

平成30年 5月30日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08103

研究課題名(和文) ムコイド型肺炎球菌の薬剤抵抗性の解明

研究課題名(英文) Clarification of drug resistance of mucoid type *Streptococcus pneumoniae*

研究代表者

宮本 篤 (Miyamoto, Atsushi)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：50166196

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：北海道全域から集められた肺炎球菌1,061株からムコイド株51株が得られた。バイオフィルム形成能、各種抗菌薬の最小バイオフィルム抑制濃度、増殖速度等を評価したが、ムコイド株、非ムコイド株で顕著な差は認められなかった。評価の過程で、納豆由来ペプチドが肺炎球菌と *Bacillus* 属の *Bacillus subtilis* group に特異的に殺菌作用を示すことを見出した。その作用メカニズムについて、肺炎球菌に対しては細胞分裂時の分離異常によって起きる溶菌の亢進であることが示唆された。納豆由来ペプチドは、肺炎球菌に対してムコイド、非ムコイド、薬剤耐性の有無にかかわらず同程度の殺菌活性を示した。

研究成果の概要(英文)：We obtained 51 mucoid strains from 1,061 *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates collected in Hokkaido Prefecture, Japan. We evaluated biofilm formation, minimum biofilm eradication concentration of various antimicrobials, and growth rate. Significant differences between mucoid and non-mucoid strains were not observed. On the other hand, we found that Natto peptide, which is from a Japanese soy bean fermented food, showed specific bactericidal activity against *S. pneumoniae*, and *Bacillus subtilis* group of *Bacillus* genus. We clarified that its mechanism was failure of cell separation during cell division in *S. pneumoniae*. The Natto peptide showed similar antimicrobial activity against mucoid, non-mucoid, antimicrobial susceptible, and multidrug resistant strains of *S. pneumoniae*.

研究分野：医療薬学

キーワード：肺炎球菌 ムコイド 抗菌ペプチド 納豆由来ペプチド

1. 研究開始当初の背景

ムコズス中耳炎では、抗菌薬による化学療法が奏効を示さないことが少なくなく、難治化することが知られている。これは、ムコイド型肺炎球菌における抗菌薬の最小発育阻止濃度 (MIC) 試験の結果が、臨床効果を反映しないことを示唆している。

ムコイド型肺炎球菌の MIC 試験に関しては、微量液体希釈法と寒天平板法による MIC の値に大きな乖離があると報告されている。また、緑膿菌のムコイド株では、バイオフィルムの形成の有無によって臨床上的抗菌薬の効果が実際の抗菌薬感受性試験の結果と乖離することが報告されている。さらに我々は、ムコイド型肺炎球菌は自己融解 (溶菌) が非常に早いことを観察しており、CLSI で定められた MIC の判定に必要な培養時間では、既に死滅期を迎えて自己融解を引き起こしていることが推察された。これらの知見は、ムコイド産生が抗菌薬感受性試験の判定に影響を与えることを示唆している。

2. 研究の目的

肺炎球菌の臨床分離株を用いてムコイド株を取得し、抗菌薬の効果に対するムコイドの関与に着目して、*in vitro* と *in vivo* で生じる乖離の要因を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ムコイド株の特徴として、そのほとんどが莢膜血清型 3 型に分類されることが報告されている。そこで、北海道全域にわたる市中感染を主体とした約 1,000 株の肺炎球菌からコロニーの形状を指標にムコイド株をスクリーニングして、ムコイド株と非ムコイド株の薬剤感受性データを比較検討する。さらに、ムコイド型の血清型を型別抗血清と遺伝子検出の両面から決定して、ムコイド株の特性と疫学的な現状を理解する。

(2) ムコイド株と非ムコイド株を選抜して、微量液体希釈法 (CLSI で定められた液体培養による MIC 判定)、寒天平板法 (寒天培地上での MIC 判定)、E-テスト (濃度勾配をつけた抗菌薬をしみこませたる紙ストリップによる寒天培地上の菌の増殖阻止領域から MIC を算出する方法) によって MIC を測定し結果を比較する。ムコイド株では、微量液体希釈法と寒天平板法の MIC に大きな乖離があるとの報告もあり、評価法によって抗菌薬感受性の結果が異なる可能性が考えられる。

(3) 最小殺菌濃度 (MBC) およびバイオフィルム撲滅濃度 (MBEC) を測定し結果を比較する。ムコイド株は菌体が粘液層によって覆われているため、抗菌薬の効果が非ムコイド株と異なると考えられる。そこで、両者の MIC と MBC、MBEC の結果を比較することで、ムコイド株が非ムコイド株に比べ MIC と MBC の差

が大きい (生育阻害は非ムコイド株と同等に生じるが殺菌はされにくい) などの違いが観察される可能性がある。

(4) 肺炎球菌は一般的な細菌と比べて自己融解が早いという特徴を持つ。中でもムコイド型肺炎球菌は非ムコイド型と比較して自己融解が激しいという報告がある。したがって、CLSI で定められた MIC 判定に必要な培養時間である 24 時間は、ムコイド型肺炎球菌にとって既に死滅期を迎えて自己融解を引き起こし、実際の MIC の値は本来もっと高濃度である可能性が考えられる。そこで、両者の増殖曲線を作成して溶菌速度を比較する。

