生体材料付着細菌に対する抗生物質の効果

九州大学 整形外科

有 菌 剛・大 賀 正 義
杉 岡 洋 一

The Antibiotics Effect to Bacteria Adherent to a Biomaterial

by

Takeshi Arizono, Masayoshi Oga and Yoichi Sugioka

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

Biomaterials were exposed to tryptic soy broth containing cells of *Staphylococcus E-46* with antibiotics (Cefaloridine 100mg). In group 1, the biomaterials and the antibiotics were put into the broth at the same time. In group 2, the biomaterials were put into the broth at an interval of seven hours after the injection of the antibiotics, and in group 3, at an interval of nineteen hours. After twenty-four hours exposure, the biomaterials of each group were removed for count of bacteria on their surface. Many laboratory data have shown that almost all of free bacteria are killed in two hours under the presence of antibiotics. In this experiment, however, there was statistically no difference between groups in the numbers of bacteria on biomaterials. This suggests that the special mechanism exists in the growth of the bacteria on biomaterials. Ultrastructural studies, reported previously, have shown that biofilm develops around the bacteria on the surface of a biomaterial. We reported that the resistance to antibiotics might increase with the growth of biofilm surrounding bacteria on a biomaterial. The result of this experiment supports this speculation.

はじめに

人工関節は耐久性など、その性能の向上に伴い、症例数も急速に増加している。しかしながらこの人工関節も一度感染が起こると細菌の温床となり、極めて治療に難渋する⁷⁾ことは周知の事実である。これまで我々は、細菌感染症における細菌側の変化に注目し、生体材料付着細菌の周囲には膜状の物質、すなわち biofilm が形成されることを報告してきた¹⁾⁵⁾⁶⁾。今回、細菌培養液に予め抗生物質を投与した後、生体材料を入れて培養した場合の抗生物質の効果について検討する目的で以下の実験を行った。

材 料

1. 細菌：臨床材料から分離された *Staphylococcus E-46* を用いた。この細菌は莢膜を有し、コアグラゼを産生する。

2. 生体材料：直径 8 mm、高さ 5 mm の円盤型の骨セメント 12 個を用いた。

3. 抗生物質：*Staphylococcus E-46* に対する MIC 0.05 $\mu\text{g/ml}$ のセフェム系抗生物質セファロジン 100mg を用いた。

方 法

Dextrose を含まない Tryptic soy broth 溶液を消毒後、D-glucuronic acid を加え、0.25% とした培養液に *Staphylococcus E-46* を入れた。これを一昼夜培養し、吸光度にて 10^8 CFU/ml に調整した。この培養液を 50ml ずつ 3 つにわけ、グループ 1 は抗生物質（セファロジン 100mg）と生体材料 4 個を同時に入れた。グループ 2 は抗生物質投与後 7 時間経過してから生体材料 4 個を入れ、またグループ 3 は抗生物質投与後 19 時間経過後に、生体材料 4 個を入れた。それぞれ生体材料投与後、24 時間摂氏 37 度にて振盪培養した後、生体材料

表1 生体材料付着細菌数 ($\times 10^4$)

各グループ欄の左側の数値は、それぞれの生体材料に付着していた細菌数を示す。右側はその平均値。グループ間に有意な差はないと思われる。

実験	グループ1		グループ2		グループ3		対照群
NO1	326	平均 412	898	平均 964	1008	平均 1069	平均 2101
	484		906		1458		
	446		884		504		
	368		1168		1308		
2	502	510	216	653	482	321	2506
	780		1212		137		
	174		492		145		
	584		692		520		
3	592	859	144	397	446	531	3140
	638		362		416		
	644		466		194		
	1560		616		1068		
4	1306	756	1132	550	168	322	4145
	1144		354		344		
	364		201		452		
	208		514		322		

を取り出し、一個ずつリン酸緩衝液 (以下 PBS) 10ml で洗浄後、PBS 10ml のはいった試験管に入れた、これらを超音波洗浄器にかけて付着細菌を落下させ、それぞれの試験管の PBS を 100 倍希釈した後、0.1 ml を普通寒天培地にまき、生着細菌数を求めた。また、対照群として抗生物質を含まない broth に入れた生体材料の付着細菌数も求めた。さらに各々の抗生物質入りの培養液 0.1 ml を直接塗抹培養し、抗生物質の遊離細菌に対する効果を確認した。以上の操作をそれぞれ 4 回ずつ行い、4 回の実験の平均値を求め、統計的検討を加えた。

