

## 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5月24日現在

機関番号：15301  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2011 ～ 2012  
 課題番号：23659759  
 研究課題名（和文） 多剤耐性アシネトバクター対策としての抗バイオフィルム剤探索とその基盤技術の開発  
 研究課題名（英文） Development of novel methods for identifying antibiofilm agents against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*  
 研究代表者  
 公文 裕巳（KUMON HIROMI）  
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
 研究者番号：30144760

## 研究成果の概要（和文）：

多剤耐性アシネトバクターに対する院内感染対策は喫緊の課題となっている。本研究では *Acinetobacter baumannii* を対象として新規の抗バイオフィルム剤を探索することにより、本感染症に対する予防法・治療法の確立を目指した。リアルタイムイメージングによる新規実験モデル系を確立するためには更なる基盤研究を必要とするが、バイオフィルム形成阻害効果を示す抗菌薬、各種抗菌薬の抗菌活性を増強するクオラムセンシング阻害剤を見出した。

## 研究成果の概要（英文）：

*Acinetobacter baumannii* is an increasingly important nosocomial pathogen that causes a broad array of infections, particularly in hospitalized patients. This study was aimed at establishing new strategies for prevention and therapy of multidrug-resistant *A. baumannii* biofilms. By using *in vitro* and *in vivo* models, we found possible therapeutic approaches for treating biofilm infections caused by multidrug-resistant *A. baumannii*. Further studies were needed to establish novel models by using real-time imaging.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：細菌、感染症、アシネトバクター、多剤耐性菌、アウトブレイク、  
 バイオフィルム、抗バイオフィルム剤、新規治療法

## 1. 研究開始当初の背景

近年、多剤耐性アシネトバクターによる院内感染事例が我が国でも散発的に発生し、2010年9月には大学病院での事例が各種報道において大きく取り上げられた。多剤耐

性アシネトバクターに対する院内感染対策は喫緊の課題となり、2010年10月21日には、感染症関連の四学会（日本感染症学会、日本化学療法学会、日本環境感染学会、日本臨床微生物学会）が、我が国における多

剤耐性アシネトバクター感染症の感染拡大防止、適正な診断と治療を促進することを目的に、現時点における問題点、将来に向けた改善点を提言した。そのなかに、新しい治療薬の研究開発を促進する仕組み作りの必要性も盛り込まれた。

1980年代後半以降のMRSAに始まるいわゆる‘細菌の逆襲’の前に新規抗菌薬の開発は低迷を続けており、新しい耐性菌対策には従来と全く異なる治療戦略の開発が求められている。今日の高度化した医療現場には多剤耐性アシネトバクター感染が致死的となる患者が少なくなく、このような弱毒耐性菌に対する予防法・治療法の開発の意義は大きい。特に、クオラムセンシング(QS:細胞密度依存的)機構に基づく抗バイオフィーム剤は単に革新的であるだけでなく、作用機序の異なる従来の抗菌薬との併用での相乗効果も期待される。多剤耐性アシネトバクター感染症対策のみならず、今世紀の抗菌化学療法開発における最大のブレークスルーになる可能性が高い。

## 2. 研究の目的

本研究では *Acinetobacter baumannii* を対象として新規の抗バイオフィーム剤を探索することにより、本感染症に対する予防法・治療法の確立を目指す。具体的には、リアルタイムイメージング(タイムラプス)を実現する *in vitro* および *in vivo* バイオフィーム実験モデル系を確立し、緑膿菌クオラムセンシング機構の阻害剤として見出された化合物(QS阻害剤: N-acylhomoserine lactone 類似化合物) および新しいコンセプトにより合成された化合物(抗菌活性をもつQS阻害剤)の効果とその効果増強法について探索する。

