

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590080

研究課題名(和文) 院内感染起因菌の消毒薬耐性の全体像の解明

研究課題名(英文) Resistant mechanism for disinfectants of pathogenic bacteria of nosocomial infections

研究代表者

黒田 照夫 (KURODA, TERUO)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：80304327

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：院内感染の起因菌の一つであるセラチア・マルセッセンスの消毒薬耐性因子の一つとして多剤排出ポンプSdeXYを我々はすでに同定している。本研究では、継代培養法により得た消毒薬耐性株を用いて更なる新規因子を同定する解析を進めた。その結果、多剤排出ポンプSdePQ-OmsAを見出した。このポンプは野生株ではほとんど発現していないが、消毒薬耐性株では発現が上昇していた。この変化には2成分制御系であるCpxAが関与する可能性を示した。また消毒薬クロルヘキシジンの耐性因子としてこれまで機能が明らかにされていないMipAを同定した。

研究成果の概要(英文)：Serratia marcescens is a well-known cause of nosocomial infections. We have already shown that multidrug efflux pump SdeXY is responsible for disinfectant resistance in *S. marcescens*. In this project, we tried to identify novel factors for this resistance using disinfectant resistant mutants which we got by passage culture. We showed that expression of RND-type multidrug efflux pump SdePQ-OmsA was significantly higher in the mutant, but the expression was not observed in wild-type strain. Knock-out mutant of sdePQ-omsA from this mutant showed sensitivity for disinfectants. It means SdePQ-OmsA is responsible for the disinfectant resistance in the mutant. Whole genome analyses with next-generation sequencing showed some mutations. One of them, two component system cpxA might be related to the sdePQ-omsA expression. Also, we newly identified MipA as a possible resistant factor.

研究分野：微生物学

キーワード：消毒薬 セラチア 多剤耐性 多剤排出ポンプ 馴化

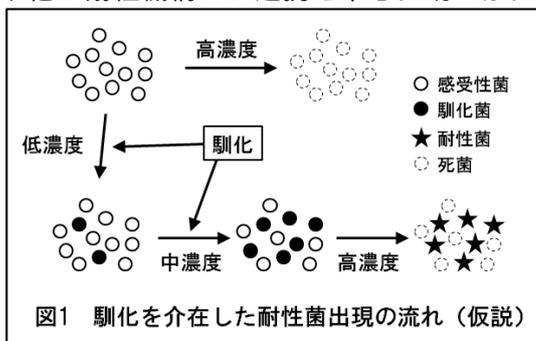
1. 研究開始当初の背景

セラチア・マルセッセンス (*Serratia marcescens*) は、土壌中、水中等の自然界や、台所や洗面台などの水回りにも幅広く分布している。病原性は弱く、健常者に対して感染を起ささない。一方で、がんの末期や重度の免疫不全を抱える患者に対して、菌血症や敗血症を引き起こし重篤な症状をしめす日和見感染菌として知られている。本菌による院内感染は国内外を問わず発生しており、臨床現場において大きな問題となっている。その主な要因として、抗菌薬や消毒薬に対する多剤耐性が挙げられている。

申請者は、本菌を院内感染において特に重要な細菌と考え、多剤耐性機構の全体像を明らかにするために研究を進めてきた。抗菌薬感受性大腸菌に、ゲノム情報から得られた推定多剤排出ポンプ遺伝子を発現させ、その機能を明らかにしてきた。そして現在までに4つの多剤排出ポンプが抗菌薬排出による多剤耐性に関与していることを報告している (J. Antimicrob. Chemother. (2003), Biol. Pharm. Bull. (2007), J. Bacteriol. (2008), Biol. Pharm. Bull. (2008))。またその他に5つの多剤排出ポンプが抗菌薬耐性に関与することを明らかにしている (未発表データ)。これら9つの中には、消毒薬耐性に関与することが示唆されるポンプも含まれていた。

臨床現場においては、本菌が消毒薬の不適切な使用により耐性となることで院内感染を惹起した例が報告されていることから、セラチアの消毒薬耐性機構を明らかにすることは本菌による院内感染を防ぐために重要な情報を提示すると推定した。消毒薬の耐性機構については緑膿菌やリステリア菌において解析が進められているものの、セラチアの消毒薬耐性に関する知見はほとんど報告されていない。さらに消毒薬の場合には他の抗菌薬とは異なり、一足飛びに耐性株とはならないことも知られている。申請者は有効濃度よりも低い濃度の消毒薬に曝され、徐々に抵抗性を示し、最終的に適応して耐性化する「馴化」が、消毒薬耐性に密接に関係していると推定した。馴化は消毒薬耐性の全容解明には避けては通れないテーマである。

