

55. 施設内感染を起こす緑膿菌の水系環境における 生息実態と病原性保有の解析

○ 四宮博人（愛媛県立衛生環境研究所）

【研究目的】

日本などの医療先進国では、強毒菌によるいわゆる伝染病は減少したが、弱毒菌による日和見感染症や薬剤耐性菌による感染症はむしろ増加している。緑膿菌は多くの消毒剤や抗菌剤に自然抵抗性がある上、後天的な薬剤耐性も獲得しやすいため、いったん発症すると治療が困難な場合が多く、感染防御能の低下する老人や糖尿病などの基礎疾患を有する人には脅威で、最も重要な病院等の医療施設内感染原因菌の1つである¹⁾。特に、敗血症を発症した場合の致命率は80%以上で、临床上重大な問題となっている。

緑膿菌は、生活圏あるいは自然界の水系環境に広く存在する環境常在菌で、医療施設内に限定した対策のみでは限界がある。水系環境が主たる感染源であるにもかかわらず、緑膿菌の生態には不明な点が多い。今回、病院患者および周辺の水系環境から分離された菌株を用いて、環境中での生息実態、遺伝子型、病原遺伝子の保有状況などを調べて、水系環境の潜在リスクを把握し、地域の保健衛生・感染対策に資することを目的とする。

【材料と方法】

1. 水系環境からの緑膿菌分離

愛媛県の河川、沼湖、沿岸などから水を採取後、細菌用培地で生菌数を測定した。緑膿菌の選択は、セトリミド培地にナリジクス酸を添加したものをを用いて行った。緑膿菌の同定は、生物学的・生化学的性状試験を定法にしたがって実施し確認した。百数十株の緑膿菌株を分離した。病院患者から採取された臨床分離菌を対照として用いた。

2. 緑膿菌株の遺伝子タイピング

遺伝子型タイピングは、それぞれの菌株よりゲノムDNAを抽出し、制限酵素で消化した後、パルスフィールド電気泳動を実施した。そのバンドパターンを画像解析して、相同性を基にグルーピングを行った。

3. 緑膿菌株の病原遺伝子保有状況

緑膿菌の病原性発現と関連するクオラムセンシング(Quorum Sensing: QS)遺伝子(*lasI*, *lasR*, *rhlI*, *rhlR*)およびタイプ III 分泌機構(Type III Secretion System: TTSS)遺伝子(*popB*,

popD, *pcrV*, *exoS*, *exoT*, *exoU*, *exoY*)の保有状況を、各菌株のゲノム DNA を鋳型として PCR 法で調べた。

【結果と考察】

1. 臨床・環境分離株の遺伝子型の特徴

愛媛県内の沿岸・河川などの自然環境および病院患者から緑膿菌を分離した。採取した場所、および分離した緑膿菌株を図 1 に示す。菌株間のゲノム近縁度を知るために、各菌株から染色体 DNA を抽出し、制限酵素 *SpeI* で処理後、パルスフィールド電気泳動(PFGE)を実施した。そのバンドパターンから、ゲノム塩基配列の近縁度を解析した(図 2)。60% 相同性を基に 13 グループにまとめられた。臨床株は全てが異なる PFGE バンドパターンを示し遺伝子型が多様であった。このことは、同一病院内で分離された菌株であるが、院内感染による伝播ではなく、それぞれの患者は個別に感染したことを意味している。環境株では興味ある知見が得られた。すなわち、河川中流域、下流域の分離株は、多様な遺伝子型を示したが、河川上流域、河口域、および沿岸海水域の分離株は多様性が低く、同一のクローンと思われる菌株も存在した(図 2)。河川中流域、下流域は分離菌数も多く、多様な緑膿菌が混在していると考えられる。一方、河川上流域、河口域および沿岸海水域では限られた遺伝子型の緑膿菌が生息していると考えられる。また、下流域、河口域、沿岸域の分離株の遺伝子型が異なっていることは、流れにしたがって流入した菌がそのまま定着し生息する訳ではなく、河口の汽水域や沿岸の海水域に適応したものが生息していると考えられる。

2. 臨床・環境分離株の病原性関連遺伝子保有状況

緑膿菌の病原性に関する研究は、主として臨床分離株を対象に実施されてきた。これらはヒトに感染し増菌できた菌で、病原性が高いものが選択されている可能性がある。自然環境中に生息する緑膿菌の病原性はどうか。この点を調べる目的で病原遺伝子の存在の有無を検討した。病原遺伝子候補の中から、クオラムセンシング(QS:Quorum sensing)遺伝子(*lasI*, *lasR*, *rhlI*, *rhlR*)、およびタイプ III 分泌機構(TTSS:type III secretion system)遺伝子(effector 遺伝子: *exoS*, *exoT*, *exoU*, *exoY*, および translocator 遺伝子: *popB*, *popD*, *pcrV*)の 11 個の遺伝子を対象とした。これらが緑膿菌の病原性発現において重要であることが、臨床株の研究から明らかにされている。

