

# 多剤耐性緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*; MDRP) と non-MDRP の外毒素産生性についての比較検討

鈴木 光一<sup>1</sup>, 眞野 容子<sup>2</sup>, 古谷 信彦<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>文京学院大学大学院 保健医療科学研究科

<sup>2</sup>文京学院大学 保健医療技術学部 臨床検査学科

## 要旨

緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*: *P. aeruginosa*) は院内感染の主な原因菌であり, 多剤耐性緑膿菌 (multi drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: MDRP) の出現は世界各地で深刻な問題となっている。緑膿菌感染症の病因は, elastase, alkaline protease, 外毒素 A, exoenzyme S, pyocyanin, pyoverdine, rhamnolipid, リポポリサッカライド, 線毛や鞭毛などの分泌分子を含む多数の病原因子に依存する。我々は多剤耐性の獲得と *P. aeruginosa* の病原因子との間の関連を明確にするために, 今回, 菌体外毒素の代表として Elastase と Protease および, Pyocyanin について MDRP と non-MDRP 間での比較検討を行った。本研究で用いた臨床由来の *P. aeruginosa* 14株は MDRP 7株, non-MDRP 7株であり, 感染症法の基準に従ってイミペネム, アミカシン, シプロフロキサシン全てに耐性を示した株を MDRP, 全てに感受性を示した株を non-MDRP と定義した。Elastase と Protease および, Pyocyanin はそれぞれ, Elastin Congo Red 法, Remazol Brilliant Blue-Hide 法 および Chloroform 法を用いて測定した。更に, PCR 法を用いて4種のクオラムセンシング遺伝子の保有状況の検討を行った。MDRP における Elastase と Protease および Pyocyanin の全ての平均値が non-MDRP に比べて有意に低下していた。MDRP, non-MDRP 共に 4種のクオラムセンシング遺伝子の DNA 欠損は確認されなかった。QS 関連遺伝子の発現の有無だけでなく, これらの遺伝子の発現量の違い, あるいは他の情報伝達機構の GacA/GacS 二成分システムや cyclic-di-GMP などが反応閾値と関連している可能性がある。本研究では, *P. aeruginosa* の株における多剤耐性の獲得は, Elastase と Protease および, Pyocyanin の産生量の減少を示している。

## キーワード

緑膿菌, MDRP, 外毒素, クオラムセンシング

## 1. 序論

緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*: *P. aeruginosa*) は, グラム陰性の好気性桿菌であり, 病院内では洗面台や浴槽, 呼吸器系装置など身近な湿潤環境中に生息するため, 日和見感染や院内感染の原因菌として重要視されている。*P. aeruginosa* 感染症の病因は, 菌体外毒素である LasA や LasB Elastase, ProteaseIV, Exotoxin A, Pyocyanin, 2, 3 型分泌システム (T3SS) である ExoU, ExoS, ExoT, ExoY や鞭毛, 4 型線毛など多数の病原因子に依存している。これらの病原因子は宿主の防御機能とそれらが相互に作用し, 病原性を発揮すると考えられている<sup>1)</sup>。

*P. aeruginosa* は外毒素である数種類の Protease を産生するが, それらは上皮を直接破壊することや, 免疫グロブリンやフィブリンを分解し, 眼感染症や敗血症を発症させる<sup>2)</sup>。更に, Protease は宿主の肺サーファクタントの分解を含めて, 呼吸器感染症の組織に障害を与えていることも示されてい

る<sup>2,3)</sup>。Elastase は病原体のオプソニン化に関与する蛋白質やリゾチームなどの免疫応答能を有する多数の構成要素を分解する<sup>4,5)</sup>。また, *P. aeruginosa* は青緑色の色素である Pyocyanin を産生する。Pyocyanin はミトコンドリア中の電子伝達系や, 宿主のカタラーゼの分解, または宿主の酸化的ストレスによって *P. aeruginosa* の集落に異なった色調を与えている。更に, 精製された Pyocyanin は好中球のアポトーシスを誘導するだけでなく, マクロファージによるアポトーシス小体の貪食を阻害することが *in vitro* で示されている<sup>6)</sup>。

これらの外毒素の分泌はクオラムセンシング (以下 QS) 機構と呼ばれる, 病原因子発現をコントロールするシステムに依存している。*P. aeruginosa* では Las および Rhl の 2 つの QS 機構が重要であり, それぞれ, I - 遺伝子 (lasI, rhlI), R - 遺伝子 (lasR, rhlR) から構成されている。I - 遺伝子産物である autoinducer 合成酵素によりそれぞれ 3-oxo-C12-Homoserine lactone (HSL), C4-HSL が合成され, これらが転写活性化因子 (LasR, RhlR) に結合し, 菌体外

