

整形外科病棟入院患者から分離したMRSAのbiofilm形成能に関する研究

佐藤 迪夫、那須 涼

(指導教員：宮本 比呂志 佐賀大学医学部病因病態科学講座 生体防御学分野)

(実施期間：平成19年2月5日～3月2日)

Summary

バイオフィーム（生物膜）を形成するメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）は人工股関節や血管内留置カテーテルなどの生体内材料に付着して増殖するため、現在大きな問題となっている。今回の研究では佐賀大学医学部付属病院の整形外科病棟に入院していた13人の患者より分離された13株のMRSAと産業医科大学病院入院患者の血液より分離された2株のMRSAおよび1株のMSSAの合計16株の *Staphylococcus aureus* を使用して、それらの菌がバイオフィームを形成するか調べた。また、これらの菌がバイオフィーム形成の責任遺伝子と推定されている *ica* 遺伝子群を保有しているかどうかについてもPCR法で検討した。その結果、16株中7株（44%）がポリスチレン上に明らかなバイオフィームを形成することが明らかとなった。しかしながら、バイオフィーム形成能と *ica* 遺伝子群の保有の有無には相関関係を認めなかった。バイオフィーム形成に *ica* 遺伝子群が関与しているか否かについては菌株数を増やしたり、プライマーを変更したりして更に研究を続けることが必要と考えられた。

Introduction

院内感染の主要な起因菌として世界中で問題となっている *Staphylococcus aureus*(2,3)であるが、日本の医療機関におけるメチシリン耐性率は50%から70%(1)にもものぼる。さらに問題であるのは、1990年代前半にはメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）感染とは主に院内において起こり(7)、手洗いやガウンの着用など医療従事者による予防策が効を奏していた(8)のに対し、90年代後半には入院する時点で既にMRSAのコロニーを有する患者が増えてきた(9,10)ことにある。鼻腔でのMRSA保菌そのものが単独でsurgical-site infection(SSI)のリスクとなることはよく知られた事実である(11)が、実際に整形外科領域でのSSIは増加しており(13)、無菌手術室で行われる股関節置換術などの整形外科領域のSSIでは、50%が *S.aureus* によるものであり、うち59%はMRSAである(12)。当院整形外科においても人工股関節置換術後患者におけるbiofilmを形成するMRSAの感染が非常に大きな問題となっている。

Biofilmとは菌と菌体外多糖膜（Polysaccharide intercellular adhesion; PIA）からなり、細菌はこの中に生息することで乾燥や塩素などの消毒剤、抗生物質など環境からのストレスを直接受けることを免れるだけでなく、細菌同士の接合がよくなることで遺伝子の授受やquorum sensingによる表現型の変化を起こすことが知られている(14)。とくに臨床の現場では、biofilmを形成した細菌に対しては抗生物質が届きにくく、in vitro試験で期待されるようには治療効果があがらない(5,6)ことに加え、biofilm形成能と抗生物質に対する耐性には相関が認められるという問題も指摘されており、特にカテーテル等の生体内に挿入するdeviceを使用している患者において問題を引き起こしている。

これまで様々な研究で示されているように *S.aureus* も含め *Staphylococcus* は様々な生体材料に対してbiofilmを形成するが、そのbiofilmは主にPolymeric N-acetyl glucosamine(PNAG)からなり、

intercellular adhesion(ica) gene がその形成に関与しているとされている(4)。

Figure1 に示したように *Coagulase negative Staphylococcus* (CoNS) においては biofilm 形成能とその原因遺伝子として *atlE* や *icaADB* の関係が明らかにされている(10)。しかし、*S.aureus* については *icaADB* と biofilm 形成能との関連性について統一した結論は得られていない。そこで今回は人工股関節置換術など整形外科領域で Surgical site infection の主要な原因となっている MRSA(12)について Heilmann らの方法と PCR 法を用い、*icaADB* の有無 (genotype) と biofilm 形成能 (Phenotype) の関係を追試験した。また原因遺伝子をより明らかにするために *icaA*, *D* それぞれの有無 (genotype) と biofilm 形成 (Phenotype) の関係についても検証した。

