

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20791110

研究課題名（和文）

大腸菌性尿路感染症対策としての抗バイオフィルム剤探索とその基盤技術の開発

研究課題名（英文）

*Escherichia coli* biofilms in urinary tract infections -the development of novel methods for identifying antibiofilm agents-

研究代表者

和田 耕一郎 (WADA KOICHIRO)

岡山大学・岡山大学病院・医員

研究者番号：20423337

研究成果の概要（和文）：大腸菌性尿路バイオフィルム感染症の予防法および治療法の確立を主要な目的として研究を遂行した。14年間の後ろ向き研究において、フルオロキノロン系抗菌薬に非感受性を示す大腸菌の分離頻度は増加傾向にあり、そのバイオフィルム形成能は主要な耐性メカニズムではないものの多剤耐性化に関与すると考えられた。新規スクリーニング法にてクランベリー尿中代謝物がバイオフィルム形成抑制効果を示すことを見出したが、新規 *in vivo* 実験モデル系での評価には至らなかった。

研究成果の概要（英文）：This study was aimed at establishing new strategies for prevention and therapy of *Escherichia coli* biofilms in urinary tract infections. On the emergence of *E. coli* strains with increasing resistance to fluoroquinolones, the relationship between fluoroquinolone insusceptibility and biofilm-forming capabilities has not been clarified, but its multiple resistance mechanism was suggested. By a novel method to screen antibiofilm agents, some compounds from urine metabolites of cranberry were found, but further studies were needed to evaluate them *in vivo* models.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：大腸菌、バイオフィルム、尿路感染症、フルオロキノロン、耐性メカニズム、実験モデル系

## 1. 研究開始当初の背景

近年、抗菌薬の乱用によって薬剤耐性菌が臨床的にも社会的にも問題となっている。大腸菌 (*Escherichia coli*) は尿路感染症 (Urinary Tract Infection: UTI) の原因菌として分離頻度の高い細菌の1つである。フルオロキノロン (FQ) 系抗菌薬は効果的な治療薬として、尿路性器感染症に広く用いられてきた。その結果、大腸菌の FQ 系抗菌薬に対する耐性化が進行している。また、大腸菌を原因菌としたカテーテル関連尿路感染症や細菌性前立腺炎は、その感染成立の機序において細菌バイオフィルムの形成が重要な役割を果たしていることが報告されている。細菌バイオフィルムが慢性的な抗菌薬の暴露を生み、薬剤耐性を獲得することでさらにバイオフィルムの形成を助長してしまうという負のサイクルを断ち切る研究が急務とされている。

## 2. 研究の目的

(1) 大腸菌が分離された UTI 患者の臨床背景や疫学的調査を行うとともに FQ 系抗菌薬の薬剤耐性機構や難治性尿路感染症の一因とされているバイオフィルム形成能について検討する。

(2) 大腸菌性尿路バイオフィルム感染症に対する予防法・治療法の開発を目的として、リアルタイムイメージングが可能な *in vitro* および *in vivo* の新規実験モデル系を確立して、抗バイオフィルム剤の探索を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 臨床検体と分離菌

UTI 患者は、膿尿 (白血球数  $\geq 5$ /HPF) お

よび細菌尿 (生菌数  $\geq 1.0 \times 10^4$  cfu/mL) を有する者とした。1994~2007 年の 14 年間に岡山大学泌尿器科において、UTI 患者の尿から分離された大腸菌 828 株 (1 患者 1 感染) を対象とした。

### (2) 薬剤感受性試験

UTI患者の尿から分離された大腸菌について、Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) に準じた微量液体希釈法により各種抗菌薬のMIC (最小発育阻止濃度) を測定した。MICの測定に供した抗菌薬は、ampicillin, cefazolin, ceftazidime, gentamicin, minocycline, imipenem, gentamicin および FQ系抗菌薬として ofloxacin, norfloxacin, levofloxacin, sparfloxacin, ciprofloxacin, tosufloxacin, sitafloxacin であった。CLSI の基準に従い、ofloxacinのMICが4  $\mu$ g/mL以上の菌株をFQ非感受性大腸菌とした。

### (3) 患者背景

FQ 非感受性大腸菌が分離された症例について、患者カルテを用い臨床背景を後ろ向きに調査した。調査項目は年齢、性別、尿路基礎疾患の有無、カテーテル留置の有無、尿路感染症の既往、分離前抗菌薬使用状況、治療経過とした。基礎疾患の有無により、単純性と複雑性の UTI に分類し、FQ 非感受性大腸菌の分離率を  $\chi^2$ -test で検討した。

