

## 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3月31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：23659878

研究課題名（和文） 口腔バイオフィルムにおける新規スーパー耐性菌の探索とその薬剤耐性機構解明

研究課題名（英文） Study on novel drug-resistant bacteria in oral biofilms and the resistance mechanisms

## 研究代表者

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

## 研究成果の概要（和文）：

緑膿菌、アシネトバクターや結核菌などにおける多剤耐性菌の絶え間ない出現は世界的な健康の驚異である。最近、Dantas G 博士らは彼らが分離した数百の分離土壌細菌が抗菌薬を唯一の炭素源として増殖する能力を持っていることを明らかにした。抗菌薬を資化する多くの細菌がヒトの病原細菌の近縁であった。

そこで、この研究の目的は多剤耐性菌、特に抗菌薬を資化するような細菌のデンタルプラークや歯科医療環境とくにデンタルユニット水におけるそれらの分布状況を調べることである。ペニシリンやカナマイシンを資化する代表的な細菌がデンタルユニット水から分離された。それらは 16S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列解析の結果、*Sphingomonas aquatilis* と *Chitinophaga sp.* と同定された。健康人や歯周病患者の口腔内サンプルからは多剤耐性菌や抗菌薬資化性細菌は見つからなかった。一方、重篤な細菌感染（敗血症）で長期間の抗菌治療を受けた患者口腔内からは薬剤耐性腸球菌やメチシリン耐性表皮ブドウ球菌やβラクタム系抗菌薬に耐性な口腔レンサ球菌が分離された。

全身的な抗菌治療によってデンタルプラークの細菌叢の構成は変化して耐性菌が増加するかもしれないし、また抗菌薬資化性細菌もすでに歯科医療環境にすでに存在することが分かった。

## 研究成果の概要（英文）：

The continuing emergence of multi-drug resistance in *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, and *Mycobacterium tuberculosis* is a global health problem. Recently Dr. Dantas G *et al.* reported that their isolated hundreds of soil bacteria had the capacity to grow on antibiotics as a sole carbon source. Many bacteria subsisting on antibiotics were closely related to human pathogens.

The aim of this study was to investigate the distribution of the multi-drug resistant bacteria and bacteria subsisting on antibiotics in dental plaques and dental environments such as dental unit water lines. Representative isolates capable of growth on penicillin and kanamycin were isolated from Dental unit water lines. They were identified *Sphingomonas aquatilis* and *Chitinophaga sp.* by 16S ribosomal RNA gene sequencing analysis. No multi-drug resistant bacteria and bacteria subsisting on antibiotics were detected in any of the samples from healthy subjects and patients with periodontitis. However, drug resistant *Enterococcus faecalis*, methicillin resistant *Staphylococcus epidermidis* and β-lactam antibiotics resistant oral Streptococci were isolated from the oral cavity

of a patient with long-term systemic antibiotic therapy for severe bacterial infection(septis).

Dental plaques may alter their composition and enrich for bacteria resistant to antibiotics by systemic antibiotic therapy and bacteria subsisting on antibiotics have been also present in dental clinic environment.

#### 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	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：感染制御学、口腔微生物学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：細菌、感染症、歯学、薬剤耐性、バイオフィーム

