

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09858

研究課題名(和文) 口腔由来高度多剤耐性黄色ブドウ球菌のリスク診断法確立に向けた基盤研究

研究課題名(英文) Fundamental research to establish a risk diagnostic method for highly multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* of oral origin.

研究代表者

松尾 美樹 (MATSUO, MIKI)

広島大学・医系科学研究科(歯)・准教授

研究者番号：20527048

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では内在性遺伝子変異が黄色ブドウ球菌の薬剤感受性に影響を与えることを検証した。黄色ブドウ球菌約100株のゲノム解析を行った結果、*graRS*や*dlt*、*mprF*遺伝子に共通した多型性を認め、この多型が陽性チャージの抗菌物質感受性に影響を与えること、この多型性は必ずしもST分類には一致しないことを見出した。一方、薬剤耐性黄色ブドウ球菌に効果を認める、バクテリオシンを4つ見出した。そのうち2つのバクテリオシンは、上記プロジェクトで黄色ブドウ球菌を分離する過程でヒトから分離した *Staphylococcus* 属であり、常在細菌の一部が薬剤耐性黄色ブドウ球菌の排除を担うことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年薬剤耐性菌問題が深刻化しており、特に多剤耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)は常在細菌であるとともに、多種多様な病原性因子を持つ病原細菌である。一般的に黄色ブドウ球菌はプラスミド等から外来性に薬剤耐性を獲得することは知られているが、本研究から薬剤耐性はSTに依存せず、特定の遺伝子多型性により影響を受けることが示唆され、この知見は、現在のST分類による薬剤耐性のリスク判定に加え、特定の遺伝子パターンにも着目した解析が必要であることを提案できる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to verify that endogenous genetic variation affects the drug susceptibility of *Staphylococcus aureus*, and genomic analysis of approximately 100 isolates of *S. aureus* showed a common polymorphism in the *graRS*, *dlt* and *mprF* genes, which affected the susceptibility of positive charges to antimicrobial substances, and that this polymorphism was not necessarily consistent with ST classification (Under review). On the other hand, we found four bacteriocins, bacterial-derived antimicrobial factors that were found to be effective against drug-resistant *S. aureus*. Two of these bacteriocins were from the genus *Staphylococcus*, which was isolated from humans in the process of isolating *S. aureus* in the above project, suggesting that some indigenous bacteria are responsible for the elimination of drug-resistant *S. aureus*.

