

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31日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592073

研究課題名（和文） 院内感染症としての多剤耐性緑膿菌尿路バイオフィルムの病原的意義

研究課題名（英文） Significance of multiple-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the urinary tract as nosocomial infections

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌を含む多剤耐性緑膿菌は、ほぼ全ての抗菌薬に高度耐性を示す傾向が強く、院内感染対策上、特に留意する必要がある。そこで、バイオフィルム形成能が高い多剤耐性緑膿菌に対する拡散防止策の確立を目標にして研究を遂行した。その成果として、最新の分子疫学的解析法を確立したことで、院内感染対策に向けてのエビデンスが得られた。また新規実験モデル系を進化させたことで、多剤耐性緑膿菌に対する新規治療法の可能性を示唆する成績が得られた。

研究成果の概要（英文）：Currently, metallo-β-lactamase (MBL)-producing *Pseudomonas aeruginosa* is the most intractable pathogen in many hospitals. The persistent biofilms formed by MBL-producing *P. aeruginosa* isolates, which may also be multiple-drug-resistant *P. aeruginosa* (MDRP), could cause serious problems in nosocomial infections. In this study period, we used newer methods for molecular epidemiological analyses and found valuable evidence for preventing nosocomial infections. In addition, we found promising therapeutic approaches for treating biofilm infections caused by MDRP using novel *in vitro* and *in vivo* models.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：緑膿菌、多剤耐性菌、バイオフィルム、院内感染症、尿路感染症、分子疫学、院内感染対策、新規治療法

1. 研究開始当初の背景

多剤耐性緑膿菌による院内感染事例に関する

るマスコミでの報道が多くなされるようになり、拡散防止策を講じることは喫緊の課題であった。

緑膿菌は自己の生育に不利なストレス環境を感知し、菌体外多糖体を産生することにより、複数の多糖体（グリコカリックス）を主とするポリマーで包まれたバイオフィルムを形成する。生体内において、緑膿菌をはじめとする細菌バイオフィルムの形成は、抗菌薬および生体の感染防御系からの隠れ家となり、難治化の重要な因子となる。一方、医療機器などにバイオフィルムが形成されると、消毒薬に抵抗性を示し、細菌バイオフィルムは長期にわたり生息することとなる。

多剤耐性緑膿菌は尿路カテーテル留置患者の尿から高頻度に分離される。緑膿菌には異なる薬剤耐性機序が存在し、バイオフィルム形成の他に、不活化酵素の産生、作用点の変異、透過性障害、排出ポンプ機能の亢進などがある。そのなかで、不活化酵素産生による耐性として、メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌の出現が問題になっている。この薬剤耐性遺伝子は可動性遺伝因子として拡散する。メタロ-β-ラクタマーゼ産生緑膿菌は、ほぼ全ての抗菌薬に高度耐性を示す傾向が強く、現時点で最も監視が必要とされている日和見感染の原因菌であり、院内感染対策上、特に留意する必要がある。一方で、新規治療法の開発は喫緊の課題となっている。

2. 研究の目的

2007～2008年度の岡山大学泌尿器病態学分野の研究成果として、尿路由来メタロ-β-ラクタマーゼ（MBL）産生緑膿菌株が非産生株に比較して、有意に高いバイオフィルム形成能を示すことが明らかとなった。そこで、本研究課題では、多剤耐性（MBL産生）緑膿菌のバイオフィルム形成能に着目し、その病原的意義についての研究を推進する。まず、最新の方法による分子疫学的解析は可動性遺伝因子を含めて行う。次いで、泌尿器病態学分野における過去数年間の研究成果である新規 *in vitro* および *in vivo* のバイオフィルム実験モデル系を用いて、特徴的な菌株のバイオフィルム形成過程を比較検討する。本研究の最終目標は、バイオフィルム形成能

が高い多剤耐性緑膿菌の拡散を防止するための方策を確立することである。

3. 研究の方法

(1) 対象

A県5施設で分離された尿路由来IMP-1型MBL産生緑膿菌92株（1症例1株）を対象とした。その内訳は、2001～2008年度までに収集したIMP-1型MBL産生緑膿菌75株に加えて、本研究課題の研究期間（2009～2011年度）に収集した17株である。また、比較検討のために、2001～2011年度に岡山大学泌尿器科で分離された尿路感染症由来MBL非産生緑膿菌92株（1症例1株）を用いた。

