

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791947

研究課題名(和文) 薬剤耐性菌における細胞壁肥厚のメカニズム

研究課題名(英文) Mechanism of cell wall thickening in drug-resistant bacteria

研究代表者

兵 行義 (YUKIYOSHI, HYO)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：80412203

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：従来より、薬剤耐性菌と感受性菌には形態的な違いがないと報告をされていた。しかし1997年バンコマイシン耐性株の超微形態的特徴として細胞壁肥厚という特徴を有することが発表されて以来、細菌の細胞壁について注目されている。われわれは慢性副鼻腔炎患者から分離されたML耐性ブドウ球菌に対して超微形態的特徴を検討し、細胞壁肥厚という形態的特徴を有していることを報告した。他菌種ではそのような特徴を有していないが、黄色ブドウ球菌に対してはML耐性菌の場合、細胞壁肥厚という特徴を有し、多剤耐性黄色ブドウ球菌に対しても同様結果が得られ、多剤耐性菌の細胞壁肥厚は蛋白合成阻害剤が一因である可能性を指摘した。

研究成果の概要(英文)：Conventionally, had been reported that there is no difference in the morphological sensitive bacteria and drug-resistant bacteria. However, it has a feature that cell wall thickening as ultrastructural features VISA (Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus) in 1997 since, it has attracted a tention for the bacterial cell wall. We have reported that examined the ultrastructural characteristics for ML -resistant staphylococci isolated from chronic sinusitis patients have morphological characteristics of cell wall thickening. We were examined whether having the morphological characteristics in drug-resistant bacteria in general in this study. In the case of ML -resistant bacteria , has a characteristic of cell wall thickening , but also for multi-drug resistant S. aureus against S. aureus similar results were obtained , cell wall thickening of multiple-drug-resistant bacteria has been pointed out may contribute the p rotein synthesis inhibitor .

研究分野：薬剤耐性、耳鼻咽喉科学、感染症学

科研費の分科・細目：鼻科学，薬剤耐性

キーワード：薬剤耐性 細胞壁 超微形態的特徴 マクロライド

1. 研究開始当初の背景

従来より薬剤耐性菌と感受性菌において形態的違いはないと報告されてきた。しかし 1997 年 VISA (Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*) の超微形態的特徴として細胞壁肥厚という特徴を有することが発表されて以来、細菌の細胞壁について注目されている。我々は耳鼻咽喉科領域で頻用されているマクロライド系抗菌薬 (MLs) に対する耐性菌の細胞壁が肥厚する特徴を有することを発表し、様々な抗菌薬耐性菌の超微形態学的構造を検討している。それにより、VISA だけではなく他の抗菌薬耐性菌にも細胞壁肥厚という特徴を有していることが判明し、報告している。

2. 研究の目的

薬剤耐性菌においてこれらの細胞壁肥厚した菌体の細菌学的意義を追求するとともに、耳鼻咽喉科で頻用されている抗菌薬の弊害についてもあわせて検討する。

3. 研究の方法

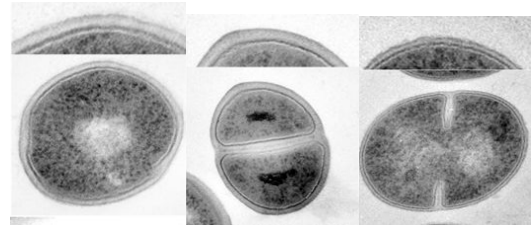
本学附属病院中央検査部より譲渡された外来患者から得られた臨床材料由来の黄色ブドウ球菌を集積、継代培養し、各種抗菌薬感受性検査を施行し、感受性の有無について検討する。それらの菌株をもとに臨床由来黄色ブドウ球菌の顕微科学的解析を常法に従って固定・脱水・包埋後ダイヤモンドナイフによる超薄切片をウルトラミクロトームを用いて作成し、透過型電子顕微鏡 (TEM, JEM1400, 同センター設置) にて超微形態を観察する。菌体観察像に対し赤道面で切れているものを選択し、その菌体の細胞壁の厚さを3か所以上計測した上で平均化して菌体の細胞壁の厚さと判定し、10菌体以上において得られた値を集積・平均化しその菌株の細胞壁の厚さとする。また本学中央検査部にて分離された細菌のなかで、サーベイランスを実施し、緑膿菌をはじめとしたブドウ球菌以外の菌腫においても同形態変化が現れるのかどうかも合わせて検討する。

4. 研究成果

1) 臨床分離 MLs 耐性黄色ブドウ球菌の表現型
黄色ブドウ球菌において当院中央検査

部において分離された、菌株に対して上記方法を用いて検討を行った。その結果、黄色ブドウ球菌において ML 耐性株 10 菌株は ML 感受性 10 菌株よりも細胞壁の厚さが有意に厚いことが分かった。また多剤耐性ブドウ球菌に対しても同様に ML 耐性菌と同様に細胞壁肥厚という形態的特徴を有することが示唆された。

ML 耐性菌 多剤耐性菌 感受性菌



上記は一例であるが、感受性菌に比較して ML 耐性菌や多剤耐性菌では細胞壁肥厚していることが分かった。

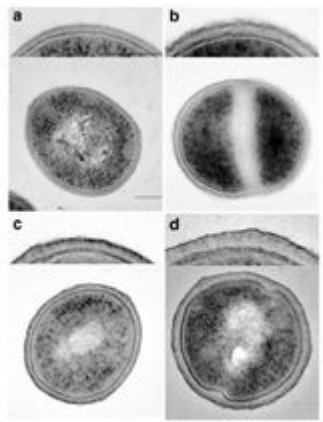
そこで、それぞれ 10 菌株ごとの集計を行った結果では ML 感受性菌 $32.6 \pm 4.2 \text{ nm}$ 、多剤耐性菌 $34.6 \pm 4.2 \text{ nm}$ 、感受性菌 $18.6 \pm 2.1 \text{ nm}$ であり、感受性菌と比較し、有意に両群は細胞壁肥厚という特徴を有していることが確認された。また多剤耐性菌と感受性菌の間には統計的な差は認めなかった。