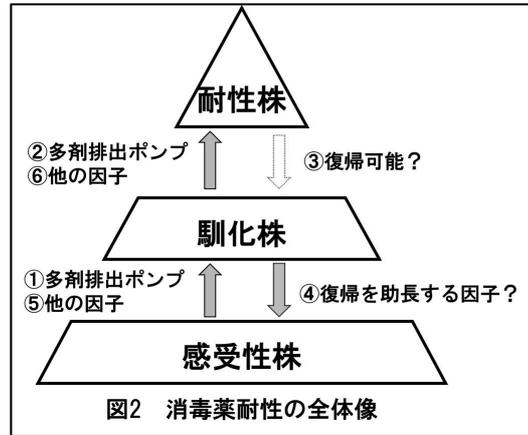
以上のことから申請者は、「馴化機構」を含めたセラチア・マルセッセンスの消毒薬耐性機構の全体像 (図1) を、多剤排出ポンプや他の耐性機構との連携を中心に明らかに



することを目的として研究を進めた。

2. 研究の目的

申請者はセラチア・マルセッセンスの消毒薬耐性機構の全体像 (図2) を明らかにするために、多剤排出ポンプとの関係を重視して、以下のように研究を進める。



- (1) 消毒薬耐性と多剤排出ポンプとの関係性の解明 (図2 および)

宿主大腸菌に対して消毒薬耐性を与えた多剤排出ポンプ遺伝子を、セラチアにおいて破壊する。

セラチア内での消毒薬耐性に関わっている多剤排出ポンプの同定
遺伝子発現を介した多剤排出ポンプ間の連携の存在の有無

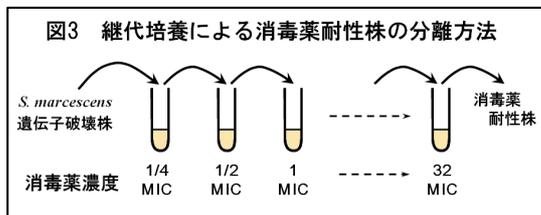
- (2) 遺伝子破壊株からの消毒薬耐性株および馴化株の単離とその性質決定

現在までに最小生育阻止濃度 (以下、MIC) よりも低い濃度の消毒薬 (塩化ベンザルコニウム、クロルヘキシジン、トリクロサン) を添加した液体培地で培養した菌を、2倍ずつ濃度を高めた培地で継代培養を行うことによって最終的に耐性株を得ている。途中過程で得られた株 (馴化株) と合わせて以下の解析を進める。

耐性株・馴化株において他の多剤排出ポンプの発現状態の確認 (図2 及び)
耐性株における変異部位の同定 (図2)
耐性株及び馴化株の感受性株への復帰の有無及びその頻度 (図2 及び)
多剤排出ポンプで説明できない耐性・馴化機構の同定 (脂質組成の変化など) (図2 及び)

3. 研究の方法

- (1) 遺伝子破壊株からの消毒薬耐性変異株及び馴化株の単離



使用した消毒薬は、塩化ベンザルコニウム、クロルヘキシジン、トリクロサンである。耐性株の単離は、親株 (KS24ΔsdeXY) における対象消毒薬の MIC を参考に行った。すなわち、MIC の 1/4 の濃度で培養した親株の菌液の一部を、その 2 倍濃度の消毒薬を含む培地で培養し、さらに 2 倍・・・といった継代培養を行って単離した (図 3)。継代培養の途中段階の株を馴化株とした。

(2) 遺伝子破壊

sdePQ 遺伝子破壊は Datsenko らの λ-Red システムを参考にして行った (Datsenko et al., 2000)。

(3) survival 解析

対象菌株を 37 で対数増殖期中期まで L 培地 (1.0% polypepton, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, pH7.0) で培養した。1 mL を集菌し生理食塩水で洗浄後、1 mL の生理食塩水に再懸濁した。濃度が 512 μg/mL になるようにクロルヘキシジンを加え、25 で 60 分間曝露後、生理食塩水で適宜希釈し、SCDLP 寒天培地 (1.7% casein peptone, 0.3% soybean peptone, 0.5% NaCl, 0.25% K₂HPO₄, 0.25% glucose, 0.1% lecithin, 0.7% polysorbate 80, 1.5% agar) に塗布した。37 で一晩培養した後に出現したコロニー数を数え生存率を評価した。

