

バイオフィルム感染症制圧に向けての展望

水之江義充、杉本真也、奥田賢一

所属機関：東京慈恵会医科大学 細菌学講座
慈恵バイオフィルム研究センター
〒105-8461 東京都港区西新橋 3-25-8
TEL: 03-3433-1111 FAX: 03-3436-3166
E-mail: mizunoe@jikei.ac.jp

【要約】

黄色ブドウ球菌は、創傷感染などの皮膚感染症から心内膜炎や骨髄炎のような重症感染症まで幅広い感染を引き起こす [3]。メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) は院内感染症の重要な原因菌であり、治療困難な症例を増加させている。また、人工医療材料を用いた治療に伴い、バイオフィルムに関連した難治性の感染症が増加し問題となっている。バイオフィルム感染症の予防法や治療法の開発には、バイオフィルム形成メカニズムの解析が必要と考えられる。完成したバイオフィルムの構成成分 (マトリクス) は、多糖、DNA、タンパク質によりなっていると考えられている。しかしながら、マトリクスタンパク質の解析はほとんどなされていない。我々は高濃度の塩処理によりマトリクスを抽出し、そこに含まれるタンパク質を同定した。マトリクス中には、130 種類のタンパク質が存在することが判明した。さらに、細菌によって産生されるペプチド性抗菌物質であるバクテリオシンのバイオフィルムに対する殺菌効果を解析した。構造と作用機作がそれぞれ異なる 3 種のバクテリオシン (ナイシン A、ラクティシン Q、ヌカシン ISK-1) を使用した。ナイシンとラクティシン Q は液体培養した MRSA に対してはほぼ同等の殺菌活性を示し、バイオフィルムを形成した MRSA に対してはナイシンの方が高い活性を示した。ヌカシン ISK-1 は液体培養した MRSA に静菌活性を示し、バイオフィルムに対する殺菌活性は示さなかった。ナイシンとラクティシン Q は細菌の細胞膜に孔を形成して殺菌活性を示すことが知られており、バイオフィルム内においても同様の作用機作により活性を示すと考えられる。以上の結果から、マトリクスタンパク質を利用したワクチンの作製や孔形成を行うバクテリオシンの使用がバイオフィルム感染症の予防・治療の開発に繋がると考えられる。

キーワード：黄色ブドウ球菌、バイオフィルム、マトリクス、バクテリオシン

はじめに

中心静脈カテーテル、人工関節等の医療材料を体内に留置する機会が増加し、難治性のバイオフィルム感染症が重要な問題となっている。バイオフィルム感染症の予防や治療にあたっては、i) バイオフィルムのできにくい医療素材

の開発、ii) バイオフィルム形成阻害・破壊因子の発見、iii) バイオフィルム内の菌に対する殺菌剤の発見等が考えられる。上記のことを達成するためには、バイオフィルムの形成メカニズムの解明が重要である。本稿では、院内感染症の原因菌として重要な MRSA のバイオフィルムマトリクスを構成するタンパク質の解析およびバイオフィルム殺菌剤の開発について述べる。また、グラム陰性菌および陽性菌のバイオ

フィルム形成過程をそれぞれの代表的な菌である大腸菌およびブドウ球菌を用いて説明する。

細菌のバイオフィーム形成メカニズム

細菌のバイオフィームは、平坦なシート状のものだと考えられていたが、コンフォーカルレーザー顕微鏡や走査型電子顕微鏡などの観察により、キノコのような複雑な形態（英文では、mushroom like structure）をしていることがわかってきた（図1）。バイオフィーム内の菌は、薬剤耐性になることが知られている。ある薬剤に対しては1,000倍の耐性を示す事もある。そのメカニズムは、バイオフィームの膜を薬剤が通過できないことによるものと考えられてきた。しかし、最近の研究により、バイオフィーム内では薬剤をトラップして汲み出す遺伝子が発現し、そのことが薬剤耐性獲得に重要な役割を果たしていることがわかってきた。

細菌は、グラム染色法により、紫色に染まるグラム陽性菌と赤色に染まるグラム陰性菌の2つに分けられる。大腸菌、緑膿菌などは、グラム陰性菌である。大腸菌を例にとり、グラム陰性菌のバイオフィーム形成過程と必要な因子について図1に示す。菌は、まず鞭毛で遊走し医療材料・組織表面に付着する。その後、線毛を発現し強固に付着し増殖する。やがて菌体外多糖体を分泌しキノコ様のバイオフィームを形成する。菌塊と菌塊の間には水チャンネルがあり、栄養や老廃物が行き来すると考えられている。