研究分野：細菌学・口腔細菌学

キーワード：薬剤耐性 黄色ブドウ球菌 バクテリオシン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本来、生体の中で外環境と接する部位(口腔、消化器官、膣、肛門、皮膚等)は常在細菌が生息している。一方、血管内や心臓などのように、外環境と接していない器官には微生物はおらず、このような組織で微生物が増殖する、つまり感染症が起こると死に至ることがある。外環境と接していない部位への微生物の侵入は、主に手術中や外傷性疾患によるものが多い。また、本来微生物が常在する器官においても、その菌数は生態に害を及ぼさない数、つまり感染症が起こらない数に免疫系によってコントロールされているが、高齢者や基礎疾患を持つ患者様では生体内の細菌数が増えてしまい、感染症が起こりやすい。細菌による感染症治療には抗生物質(現在は「化学療法剤」「抗菌剤」と呼ばれる)が用いられるが、投与量や頻度によっては薬剤に耐性を持つ細菌(薬剤耐性菌)が爆発的に増加し、感染症が継続してしまう。申請者が今回ターゲットにしている黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*, 以下 Sa) はヒトの皮膚や粘膜に常在する細菌である。Sa の問題点としては、本菌が多種多様な病原性因子を持つ病原細菌であることに加え、抗菌剤による薬剤耐性化が起こりやすい点が挙げられる。2001 年小島らや 2004 年伊藤らの報告によると、黄色ブドウ球菌のヒトへの定着率は各々 26.9%と 27.1 %、また申請者らは 30 歳以下の若年層 377 名の鼻腔、口腔からの黄色ブドウ球菌の分離率を検証した結果、39.5%が本菌を保有しており、その内 68.4%が全身疾患に直結する口腔から分離されたことから、Sa は決して稀な常在細菌ではない。2013 年アメリカ疾病予防管理センター (CDC)の報告によると、アメリカではメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(以下 MRSA)に 8 万人罹患し、約 1 万人が死亡したとの報告があった。また、オニールレポート(2014)によると、2050 年には薬剤耐性菌による死者数が癌を上回るという予測が報告された。このレポート中にある感染症を惹起する微生物の中には、MRSA 等の種々の薬剤耐性菌が含まれる。これらの報告を受け、世界中で薬剤耐性菌に対する対策が提唱され、2016 年に開催された G7 伊勢志摩サミットにおいて、保健課題の一つである薬剤耐性菌 (AntiMicrobial Resistance, AMR) 対策が議論された。AMR 対策の議論がなされる理由としては、AMR の増加に伴い既存の化学療法剤では治療効果が上がらないこと、新規化学療法剤の開発が手詰まり状態にあることが挙げられる。この若年層からの分離率の結果は既報の約 1.5 倍の定着率であり、Sa の定着率は増加傾向にあると考えられる。さらに、分離した Sa からは、MRSA が多数分離された。これらの分離した MRSA のメチシリン感受性を検証した結果、低感受性から高度耐性まで多様に富んでおり、既報のメチシリン耐性因子である *mecA* 発現にも大きな際は認められず、外来性以外の耐性因子の存在が示唆された。そこで、抗菌物質であるナイシンを用いて MRSA から潜在的な高度薬剤耐性化株を分離する手法を確立した。この手法により解析を行った MRSA 3 株全てにおいて、高度耐性株が分離された。一部の株を解析した結果、「内在性遺伝子の点変異による耐性化」株が存在することを明らかにした。これらの研究から、実際にヒトに常在している黄色ブドウ球菌にも、潜在的な高度薬剤耐性黄色ブドウ球菌が存在しているのではないかと考えた。これまでの MRSA の薬剤耐性化は、*mecA* を外来性に獲得することで耐性化するという「外来性因子獲得による耐性化」によるものであるという考え方が一般的で、申請者が見出した遺伝子の点変異という「内在性因子」による耐性化の報告はこれまでに 1 報のみであった。申請者の実験から、薬剤の使用頻度と使用濃度により潜在的な高度薬剤耐性菌の存在が証明されたことから、まだ市中に拡散していない潜在性の薬剤耐性菌を検証する意義は高い。

### 2. 研究の目的

本研究では、全身感染症の起点となる口腔由来黄色ブドウ球菌について、高度薬剤耐性黄色ブドウ球菌の出現割合や遺伝子変異と病原性の相関を網羅的に検証する目的としている。高度薬剤耐性能を持つ黄色ブドウ球菌の市中における潜在率の検証も同時に行うことで、将来的に口腔由来黄色ブドウ球菌の高度薬剤耐性化リスクのトリアージを行うことで診断法確立へ向けた基盤研究を行うことが最終的なゴールである。さらに、本研究では、口腔から効果的に黄色ブドウ球菌を排除する方法も模索することも視野に入れている。

### 3. 研究の方法

#### 口腔・鼻腔の黄色ブドウ球菌の分離

黄色ブドウ球菌用選択培地 No. 110 培地に、口腔・鼻腔からのスワブサンプルを塗布し、一晚培養する。コロニーを採取し、細菌培養用液体培地 (TSB) にて培養し、菌を回収し、lysostaphin 処理にて DNA を抽出する。抽出した DNA を用いて、黄色ブドウ球菌特異的 primer を用いて PCR を行い、黄色ブドウ球菌を同定する。同定された黄色ブドウ球菌はグリセロール処理にて -80 にて永久保管する。