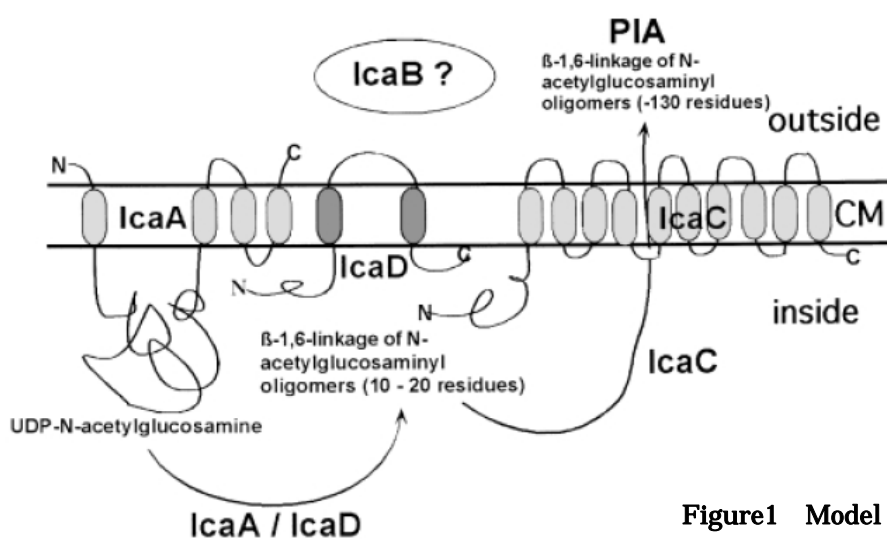


Figure1 Model of PIA biosynthesis.

icaA and *icaD* synthesize oligomers derived from UDP-N-acetylglucosamine(4).

Materials and Methods

Bacterial samples

今回実験に用いた検体は、2003年11月19日～2006年1月4日までの間に佐賀大学医学部附属病院の整形外科病棟に入院していた13人の患者の開放性の膿、非開放性の膿、関節液、から採取された13株のMRSA(SAGA1001~1013)、産業医科大学病院入院患者の血液より分離された2株のMRSA(UOEH6,45)および1株のMSSA(UOEH79)を併せた計16株の*S.aureus*である。佐賀大学医学部附属病院分離株は永沢善三博士より、産業医科大学病院分離株は田辺忠夫技師よりそれぞれ分与された。

Assay of biofilm on polystyrene

MRSA を、110 番培地に起こす (37 °C で 24 時間)

培地上より釣菌し、TBS (tryptosoya broth) +1% glucose に懸濁し、37 °C で 24 時間振盪培養。

TSB + 1% glucose 培地を 200 μ l ずつ 96 穴 plate に分注する。

上記の over night culture した菌(full growth の菌)を 1 μ l ずつ各 well に接種したものを triplicates で用意し、37 $^{\circ}$ C で 24 時間、48 時間、5 日間各々静置培養。

菌液を吸引除去し、well の底や側面に付着していない菌を除くため well を PBS (-) で 3 回洗浄した後、風に乾かす。

well の底や側面に付着している菌 (biofilm 形成菌) を 0.1% サフラニンで染色 (1 分間) した後、サフラニンを吸引除去し、well の染色の程度を目視で判断した。

Polymerase chain reaction (PCR)

純培養した菌を一白金耳採り滅菌水 100 μ l に懸濁する。

菌体を破壊するために 100 $^{\circ}$ C のお湯で 10 分間 boiling する。

菌体と DNA を分離するために 12000 rpm で 2 分間遠心し、その上清を鋳型 DNA とする。

下記の組成で用意した PCR 溶液を、それぞれのマイクロチューブに 50 μ l ずつ分注する。

PCR に用いた試料の組成	dose
Primer forward	0.5 μ l
Primer reverse	0.5 μ l
Taq (Takara Ex Taq [®])	0.5 μ l
10xBuffer	5.0 μ l
MgCl ₂ 25mM	4.0 μ l
H ₂ O	25.5 μ l
Sample (菌体 DNA 抽出液)	10 μ l

PCR : 以下の条件で 30 cycle の増殖を行う。

Step 1 initial denaturation at 94 $^{\circ}$ C for 2min
Step 2 denaturation at 94 $^{\circ}$ C for 1min
Step 3 annealing at 55 $^{\circ}$ C for 1min
Step 4 amplification at 72 $^{\circ}$ C for 2min
Step 5 Step 2 ~ 4 を 30 cycle 施行

TAE + Ethyldium bromide に、agarose を添加し 2% となるように調製した gel を用いて電気泳動する。この際、DNA size の marker として、100bp ladder の DNA を用いる。

