

東邦大学学術リポジトリ

Toho University Academic Repository

タイトル	Morphological and biological characteristics of staphylococcus aureus biofilm formed in the presence of plasma
別タイトル	血漿存在下で作成した黄色ブドウ球菌バイオフィルムの形態学的・生物学的特性
作成者（著者）	佐藤, 礼実
公開者	東邦大学
発行日	2020.03.15
掲載情報	東邦大学大学院医学研究科 博士論文 内容の要旨及び審査結果の要旨.
資料種別	学位論文
内容記述	主査：杉山篤 / タイトル：Morphological and biological characteristics of staphylococcus aureus biofilm formed in the presence of plasma / 著者：Ayami Sato, Tetsuo Yamaguchi, Masakaze Hamada, Daisuke Ono, Shiro Sonoda, Takashi Oshiro, Makoto Nagashima, Keisuke Kato, Shinichi Okazumi, Ryoji Katoh, Yoshikazu Ishii, Kazuhiro Tateda / 掲載誌：Microbial Drug Resistance / 巻号・発行年等：25(5):668-676, 2019
著者版フラグ	none
報告番号	32661甲第942号
学位記番号	甲第647号
学位授与年月日	2020.03.15
学位授与機関	東邦大学
メタデータのURL	https://mylibrary.toho-u.ac.jp/webopac/TD37393063

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

佐藤礼実より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第 647 号

学位申請者 : さ とう あや み
佐 藤 礼 実

学位論文 : Morphological and biological characteristics of *staphylococcus aureus* biofilm formed in the presence of plasma

(血漿存在下で作成した黄色ブドウ球菌バイオフィルムの形態学的・生物学的特性)

著 者 : Ayami Sato, Tetsuo Yamaguchi, Masakaze Hamada, Daisuke Ono, Shiro Sonoda, Takashi Oshiro, Makoto Nagashima, Keisuke Kato, Shinichi Okazumi, Ryoji Katoh, Yoshikazu Ishii, Kazuhiro Tateda

公表誌 : Microbial Drug Resistance 25(5): 668- 676, 2019

論文内容の要旨 :

【背景】

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) を含めた黄色ブドウ球菌は、皮膚軟部組織感染から敗血症まで幅広い疾患を引き起こす。近年では従来の院内感染型 MRSA (HA-MRSA) に加えて、健康人にも感染症を引き起こす市中感染型 MRSA (CA-MRSA) が国内外で増えており問題となっている。黄色ブドウ球菌はコアグラゼという血漿凝集素を産生し、生体内ではフィブリンを含めた凝固因子を利用した強固なバイオフィルム (BF) を形成していることが近年明らかになってきている (plasma-BF)。

本研究では、CA-MRSA および HA-MRSA の代表株を対象に MRSA-BF を血漿存在下で観察し、plasma-BF の特性を検討した。

【方法】

菌株は市中感染型 MRSA の USA 300 クロンの BAA1556 と、院内感染型 MRSA の N315 を用い、初期菌数を OD600 = 0.01 (10^7 CFU/ml) に設定した。

① クリスタルバイオレット染色法を用いた BF 形成量の評価

ウサギ血漿を各濃度に調整した培地に各種菌株を摂取・調整後、培養 6 時間・12 時間・18 時間後にクリスタルバイオレット染色法で BF 形成量を評価した。

② COCRM 法を用いた BF 構造の評価

ガラスベースディッシュに 7.14%濃度の血漿を含んだ TSB 培地を用いて 12 時間、24 時間静置培養し、COCRM 法で構造を評価した。

③ フローセルモデルを用いた plasma-BF 構造の評価

フローセルのガラス面に菌を付着させ、顕微鏡で菌の付着を確認後、0.39%濃度の血漿を含んだ TSB 培地を 0.2ml/min の速度で 24 時間流し続け plasma-BF を作成させた。COCRM 法を用いて 3 時間ごとに経時的に構造を観察した。

④ 培地交換モデルによる BF 構造の評価

ガラスベースディッシュのガラス面に菌を付着させ、続いて、1 時間ごとに新しい培地に交換。合計 6 時間培養し BF を作成、COCRM 法で BF 構造を観察した。

⑤ 蛍光標識したバンコマイシン及びダプトマイシンの BF 内部への浸透性の評価

BODIPY 標識バンコマイシン及び BODIPY 標識ダプトマイシンを用い BF 内部への浸透及び蓄積を 60 分間観察した。

⑥ 抗菌薬治療後の BF 内生菌数の評価

培地交換モデルで作成した BF に抗菌薬含有培地を添加し 12 時間静置後、BF 内の生菌数を評価した。

【結果】

① クリスタルバイオレット染色法を用いた BF 形成量の評価

2 株とも 6 時間後には血漿濃度依存的な BF 形成量増加が確認されたが、培養 12 時間以降では N315 において血漿濃度依存的に BF 形成量が減少した。