このような過程をバイオフィームの成熟と呼んでいる。バイオフィームの成熟には、さらに、カーリー（curli）と言う構造物が必要である。図2に線毛・鞭毛・カーリーの電顕写真を示す。カーリーは、大腸菌やサルモネラ等の菌体表面上に発現するクルクルとした構造物でカーリーヘヤーに因んで命名された。通常の培養法（寒天培地や液体培地）では、低温（30℃以下）でのみ発現することより病原性に参与していないと考えられていた。しかし、バイオフィーム内では、37℃でもカーリーが発現することが示された [1]。走査型電子顕微鏡でバイオフィームを観察すると、野生株（カーリー保有株）は、典型的なキノコ様の成熟したバイオフィームを形成するが、カーリー欠損変異株では、典型的なバイオフィームは形成されない（図3）。バイオフィーム形成能と病原性との関連をマウスの尿路感染症モデルを用い検討すると、感染後3日目で、キノコ様バイオフィームを形成する野生株（カーリー陽性株）感染マウスは全頭死亡したが、カーリー欠損株感染マウスは70%が生きていた（図4）。細菌のバイオフィーム形成能は、病原性に強く関与していることが判明した。バイオフィーム内の細菌は、遺伝子発現が浮遊細菌とは異なり、通常37℃（生体内）では、発現しないと考えられていたカーリーなどの病原因子を発現する可能性が示された。