今回の PCR で用いた primer の組成と特徴を Table 1 に示す。

使用した Primer	position	特徴
<i>icaADB</i>		
5'-TTATCAATGCCGAGTTGTC-3'	1893-1912	<i>S.epidermidis</i> specific (10)
5'-AGTTTAACGCGAGTGCGCTAT-3'	2409-2389	増幅産物 : 546bp

<i>icaA</i>		
5'-ACACTTGCTGGCGCAGTCAA-3'	2906-2925	<i>S.aureus</i> specific (16)
5'-TGTTGGATGTTGGTTCCAGA-3'	3074-3093	増幅産物 : 188bp
<i>icaA</i>		
5'-TCTCTTGCAGGAGCAATCAA-3'	1337-1356	<i>S.epidermidis</i> specific (15)
5'-TCAGGCACTAACATCCAGCA-3'	1524-1505	増幅産物 : 169bp
<i>icaD</i>		
5'-ATGGTCAAGCCCAGACAGAG-3'	3532-3551	<i>S.aureus</i> specific (16)
5'-TTGCTTTAAACATTGAAAATACT-3'	3729-3707	増幅産物 : 176bp
<i>icaD</i>		
5'-ATGGTCAAGCCCAGACAGAG-3'	1963-1982	<i>S.epidermidis</i> specific (15)
5'-CGTGTTTTCAACATTTAATGCAA-3'	2160-2138	増幅産物 : 176bp

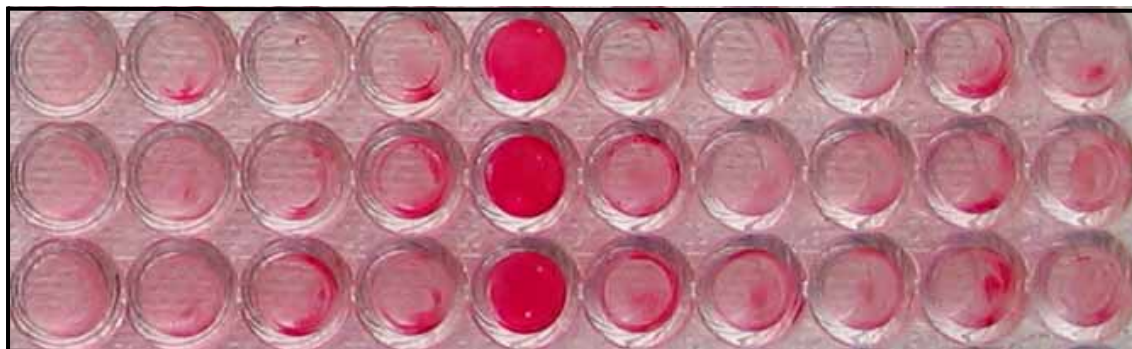
Table1. primer は過去に発表された論文 (15,17,18) において、*S.aureus* の *ica* gene の検出に有効とされているものを選択した。

Results

Phenotype

Figure2 に biofilm 形成(Phenotype)の結果を示す。sample 接種後 1 日後、2 日後、5 日後のそれぞれにおいてサフラニン染色を施し、biofilm 形成の有無を観察したが、sample 接種 1 日後に biofilm を形成なかったものは全て 2 , 5 日後にも biofilm を形成していなかったために、biofilm 形成に必要な期間は 1 日で十分であると判断した。写真は sample 接種後 2 日後のものである。

No.1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



No.11 12 13 14 15 16 control

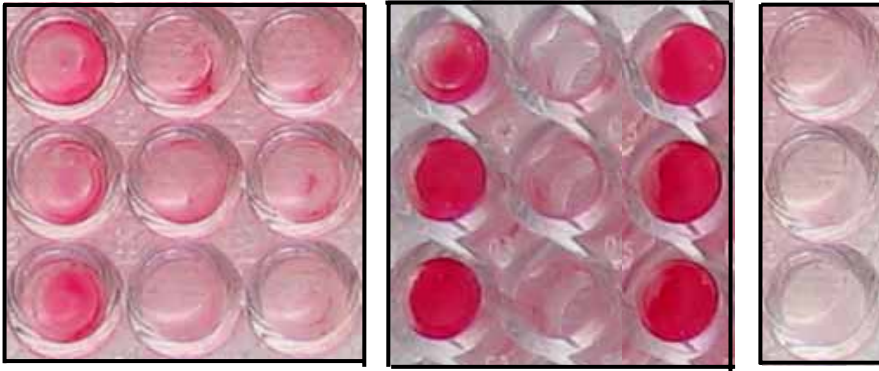


Figure2 各 sample (菌体) は3つずつ接種されており (triplicates), biofilm を形成した株はサフラニン色素により赤色に染色されて観察される。上段左端より sample No.1~10, 下段は No.11~16 であり、右端は菌体を加えずに培養液だけ注入した control である。また、No.15 は予め biofilm を形成しないことが分かっている菌株で、これを Negative control に用いた。