毒素やバイオフィームなどの病原因子の発現を調節している<sup>7)</sup>。

一方で近年、多剤耐性緑膿菌 (Multi Drug-Resistance *P.aeruginosa*: MDRP) が散発的に臨床分離され、その動向が警戒されている。MDRPはほとんどの抗生物質に耐性を示すが、non-MDRPと比較して、これらが気道に定着した時の感染発症と死亡率には大きな相違はみられないとの報告もある<sup>8)</sup>。そこで、我々はMDRPとnon-MDRP間の病原因子である菌体外毒素 (Protease, Elastase, Pyocyanin) について比較検討した。

## 2. 方法

### 2.1 供試菌株

臨床由来MDRP 7株、臨床由来non-MDRP 7株の計14株を用いた。感染症法の基準に準拠し、イミペネム (IPM) (MIC  $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ )、アミカシン (AMK) (MIC  $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ )、シプロフロキサシン (CPFX) (MIC  $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ ) 全てに耐性を示した株をMDRP、全てに感受性を示した株をnon-MDRPと定義した。

### 2.2 Pyocyanin 産生量の定量

供試菌液を滅菌生理食塩水で106 CFU/mLに調整し、LB broth 5mLに10  $\mu\text{L}$ 接種し、35°C、24時間振盪培養を行った。振盪培養後の菌液を3000 rpm、室温で10分遠心後、上清を3 mLガラス試験管に分離、クロロホルムを1.8 mL加え、よく混和後、遮光して3時間静置した。上清を取り除き、0.2N HClを1 mL加え、遮光して一晩静置した。クロロホルム層を取り除いた後、波長520 nmで吸光度測定を行った<sup>9)</sup>。

### 2.3 Elastase 産生量の定量

LasB Elastaseは10mg/mL Elastin Congo Red (ECR, Sigma Chemicals) を用いて行った。供試菌液を滅菌生理食塩水で106 CFU/mLに調整し、LB broth 5mLに10  $\mu\text{L}$ 接種し、

35°C、18時間振盪培養を行った。振盪培養後の菌液を3000 rpm、室温で10分遠心後、得られた上清0.5mLをECR緩衝液 (100mMTris HCl, pH7.5) 0.5mLとECR 10mgと混合した。更に、混合物を35°Cで6時間振盪させ、不溶性のECRを除去するために遠心分離した後、波長495 nmで測定した<sup>10)</sup>。

### 2.4 Protease 産生量の定量

Proteaseは1mg/mL Remazol Brilliant Blue R-Hide (Sigma Chemical) を用いて行った。供試菌液を滅菌生理食塩水で106CFU/mLに調整し、LB broth 5mLに10 $\mu\text{L}$ 接種し、35°C、18時間振盪培養を行った。振盪培養後の菌液を3000rpm、室温で10分遠心後、得られた上清 (2mL) を、Remazol Brilliant Blue R-Hide緩衝液 (10mMTris HCl, pH7.5) 1mLとRemazol Brilliant Blue R-Hide 3mgと混合した。更に、混合物を35°Cで1時間振盪させ、不溶性のRemazol Brilliant Blue R-Hideを除去するために遠心分離した後、波長595 nmで測定した<sup>11)</sup>。

### 2.5 PCR法を用いたQS関連遺伝子の検索

MHAgarで供試菌を一晩培養し、ボイル法 (100°C、10分) によってDNAの抽出を行った。TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ)、各primer (Table 1)、および抽出したDNAを混和し、PCR (94°C 5分、94°C 1分、52°C 1分、72°C 1分30秒を30サイクル、72°C 10分) を行った。Tris-borate-EDTA緩衝液を用いて2% agarose gelを作製し、100 V、50分電気泳動後、ethidium bromideで30分染色を行った。染色後、UVを照射し、バンドの有無及びサイズの確認を行った<sup>12, 13)</sup>。

### 2.6 統計分析

全ての外毒素の産生量において、MDRPとnon-MDRPとの間の有意差を決定するために、t検定を行った。

Table 1. Primers used in this study.