#### 1. 研究開始当初の背景

昨今、あらゆる抗菌薬が無効な多剤耐性化した緑膿菌やアシネトバクターや結核菌の蔓延が懸念されている。その他、病院内さらには市中においてもメチシリン耐性黄色ブドウ球菌やバンコマイシン耐性腸球菌をはじめ様々な耐性菌が人々の健康を脅かしている。本研究者は、易感染性患者の口腔内に出現した多剤耐性日和見菌に対して、抗菌化学療法が困難な状況となり、その患者が重篤化し、転帰となったことを実際に経験してきた (Soga Y, Saito T, Nishimura F, Ishimaru F, Mineshiba J, Mineshiba F, Takaya H, Sato H, Kudo C, Kokeyuchi S, *et al.*: Appearance of multidrug-resistant opportunistic bacteria on the gingiva during leukemia treatment. *J Periodontol.* 2008; 79(1):181-6.)。難治性感染症治療のための抗菌化学療法によって、バイオフィーム中では新しい機序を有する薬剤耐性菌が生き残り、また密集菌塊中で効率よく薬剤耐性遺伝子を相互に獲得し合い、多剤耐性化が進み、またバイオフィームという栄養源の限られた環境は、抗菌薬までも分解し、代謝して増殖するという新規の薬剤耐性機構を持つスーパー耐性菌出現の温床となるのではとの着想を得ていた。折しも、Dantas Gらは、土壌バイオフィームから抗菌物質を貴重な炭素源として栄養にする細菌(抗菌薬資化性細菌)を発見し、その中には病原細菌と近縁種も含まれることを先んじて報告していた (Dantas G, Sommer MO, Oluwasegun RD, Church GM: . Bacteria subsisting on antibiotics. *Science.* 2008; 320(5872):100-3)。

#### 2. 研究の目的

昨今、ほとんどの抗菌薬が効かない多剤耐性菌の出現や蔓延が問題となっている。臨床材料からは多くの抗菌薬に対して最小発育阻止濃度(MIC)が256~512  $\mu\text{g/mL}$ 、それ以上の高度耐性を示す新規の病原細菌が分離されている。この薬剤濃度は、発想を逆転すると、細菌の栄養源(炭素源や窒素源)として十分である。これまでに解明された薬剤耐性機構は、抗菌薬の膜透過低下、分解、修飾、排出などいわば細菌の薬剤からの回避であった。一方、細菌は栄養・増殖条件などが限定されるバイオフィーム中では抗菌薬をも積極的に分解し、増殖に利用しうるのではないかという斬新な着想を得た。

そこでまず、歯科医療環境、特にバイオフィームを形成しやすいデンタルユニットからの診療水やヒト口腔内バイオフィームであるデンタルプラークにおける抗菌薬までも分解し、栄養源として利用し、増殖するという抗菌薬資化性細菌の分布状況について調べ、考察することを目的に研究を開始した。

#### 3. 研究の方法

- (1) 分析試料: 10台のデンタルユニットから採水した試料水、健常人4名および歯周病患者1名からのデンタルプラーク、心内膜炎で敗血症治療のために大量の抗菌薬の投与を受けた患者の口腔内ぬぐい液
- (2) 抗菌薬を唯一の炭素源として利用して増殖しうる抗菌薬資化性細菌の分離: Dantas Gらの報告を参考に、無機塩溶液に炭素源

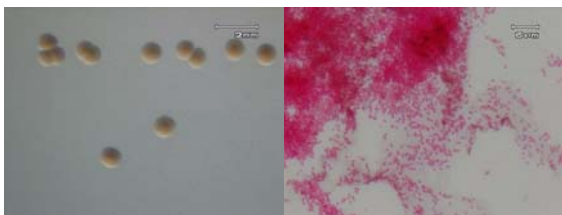
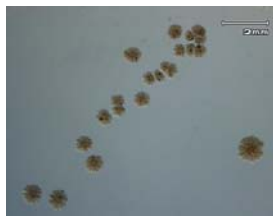
として各種抗菌薬 (kanamycin, mafenide, penicillin G, vancomycin) をそれぞれ 1g/Lの濃度含む寒天平板培地を作成してスクリーニング調査を行った。

