

界を超えた複合菌種による難治性バイオフィーム感染症
 —複合バイオフィーム形成と代替動物モデルを用いた治療法の検討—

Biofilm infection Due to Cross-Kingdom Dual-Species: Evaluation of Antimicrobial Drug Resistance in *Escherichia coli* Induced by *Candida albicans* and the Development of Alternative Animal Models for Developing New Treatment Methods

令和 2 年度入学 江島 慎太郎 (Eshima, Shintaro)

近年、医療の高度化や社会の高齢化が進む中、医療デバイスを留置する患者の数は増加傾向にある。これらのデバイスは生命維持には不可欠な一方で、デバイス関連合併症という新たな課題も引き起こしている。特に、医療デバイス関連感染症は頻繁に発生しており、その診断と治療には患者の臨床検体から病原微生物を分離することが必須となる。厚生労働省の院内感染対策サーベイランス(JANIS)によれば、国内の入院患者から過去 10 年間に最も多く分離された細菌は *Escherichia coli*、真菌では *Candida*

albicans であった。申請者の勤務先施設(さがみ林間病院)でも同様の傾向が見られた(図1)。

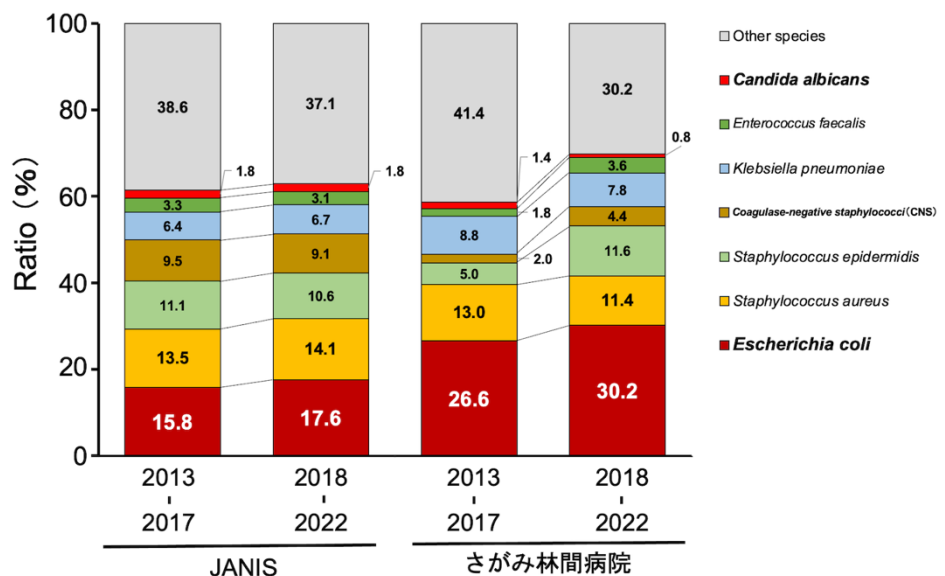


図1 血液検体からの分離比率(2013-2022年)

病原微生物は血流を通じて医療デバイスに付着し、バイオフィルムを形成する。バイオフィルムを形成した微生物は、浮遊細胞状態と比べて抗菌薬に対する抵抗性が著しく上昇するため治療を困難にする。また、カテーテル関連血流感染症の約15%は、複数の菌種による複合感染であり、真菌と細菌の界(kingdom)を超えた複合バイオフィルム感染も確認されている。しかしながら、高頻度に分離される組み合わせである *E. coli* と *C. albicans* の複合バイオフィルム系に関する研究は限定されている。これは適切な *in vivo* 評価モデルが確立されていないことが一因と考えられる。

本研究では、当院の患者血液から分離された *E. coli* のバイオフィルム形成能と抗微生物薬抵抗性を評価することで、*E. coli* が *C. albicans* と複合バイオフィルムを形成する際の抗微生物薬抵抗性について検討した。また、複合バイオフィルムに対する効果的な抗微生物薬投与法を探索するため、宿主内での治療効果が評価できる代替動物モデルを開発し、併用投与の有効性を評価した。

