MRSAは多くの医療器材上でバイオフィームを形成し付着することが知られている。また整形外科領域では特に人工関節や内固定材等デバイスを用いる手術が多く、時にデバイス関連感染症が問題となり、生命予後や著しいADL障害をきたすことがある。しかしながらMRSAに起因する整形外科領域デバイス関連感染症におけるバイオフィーム形成能を検討した報告は少ない。今回われわれはMRSAによる整形外科領域デバイス関連感染と原因菌株のバイオフィーム形成能について検討を行った。

【材料および方法】

1999年から2009年までに分離された創部感染由来菌株78菌株、および術前に分離された鼻腔保菌90株を用いた。さらに創部由来菌株をデバイス関連感染群23菌株、デバイス非関連感染群55菌株の2群に分類した。パルスフィールド電気泳動法、SCC*mec*型、毒素遺伝子型、*spa*型、*agr*型、*mec*-HVR型による遺伝子タイピングを行い、またバイオフィーム関連遺伝子である*icaAD*、*fnbAB*、*cna*、*clf*、*bbp*各遺伝子の保有についてPCR法を用い検討した。各菌株のバイオフィーム形成能は0.25%グルコース添加TSBを用いたマイクロタイタープレート法で測定し、吸光度(595nm)で定量化したものをbiofilm indexとし検討した。

【結果】

デバイス関連感染群は鼻腔保菌群と比較し、有意に *agr-2* 型が多かった(78.3% vs. 34.4%, $p=0.001$)。バイオフィーム関連遺伝子保有率は各群間に差を認めなかった。バイオフィーム形成能は *agr-2* 型株(mean \pm SD, 0.523 ± 0.572)が *agr-1* 型株(0.260 ± 0.418 , $p<0.0001$)および *agr-3* 型株(0.379 ± 0.557 , $p=0.045$)と比較し有意に高かった。またデバイス関連感染群のバイオフィーム形成能(0.517 ± 0.517)はデバイス非関連感染群と比較し有意に高かった(0.328 ± 0.453 , $p=0.039$)が、鼻腔保菌群とは有意差を認めなかった(0.411 ± 0.558 , $p=0.104$)。低いバイオフィーム形成能を示す *agr-1* 菌株群の95パーセンタイル値にあたる biofilm index 0.50 を cut off 値としバイオフィーム形成能を検討したが、デバイス関連感染群(10/23, 43.5%)はデバイス非関連感染群(7/55, 12.7%, $p=0.003$)および鼻腔保菌群(18/90, 20.0%, $p=0.020$)と比較し高いバイオフィーム形成能をもつ菌株が有意に多かった。

【結論及び考察】

agr 遺伝子はブドウ球菌における病原調節遺伝子として知られている。*agr* 型でバイオフィーム形成能に差があることから、*agr* 遺伝子型は菌側病原因子の一つとして考えられる。デバイス関連感染群には高バイオフィーム形成能をもつ *agr-2* 型の分離頻度が多く、このことがデバイス関連感染症発症に関与している可能性が示唆された。

(FEMS Immunology and Medical Microbiology. in press)

論文審査の要旨

報告番号	総研第 162 号		学位申請者	川村 英樹
審査委員	主査	中川 昌之	学位	博士 (医学)
	副査	上村 裕一	副査	垣花 泰之
	副査	井上 博雅	副査	吉家 清貴

Quantitative analysis of biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains from patients with orthopaedic device-related infections

(整形外科領域デバイス関連感染症発症患者から分離されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌株におけるバイオフィーム形成能の検討)

バイオフィーム形成は感染症難治化の要因であり、特にデバイス関連感染症の難治・慢性化に関与していることがこれまでカテーテル関連尿路感染症・血流感染症などで報告されている。しかしながら整形外科領域のデバイス関連感染症での報告は少ない。そこで学位申請者らは整形外科領域感染症の主要起炎菌でありかつ薬剤耐性菌として問題となる MRSA の臨床分離菌株を用い、デバイス関連感染症群・非デバイス関連感染症群・鼻腔保菌群に分類し、これらのバイオフィーム形成能とバイオフィーム形成に関連する遺伝子タイピングの相違について検討をおこなった。バイオフィーム形成能に関してはマイクロタイタープレート法で吸光度を測定し Biofilm index と定義し、また病原調節遺伝子である *agr* タイピング、バイオフィーム形成に関連する遺伝子の保有について PCR 法を用い検討を行った。