#### 黄色ブドウ球菌の薬剤感受性試験

各種抗菌剤に対する感受性試験は、最小発育阻止濃度 (MIC)法を用いた。一晚培養した黄色ブド

ウ球菌を 660nm の光学濃度が 1.0 (  $1 \times 10^9$  個/ml ) になるように調整し、TSB で 100 倍に希釈した (  $1 \times 10^7$  個/ml )、96 ウェル丸底プレートで、希釈した培養液 10  $\mu$ l を、抗菌剤 2 倍連続希釈液 OFX ( 0.008-8  $\mu$ g/ml )、VCM ( 0.016-16  $\mu$ g/ml )、EM ( 0.008-8  $\mu$ g/ml ) または DAP ( 0.016-16  $\mu$ g/ml ) を 50  $\mu$ g/ml の Ca<sup>++</sup>、GM ( 0.125-128  $\mu$ g/ml ) および KM ( 0.125-128  $\mu$ g/ml ) で 2 倍に連続希釈した培地 100  $\mu$ l に接種した。MIC は、37 °C で 24 時間静置培養した後に決定した。実験は独立して 3 回行い、中央値を MIC として報告した。

### ゲノム解析

DNA の抽出方法は、と同様の lysostaphin 処理にて行なった。その後、ゲノム解読用に、上清にフェノール-クロロホルムを加え、よく混合した後、遠心分離して上清を回収した。等容量のエタノールを加えて DNA を沈殿させた。遠心分離後、沈殿物を蒸留水に溶解した。全ゲノムシーケンス ( WGS ) は、Illumina HiSeq X FIVE および GridION プラットフォーム ( Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK ) を用いて行った。イルミナのショートリードと GridION のロングリードのハイブリッドアセンブルをハイブリッドアセンブラー Unicycler v0.5.0 ( 58 ) を用いて行い、染色体の完全配列を得た。

### バクテリオシン同定・精製

バクテリオシン産生菌の同定は、Direct 法を用いて行った。Direct 法にて黄色ブドウ球菌をはじめとする複数の病原細菌に阻止円を形成したバクテリオシン産生菌を培養し、macro prep を用いて簡易精製を行う。簡易精製したバクテリオシンは、HPLC を用いてペプチド分収を行い、活性を認めた画分については、EMS-MS 解析を行いバクテリオシンの同定を行った。

### バクテリオシンの MRSA に対する抗菌効果の検証

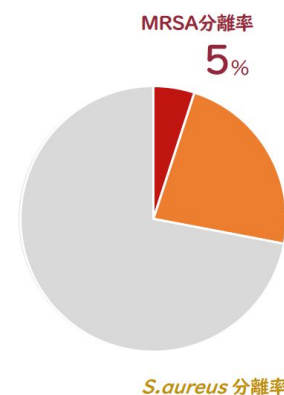
MRSA は申請者が所属する研究室で保有する laboratory strain MW2 株をはじめ、臨床から分離し mecA 陽性でかつオキサリリンに対する MIC が 8  $\mu$ g/ml 以上の菌株を MRSA とし、Direct 法もしくは spot-on-lawn 法、MIC 法を用いて感受性の検証を行なった。

## 4. 研究成果

広島大学病院歯科外来における黄色ブドウ球菌ならびに MRSA の分離状況

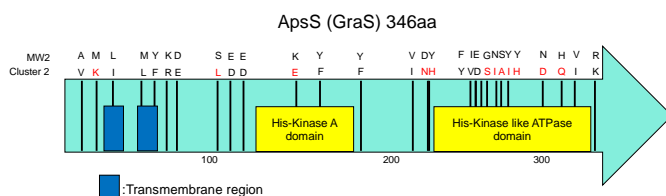
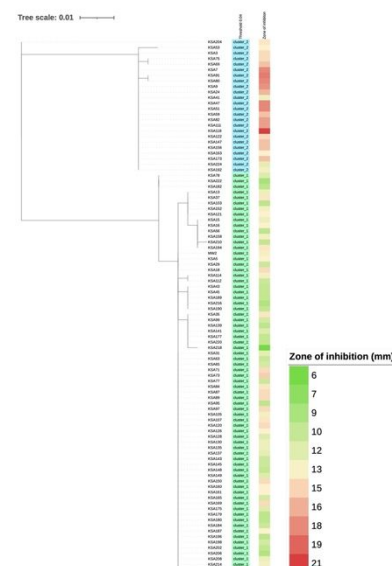
今回広島大学病院歯科外来の協力の元、口腔・鼻腔から黄色ブドウ球菌を分離した。495 名の被験者にて分離を行った結果、黄色ブドウ球菌の分離率は 28%、MRSA の分離率は 5% であった。これまでの先行研究では、市中における黄色ブドウ球菌の分離率は約 30%、そのうち 1 割程度が MRSA との報告であることから、歯科外来患者はこれまでに報告されている市中黄色ブドウ球菌の分離状況とほぼ同様であることが示唆された。別プロジェクトにて、高齢者施設における黄色ブドウ球菌の分離を試みており、高齢者施設では 35~40% の分離率であった ( 論文投稿準備中 )。この結果は、以前 Kajihara らが自立性を持たない特老入居者から分離を試みた際の分離率が約 40% ほどであったことから、年齢が上昇するほど、黄色ブドウ球菌の分離率は増加傾向にあることが認められた。このことから、若いうちからの積極的な黄色ブドウ球菌の除菌を行うことが大切であると考えられる。