| primer | Genes                              | Forward Primers             | Reverse Primers           | PCR product size (bp) |
|--------|------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------|
| lasI   | Autoinducer synthesis protein lasI | 5'-cgtgctcaagtgtcaagg-3'    | 5'-tacagtcggaaaagcccag-3' | 295                   |
| rhII   | Autoinducer synthesis protein rhII | 5'-ttcatcctcttttagtctccc-3' | 5'-ttcagcgattcagagagc-3'  | 155                   |
| lasR   | Autoinducer synthesis protein lasR | 5'-ctgtggatgctcaaggactac-3' | 5'-aactggtcttccgatgg-3'   | 133                   |
| rhIR   | Autoinducer synthesis protein rhIR | 5'-gccagcgtcttcttccg-3'     | 5'-cgtctcctgagccatc-3'    | 160                   |

### 3. 結果

#### 3.1 外毒素の産生量

MDRP 7 株, non-MDRP 7 株の Pyocyanin, Elastase, Protease 産生量の結果を示した (Fig1). 誤差線は SD を示している. Pyocyanin 産生量における MDRP の平均値は 0.047 であり, SD は 0.047 であった. また, non-MDRP の平均値は 0.348 であり, SD は 0.153 であった. Elastase 産生量における MDRP の平均値は 0.061 であり, SD は 0.042 であった. また, non-MDRP の平均値は 0.452 であり, SD は 0.104 であった. Protease 産生量における MDRP の平均値は 0.036 であり, SD は 0.032 であった. また, non-MDRP の平均値は 0.229 であり, SD は 0.082 であった. MDRP と non-MDRP 間での Pyocyanin, Elastase, Protease 産生量で  $p < 0.001$  であり, 有意差を示した. MDRP では, non-MDRP と比較し全ての外毒素の産生量が低値であった. また, non-MDRP は株によって高産生, 中程度の産生, 低産生の相違がみられたが, MDRP では外毒素の産生がほとんど確認されなかった.

#### 3.2 QS 関連遺伝子の検索

PCR 法を用いた QS 関連遺伝子のアガロースゲル電気泳動の電気泳動パターンを示した (Fig2). 泳動像は 1 種の primer につき 4 つの株を用いている. MDRP 7 株と non-MDRP 7 株の QS 関連遺伝子である *lasI*, *rhII*, *lasR*, *rhIR* の 4 種全ての遺伝子 DNA は欠損していなかった. 今回, 標的とした *lasI*, *rhII*, *lasR*, *rhIR* の 4 種の primer では, MDRP と non-MDRP 間で QS 関連遺伝子の DNA の相違は認められなかった.

### 4. 考察

本研究では MDRP と non-MDRP の Pyocyanin, Elastase, Protease 産生量, および QS 関連遺伝子の発現の相違について検討を行った. MDRP はほとんど全ての抗生物質に耐性を示し, 臨床上問題視されている. しかし, non-MDRP と比較して, これらが気道に定着していた時の感染症の発症と死亡率に大きな相違は認められないとことが報告されている<sup>8)</sup>.

MDRP 7 株において, Pyocyanin, Elastase, Protease の産生はほとんど確認されなかった. これらの結果は, *P. aeruginosa* の多剤耐性の獲得が, 菌体外毒素の産生を抑制している可能性を示唆している. QS はいくつかの病原因子の情報伝達に関与しており, これらの QS 依存性病原因子は相互に密接な関係があると報告<sup>7)</sup>されており, 遺伝子の発現量や autoinducer の量などに影響があればそれぞれの産生量

