

## 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 6 月 6 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592183

研究課題名（和文） 臨床由来マクロライド耐性黄色ブドウ球菌の細胞壁肥厚に関する研究

研究課題名（英文） Study on thickened cell wall in clinical macrolide-resistant *Staphylococcus aureus* isolates.

研究代表者

山田 作夫 (YAMADA SAKUO)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00122458

研究成果の概要（和文）：臨床由来マクロライド（ML）耐性黄色ブドウ球菌は臨床由来 ML 感受性黄色ブドウ球菌よりも有意に厚い細胞壁を有することを明らかにすることができた。さらに ML と同じ蛋白合成阻害薬のゲンタマイシン（GM）耐性臨床由来黄色ブドウ球菌についても GM 感受性臨床株に比べ厚い細胞壁を有することが判明し、臨床由来蛋白合成阻害薬耐性黄色ブドウ球菌は細胞壁肥厚という超微形態的特徴を示すことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The clinical macrolide（ML）-resistant *Staphylococcus aureus* strains showed a thickened cell wall when compared morphologically with the clinical ML-sensitive *S. aureus* strains. We also demonstrated that gentamycin-resistant clinical isolates of *S. aureus* exhibited a thickened cell wall. These results strongly suggest that a thickened cell wall is a common ultrastructural characteristic of protein synthesis inhibitor antibiotics-resistant *S. aureus* clinical strains.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	300,000	90,000	39,000
年度			
年度			
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・耳鼻咽喉科学

キーワード：黄色ブドウ球菌、細胞壁、肥厚、マクロライド、ゲンタマイシン、耐性菌

## 1. 研究開始当初の背景

マクロライド(ML)は耳鼻咽喉科領域における慢性副鼻腔炎や呼吸器領域における慢性下気道炎における抗菌治療を目的とするだ

けでなく、近年は抗炎症作用を目的として少量長期投与が頻繁に行われることから、ML耐性菌の出現が臨床上、大きな問題となっている。そのため我々は、耳鼻科領域の患者材

料より ML 耐性菌株の分離を試みたところ、慢性副鼻腔炎患者の上顎洞より ML 耐性 *Staphylococcus capitis* (NH 株) を分離することができた。一方、一般的には抗菌薬耐性菌は抗菌薬感受性と抗菌薬感受性以外の性状には大きな相違はないとされてきたが、近年、細胞壁における形状に違いのあることが示唆されつつある。そこで、分離できた ML 耐性 *S. capitis* の細菌学的特徴、とくに超微形態的特徴について顕微科学的に追求したところ、NH 株の細胞壁が対照とした ML 感受性臨床分離 *S. capitis* CKW 株および *S. capitis* 標準株 GTC287 に比べ、有意に肥厚していることを見出した。

## 2. 研究の目的

- (1) 臨床由来 ML 耐性 *S. aureus* ならびに ML 感受性 *S. aureus* をさらに集積して、これらの菌株を対象にして超微形態的に検索し、ML 耐性臨床分離株における細胞壁肥厚の普遍性を検証するとともに ML 以外の各種抗菌薬感受性と細胞壁肥厚との間の関連性を明らかにする。
- (2) ML 耐性菌株が細胞壁肥厚という超微形態的特性を有することをさらに確かめるために、ML 感受性 *S. aureus* 標準株を親株として実験室内にて ML 耐性変異株を選択的に分離することを試みたところ、ML 耐性株を樹立することができた。そこで、得られた ML 耐性変異株の細胞壁について、親株との間で超微形態的に比較する。
- (3) 上記(1)で得られた臨床由来耐性株ならびに(2)において実験室内で樹立できた耐性株を対象に、既知の ML 耐性遺伝子の有無を検索し、さらに ML 耐性遺伝子と細胞壁肥厚との間に特定の関連性が有るかないかを明らかにする。
- (4) 細胞壁肥厚という特徴を持った ML 耐性

菌の細菌学的特徴を ML 感受性菌の性状と比較することによって追求する。

- (5) 細胞壁肥厚 ML 耐性株における ML の菌体内透過性について抗 ML 抗体を用いた免疫電子顕微鏡法で可視化して明らかにする。
- (6) ML 耐性株における細胞壁肥厚の機序を追求するために、まず、細胞壁の構成成分にいかなる変化が生じているか、例えば、ペプチドグリカンが多く構築されているか、あるいは多糖なような新たな成分が出現しているかを生化学的、さらに免疫電子顕微鏡法を駆使して明らかにする。
- (7) 細胞壁肥厚化は ML 以外の抗菌薬に対する感受性にも影響を及ぼすか否かを検索し、有効な治療法を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 臨床由来 ML 耐性株の集積

本学附属病院中央検査部譲渡された患者由来 *S. aureus* 菌株を集積・継代培養し樹立した。

### (2) 臨床分離 *S. aureus* 菌株の薬剤感受性試験

得られた臨床分離菌株を対象に、ML を含めた各種抗菌薬に対する感受性を、抗菌薬の minimum inhibitory concentration (MIC) 測定法試験に準じて検索した。