結 果

結果は表 1 のごとく、抗生物質と生体材料を同時に投与したグループ 1 のみならずグループ 2、グループ 3 の生体材料にも細菌が付着していた。表 1 の各数値はそれぞれの実験において生体材料に付着していた細菌数を表わしている。各実験欄の右側の数値は 4 個の生体材料の平均値である。ばらつきはあるものの、何れの実験においてもグループ間の値に一定の傾向は認められない。4 回の実験における付着細菌数すべての平均値は、表 2 に示すごとく、それぞれグループ 1 が 633.9、グループ 2 が 641.1、グループ 3 が 560.1 となり、t 検定の結果でもグループ間に有為な差は認められなかった。また、培養液の直接培養ではいずれのグルー

表2 全体の平均値と t 検定の結果

生体材料に付着した細菌数は、グループ間に有意差を認めなかった。

	全体の平均値と標準偏差	
グループ 1	639.9 ± 378.6	
2	641.1 ± 344.0	
3	560.1 ± 404.9	
(t 検定の結果 n=16)		
グループ 1	V. S. グループ 2	N. S.
1	3	N. S.
2	3	N. S.

N. S. = nonsignificant

図1 セファロリジンのブドウ球菌に対する効果(長野らによる)
遊離細菌は、抗生物質投与後約2時間で、1%以下に激減する。

プもコロニーは認められなかった。

考 察

遊離細菌に対する抗生物質の効果は既に多くの報告により示されるように、図1のごとく、1 MIC濃度の抗生物質投与後約2時間で細菌は1%以下まで激減し、その後は緩やかに減少を続け、24時間で0.01%以下となるとされている。今回の実験でも培養液を直接塗抹培養した結果では全て細菌の増殖を認めず、肉眼的完全殺菌の状態であった。しかしグループ1からグループ3までの生体材料に多くの細菌が付着していた。生体材料と抗生物質を同時に投与したグループ1と比較し、抗生物質を予め投与しておいたグループ2やグループ3の遊離細菌数は、生体材料投与時に既に極めて少なくなっていたと思われる。しかしながら、付着細

菌数にはグループ間に有意差が認められなかった。これらのことから、抗生物質の効果により遊離細菌が完全に死滅する前、あるいは、抗生物質によって増殖が抑制された状態でも細菌は生体材料に付着する能力を持っており、付着した後あまり抗生物質の影響を受けずに増殖していったことが示唆される。取り分け、グループ1, 2, 3の間で付着細菌数の有意な差がなく、生存遊離細菌数を殆ど反映していないことから、遊離細菌と生体材料付着細菌とは、増殖過程に異なった機構が働いていることが示唆される。

これまで我々は、生体材料付着細菌が菌体周囲を多糖体からなる膜状の物質、すなわち glycocalyx biofilm で包まれているのを電子顕微鏡下に観察し、この biofilm が、抗生物質や免疫機構から細菌を守る細菌側の防御因子として働くことを報告してきた¹⁾⁵⁾⁶⁾。この glycocalyx biofilm の産生は、細菌が抗生物質や生体防御機構などのストレスにさらされることによって刺激されるとされている²⁾³⁾⁴⁾。前回の本学会にて培養時間を変えることによって biofilm の厚さを変え、biofilm の厚さに伴い抗生物質への抵抗性が高まることを証明した。今回の結果は抗生物質の存在下において biofilm の産生が刺激され、厚い biofilm の下では極めて僅かの細菌も抗生物質の作用をあまり受けずに増殖することを支持するものであり、生体材料存在下の細菌感染症のメカニズムの解明に繋がると思われる。また、抗生物質や生体防御機能などによっても生体材料付着細菌が死滅せず何等かの機会を契機に急激に細菌感染症を発症してくる delayed infection の解明にも結びつく結果であったと考えられた。

ま と め

1. 予め抗生物質を投与した細菌培養液に、生体材料を投与した場合の、抗生物質の効果について検討した。
2. 生体材料と抗生物質を同時に投与したグループも、抗生物質投与後19時間経過後に生体材料を投与したグループも細菌は生体材料に付着していた。
3. 遊離細菌に比べ、生体材料付着細菌は glycocalyx biofilm の形成により抗生物質の効果が及びにくくなっていると考えられる。

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) Carson, K. J. M. et al.：An electron microscopic study of the effect of clindamycin therapy on bacterial adherence and glycocalyx formation in experimental *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. J. Microbiol 48：189-206，1986。
- 3) Cristina, A. G. et al.：Adherent bacterial colonization in the pathogenesis of osteomyelitis. Science, 228：990-993，1985。
- 4) Cristina, A. G. et al.：Adhesive colonization of biomaterials and antibiotic resistance. J. Biomaterials, 8：423-426，1987。
- 5) 大賀正義他：医用材料と感染。整形・災害外科，30：939-948，1987。
- 6) Oga, M. et al.：Surgical Biomaterials and Differential Colonization by *Staphylococcus Epidermidis*. J. Biomaterials in press。
- 7) R. A. Elson et al.：Bacterial infection and acrylic cement in the rat. J. Bone and Joint Surg., 59-B：452-457，1977。