以上よりバイオフィーム内の細菌の遺伝子発現やバイオフィーム形成メカニズムを解明する

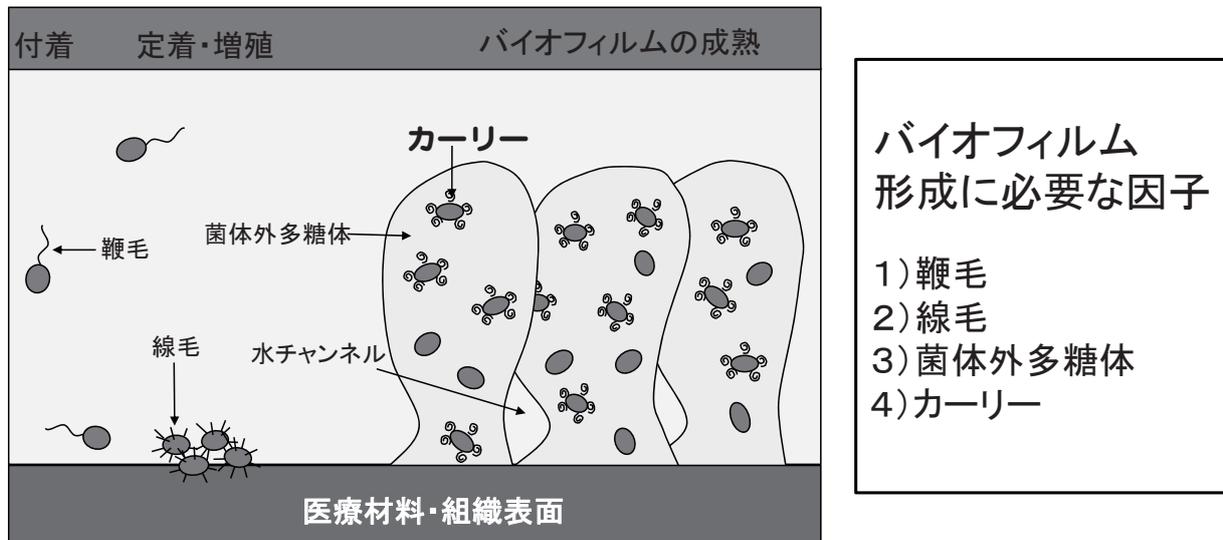


図1 バイオフィームの形成過程（大腸菌）

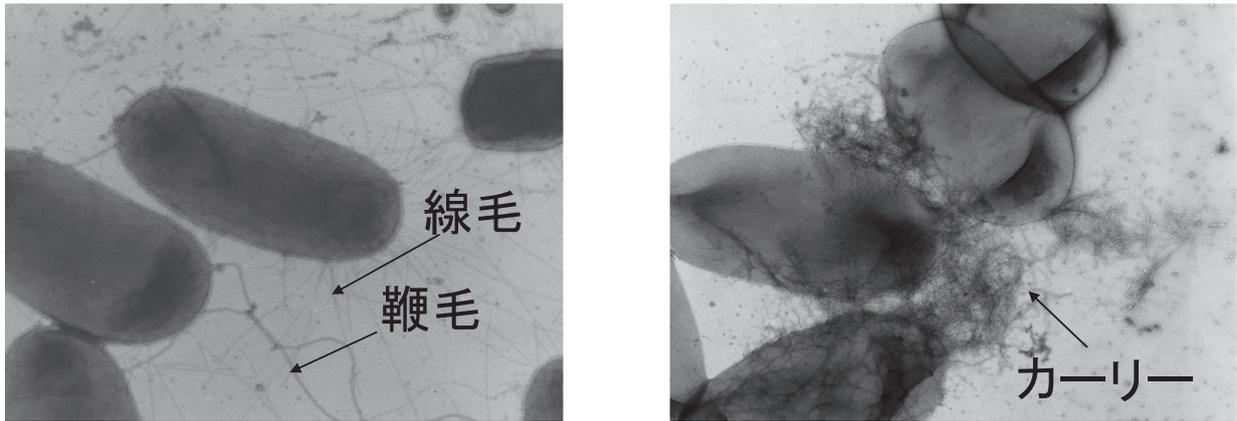
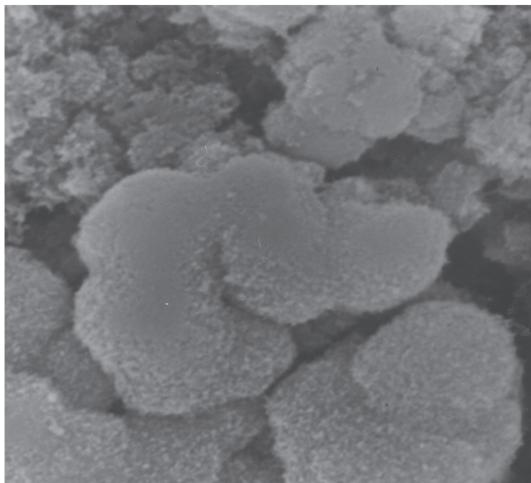


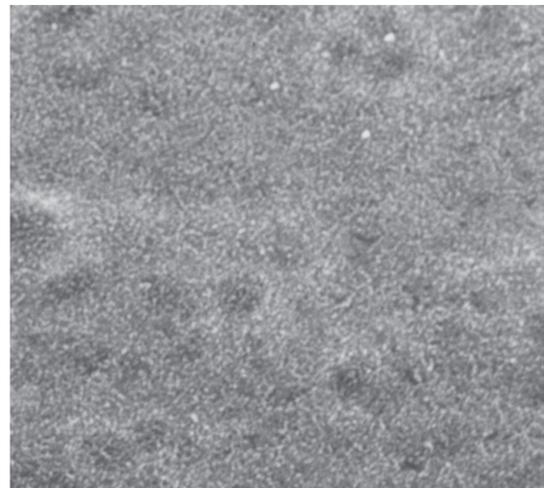
図2 TEM(ネガティブ染色)による大腸菌の鞭毛、線毛、カーリー

Wild type: Curli (+)