### (4) DNAシーケンスとアミノ酸置換の解析

FQ 系抗菌薬の作用点である type II topoisomerase に着目し、アミノ酸置換の有無を検討した。分離された FQ 非感受性大腸菌について、DNA gyrase および topoisomerase IV のキノロン耐性決定領域遺伝子の塩基配列を PCR ダイレクトシーケンス法で解析した。大腸菌標準株である *E.*

*coli* K12 を対照株として、NCBI-BLAST にて type II topoisomerase におけるアミノ酸置換を決定した。また、ランダムに抽出した FQ 感受性大腸菌株は、対照として ofloxacin の MIC とアミノ酸置換との関連の検討に用いた。

#### (5) バイオフィーム形成能の測定

人工尿を満たしたペグ (細い短棒) 付き 96 穴ポリスチレンマイクロプレートを用い、各大腸菌株を培養した。48 時間後にペグに形成されたバイオフィームを 2%クリスタルバイオレットで染色し、95%エタノールに溶出して 570 nm の吸光度を測定した。同様の操作を 3 回繰り返す、その吸光度の相加平均をもってバイオフィーム形成能の指標とした。比較検討を行うために、ランダムに抽出した FQ 感受性大腸菌株についても同様に測定した。

#### (6) バイオフィーム形成阻害候補化合物のスクリーニング

新規スクリーニング法として、96 穴ポリスチレンマイクロプレートを使用し、上記 (5) の方法で、ペグに形成された大腸菌 (*E. coli* 128 株) バイオフィームを数値化した。供試化合物無添加のバイオフィーム形成能を 1 とし、供試化合物の阻害効果を評価した。

#### (7) 新規 *in vivo* 実験モデル系 (リアルタイムイメージングシステム)

Caliper Life Sciences/Xenogen 社から購入した発光標識大腸菌 (*E. coli* Xen14) を用い、先端機器 IVIS imaging system (Xenogen 社) の感染症領域への応用性を検証した。IVIS での観察は、撮影時イソフルラン麻酔下で同一マウスを用い、経時的・経日的に行った。① 大腿部感染モデル (マウス): ICR 系マウス (雄, 5~6 週齢) を用い、シクロフォスファミドにより免疫不全状態を惹起させた。左大腿部に  $10^7 \sim 10^4$  cfu/0.1 mL/thigh の菌量で接種した。② 尿路バイオフィーム

*in vivo* 感染症モデル (ラット・マウス): SD 系ラット (雌, 7~8 週齢)、ICR 系マウス (雌, 6~7 週齢) を用いた。黒坂らの方法に従い、コイル状に形成したポリエチレンチューブを非侵襲的に麻酔下で膀胱内に留置後、ampicillin (1 mg/mL) を 4 日間給水し、感染前日から絶水した。ラットまたはマウスの膀胱内に菌液  $10^7$  cfu/0.5 mL、 $10^6$  cfu/0.05 mL をそれぞれ経尿道的に接種し、4 時間尿道口をクランプした。

## 4. 研究成果

### (1) 臨床分離株と薬剤感受性測定

FQ 非感受性大腸菌の分離頻度は年々上昇傾向にあり、2006 年および 2007 年には、分離された全大腸菌のうち FQ 非感受性大腸菌が約 20%に達した。1994~2007 年の 14 年間に分離された計 828 株の大腸菌のうち 89 株 (10.7%) の大腸菌が FQ 非感受性大腸菌であった。Cefozopran と imipenem は FQ 非感受性大腸菌に対しても高い感受性を示した。Ofloxacin の MIC は他の FQ 系抗菌薬の MIC と相関する傾向がみられた。Sitafloxacin では、MIC を測定した 79 株全ての菌株の MIC が 2  $\mu$ g/mL 以下に分布し、64 株 (81.0%) は 0.5  $\mu$ g/mL 以下、13 株 (16.5%) は 1  $\mu$ g/mL であり、良好な感受性を示した。