(4) ゲノム変異解析

クロルヘキシジン耐性株のゲノム DNA の抽出は、以下の方法で行った。L 培地で一晩培養した株を集菌し、570 μL の Lysis buffer (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 50 mM EDTA, pH 8.5) に懸濁した。30 μL の 20% SDS を加え、75 で 10 分処理後、37 でさらに 1 時間処理した。200 μL の 5 M NaCl と、700 μL のクロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) を加え遠心し、上層に等量のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1) を加え、遠心後、上層に再度等量のクロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) を加え、遠心した。上層に等量の 2-プロパノールを加え遠心後、70% エタノールで洗浄し、100 μL の TE buffer に再懸濁した。RNaseA で 30 分処理した後、等量のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1) を加え、遠心し、引き続き上層に等量のクロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) を加え、遠心した。上層に 1/2 倍量の 6 M NH₄OAc と等量の 2-プロパノールを加え遠心後、70% エタノールで洗浄した。生じた沈殿を 25 μL の MilliQ で溶解した。

上記の方法で抽出したゲノム DNA について、次世代シーケンサーを用いて変異解析を

行った。変異解析はタカラバイオ株式会社に依頼した。

(5) 遺伝子クローニング

S. marcescens KS24 株の全塩基配列 (Iguchi et al., 2014) を基に、目的の遺伝子を PCR 法によりクローニングした。

4. 研究成果

(1) 耐性株の分離及びそれらの性質解析

本研究開始以前に、S. marcescens の SdeXY が本菌の消毒薬耐性に大きく関与していることを突きとめていた (論文作成中)。この際に構築したのが sdeXY 破壊株である (KS24ΔsdeXY)。本研究では、S. marcescens の消毒薬耐性の全貌を明らかにすることを目的としているので、SdeXY 以外の耐性機構を明らかにすることを第一の目的とし、解析を進めた。そのために行った実験が、継代培養による消毒薬耐性株の分離とそれらの株の徹底した性質解析である。

耐性株の分離実験の結果、塩化ベンザルコニウムでは MIC が 64 μg/mL (親株の MIC の 32 倍)、トリクロサンでは 256 μg/mL (親株の MIC の 8 倍)、クロルヘキシジンでは 512 μg/mL (親株の MIC の 128 倍) まで耐性度が上昇した株を最終的に得ることができた。またこうして得られた株に対して種々の抗菌薬の耐性度を調べたところ、消毒薬だけでなく抗菌薬や抗菌活性を持つ色素などにも耐性を示した (表 1)。

Antimicrobial agent	MIC (μg/ml)						
	KS24ΔsdeXY (親株)	BC1	BC2	CHX1	CHX2	TRI1	TRI2
Benzalkonium-Cl	2	64	128	16	16	16	16
Chlorhexidine	4	64	64	256	128	16	16
Triclosan	32	>512	512	256	128	>512	>512
Norfloxacin	1	16	16	16	16	16	16
Erythromycin	4	256	256	256	256	128	128
Tetracycline	1	8	8	8	8	8	8
Acriflavine	16	128	128	128	128	64	64
Rhodamine 6G	4	1024	512	512	512	512	512
Ethidium-Br	2	512	512	512	512	128	256

これらの 6 株の解析をさらに進めた。化学構造的に類似性が低く、作用点が異なる抗菌性物質に同時に耐性になるという性質は、一つの輸送タンパク質で複数種の物質を細胞外に排出できる能力を持つ RND (Resistance Nodulation cell Division) 型多剤排出ポンプの関与が大きいと考えられた。以前申請者らの研究室では、S. marcescens のゲノム上で推定される RND 型多剤排出ポンプ遺伝子をクローニングし、抗菌薬高度感受性大腸菌において発現させ、その性質を解析している。その結果と表 1 に示す耐性パターン (どの抗菌薬に耐性となりどの抗菌薬に耐性とならないか) を比較したところ、SdePQ-OmsA と名付けたものの関与が最も高いと考えら

れた。RT-PCR 法によって遺伝子発現状況を調べたところ、

親株では全く発現していなかったものが、耐性株 6 株すべてにおいて *sdeP*, *sdeQ*, *omsA* いずれの発現も上昇していた。そこですべての株において *sdePQ* 遺伝子の破壊株を作成した。

