

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07122

研究課題名(和文) バイオフィルム離脱細菌の解析と治療への応用

研究課題名(英文) Analysis of biofilm detached bacteria

研究代表者

田嶋 亜紀子 (Tajima, Akiko)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：70317973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：体内で、細菌がバイオフィルム(菌の集合体)を形成すると、免疫システムや抗菌薬が効きにくくなるため、細菌を排除することが困難となる。その結果、治療に難渋するバイオフィルム感染症を引き起こし問題となるが、バイオフィルムの細菌がどのように病原性を発揮するのかは不明であった。本研究では、バイオフィルム形成後に細菌がその集合体から離れ自由に動き回れるようになること、免疫システムの攻撃から逃れる能力を獲得して体内で生き残りやすく、感染を悪化させる可能性があることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、細菌がバイオフィルムを形成すると、生体内で排除されにくくなるという問題に加えて、病原性の高い細菌がバイオフィルムから離脱することで、感染を拡大・悪化させる可能性があることが判明した。このことからバイオフィルム感染症の治療において、離脱細菌に対する殺菌の重要性が示唆されるが、抗菌薬が有効であることが明らかとなった。但し、離脱細菌はバイオフィルムを形成しやすく、再形成すると治療は困難となると考えられることから注意が必要である。

研究成果の概要(英文)：Bacterial biofilms are clusters of bacteria and biofilm-residing bacteria can be resistant to both the immune system and antibiotics. Therefore, medical importance of biofilm-related infections has been recognized. However, the pathogenicity of biofilm bacteria has not been fully elucidated. We found that bacteria caused biofilm dispersal and dispersed bacteria evaded host immune response and caused a lethal infection in mice model. These results suggested that biofilm dispersal promote biofilm-related infections.

研究分野：細菌学

キーワード：バイオフィルム バイオフィルム感染症 病原性 離脱細菌

## 1. 研究開始当初の背景

細菌感染症の80%以上はバイオフィーム関連感染症であると言われ、その中でも黄色ブドウ球菌はデバイス関連感染の主要な原因菌である。しかし、いまだ有効な治療法は確立しておらず、バイオフィーム感染症における宿主免疫応答や菌の免疫回避機構については不明である。またバイオフィームからの菌の離脱については、いくつかの機構が報告されているが離脱細菌の性状や病原性についてわかっていない。

我々は、黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成を調べる中で、菌がバイオフィームから離脱して浮遊状態に戻ることを見出した。これまで、バイオフィームから離脱した菌は、バイオフィーム形成前の浮遊細菌と同じ状態に戻ると考えられてきた。しかし、好中球による菌の貪食を調べたところ、バイオフィーム離脱細菌は浮遊細菌と比べて貪食されにくく(図1)、生き残りやすいことが判明した。このことからバイオフィーム離脱細菌は、元の浮遊細菌とは異なる性質を持ち、病原性が高い可能性が示唆された。

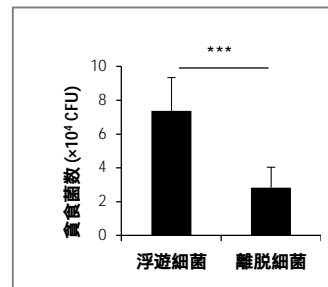


図1 好中球による菌の貪食

## 2. 研究の目的

これまでの検討から、バイオフィーム内で抗菌剤や宿主の攻撃から逃れていた細菌は、バイオフィームから離脱後も宿主の防御機構を回避し感染の拡大を引き起こす可能性が考えられる。そこで本研究では、バイオフィームからの菌の離脱に着目し、バイオフィーム感染症に対する新たな治療法の開発を目指すことを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 離脱細菌の性状と病原性解析

離脱細菌の白血球貪食抵抗性をもたらす因子を明らかにするため、菌体表面因子に着目し、浮遊細菌・離脱細菌における細胞外多糖 poly-N-acetylglucosamine (PNAG)の発現をレクチンプロットにより解析した。各菌を酵素処理してPNAGを消失させ、好中球に対する貪食抵抗性への影響を調べた。また離脱細菌の付着能やバイオフィーム形成能についてマイクロプレートアッセイ法を用いた。離脱細菌の病原性を解析するため、マウス感染モデルを用いて各菌を腹腔内投与し、感染マウスにおける血中菌数、臓器内菌数をコロニーカウント法で調べ in vivo での菌の生存を解析した。また感染マウスの生存率について経的に解析し菌の病原性を比較した。