### (2) 臨床背景

尿路に基礎疾患を有しない単純性 UTI から分離された大腸菌 189 株のうち 7 株 (3.7%)、複雑性 UTI から分離された大腸菌 639 株のうち 82 株 (12.8%) が FQ 非感受性大腸菌で、単純性より複雑性の UTI で有意に FQ 非感受性大腸菌の分離率が高かった。FQ 非感受性大腸菌が分離された 89 例のうち 40 例 (44.9%) は、持続的もしくは間欠的に尿路にカテーテルが挿入されていた。基礎疾患は神経因性膀胱 (39.0%) が最も多く、前立腺癌や膀胱癌

などの悪性腫瘍 (26.8%) と続いた。分離前 2 年以内に抗菌薬の投与を受けた患者は 68 例 (76.4%)、68 例中 48 例 (70.6%) は FQ 系抗菌薬が投与されていた。治療として 89 例中 49 例 (55.1%) に cephem 系抗菌薬が投与され 43 例 (87.8%) は治癒に至った。

### (3) Type II topoisomeraseのアミノ酸置換

FQ 非感受性大腸菌 78 株についてアミノ酸置換を検討した。DNA gyrase (GyrA)、topoisomerase IV (ParC) では、特定の部位にアミノ酸置換が認められた。すなわち、GyrA (83 番と 87 番)、ParC (80 番と 84 番) が置換するパターンである。GyrA (83 番) の置換は 78 株中 78 株 (100%) に、GyrA (87 番) の置換は 78 株中 77 株 (98.7%) に見られた。ParC (80 番) の置換は 78 株中 73 株 (93.6%) に、ParC (84 番) の置換は 78 株中 44 株 (56.4%) に見られた。これら 4 個のアミノ酸置換は、78 株中 75 株で 3 個以上認められた、一方、対照として検討した FQ 感受性大腸菌 9 株については 3 個以上の置換を持つ株は見られなかった。

### (4) バイオフィーム形成能

Mann-Whitney' s *U* test を用い、FQ 非感受性大腸菌 81 株と FQ 感受性大腸菌 40 株の 2 群間のバイオフィーム形成能を検定した。統計学的に有意差を認めなかった ( $P = 0.19$ ) が、FQ 非感受性株のなかにバイオフィーム形成能が顕著に高い株が存在した。

### (5) バイオフィーム形成阻害候補化合物

クランベリーポリフェノール尿中代謝物である *o*-coumaric acid, *p*-coumaric acid, vanillic acid, ferulic acid および homovanillic acid は、比較的強いバイオフィーム形成抑制効果を示した。これらの化合物を 2 種類ずつ組み合わせることで評価を行った結果、それぞれ単独の場合に比較して、より強いバイオフィーム形成抑制効果を示した。

(共同研究者：伊東秀之准教授、波多野力教授、岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科)

### (6) 新規 *in vivo* 実験モデル系 (リアルタイムイメージングシステム) の確立

マウス大腿部感染モデルでは、*E. coli* Xen14 接種後 2~24 時間の生菌数と IVIS 発光強度 (フォトン数) との関連性があることを確認した。*E. coli* Xen14 株の尿路における病原性を確認するために、尿路バイオフィーム感染症モデルでの検討を行った結果、 $10^5 \sim 10^6$  cfu/mL 接種で 7 日目まで腎内・尿中大腸菌が検出され、感染の成立を確認した。しかし、膀胱内留置ポリエチレンチューブに形成された大腸菌性バイオフィームの発光強度は検出限界以下であった。実験の再現性については、さらに検討を要する。

### (7) 考察

大腸菌は尿路性器感染症において分離頻度が高く、宿主に対して強い病原性を発揮することから最も重要な菌種といえる。岡山大学泌尿器科における 14 年間の長期調査研究において、FQ 非感受性大腸菌の分離頻度、分離された全大腸菌のうち FQ 非感受性大腸菌が占める割合は年々増加傾向にあった。FQ 系抗菌薬の投与によって FQ 非感受性大腸菌が選択的に残存、分離されている可能性は否定できないが、急性単純性の UTI 患者においても FQ 非感受性大腸菌が 10%前後分離され、事態は深刻である。

大腸菌の FQ 系抗菌薬に対する耐性化は type II topoisomerase の遺伝子上に存在するキノロン耐性決定領域遺伝子における点変異がその一因を担っており、本研究課題でもその結果としておこる type II topoisomerase のアミノ酸置換が FQ 耐性化機構に関与していることを確認した。FQ 系抗菌薬の 1 つである sitafloxacin は、他の FQ 系抗菌薬と比べて DNA gyrase, topoisomerase IV に対する阻