1. 患者血液由来 *Escherichia coli* のバイオフィルム形成能と抗菌薬感受性¹⁾

入院患者の血液検体から分離された52株の *E. coli* 臨床分離株のうち、14株(26.9%)が *in vitro* バイオフィルム形成能を有しており、特に4株は高形成能を示した(図2)。これらの4株は浮遊細胞条件下では Meropenem(MEPM)、Cefmetazole (CMZ)、Ceftriaxone (CTRX)、Levofloxacin (LVFX) に対して感

受性を示した(図2)。以後の実験では、高いバイオフィルム形成能を示したRB-3株を供試菌株とした。

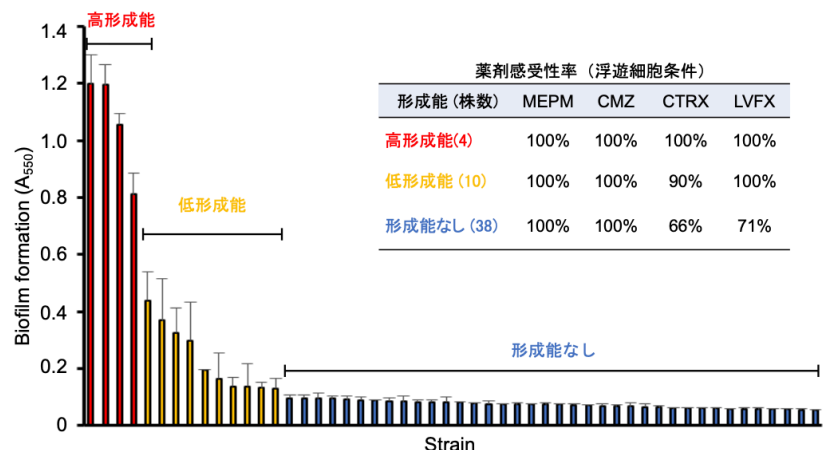


図2 バイオフィルム形成能と浮遊細胞での抗菌薬感受性

バイオフィーム中の生菌数(CFU, colony forming unit)は抗菌薬の濃度依存的に減少したが、最小発育阻止濃度(MIC, minimum inhibitory concentration) (MEPM, ≤ 1 ; CMZ, ≤ 8 ; CTRX, ≤ 1 ; LVFX, $\leq 0.5 \mu\text{g/mL}$)を大幅に超える濃度(50 $\mu\text{g/mL}$)でも 10^5 CFU が生存していた(図 3)。なお、菌株の収集は、倫理審査委員会の承認後に実施した。

E. coli RB-3の最小発育阻止濃度 (MIC)

Antibacterial drugs	MEPM	CMZ	CTRX	LVFX
MIC value ($\mu\text{g/mL}$)	≤ 1	≤ 8	≤ 1	≤ 0.5

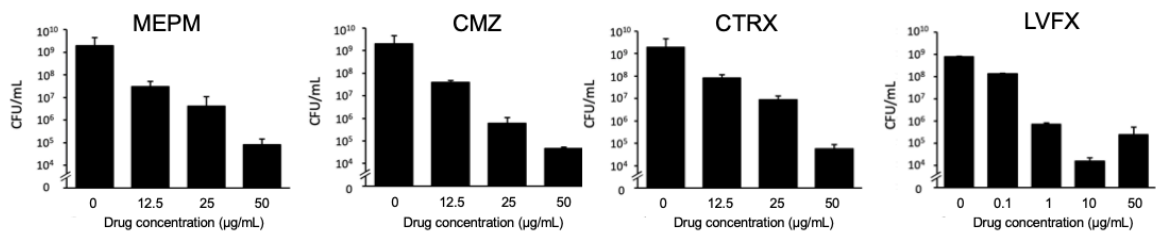


図 3 *Escherichia coli* バイオフィームに対する抗菌薬抵抗

MEPM, メロペネム; CMZ, セフメタゾール; CTRX, セフトリアキソン; LVFX, レボフロキサシン

2. *In vitro Escherichia coli – Candida albicans* 複合バイオフィームの抗菌薬抵抗性機序の解析¹⁾

MEPM は *E. coli* による敗血症の経験的治療薬として使用されるため *E. coli – C. albicans* 複合バイオフィームにおける MEPM の感受性について検討した。*E. coli* 単独バイオフィームにおける *E. coli* CFU は MEPM 存在下で、コントロールに比べて 10^{-4} CFU を示したが複合バイオフィームでは 10^{-2} CFU までしか減少しなかった(図 4A)。*C. albicans* CFU はいずれの条件でも影響を受けなかった(図 4B)。このことから、*C. albicans* との複合系

