In vivo における細菌の生体材料への付着状態の観察

九州大学医学部整形外科

有 菌 剛・大 賀 正 義

神宮司 誠 也・杉 岡 洋 一

The Observation of Bacterial Adherence to Biomaterials in vivo

by

Takeshi Arizono, Masayoshi Oga, Masayuki Jinguji
and Yoichi SugiokaDepartment of Orthopaedic Surgery, School of Medicine,
Kyushu University, Fukuoka

Clinical reports clearly show that the presence of biomaterials makes adjacent tissues susceptible infection. The bacteria on biomaterial were examined by electron microscopy 10 days after intraperitoneal administration of staphylococci. This study shows that a large percentage of bacteria adhere to surfaces of biomaterials and form microcolonies surrounded by a biofilm. The bacterial glycocalyx seemed to mediate the formation of microcolonies. These microcolonies may adhere to inert or tissue surface by the interaction of their glycocalyx and their pili with surface components. These demonstration of bacterial adherence to biomaterials in vivo suggests that polysaccharide mucoid peribacterial films (glycocalyx) are among the initial and fundamental factors in infection and are significant factors in the resistance of these types of infections to host defense mechanisms and antibiotic therapy.

は じ め に

人工関節、内固定材料などの体内異物に伴う細菌感染症は、治療抵抗性であり、しばしば悲惨な経過をたどることはよく知られている。しかしながら、体内異物に伴う感染症の本質についてはいまだ十分解明されていない部分も多い。今回われわれは感染症の第一段階である細菌の生体材料への付着の状態を in vivo にて観察したので報告する。

材料および方法

1. 動物：生後5週令メスのDDDマウスを用いた。
2. 細菌：mucoid産生株である *Staphylococcus aureus* Smith株 diffuse type と *Staphylococcus epidermidis* E46株を使用した。両株とも tryptic soy broth にて、37°C 一昼夜培養した1mlを取り吸光度にて10⁶CFUに調整して用いた。

3. 生体材料：直径8mm厚さ5mmのステンレス製の円板を用いた。

4. 方法：エーテル麻酔下にてマウスを開腹し、無菌的に生体材料を腹腔内に挿入後閉腹縫合した。3日後に縫合部の異常がないことを確認し、注射器にて菌液0.5mlを腹腔内に注入した。注入して10日後、生体材料を腹腔内より摘出し、0.15%ルテニウムレッドを含むグルタルアルデヒドで固定し、脱水、臨界点乾燥を行い、走査型電子顕微鏡で、その表面を観察した。また、同時にリン酸緩衝液にて腹腔内を洗浄し、その洗浄液を普通寒天培地にて培養した。

結 果

図1は *Staph. aureus* である。細菌は散在性に存在し菌体自体の表面にあまり変化がみられず、スムーズである。生体材料に付着したばかりの状態と思われる。図2の *Staph. epidermidis* においても同様の状態が観

図1 *Staphylococcus aureus* : 細菌が付着したばかりの状態

図3 *Staphylococcus epidermidis* : お互いに索状物で結ばれている

図2 *Staphylococcus epidermidis*

察できる。図3は *Staph. epidermidis* である。細菌と細菌は、お互いに索状物で結びついていて、細菌の表面も図1や2ほどスムーズではなく、索状物で覆われ始めているように見える。図1や2の状態よりも生体材料に付着後いくらか時間が経過した状態と思われる。図4は *Staph. aureus* である。図3より、さらに時間が経過した状態と思われ、細菌とその周囲を包む組織が塊状となっており、お互いの結びつきも強固な印象をうける。生体材料へもかなり強く付着していると思われる。図5の *Staph. epidermidis* においても細菌は biofilm に覆われている。図6は、*Staph. epidermidis* であるが、細菌のそばに板状にまで成長した biofilm が観察できる。われわれがすでに報告した *in vitro* にお

ける biofilm の状態とよく似ている。

考 察

近年、細菌学的研究²⁾⁵⁾により、細菌感染症、とくに体内異物に伴う感染症において菌体表面が多糖体で覆われ、コロニーを形成する adherent bacterial forms の存在が明らかにされている。今回の実験でも観察された菌体周囲の組織は、*Staph. aureus* のみではなくコアグラゼ非産生菌である *Staph. epidermidis* においても観察され、fibrin の沈着とは異なり、感染症と、なんらかの関係があるものと思われる。Costerton¹⁾は、細菌の細胞壁の周りを囲むこの多糖体を glycocalyx と定義づけ、cytoplasmic membrane で作られ、線維性の

図 4 *Staphylococcus aureus* : 細菌は glycocalyx biofilm で覆われている

図 5 *Staphylococcus epidermidis*

多糖体からなると言っている。この glycocalyx は、環境因子によって、regulate され、in vitro の環境では失われやすいため、これまで十分解明されなかった。われわれは生体材料存在下の感染における glycocalyx の覆い、すなわち biofilm の役割を以下のように考える。細菌の付着に際して細菌から伸びた索状の glycocalyx fiber が静電的反発力に打ちかって生体材料に結合し、次第に強固な付着力を得る。一方では、細菌は栄養物を得て、さらに、glycocalyx を産生し、分裂して

できた娘細胞も取込んで colony を作って行く。biofilm で覆われているため細菌表面から情報を得る免疫機構は十分活性化されにくく、また、colony まで成長した細菌には白血球などの貪食作用も十分効果を発揮し得なくなる。また、glycocalyx は、抗生物質と細菌との間の barrier となって細菌を守る働きをされると思われる。Nickel ら⁴⁾はこの biofilm の厚さと抗生物質への抵抗性とは相関があると述べている。Toni Hau ら³⁾の実験でも細菌注入後の経過時間によって抗生物質の効果が

図 6 *Staphylococcus epidermidis*

著しく異なったように、細菌混入後、生体材料への付着段階、biofilm の形成段階と進むに連れ、細菌感染症の難治性は急激に高まるものと思われる。

結 語

1. 生体材料に付着した細菌の状態を *in vivo* で観察した。
2. 細菌は colony を形成し、glycocalyx biofilm に包まれ、生体材料表面に付着していた。
3. われわれは、glycocalyx biofilm が宿主の免疫防御機能、抗生物質の作用に対して barrier として働き、この中で生着する細菌を保護することが foreign body infection を難治性にする一因であると考え、

参 考 文 献

- 1) Costerton J. W. and Irvin R. T.: The Bacterial

Glycocalyxin Nature and Disease. *Ann. Rev. Microbiol.*, 35: 229-324, 1981.

- 2) Costerton J. W. et al.: How Bacteria Stick. *Scientific American*, 238: 85-96, 1978.
- 3) Haw T. et al.: Secondary Bacterial Peritonitis: The Biologic Basis of Treatment. *Current Problems in Surg.*: 36-43, 1979.
- 4) Nickel J. C. et al.: Tobramycin Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Cells Growing as a Biofilm on Urinary Catheter Material. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 27: 619-624, 1985.
- 5) Roger Lewin.: Microbial Adhesion is a Sticky Problem *Science*, 224 (27): 375-377, 1984.