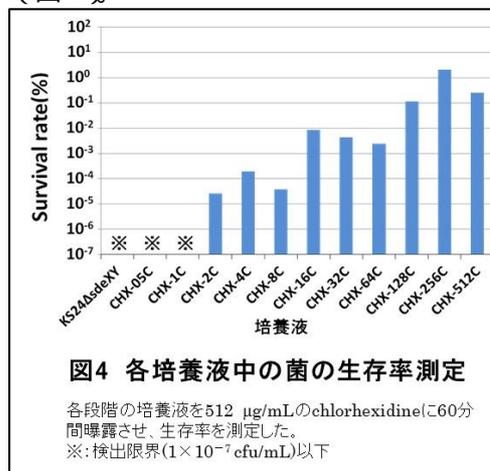
塩化ベンザルコニウムおよびクロルヘキシジン耐性株からの *sdePQ* 破壊株では、4 株いずれにおいても調べたすべての消毒薬・抗菌薬の MIC が親株 (KS24Δ*sdeXY*) と同程度にまで低下していた。以上のことからこれら 4 株の消毒薬・抗菌薬耐性は、RND 型多剤排出ポンプ *SdePQ-OmsA* の発現上昇によるものであることが示された。一方、トリクロサン耐性株からの *sdePQ* 破壊株では、トリクロサン以外の消毒薬および抗菌薬耐性は親株程度にまで低下したが、トリクロサンについては耐性を維持したままだった。トリクロサン耐性株については、馴化の過程でトリクロサン特有の耐性因子に何らかの変化があったと推察される。

多剤排出ポンプの発現上昇が起こっている理由として、*sdePQ-omsA* の構造遺伝子もしくはプロモーター領域の変異が考えられた。しかしいずれでもそのような変異は見いだせなかった。

(2) 馴化株の性質解析

ここまでは、3 種類の消毒薬について解析を進めてきた。しかし馴化株 (耐性株を得る途中段階で得た株) の解析では、膨大な数の株を対象とすることとなり、煩雑である。そこで臨床現場でもよく利用されているクロルヘキシジンに対象を絞り解析を進めた。

馴化株について最初にクロルヘキシジンに対する耐性度を各段階で調べた。消毒薬に対する耐性度の評価はこれまで MIC の測定を行ってきた。しかし実験がやや煩雑ではあるが、実際に臨床現場で用いている消毒薬の濃度に曝露した場合にどのくらい生き残ることができるかを調べる方がよい。その結果、馴化の過程が進んでいくにつれて、生存率が高い集団となることが明らかとなった (図 4)。



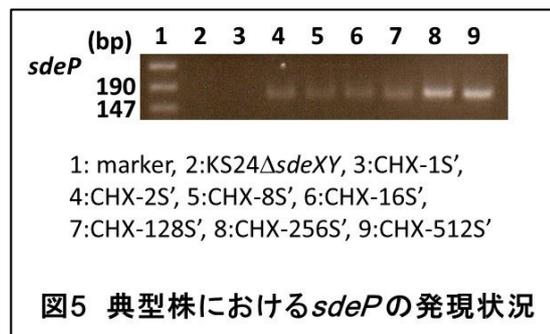
さらに、各段階の培養液からそれぞれ 10 株ずつ単離してその性質を比較したところ、各段階の培養液には、耐性度の高いものと低いものが混在していることがわかった。そこで各段階の培養液から最も比率が多かった株を「典型株」として選択し、解析を進めた。

典型株における各種消毒薬・抗菌薬の MIC を測定したところ、2 μg/mL, 16 μg/mL, 256 μg/mL のクロルヘキシジンを含む培地で培養した段階で、MIC の明らかな上昇が見られた(表 2、CHX-2S', CHX-16S', CHX-256S')。2 μg/mL と 256 μg/mL では複数の消毒薬・抗菌薬の MIC が上昇しているが、16 μg/mL では、クロルヘキシジンの MIC のみが上昇していた。

Anti-microbial Agent	MIC (μg/mL)								
	KS24 Δ <i>sdeXY</i>	CHX -1S'	CHX -2S'	CHX -8S'	CHX -16S'	CHX -128S'	CHX -256S'	CHX -512S'	
CHX	4	4	32	32	128	128	256	256	
BC	2	2	8	8	8	8	16	16	
TRI	64	64	>512	>512	>512	>512	>512	>512	
NFLX	0.5	0.5	8	8	8	8	16	16	
EM	2	2	128	128	128	128	256	256	
R6G	8	8	512	512	512	512	512	512	
EtBr	4	4	256	256	256	256	512	512	