### (3) 臨床由来 *S. aureus* 菌株の超微科学的解析

臨床材料由来 *S. aureus* 菌株を対象に、常法に従って固定・脱水・Spurr 樹脂包埋後、ダイヤモンドナイフによる超薄切片をウルトラマイクローム（本学電子顕微鏡センター設置）を用いて作製し、透過型電子顕微鏡 (TEM, JEM12000EX II、同センター設置) にて、超微形態を観察した。ファイルに取り込まれた菌体観察像について、赤道面で切片化された菌体を選択し、その菌体の細胞壁の厚さを 3

カ所以上計測した上で、平均化して一菌体当たりの細胞壁の厚さと判定し、10 菌体以上において得られた値を集積・平均化し、その菌株の細胞壁の厚さとした。(2)、(3)により得られた結果を集積し、各種薬剤感受性と細胞壁肥厚との間の関連性を明らかにした。

(4) 実験室内にて得られた ML 耐性変異株の細胞壁の超微形態観察

*S. aureus* 標準・ML 感受性 209P 株から protein A 欠損株として既に分離・樹立した菌株 2PF-18 株を親株として、高濃度 ML 含有寒天培地で培養することにより選択的に得られた菌株を ML 耐性変異株として樹立した。そこで、得られた ML 耐性変異株を対象に、(3)と同様の方法により、細胞壁の厚さを測定し、親株の細胞壁の厚さと比較検討した。あわせてこれらの ML 耐性変異株の他の抗菌薬に対する感受性を(2)と同様に測定した。

(5) ML 耐性機序と細胞壁肥厚との間の関連性検索

これまで見出されたブドウ球菌の主な ML 耐性機構は 23SrRNA の薬剤結合性低下で *ermA*, *ermB*, および *ermC*, さらに ML 排出ポンプをコードする遺伝子として *msrA* が知られている。そこで、得られた ML 耐性臨床分離株ならびに実験室内 ML 耐性誘導株が、いかなる耐性機序を發揮しているかを既知の耐性遺伝子を、それぞれの遺伝子に特異的なプライマーを用いた PCR 法により検出して検討した。

(6) ML 耐性菌における ML 透過性の免疫電子顕微鏡法による超微形態学的解析

超薄切片上で抗 ML 抗体と反応後 protein A-gold で標識する post-embedding 法に従った免疫電子顕微鏡法を遂行した。ML 耐性菌における ML の局在を観察することにより、ML の菌体内透過性について解明を試みた。

(7) ML 耐性菌株における肥厚細胞壁の生化的解析

学的解析

ML 耐性菌細胞壁が感受性菌といかに構成成分が異なるかを明らかにするために、(4)で得られた ML 耐性変異株と親株を対象に、粗精製した細胞壁を SDS-PAGE 展開し、バンドのパターンを比較検討した。PAGE 後、ウェスタンプロットした膜上でレクチン染色を行って糖鎖における相異点の解明を試みた。

(8) ML 耐性 *S. aureus* の各種抗菌薬感受性測定

細胞壁の肥厚化 *S. aureus* 株の ML 以外の抗菌薬に対する感受性を MIC 測定ならびに、抗菌薬添加後の経時的生菌数減少を求めて検索した。さらに、各種抗菌薬による処理菌体の超微形態変化を TEM にて観察した。

#### 4. 研究成果

(1) 臨床由来 ML 耐性 *S. aureus* 10 菌株および ML 感受性 *S. aureus* 10 菌株の計 20 菌株を対象に、常法によって透過型電子顕微鏡 (TEM) にて観察し、細胞壁の厚さを計測した結果、ML 耐性 *S. aureus* 10 菌株における細胞壁の平均の厚さは  $31.5 \pm 3.7$  nm で、ML 感受性 10 菌株の細胞壁の  $18.6 \pm 2.1$  nm に比べ有意に厚いことが明らかとなった。さらに、感受性 *S. aureus* を親株として実験室内で得られた ML 耐性分離 3 菌株は、ともに親株に比べ有意に細胞壁が肥厚していることが TEM 観察により確かめられた。従来、ML で *S. aureus* を処理すると細胞壁が肥厚化することは *in vitro* 実験において既に明らかにされているが、ML 投与とは無関係の患者から採取できた ML 耐性 *S. aureus* が細胞壁肥厚を呈することを今回明らかにすることができた。そのため、細胞壁肥厚という観点からの新たな耐性機構の解明を試みるために ML 耐性株における既知のエリスロマイシン耐性遺伝子について PCR 法にて検索した。

その結果、既知の ML 耐性遺伝子と細胞壁肥厚との間には特定の関連性は得られず、また、いずれの既知の耐性遺伝子も保有しない菌株も得られたことから、未だ明らかにされていない耐性メカニズムの存在することが強く示唆された。