Curli (-) mutant



マッシュルーム様バイオフィルム



平坦なバイオフィルム

図3 Curliの有無によるバイオフィルム形態の相違

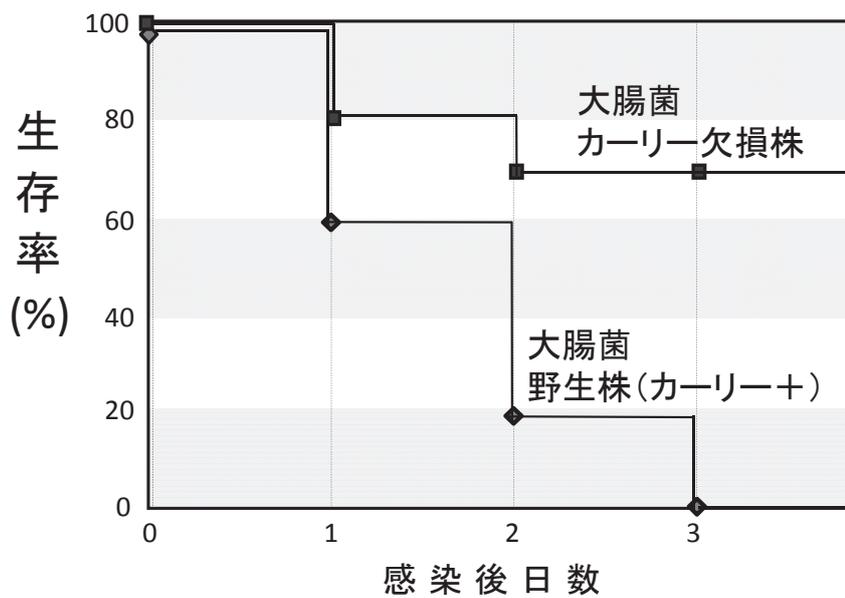


図4 マウス尿路感染症モデルを用いたカーリーの病原性の検討

ことは感染症の予防・治療法の開発過程に重要であると考えられる。

次に、グラム陽性菌の代表的な院内感染原因菌である黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成過程を図5に示す。浮遊細菌が、カテーテルなどの表面に付着・増殖し、菌体外マトリクスを産生し、バイオフィームが成熟する。やがて、バイオフィームから浮遊細菌が遊離し感染が拡大する。黄色ブドウ球菌は、大腸菌などのグラム陰性菌のように遊走と初期付着に必要な鞭毛や強固な付着（定着）のための線毛などの明瞭な役割を持った菌体外構造物を有していない。黄色ブドウ球菌では、初期接着因子としてクランピングファクター（ClfA）やフィブロネクチン結合タンパク（FnBPA & FnBPB）などが挙げられている。Ica 遺伝子群にコー

ドされた菌体外多糖体（PIA: polysaccharide intercellular adhesin）、タンパク成分の Eap (extracellular adherence protein) や、菌体外 DNA (eDNA: extracellular DNA) などが、バイオフィームの成熟に関与していることが示されてきた [2]。今後バイオフィーム形成過程での各々の因子の遺伝子発現の解析、バイオフィームマトリクスの詳細な成分解析が必要と考えられる。

黄色ブドウ球菌の バイオフィームマトリクスの抽出と解析

1M NaCl の処理によりバイオフィームマトリクスを抽出した (図6)。そこに含まれるタンパク質を質量分析・アミノ酸シーケンスにより同定した。約 130 種類のタンパク質がバイオ