CHX:Chlorhexidine, BC:Benzalkonium chloride, TRI:Triclosan, NFLX:Norfloxacin, EM:Erythromycin, R6G:Rhodamine 6G, EtBr:Ethidium Bromide

また *sdeP* の発現を調べたところ、CHX-2S' ではそれ以前は発現されていなかったのに対して、明らかに発現するようになっていた (図 5)。この発現は CHX-256S' ではさらに上昇していた。このことは *sdePQ-omsA* の発現上昇は少なくとも 2 段階で起こっていることがわかった。



以上のことから、クロルヘキシジンへの耐性化は、少なくとも 3 段階で起こっており、そのうちの 2 回は多剤排出ポンプ *SdePQ-OmsA* の発現上昇を引き起こす変異であることが示された。

(3) ゲノム変異解析

継代培養の最終段階、すなわち 512 μg/mL のクロルヘキシジンを含む培地で得られた株 10 株について *sdePQ-omsA* のプロモーター領域の塩基配列を調べたところ、すべてにおいて変異は認められなかった。また、*sdePQ-omsA* の発現を制御する local

regulator が存在する可能性を考えたが、*S. marcescens* KS24 のゲノム配列からは *sdePQ-omsA* の直前、直後の遺伝子は regulator をコードする遺伝子ではなかった。そこでゲノム変異解析によりその変異箇所を調査した。

S. marcescens KS24 の全ゲノム配列と比較した結果、378ヶ所で違いが見られた。このうち、実際に変異が入っている可能性が特に高いと考えられた 31ヶ所について、耐性株と *KS24ΔsdeXY* のシーケンス解析を行った。その結果、耐性株において変異している箇所が 4ヶ所認められた(表 3)。

遺伝子名	塩基変化	アミノ酸変化	推定機能
<i>cpxA</i>	G→A	グリシン→バリン	two component system sensor kinase
<i>ykgC</i>	A→C	アラニン→バリン	pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase
<i>mipA</i>	C欠損	105番目で stop codon	MitA interacting protein
<i>tetR</i>	C→T	グリシン→セリン	regulatory protein

以上の変異が馴化のどの過程で起こったのかを確認するために、途中段階で得た各馴化株における塩基配列を調べた。2 μg/mL クロルヘキシジン培養時に得られた株では、*cpxA* と *ykgC* に変異が見られた。16 μg/mL クロルヘキシジン培養時に得られた株では、*mipA* に変異が見られた。しかし *tetR* の変異は、256 μg/mL ではなく 512 μg/mL クロルヘキシジン培養時に得られた株で認められた。

(4) 候補遺伝子のクローニングと解析

これら 4 つの候補遺伝子が実際にクロルヘキシジン耐性に関与しているかどうかを調べるために、KS24 株および耐性変異株を用いて、野生型および変異型の候補遺伝子のクローニングを行った。そして変異が起こる直前および直後の株にそれぞれの遺伝子を形質転換により導入し、その影響を解析した。

cpxA

cpxA に変異をもつ 2 株に野生型の *cpxA* を導入したところ、クロルヘキシジンの MIC が 1/4 となり感受性化した。しかし、変異型の *cpxA* を導入しても変化は見られなかった。このことから、*cpxA* が変異することでクロルヘキシジンに対して耐性化していることが強く示唆された。

一方 *cpxA* に変異のない 2 株に変異型の *cpxA* を導入したところ、色素系抗菌物質である Rhodamine 6G の MIC が上昇する傾向がみられた。しかし Rhodamine 6G の MIC にしか変化がないことから、*sdePQ-omsA* の発現量に変化が起きているわけではなく、変異型 *cpxA* が発現すると、Rhodamine 6G を基質とする *SdePQ-OmsA* 以外の排出ポンプの発現が上昇する可能性が示唆された。

ykgC

ykgC に変異をもつ 2 株に野生型の *ykgC* を導入したが、いずれの消毒薬・抗菌薬の MIC も変化しなかった。また、変異型の *ykgC* を導入しても変化は見られなかった。一方 *ykgC* に変異のない 2 株に変異型の *ykgC* を導入しても何も変化は見られなかった。このことから、*ykgC* はクロルヘキシジン耐性に対して関係があるとは言えなかった。

mipA

mipA に変異のある 2 株に野生型の *mipA* を導入したところ、クロルヘキシジンの MIC が 1/8 に低下した。さらにクロルヘキシジン曝露時の生存率を調べたところ、野生型の *mipA* を導入した株では生存率が大きく減少し、変異型の *mipA* を導入しても変化はみられなかった(図 6)。これらの結果から、*MipA* が CHX 単剤に対する耐性因子である可能性が示唆された。