② COCRM 法を用いた BF 構造の評価

両菌株共に血漿なしの BF は、均一で平坦な BF を形成しているが、血漿存在下での plasma-BF の形態は、血漿なしで形成されたものとは明らかに異なっており、不均一で隙間があり、凝集した構造を示していた。

③ フローセルモデルを用いた plasma-BF 構造の評価

フローセルモデルでは血漿が常に供給される環境であり、3 時間という早い段階で plasma-BF が形成されることが明らかとなった。

④ 培地交換モデルによる BF 構造の評価

培地交換モデルで作成した plasma-BF は、フローセルモデルによる plasma-BF と同様に、起伏に富み分厚い BF を形成しており、ガラスディッシュ上でフローセルモデルと同等の plasma-BF 形成が可能となった。

⑤ 蛍光標識したバンコマイシン及びダプトマイシンの BF 内部への浸透性の評価

バンコマイシン、ダプトマイシン共に plasma-BF では浸透性が大きく低下した。

⑥ 抗菌薬治療後の BF 内生菌数の評価

抗 MRSA 薬であるバンコマイシン、ダプトマイシン、またはリネゾリドとリファンピシンは、血漿を含まない BF 中の細菌数を減少させたが、plasma-BF ではどちらの菌株においても、抗菌薬に対して抵抗性を示した。

【考察】

本研究では、日本独自の観察法である COCRM を用いて黄色ブドウ球菌の BF を世界で初めて観察した。これにより、血漿存在下で急速に形成する黄色ブドウ球菌の plasma-BF を経時的に観察することができた。これらの結果は、血漿が存在する生体内では、MRSA が形態学および生物学的に強固な BF を形成していることを示唆している。plasma-BF は、生体内に近い実験条件下で観察された現象であり、plasma-BF のより詳細な解析は、MRSA 感染症に対する新しい治療戦略の検討を可能にすると考えている。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号甲第 647 号	氏 名	佐 藤 礼 実
学位審査担当者	主 査	杉 山 篤
	副 査	渡 邊 善 則
	副 査	渡 邊 学
	副 査	澁 谷 和 俊
	副 査	岸 一 馬

学位論文の審査結果の要旨 :

申請者は、健康人にも感染症を引き起こす市中感染型 MRSA (CA-MRSA) および従来の院内感染型 MRSA (HA-MRSA) の代表株 (それぞれ、BAA1556 および N315) を用いて、MRSA が形成するバイオフィーム (BF) を血漿存在下で観察し、plasma 存在および非存在下での BF 特性を検討した。クリスタルバイオレット染色法を用いた BF 形成量の評価では、2 株とも 6 時間後には血漿濃度依存的な BF 形成量増加が確認されたが、培養 12 時間以降では N315 において血漿濃度依存的に BF 形成量が減少した。COCRM 法を用いた BF 構造の評価では、両菌株共に、血漿なしの BF は均一で平坦な形状を示したが、血漿存在下での plasma-BF の形態は、血漿なしで形成されたものとは異なり、不均一で隙間があり、凝集した構造を示した。フローセルモデルを用いた plasma-BF 構造の評価では、血漿が常に供給されると早い段階 (3 時間) で plasma-BF が形成された。培地交換モデルで作成した plasma-BF は、フローセルモデルによる plasma-BF と同様に、起伏に富み分厚い BF を形成し、ガラスディッシュ上でフローセルモデルと同等の plasma-BF を形成した。また、バンコマイシン、ダプトマイシンは plasma-BF 存在下では浸透性が大きく低下した。抗 MRSA 薬であるバンコマイシン、ダプトマイシン、またはリネゾリドとリファンピシンは、血漿を含まない BF 中の細菌数を減少させたが、plasma-BF の存在はどちらの菌株においても、抗菌薬に対して抵抗性を増強した。以上のように、申請者は黄色ブドウ球菌は血漿存在下で形態学的および生物学的に強固な BF を形成することを示した。

申請者による研究結果の説明の後に、審査委員から多数の質問が寄せられた。真菌の BF は BF 内の菌の活性が落ちて死菌を示すことが多いが、同じような現象が見られたかどうか、初期菌数の 10^7 CFU/mL は臨床的にはかなり多いが初期菌数を 10^4 CFU/mL に設定するなど臨床に近い菌数で評価したか、他の菌でも同じように BF を形成するのか、BF を溶かすような治療があるか、臨床への外挿性はどうか、実際に臨床で使用しているデバイスで評価したことがあるか、という質問に加えて、論文内の英文表記に関して確認があったが、申請者は各質問および確認事項に的確に回答した。

発表内容および質疑応答を審査委員で討議した結果、本論文は学位に値する研究成果であることが全員一致のもとに確認された。