- (3) 細菌種の同定：サンプルのDNA抽出は InstaGene Matrix (Bio-Rad) を用いて調製した。細菌種の同定は 16S リボソーム RNA 遺伝子 (16S rDNA) 塩基配列で行なった。すなわち、菌種の同定や分類に用いられる細菌 16S rDNA を増幅するプライマーセット (341f : 5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3', 907r : 5'-CCG TCA ATT CMT TTG AGTTT-3') を用いて PCR 法で増幅し、増幅 DNA 断片を TopoTA クローニングキット (Invitrogen) を用いてクローニングした。それぞれの塩基配列を決定後、細菌 DNA データベースと照合し、菌種を決定した。またペニシリン結合蛋白の変異およびメチシリン耐性遺伝子 (*mecA*) についても PCR 法で調べた。
- (4) 各種消毒薬の効果：分離された抗菌薬資化性細菌に対して 0.02% (200ppm) 次亜塩素酸溶液および 100 倍希釈ポピドンヨード液を用いて消毒効果を確かめた。

#### 4. 研究成果

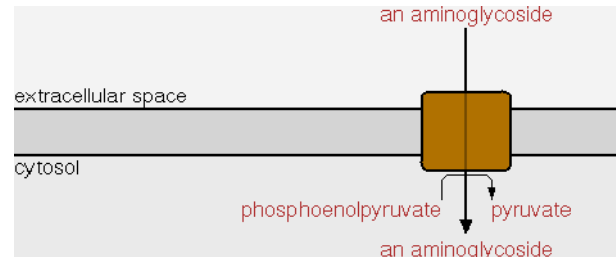
##### (1) 研究の主な成果：

- ① 研究の主な成果：健康人 4 名および歯周病患者 1 名からのデンタルプラークを適宜希釈して Dantas G らの無機塩溶液に炭素源として各種抗菌薬 (kanamycin, mafenide, penicillin G, vancomycin) をそれぞれ 1g/L の濃度含む寒天平板培地に塗布して好気条件下、22°C で 1 週間培養してもコロニーは認められなかった。
- ② 一方、10 台のデンタルユニットから採水したサンプル水の 1 つからは penicillin G 含有培地では上記と同じ培養条件で右図のような約 1mm の淡黄色のラフ型のコロニーが分離でき、グラム陰性桿菌であった。また、2 のサンプル水から kanamycin 含有培地において下図のような約 1mm の淡黄

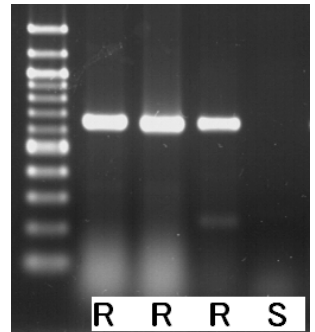
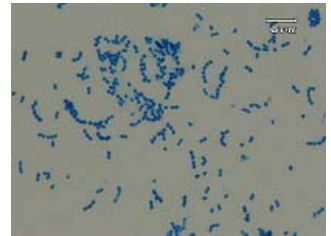


色のコロニーが分離でき、グラム陰性桿菌であった。

- ③ それぞれの 16S リボソーム遺伝子塩基配列から解析すると、penicillin G 資化性細菌は *Sphingomonas aquatilis* であり、有害な PCB やビスフェノール A 分解活性を有するとの報告がある。また kanamycin 資化性細菌は土壌細菌の *Chitinophaga* sp. に相同性を示すものであった。これは Dantas G. の報告にあるスーパー耐性菌、Sphingobacteriales に近縁であり興味深い。その薬剤耐性機構や代謝系などは不明であるが、下図のような aminoglycoside の取り込み系を有しているようだ。



- ④ さらにまた、心内膜炎からの敗血症での治療のため大量の抗菌薬の投与を受けた患者口腔内からは、下図のような penicillin G 高度耐性レンサ球菌 *Streptococcus mitis/oralis* (MIC 10 μg/mL 以上)、メチシリン耐性表皮ブドウ球菌および腸球菌が検出され、健康人の口腔内細菌叢とは大きく異なっていた。その耐性機構はそれぞれペニシリン結合蛋白の変異と *mecA* の獲得であった。またレンサ球菌のペニシリン結合蛋白 (PBP) のアミノ酸配列の変異はペニシリン感受性 (S) 株とペニシリン耐性 (R) 株とは、PCR 法によって右図のように検出できた。PBP のアミノ酸配列の比較では既報の S 株の PBP に比べて、R 株では変異している個所が多く認められた。