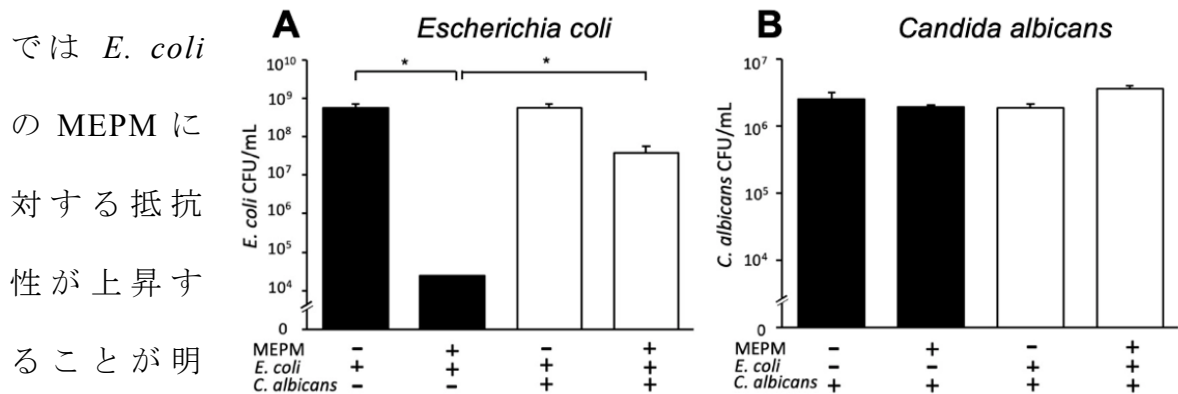


図 4 複合バイオフィームにおける *Escherichia coli* と *Candida albicans* の生菌数
MEPM, メロペネム; *, $p < 0.05$

では *E. coli* の MEPM に対する抵抗性が上昇することが明らかになっ

た。*E. coli* 単独バイオフィームに *C. albicans* の培養上清を添加したところ、*E. coli* の MEPM 抵抗性は上昇したことから、*E. coli* の MEPM 抵抗性には *C. albicans* の分泌物質が関与していると推定された(図 5)。この抵抗性に関与する物質を解析するために培養上清を加熱(100°C, 30 分)、Lyticase、DNase および Proteinase K 処理をしたがいずれも *E. coli* の MEPM 抵抗性に大きな影響を与えなかった(図 5A, 5B)。培養上清の分画処理の検討から 10 kDa 以下の画分に MEPM 抵抗性を高める活性が認められた(図 5C)。

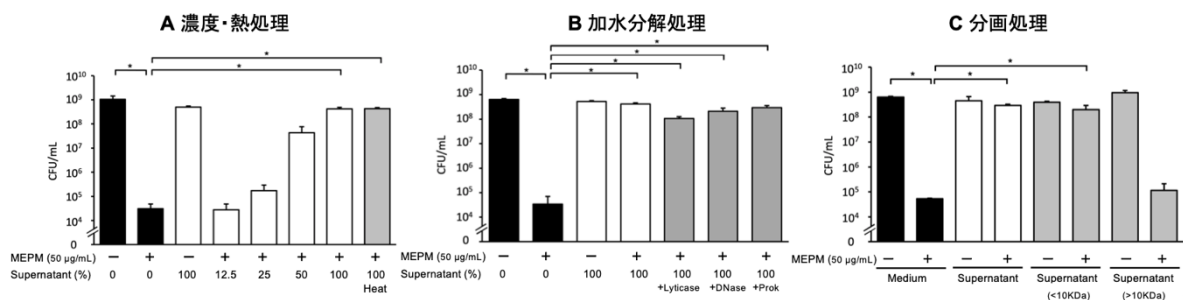


図5 *Escherichia coli* バイオフィームに対する *Candida albicans* 培養上清の影響
MEPM, メロペネム; *, $p < 0.05$

3. *In vivo Escherichia coli – Candida albicans* 複合バイオフィーム代替動物モデルの作製と治療評価²⁾

複合バイオフィームに対する抗微生物薬治療法提案のために代替動物モデルを構築し、これを用いて治療効果を評価した。カイクにカテーテルを擬似したポリウレタン繊維 (PF) を挿入し、*E. coli* と *C. albicans* を接種