(5) ムコイド株において、抗菌薬の MIC 試験の結果が、臨床効果を反映しない (抗菌薬投与後も宿主に対して悪影響を及ぼす) 原因として、非ムコイド株とムコイド株の宿主の免疫応答に対する影響が異なることが考えられた。そこで、両者に対する宿主上皮細胞のサイトカイン産生量の違いを観察する。

(6) ムコイド株および非ムコイド株の両者に抗菌活性が期待される納豆由来のペプチドの抗菌活性 MIC によって評価した。

(7) *Bacillus* 属の一部の菌種とムコイドの有無にかかわらず肺炎球菌に殺菌的な作用をするメカニズムを明らかにするため増殖曲線を作成して、透過電子顕微鏡 (TEM) による納豆ペプチド作用時の形態観察を行う。

4. 研究成果

(1) 北海道内全域から集められた肺炎球菌 1,100 株のうち 1,061 株についてムコイド形成の有無および莢膜血清型の判定を行った。このうちムコイド形成が認められたのは 51 株 (4.8%) であった。ムコイド株 51 株のうち、莢膜血清型 3 型が 45 株 (88.2%) で圧倒的に多く、次いで 33F 型が 5 株 (9.8%)、23F 型が 1 株 (2.0%) であった。従来の報告でもムコイド型は大半が 3 型であり、我々の結果もこれまでの報告を支持している。一方、33F 型が一定割合見られたことは興味深い結果であった。51 株のムコイド型はすべてペニシリン感受性株 (PSSP) と判定され、従来の報告と同様にムコイド株では *in vitro* のペニシリン感受性の高いことが明らかとなった。

(2) ムコイド株 4 株、非ムコイド株 4 株について、液体培地または寒天培地上での MIC を 4 種の抗菌薬で比較検討した。その結果、イミペネムにおいてのみムコイド株で液体培地の場合に比べ、寒天培地での MIC が高かった。しかし、この差は臨床的に意味のある差とは考えられなかった。

(3) ムコイド株 8 株、非ムコイド株 8 株について、6 種の抗菌薬の MIC と MBEC (最小バイオフィルム撲滅濃度) を測定した。その結果、ムコイド株と非ムコイド株で MIC と MBEC の差に有意な差は認められなかった。

(4) ムコイド株と非ムコイド株の増殖曲線から溶菌速度を観察した結果、両者に差は認められなかった (図 1)。

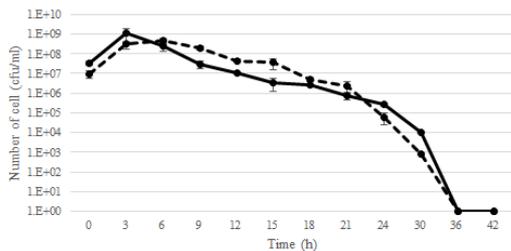


図 1 非ムコイド株(実線)とムコイド株(破線)の増殖曲線

(5) 宿主に対するムコイド株と非ムコイド株の影響を検討するため、気道上皮細胞株に両菌を作用させた時の IL-8 産生誘導を比較した。その結果、両者に有意な差は認められなかった。

以上の結果から、ムコイド株と非ムコイド株における抗菌薬の *in vivo* と *in vitro* における効果の乖離を説明できる現象を見出すことはできなかった。しかし、本研究の過程で納豆由来のペプチドにおいて、ムコイド株、非ムコイド株にかかわらず肺炎球菌への特異的な抗菌作用が期待された。以下にその結果を示す。

(6) グラム陰性および陽性細菌や真菌を含む 45 株を評価したところ、納豆ペプチドはヘミン存在下で *Bacillus* 属の一部の菌種と肺炎球菌に特異的な抗菌作用を示した。肺炎球菌に対しては、ムコイド株、非ムコイド株、薬剤耐性株いずれに対しても同等の抗菌活性を示した。

(7) 納豆ペプチド存在下での殺菌曲線と菌体の形態変化から、*Bacillus* 属細菌 (*Bacillus subtilis*) と肺炎球菌では、作用機序に違いがあることが示唆された。*B. subtilis* では、ペプチド添加直後から速やかな生菌数の減少が認められ (図 2A, B)、形態観察からその殺菌機序は膜傷害であることが示唆された (図 3A, B)。一方、肺炎球菌では、ペプチドへの曝露初期 (数時間以内) は通常の増殖を示し、その後急速な殺菌が観察された (図 4A, B)。この殺菌機序は、死滅した菌体の形態観察から溶菌であることが示唆された (図 5D)。さらに、本来双球菌である肺炎球菌 (図 5A) が、納豆ペプチド曝露初期にはレンサ状になっており (図 5B)、菌

体の分裂時に分離異常が起きていることが示唆された。肺炎球菌の主要な自己溶菌酵素である LytA の遺伝子欠損株では、殺菌時間が遅延することから (図 4C)、ペプチドの肺炎球菌への殺菌機序は、細胞分裂時の分離異常に伴って生じる溶菌であると考えられた。