その結果、本研究では以下の知見が明らかにされた。

- 1) *agr* タイピングの結果デバイス関連感染症群では *agr-2* 型の頻度が高く、*agr-1* 型の頻度が少なかった。
- 2) 細胞外マトリックス接着因子遺伝子である *icaA*, *fnbAB*, *clfA*, *bbp*, *cna* 遺伝子の保有に関しては各群間に有意差を認めなかった。
- 3) *agr* 型別では *agr-2* 型が *agr-1* 型や *agr-3* 型と比較し高いバイオフィーム形成能を示した。
- 4) 病態別バイオフィーム形成能に関してはデバイス関連感染症群が非デバイス関連群より有意に高く、また Biofilm index 0.50 をカットオフ値とした場合、高バイオフィーム形成能菌株はデバイス関連感染症群が非デバイス関連感染症群、鼻腔保菌群と比較し有意に高頻度であった。

以上より MRSA による整形外科領域デバイス関連感染症の病態にバイオフィーム形成能が関与していること、またその差異には *agr* 遺伝子型の差異が関連していることが示唆された。バイオフィーム形成能がデバイス関連感染症の直接的発症要因となりうるかについてはさらなる検討が望まれる。しかし、整形外科領域の感染症におけるバイオフィーム形成に関する疫学的研究は少なく、今後臨床の現場において MRSA 感染制御の一助となる意義のある研究として判定される。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断した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 162 号		学位申請者	川村 英樹
審査委員	主査	中川 昌之	学位	博士 (医学)
	副査	上村 裕一	副査	垣花 泰之
	副査	井上 博雅	副査	吉家 清貴
<p>主査および副査の5名は、平成23年12月19日、学位申請者 川村 英樹 君に面接し、学位申請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、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) MRSA のバイオフィーム形成能が整形外科領域デバイス関連感染症の発症要因であるという仮説について他の見方はないのか？</p> <p>(回答) 本研究は、デバイス関連感染症とバイオフィーム形成能の疫学的関連性を検討したものであって、ご指摘のように、直接的な発症要因とは言えない。直接的発症要因の検討には、臨床経過を含めたコントロール研究が必要と考える。</p> <p>質問2) MRSA のバイオフィーム形成の有無が整形外科領域デバイス関連感染症の病態と関連していると述べているが、この菌側因子が感染症を発症する因子となりうるか？</p> <p>(回答) デバイス関連感染症の病態として、菌がバイオフィームを形成し静止した状態からその後菌が増殖し感染症状が出現する病態と、菌血症から創部に菌が播種され感染症を発症する病態の2つが考えられる。前者ではバイオフィーム形成がデバイス関連感染のリスク因子としてはなりうるが、後者のような病態もあり、バイオフィーム形成能だけがデバイス関連感染症の発症要因とは言えないと考える。</p> <p>質問3) 培養条件によってバイオフィーム形成能には差が出ると考えられるが、そのような検討をおこなったか？</p> <p>(回答) NaCl 負荷では <i>ica</i>-dependent mechanism のバイオフィーム形成が、glucose 負荷では <i>ica</i>-independent mechanism のバイオフィーム形成が賦活化されるという報告があり、予備実験の段階で行ったが有意なバイオフィーム形成能の差異はみられなかった。また静置と振盪培養の違い、好気・嫌気培養の違い、また培養時間でもバイオフィーム形成能には差が出ることも予想されるが、今回の検討では実施していない。</p> <p>質問4) デバイス関連感染症の定義はどのようにおこなっているか？</p> <p>(回答) CDC/NHSN のサーベイランス基準に則り、排膿・発赤・腫脹・圧痛・発熱などの感染症状、医師の診断といった項目に当てはまるものを感染症と定義しており、それ以外の保菌は除外を行っている。今回デバイス関連感染症はすべて深部の感染症であり、デバイスを用いているが、直接デバイスとは関連しない表層感染症症例はデバイス関連感染群には含まれていない。</p> <p>質問5) バイオフィームが形成しているかどうかを可視化できるか？</p> <p>(回答) 実際に手術で用いたデバイスに形成されたバイオフィームを肉眼的に評価することはできない。しかし、今回用いたマイクロプレート法では染色しなくても肉眼的に見ることも可能である。</p> <p>質問6) 保菌者での菌側危険因子が予測できれば予防が可能と思われるが、予防方法はどのようなものがあるか？</p> <p>(回答) 現在遺伝子タイピングやバイオフィーム形成能を評価し実施してはいないが、臨床現場では保菌者に対しての除菌、コホーティング等の接触感染予防策やハイリスク手術に関してはバンコマイシンの予防投与を実施している。</p>				