(2) PCR法

IMP-1型MBL産生遺伝子（*bla_{IMP-1}*）の検出およびインテグロンカセット解析のためのPCR法は、報告されたプライマーの最適条件にて行った。

(3) 薬剤感受性試験

ドライプレート DP25（栄研化学）を用い、感染症法の判定基準となる3剤について感性・耐性を判定した。MIC（最小発育阻止濃度）値：イミペネム（IPM） $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ 、シプロフロキサシン（CPFX） $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ 、アミカシン（AMK） $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ を耐性とした。

(4) バイオフィルムアッセイ

96穴ポリスチレン製滅菌平底プレートを用い、供試菌を人工尿中、37°Cで静置培養した。24時間後に形成されたバイオフィルムをクリスタルバイオレットにて染色した。その溶出液のOD₅₇₀値（3穴の平均値）を求めて、バイオフィルム形成能とし、高度形成群（OD₅₇₀ ≥ 1 ）、中等度形成群（1 $>$ OD₅₇₀ ≥ 0.5 ）、低度形成群（0.5 $>$ OD₅₇₀ ≥ 0 ）の3群に分類した。

(5) 統計学的解析

データの解析はMann-WhitneyのU検定を用い、 $P < 0.05$ の場合を有意差ありとした。

(6) 接合伝達実験（フィルター法）

受容菌として *Pseudomonas aeruginosa* ML5017株、イミペネムおよびリファンピシン添加の選択培地を用い、供与菌数あたりの伝達頻度を算出した。伝達の有無は、PCR法およびPFGE法により確認した。

(7) パルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE解析）

BIO-RAD 社のプロトコールに準じた。一夜培養液と 1.2% Chromosomal Grade Agarose を等量混合したゲルブロックを制限酵素 *Spe* I で処理後アガロースゲルに埋め込み、Bio-Rad CHEF DR-III を使用して泳動を行った。泳動終了後、ゲルを SYBR Green I で染色し、デンドログラムを作成した。

(8) MLST (multilocus sequence typing)

P. aeruginosa MLST website (pubmlst.org/paeruginosa/) の方法で行った。ハウスキーピング遺伝子の 7 種類をシーケンス解析し、遺伝子セットとしての塩基配列の差異をパターン化し、データベースと比較した。

(9) 新規 *in vitro* 実験モデル系

P. aeruginosa OP14-210 株および GFP (green fluorescent protein) 産生 OP14-210 (pMF230) 株を用いた。最新型マイクロデバイス (薬剤混合タイプ) に一夜培養の菌液を接種して、37°C, 2 時間放置したのち、人工尿を 20 mL/hr で灌流させ、薬剤無添加と薬剤作用後のバイオフィルムを共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM: Zeiss LSM 510) にて観察した。GFP 非産生株の場合は、蛍光染色キット (Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kits: Molecular Probes) を用いてバイオフィルム内の生菌と死菌を染め分けた。画像解析 (3 次元画像構築) には、Imaris (Bitplane) および MetaMorph (Molecular Devices) を用いた。

(10) 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性緑膿菌 (*P. aeruginosa* Xen 5 株) を用いた。Xen 5 株はカルバペネム系抗菌薬ピアペネムに感受性 (MIC: 0.5 µg/mL) を示し、*in vitro* 継代により中等度耐性化させた菌株 (MIC: 8 µg/mL) とともに供試した。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 ICR 系マウス (雄、5~6 週齢) の左大腿部に発光性緑膿菌を 10^6 CFU/0.1 mL の菌量で接種した。感染 2 時間後より用時調製したピアペネムをマウス背部皮下に 4 回、2 時間毎に投与した。IVIS® Lumina (以下、IVIS®) での発光量 (フォトン数) 測定は感染直後、以降 2 時間毎に 10 時間までイソフルラン麻酔下の同一マウスで発光量増減推移

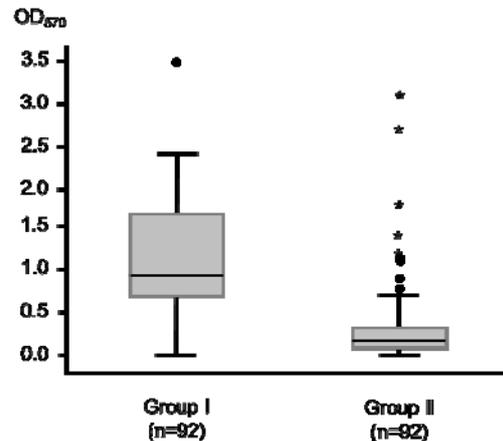
を観察し、生菌数との比較は感染 10 時間後の値で行った。

4. 研究成果

(1) MBL 産生・非産生緑膿菌株のバイオフィルム形成能 (図)

