

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18591753  
 研究課題名 (和文)  
 緑膿菌性尿路感染症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)  
*Pseudomonas aeruginosa* biofilms in urinary tract infections -the development of novel methods for the search of antibiofilm agents-  
 研究代表者  
 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

研究成果の概要：緑膿菌性尿路バイオフィルム感染症の予防法および治療法の確立を主要な目的として研究を遂行した。抗バイオフィルム剤の評価に使用するバイオフィルム実験モデル系（キャピラリーフローセルシステム）は、緑色蛍光蛋白質産生株・非産生株のいずれを用いても再現性のある実験系として、本研究期間に格段の進化を遂げた。本実験系および新規スクリーニング法を使用し、人工尿中、抗バイオフィルム剤としての有用性が示唆される化合物を見出した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,900,000	0	1,900,000
2007 年度	900,000	270,000	1,170,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	480,000	3,980,000

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：緑膿菌、バイオフィルム、尿路感染症、抗バイオフィルム剤、スクリーニング、クォーラムセンシング、実験モデル系、フローセル

## 1. 研究開始当初の背景

細菌バイオフィルムは難治性感染症に関与する病態概念として注目されており、その病態の解明や予防・治療法の開発など基礎的・臨床的研究が進展している。尿路感染症

においても、カテーテル留置感染症を代表とする難治性感染症の多くにこの細菌バイオフィルムが関与している。複雑性尿路感染症より分離される日和見感染菌は、本来尿路への定着性は低いものの、留置カテーテルや高

度の尿流障害などの基礎疾患につけこんで、細菌バイオフィルムを形成して尿路での定着性と増殖性を獲得する。尿路バイオフィルム感染症は、潜伏・持続感染の様相を呈することが多く難治性である。通常臨床症状に乏しく比較的穏やかな感染症であるが、一旦、尿流障害を合併すると尿性敗血症に移行し、宿主を重篤化させる。また、除菌が困難であるため感染が持続し、院内感染の感染源となっている。特に、緑膿菌はバイオフィルム形成能が高く、尿路バイオフィルム感染症の主たる原因菌である。そのような背景のなかで、尿路バイオフィルム感染症の予防と制御のための新しい治療法・医用材料・抗バイオフィルム剤の開発は重要な研究課題である。

## 2. 研究の目的

緑膿菌性尿路バイオフィルム感染症の予防法および治療法の確立を主要な目的として、本研究期間に抗バイオフィルム剤の評価系としての *in vitro* バイオフィルム実験モデル系（キャピラリーフローセルシステム）を進化させる。本実験系を使用して、クォーラムセンシング（菌密度依存的遺伝子発現制御）機構の拮抗剤・阻害剤、植物成分であるポリフェノール類、非翻訳RNA（noncoding RNA: ncRNA）候補分子、抗菌薬などの評価（単独および併用）を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) キャピラリーフローセルシステム

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科泌尿器病態学分野では、平成14年度に、*in vitro* バイオフィルム実験モデル系としてのキャピラリーフローセルシステムを導入した。本実験系は、green fluorescent protein (GFP) 産生株がキャピラリー中に形成したバイオフィルムを共焦点レーザー走査型顕微鏡あ

るいは蛍光顕微鏡でリアルタイム（タイムラプス）に観察して、抗バイオフィルム剤の評価を行うときに最も威力を発揮する。平成17年度までに、GFP産生株およびGFP非産生株を用いて再現性のある実験系として確立した。本研究期間（平成18～20年度）には、画像解析のために最新のソフトウェアを導入、また共焦点レーザー走査型顕微鏡での観察において、高倍率での観察が可能なウォーターレンズを導入し、本実験系は格段の進化を遂げた。