## 3. 研究の方法

### (1) 菌株

施設 A で分離された *A. baumannii* 29 株(主にアウトブレイク株、多剤耐性株は 24 株) 1 症例 1 株ならびに比較対象としてアウトブレイクが未確認の施設 B で分離された *A. baumannii* 25 株(主に尿路由来株、非多剤耐性株) 1 症例 1 株を用いた。*A. baumannii* の菌種同定は、PCR 法にて *bla*<sub>OXA-51-like</sub> 遺伝子

の存在を確認した。

### (2) 薬剤感受性試験

Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) に準じた微量液体希釈法により各種抗菌薬の MIC (最小発育阻止濃度) を測定した。MIC の測定に供した抗菌薬は、ピアペネム (BIPM)、ピペラシリン (PIPC)、タゾバクタム/ピペラシリン (TAZ/PIPC)、コリスチンメタンスルホン酸ナトリウム (CMS)、ホスホマイシン (FOM)、レボフロキサシン (LVFX)、シタフロキサシン (STFX) であり、QS 阻害剤は QSI-1 を供した。

### (3) バイオフィームアッセイ (静置法)

96 穴ポリスチレンマイクロプレートを用い、供試菌を人工尿およびトリプトソイブイオン (TSB) 培地中、37°C で静置培養した。24 および 48 時間後に形成されたバイオフィームをクリスタルバイオレットで染色、そのエタノール溶出液の OD<sub>570</sub> 値を測定し、3 穴の平均値をバイオフィーム形成能とした。

### (4) バイオフィームアッセイ (振盪法)

ペグ (細い短棒) 付 96 穴ポリスチレンマイクロプレート (MBEC assay™ for physiology & genetics, Innovotech 社) を用い、37°C で振盪培養 (50 rpm) した。使用培地、ペグに形成されたバイオフィームの染色は静置法と同様に行った。

### (5) *in vitro* バイオフィーム実験モデル系 (フローセルシステム)

複数チャンネルのフローセル (bio 観る®) に一夜培養の菌株を接種して、37°C、2 時間放置したのち、20 mL/hr で培地を灌流させた。培地は人工尿および TSB (1/10 に希釈) を用いた。48 時間後に形成されたバイオフィームを蛍光染色キット (Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kits: Molecular Probes 社) により生菌 (緑色) と死菌 (赤色) に染め分け、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM: Zeiss LSM 510) で観察した。画像解析 (3 次元画像構築) には、Imaris (Bitplane 社) および MetaMorph (Molecular Devices 社) を用いた。

### (6) *in vivo* 実験モデル系 (マウス大腿部感染モデルでの治療実験)

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、5~7 週齢)

の左大腿部に *A. baumannii* FUA-2 株を  $10^6$  CFU/0.1mL の菌量で接種した。感染 2 時間後より各種抗菌薬をマウス背部皮下に 2 時間毎 4 回投与した。QSI-1 (50 mg/kg) は腹腔内に 2 回 (感染 2 および 6 時間後) 併用投与した。生菌数測定は感染 10 時間後に実施した。

#### (7) 自己発光株の作製

グラム陰性菌用に開発された *lux CDABE* (*Photobacterium luminescens*) 発光遺伝子オペロンをコードしているベクター pXen13 を Caliper Life Sciences/Xenogen 社から購入し、アシネトバクテリア用シャトルベクター pMU125 に挿入した。pMU125 は Luis A. Actis 教授 (Miami University, Ohio, USA) から譲受を受けた。(Dorsey CW, Tomaras AP, Actis LA: Genetic and phenotypic analysis of *Acinetobacter baumannii* insertion derivatives generated with a transposome system. Appl. Environ. Microbiol. 68: 6353-6360, 2002)