2) 臨床分離 MLs 耐性黄色ブドウ球菌の遺伝型

臨床これらの ML 耐性菌 20 菌株をすでに報告をされている耐性遺伝子所有の有無について検討をしたところ、*ermA* は 12 菌株、*ermC* は 4 菌株、*msrA* は 1 菌株であり、既存の耐性遺伝子を所持していない菌株が 3 菌株あった。これらの結果は臨床分離株であった。

3) 実験室分離 MLs 耐性黄色ブドウ球菌の表現型と遺伝型

実験室内でも ML 耐性菌を誘導することにより細胞壁肥厚という形態的特徴を有することを証明したく、以下の実験を遂行した。実験室内での黄色ブドウ球菌 2PF-18 株に対し、ML 耐性菌の誘導を行った。その結果以下のように細胞壁肥厚した菌株を確認することができた。



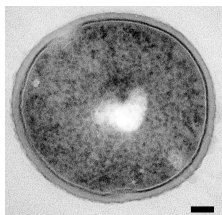
a) 親株 2PF-18, b) 誘導ML耐性菌 2PFRE-1, c) 誘導ML耐性菌 2PFRE-2, d) 誘導ML耐性菌 2PFRE-8

上記は一例であるが、ML耐性株は3菌株誘導でき、超微形態観察を行ったところ実験室内においてもML耐性菌の細胞壁肥厚した菌株を誘導することができた。

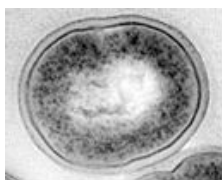
またこれらは既存の耐性遺伝子を所有していないことから、既存のML耐性遺伝子の所有の有無には無関係であり、ML耐性ブドウ球菌の特徴として確立し、何らかの細胞壁肥厚をもたらす遺伝子が存在する可能性を示唆される結果となった。

4) 表皮ブドウ球菌による検討

今回の結果をもとに表皮ブドウ球菌においても同様の検討を行ったところ、表皮ブドウ球菌に対しても同様であり、ML耐性表皮ブドウ球菌は細胞壁肥厚という形態的特徴を有していることが示唆された。



— 表皮ブドウ球菌感受性株



ML耐性株

院内のサーベイランスとして、緑膿菌の検討を行ったが、耳鼻咽喉科領域から多剤耐性緑膿菌の検出はなかった。院内サーベイランスの結果、多剤耐性緑膿菌が検出される患者背景因子には尿道留置バルーン挿入している患者にもっとも検出率が高かった。これらのように多剤耐性緑膿菌においては標準的予防策により院内の感染の伝播

を防ぐことが重要であることが分かった。また同様に形態的变化を確認をしたが、これらの菌種においても検討を試みたが、緑膿菌などの桿菌はML自然耐性であり肥厚化した細胞壁は観察できなかった。

また他の実験系でもGMに対しても耐性株では細胞壁肥厚という形態的特徴を有していることが分かった。つまり、MLをはじめとしたタンパク合成阻害剤の耐性化することにより細胞壁肥厚という特徴を有する可能性があることを示唆された。前述のVISAにおいてもタンパク合成阻害剤は耐性であるので、これらによる影響がある可能性があることが示唆される。

今後は表現型だけでなく、肥厚化した細胞壁の細菌学的意味付け、また宿主に対する効果も含めて検討し、これにより難治化の感染症を引き起こしている可能性があるために、この肥厚化した細胞壁を破壊する方法についても検討したいと考える。

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 3 件)

1. Hyo Y, Yamada S, Fukutsuji K, Harada T. Thickening of the cell wall in macrolide-resistant *Staphylococcus aureus*. 査読あり、*Med Mol Morphol*.;46(4):217-24. 2013. doi: 10.1007/s00795-013-0027-y

2. 兵行義, 原田保, 図で見る免疫学 ABC, 免疫系の仕組みと基礎、細胞表面機能分子 C D 分類、査読なし、J O H N 29, 321-25.2013.

2. Hyo Y, Yamada S, Ishimatsu M, Fukutsuji K, Harada T. Antimicrobial effects of Burow's solution on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. 査読あり。

Med Mol Morphol.;45(2):66-71. 2012. doi: 10.1007/s00795-011-0540-9

3. 兵行義, 石松昌己, 原田保. 当院における緑膿菌の薬剤感受性の動向. 査読あり、日本耳鼻咽喉科感染症研究会会誌 30(1) 93-97, 2012

[学会発表](計 3 件)

1. 兵行義、当院における緑膿菌の薬剤感受性の動向、日本耳鼻咽喉科感染症研究会、2011年9月3日、東京ガーデンパレス。

2. Yukiyoshi Hyo, Ultrastructural Analysis of Macrolide-resistant *Staphylococci*, ISIAN, 2011.9.22, ANA インターコンチネンタル東京

3. 兵 行義、薬剤耐性肺炎球菌により頸部腫脹を主訴に来院した咽後膿瘍の一例、日本耳鼻咽喉科感染症研究会 2012年9月7日、海峡メッセ下関.

4. 兵 行義、臨床由来マクロライド（ML）耐性表皮ブドウ球菌におけるML耐性遺伝子の検索、日本耳鼻咽喉科感染症研究会、2013年9月6日、レンブラントホテル大分.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

兵 行義 (Yukiyoshi Hyo)

川崎医科大学 耳鼻咽喉科 講師

研究者番号：80412203