したところ

PF 表面にバ

イオフィル

ムが形成さ

れ、その形成

量は複合系

が最も高か

った(図 6)。

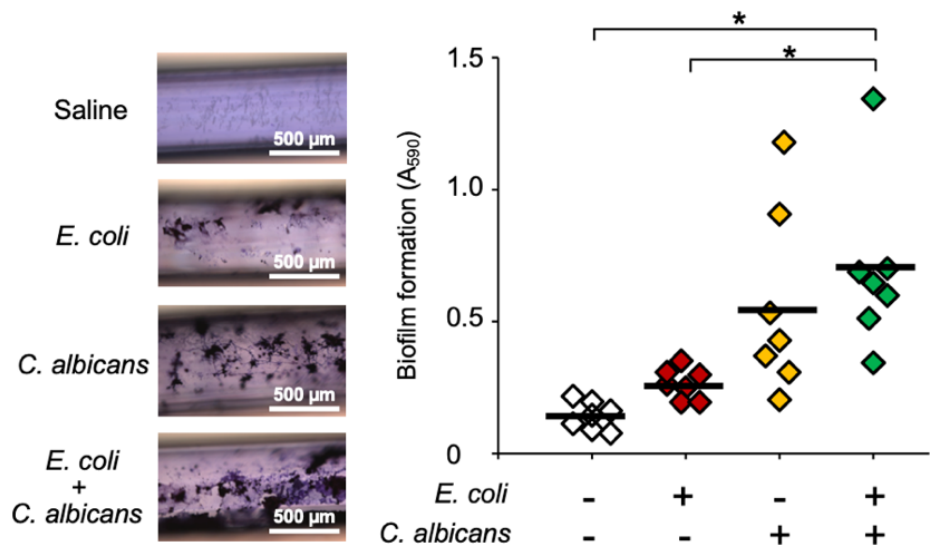


図6 動物代替モデルにおけるポリウレタン繊維表面上の *Escherichia coli* - *Candida albicans* 複合バイオフィーム形成 *, $p < 0.05$

次に、このカイコモデルに MEPM を投与したところ、PF 表面の *E. coli* CFU は *C. albicans* の共接種により増加した。このことから、複合バイオフィーム系において *E. coli* の MEPM 抵抗性が增強されることがカイコモデルでも確認できた(図 7)。*C. albicans* バイオフィームの形成阻害には、ミカファンギン(MCFG)が有効であると考えられる。

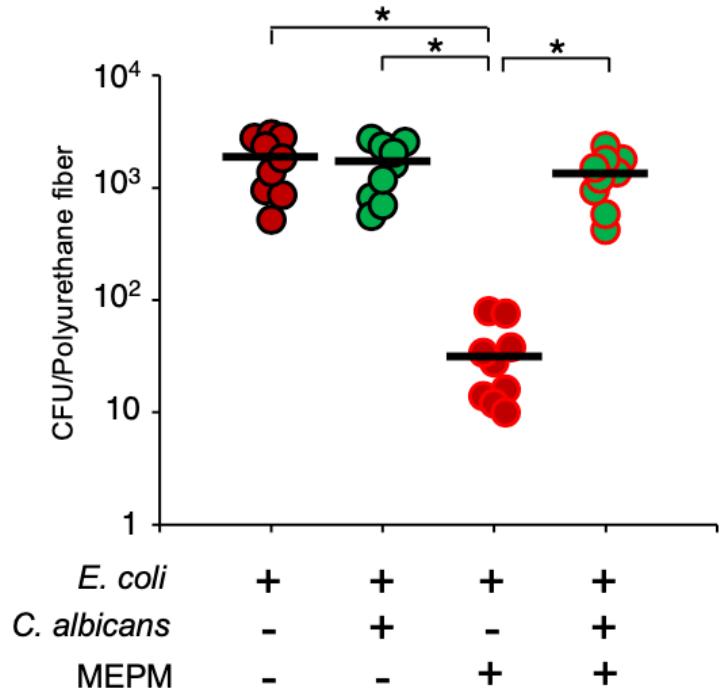


図7 ポリウレタン繊維挿入動物代替モデルにおける *Escherichia coli* のメロペネム抵抗性 MEPM, メロペネム; *, $p < 0.05$

そこで、複合バイオフィーム感染カイコモデルに MEPM と MCFG を併用投与したが、*E. coli* と *C. albicans* のいずれの CFU にも変化を与えなかった(図 8)。このことは、複合バイオフィーム系においては *C. albicans* が抗真菌薬にも抵抗性を示し、MEPM と MCFG の併用によって複合バイオフィーム内の菌の増殖を阻止することは困難であることを示唆している。