### (2) 離脱細菌に有効な薬剤の検討

二次元電気泳動により離脱細菌の網羅的発現解析を行い、離脱細菌を殺菌するための標的因子の探索を試みた。抗菌薬感受性は、浮遊細菌・離脱細菌に作用機序の異なる種々の抗菌薬(細胞壁合成阻害剤・タンパク合成阻害剤・核酸合成阻害剤)を作用させた後、コロニーカウント法により菌の生存率を解析することで調べた。また離脱細菌の付着を抑制する物質の探索は、離脱細菌に様々な物質(レクチン、界面活性剤、多糖、抗菌薬・抗菌物質など)を添加し、付着への影響を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 離脱細菌における貪食抵抗因子の解析

浮遊細菌に対し、バイオフィームからの離脱細菌では、好中球との共培養3時間後においても、高い生存率を示した(図2)。貪食に対する抵抗因子について検討したところ、離脱細菌では、貪食抵抗性への寄与が報告されている多糖(PNAG)の発現が多くみられた(図3A)。PNAG分解酵素(dispersin B)で処理すると離脱細菌は浮遊細菌と同程度まで好中球に貪食されやすくなり(図3B)、好中球存在下での生存率が低下し殺菌されやすくなった(図3C)。このことから離脱細菌ではPNAGの発現が好中球に対する貪食抵抗性に作用し、その結果、菌の生存率が高くなっていると考えられた。PNAG発現はバイオフィーム内で時間とともに増加し、離脱細菌は菌体表面にPNAGを多く保持したまま遊離してくると考えられた。また離脱細菌は、PNAG依存的にポリスチレン付着能(図4)やバイオフィーム形成能が高かった。

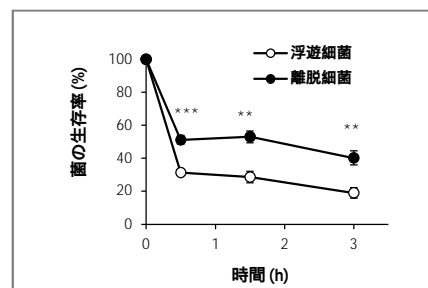


図2 好中球共培養後の菌の生存率

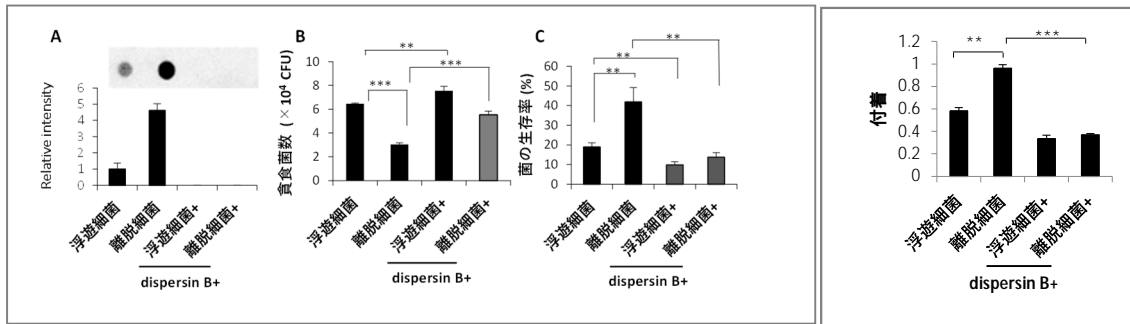


図3 PNAG 発現と好中球による貪食・菌の生存率への影響

図4 離脱細菌の付着能

(2) 離脱細菌の病原性の解析

マウス感染モデルを用いて離脱細菌の病原性を検討した。バイオフィーム離脱細菌の投与群では、血中菌数、臓器内菌数が高い傾向にあり、またマウスの生存率は50%に低下した(図5)。一方、浮遊細菌やPNAG欠失変異株の投与群では、マウスの死亡はみられなかった。以上より、離脱細菌は *vivo* で生存しやすく、高い病原性を示すことが明らかとなった。

