

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月3日現在

機関番号：16101
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22592040
 研究課題名（和文） ペグを用いたバイオフィルムの抗菌薬抵抗性遺伝子の探索
 研究課題名（英文） The screening for antibiotic tolerance related genes in peg-biofilm cells of *Pseudomonas aeruginosa*
 研究代表者
 三宅 洋一郎 (MIYAKE YOICHIRO)
 徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授
 研究者番号：80136093

研究成果の概要（和文）：細菌は、しばしばヒトの生体内で、バイオフィルムと呼ばれる“細菌の巣”を形成し、慢性の感染症を引き起こし、適切な抗菌薬を使用しても、十分な殺菌効果を得ることは困難である。この理由は、不明な点が多いため、本研究では、このメカニズムを明らかにすることを目的として、関与する遺伝子の網羅的な探索を行い、その結果、8個の遺伝子が関与することが見いだされた。これらの遺伝子は、新たな抗菌薬のターゲットになり得る可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Biofilm bacteria are reported to be tolerant to antibiotics compared to planktonic bacteria. We tried the transposon screening to look for the antibiotic tolerance related genes with biofilm cells. Our results showed that 8 genes for biofilm cells play an important role in antibiotic tolerance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
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：歯学・形態形基礎歯学

キーワード：緑膿菌、抗菌薬抵抗性、バイオフィルム、

1. 研究開始当初の背景

感染症の治療において、MIC（最小発育阻止濃度）を基準に適切な抗菌薬を使用したにも関わらず、十分な効果を得る事が出来ず、慢性化してしまう症例がしばしば問題となり、特にバイオフィルム感染症はその典型例として知られている。特に、生体内に留置され

る義歯、カテーテルやコンタクトレンズなど人工医用材料には、バイオフィルムが形成されやすく、完全な除菌が時として困難となる(C. A. Fux, P.S. Stewart, Trends in Microbiol. 13, 34-40, 2005)。このような現象は、薬剤耐性 (antibiotic resistance) では説明できず、抗菌薬抵抗性 (antibiotic tolerance) による

ものであると考えられている。抗菌薬抵抗性に関して、その現象については 1944 年に既に報告されているものの (Bigger, J. W. Lancet, 11, 495-500)、メカニズムについてはまだほとんど明らかにされていない。

我々はこれまでに、浮遊菌においても定常期の細菌では、抗菌薬抵抗性を獲得している事を明らかにし、この抵抗性には、sigma factor である *rpoS*, *rpoN* 遺伝子や、Quorum sensing 機構, *tcp* 遺伝子などが関与している事を報告してきた。

また、バイオフィーム形成以前の付着菌も抵抗性を獲得しており、バイオフィーム形成に関与する *psl* 遺伝子が、付着菌での抗菌薬抵抗性に関与している事も見出した。

2. 研究の目的

バイオフィーム感染症は慢性化しやすく難治性である事が知られており、その原因は抗菌薬耐性ではなく、抵抗性であると考えられている。この抗菌薬抵抗性のメカニズムを明らかにするために、バイオフィーム形成菌での抗菌薬抵抗性に関与する遺伝子を見出す事を本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 使用菌株と抗菌薬

緑膿菌 PA01 株を親株として、トランスポゾン保有プラスミド、pUT mini-Tn5 Pro を有する *E. coli* S17-1 λ -*pir* とで接合伝達を行い、PA01 株由来トランスポゾン挿入変異株を作製した。また、抗菌薬として、カルバペネム系抗菌薬の 1 つである biapenem (BIPM) を使用した。

(2) バイオフィーム形成菌における抵抗性変異株のスクリーニング

本研究では、Innovotech 社の MBEC P&G assay と呼ばれるペグバイオフィームシステムを用いてスクリーニングを行った。96 穴平底マイクロプレートに、LB broth を各ウェル 150 μ l ずつ加え、一晚培養した菌液を 1.5 μ l 接種し、Peg-Biofilm plate のペグ付の蓋をして 37°C で 24 時間培養し、ペグ表面にバイオフィームを形成させた。その後、新しい 96 穴平底マイクロプレートに生理食塩水

のみと BIPM (32 μ g/ml) を含む生理食塩水それぞれ 150 μ l ずつ分けて分注し、ペグ付の蓋を移し替え 37°C で 6 時間作用後、BIPM を除去するために生理食塩水を 150 μ l ずつ加えた新しい 96 穴平底マイクロプレートに移した。その後、再び生理食塩水を 150 μ l ずつ加えた新しい 96 穴平底マイクロプレートに移し、超音波処理を行いペグからバイオフィームを剥がし均一な菌液とし、プレートに塗布し 37°C 24 時間培養、コロニー形性能 (CFU) を測定した。

(3) トランスポゾン挿入部位の決定

37°C で一晚培養した菌液からゲノム DNA を抽出した。そして、抽出した DNA を *Nco* I (New England Biolabs) で切断し、T4 DNA Ligase (New England Biolabs) で self-ligation を行った。self-ligation により得られた環状 DNA を、*E. coli* JM109 λ -*pir* にエレクトロポレーション (GENE PULSER II (BioRad)) により形質転換を行った。得られた Gm 耐性のトランスコンジュガントのプラスミド DNA を抽出し、サイクルシークエンスにより、トランスポゾン挿入領域の塩基配列を決定し、Pseudomonas Genome Database V2 を基にデータベース解析を行い、トランスポゾン挿入部位の遺伝子を決定した。