Figure2 より biofilm を形成した sample は No.1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 14, 16 であった。これらのうち、No.5,6,14,16 は著明に染色されており、明らかな biofilm 形成がなされたと判断した。

Genotype (PCR)

icaABD, *icaA*, *icaD* を標的とした primer を用いて行った PCR の結果 (genotype) をそれぞれ示す。(Figure 3~7, 各 band は左端より DNA size marker, No.1~16 を示す。)



Figure3. *icaADB*

Sample No.1,3,5,16 において 546bp の PCR 増幅産物が確認された。



Figure4. *icaA*

Sample No.13,15,16 において 100~200bp の範囲に PCR 増幅産物が確認された。

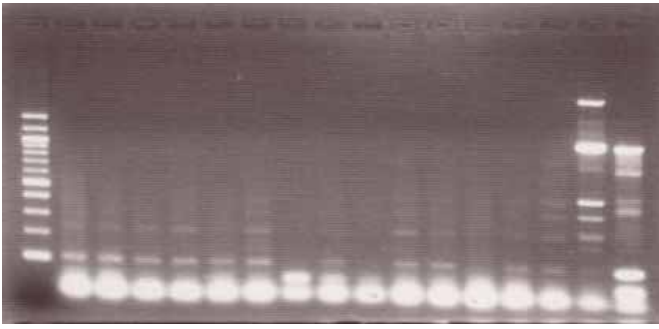


Figure5. *icaA*

それぞれの sample で様々な増幅産物が検出されているが、目標のサイズの増幅産物は確認されず non-specific pattern と考えられる。

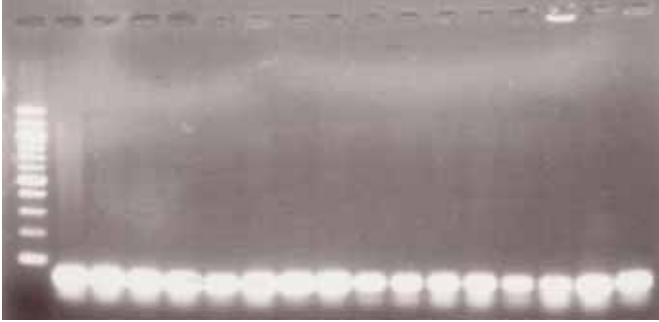


Figure6. *icaD*

全ての sample において PCR 増幅産物が確認されなかった。

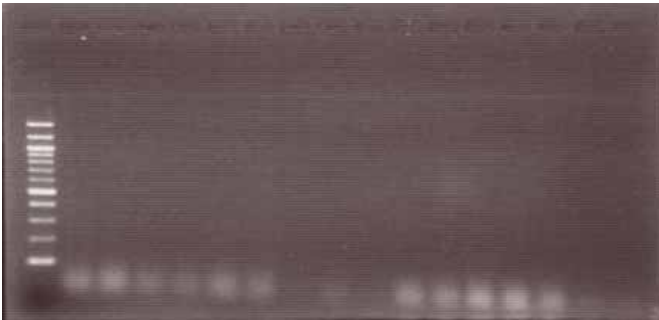


Figure7. *icaD*

Figure6 同様、全ての sample において PCR 増幅産物が確認されなかった。

icaADB の primer を用いた PCR において No.1,5,16 で 100 ~ 150bp の PCR 産物が観察されるが、予想された size とは異なるため、non specific な増幅産物であると考えられた。また、全ての PCR 結果において観察されている 100bp 以下の増幅産物は primer dimer であり、有意な増幅産物ではない。得られた biofilm 形成の結果 (phenotype) と PCR の結果(genotype)を照合し、Table2 に纏めた。Table3 は Table2 の結果を基に得た統計資料である。

sample No.	biofilm形成	<i>icaADB</i>	<i>icaA</i> (primer①)	<i>icaA</i> (primer②)	<i>icaD</i> (primer①)	<i>icaD</i> (primer②)
No.1	+	+	-	-	-	-
No.2	±	-	-	-	-	-
No.3	±	+	-	-	+	-
No.4	±	-	-	-	+	-
No.5	++	+	-	-	+	-
No.6	++	-	-	-	+	-
No.7	±	-	-	-	+	-
No.8	±	-	-	-	+	-
No.9	+	-	-	-	-	-
No.10	±	-	-	-	-	-
No.11	+	-	-	-	+	-
No.12	-	-	-	-	+	-
No.13	-	-	+	-	-	-
No.14	++	-	-	-	+	-
No.15	-	-	+	-	+	-
No.16	++	+	+	-	-	-

