

令和 4 年 4 月 25 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18611

研究課題名(和文) スツルバイト形成モデル開発による生成メカニズムの多角的・網羅的解析

研究課題名(英文) Multidimensional and comprehensive analysis of the formation mechanism by developing a model of struvite formation

研究代表者

佐久間 貴文 (Sakuma, Takafumi)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：70833797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：バイオフィーム生成をモニタリングするフローセルシステムを応用し、スツルバイト生成モデルを作成することを目的とした。これまでの研究の改善を行い、リン酸カルシウムの方が多く形成され、スツルバイトを安定して形成させることに成功した。プロテウス・ミラビリスだけでなく、そのほかの菌種(Escherichia coli, Morganella morganii, Phuedomonas aureginosa等)を多重感染させそれぞれの菌が増殖できる環境を作成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スツルバイトの生成機序を、臨床分離株と既存の尿路バイオフィーム観察系を用いたモデルで再現して病態を詳細に解析し、細菌側の生成因子を抑制して感染結石の予防、より有効な治療や再発予防につながるための基盤的な研究につながるための基礎研究を立案した。同モデル、in vitroスツルバイト形成モデルを構築した。細菌側の因子として菌種、ウレアーゼ産生能、バイオフィーム形成能、人工尿のpHや組成の変化がスツルバイトに与える影響を明らかにすることができた。既存の抗菌薬、酸性緩衝液、乳酸菌製剤、さらにバイオフィーム形成阻害剤などがスツルバイトの形成にどの程度抑制的に作用するかを定量的に調査することにつながる。

研究成果の概要(英文)：The objective was to apply a flow cell system to monitor biofilm formation and to create a model of struvite formation. Improvements were made to previous studies, and more calcium phosphate was formed, resulting in a stable formation of struvite. We created an environment in which not only Proteus mirabilis but also other bacteria (Escherichia coli, Morganella morganii, Phuedomonas aureginosa, etc.) were multiply infected and each bacteria could grow.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：スツルバイト

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

尿路結石は Common disease であり、生活習慣病に関連して患者数は増加している。尿路感染症を原因とする尿路結石症を「感染結石」とよび、リン酸アンモニウムマグネシウム (struvite: スツルバイト) を主成分とする結石である。スツルバイトの形成メカニズムは、*Proteus* 属や *Pseudomonas* 属の細菌がウレアーゼで尿素をアンモニアに分解し、アルカリ性となった尿中でスツルバイトが析出する、という機序である¹⁾。感染結石の問題点は、結石による尿のうっ滞や感染症そのものによる生命の危機であり、手術によって除去しても容易に再発することも大きな臨床的課題である。

2. 研究の目的

本研究は、バイオフィルム生成をモニタリングするフローセルシステムを応用し、スツルバイト生成モデルを作成することを目的とする。完成したモデルにより、感染結石の治療および再発予防に関する治療戦略を探索することが可能となる。具体的には、スツルバイトの生成機序を、臨床分離株と既存の尿路バイオフィルム観察系を用いたモデルで再現して病態を詳細に解析し、細菌側の生成因子を抑制して感染結石の予防、より有効な治療や再発予防につなげる。同モデル、*in vitro* スツルバイト形成モデルが完成すれば、細菌側の因子として菌種、ウレアーゼ産生能、バイオフィルム形成能、人工尿の pH や組成の変化がスツルバイトに与える影響を明らかにすることが可能となる。さらに、既存の抗菌薬、酸性緩衝液、クランベリージュースや乳酸菌製剤などの食品、さらにバイオフィルム形成阻害剤などがスツルバイトの形成にどの程度抑制的に作用するかを定量的に調査する研究につながることを期待される。

3. 研究の方法

A. 保存してある尿由来の臨床分離株に関する性状解析

岡山大学泌尿器科学教室に保存されている数千株の臨床分離株のうち、スツルバイトの原因菌として最も頻度の高い *Proteus* 属の菌株について、性状解析を行った。

B. フローセルシステムの応用と調整

これまでバイオフィルムの形成モデルとして使用してきたフローセルシステムを、スツルバイト形成モデルに応用する。このシステムは、9本存在する微細なガラス管にそれぞれ人工尿と対象とする菌株を 37 の条件下で還流し、ガラス管内腔に形成されるバイオフィルムの観察ができる。

C. 光学顕微鏡による還流後人工尿沈渣の観察

フローセルシステムを還流した人工尿の沈渣を光学顕微鏡で観察。

D. レーザー走査型顕微鏡で観察

レーザー走査型顕微鏡の観察は、明視野、Live-dead cell staining で行うことを検証した。により、内腔の沈着物の有無を観察でき、 によって生菌と死菌を判別することが可能となる。 で沈着物が観察でき、 で生菌の割合が低ければ、バイオフィルムよりスツルバイトが主に沈着していることが推測される。

E. 沈着物の組成を分析

IR 赤外吸収スペクトロメトリー法 (Infrared Absorption Spectrometry)で行うことを検証した。同法は沈着物に赤外線を照射し、吸収される周波数を測定することにより、試料の定性・定量分析を行う方法であり、成分と組成 (%) の情報を得ることができる。

4. 研究成果

A) 岡山大学泌尿器科学教室に保存されている数千株の臨床分離株のうち、スツルバイトの原因菌として最も頻度の高い *Proteus* 属の菌株について、性状解析を行った。具体的には、各種抗菌薬に対する薬剤感受性、ウレアーゼ産生能、バイオフィルム形成能を測定した。薬剤感受性は従来行っている微量液体希釈法、ウレアーゼ産生能は pH 変化による定量法、バイオフィルム形成能は 96 穴マイクロプレートアッセイ法を用いた。測定したデータをもとに、それぞれの組み合わせが異なる菌株を 8-10 株選択し、フローセルシステムの実験系に適應させた。

B) 人工尿と A. で選択した菌株を還流し、ガラス管内部に沈着物を形成させることができた。

C) スツルバイトの結晶は多彩な形状を示すが特徴的な形状を示すことを観察した。結晶の有無については、後述する沈着物の成分分析の結果に比べると正確性は劣るものの、安価かつ簡便にスクリーニングすることが可能であった。

D) 沈着物の生成量については、菌株の性質、菌量 (濃度)、培養条件に加え、人工尿中の電解質 (Mg, Ca) 組成、尿素濃度やフローセルシステムの還流速度、還流時間を変化させた。生体内の環境から逸脱しない範囲でスツルバイトの形成量が最も多くなる条件を同定した。この行程は、モデル完成後の治療や再発予防に関する研究を立案する際に重要であると考えられた。

- E) 沈着物の分析については、岡山大学医学部共同実験室内の装置で行うことができないため、外注検査として行う。方法は IR 赤外吸収スペクトロメトリー法 (Infrared Absorption Spectrometry)で行うことを検討した。同法は沈着物に赤外線照射し、吸収される周波数を測定することにより、試料の定性・定量分析を行う方法であり、成分と組成 (%) の情報を得ることができるためである。フローセルシステムのガラス管内に生成した沈着物がスツルバイトをどの程度含むのか、フローセルシステムの還流条件によって変化するのかを考察した。臨床的には、スツルバイトを含む場合には大部分 (95%以上) がスツルバイトであることが多いため、フローセルシステムの条件を調整してスツルバイトの割合がどのように変化するのか検討しておいた。乳酸菌上清を添加した場合、スツルバイトの形成が有意に低下した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------