

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 10 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590477

研究課題名（和文）多剤耐性化する *S. maltophilia* の薬剤耐性と病原性の研究研究課題名（英文） Analysis of antibiotics resistance and virulence of multidrug resistant *S. maltophilia*

研究代表者

谷本 弘一（TANIMOTO KOUICHI）

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40188389

研究成果の概要（和文）：臨床分離 *S. maltophilia* 66 株を用いて多剤耐性化しているこの菌の薬剤耐性や病原性について研究を行った。PFGE や MLST を行った結果、同一病院で分離された株であるがそれぞれの遺伝的関連は薄いことがわかった。また、病原性遺伝子について調べたところ臨床分離株であるにもかかわらず目立った病原性因子は持たないことがわかった。この結果から、病院内における *S. maltophilia* は外部から持ち込まれ、耐性遺伝子を生来幾つか持っていることから院内に留まり続けている事がわかった。

研究成果の概要（英文）：The diversity within the genetic and antibiotic resistance profiles and the production of virulence-associated enzymatic activities of 66 *Stenotrophomonas maltophilia* strains collected from a university hospital were studied. PFGE and MLST analysis indicated that there were a variety of profiles present. The study of virulence factors indicated that these strains did not have strong virulence factors. Those results suggested that clinical isolates studied were community-acquired strains and stayed in a hospital because of their multiple drug resistances.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：薬剤耐性

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：Stenotrophomonas maltophilia、薬剤耐性、病原性因子、PFGE、MLST

1. 研究開始当初の背景

*S. maltophilia*は近年院内感染の起原因菌としてその重要性を増してきているグラム陰性桿菌である。*S. maltophilia*は広く病院内外の環境にも存在し、かつては病巣から分離されるにもかかわらず限られた病原性しかないと報告されてきた。しかしながら易感染者の増加に伴いこの細菌が重大な院内感染症の起原因菌となりうる報告が90年代以降増え、新興の多剤耐性病原菌の中でも重要な細菌の1つに数えられるようになった。*S. maltophilia*は気道や尿路を中心に多彩な臓器感染症から分離され、ICUを中心に、特にカテーテルに付着する形で存在していることが報告されていた。

この細菌は染色体上にL1、L2と呼ばれる2つのβ-ラクタマーゼ遺伝子を持つためカルバペネムをはじめとする殆どすべてのβ-ラクタム剤に対して自然耐性を示す。それに加え、緑膿菌同様、外部から薬剤耐性プラスミドを積極的に取り込むことで耐性遺伝子を獲得する系を持つことから菌によってはほとんどすべての薬剤に耐性を示すことも知られている。さらに、この細菌は元来環境に存在していたことから抵抗性が高く、病院内のあらゆる環境で長く生存でき院内感染菌としてのすべての要素を持っている。また、病原因子としてプロテアーゼ、リパーゼ、溶血毒素を産生する株が存在することや培養細胞に対する細胞毒性を示す株があることが報告されていた。

2. 研究の目的

臨床分離された*S. maltophilia*の1) 薬剤耐性と多剤耐性化機構、と2) 病原性因子の研究を行う。1) についてはどのようなプラスミドが耐性遺伝子を運ぶのか。またどのような遺伝子によって耐性化するのか、どのよう

な変異で、あるいはどのような機構でこの菌が多剤耐性化するのかを明らかにする。2) についてはどんな病原性遺伝子があるのかを調べ、遺伝子レベルでの発現状態を臨床分離株で調べてみる。そうすることによりこの細菌がどのようにして臨床に存在し得るのかについて知見を得る。また、我が国における*S. maltophilia*と欧米の株との関連性についての知見はないためそれについても明らかにしたい。

3. 研究の方法

(1) 菌株間の遺伝的関連性の研究

Pulsed-field gel electrophoresis (PEGE)を行う。その結果をコンピューターで解析し菌株間の関連性についての情報を得た。また、7遺伝子をPCRで増幅しDNA塩基配列を決定することにより菌株間の関連性についての情報を得た (Multi Locus Sequence Typing: MLST)。その際には *Stenotrophomonas maltophilia* MLST Database (<http://pubmlst.org/smaltophilia/>)を用いた。

(2) 薬剤感受性試験

寒天希釈法を用いた。

(3) 伝達性プラスミドの検出

伝達性プラスミドを検出するために接合伝達を行った。試験菌を供与菌とし、受容菌として標準株 ATCC13037 と ATCC17666 から得たリファンピシン (rif) 耐性株、ATCC13037rif と ATCC17666rif を用いた。接合伝達の手順は以下の通りである。供与菌、受容菌の終夜培養液を1:1で混合し栄養寒天培地 (L 寒天培地) に10 ml スポットする。37°Cで8時間保温の後、爪楊枝で菌体を掻き取り、耐性の伝達を調べたい薬剤とリファンピシンを含む選択平板に塗布する。37°Cで終夜培養しコロニーが選択平板に現れたならば耐性遺