#### 4. 研究成果

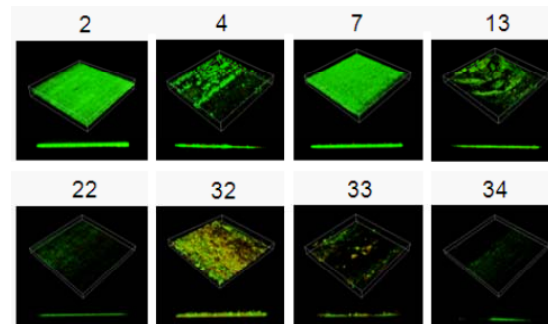
##### (1) *A. baumannii* のバイオフィーム形成能

施設 A と施設 B で分離された *A. baumannii* のバイオフィーム形成能は、培地別・方法別の 4 群に分類して比較検討した。24 時間後と 48 時間後のバイオフィーム形成能 (平均 OD<sub>570</sub> 値 ± 標準誤差) は、施設 A では、人工尿静置法 ( $0.07 \pm 0.01$ ,  $0.12 \pm 0.01$ )、TSB 静置法 ( $0.12 \pm 0.02$ ,  $0.18 \pm 0.01$ )、人工尿振盪法 ( $0.66 \pm 0.05$ ,  $1.12 \pm 0.09$ )、TSB 振盪法 ( $1.18 \pm 0.10$ ,  $1.57 \pm 0.10$ )、施設 B では、人工尿静置法 ( $0.28 \pm 0.04$ ,  $0.32 \pm 0.05$ )、TSB 静置法 ( $0.47 \pm 0.06$ ,  $0.50 \pm 0.09$ )、人工尿振盪法 ( $0.54 \pm 0.05$ ,  $0.85 \pm 0.07$ )、TSB 振盪法 ( $0.93 \pm 0.14$ ,  $1.42 \pm 0.15$ ) であった。全ての群で、24 時間後に比較して 48 時間後では高いバイオフィーム形成能を示した。

施設 A 株のバイオフィーム形成能は、培地の比較では TSB が人工尿より有意に高く、方法の比較では振盪法が静置法より有意に高かった。施設 B 株のバイオフィーム形成能は、施設 A 株と同様の傾向を認めたが、施設間比較において静置法が有意に高く、振盪法は低かった。

##### (2) フローセルシステムにおける多剤耐性 *A. baumannii* のバイオフィーム形成能

人工尿および TSB (1/10 に希釈) の 48 時間灌流で、多剤耐性 *A. baumannii* 8 株がフローセル (bio 観る®) に形成したバイオフィームの形状は多様であり、その厚さは、人工尿の灌流で  $7.6 \sim 84.0 \mu\text{m}$ 、TSB (1/10 に希釈) の灌流で  $16.5 \sim 53.4 \mu\text{m}$  であった。人工尿の灌流で、密度の高い均質なバイオフィームを形成する株が 2 株 (FUA-2 株および FUA-7 株) あり、その厚さは  $53 \mu\text{m}$  と  $44 \mu\text{m}$  であった (下図)。



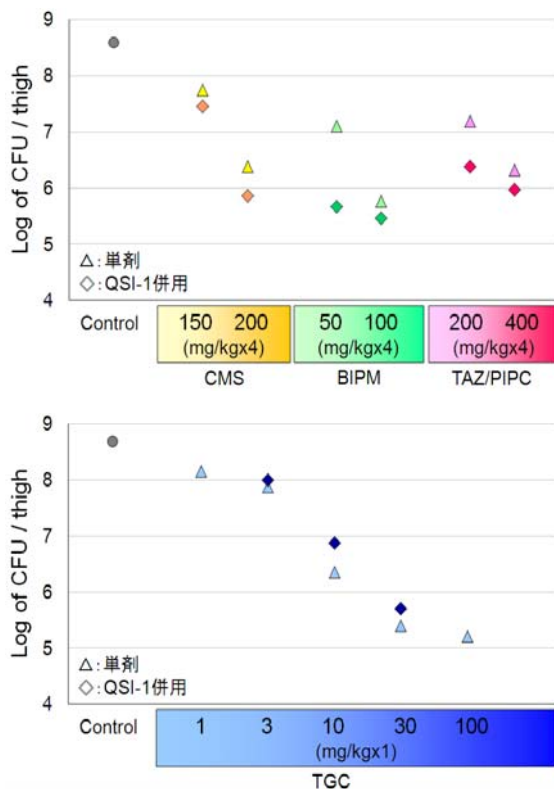
##### (3) 多剤耐性 *A. baumannii* バイオフィームに対する抗菌薬と QS 阻害剤 (単剤・併用) の効果 - フローセルシステムでの評価 -