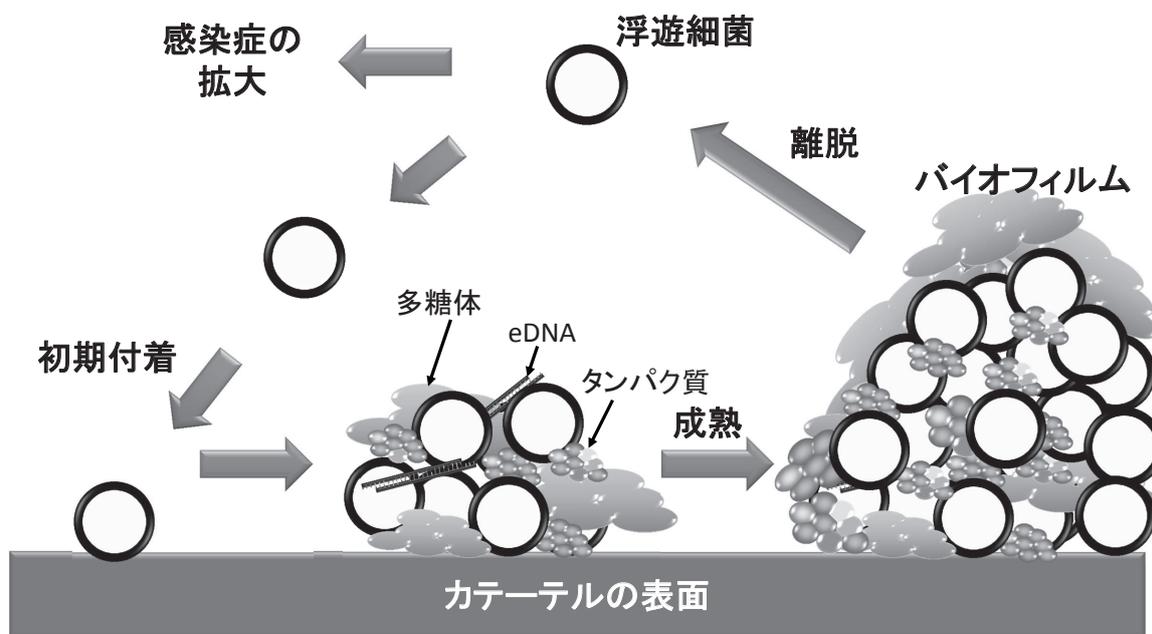


図5 黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成過程

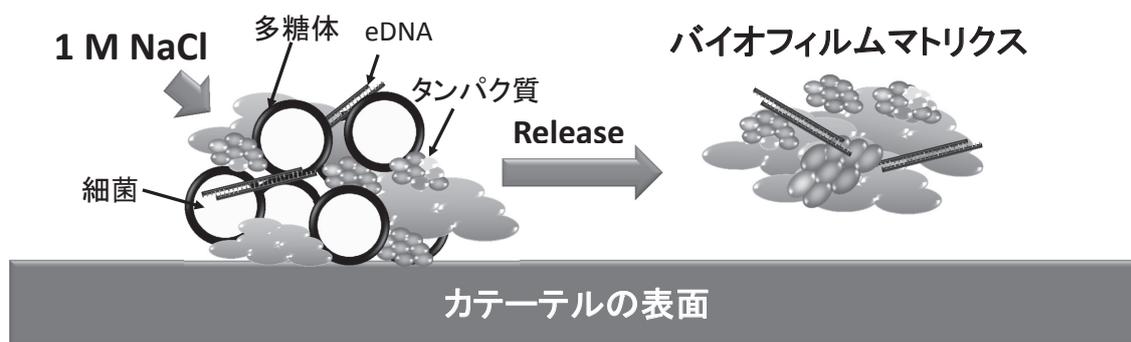


図6 バイオフィームマトリクスの抽出

フィルムマトリクス中に認められた。驚いたことに64%が細胞質タンパク質であり12%が分泌タンパク質、6%が膜タンパク質であった(図7)。MRSA (MR23株)のバイオフィルムマトリクスに多量に含まれるEap (extracellular adherence protein)についてバイオフィルム形成への効果を検討した。ブレヴィバチルスを用い、大量に発現させ精製したEapは、ブレヴィバチルスおよび黄色ブドウ球菌のバイオフィルム形成を増強することが判明した(図8) [5]。

バクテリオシンのバイオフィルム殺菌効果

細菌によって産生されるペプチド性抗菌物質であるバクテリオシンのバイオフィルムに対する殺菌効果を解析した。構造と作用機作が異なる3種のバクテリオシ (ナイシン A、ラクティ

シン Q、ヌカシン ISK-1) (図9) の効果を比較した。ナイシンとラクティシン Qがメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 臨床分離株のバイオフィルムに対して殺菌活性を示したが、ヌカシン ISK-1はバイオフィルムに対する殺菌活性を示さなかった(図10)。ナイシンとラクティシン Qは濃度依存的にバイオフィルム内の細胞からATPを漏出させ、殺菌活性とATP漏出量には相関性が見られたことから(図11)、胞膜上に安定的な孔を形成することがバイオフィルムの殺菌において重要であることが示唆された [4]。