MBL 産生緑膿菌 (Group I) 92 株のバイオフィルム形成能の平均 OD₅₇₀ 値 1.16 ± 0.08

(Mean ± SE) は、MBL 非産生緑膿菌 (Group II) 92 株の平均 OD₅₇₀ 値 0.33 ± 0.05 (Mean ± SE) に比較して、3.5 倍の高値であり、MBL 産生緑膿菌株は有意に高いバイオフィルム形成能を示した。($P < 0.001$) 2007~2008 年度に得られた成績に比較して、MBL 非産生緑膿菌のなかにバイオフィルム形成能が高い株が散見されるようになった。



(2) 分子疫学的解析

MBL 産生緑膿菌 30 株の MLST (multilocus sequence typing) を行った結果、全株が ST235 であった。インテグロンカセットタイプでは、2 タイプの存在が確認された。ST235 クローンは国際的に広く拡散している多剤耐性緑膿菌であるが、本研究において得られたバイオフィルム形成能に関する実験データならびにパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法での解析において、それぞれの菌株は多様な性状を示した。

(3) 薬剤耐性遺伝子の伝達性

MBL 産生緑膿菌 18 株 (バイオフィルム高度形成群 8 株、中等度形成群 6 株、低度形成群 4 株) の接合伝達実験を行った結果、16 株でイミペネム耐性が伝達した。伝達頻度が比較的高かった ($10^{-3} \sim 10^{-6}$) 6 株中、4 株は高度

形成群、1株は中等度形成群、1株は低度形成群であった。

(4) 新規 *in vitro* 実験モデル系での成績

バイオフィーム形成阻害剤を効率的にスクリーニングするための *in vitro* 実験系に用いる新規マイクロデバイスを設計し、2008年度末に特許申請を行い、2010年度末に特許を取得した(特許第4674337号)。本研究課題の研究期間(2009～2011年度)に改良を重ね、改良型マイクロデバイス(薬剤混合タイプ)の有用性を検討した。GFP産生株を用いて、デバイスに形成されたバイオフィームを共焦点レーザー走査型顕微鏡にて観察した結果、基本設計に問題がないことが確認できた。最新型マイクロデバイスを用いるフローセルシステム(尿路バイオフィーム *in vitro* 実験モデル系)において、多剤耐性緑膿菌に対して有効とされる抗菌薬(コリスチン)と既存の抗菌薬(レボフロキサシン、ホスホマイシン)や緑膿菌クオラムセンシング(細胞密度依存的)機構の阻害剤(QSIs)として見出された化合物(QSI-1)との併用効果を検討した結果、新規治療法の可能性を示唆するデータが得られた。

(5) 新規 *in vivo* 実験モデル系での成績

IVIS[®]を使用する緑膿菌マウス大腿部感染モデル(発光性緑膿菌 Xen 5株)において、緑膿菌クオラムセンシング阻害剤(QSIs)として見出された4化合物を腹腔内投与し、有効性評価を行った。その結果、*in vitro* 実験系でバイオフィーム形成阻害効果が比較的高かった化合物(QSI-1)とカルバペネム系抗菌薬(ピアペネム)との併用で、カルバペネム系抗菌薬に中等度耐性を示す株に対しても抗菌活性が増強することを確認した。

マウスを用いた *in vivo* 尿路バイオフィーム感染症モデルとして、2009年度に *P. aeruginosa* OP14-210株を用いて再現性のある実験系を確立した。菌接種後少なくとも7日間は死亡例がなく、バイオフィーム形成阻害剤の評価に使用可能な実験系である。しかし、IVIS[®]での観察において、貯尿した膀胱中に生存する発光性緑膿菌 Xen 5株の検出は可能であったものの、膀胱留置のポリエチレンチューブに形成されたバイオフィームや腎盂ならびに尿路における感染巣では検出

限界以下であることが明らかとなった。そこで、2011年度に新規発光性緑膿菌株の構築を行った結果、市販の Xen 5株よりも10～100倍高い発光量を示す株の構築に成功した。