### 歯科外来



### 広島大学病院歯科外来から分離した黄色ブドウ球菌のゲノム解析

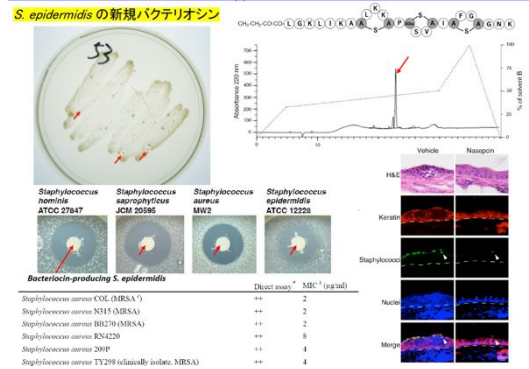
分離した黄色ブドウ球菌の WGS を用いて系統樹を作成した結果、右図に示す通り分離した黄色ブドウ球菌はいくつかのグループに大別された。この結果を、各種抗菌剤感受性結果と比較した結果の一例を右に示す。一番右の heat map が抗菌剤感受性の結果であるが、一番上のグループの黄色ブドウ球菌は陽性にチャージする抗菌剤に対する感受性が高い傾向を認めた。この際、この水色のグループは陽性チャージの因子に対し抵抗性を獲得する GraRS とその制御下にある遺伝子に特徴的な変異を認めた ( 下図 )。



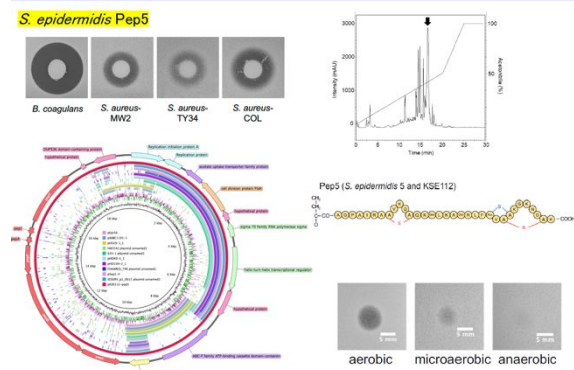
### バクテリオシンの分離・精製

今回黄色ブドウ球菌分離対象とした患者から、表皮ブドウ球菌も分離した。分離した表皮ブドウ球菌を用いて、黄色ブドウ球菌をはじめとした各種病原細菌に対する感受性を検証した結果、黄色ブドウ球菌に効果を示すバクテリオシン産生株を見出し、バクテリオシンを精製し、同定した(下図①～④)。これらのバクテリオシンは *Staphylococcus* 属に抗菌効果が高く、特筆すべきは MRSA に対する高い抗菌力を発揮している。近年既存の化学療法剤による耐性菌問題を解決する、第 2 の抗菌剤として期待がもたれる。