最終試験の結果の要旨

質問7) 整形外科のデバイスで用いられる素材は何か?素材の違いによりバイオフィーム形成に差がでるか?

(回答) 整形外科領域デバイスの多くはチタン等の金属製である。素材の荷電状態等の違いによってバイオフィーム形成には差が出るのが予想されるが今回は検討していない。

質問8) 保菌群と感染群には遺伝子タイピングの結果に差が見られるが、どうしてこのような差が見られるのか?

(回答) 鼻腔の保菌には遺伝子型的に市中感染型 MRSA と推定される菌株も多く含まれており、院内環境だけでなく、市中環境で保菌されたものがあると思われる。一方感染群では、保菌者は発症リスクとはなるが、多くの感染症発症者は非保菌者である。非保菌者での発症者の大部分は院内環境での菌伝播によるものと考えられ、院内感染型 MRSA と推定される菌株の検出数が多くなると考えられる。また保菌者に対しては除菌を行っており、少なからず保菌で持ち込まれる菌による発症予防につながっていると考えられ、これらのことが、遺伝子型の差異をもたらしているものと考えられる。

質問9) 非デバイス群に含まれている疾患は何か?その場合の培養検体は何を用いているか?

(回答) 非デバイス群に含まれる感染症としては腫瘍摘出やデバイスを用いない脊椎手術の手術部位感染症の他に皮膚・軟部組織感染症や骨髄炎、関節炎なども含まれている。検体は深部であれば膿瘍、組織などで検体を採取している。

質問10) 高バイオフィーム形成菌株での発症例に臨床側のリスクファクターや臨床経過との関連があるか?

(回答) 感染症のリスクファクターに関しては今回菌側因子のみの検討であり、宿主側のリスク因子については検討を行っていない。デバイス群では感染発症後のドレナージ等を含めた手術回数や抗菌薬使用日数等に関して検討を行ったが明らかな差は認めなかった。

質問11) バイオフィーム形成能の評価にマイクロタイタープレート法を用いているが、その他の方法を検討すべきではなかったか?

(回答) バイオフィーム形成能を評価する方法としてはこれ以外にも電子顕微鏡による評価、radiolabel 法、共焦点レーザ法などがある。今回は約 200 株と多数の菌株に関しバイオフィーム形成能をスクリーニングするためマイクロタイタープレート法を用いた。マイクロタイタープレート法は半定量的測定法であり、また実際のスライム形成能ではなく、付着菌株数を見ているという欠点がある。しかし、スライム形成能は付着菌株数に相関すると考えられ、現在公表される論文でもバイオフィーム定量法としてマイクロタイタープレート法が最もよく用いられている方法である。今後他の方法でのバイオフィーム形成能を検討していきたいと考える。

質問12) Autoinducer peptide (AIP) は炎症反応の急性相に関与するのではないかと考えられる物質と考えられるが、宿主免疫との関連はどうか?

(回答) AIP は菌がかなり増殖した状態で低栄養となった場合菌間の情報伝達物質として細菌から放出され、agr 遺伝子を介し病原因子の発現とバイオフィーム抑制に関与する。黄色ブドウ球菌の病原因子と宿主免疫受容体との関連についての報告はみられるが、AIP やその他バイオフィーム構成成分と宿主免疫との関連については明らかになっていない。

質問13) agr-2型菌株はデバイス群>非デバイス群>保菌群の順に多いが、バイオフィーム形成能はデバイス群>保菌群>非デバイス群の順となる。この違いの差はなぜ生じるのか?

(回答) 保菌群の中には非デバイス群よりバイオフィーム形成能の高い strong biofilm former が多く見られる。このため保菌群のバイオフィーム形成能が非デバイス群より高くなっていると考えられる。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・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。