### ① 使用菌株およびバイオフィルムの観察

カテーテル留置複雑性尿路感染症患者由来の緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* OP14-210株（GFP非産生株）を用いた。GFP産生株は、GFPをコードしたプラスミド pMF230をOP14-210株に導入して、*P. aeruginosa* OP14-210 (pMF230)株を構築した（研究協力者：加藤純一教授・広島大学）。ガラスキャピラリー中に菌液を接種して、37℃、2時間放置したのち、人工尿を20 ml/hrで灌流させ、バイオフィルムを形成させた。GFP産生株が形成したバイオフィルムは、共焦点レーザー走査型顕微鏡（Zeiss LSM 510）あるいはオールインワン蛍光顕微鏡（キーエンス BZ8000）で観察した。GFP非産生株の場合は、蛍光染色キット（Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kits : Molecular Probes）を用いてバイオフィルム内の生菌（Green）と死菌（Red）を染め分け、同様に観察を行った。

### ② 評価に使用した抗菌薬

人工尿における浮遊菌に対するレボフロキサシン (LVFX)、ウリフロキサシン (UFX : プルリフロキサシンの活性本体)、ホスホマイシン (FOM) のMICは、それぞれ8, 2, 64 μg/mlであった。薬剤濃度は、通常の臨床投与量で尿中に十分に到達する濃度：それぞれ80, 20, 192 μg/mlを使用した。

### ③ ソフトウェア

画像解析（3次元画像構築）には、Imaris (Bitplane) および MetaMorph (Molecular Devices) を用い、Green/Red 蛍光強度の定量化には MetaMorph を用いた。

#### (2) バイオフィーム形成阻害候補化合物のスクリーニング

新規スクリーニング法として、ペグ（細い短棒）付き 96 穴ポリスチレンマイクロプレートを使用した。緑膿菌におけるクォーラムセンシング機構の阻害剤として見出された 17 種の化合物（研究協力者：菅 裕明教授・東京大学）を用い、人工尿中でのバイオフィーム形成阻害候補化合物を探索するために、スクリーニングを行った。

#### 4. 研究成果

平成18年度は、主として抗菌薬を使用して、キャピラリーフローセルシステムでの評価を行い、実験系を進化させた。平成19年度までに、緑膿菌性バイオフィームに対して濃度依存的に抑制効果を発揮する数種類の化合物をスクリーニング法にて見出した。平成20年度に更なる進化を遂げた実験系において、抗バイオフィーム剤としての有用性が示唆される化合物を見出した。

以下、共焦点レーザー走査型顕微鏡を使用して得られた主たる研究成果を報告する。

#### (1) GFP 産生株を用い、抗菌薬無添加あるいは添加の条件下で観察

図 1&2 は、画像解析ソフトウェア Imaris を使用して得られたイメージである。

① GFP 産生株が 3 日後に形成したバイオフィームは、100  $\mu\text{m}$  程度の厚さで全面を覆っていた（図 1A）。GFP 産生株に FOM 単独を作用させて 3 日後に観察すると、部分的にマッシュルーム状のバイオフィームを形成した（図 1B）。LVFX 単独、LVFX・FOM 併用では、マイ

クロコロニーが点在するもののバイオフィームの形成を認めなかった。

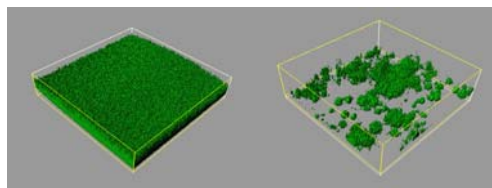


図 1A 薬剤無添加 図 1B FOM 単独

② GFP 産生株が 1 日後に形成したバイオフィームに 72 時間薬剤を作用させると、FOM 単独（図 2B）では、薬剤無添加（図 2A）の場合と比較して顕著な差を認めなかった。LVFX 単独では、表面が剥離したイメージが得られた（図 2C）。LVFX・FOM 併用では、併用効果としての剥離した薄いバイオフィームが観察された（図 2D）。