*A. baumannii* FUA-2 株を用いて、各種抗菌薬と QSI-1 (単剤・併用) のバイオフィーム形成と剥離に及ぼす効果をフローセルシステムに人工尿を灌流させて評価した。*A. baumannii* FUA-2 株に対する LVFX, FOM, CMS, QSI-1 の MIC は、それぞれ 4, 128, 0.5, 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった。LVFX (3 x, 5 x, 10 x MIC), FOM (1 x, 3 x MIC), CMS (1 x, 2x MIC), QSI-1 (1 x, 2 x MIC) を 48 時間あるいは 72 時間作用させると FOM のバイオフィーム形成抑制効果が顕著であった。また、FOM は形成されたバイオフィームを剥離する効果も示した。LVFX と CMS もバイオフィーム形成抑制効果を示し、LVFX と FOM との併用効果は顕著であった。しかしながら、QSI-1 はバイオフィーム形成の促進効果を示し、抗菌薬との併用でも同様であった。

##### (4) 多剤耐性 *A. baumannii* に対する抗菌薬と QS 阻害剤 (単剤・併用) の効果 - マウス大腿部感染モデルでの治療実験 -

*A. baumannii* FUA-2 株によるマウス大腿部

感染モデルに対する各種抗菌薬と QSI-1 (単剤・併用) の治療効果を評価した。 *A. baumannii* FUA-2 株に対する CMS, BIPM, PIPC, TAZ/PIPC, FOM, LVFX, STFX, QSI-1 の MIC は、それぞれ 0.5, 8, >64, 32, 64, 4, 0.25, 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった。各種抗菌薬: CMS (100, 150, 200  $\text{mg}/\text{kg}$  x 4回), BIPM (10, 50, 100, 200  $\text{mg}/\text{kg}$  x 4回), TAZ/PIPC (25, 100, 200, 400  $\text{mg}/\text{kg}$  x 4回), LVFX (0.3, 3, 10, 30  $\text{mg}/\text{kg}$  x 4回), STFX (0.3, 3, 10, 30  $\text{mg}/\text{kg}$  x 4回), FOM (25, 100, 300  $\text{mg}/\text{kg}$  x 4回) の単剤および QSI-1 との併用による治療実験を行った。その結果、感染 10 時間後の生菌数測定において、QSI-1 は BIPM, TAZ/PIPC, CMS の抗菌活性を増強した。(下図)。また、QSI-1 は LVFX, FOM の抗菌活性も若干増強した。追加実験として、チゲサイクリン (TGC) の単剤 (1, 3, 10, 30, 100  $\text{mg}/\text{kg}$  x 1回) および QSI-1 との併用による治療実験を行った結果、QSI-1 は TGC の抗菌活性を若干低下させることが明らかとなった (下図)。



#### (5) 自己発光株の作製

ベクター pXen13 中の発光遺伝子 *luxCDABE* オペロンをアシネトバクター用シャトルベクターである pMU125 にクローニングし、多

剤耐性 *A. baumannii* に形質転換する実験を立案した。しかしながら、*luxCDABE* を pMU125 にクローニングすることに成功しなかった。これは、pMU125 が非常に不安定であることが原因であった。そこで、臨床分離株が保有するプラスミドを用いる実験に変更して実施することにした。