まとめ

人工関節や血管内留置カテーテル等の人工医療材料の使用の増加により難治性のバイオフィ

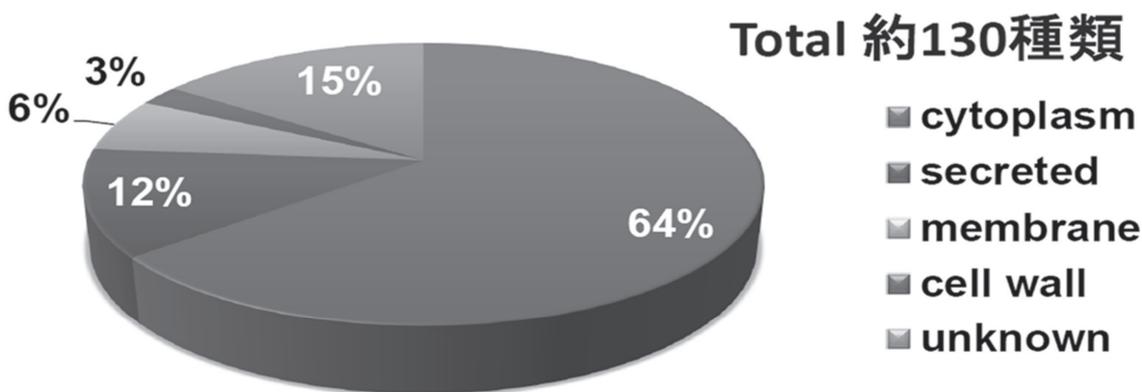


図7 黄色ブドウ球菌のマトリクスタンパク質の種類

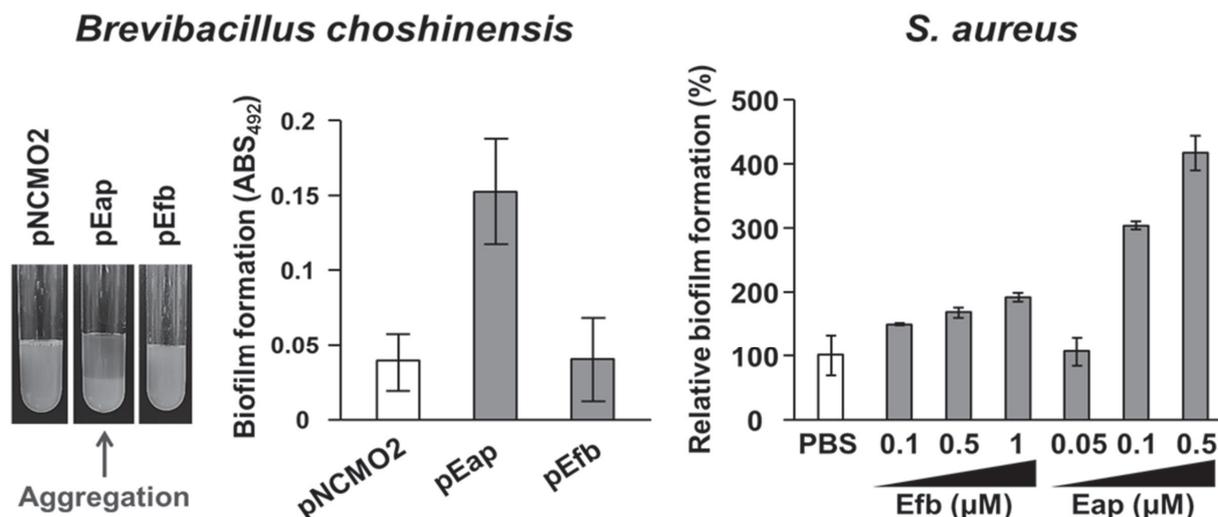
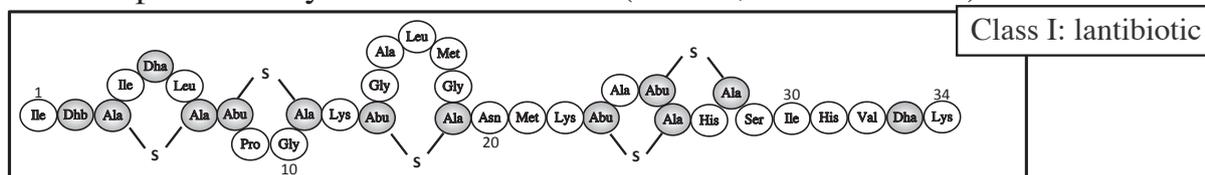


図8 Eapによる細菌の凝集とバイオフィルム形成促進

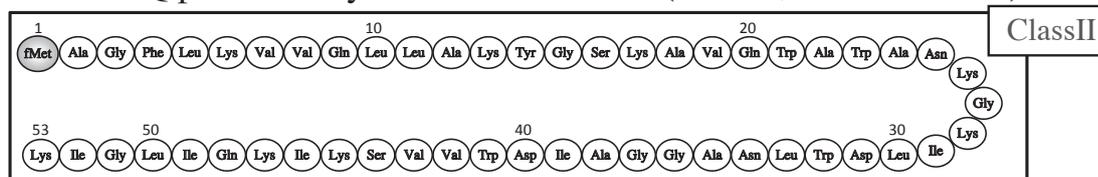
ルム感染症が、大きな問題となっている。バイオフィーム感染症のコントロールは、容易なことではない。新しい試みとして、バイオフィームマトリクスを構成するタンパク質の解析を

行った。今後、タンパク質の局在等を調べ、ワクチンの開発などにも繋げたいと考えている。また、細菌によって産生されるペプチド性抗菌物質であるバクテリオシンのバイオフィームに

Nisin A produced by *Lactococcus lactis* (34 AA, M. W. = 3354)



Lactacin Q produced by *Lactococcus lactis* (53 AA, M. W. = 5962)



Nukacin ISK-1 produced by *Staphylococcus warneri* 27 AA, (M. W. = 2960)

