生体材料付着細菌の抗生物質への抵抗性 (経時的变化について)

九州大学医学部整形外科

有 菌 剛・大 賀 正 義
杉 岡 洋 一

The Antibiotics Resistance of Bacteria Adherent to Biomaterial (variation according to time of incubation)

by

Takeshi Arizono, Masayoshi Oga and Yoichi Sugioka

Department of Orthopaedic Surgery,
School of Medicine, Kyushu University, Fukuoka, Japan.

When biomaterials were exposed to tryptic soy broth containing cells of *Staphylococcus E-46*, a thick adherent biofilm developed on the surface of bacteria. After this exposure (for 2 hours, 6 hours and 12 hours), half of the biomaterials were removed to be suspended in PBS as control and another half were in PBS with very high concentration of Cefaloridine. 24 hours later, each biomaterial was removed from PBS for count of bacteria on its surface. Compared with the control, the bacteria on the biomaterial exposed for 2 hours had the most effect of antibiotics and those on the biomaterial exposed for 12 hours had the least effect. It is proposed that the resistance to antibiotics increases with the growth of biofilm surrounding bacteria on a biomaterial.

は じ め に

我々は人工関節等の生体材料への細菌の付着に際し、菌体周囲に膜状の物質すなわち bacterial glyocalyx biofilm の形成が観察されることを報告し、これが抗生物質や宿主の感染防御機能に対し、細菌側の防御因子として働き、生体材料存在下の細菌感染症を難治性にする一因であると述べてきた^{1) 2)}。今回、生体材料に付着した細菌の抗生物質に対する抵抗性が、biofilm の形成が進むにつれ、どのように変化するかを検討する目的で以下の実験を行った。

材 料

1. 細菌：岩田らにより人咽頭ぬぐい液より分離された *Staphylococcus E-46* を用いた。
2. 生体材料：直径 8 mm 高さ 5 mm の円盤型の Bone Cement を用いた。

方 法

Dextrose を含まない tryptic soy broth を消毒した後、D-gluconic acid を加えた培養液にて *Staphylococcus E-46* を一昼夜培養し、吸光度にて 10^8 CFU/ml に調整した 200 ml に、Bone Cement 18 個を入れた。37 度で培養し、随時、吸光度で培養液の濃度を測りながら、2 時間後、6 時間後、12 時間後にそれぞれ 6 個ずつ Bone Cement を取り出し、生食 20 ml で、洗浄後、3 個は 100 ml のリン酸緩衝液（以下 PBS）に、残りの 3 個は抗生物質（MIC $0.05 \mu\text{g/ml}$ のセファロリジン 0.25 mg/ml ）を含む PBS 100 ml に入れた。24 時間後、生体材料を取り出し各々生食 20 ml の中に入れ、振とう洗浄し、さらに PBS 5 ml で洗浄後、PBS 10 ml を含む試験管に入れた。これを超音波洗浄器にかけ、Bone Cement に付着した細菌を落下させ、平板塗抹法にて生着細菌数を求めた。以上全ての操作を 7 回行い、その平均値を計算した。さらに、超音波洗浄器にかける

前の状態の生体材料を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、臨界点乾燥後、日立S-700走査型電子顕微鏡で細菌の付着の状態を観察した。

結 果

表は3個の生体材料に付着していた細菌数の平均値である。7回の実験すべてにおいて2時間後に取り出したものは抗生物質投与群の付着細菌数が非投与群の3割以下に減っているのに対し、12時間培養したものは付着細菌数にあまり差がみられない。7回の実験結果の平均値をグラフ化すると、図1のごとく、2時間培養群では抗生物質により付着細菌数が著明に減少しているのに対し、12時間培養群ではあまり減少していないのが明瞭となる。図2は抗生物質投与群の非投与群に対する付着菌数の平均値の比を表わしたものである。2時間培養したものが0.156であったのに対し、6時間では0.578、12時間では0.836であった。また電子顕微鏡による観察では抗生物質投与群、非投与群とも2時間培養したものは図3左のごとく細菌が散在性に存在し菌体表面もスムーズなものが多かったが、12時間培養したものは図3右のごとく菌塊を形成し、薄い膜状の bacterial glycocalyx biofilm で覆われているのが、多数認められた。

表 3個の生体材料に付着していた細菌数の平均値である。最下段は7回の実験結果の平均値を表す
Number of Bacteria on Bone Cement
(average of three samples)

