

学位研究紹介

***Pseudomonas aeruginosa* の人工 biofilm 形成と共焦点レーザー顕微鏡による分析**
Artificial *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and the Confocal Laser Scanning Microscopic Analysis

新潟大学歯学部歯科保存学第一講座¹
 口腔細菌学講座²

竹中彰治¹, 岩久正明¹, 星野悦郎²

Department of Operative Dentistry and Endodontics¹,

Department of Oral Microbiology²,

Faculty of Dentistry, Niigata University

Shoji Takenaka, Masaaki Iwaku, Etsuro Hoshino

目 的

臨床の場において、起炎菌に対して *in vitro* では有効な殺菌剤も、実際の病巣で十分な殺菌効果が得られない場合がある。そういった細菌感染症の難治化要因のひとつとして生体表面や組織内に形成する細菌の biofilm が注目されている。なかでも慢性気道感染症などの原因となっている *Pseudomonas aeruginosa* (緑膿菌) による biofilm は難治性感染症の病態として注目され、種々報告されているものの、biofilm そのものの形成メカニズムや biofilm としての生態などは十分に解明されていない。そこで、形成メカニズムおよびその生態、薬剤抵抗性を検討する目的で、*in vitro* 人工 biofilm 形成モデルを考案し、形成した人工 biofilm を共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) を用いて分析した。CLSM は、試料内の焦点面からのみの蛍光を抽出して画像化することにより、試料の 3 次元構造を壊すことなく任意の深さでの光学的断層像を取得、解析することが可能である。

方 法

臨床分離株 *P. aeruginosa* PT1252 株の人工 biofilm 形成は細菌を均一に分散した状態に遠心することのできる機器である CytoFuge にて、スライドガラス上においたカバーガラス上に被験細菌を遠心し、人工的に付着させ、その後、培地を灌流し培養した。0-24 時間培養し形成された biofilm はグルタルアルデヒドにて固定後、菌体は propidium iodide (PI)、菌体外多糖体は FITC-ConA にて染色し、CLSM にて観察した。また、CLSM による biofilm 中の総細菌数の測定のために、既

知の菌数の細菌を CytoFuge にて付着させ、PI にて染色後、総蛍光量と細菌数の比例関係を調べた。また、biofilm 形成菌とそうでない浮遊菌との薬剤感受性の違いを調べるため、37°C、24 時間緩やかな攪拌培養中に培養瓶に付着した細菌を超音波で回収し、*P. aeruginosa* にもっとも効果があるとされるシプロフロキサシン (CPF) に対する最小発育阻止濃度 (MIC) と最小殺菌濃度 (MBC) を測定した。浮遊菌についても同様に測定した。また、人工 biofilm 中の細菌の薬剤抵抗性の検討として、12 時間および 24 時間培養した biofilm に対し、浮遊菌に対する MBC (6.26 μg/ml) の CPF をそれぞれ 60-120 分作用させ、SYTO9 で生菌を、PI で死菌をそれぞれ分別染色し、CLSM でその割合を調べた。

結果と考察

biofilm 形成過程の観察では、経時的に面積を増す方向 (XY 方向)、厚さを増す方向 (XZ 方向) とともに増加しており、XY 方向には遠心直後には 10% 程度を占めておいた細菌は、8 時間後にガラス表面の 25% を、12 時間培養で 50%、24 時間で 75% を占めるまでに増殖していた。biofilm を XZ 方向に 1 μm の厚さの断層分析をすると、細菌はガラス平面付着部に最も多く、深部から表層