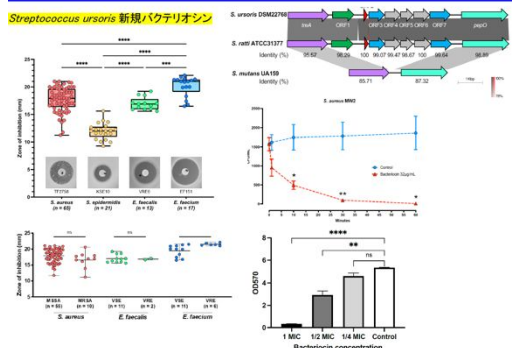
### 新規抗 *S.aureus* 効果のあるバクテリオシンの探索 ①



### 新規抗 *S.aureus* 効果のあるバクテリオシンの探索 ②



### 新規抗 *S. ursoris* 効果のあるバクテリオシンの探索 ④



### 新規抗 *S.aureus* 効果のあるバクテリオシンの探索 ③



さらに、本研究を推進する過程で、う蝕細菌 *Streptococcus mutans* に対する効果を認めるバクテリオシンを分離することに成功した。

### バクテリオシンに対する耐性獲得機構の解明

当初の研究計画には入っていなかったが、研究を進める過程で分離された *S. mutans* にも抗菌効果を認めるバクテリオシンについて、さらに研究を進めた結果、耐性因子について興味深い知見が得られた。本研究で分離した *Staphylococcus* 属が産生するバクテリオシンの一つであるヌカシンに対する *S. mutans* 127 株の感受性を検討した。その結果、菌株間で多様な感受性が検出された。19 株はヌカシン感受性の原因である LctF が破壊されたタイプ I であったが、残りの 108 株は LctF が intact なタイプ II であり、ヌカシンに対する耐性を示した。しかし、タイプ I の菌株もある程度はヌカシンに抵抗性を示した。興味深いことに、タイプ I の 18/19 株 (94.7%) は、 $\Delta$  タシン K8 の合成に関わる *mukA-T* 遺伝子座と ABC トランスポーターの *mukFEG* を保有していた。一方、II 型株では、*mukA-T* 遺伝子座と *mukFEG* の両方を持つ株はわずか 6/108 株 (5.6%)、*mukFEG* のみを持つ株は 19/108 株 (17.6%)、*mukA-T* も *mukFEG* も持たない株は 83/108 株 (76.9%) であった。また、MukF には 2 つの変異体があることもわかった：305 アミノ酸 (型) と 302 アミノ酸 (型) であった。I 型株はすべて 型 (MukF ) であったが、*mukFEG* を持つ II 型株のほとんど (22/25 株) は 型 (MukF ) であった。そこで、MukF EG または MukF EG で相補された *mukFEG* 欠失変異体を作製したところ、MukF EG のみがヌカシン抵抗性に関与していた。タイプ II-LctFEG のヌカシン耐性能は MukF EG のそれよりも強かった。以上の結果より、新規のヌカシン抵抗性因子 MukFEG を同定し、*mukA-T* 遺伝子に依存した遺伝子多型を介して LctFEG または MukFEG のいずれかがほとんどの株で活性を示すことが明らかとなった。