NO.	2 hours		6 hours		12hours	
	Antibiotics (+)	Antibiotics (-)	Antibiotics (+)	Antibiotics (-)	Antibiotics (+)	Antibiotics (-)
1	88	547	2516	5000	6510	8250
2	127	430	1430	1248	3099	2654
3	26	257	295	695	3430	2040
4	108	822	477	214	4680	5230
5	429	2161	1693	8453	4777	5618
6	14	849	292	653	5034	10239
7	22	123	127	344	3720	31340
Average	116	741	958	1658	4464	5339

図1 抗生物質投与群と非投与群の比較

抗生物質投与群の細菌数(A)/非投与群の細菌数(B)

図2 2時間培養群では、抗生物質により、15.6%まで減少したが、12時間培養群では、抗生物質の効果が少なく、83.6%までにしか減少していない。

2時間培養 — 1 μm 12時間培養 (矢印は biofilm)

図3 走査型電子顕微鏡写真

考 察

生体材料に伴う細菌感染症は手術後長期間経過しても発症しうること、抗生物質に反応せず生体材料を除去することによって治癒がえられることなど特異な臨床像を呈する⁶⁾。これまで我々は生体材料に付着した細菌が菌体周囲を bacterial glycocalyx biofilm に包まれコロニーを形成しているのを電子顕微鏡下に観察し、この glycocalyx の役割について検討してきた。Costerton^{2) 3)} はこの glycocalyx が細胞膜で産生され、主に水分と種々の単糖類の重合体からなると述べている。又、イオン交換樹脂の働きをなし、イオン化した抗生物質を吸着して細菌への到達を阻止するのではないかと推測している。前回我々は遊離細菌を完全殺菌できた高濃度の抗生物質でも、生体材料に付着した細菌を完全殺菌できなかったことを報告した。今回の結果でも MIC の5000倍もの高濃度の抗生物質を投与したにもかかわらず、付着細菌を完全に殺菌することはできなかった。また培養時間が2時間のものでは抗生物質投与により付着細菌が15.6%に減少したのに対し6時間培養では57.8%、12時間培養では83.6%に減少したにすぎなかった。Nickel ら⁴⁾ が 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ように細菌が生体材料に付着し2時間、6時間、12時間と経過するにつれ biofilm の形成も進み、抗生物質への抵抗性は急激に高まるものと思われる。また、この glycocalyx biofilm のため菌体表面から情報を得る免疫機構は十分活性化されにくく、コロニーまで成長した細菌は白血球等の貪食作用も受けにくくなり、生体材料存在下における感染症の治療抵抗性の一因になっていると思われる。

ま と め

1. 生体材料付着細菌の培養時間の経過に伴う抗生物質への抵抗性について検討した。
2. 培養時間が長くなるに連れ抗生物質への抵抗性は

高くなった。

3. 抗生物質への抵抗性は glycocalyx biofilm の形成が進むにつれ高まるものと思われる。

文 献

- 1) 有菌 剛他：In vivo における細菌の生体材料への付着状態の観察。整形外科と災害外科35：1104-1107, 1987.
- 2) Costerton J.W. and Irvin R.T.: The Bacterial Glycocalyx in Nature and Disease. Ann. Rev. Microbiol., 35：229-324, 1981.
- 3) Costerton J.W. et al.: How Bacteria Stick. Scientific American, 238：85-96, 1978.
- 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) 大賀正義他：医用材料と感染。整形・災害外科30：939-948, 1987.
- 6) Elson, R. A. et al.: Bacterial infection and acrylic cement in the rat. J. Bone and Joint Surg. 59-B：452-457, 1977.

質 問

東京労災病院 松本 司

- ① 臨床上では感染症はそれ程発症しません。臨床例の発症と本研究との関係について先生の考えを教えてください。
- ② 少しピントがずれてますが、「血腫予防、死腔を小さくするように注意すると感染は予防出来るのでしょうか？」。

解 答

九州大学 有菌 剛

- ① 十分高濃度の細菌培養液を作った後、Bone cement を挿入したため、すべての Bone Cement に細菌が付着した。
- ② 血腫や死腔を作らないことは、感染予防において重要であるが、それだけでは不十分で、手術中の細菌の混入及び、細菌の生体材料への付着を阻止できなければ十分な感染予防にはならないと思う。