(6) 考察

緑膿菌は尿路感染症の原因菌となる代表的な菌種のひとつであり、尿路に基礎疾患を有する複雑性尿路感染症、特に尿路にカテーテルが留置された患者からは頻繁に分離される。免疫抑制宿主を主体とした長期入院患者には尿路カテーテルが留置されることが多いことから、緑膿菌性尿路バイオフィーム感染症は泌尿器科病棟のみならず医療施設全体の問題として対策に取り組むことが求められている。MDRPは五類感染症定点把握疾患に指定され、注意を喚起されているが、全数把握の感染症ではない。最近では、外来患者の尿中からMDRPやMBL産生緑膿菌が検出されるようになったこと、またバイオフィーム形成能が高い緑膿菌は環境中に生息しやすいことを考慮すると、医療環境の管理を徹底する必要がある。最新の方法による分子疫学的解析を継続することで、より有効な拡散防止策の構築を行う必要がある。

複雑性尿路感染症より分離される日和見感染菌は、本来尿路への定着性は低いものの、留置カテーテルや高度の尿流障害など基礎疾患につけこんで、細菌バイオフィームを形成して尿路での定着性と増殖性を獲得する。尿路バイオフィーム感染症は、潜伏・持続感染の様相を呈することが多く難治性である。反復かつ遷延する尿路バイオフィーム感染症に対して、抗菌化学療法を繰り返すことによって多剤耐性菌が選択されていることも事実である。尿路バイオフィーム感染症は通常臨床症状に乏しく比較的穏やかな感染症であるが、一旦、尿流障害を合併すると敗血症に移行し、宿主を重篤化させる。今日の高度化した医療現場には多剤耐性菌による感染症が致死的となる患者が少なくなく、新規予防法・治療法の開発の意義は大きい。

近年、細菌の集団状態を感知し、遺伝子発現を制御するクオラムセンシング機構という概念が、細菌の世界に導入された。クオラムセンシングはバイオフィーム形成にも関わっており、この機構の解明はバイオフィル

ム対策への活路を拓くものと期待されている。本研究課題において、緑膿菌マウス大腿部感染モデルに対するクオラムセンシング阻害剤の有用性ならびに既存の抗菌薬との併用による新規治療法を示唆する価値ある研究成果を得ることができた。国内外では、緑膿菌をはじめとするグラム陰性菌およびグラム陽性菌に関してもクオラムセンシング機構の研究は進展しており、その阻害剤の開発研究がなされている。クオラムセンシング機構の阻害剤が尿路バイオフィーム感染症の予防や治療に役立てられるのかどうかは、今後の課題であるが、一種の阻害剤で、病原性や薬剤抵抗性に関与する遺伝子の発現を同時に制御できるような抗バイオフィーム剤の開発が期待されている。

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6件)

- ① 狩山玲子、光畑律子、上原慎也、渡辺豊彦、公文裕巳、緑膿菌性尿路バイオフィーム *in vitro* 実験モデル系におけるコリスチンの有効性評価、査読無、Bacterial Adherence & Biofilm、25: 43-46, 2012
- ② 狩山玲子、金原和秀、高野和潔、妹尾典久、大森啓士、光畑律子、桐田泰三、公文裕巳、緑膿菌性バイオフィーム形成阻害剤のスクリーニングにおける新規マイクロデバイスの有用性について、査読無、緑膿菌感染症研究会講演記録、45: 84-88, 2011
- ③ 狩山玲子、金原和秀、高野和潔、妹尾典久、大森啓士、光畑律子、桐田泰三、公文裕巳、新規マイクロデバイスに形成された緑膿菌性バイオフィームの共焦点レーザー走査型顕微鏡観察、査読無、Bacterial Adherence & Biofilm、24: 69-73, 2011
- ④ 狩山玲子、堀賢司、光畑律子、上原慎也、渡辺豊彦、公文裕巳、緑膿菌性尿路バイオフィーム *in vivo* 感染症モデルへのリアルタイムイメージング装置の応用性に関する検討、査読無、緑膿菌感染症研究会講演記録、44: 98-103, 2010
- ⑤ 狩山玲子、公文裕巳、バイオフィーム形成とクオラムセンシング 臨床医学編 泌尿器感染症とバイオフィーム、化学療法の領域、査読無、26: 71-78, 2010
- ⑥ 山本満寿美、狩山玲子、光畑律子、石井亜矢乃、上原慎也、渡辺豊彦、公文裕巳、メタロ-β-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 *bla_{IMP-1}* 遺伝子の伝達性に関する検討、査読無、Bacterial Adherence & Biofilm、23: 71-75, 2010

[学会発表] (計16件)