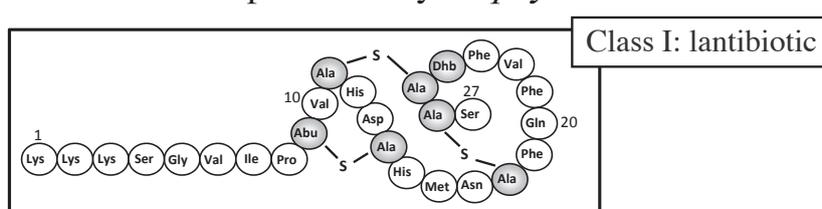
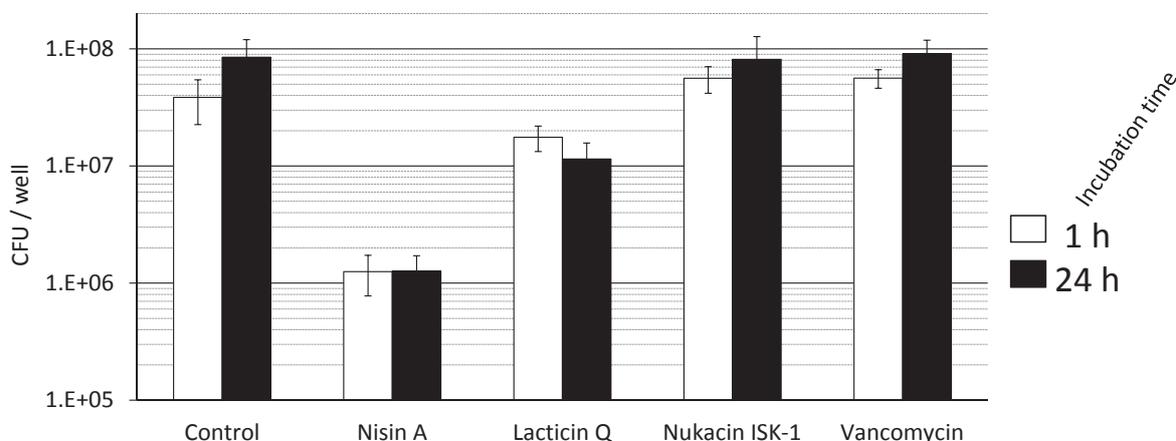


図9 使用したバクテリオシンの構造

BHI-1% Glucose培地を使用して96ウェルプレート上にバイオフィームを形成 (24 h)
 ↓4 × MIC のペプチドを添加 (in PBS)
 ↓1, 24 h後のCFUを測定



Nisin Aとlactacin Qはバイオフィームに対して殺菌活性を示した。

図10 MR23バイオフィームに対する殺菌活性

対する殺菌効果を検討した。その結果、バイオフィルムを殺菌するバクテリオシンを見出した。バイオフィルム感染症の予防・治療においてはバクテリオシンの使用が有効であることが示唆された。

biofilm formation and host-pathogen interaction. J. Bacteriol. 195(8) : 1645-1655.

引用文献

1. Kikuchi, T., Mizunoe, Y., Takade, A., Naito, S. and Yoshida, S. 2005. Curli fibers are required for development of biofilm architecture in *Escherichia coli* K-12 and enhance bacterial adherence to human uroepithelial cells. Microbiol. Immunol. 49(9) : 875-884.
2. Merino, N., Toledo-Arana, A., Vergara-Irigaray, M., Valle, J., Solano, C., Calvo, E., Lopez, J, A., Foster, T, J., Penadés, J. R. and Lasa, I. 2009. Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 191(3) : 832-843.
3. 水之江義充, 杉本真也, 岩瀬忠行. 2014. 常在細菌による黄色ブドウ球菌排除メカニズム. 呼吸器内科 26 (1) : 49-52.
4. Okuda, K., Zendo, T., Sugimoto, S., Iwase, T., Tajima, A., Yamada, S., Sonomoto, K., Mizunoe, Y. 2013. Effects of bacteriocins on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm. Antimicrob. Agents. Chemother. 57(11) : 5572-5579.
5. Sugimoto, S., Iwamoto, T., Takada, K., Okuda, K., Tajima, A., Iwase, T., Mizunoe, Y. 2013. *Staphylococcus epidermidis* Esp degrades specific proteins associated with *Staphylococcus aureus*