- ⑤ penicillin G 資化性細菌 *Sphingomonas aquatilis* も kanamycin 資化性細菌 *Chitinophaga* sp. に対しても 0.02% (200ppm) 次亜塩素酸溶液および 100 倍希

積ポピドンヨード液は有効であった。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト：

今回の研究成果で Dantas G らが先に報告した抗菌薬までも分解し、代謝して増殖する抗菌薬資化性細菌は、土壌だけでなく、デンタルユニットのバイオフィームという身近な歯科医療環境にも生息することが判った。歯科治療によってデンタルユニット水から抗菌薬資化性細菌のヒトへの感染が懸念される。Dantas G らは抗菌薬を資化する多くの細菌がヒトの病原細菌の近縁であり、環境中に分布している抗菌薬を資化する超耐性菌から耐性遺伝子を病原細菌が獲得すると推察している。今回、Dantas G の培地を用いて調べたところ、他の栄養源が豊富なヒト口腔内からは抗菌薬資化性細菌を見いだせなかったが、今後も注視する必要がある。抗菌薬資化性細菌は栄養源が豊富な口腔内という niche では口腔常在菌と拮抗しているためか、従来の培養法では回収できなかったのかもしれない。今回、重篤な細菌感染症においては、抗菌薬治療によって口腔内細菌叢は変化し、薬剤耐性菌が出現することが再認でき、それらは薬剤耐性遺伝子の獲得や標的遺伝子の変異によるものであった。口腔バイオフィームは新規薬剤耐性菌のリアクターあるいはリザーバーとしての可能性も十分に考えられる。

(3) 今後の展望：

デンタルユニットのバイオフィームという歯科医療環境からも抗菌薬資化性細菌が Dantas G らの培地を用いて今回分離できたが、今後生体サンプルからの抗菌薬資化性細菌の分離には培地の改良と PCR 法など分子生物学的検出方法を利用するなど何らかの工夫が必要かもしれない。Kunze M らは有害な有機塩素系化合物をも栄養源として分解、代謝して増殖する病原細菌には一連の機能遺伝子群が存在し、また Mazel D らの研究グループは新規薬剤耐性化やその伝播にはインテグロンが関与することを報告していることを参考にして解析を進めており、抗菌薬資化性細菌におけるその耐性機構や代謝系の解明が今後の課題である (Kunze M, Zerlin KF, Retzlaff A, *et al.* Degradation of chloroaromatics by *Pseudomonas putida* GJ31: assembled route for chlorobenzene degradation encoded by clusters on plasmid pKW1 and the chromosome. *Microbiology*, 2009; 155 (12) :4069-83. Guerin E, Cambray G, Sanchez-Alberola N, Campoy S, Erill I, Da Re S, Gonzalez-Zorn B, Barbé J, Ploy MC, Mazel D. The SOS response controls integron recombination. *Science*, 2009; 324 (5930) :1034.)。