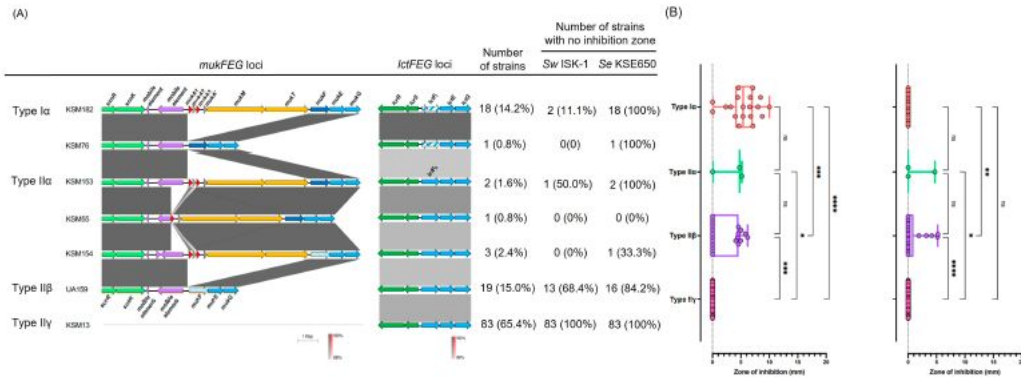
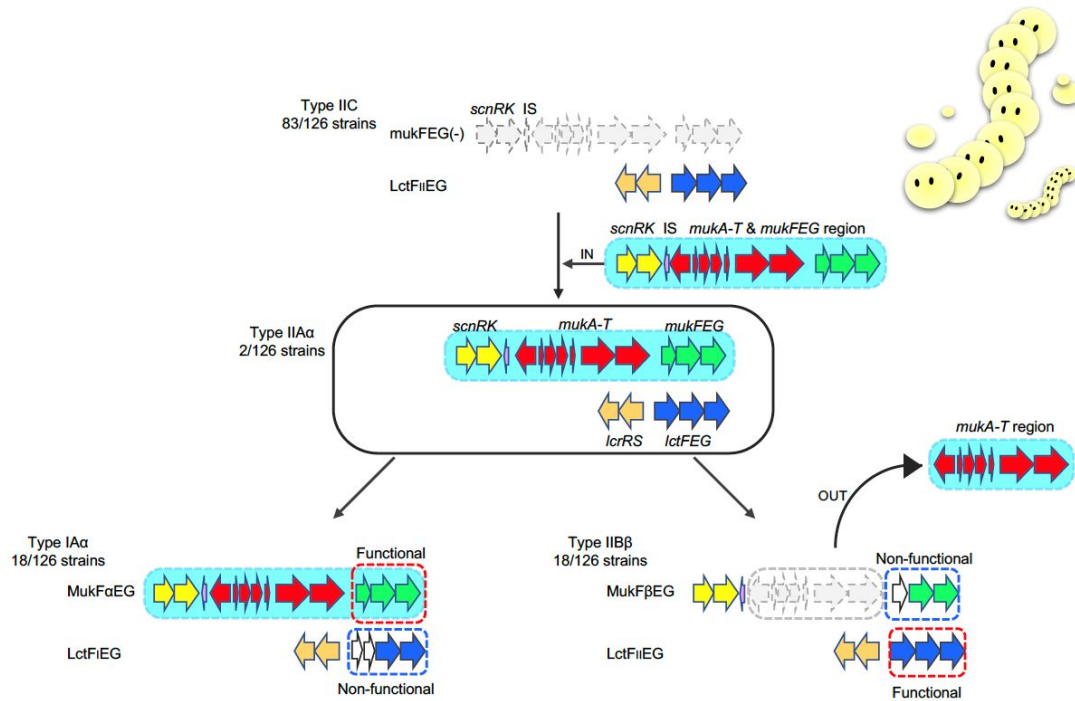


FIG 2 Open reading frame (ORF) map of *mukFEG* and *lctFEG* loci and susceptibility to nukacin ISK-1 (Sw ISK-1) and nukacin KSE650 (Se KSE650) in each group. (A) ORF map of *mukFEG* and *lctFEG* in representative strains of each type (left and middle) and number of resistant strains (no inhibition zone) of each type obtained by the direct method (right). (B) Distribution of zones of inhibition obtained with all strains of each type by the direct method. Sw ISK-1, susceptibility against *S. warneri* ISK-1; Se KSE650, susceptibility against *S. epidermidis* KSE650.