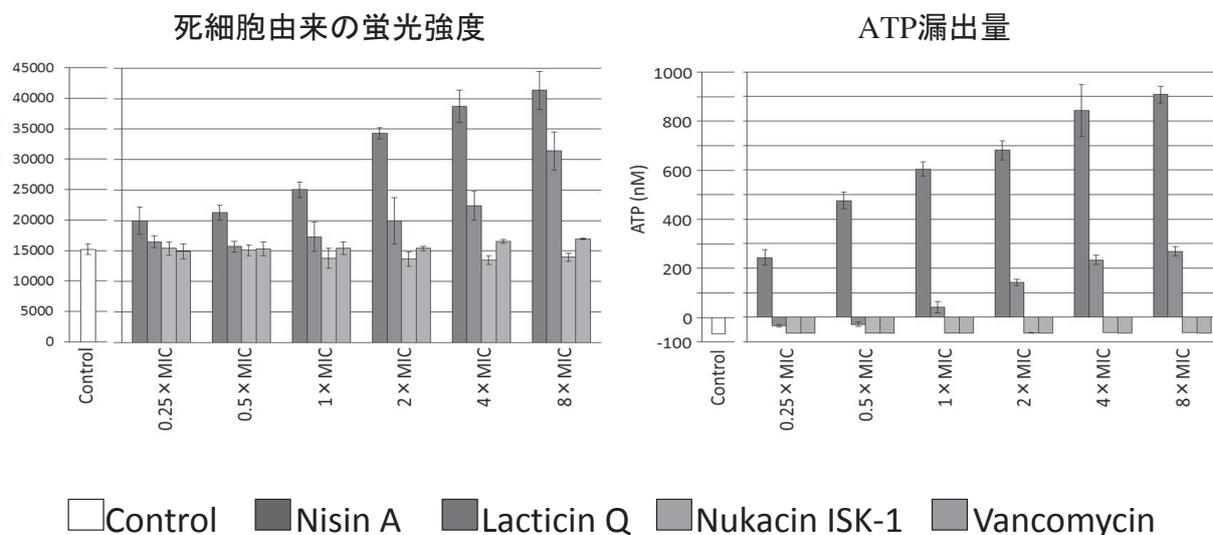


図11 MR23バイオフィルムに対する殺菌活性とATP漏出活性

Mechanism of biofilm formation and effects of bacteriocins on MRSA biofilm

Yoshimitsu Mizunoe, Shinya Sugimoto, Ken-ichi Okuda

Department of Bacteriology, Jikei Center for Biofilm Science & Technology, The Jikei University

[Abstract]

We examined the profiles of biofilm matrix proteins by 1D SDS-PAGE analyses after 1 M NaCl treatment to detach biofilm matrix components from *Staphylococcus aureus* cells. Then Biofilm matrix proteins were identified by N-terminal amino acid sequence analysis combined with mass spectrometry. Hundred thirty proteins were identified in biofilm matrix (cytoplasmic, 64%; secreted, 12%; membrane, 6%; cell wall, 3%; unknown, 15%). Eap was the most abundant protein in the biofilm matrix fraction of MR23. To address the role of Eap in biofilm formation, we used a *Brevibacillus choshinensis* expression-secretion system which enables us to produce a particular protein in the extracellular environment. Extracellular production of recombinant Eap triggered cell aggregation and biofilm formation of *B. choshinensis* cells, whereas Efb, the other abundant protein in the biofilm matrix fraction of MR23 did not. Development of a vaccine targeting proteins that contribute to *S. aureus* biofilm formation and colonization of human skin and the human nasal cavity could be an alternative approach to control biofilm infections. We also examined the effects of different kinds of bacteriocins, which are ribosomally-synthesized antimicrobial peptides produced by certain bacteria, on biofilms formed by a clinical isolate of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). The activities and modes of action of three bacteriocins with different structures (nisin A, lactacin Q, and nukacin ISK-1) were evaluated. Vancomycin, a glycopeptide antibiotic used in the treatment of MRSA infections, showed bactericidal activity against planktonic cells, but not against biofilm cells. Among the tested bacteriocins, nisin A showed the highest bactericidal activity against both planktonic cells and biofilm cells. Lactacin Q also showed bactericidal activity against both planktonic cells and biofilm cells, but its activity against biofilm cells was significantly lower than that of nisin A. Nukacin ISK-1 showed bacteriostatic activity against planktonic cells and did not show bactericidal activity against biofilm cells. Mode-of-action studies indicated that pore formation leading to ATP efflux is important for the bactericidal activity against biofilm cells. These results suggest that bacteriocins that form stable pores on biofilm cells are highly potent for the treatment of MRSA biofilm infections.

Keywords: bacteriocin, biofilm matrix, Eap, MRSA, nisin A