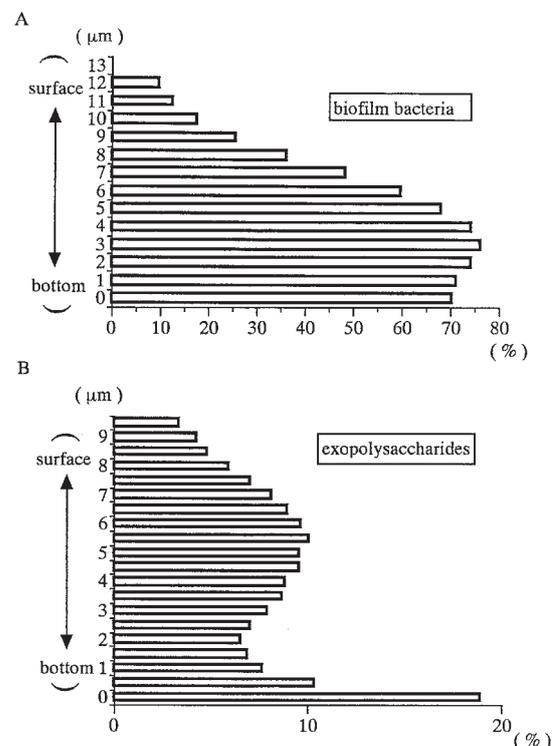


図 1 24h 培養で形成された biofilm の断層解析
 A : biofilm 中の細菌の分布 B : 菌体外多糖の分布

にいくにしたがって細菌数が減じていた。(図1 A)厚さは8時間で $6\mu\text{m}$, 12時間で $9.5\mu\text{m}$ に増加していた。また, biofilm 中には ConA 反応性菌体外多糖も形成されていた。24時間後には, ガラス表面が一番多く面積の19.5%を占め, 上方に行くにしたがってその割合を減らし, $5\mu\text{m}$ 付近でまた増加する, 2峰性を示した。(図1 B)

薬剤感受性試験では, 浮遊菌, biofilm 形成菌共に MIC は $3.13\mu\text{g/ml}$ と違いはみられないものの, MBC では浮遊菌が $6.26\mu\text{g/ml}$ であるのに対し biofilm 形成菌が $25\mu\text{g/ml}$ と約3倍もの濃度であった。(表1) これは, biofilm 形成により細菌自身の代謝活性が変化し, 浮遊菌に比してはるかに抵抗力がもった可能性を示唆している。人工 biofilm での薬剤抵抗性の検討では, 12時間培養の biofilm に対する CPF₆₀分作用では全体の約38%が生菌で, ガラス平面から $1\mu\text{m}$ ごとの生菌の割合は, ガラス平面で約37%であるのに対し, $8\mu\text{m}$ 上方ではわずか1%にすぎなかった。(図2) CPF₉₀分作用ではすべて殺菌されていた。一方, 厚みを増した24時間培養の biofilm では, 120分作用させても約11%が生菌であった。

以上の成績の様に, CytoFuge による遠心力を利用し, 人工 biofilm の形成が容易に行えるようになった。また, CLSM を用いることにより biofilm の複雑な3次元構造を壊すことなく, これを構成する細菌数を蛍光強度を測定することで算出できた。また, 人工 biofilm 構造分析や死菌/生菌の分別が可能なることから, その生態や, biofilm としての薬剤に対する抵抗力などの測定もできた。本研究により biofilm の研究を飛躍的に高める基本的な研究手段が確立された。

表1. 浮遊菌と biofilm 形成菌の CPF₆₀における MIC, MBC

| | MIC | MBC |
|-----------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| non-adhered organisms | 3.13 ($\mu\text{g/ml}$) | 6.25 ($\mu\text{g/ml}$) |
| natural biofilm-forming organisms | 3.13 | 25 |

*MIC: minimum inhibitory concentration

MBC: minimum bactericidal concentration

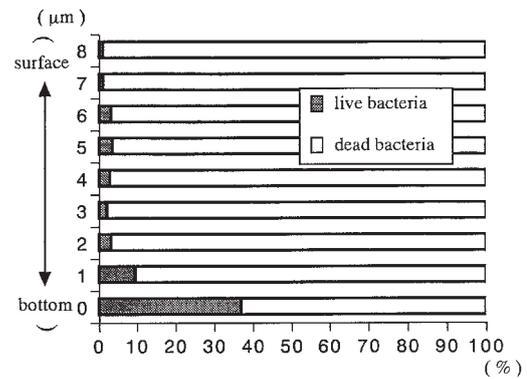


図2 12h 培養の biofilm に対する CPF₆₀分作用時の biofilm 底面から $1\mu\text{m}$ ごとの生菌, 死菌の分布