## 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 5 件)

- ① Maeda Hiroshi, Hirai Kimito, Mineshiba Jyunji, Yamamoto Tadashi, Kokeguchi Ssusumu, Takashiba Shogo. Medical microbiological approach to Archaea in oral infectious diseases. *Japanese Dental Science Review*, 2013 in press. 査読あり
- ② Hirai Kimito, Maeda Hiroshi, Omori Kazuhiro, Yamamoto Tadashi, Kokeguchi Susumu, Takashiba Shogo. Serum antibody response to group II chaperonin from *Methanobrevibacter oralis* and human chaperonin CCT. *Pathogens and Disease*, 2013 in press, (doi: 10.1111/2049-632X.12041). 査読あり
- ③ 玉木直文、伊藤博夫、酸化ストレスと歯周病、*四国歯学会雑誌*、2012、25、93-99.
- ④ 狩山玲子、公文裕巳、特集：抗菌薬多剤併用療法の理論と実践 「バイオフィーム感染症に対する抗菌薬併用療法」、2012、28(9)、57-64.
- ⑤ Soga Y, Maeda Y, Ishimaru F, Tanimoto M, Maeda H, Nishimura F, Takashiba S. Bacterial substitution of coagulase-negative staphylococci for streptococci on the oral mucosa after hematopoietic cell transplantation. *Support Care Cancer*, 2011;19(7):995-1000, (doi: 10.1007/s00520-010-0923-9) .

[学会発表] (計 9 件)

- ① Akari Watanabe, Norito Satoh, Naofumi Tamaki, Susumu Kokeguchi, *Infection Control Awareness among American and Japanese Dental Hygienist Students*. 91th General Session & Exhibition of the IADR, 2013年3月20日-23日, Seattle, USA
- ② 狩山玲子、シンポジウム3「バイオフィー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ー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18日-20日、千葉県千葉市
- ③ 大西信彦、江原弘貴、金森達也、神崎資子、筑木隆雄、花山宜久、草野展周、大塚文男、

豊岡伸一、苔口 進、播種性淋菌感染症の1例、第107回日本内科学会中国地方会、2012年11月24日、広島県広島市

- ④ 奥井明美、曾我賢彦、山中玲子、森田学、苔口 進、口腔粘膜上細菌と心内膜炎原因菌の同一性を遺伝子レベルで検討した一症例、日本歯科保存学会2012年度秋季学術大会、2012年11月22、23日、広島県広島市
- ⑤ 佐古真一、狩山玲子、山本満寿美、石井亜矢乃、和田耕一郎、上原慎也、渡辺豊彦、公文裕巳、光畑律子、苔口 進、尿路由来メタロ-β-ラクタマーゼ産生緑膿菌のバイオフィルム形成能および分子疫学的検討、第60回日本化学療法学会西日本支部総会、第55回日本感染症学会中日本地方会学術会議、第82回日本感染症学会西日本地方会学術集会、2012年11月5日-7日、福岡県、福岡市
- ⑥ 田口裕子、前田博史、峯柴 史、平井公人、山部こころ、苔口 進、高柴正悟、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*におけるRNA シャペロン (Hfq) の蛋白質発現制御と病原性への関与、第55回春季日本歯周病学会学術大会、2012年5月17日-19日、北海道札幌市
- ⑦ 田口裕子、前田博史、峯柴 史、平井公人、山部こころ、苔口 進、高柴正悟、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*におけるRNAシャペロン(Hfq)の蛋白質発現制御と病原性への関与、第32回岡山歯学会総会・学術集会、2011年11月13日、岡山県、岡山市
- ⑧ 苔口 進、歯科診療における汚染状況の把握とその対策について、第20回日本口腔感染症学会総会・学術集会、2011年11月13日、神奈川県、横浜市
- ⑨ Akari Watanabe, Norito Satoh, Naofumi Tamaki, Susumu Koikeguchi, Evaluation of contamination on dental PPE using an ATP-bioluminescence method, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS2011), 2011年9月6日-10日、北海道、札幌市

[その他]

ホームページ等

岡山大学歯学部

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/dent/>

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

<http://www.hsc.okayama-u.ac.jp/mdps/>

医歯学系総合研究業績

[http://www.okayama-u.ac.jp/user/med/Gyoseki/Gyoseki\\_md/index.html](http://www.okayama-u.ac.jp/user/med/Gyoseki/Gyoseki_md/index.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

前田 博史 (MAEDA HIROSHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：00274001

玉木 直文 (TAMAKI NAOFUMI)

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：20335615

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

### (3) 連携研究者

該当なし