害活性が強く、より高い殺菌作用を示すことが明らかとなっているが、乱用によって感受性が低下する可能性は十分ありうる。例えば、尿道カテーテルや結石表面にバイオフィームを形成した状態においては、バイオフィーム深層の大腸菌は低濃度の sitafloxacin に曝露され、遺伝子変異が生じて耐性を獲得するということである。本研究期間に、バイオフィーム形成能が顕著に高い株の存在を確認したが、FQ に対する非感受性とバイオフィーム形成能に統計学的な関連は認めなかった。バイオフィーム形成能と抗菌薬に対する耐性化については、今後も継続して検討すべき研究課題であり、大腸菌性バイオフィームにおける薬剤耐性遺伝子の伝達性や ESBL (基質拡張型 $\beta$ -ラクタマーゼ) 産生菌の分離動向に留意が必要である。

難治性を示す尿路バイオフィーム感染症に対して、いわゆる抗菌薬以外の治療薬を開発することは抗菌薬使用の抑制に繋がる。岡山大学天然医薬品開発学との共同研究において、クランベリーポリフェノール尿中代謝物のうち数種類が大腸菌性バイオフィーム形成に対して比較的強いバイオフィーム抑制効果を示し、尿中で複合的に作用している可能性が示唆された。本研究課題では、先駆的なバイオフィーム実験モデル系を確立し、バイオフィーム形成阻害候補化合物を評価することを目標とした。そこで、発光標識大腸菌による *in vivo* 感染症モデルを確立し、先端機器 IVIS imaging system にて観察した。マウス大腿部感染モデルでは、同一個体での非侵襲的な経時的・経日的観察が可能であり、使用動物数の低減化に資することを確認した。マウス大腿部感染モデルでの成績に基づいて、ラットおよびマウス尿路バイオフィーム感染症モデルでの検討を行ったが、膀胱内留置ポリエチレンチューブに形成された大

腸菌性バイオフィームの発光強度は検出限界以下であった。今後の課題として、尿路バイオフィーム感染症モデルに使用可能な新規発光標識株の構築を行う必要がある。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Wada K, Kariyama R, Mitsuhata R, Uehara S, Watanabe T, Monden K, Kumon H : Experimental and clinical studies on fluoroquinolone-insusceptible *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infections from 1994 to 2007. Acta Medica Okayama 63(5): 263-272, 2009 (査読有)
- ② 石井亜矢乃、狩山玲子、光畑律子、佐古真一、和田耕一郎、上原慎也、渡辺豊彦、門田晃一、公文裕巳：尿路由来メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生緑膿菌のバイオフィーム形成能および分子疫学的検討. Bacterial Adherence & Biofilm 22: 59-64, 2009 (査読無)

[学会発表] (計 5 件)

- ① Wada Koichiro : Pharmacokinetics and pharmacodynamics of biapenem in patients with pyelonephritis. 26th International Congress of Chemotherapy and Infection, 2009/6/20, Toronto, Canada
- ② 佐古真一、尿路感染症由来緑膿菌のバイオフィーム形成能と臨床的背景の関連性の検討、第 56 回日本化学療法学会西日本支部総会、2008/12/7、広島国際会議場(広島市)

- ③ 和田耕一郎、腎盂腎炎患者におけるビアペネムの体内動態に関する研究、第 56 回日本化学療法学会西日本支部総会、2008/12/6、広島国際会議場（広島市）
- ④ 佐々木典子、クランベリーポリフェノール尿中代謝物の大腸菌性バイオフィルム形成抑制効果、日本農芸化学会中四国支部第 22 回講演会、2008/9/13、鳥取大学農学部(鳥取市)
- ⑤ 石井亜矢乃、尿路由来メタローβ-ラクタマーゼ産生緑膿菌のバイオフィルム形成能および分子疫学的検討、第 22 回 Bacterial Adherence & Biofilm 学術集会、2008/7/4、兵庫県立夢舞台国際会議場（淡路市）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

和田 耕一郎 (WADA KOICHIRO)

岡山大学・岡山大学病院・医員

研究者番号：20423337

### (2) 研究協力者

狩山 玲子 (KARIYAMA REIKO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：40112148

公文 裕巳 (KUMON HIROMI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：30144760