伝子が伝達した事がわかり、接合伝達性プラスミドが存在していたことがわかる。

(4) 病原遺伝子の検出

溶血毒の産生は5%羊血液寒天に菌を塗布し37°Cで終夜培養を行い、溶血斑が現れた場合溶血毒素産生陽性とした。タンパク分解酵素産生は3%スキムミルクを含む寒天平板に菌を塗布し37°Cで終夜培養を行い、コロニーの周りに透明な領域が現れた場合プロテアーゼ産生陽性とした。リパーゼ産生は1% Tween-80 を含む寒天平板に菌を塗布し37°Cで終夜培養を行い、コロニーの周りに白濁した領域が現れた場合リパーゼ産生陽性とした。

(5) インテグロンの検出

試験菌株より全DNAを抽出し、クラス1からクラス3のインテグロンの持つインテグラーゼ遺伝子に特異的なプライマーとともにPCRを行った。PCR産物が得られた場合、そのタイプのインテグロンが存在していることがわかる。

(6) 遺伝子発現量の測定

終夜培養液を100倍希釈し37°Cで3時間培養した後、全RNAを抽出しその0.1mgを用いてcDNA合成を行った。そして、そのcDNAと注目する遺伝子に対する特異的プライマーを用いて定量的Real-time PCRを行い発現量の測定を行った。

4. 研究成果

薬剤感受性試験

ピペラシリン、セフトラジジム、イミペネム、アズトレオナム、ゲンタミシン、アミカシン、シプロフロキサシン、レボフロキサシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコールに対する感受性試験を行った。レボフロキサシンは77.3%の株に有効であったが、他の薬剤に対しては80%以上の株が耐性であった。ほとんどの株が6薬剤以上に耐性で多剤耐性化が

進んでいることがわかった。

分子疫学による菌株間の関連性

PFGEにより菌株間の関連性について調べたところ、同一病院で分離された菌株ばかりであるにもかかわらず非常に近縁な株は存在していなかった。同一患者からの検体は1検体のみを使用することにはしたが、この結果は院内感染が起こっていないことを示している。また、これら *S. maltophilia* は外部(外来患者)から病院内に入って来てそのまま居続けていることが推測される。先に述べたように多くの薬剤に耐性であることから薬剤に曝される機会の多い病院という環境でも存在し続けることが出来るのであろうと考えられる。またMLSTによる解析の結果、これまで報告されていないシーケンスタイプ(ST)を示す株がほとんどであった。*S. maltophilia*のMLSTデータベースは始まったばかりで、これからデータが蓄積されてくると変わる可能性は否定できないが、現時点では我が国の *S. maltophilia* と欧米とくに欧州の株とは異なる遺伝型を持っていると考えられる。

接合伝達性プラスミドの検出

*S. maltophilia*が生来β-lactam剤に対して耐性であること、キノロン耐性のほとんどが染色体性であることからそれ以外の薬剤に対する耐性の伝達を検証したが一株も耐性を伝達した株は見いだせなかった。寒天平板上で接合伝達を行ったので低頻度の伝達系しか持たないプラスミドについても検出可能であることを考えると、用いた菌株には接合伝達性プラスミドは存在していなかったと考えられる。

病原性因子の検出

溶血毒はすべての株で産生されていなかったが、プロテアーゼ活性は 86.4%の株が示した。リパーゼ活性は 31.8%の株が示し、そのうちの 85.7%がプロテアーゼ活性を同時に示した。*S. maltophilia* は染色体上にプロテアーゼ遺伝子を持つとされていることから多くの株がプロテアーゼ活性を示したものと考えられる。

インテグロンの検出

45.5%の株がクラス 1 インテグロンを持つことがわかった。このことからインテグロンがこの菌の多剤耐性化に一定の役割を果たしていることがわかったが、このインテグロンを運ぶ接合伝達のような遺伝子交換のための系が見つからないのが奇妙である。特定の伝達系が用いた菌株の中にないのであれば、多剤耐性化は病院に入り込む以前に起こったことになり、別の菌種からの伝達も含めて様々な可能性について検証して行かなければならないと考える。

病原遺伝子の発現量の測定

プロテアーゼ遺伝子と排出ポンプ遺伝子の転写量を測定したが、標準株と比べて発現が亢進していた株はなかった。

まとめ

得られた結果を合わせて考えると、*S. maltophilia* が臨床の現場に広く存在しているのは病原性が高いせいではなく、多くの薬剤に対して耐性であることと、悪い環境でも生存できる環境菌であることが主たる理由であると考えられる。しかも多くの薬剤に対しての耐性は病院内で構築されたものではなくそれ以前に獲得していた可能性があることが考えられる。

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)

[学会発表] (計 1 件)

①第 23 回臨床微生物学会

日時：2012 年 1 月 22 日

場所：横浜 (パシフィコ横浜)

発表者名：谷本弘一

発表標題：

臨床分離された *Stenotrophomonas maltophilia* の分子疫学的解析

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷本 弘一 (TANIMOTO KOUICHI)

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40188389