

ふりがな ひらたたつお
氏名 平田龍緒
学位 博士(農学)
学位記番号 新大院博(農)第78号
学位授与の日付 平成19年3月22日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名

細菌バイオフィルムの薬剤耐性に関する研究

論文審査委員

主査 教授 仲川洋治
副査 教授 渡邊剛志
副査 教授 堀秀隆
副査 助教授 鈴木一史

博士論文の要旨

細菌はバイオフィルムを形成することで、消毒薬や抗生物質などの抗生剤に対して浮遊状態にある菌に比べ高い耐性を持つといわれている。このような耐性を示す要因を明らかにするために、消毒薬耐性、抗生物質耐性、それぞれに関して実験を行った。

1. バイオフィルム消毒薬MBC測定における誤判定の可能性とその原因の検討

バイオフィルム内の菌体は、消毒薬に対し耐性であると以前から言われていた。しかし、我々は、*Serratia marcescens* 274 と *Pseudomonas aeruginosa* PAOIT のバイオフィルムが、閉鎖循環系にして、バイオフィルムの全てに消毒薬を作用させる回転法による消毒を行った場合、感受性を示すことを発見した。結果として、バイオフィルム内の全菌体は、回転法により、浮遊菌と同程度の消毒薬濃度で死滅していた。これは、従来言われてきたバイオフィルムの消毒薬耐性が絶対的なものではなく、菌体外多糖による消毒薬浸透性の低下という防御機構は、回転法によって回避できるということを示したものである。バイオフィルムの消毒薬耐性への誤解の原因として、受動的なバイオフィルムの消毒薬作用域外への移行という事が、同時に発見された。バイオフィルム内の菌体それ自体は、消毒薬に対し特異的な耐性機構を持たず、バイオフィルムの完全な消毒は、全てのバイオフィルムを回転法で消毒薬に浸すことで可能になるということを示した。

2. *Serratia marcescens* の産生する物質を利用した薬剤感受性バイオフィルム変異株の新選別法

バイオフィルムの抗生物質に対する耐性を調べるためには、抗生物質感受性を示す変異株をスクリーニングする必要がある。数多くの変異株の中から、目的の変異株を単離するために、*S. marcescens* 274 の産生する赤色色素を裸眼で認識できるマーカーとして利用した。この方法により、*S. marcescens* Tn5 変異株から、ABPC 感受性バイオフィルム形成変異株をスクリーニングした。得られた変異株は、4つのグループに大別され、その内、3つのグループが遺伝的に分析された。2つのグループの Tn 挿入遺伝子は、菌体外多糖の形成に関与しているように思われた。もう1つのグループは、ferric enterobactin-binding protein の遺伝子に、高い相同性を持つ遺伝子に Tn が挿入されていた。

そして、これらのスクリーニングされた変異株は全て、ABPC 感受性バイオフィルムを形成することが、ポリスチレン管で再確認された。それゆえ、この方法は、抗生物質感受性バイオフィルム形成変異株をスクリーニングするのに、有用であることが証明された。

審査結果の要旨

本論文はバイオフィルム耐性を示す要因を明らかにするために、次の二点が論じられており、その結果が評価された。

1. バイオフィルム消毒薬MBC測定法の検討

バイオフィルム内の菌体は、消毒薬に対し耐性であると以前から言われていた。しかし、閉鎖循環系でバイオフィルムの全てに消毒薬を作用させる回転法の場合、感受性を示すことを発見した。さらに、バイオフィルムの消毒薬作用域外への移行という現象も見つけている。バイオフィルム内の菌体それ自体は、消毒薬に対し特異的な耐性機構を持っていないことを明らかにした。

2. 薬剤感受性バイオフィルム変異株の新選別法

バイオフィルムの抗生物質感受性変異株を取得するために、*S. marcescens* 274 の産生する赤色色素をマーカーとして利用する方法を開発した。この方法を用いて、*S. marcescens* Tn5 変異株から、ABPC 感受性バイオフィルム形成変異株をスクリーニングし、4 つのグループに大別された変異株を得た。遺伝子解析の結果は Tn の挿入位置が異なる ABPC 感受性バイオフィルムを形成することが、ポリスチレン管で再確認している。この方法が、抗生物質感受性バイオフィルム形成変異株をスクリーニングするのに、有用であることを明らかにした。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として、十分であると認定した。