- ① 狩山玲子、泌尿器科領域における緑膿菌感染症の特徴と新規治療法開発に向けた基礎的アプローチ、第46回 緑膿菌感染症研究会(招待講演)、2012年2月17日、慶應義塾大学医学部北里講堂(東京都)
- ② 狩山玲子、リアルタイムイメージング装置での緑膿菌マウス大腿部感染モデルに対するクオラムセンシング阻害剤とピアペネムの併用効果の検討、第59回 日本化学療法学会西日本支部総会、2011年11月25日、奈良県新公会堂(奈良市)
- ③ 堀賢司、リアルタイムイメージング装置での緑膿菌マウス大腿部感染モデルに対するクオラムセンシング阻害剤の有効性評価と投与方法の検討、第59回 日本化学療法学会西日本支部総会、2011年11月24日、奈良県新公会堂(奈良市)
- ④ 狩山玲子、Symposium 「Biofilm」、「Development of novel methods for the search of antibiofilm agents」、The Joint Meeting of The 17th International Symposium on Gnotobiology and The 34th Congress of the Society for Microbial Ecology and Disease (招待講演)、2011年11月23日、ナビオス横浜(横浜市)
- ⑤ 狩山玲子、緑膿菌性尿路バイオフィーム新規 *in vitro* 実験モデル系での抗バイオフィーム剤の探索、第22回 尿路感染症研究会、2011年10月16日、じゅうろくプラザ(岐阜市)
- ⑥ 狩山玲子、リアルタイムイメージング装

- 置での緑膿菌マウス大腿部感染モデルに対するクオラムセンシング阻害剤の有効性評価、第 81 回 日本感染症学会西日本地方会学術集会、2011 年 10 月 7 日、北九州国際会議場（北九州市）
- ⑦ 狩山玲子、緑膿菌性尿路バイオフィルム *in vitro* 実験モデル系におけるクリスチンの有効性評価、第 25 回 Bacterial Adherence & Biofilm 学術集会、2011 年 7 月 8 日、東京慈恵会医科大学（東京都）
- ⑧ 狩山玲子、新規マイクロデバイスにおける緑膿菌性バイオフィルムに対するクリスチンの有効性評価、第 59 回 日本化学療法学会総会、2011 年 6 月 25 日、札幌コンベンションセンター（札幌市）
- ⑨ 上原慎也、シンポジウム「尿路性器感染症研究・診療における現状と課題」、「上部尿路感染症：退治か？共棲か？細菌との知恵比べ」、第 99 回 日本泌尿器科学会総会（招待講演）、2011 年 4 月 23 日、名古屋国際会議場（名古屋市）
- ⑩ 狩山玲子、バイオフィルム形成阻害剤のスクリーニングにおける新規マイクロデバイスの有用性に関する検討、第 85 回 日本感染症学会総会、2011 年 4 月 22 日、ザ・プリンス パークタワー東京（東京都）
- ⑪ 狩山玲子、リアルタイム *in vivo* イメージングシステムにおける緑膿菌マウス大腿部感染モデルに対するピアペネムの有効性評価、第 58 回 日本化学療法学会西日本支部総会、2010 年 11 月 25 日、大分全日空ホテル（大分市）
- ⑫ 狩山玲子、新規マイクロデバイスに形成された緑膿菌性バイオフィルムの共焦点レーザー走査型顕微鏡観察、第 24 回 Bacterial Adherence & Biofilm 学術集会、2010 年 7 月 9 日、京王プラザホテル（東京都）
- ⑬ 狩山玲子、緑膿菌性尿路バイオフィルム感染症対策としての抗バイオフィルム剤の探索、第 58 回 日本化学療法学会総会、2010 年 6 月 3 日、長崎ブリックホール（長崎市）
- ⑭ 狩山玲子、リアルタイム *in vivo* イメージング装置の動物感染実験モデルへの応用性に関する検討－緑膿菌マウス大腿部

感染モデル－、第 84 回 日本感染症学会総会、2010 年 4 月 6 日、国立京都国際会館（京都市）

- ⑮ 狩山玲子、Biofilm-forming capabilities and molecular epidemiology of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*、ASM Conference on Biofilms 2009、2009 年 11 月 17 日、Hilton Cancun（Cancun, Mexico）
- ⑯ 山本満寿美、メタロ- 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 *bla*_{IMP-1} 遺伝子の伝達性に関する検討、第 23 回 Bacterial Adherence & Biofilm 学術集会、2009 年 7 月 11 日、第一三共本社ビル（東京都）

[その他]

ホームページ等

<http://www.uro.jp/okayama/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

上原 慎也 (UEHARA SHINYA)
岡山大学・岡山大学病院・講師
研究者番号：30379739

苔口 進 (KOKEGUCHI SUSUMU)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：10144776

(3) 連携研究者