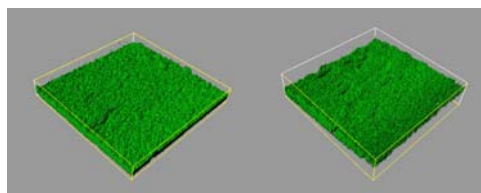


図 2A 薬剤無添加 図 2B FOM 単独

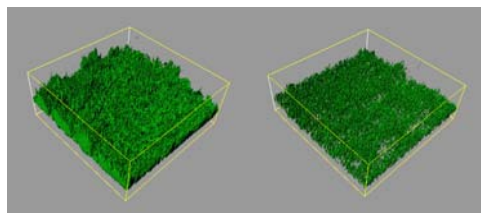


図 2C LVFX 単独 図 2D FOM & LVFX

#### (2) GFP 産生株を用い、阻害候補化合物無添加あるいは添加の条件下で観察

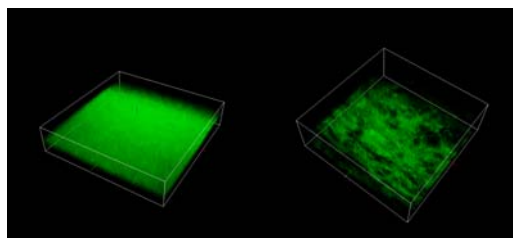
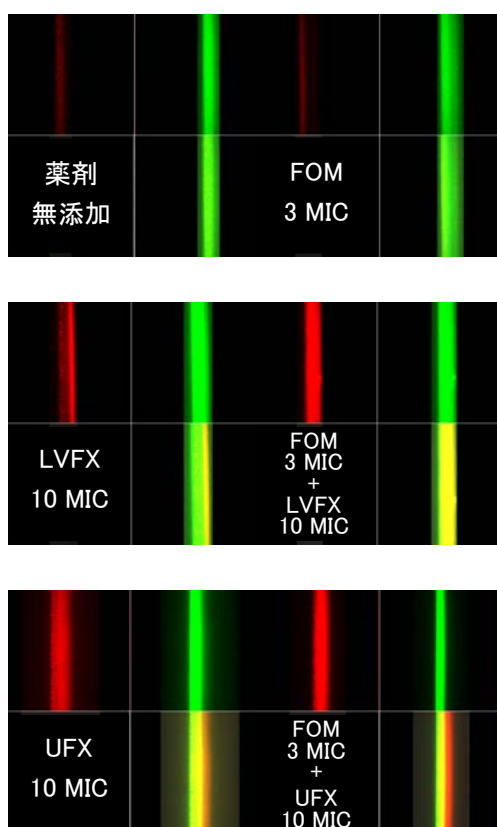


図 3A 化合物無添加 図 3B 化合物添加

図 3 は、画像解析ソフトウェア MetaMorph を使用して得られたイメージである。阻害候補化合物のスクリーニングにおいて、緑膿菌

性バイオフィルムに対して濃度依存的に抑制効果を発揮する数種類の化合物を見出した。それらの化合物を用い、人工尿中、キャピラリーフローセルシステムでの評価を行った。スクリーニング法において最も抑制効果が高かった化合物は、キャピラリーフローセルシステムでの観察においても抗バイオフィルム剤としての有用性が示唆された (図 3B)。

(3) GFP非産生株を用い、抗菌薬無添加あるいは添加の条件下で観察 (蛍光染色)



GFP 非産生株が 2 日後に形成したバイオフィルムに 18 時間薬剤を作用させると、LVFX 単独に比較して、UFX 単独では浅層部に死菌 (Red) が多く存在するイメージが得られた。UFX・FOM 併用では、深層部まで死菌 (Red) が多く存在し、浅層部の大部分が死菌 (Red) であるというイメージが得られた。UFX 単独、LVFX 単独および UFX・FOM 併用、LVFX・FOM 併用を比較すると、いずれにおいても UFX が LVFX より強い殺菌効果を示した。