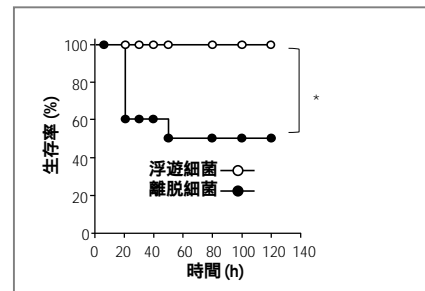


図5 離脱細菌感染マウスの生存率

(3) 離脱細菌に有効な薬剤の検討

治療においては離脱細菌を速やかに殺菌・除去することも重要になると考えられ、離脱細菌に対して有効な薬剤・化合物の探索・検討を行った。網羅的発現解析による離脱細菌の性状解析を行い、離脱細菌を殺菌するための標的の探索を試みた。離脱細菌で増加・減少した複数のタンパク(ストレス応答タンパク、代謝関連タンパクなど)が見られたが、殺菌の標的に結び付くものは得られなかった。次に離脱細菌に有効な抗菌薬について検討した。バイオフィーム内の細菌は抗菌薬に抵抗性があることが報告されているが、離脱細菌では不明である。作用機序の異なる種々の抗菌薬に対する感受性について調べたところ、離脱細菌はゲンタマイシンなどのアミノグリコシド系抗菌薬に対して感受性が低下していたが、その他の薬剤(バンコマイシン、ペニシリン系・セフェム系抗菌薬やマクロライド系・オキサゾリジノン系抗菌薬、ニューキノロン系抗菌薬、リファンピシンなど)には浮遊細菌と同様の感受性を示した。この傾向は、バイオフィームを音波破碎して得られた浮遊細菌においても見られ、離脱細菌はバイオフィーム内の細菌と共通する性状を保持している可能性が示唆された。以上より離脱細菌は一部の抗菌薬に対しては抵抗性を示すが、多くの抗菌薬が有効であることが明らかとなった。このことから抗菌薬による治療が有効であることが示唆された。

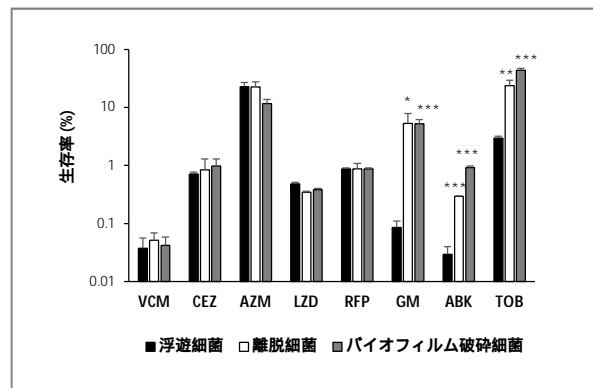


図6 離脱細菌の抗菌薬感受性

離脱細菌は、付着力(図4)やバイオフィーム形成能が高いことからバイオフィームから離脱した後に、新たな部位へ付着し素早くバイオフィーム形成を行う可能性が示唆される。そこで、離脱細菌の付着を抑制・制御する方法について、様々な物質を用いて検討を行った。付着抑制作用の有無を調べたところ、リファンピシンを含む数種類の抗菌薬で離脱細菌の付着が優位に抑制されたが、ゲンタマイシンやシプロフロキサシンなどの抗菌薬では効果が見られなかった。これらのことから、離脱細菌に対しては、抗菌活性に加えて、付着抑制作用を示すような抗菌薬を使用するとより効果が発揮される可能性が示唆された。

以上の結果から、黄色ブドウ球菌のバイオフィーム離脱細菌は、浮遊細菌とは異なる性状を有し、細胞外多糖 PNAG の発現により好中球の貪食・殺菌に抵抗性を持つこと、マウス感染モデルで高い病原性を発揮することが明らかとなった。これまで、黄色ブドウ球菌におけるバイオフィーム離脱の研究では、agr や PSMs などを経た離脱機構が報告されているが、離脱細菌の性状についての報告はない。本研究が示したバイオフィーム離脱細菌の病原性は新しい知見であり、バイオフィーム感染症における離脱細菌の重要性を示唆していると考えられる。バイ

オフィームからの離脱について研究が進んでいる緑膿菌においては、離脱細菌が浮遊細菌と異なる性状を持ち、マクロファージへの傷害性を示すことや *in vivo* 感染実験における病原性が報告されており (Nat Commun.2014)、離脱細菌が高い病原性を有することは菌種に依存しない特徴であるかもしれない。

また本研究では、離脱細菌に対して抗菌薬による治療が有効であることが明らかとなったが、PNAG は細胞やデバイスへの付着を促進すること、離脱細菌はバイオフィーム形成しやすいことから付着抑制の観点においての対策も重要であると考えられる。いくつかの抗菌薬が離脱細菌の付着を抑制すること示したが、sub-MIC 濃度の抗菌薬が菌の付着を抑制するという報告はこれまでも散見されておりメカニズムが不明な場合が多い。本研究も含め抗菌薬による付着抑制については更なる検討が必要であると考えられる。しかし、PNAG はグラム陽性菌・陰性菌を含む様々な病原細菌に存在しており、ワクチン抗原として研究されていることから、PNAG 抗体による離脱細菌の付着抑制やオプソニン化は治療に応用できる可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田嶋亜紀子
2. 発表標題 バイオフィルム遊離細菌における好中球貪食回避
3. 学会等名 第93回細菌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田嶋亜紀子
2. 発表標題 バイオフィルムdispersed細菌の病原性
3. 学会等名 第92日本細菌学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------