

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K10038

研究課題名(和文) 非抗菌薬を用いた持続感染細胞の駆逐を目指したMRSAバイオフィルムの制御

研究課題名(英文) Controlling MRSA biofilms to eradicate persistently infected cells using non-antimicrobial agents

研究代表者

高田 徹 (TAKATA, TOHRU)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：90268996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では4種類の界面活性剤のMRSAのバイオフィルム形成に対する抑制効果を検討し非イオン性界面活性剤であるポリソルベート80(PS80)が最も適していることを明らかにした。バイオフィルム形成抑制効果はバイオフィルムの破壊よりも基質への細菌の付着の抑制に起因するものであり、有効性を発揮する濃度での培養細胞に対する細胞毒性は低かった。しかし、その阻害効果は基質の種類に依存しプラスチック、シリコン、マウス真皮組織の各基質で認められたがステンレスでは認められなかった。以上より、PS80はプラスチック、シリコン、真皮組織に対して、MRSAが形成するバイオフィルムの予防に有効である可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)は、壊死組織や医療器材にバイオフィルムを形成し、持続的な感染を引き起こし、各種の抗菌薬に対して抵抗性を示す。そのため、バイオフィルムの形成を阻害する非抗菌薬を使用した実用的な対応策が求められている。本研究結果により、界面活性剤であるポリソルベート80(PS80)がMRSAのバイオフィルム形成に対し抑制効果を示すことが明らかとなった。今後、医療現場において、傷口の洗浄液や医療器材使用時の前処理液として使用できる候補となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) forms biofilms on necrotic tissues and medical devices, and causes persistent infections. In this study, we investigated the inhibitory effect of four different surfactants on MRSA biofilm formation, and found that a nonionic surfactant, polysorbate 80 (PS80), was the most suitable. The biofilm inhibitory effects resulted from the inhibition of bacterial adhesion to substrates rather than biofilm disruption, and the effective dose was less cytotoxic for fibroblasts. However, the effects were substrate-dependent: positive for plastic, silicon, and dermal tissues, but negative for stainless-steel. These results indicate that PS80 is effective for prevention of biofilms formed by MRSA on tissues and foreign bodies. Therefore, PS80 could be used in medical practice as a washing solution for wounds and/or pretreatment of indwelling catheters.

研究分野：感染症内科学

キーワード：MRSA バイオフィルム 非抗菌薬 界面活性剤 agr

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) は、壊死組織やカテーテルや人工関節などの医療器材にバイオフィルムを形成し、持続感染する。バイオフィルム形成により幅広いスペクトルの抗菌薬に対して抵抗性を示し、薬剤耐性は数百倍にまで増加する。結果、抗菌薬治療のみではバイオフィルム内の菌を死滅させることができず、その除去は極めて困難で、感染症が持続し耐性菌の発現を招くことになる。このため、バイオフィルムを駆除する、あるいはバイオフィルムの形成を阻害する非抗菌薬による実用的な対応策が求められている。

界面活性剤は、物質間の界面張力を低下させる化合物であり、洗剤、湿潤剤、形成剤および分散剤として作用する。界面活性剤は疎水性および親水性部分から構成されるため、一般に両親媒性であることが知られており、陽性イオン系、陰性イオン系、両性イオン系および非イオン性界面活性剤に分類される。界面活性剤は、古くから抗菌活性があることが知られ、化粧品や食品、医療分野などで洗浄・除菌液として使用されている。しかし、バイオフィルムに対する効果はこれまで検証されていない。また、界面活性剤を臨床応用するためには、組織への細胞障害性が最小限にとどまる必要がある。本研究では界面活性剤のバイオフィルムそのものの破壊や、バイオフィルムの形成過程を阻害したりする可能性に着目し、各種界面活性剤を用い、MRSA が形成するバイオフィルムに対する効果を *in vitro* で検討した。

2. 研究の目的

- (1) 各種の界面活性剤を用いて MRSA によるバイオフィルム形成抑制の有無とその作用機序を探り、最適化条件と臨床応用の可能性が高い界面活性剤を決定すること
- (2) 近年の MRSA 血液分離株においてバイオフィルム関連遺伝子を中心に遺伝子型を探ること

3. 研究の方法

(1) 界面活性剤: 界面活性剤は陽イオン系界面活性剤として塩化ベンザルコニウム (BZC)、陰イオン系界面活性剤としてドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、両性イオン系界面活性剤として 3-(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio-1-propane-sulphonate (CHAPS)、非イオン界面活性剤として Polysorbate 80 (PS80) の 4 種類を用いた。Tryptic Soy Broth (TSB) に溶解した界面活性剤を 10 倍に連続希釈し、界面活性剤の最終濃度を調整した。

(2) 細胞生存率アッセイ: 96 ウェルプレートで発育した 3T3 細胞に異なる濃度の界面活性剤を添加し、37 °C で 24 時間培養後、MTS アッセイを用い細胞生存率を評価し 3T3 線維芽細胞に対する界面活性剤の影響を検討した。