画像解析ソフトウェア MetaMorph の使用により、Green/Red 蛍光強度は UFX 単独が Green 58.63/Red 23.30、UFX・FOM 併用が Green 46.78/Red 51.60 であり、併用による殺菌効果の増強が定量的に確認できた。

#### (4) その他

① 大腸菌性バイオフィルムに対して抑制効果を示したクランベリー成分は、緑膿菌性バイオフィルムに対して抑制効果を発揮するには至らなかった。(研究協力者：伊東秀之准教授、波多野力教授・岡山大学)

② バイオインフォマティクス技術による非翻訳 RNA 分子 (ncRNA) の文献検索を行い、候補化合物を見出した。

#### (5) 考察

近年、細菌の集団状態を感知し、遺伝子発現を制御するクォーラムセンシング機構という概念が、細菌の世界に導入された。クォーラムセンシングはバイオフィルム形成にも深くかかわっており、この機構の解明はバイオフィルム対策への活路を拓くものと期待されている。本研究期間に、クォーラムセンシング機構の阻害剤が、尿路バイオフィルムに対しても有用であることを示唆する価値ある研究成果を得ることができた。

国内外では、緑膿菌をはじめとするグラム陰性菌およびグラム陽性菌に関してもクォーラムセンシング機構の研究は進展しており、その阻害剤の開発研究がなされている。クォーラムセンシング機構の阻害剤が尿路バイオフィルム感染症の予防や治療に役立てられるのかどうかは、今後の課題であるが、一種の阻害剤で、病原性や薬剤抵抗性に関与する遺伝子の発現を同時に制御できるような抗バイオフィルム剤の開発が期待されている。本研究成果は、岡山大学泌尿器病態学分野において、現在推進中の難治性尿路感染症対策に関する研究課題の礎となった。

## 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 11 件)

- ① 山本満寿美、狩山玲子、光畑律子、公文裕巳、千田好子：メタロ-β-ラクタマーゼ産生緑膿菌のバイオフィーム形成能および分子疫学的解析. 日本環境感染学会 24:85-92, 2009 (査読有)
- ② 石井亜矢乃、狩山玲子、光畑律子、佐古真一、和田耕一郎、上原慎也、渡辺豊彦、門田晃一、公文裕巳：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ーム形成能および分子疫学的検討. Bacterial Adherence & Biofilm 2008 (印刷中) (査読無)
- ③ 狩山玲子：多剤耐性緑膿菌 (MDRP) とバイオフィーム. 感染と抗菌薬 11:356-360, 2008 (総説：依頼原稿) (査読無)
- ④ 門田晃一、狩山玲子、公文裕巳：緑膿菌性尿路感染症：どう対峙するか. 第42回緑膿菌感染症研究会講演記録 42:27-30, 2008 (査読無)
- ⑤ 山本満寿美、狩山玲子、光畑律子、石井亜矢乃、上原慎也、渡辺豊彦、門田晃一、公文裕巳、草野展周：メタロ-β-ラクタマーゼ産生緑膿菌のバイオフィーム形成能と耐性遺伝子伝達性の検討. 第42回緑膿菌感染症研究会講演記録 42:95-99, 2008 (査読無)
- ⑥ Tashiro Y, Nomura N, Nakao R, Senpuku H, Kariyama R, Kumon H, Kosono S, Watanabe H, Nakajima T, Uchiyama H : Opr86 is essential for viability and is a potential candidate for a protective antigen against biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Bacteriology, 190(11): 3969-3978, 2008 (査読有)
- ⑦ Mikuniya T, Kato Y, Ida T, Maebashi K, Monden K, Kariyama R, Kumon H : Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms with a combination of fluoroquinolones and fosfomycin in a rat urinary tract infection model. Journal of Infection and Chemotherapy, 13(5): 285-290, 2007 (査読有)
- ⑧ 狩山玲子、門田晃一、公文裕巳：新感染症学(上) - 新時代の基礎・臨床研究 - IV. 感染症学総論 慢性化, 潜伏化, 再発再燃の機序 「バイオフィーム形成と尿路感染症の慢性化」 日本臨床 65(増刊2): 120-123, 2007 (総説: 依頼原稿) (査読無)
- ⑨ 狩山玲子、門田晃一、公文裕巳：緑膿菌性尿路感染症対策としての抗バイオフィーム剤探索とその基盤技術の開発. 第41回緑膿菌感染症研究会講演記録 41: 39-43, 2007 (査読無)
- ⑩ 渡辺豊彦、上原慎也、光畑律子、和田耕一郎、石井亜矢乃、狩山玲子、門田晃一、公文裕巳：尿路感染症由来緑膿菌のバイオフィーム形成能と臨床的因子および薬剤感受性との関連性に関する検討. 第41回緑膿菌感染症研究会講演記録 41: 94-98, 2007 (査読無)
- ⑪ 狩山玲子、光畑律子、上原慎也、門田晃一、公文裕巳：キャピラリーフローセルシステムにおける緑膿菌性バイオフィームに対する抗菌薬の有効性評価. 第40回緑膿菌感染症研究会講演記録 40: 135-138, 2006 (査読無)