Table2 biofilm 形成の程度の評価は -、±、+、++ の 4 段階とした。尚、sample15 は過去の実験 (10) で用いられた

sample でもあり、既に biofilm 形成能がないことが確認されているので、これを negative control として評価の尺度とした。また、***Materials and Methods*** で記載した通り、培養後 day1, day2, day5 のそれぞれを観察し、全ての sample の観察結果より総合的に判断した。

		Presence of <i>icaADB</i>			
		positive	negative	total	
formation	Biofilm	positive	4(100%)	9(75.0%)	13(81.3%)
	negative	0(0%)	3(25.0%)	3(18.7%)	
	total	4(25.0%)	12(75.0%)	16(100%)	

		Presence of <i>icaA</i>			
		positive	negative	total	
formation	Biofilm	positive	4(100%)	9(75.0%)	13(81.3%)
	negative	0(0%)	3(25.0%)	3(18.7%)	
	total	4(25.0%)	12(75.0%)	16(100%)	

		Presence of <i>icaD</i>			
		positive	negative	total	
formation	Biofilm	positive	4(100%)	9(75.0%)	13(81.3%)
	negative	0(0%)	3(25.0%)	3(18.7%)	
	total	4(25.0%)	12(75.0%)	16(100%)	

Table3 biofilm formation と *ica* gene の存在の相関 : ()内は% : *icaADB*, *A*, *D*のそれぞれについて positive or negative ごとに biofilm を形成する割合を算出した。

Discussion

この実験で *icaADB* gene 検出のために用いた primer は Miyamoto H et al の論文 (10)で使用されていた primer と同一のものである。これらは元々 *S.epidermidis* の *icaADB* gene の一部 : 546bp の増幅を目的とした primer (10) であり、今回の我々の sample は *S.epidermidis* ではなく *S.aureus* であるが、*ica* gene に関して両者は非常に類似しており、同様の primer で検出可能であると考えられている (15)ため、この primer を用いた。

Table2 より、*icaADB* が検出された sample は全て biofilm を形成している (No.1, 3, 5, 16) が、一方で *icaADB* が検出されなかった sample の 75.0% も同様に biofilm を形成している (No.2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 14)。この結果からは過去の論文 (17) で示唆された内容に反し、biofilm 形成に *icaADB* は必要ないという結論が導かれる。また、biofile 形成の程度と、*ica* gene の有無についても相関は認められなかった。

icaA に関しては *S.aureus* に特異的な primer (*icaA*) を用いたが、*icaA* positive の 3samples のうち biofilm 形成したのは 1sample (33.3%) であるのに対し、*icaA* negative の 13samples のうち biofilm 形成したのは 12samples (92.3%) に上った。

同様に *icaD* についても、*S.aureus* に特異的な primer (*icaD*) を用いたが、*icaD* positive の 10samples のうち、biofilm 形成したのは 8 samples (80%) であるのに対し、*icaD* negative の 6samples のうち biofilm 形成したのは 5samples (83.3%) であった。

以上の結果を踏まえると、*S.aureus* に特異的な primer を用いたにも関わらず *icaA*, *icaD* negative の sample が biofilm を形成していることから、今回の実験結果からは *icaA*, *icaD* は必ずしも biofilm 形成には関与しないと見える。Rohde et al の論文 (16) でも *icaA*, *icaD* と biofilm 形成は関係ないと主張しているが、この研究では実験に用いた全ての *S.aureus* から *icaA*, *icaD* が検出されたにも関わらず

biofilm を形成するものとし、ないものが存在することから、その関係性を否定したもので今回の実験結果とはまた異なる。

一方、*S.epidermidis* に特異的とされる primer(*icaA*、*icaD*) (15) を用いた PCR では、全ての sample において *icaA*, *icaD* ともに検出されなかった。このことから、Arciola et al の論文 (15) で、紹介されているような *icaA*, *icaD* についての *S.aureus* と *S.epidermidis* 間での相同性は認められないと考えられる。