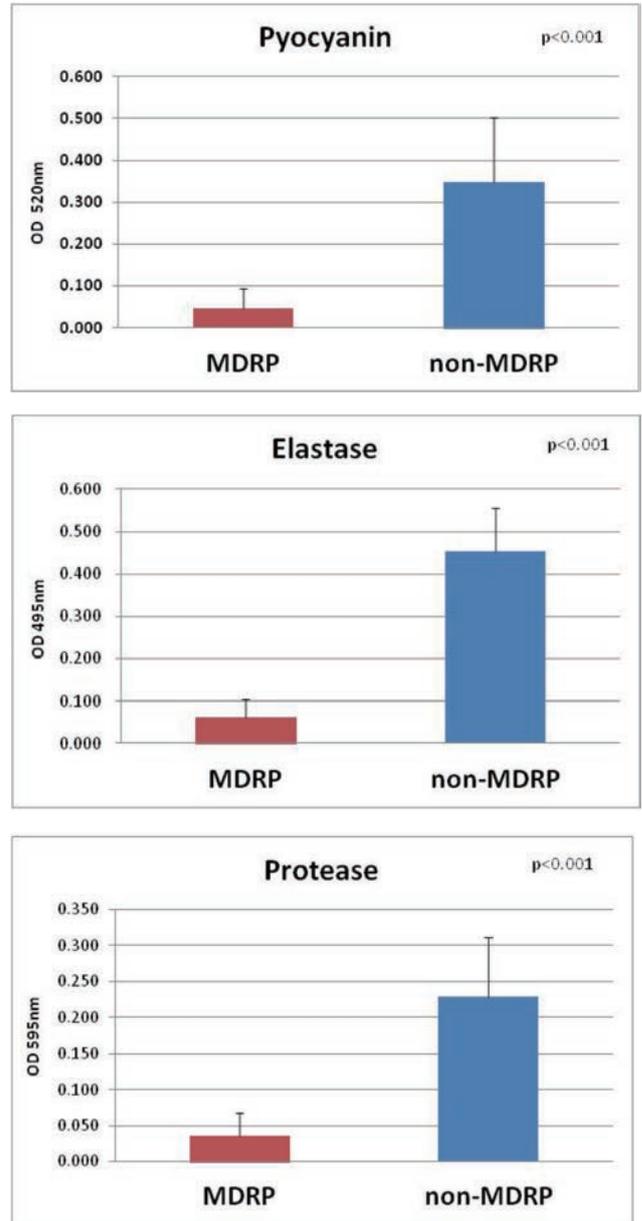


Fig1. Comparison vitulence factor (Pyocyanin, Elastase, Protease) between MDRP and non-MDRP.

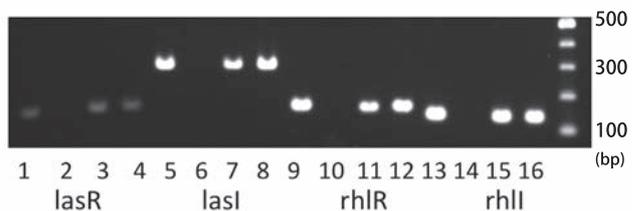


Fig2. The expression of quorum sensing genes *lasI*, *rhII*, *lasR*, and *rhIR*. Lane 1, 5, 9, 13 (Positive control). Lane 2, 6, 10, 14 (Negative control). Lane 3, 7, 11, 15 (MDRP strain). Lane 4, 8, 12, 16 (non-MDRP strain).

などは変化する。今回、MDRPにおいて確認された外毒素の低下は他のQS依存性病原因子の低下の可能性も示唆され今後検討していく必要があると考えられる。

MDRPとnon-MDRP間におけるQS遺伝子の保有状況の検討では、MDRPとnon-MDRPの全ての株で4種の遺伝子発現が確認された。Karatunaらの報告<sup>14)</sup>ではQS欠損株は抗菌薬の影響を受けにくい傾向にあるとされているが、今回の結果ではMDRPでのQS関連遺伝子に関する影響は確認されなかった。しかしながら、*P. aeruginosa*には病原因子発現をコントロールする情報伝達機構が、QS機構以外にも存在していることが明らかとなっている。QS関連遺伝子の有無だけではなく、これらの遺伝子の発現量の違い、あるいは他の情報伝達機構のGacA/GacS二成分システム（環境の変化に迅速に適応するために細菌によって使用される主要な情報伝達機構）やcyclic-di-GMP<sup>15, 16)</sup>と呼ばれるセカンドメッセンジャーによる影響などが反応閾値と関連している可能性があり、今後の検討課題と考える。