#### (6) 考察

緑膿菌やアシネトバクター属菌などのブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌は重要な医療関連感染病原体であり、病院環境中に広く生息している。アシネトバクター属菌は、様々な環境条件下で生育することができる。臨床的に最も分離頻度が高いのが *A. baumannii* であり、湿性および乾性のいずれの環境中でも、長期間にわたって生息可能である。乾燥した環境から分離した *A. baumannii* は、湿性環境からの分離菌よりも生存率が高いことが確認されている。また、乾燥表面にバイオフィームを形成することで、長期間の生息が可能になると推測されている。つまり、*A. baumannii* は医療器材表面に強固に付着する性状を有しており、バイオフィーム形成によって消毒薬に抵抗性を示す。一方、生体内において、細菌バイオフィームの形成は抗菌薬および生体の感染防御系からの回避機構となり、難治化の重要な因子となる。*A. baumannii* は血管内カテーテル関連血流感染症、尿路カテーテル関連感染症、人工呼吸器関連肺炎などのバイオフィームが関与する感染症の起因菌となっている。多剤耐性アシネトバクター感染症の場合、治療に使用可能な抗菌薬は限定されるため、バイオフィームの関与があれば治療は難渋を極めることになる。

本研究において、*A. baumannii* アウトブレイク株は、非アウトブレイク株に比較して、低いバイオフィーム形成能を有していた。得られた実験データと多剤耐性 *A. baumannii* によるアウトブレイクとの関連は明らかでないが、実験条件によっては、バイオフィーム形成能の高いアウトブレイク株が存在した。我々が緑膿菌に関して行った検討では、バイオフィーム形成能の高い菌株には薬剤耐性遺伝子が集積し、多剤耐性化傾向を示すという成績を得ている。院内感染対策上、*A.*

*baumannii* はグラム陰性桿菌（湿潤な環境を好む）ならびにグラム陽性球菌（乾燥に強い）の両性状を備えているということを認識し、緑膿菌とは異なる観点からのバイオフィーム対策を構築する必要があると考えられた。

本研究における主要な目的は、リアルタイムイメージングを実現する自己発光株および GFP 産生株を作製することであった。しかしながら、アシネトバクター用シャトルベクターである pMU125 が不安定であったことから、本研究期間（2011～2012 年度）に構築することはできなかった。*A. baumannii* 自己発光株の作製においては、安定なプラスミドを得ることが不可欠である。そこで、臨床分離株が保有するプラスミドの中で大腸菌でも複製可能なものをスクリーニングすることから開始するのが正攻法であると考えた。

我々は緑膿菌の自己発光株として、市販の *Pseudomonas aeruginosa* Xen 5 株と Xen 41 株（Caliper Life Sciences/ Xenogen 社）を用いて、IVIS® Lumina でマウス大腿部感染モデルを観察することによって、治療実験を実施している。IVIS®を用いるリアルタイムイメージング法は、同一個体での非侵襲的な経時的観察が可能であり、治療実験に有用である。また、我々はベクター pXen13 中の発光遺伝子 *luxCDABE* オペロンを pBBR1 MCS-2（広域宿主クローニングベクター）や pUCP18（大腸菌-緑膿菌シャトルベクター）に組み込んで緑膿菌の自己発光株を作製することに成功している。多剤耐性 *A. baumannii* では、リアルタイムイメージングによる新規実験モデル系を確立するための基盤研究をさらに遂行する必要があると、技術的には可能であると考えている。今後も継続して問題解決に取り組む、多剤耐性 *A. baumannii* に対する新規治療法の探索に有用な実験モデル系の構築を目指す。

緑膿菌における先行研究において、リアルタイムイメージング法による *in vitro* および *in vivo* 実験系で、QS 阻害剤（N-acylhomoserine lactone 類似化合物）の評価を行った。緑膿菌と *A. baumannii* の QS 機構は類似していることから、緑膿菌 QS 機構の阻害剤は緑膿菌のみならず *A. baumannii* のバイオフィーム形成にも阻害効果を示すことが期

待された。*in vitro* 実験系において、供与を受けた QS 阻害剤のなかで QSI-1 が緑膿菌バイオフィーム形成を最も抑制した。ところが、多剤耐性 *A. baumannii* を用いた *in vitro* 実験系では、数種類の QS 阻害剤がバイオフィーム形成を促進するというデータを得た。また、*in vivo* 実験系においては、多剤耐性 *A. baumannii* に対して QSI-1 が各種抗菌薬の抗菌活性を増強する効果は緑膿菌に比較して低かった。