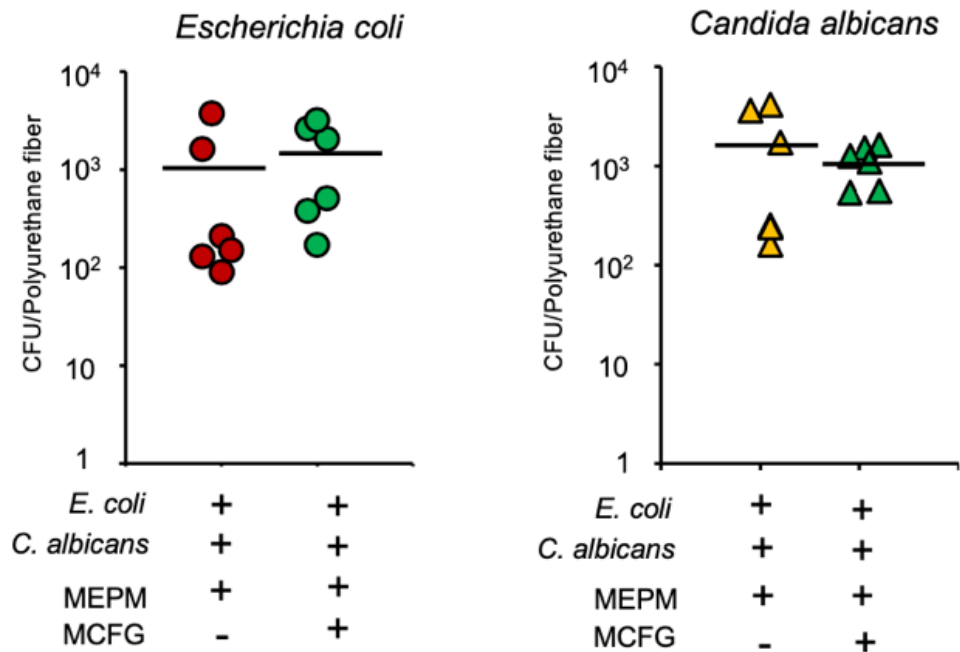


図8 ポリウレタン繊維挿入動物代替モデルにおける *Escherichia coli* のメロペネム抵抗性に対するミカファンギンの効果 MEPM, メロペネム; MCFG, ミカファンギン

総括

本研究では、高バイオフィルム形成能を持つ *Escherichia coli* 血液由来臨床分離株を用いて、*Candida albicans* との複合バイオフィルム形成が *E. coli* の抗菌薬抵抗性を増強することを明らかにした。この増強作用は、*C. albicans* の培養上清中の 10 kDa 以下の画分に起因していた。

さらに、*in vivo* 評価系として代替動物にカイコを用いた複合バイオフィルム感染モデルを構築し、*in vitro* と *in vivo* の両方の実験系で、*C. albicans* による *E. coli* の抗菌薬抵抗性の誘導を確認した。この結果から、複合バイオフィルム形成は抗菌薬治療を困難にし、特に *C. albicans* との複合バイオフィルムにおいては治療をより難しくすることが示唆された。従って、抗菌薬に不応答な症例では、医療デバイス表面におけるバイオフィルム形成の菌学的診断が重要となる。今後は、本研究で構築した *in vivo* 評価系を用いた抗菌薬の最適な組み合わせに基づく新たな治療戦略の開発が期待される。

《 参考文献 》

- 1) Eshima S., Kurakado S., Matsumoto Y., Kudo T., Sugita T., *Microorganisms* **10**, 2127 (2022).
- 2) Eshima S., Matsumoto Y., Kurakado S., Sugita T., *PLoS One* **18**, e0288452 (2023).