(4) 付着菌における抵抗性の測定

37°C で対数増殖中期になるまで培養し、生理食塩水で希釈した菌液を、96 穴平底細胞培養用マイクロプレート (FALCON) に 50 μ l ずつ分注後、1800 rpm で 20 分間遠心し、37°C で 1 時間静置した。その後、アスピレーターで上清を吸引除去し、事前に調整した BIPM 連続希釈液を、各ウェルに 100 μ l ずつ分注し、37°C で 20~24 時間培養して付着菌における最小発育阻止濃度 (MIC^{AD}) を判定した。その後、菌の増殖が認められないウェルの上清をアスピレーターで吸引除去し、200 μ l の抗菌薬を含まない LB broth に交換し、37°C で 20~24 時間培養して、付着菌における最小発育阻止濃度 (MBC^{AD}) を判定した。

(5) 浮遊菌での抵抗性の測定

LB broth にて菌株を 37°C 一夜培養し、3000 rpm、15 分間遠心し新しい培地に交換し、BIPM

(32 $\mu\text{g/ml}$) を加え経時的に CFU を測定した。

4. 研究成果

(1) バイオフィーム形成菌における抵抗性変異株のスクリーニング

約 7000 株の Tn 挿入変異株についてスクリーニングを行い、バイオフィーム形性能が親株と同等であるにも関わらず、BIPM 作用後の生菌数が親株に比べ 10 分の 1 以上、大きく低下していた株が 10 株見いだされた。

(2) トランスポゾン挿入部位の決定

10 株の中で 2 株は同じ遺伝子内に Tn が挿入されていたため、合計 8 個の遺伝子が、バイオフィーム形成菌における抗菌薬抵抗性に関与していることが明らかとなった。8 個の遺伝子の中で、まだ機能が明らかにされていないものが多かったが、2 成分制御系に関連するものが 2 個と、代謝に関連するものが 1 個見出された。

(3) 付着菌、浮遊菌における抵抗性の測定

バイオフィーム形性能での抵抗性が減少していた 8 株について、付着菌と浮遊菌での抵抗性について検討したところ、BIPM に対する感受性、つまり MIC が変化した株は無かった。親株では、付着菌の MBC (MBC^{AD}) は、付着菌の MIC (MIC^{AD}) と比較し、64 倍と高い値を示し、抗菌薬に対し抵抗性を獲得している。8 株のトランスポゾン変異株の中で、 MBC^{AD} が MIC^{AD} の 8 倍、16 倍とやや抵抗性が減少している株が 2 株存在していた。また、浮遊菌での抵抗性について、親株と比べ、大きく低下していた株は認められなかった。

(4) 考察

緑膿菌は、ヒトの体内に留置されたメディカルデバイスや、気管、褥創部などの皮膚にバイオフィームを形成し、慢性で、難治性の感染症を引き起こすことで、臨床上非常に問題となる。バイオフィーム形成菌は、殺菌的な抗菌薬を使用しても除菌することが非常に困難であることが知られているものの、そのメカニズムについてはほとんど明らかにされていない。

本実験の結果より、2 成分制御系などの 8 個の遺伝子が、バイオフィーム形成菌での抵抗性に関与することが明らかとなった。これらの遺伝子は、浮遊菌や、付着菌での抵抗性にはあまり関与していなかった。

このことは、細菌のライフサイクルの中で、浮遊状態から、固層表面に付着し、マイクロコロニーを形成し、バイオフィームを形成、成熟させていく過程において、抗菌薬抵抗性とは、ある 1 つのメカニズムにより制御されているわけではなく、それぞれの段階で、様々な制御を受けながら、細菌が生き残っている可能性が強く示唆された。その中で、バイオフィーム形成菌では、その形成過程において、何らかの環境変動や環境シグナルを 2 成分制御系で感知し、抗菌薬に対して抵抗性を獲得した状態に移行していくものと推測される。

今後これらの遺伝子に対する薬剤をスクリーニングすることにより、バイオフィーム内の細菌の抵抗性を阻害することが出来れば、より効果的な除菌治療を行うことが出来る可能性が考えられる。

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)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 村上圭史、緑膿菌における付着及びバイオフィーム形成菌の抗菌薬抵抗性遺伝子のスクリーニング、第 60 回日本化学療法学会西日本支部総会、2012 年 11 月 5 日、アクロス福岡 (福岡市)
- ② 村上圭史、付着およびバイオフィーム形成緑膿菌の抗菌薬抵抗性関連遺伝子の探索、第 26 回 Bacterial Adherence & Biofilm 学術集会、2012 年 7 月 13 日、大阪ガーデンパレス (大阪市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三宅 洋一郎 (MIYAKE YOICHIRO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：80130693

(2)研究分担者

弘田 克彦 (HIROTA KATSUHIKO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・准教授

研究者番号：60199130

根本 謙 (NEMOTO KEN)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教

研究者番号：10218274

村上 圭史 (MURAKAMI KEIJI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教

研究者番号：10335804

小野 恒子 (ONO TSUNEKO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・教授

研究者番号：40035514

(3)連携研究者

()

研究者番号：