同様の研究は幾つか行われており、Arciolar et al の研究 (15) においては分離された 23 株の *S.aureus* のうち 14 株 (61%) に *icaA* gene が検出されたが、Horstkotte らはそれに対し臨床現場より収集された 80 株の *S.aureus* すべてに *icaA* gene を検出した (Horstkotte MA, Knobloch JKM, Rohde H, Mack D, Unpublished data) と反論している (16)。また、Cramton らの研究 (17) によれば *icaA* gene を有していても強固な biofilm 形成が認められない菌株もあり、遺伝子の存在が必ずしも表現型に反映されているわけではなく、詳細は不明だが表現型を決める何らかの因子、例えば転写制御因子等が他にもあるのではないかと考えられる。

以上のように *S.aureus* の biofilm 形成と *ica* gene との間には関連性は認められない。しかし今回の実験では用いた sample 数が少ないこと、また実験回数が少ないことから十分に再現性を吟味されていない点等、不十分な点が多々残っている。今後、この関係を明らかにするためにはより多くの sample を用いた大規模な実験を、より特異性の高い primer を用いて行うことが必要であると考えられる。

References

1. Arakawa Y, Ike Y, Nagasawa M, Shibata N, Doi Y, Shibayama K, Yagi T and Kurata T: Trends in antimicrobial-drug resistance in Japan. *Emerg Infect Dis*(2000)6:572-575
2. Tenover FC and Gaynes RP: The epidemiology of Staphylococcus infections; in Gram-Positive Pathogens, Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA and Rood JI eds, American Society for Microbiology, Washington DC(2000)pp414-421
3. Konno M: Nosocomial infections caused by methicillin-resistant Staphylococcus *S.aureus* in Japan. *J Infect Chemother*(1995)1:30-39
4. Gotz F: Staphylococcus and biofilms. *Mol Microbiol*(2002)43:1367-1378.
5. Donlan RM and Costerton JW: Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*(2002)15:167-193
6. Hall-Stoodley, L, Costerton JW and Stoodley P: Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious disease. *Nature Rev Microbiol*(2004)2:95-108
7. Witte W, Bräulke C, Heuck D, Cuny C: Analysis of nosocomial outbreaks with multiply and methicillin-resistant Staphylococcus *S.aureus* (MRSA) in Germany: implications for hospital hygiene. *Infection* (1994)22:128-134
8. The Hospital Infection Control Practices Advisory Committee, Centers for Disease Control and Prevention: Guideline for isolation precautions in hospitals: Part . Recommendations for isolation

precautions in hospitals. *Am J Infect Control*(1996)24:32-52

9. Tacconelli E, Venkataraman L, De Girolami PC, D'Agata EM: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia diagnosed at hospital admission: distinguishing between community-acquired versus healthcare-associated strains. *J Antimicrob Chemother*(2004)53:474-479

10. Miyamoto H, Imamura K, Kojima A, Takenaka H, Hara N, Ikenouchi A, Tanabe T, Taniguchi H: Survey of nasal colonization by, and assessment of a novel multiplex PCR method for detection of biofilm-forming methicillin-resistant staphylococci in healthy medical students. *Journal of Hospital Infection* (2003) 53:215-223

11. Kalmeijer MD, Nieuwland[^]Bollen E, Bogaers-Hofman D, de Baere GA: Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* is a major risk factor for surgical-site infections in orthopedic surgery. *Infect Control Hosp Epidemiol*(2000)21:319-323

12. Ridgeway S, Wilson J, Charlet A, Kafatos G, Pearson A, Coello R: Infection of the surgical site after arthroplasty of the hip: *Journal of Bone & Joint*(2005)87:844-850

13. Soriano A, Popescu D, Garcia S, Bori G, Martinez JA, Balasso V, Marco F, Almela M, Mensa J: Usefulness of teicoplanin for preventing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in orthopedic surgery. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*(2006)25:35-38

14. *Toda new microbiology* 32nd edition: 167-168

15. Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L: Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of Staphylococcal strains from catheter-associated infections. *Journal of Clinical Microbiology*(2001)39:2151-2156

16. Rohde H: Correlation of *Staphylococcus aureus icaADBC* genotype and biofilm expression phenotype. *Journal of Clinical Microbiology*(2001)39:4595-4596

17. Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Gotz F: The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infection and Immunity*(1999)67:5427-5433