## 5. 結語

本研究では、*P. aeruginosa*の株における多剤耐性の獲得は、ElastaseとProteaseおよび、Pyocyaninの産生量の減少を示している。

## 6. 参考文献

- 1) 奥田研爾, 福島淳. 緑膿菌病原因子の分子生物学最近の進歩. 日本細菌学雑誌 1994; 49: 3-4.
- 2) Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. Médecine et Maladies Infectieuses 2006; 36: 78-91.
- 3) Fleiszig SM, Evans DJ. The pathogenesis of bacterial keratitis: studies with *Pseudomonas aeruginosa*. Clinical and Experimental Optometry 2002; 85: 271-278.
- 4) Alcorn JF, Wright JR. Degradation of pulmonary surfactant protein D by *Pseudomonas aeruginosa* elastase abrogates innate immune function. Journal of Biological Chemistry 2004; 279: 30871-30879.
- 5) Kuang Z, Hao Y, Walling BE, et al. *Pseudomonas aeruginosa* elastase provides an escape from phagocytosis by degrading the pulmonary surfactant protein-A. PLoS One 2011; 6: 27091.
- 6) Lau GW, Hassett DJ, Ran H, et al. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. Trends in Molecular Medicine 2004; 10: 599-606.
- 7) 館田一博, 石井良和, 山口恵三. 緑膿菌のQuorum-Sensing機構-新しい感染症治療のターゲットとして-. 日本細菌学会誌 2004; 59: 543-549.
- 10) Yang K, Zhuo H, Guglielmo BJ, et al. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia: the role of endotracheal aspirate surveillance cultures. Annals of Pharmacotherapy 2009; 43: 28-35.
- 11) Essar DW, Eberly L, Hadero A, et al. Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. Journal Of Bacteriology 1990; 172: 884-900.
- 12) Dennis O, Stanley C. Isolation and Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* PAO Mutant That Produces Altered Elastase. Journal Of Bacteriology 1980; 142: 836-842.
- 13) Gerhard A, Stephan J. Wirth, Soluble, dye-labelled substrates for a micro-plate assay of proteinase activity. Journal of Microbiological Methods 1996; 25: 337-342.
- 14) Zhu H, Bandara R, Conibear TC, et al. *Pseudomonas aeruginosa* with lasI quorum-sensing deficiency during corneal Infection. Immunology and Microbiology 2004; 45: 1897-903.
- 15) Ajayi T, Allmond LR, Sawa T, et al. Single-nucleotide-polymorphism mapping of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion toxins for development of a diagnostic multiplex PCR system. Journal Of Clinical Microbiology 2003; 41: 3526-3531.
- 16) Karatuna O, A Yagci A. Analysis of quorum sensing-dependent virulence factor production and its relationship with antimicrobial susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* respiratory isolates. Clinical Microbiology and Infection 2010; 16: 1770-1775.
- 17) Gooderham WJ, Hancock REW. Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiology Reviews 2009; 33: 279-294.
- 18) Jimenez PN, Koch G, Thompson JA, et al. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology and Molecular Biology Reviews 2012; 76: 46-65.

## Comparison of Exotoxins between Multi Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDRP) and non-MDRP.

Kouichi Suzuki <sup>1</sup>, Yoko Mano <sup>2</sup>, Nobuhiko Furuya <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Health Care Science, Graduate School of Bunkyo Gakuin University

<sup>2</sup> Department of Clinical Laboratory Medicine, Faculty of Health Science Technology Bunkyo Gakuin University

### Abstract

*Pseudomonas aeruginosa* is a major source of nosocomial infections, and the emergence of multidrug-resistant *P.aeruginosa* (MDRP) is a serious problem in many countries. The pathogenesis of *P.aeruginosa* infections is multifactorial and depends on numerous virulence factors, including the secreted factors such as elastase, alkaline protease, exotoxin A, exoenzyme S, pyocyanin, pyoverdine, rhamnolipid, lipopolysaccharide, flagella and pili. In order to further clarify the association between magnitude of multidrug-resistance and its effect on *P.aeruginosa* virulence factors, we here compared the Elastase, total protease and Pyocyanin activities, representatives of virulence factors between MDRP and non-MDRP. Fourteen clinical *P.aeruginosa* strains were used in this study; 7 strains were MDRP and 7 were non-MDRP strains resistant to imipenem, amikacin, and ciprofloxacin were defined as MDRP, and strains sensitive to all these drugs were defined as non-MDRP according to the criteria of infectious disease law. Elastase, total protease and Pyocyanin activities, representatives of virulence factors, were determined using the Elastin Congo Red assay, the Remazol Brilliant Blue-Hide assay and Chloroform assay respectively. Further, Four quorum sensing genes were examined for holding status by PCR method. All mean values for production of elastase, total protease and pyocyanin in MDRP strains were significantly smaller than those in non-MDRP. DNA defects of four quorum sensing genes were not confirmed in both MDRP and non-MDRP. The discrepancy of production of exoproducts and between MDRP and non-MDRP strains may associate with difference in the quorum sensing gene expression level and their different response threshold for the, GacA/GacC two component system, and cyclic-di-GMP regulations. Overall, this study demonstrates that the extent of multi-resistance in *P.aeruginosa* strains decrease in production of elastase, total protease and pyocyanin.

**Key words** ——— *Pseudomonas aeruginosa*, MDRP, virulence factors, quorum sensing

Bunkyo Journal of Health Science Technology vol.9: 1-5