一方、*in vitro* 実験系において、FOM とキノロン系薬（単剤・併用）を作用させると、多剤耐性 *A. baumannii* のバイオフィーム形成と剥離に及ぼす効果が顕著であることを見出した。緑膿菌バイオフィームに対する FOM とキノロン系薬の併用効果は、*in vitro* および *in vivo* 実験系において確認されている。(① Kumon H. et al.: Combination effect of fosfomycin and ofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* growing in a biofilm. *Antimicrob Agents Chemother*, 39: 1038-1044, 1995; ② Mikuniya T. et al.: Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms with a combination of fluoroquinolones and fosfomycin in a rat urinary tract infection model. *J Infect Chemother*, 13: 285-290, 2007)。本研究期間には、尿路バイオフィーム実験モデル系（膀胱異物モデル）を用いて、多剤耐性 *A. baumannii* バイオフィームに対する治療実験を実施しておらず、今後の重要な課題として残されている。

TGC は多剤耐性アシネトバクターに有効な新系統の抗菌薬として、日本でも 2012 年 9 月に製造販売が承認された。本研究課題において、TGC と QSI-1 との併用効果についても評価を行ったところ、拮抗作用を認めた。その他の各種抗菌薬では、多少なりとも抗菌活性の増強作用を示した。QSI-1 と各種抗菌薬との併用効果に関する作用機序の解明が今後の重要な研究課題であると考えられた。

2011～2012 年度に、多剤耐性アシネトバクターに対する新規治療法の開発を目指して、本挑戦的萌芽研究に取り組んだ。多剤耐性菌に対する新規治療法の開発は喫緊の課題であるが、研究の進展に伴い、一連の問題解決のためには更なる基盤研究を遂行する必要

性が生じた。多剤耐性菌に対する新規治療薬の研究開発を促進するための新たな施策を構築することが求められている。

#### 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1件)

- ① 狩山玲子、光畑律子、高田徹、松永彰、吉村尚江、公文裕巳、本邦で分離された多剤耐性アシネトバクター (*Acinetobacter baumannii*) のバイオフィルム形成能に関する検討、査読無、Bacterial Adherence & Biofilm, 26: 83-88, 2013.

[学会発表] (計5件)

- ① 狩山玲子、シンポジウム：バイオフィルム制御に向けての挑戦的アプローチ、医学領域におけるバイオフィルムとその制御法の開発、第86回日本細菌学会総会、2013年3月19日、幕張メッセ(千葉市)
- ② 狩山玲子、緑膿菌ならびにアシネトバクターによるマウス大腿部感染モデルにおけるクオラムセンシング阻害剤と各種抗菌薬の併用効果、第47回緑膿菌感染症研究会、2013年2月22日、札幌医科大学(札幌市)
- ③ 狩山玲子、本邦で分離された多剤耐性アシネトバクター (*Acinetobacter baumannii*) のバイオフィルム形成能に関する検討、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)
- ④ 狩山玲子、*Acinetobacter baumannii* アウトブレイク株のバイオフィルム形成能に関する検討、第86回日本感染症学会総会、2012年4月26日、長崎ブリックホール(長崎市)
- ⑤ 狩山玲子、*Acinetobacter baumannii* 臨床分離株のバイオフィルム形成能に関する検討、第27回日本環境感染学会総会、2012年2月4日、福岡国際会議場(福岡市)

[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

公文 裕巳 (KUMON HIROMI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：30144760

##### (2) 研究分担者

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

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

##### (3) 連携研究者

菅 裕明 (SUGA HIROAKI)

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号：00361668

##### (4) 研究協力者

高田 徹 (TAKATA TOHRU)

福岡大学・福岡大学病院・准教授

研究者番号：90268996

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