[学会発表] (計 11 件)

- ① 狩山玲子、尿路由来メタロ-β-ラクタマ

- 一ゼ産生緑膿菌のバイオフィルム形成能および耐性遺伝子伝達性の検討、第 83 回 日本感染症学会総会、2009/4/23、東京
- ② 山本満寿美、メタロー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その問題点と対策、第 24 回 日本環境感染学会総会、2009/2/27、横浜
- ③ 佐古真一、尿路感染症由来緑膿菌のバイオフィルム形成能と臨床的背景の関連性の検討、第 56 回 日本化学療法学会西日本支部総会、2008/12/7、広島
- ④ 石井亜矢乃、尿路由来メタロー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 22 回 Bacterial Adherence & Biofilm 学術集会、2008/7/4、淡路
- ⑤ 山本満寿美、メタロー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 56 回 日本化学療法学会総会、2008/6/6、岡山
- ⑥ 山本満寿美、メタローβ-ラクタマーゼ産生緑膿菌のバイオフィルム形成能と耐性遺伝子伝達性の検討、第42回 緑膿菌感染症研究会、2008/2/1、東京
- ⑦ 狩山玲子、緑膿菌性バイオフィルムに対するフルオロキノロン系薬とホスホマイシンの併用効果に関する新知見、第 55 回 日本化学療法学会西日本支部総会、2007/10/31、神戸
- ⑧ 渡辺豊彦、尿路感染症患者より分離された緑膿菌のバイオフィルム形成能と薬剤感受性および臨床的因子に関する検討、第 55 回 日本化学療法学会総会、2007/6/1、仙台
- ⑨ Shinya Uehara、Relationships between biofilm-forming capacities of *Pseudomonas aeruginosa* isolates and clinical background/antimicrobial

resistance in urinary tract infections. 102nd Annual Meeting, American Urological Association, 2007/5/22, Anaheim, USA

- ⑩ 狩山玲子、緑膿菌性尿路感染症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、第41回 緑膿菌感染症研究会、2007/2/10、岡山
- ⑪ 狩山玲子、キャピラリーフローセルシステム(*in vitro* biofilm実験モデル系)での緑膿菌biofilmに対する抗菌薬の有効性評価-、第 54 回 日本化学療法学会総会、2006/5/19、京都

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

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

### (3) 連携研究者

門田 晃一 (MONDEN KOICHI)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・講師  
研究者番号：60291473

### (4) 研究協力者

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

菅 裕明 (SUGA HIROAKI)

東京大学・先端科学技術研究センター・教授  
研究者番号：00361668

Philip S. Stewart

モンタナ州立大学 (米国) ・バイオフィルム工学研究所・教授