これらの知見に基づき、LctFEG と MukFEG という 2 つの ABC トランスポーター間で、*muk* 領域の有無による多型の発生を提唱した。耐性機能を担う 2 つの因子が存在する場合、「スイッチング」が起こると考えられ、その際、遺伝子の挿入によって不要な ABC トランスポーターが遺伝子改変され、より有効な因子のみが耐性機能を発揮するようになると思われる（下図）。今回の研究では、バクテリオシン合成遺伝子がこのスイッチング機能において中心的な役割を果たしていることが示唆された。しかし、この遺伝子スイッチングのメカニズムは不明であり、本研究は、細菌がバクテリオシン耐性機構を獲得する新たな遺伝子変異機構の存在を示唆している。本研究成果は、遺伝子獲得による細菌の進化を理解する上で重要である。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mi Nguyen-Tra Le, Miki Kawada-Matsuo, Hitoshi Komatsuzawa	4. 巻 13
2. 論文標題 Efficiency of Antimicrobial Peptides Against Multidrug-Resistant Staphylococcal Pathogens	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Microbiol.	6. 最初と最後の頁 930629
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2022.930629	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kenta Nakazono, Mi Nguyen-Tra Le, Miki Kawada-Matsuo, Noy Kimheang, Junzo Hisatsune, Yuichi Oogai, Masanobu Nakata, Norifumi Nakamura, Motoyuki Sugai, Hitoshi Komatsuzawa	4. 巻 17(1)
2. 論文標題 Complete sequences of epidermin and nukacin encoding plasmids from oral-derived Staphylococcus epidermidis and their antibacterial activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0258283
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0258283	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sadaoka N, Le MN-T, Kawada-Matsuo M, Eng S, Zendo T, Nakanishi J, Takeda K, Shiba H, Komatsuzawa H	4. 巻 17(1)
2. 論文標題 Opposing genetic polymorphisms of two ABC transporters contribute to the variation of nukacin resistance in Streptococcus mutans	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Appl Environ Microbiol.	6. 最初と最後の頁 e0208423
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/aem.02084-23	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawada-Matsuo M, Le MN, Komatsuzawa H.	4. 巻 12(10)
2. 論文標題 Antibacterial Peptides Resistance in Staphylococcus aureus: Various Mechanisms and the Association with Pathogenicity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes (Basel).	6. 最初と最後の頁 1527
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/genes12101527.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Haruta A, Kawada-Matsuo M, Le MN, Yoshikawa M, Kajihara T, Yahara K, Kitamura N, Kutsuno S, Arai C, Takeuchi M, Sugawara Y, Hisatsune J, Tsuga K, Ohge H, Sugai M, Komatsuzawa H.	4. 巻 89(1)
2. 論文標題 Disinfectant Susceptibility of Third-Generation-Cephalosporin/Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacteria Isolated from the Oral Cavity of Residents of Long-Term-Care Facilities	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Appl Environ Microbiol.	6. 最初と最後の頁 e0171222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/aem.01712-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Le MN, Kawada-Matsuo M, Komatsuzawa H.	4. 巻 10(3)
2. 論文標題 Gene Rearrangement and Modification of Immunity Factors Are Correlated with the Insertion of Bacteriocin Cassettes in <i>Streptococcus mutans</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiol Spectr.	6. 最初と最後の頁 e0180621
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/spectrum.01806-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Miki Kawada-Matsuo, Mi Nguyen-Tra Le, Hitoshi Komatsuzawa
2. 発表標題 Novel candidates of antimicrobial peptides (AMPs) against MRSA and Resistance mechanisms of MRSA against AMPs.
3. 学会等名 The 15th Korea-Japan International Symposium on Microbiology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木優仁、松尾美樹、Mi Nguyen-Tra Le、小松澤均
2. 発表標題 表皮ブドウ球菌由来バクテリオシン Pep5 の解析および黄色ブドウ球菌における菌体表層チャージを介した Pep5 耐性因子の検証
3. 学会等名 第66回日本ブドウ球菌研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木優仁、松尾美樹、Mi Nguyen-Tra Le、小松澤均
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌における菌体表層チャージを介した新規バクテリオシン耐性メカニズムの解明
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Miki Kawada-Matsuo Mi Nguyen-Tra Le Hitoshi Komatsuzawa
2. 発表標題 Identification of a new resistance factor against nukacins in Streptococcus mutans
3. 学会等名 第63回 歯科基礎医学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Miki Kawada-Matsuo Mi Nguyen-Tra Le Hitoshi Komatsuzawa
2. 発表標題 Complete sequences of bacteriocin plasmids of S. epidermidis and their antibacterial activity
3. 学会等名 第95回 日本細菌学会総会
4. 発表年 2022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
研究 分 担 者	小松澤 均  (Komatsuzawa Hitoshi)  (90253088)	広島大学・医系科学研究科(歯)・教授   (15401)	



6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	菅井 基行  (Sugai Motoyuki)  (10201568)	国立感染症研究所・薬剤耐性研究センター・センター長    (82603)	
研究分担者	LE NGUYEN・TRA・MI  (Le Nguyen Tra Mi)  (20897904)	広島大学・医系科学研究科（歯）・助教    (15401)	

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