(2) ML耐性株における細胞壁肥厚の細菌学的意義について明らかにするために、細胞壁合成阻害剤による溶菌効果について、ML感受性株およびそれを親株として実験室内で分離できたML耐性株を対象に、 $\beta$ -ラクタム薬の一つであるセフトレンピボキシル (CDTR-PI) を作用した後の吸光度の減少を経時的に測定することにより、さらに CDTR-PI で処理して惹起される超微形態変化を TEM にて観察して検討した。その結果、ML耐性分離株は CDTR-PI により ML感受性株と同様に溶菌することが吸光度測定法ならびに TEM 観察により明らかとなり、ML耐性 *S. aureus* における肥厚化した細胞壁は細胞壁合成阻害薬に対する感受性には直接的には関与しないことが示唆された。

(3) ML と同じ蛋白質合成阻害薬であるゲンタマイシン (GM) に耐性の *S. aureus* の臨床由来株における超微形態的特徴を TEM 観察後、細胞壁を計測して検討したところ、GM感受性 7 菌株における細胞壁の厚さは  $19.02 \pm 2.72 \text{ nm}$  であったのに比べ、GM耐性 7 菌株の細胞壁の厚さは  $32.24 \pm 5.99 \text{ nm}$  で、GM耐性臨床分離株は GM感受性分離株より有意に細胞壁が肥厚していることが判明した。従来得られた ML耐性菌株における細胞壁肥厚という超微形態的知見に加え今回得られた結果から、臨床由来タンパク合成阻害薬耐性 *S. aureus* は細胞壁肥厚という超微形態的特徴を有することが示唆された。

(4) 実験室内で GM感受性株より GM耐性株を分離・樹立できたことから、感受性親株と

分離耐性変異株の細胞壁の厚さを常法により超薄切片を作製して、透過型電子顕微鏡にて比較観察した。その結果、親株は  $16.27 \pm 2.97 \text{ nm}$  を示したのに比べ、変異株は  $29.08 \pm 3.05 \text{ nm}$  と有意に厚い細胞壁を有することを明らかにすることができた。そこで、この GM耐性変異株の細胞壁肥厚が、細胞壁構成ペプチドグリカンの実質的增加に基づくものか否かを、Silkworm Larvae Plasma 試薬を用いてペプチドグリカン量を測定した結果、GM耐性変異株では親株の GM感受性株に比べ、約 3 倍増加していることが認められ、電顕観察された細胞壁の肥厚は、ペプチドグリカンの増加に基づくものであることが確かめられ、GM耐性株は GM感受性株に比べ、細胞壁構成ペプチドグリカン量の多いことが明らかとなった。一方、GM耐性変異株における、細胞壁肥厚と GM耐性遺伝子との関連性を追求するために、アミノ配糖体修飾酵素遺伝子である *aac(6')-Ie-aph(2'')*、*aph(3')-IIIa* および *ant(4')-Ia* の 3 耐性遺伝子について、その有無を PCR 法にて検索した結果、*aac(6')-Ie-aph(2'')* は保有するものの、他の 2 遺伝子は保有しないことが判明した

## 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 3 件)

- ① Fukutsuji Kenji, Yamada Sakuo, Harada Tamotsu: Ultrastructural cell wall characteristics of clinical gentamycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Medical Molecular Morphology*, 査読有, 2012, in press.
- ② Hyo Yoshiyuki, Yamada Sakuo, Ishimatsu Masaki, Fukutsuji Kenji, Harada Tamotsu: Antimicrobial effects of Burrow's solution on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Medical Molecular Morphology*,

査読有, 2012, in press.

- ③ 兵行義、山田作夫、原田保：臨床由来マクロライド耐性ブドウ球菌の顕微科学的検索。顕微鏡、査読有、45 (4)、2010、pp. 218-222、

[学会発表] (計 5 件)

- ① Fukutsuji Kenji, Yamada Sakuo, Harada Tamotsu: Ultrastructural cell wall characteristics of clinical gentamycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. 21st ECCMID: 21st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases/ 27th ICC: International Congress of Chemotherapy, 2011 年 5 月 8 日, ITALIA.
- ② 福辻賢治、山田作夫、兵行義、原田保：ゲンタマイシン耐性黄色ブドウ球菌臨床分離株における細菌学的特徴。第 58 回日本化学療法学会総会, 2010 年 6 月 3 日, 長崎.
- ③ 福辻賢治、山田作夫：ゲンタマイシン耐性黄色ブドウ球菌臨床分離株における超微形態的特徴。日本顕微鏡学会第 66 回学術講演会, 2010 年 5 月 25 日, 名古屋.
- ④ 山田作夫: マクロライド耐性ブドウ球菌の顕微科学的解析。第 83 回日本細菌学会総会, 2010 年 3 月 29 日, 名古屋.
- ⑤ 兵行義、山田作夫、原田保：マクロライド耐性黄色ブドウ球菌における超微形態的特徴ならびにβラクタム薬感受性。第 41 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会, 2009 年 9 月 5 日, 神戸.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 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 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：

種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山田 作夫 (Yamada Sakuo)  
川崎医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：00122458

### (2) 研究分担者

原田 保 (Harada Tamotsu)  
川崎医科大学・医学部・教授  
研究者番号：30165021

### (3) 連携研究者 ( )

研究者番号：