(3) 各種基質への MRSA の付着に及ぼす界面活性剤の影響: 高バイオフィルム形成能を有する MRSA 臨床株 (ATCC BAA-2856) を用いて、プラスチック、マウス皮膚切片 (ダーマルチップ)、シリコン、ステンレスの各基質上で、各種界面活性剤 (SDS, CHAPS, PS80) を添加後、37 °C で 24 時間培養した。生菌数は colony forming unit (CFU) アッセイを用い、バイオフィルムはクリスタルバイオレット染色法により定量評価した。菌の生死判定は LIVE/DEAD アッセイを用いた。

(4) ダーマルチップおよびプラスチックチップへの MRSA 付着に及ぼす界面活性剤の影響: ダーマルチップおよびプラスチックチップに付着した MRSA に各種界面活性剤を添加後、超音波で分離させ、得られた菌懸濁液の定量培養を行った。

(5)血液分離株を対象にマルチプレックス PCR 法により *agr* 型、*SCCmec* 型など遺伝子型解析を行った。

4. 研究成果

(1) 非イオン系である PS80 以外の界面活性剤は、培養線維芽細胞に対し急激な毒性を示したが、PS80 では最高濃度でも 50%程度の細胞生存率低下にとどまり、細胞障害性発現は緩徐であった。4 種の界面活性剤は全てバイオフィーム形成を抑制したが、陽イオン系(BZC)と陰イオン系(SDS)では各々0.0005%と0.5%を超える濃度で、バイオフィーム形成の減少を伴い、総 CFU 数の強い減少を引き起こした。

(2) 一方、両性イオン系界面活性剤である CHAPS と非イオン界面活性剤である PS80 は総 CFU 数の減少を招くことなく、培養線維芽細胞に比較的毒性が少ない 0.5%濃度でバイオフィーム形成を特異的に抑制した。

(3) PS80 は CHAPS に比べ MRSA の種類や温度に関係なくより有効性を示した。PS80 の抗バイオフィーム効果は添加培養後、早い段階(4 時間)で認められ、その後消失した。これは PS80 が成熟したバイオフィームの破碎効果よりもバイオフィーム形成早期の基質への菌の付着抑制により抗バイオフィーム効果を発揮することを示唆している。

(4) PS80 はダーマルチップやプラスチックチップへの MRSA の付着を各々46%、91%低下させ、真皮組織上の付着細菌数を減少させた。

(5) 基質別に PS80 の抗バイオフィーム効果を検討すると、ステンレスへのバイオフィーム形成は抑制できなかったものの、ダーマルチップやシリコンではバイオフィーム形成を抑制した。

(6) 以上より PS80 はバイオフィーム形成の初期段階である菌の基質への付着を抑制し、MRSA によるバイオフィーム形成を効果的に抑制することが明らかとなった。MRSA によるバイオフィーム形成が問題となる皮膚組織やプラスチック、シリコン素材の医療器材を PS80 で前処理することで、菌の付着および BF 形成を阻止でき、難治性感染症への移行を予防できる可能性が考えられた。本研究は界面活性剤の抗 MRSA バイオフィーム効果とその機序を明らかにした世界発の研究である。今後、医療現場において、傷口の洗浄液や医療器材使用時の前処理液として医療現場で使用できる候補となる可能性が期待される。

(7) 年次推移でみた MRSA 血液分離株の遺伝子型解析ではバイオフィーム形成に関わる遺伝子である *agr* 型は 2011 年、2013 年は II 型が、他の年は I 型が最多を占めたが、2017 年移行は III 型が優勢となっていた。また、*SCCmec* 型ではかつて主要な遺伝子型であった *SCCmecI* 型は減少し、*SCCmecIV* 型が 2015 年以降主要な遺伝子型として置き換わり、2021 年までその傾向は継続していることが明らかとなった。

< 引用文献 >

Yutaka Ueda, Kota Mashima, Motoyasu Miyazaki, Shuuji Hara, Tohru Takata, Hidetoshi Kamimura, Satoshi Takagi, Shiro Jimi Inhibitory Effects of Polysorbate 80 on MRSA Biofilm Formed on Different Substrates Including Dermal Tissue. Sci Rep 9(1): 3128, 2019.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ueda Y, Mashima K, Miyazaki M, Hara S, Takata T, Kamimura H, Takagi S, Jimi S.	4. 巻 9
2. 論文標題 Inhibitory effects of polysorbate 80 on MRSA biofilm formed on different substrates including dermal tissue.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep. .	6. 最初と最後の頁 3128
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-39997-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上田 裕、宮崎元康、高田 徹、神村英利、自見至朗
2. 発表標題 皮膚組織を含む様々な基質上に形成されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)バイオフィルムに対するPS80の抑制効果
3. 学会等名 第33回日本バイオフィルム学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高田 徹
2. 発表標題 当院におけるMRSA血液分離株の分子疫学動向
3. 学会等名 第96回日本感染症学会学術総会・講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本村由佳、宮崎元康、釜田充浩、萩原大樹、鹿志毛信広、高田 徹
2. 発表標題 最近5年間のMRSA 菌血症例の分子疫学解析
3. 学会等名 第71回日本化学療法学会総会 2023年
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------