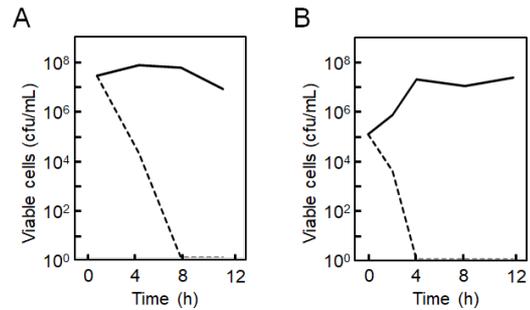


図 2 納豆ペプチド非存在 (実線) および存在下 (破線) での *B. subtilis* の増殖曲線

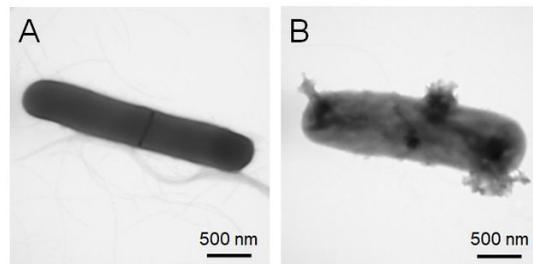


図 3 納豆ペプチド非存在 (A) および存在下 (B) での *B. subtilis* の形態観察

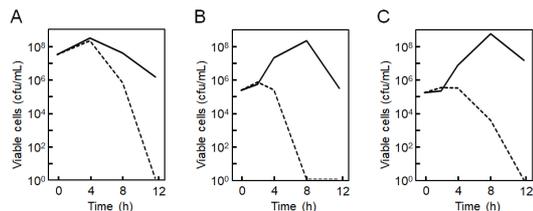


図 4 納豆ペプチド非存在 (実線) および存在下 (破線) での肺炎球菌 (A, B) と溶菌遺伝子 (*lytA* 欠損株) (C) の増殖曲線

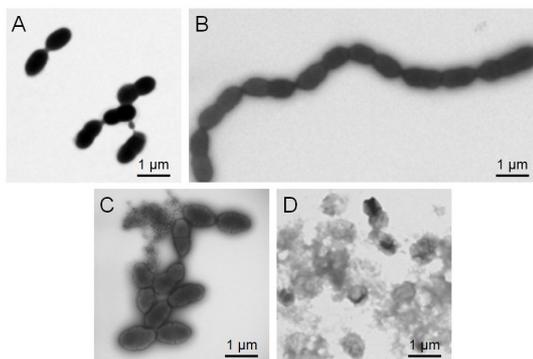


図 5 納豆ペプチド非存在 (A, C) および存在下 (B, D) での 4h (A, B) および 8h (C, D) 後の肺炎球菌の形態観察

<引用文献>

黒川いく、真崎純子、千葉菜穂子、生方公子、急性中耳炎例の中耳貯留液から分離された肺炎球菌の莢膜型と薬剤耐性遺伝子解析、日本臨床微生物学雑誌、19巻、2009、5-11

Sepandj F, Ceri H, Gibb A, Read R, Olson M、Minimum inhibitory concentration (MIC) versus minimum biofilm eliminating concentration (MBEC) in evaluation of antibiotic sensitivity of gram-negative bacilli causing peritonitis、International Society for Peritoneal Dialysis、Vol.24、2004、65-67

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 1 件)

Kitagawa M、Shiraishi T、Yamamoto S、Kutomi R、Ohkoshi Y、Sato T、Wakui H、Itoh H、Miyamoto A、Yokota SI、Novel antimicrobial activities of a peptide derived from a Japanese soybean fermented food, Natto, against *Streptococcus pneumoniae* and *Bacillus subtilis* group strains、AMB Express、査読有、Vol.7、2017、127
doi: 10.1186/s13568-017-0430-1

[学会発表](計 4 件)

白石宗、納豆由来ペプチドの特異な殺菌活性と作用機序、細菌学若手コロッセウム、2017年、茨城県つくば市

北川学、Novel antimicrobial activities of a peptide derived from a Japanese soy-bean fermented food, Natto、日本細菌学会、2017年、宮城県仙台市

白石宗、納豆抽出物由来ペプチドの特異な殺菌作用、日本エンドトキシン・自然免疫研究会、2016年、鹿児島県鹿児島市

北川学、納豆抽出物由来ペプチドの殺菌作用の特異性、日本細菌学会北海道支部学術総会、2016年、北海道札幌市

[図書](計 1 件)

白石宗 他、医学図書出版、エンドトキシン・自然免疫研究 20 自然免疫における化学生物学の貢献、2017、39-41

[産業財産権]

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮本 篤(MIYAMOTO, Atsushi)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：50166196

(2)研究分担者

横田 伸一(YOKOTA, Shin-ichi)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：10325863

白石 宗(SHIRAISHI, Tsukasa)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：70725168

北川 学(KITAGAWA, Manabu)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：70751270