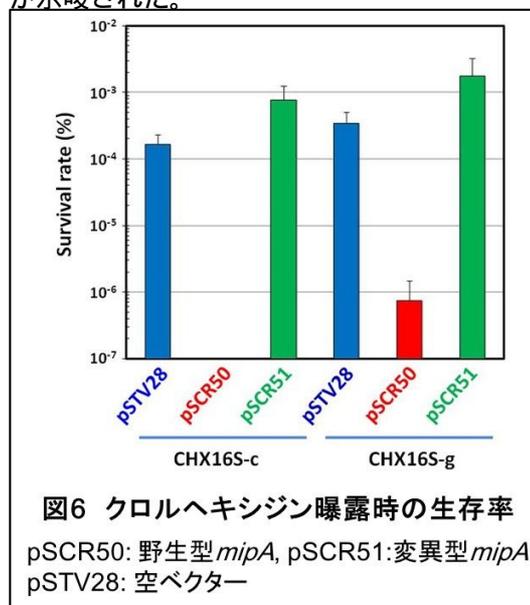


図6 クロルヘキシジン曝露時の生存率

pSCR50: 野生型 *mipA*, pSCR51: 変異型 *mipA*
pSTV28: 空ベクター

tetR

tetR に変異のある 2 株に野生型の *tetR* を導入したところ、クロルヘキシジン及びトリクロサンの MIC がそれぞれ 1/4-1/32, 1/16 に低下した。一方、これらの株に変異型の *tetR* を導入した株ではトリクロサンの MIC のみ低下がみられた。さらにクロルヘキシジン曝露時の生存率を調べたところ、野生型 *tetR* を導入すると生存率が大きく低下するが、変異型 *tetR* を導入した場合でも生存率が低下する傾向がみられた。

以上の結果より、消毒薬耐性において *SdePQ-OmsA* を新たな消毒薬耐性因子として同定することができた。また、その発現調節には 2 成分制御系である *CpxA* の関与が強く示唆された。さらに現在までほとんど機能が明らかになっていない *MipA* やリプレッサーであることが予想される *TetR* がクロルヘキシジン耐性に深く関与していることが示唆された。これらの因子はセラチアにおいて

消毒薬耐性因子として報告はされておらず、セラチアの消毒薬耐性の全貌を明らかにする一助になると期待できる。
研究開始時の目的のうち、「セラチア内での消毒薬耐性に関わっている多剤排出ポンプの同定」「耐性株・馴化株において他の多剤排出ポンプの発現状態の確認」「耐性株における変異部位の同定」「多剤排出ポンプで説明できない耐性・馴化機構の同定」の4点については大部分において目的を達成できた。また予想外の遺伝子も同定できた。この予想外の因子の解析の重要性が高かったこともあり、いくつかの目的は達成できなかった。今後、上記の点と合わせて研究を展開していく予定である。

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4件)

芳賀仁美、峠雄太、朝熊弘樹、小川和加野、後藤直正、土屋友房、黒田照夫 *Serratia marcescens* の消毒薬クロルヘキシジンに対する耐性機構の解析、第24回微生物シンポジウム、2012/9/3-2012/9/4、大阪

峠雄太、小川和加野、土屋友房、後藤直正、黒田照夫 *Serratia marcescens* における新規消毒薬耐性因子の解析、第86回日本細菌学会総会、2013/3/18-2013/3/20、千葉

黒田照夫、小川和加野 多剤耐性菌はどのようにして出現するのか?、日本薬学会第133年会(一般シンポジウム)、2013/3/28-2013/3/30、横浜

峠雄太、小川和加野、土屋友房、後藤直正、黒田照夫 *Serratia marcescens* における消毒薬耐性機構の解析、第67回日本細菌学会中国・四国支部総会、2014/10/4-2014/10/5、徳島

6. 研究組織

(1)研究代表者

黒田 照夫 (KURODA TERUO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：80304327