QS 機構は細菌が周囲の菌密度を感知する機構で、菌密度が一定以上になると特定の遺伝子の発現が開始される²⁾。QS 機構は菌の病原性発現において重要で、感染局所で菌が一定数増殖した段階で病原因子の合成が開始することは、病原体にとって合理的と考えられて

いる^{3,4)}。一方、河川や沿岸の水域は人体などと比べはるかに貧栄養状態であり、採取される菌数も少なく、菌密度がさほど高くなるとは考えにくい。したがって、自然環境を主たる生息場所とする菌は、QS 遺伝子の必要性が低いのではないかと予想された。しかし、環境株は臨床株と同様に QS 遺伝子を保有し、調べた 154 株は全て QS 遺伝子(*lasI*, *lasR*, *rhlI*, *rhlR*)を有していた(表 1)。このことは、QS 機構が病原性発現に関与するのみならず、自然環境中での適応・生存においても重要な役割を果たしていることを示唆する。

TTSS はニードル構造を通じて標的宿主細胞にエフェクタータンパク質を注入する機構で、エフェクターは細胞生理機能を攪乱し、病原性の発現において重要である⁵⁾。TTSS は細菌の増殖には必須でなく、宿主に感染した際に標的細胞に働きかけるのであるから、河川・沿岸の自然環境中では必要性が低いのではないかと予想された。しかし、154 株の環境株および臨床株は全て TTSS translocator 遺伝子(*popB*, *popD*, *pcrV*)を保有していた(表 2)。effector 遺伝子に関しても、全ての株が *exoT* を保有し、ほとんどの株が *exoY* を保有していた(表 2)。したがって、TTSS も自然環境中で機能していると想定される。一方、*exoS* と *exoU* は 2 者択一的に保有されるが、それぞれの保有率が分離場所によって著しく異なっていた(表 2)。すなわち、臨床株では *exoS*(+)*exoU*(-)が 64.5%、*exoS*(-)*exoU*(+)が 35.5% であるのに対し、河川株では *exoS*(+)*exoU*(+)が 1.1%、*exoS*(+)*exoU*(-)が 98.9%、*exoS*(-)*exoU*(+)が 0%であった。逆に、沿岸株では *exoS*(+)*exoU*(-)が 11.4%、*exoS*(-)*exoU*(+)が 88.6%であった。*exoS* は N 末端に GAP(GTPase activating protein)領域を、C 末端に ADP ribosylase 領域を有する二機能タンパク質で、標的細胞の生理機能を変化させる。一方、*exoU* は phospholipase A2 活性を有し、標的細胞を細胞死させる。

【おわりに】

緑膿菌の主たる生息場所は、自然界の湿潤な環境である。細菌として最大クラスのゲノムや多数の制御系遺伝子・排出系遺伝子の存在は、環境適応能力の高さと関連があるであろう¹¹⁾。ヒトなどの宿主に対する病原性の発現に特化して発達したと考えられてきた病原遺伝子群が、自然生態系での適応・生存の過程で獲得されたのではないとも考えられる。また、このような研究は、ただちに、環境微生物の潜在リスクを評価することになり、環境が感染源・感染経路となるようなヒト感染症の予防手段の確立においても重要である。

【主な文献】

- 1) Stover CK, Pham XQ, Erwin AL et al: Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 2000;406:959–64.
- 2) Bassler BL: Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell* 2002;109:421–4.

- 3) Miller MB, Skorupski K, Lenz DH et al: Parallel quorum sensing systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholerae*. *Cell* 2002;110:303–14.
- 4) Wu L, Estrada O, Zaborina O: Recognition of host immune activation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* 2005;309:774–7.
- 5) Galán JE, Collmer A: Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* 1999;284:1322–8.

【謝辞】

本研究を実施するにあたり，研究助成をいただきました財団法人大同生命事業団に厚く御礼申し上げます。

【経費使途内訳】

使 途 内 容	金 額
細菌培養試薬（普通培地，セトリミド培地，ナリジキシン酸）	98,040 円
分子生物学試薬（制限酵素，PCR 酵素，合成プライマー）	130,250 円
プラスチック器具類（シャーレ，遠心チューブ，ピペットマン）	68,960 円
その他（コピー用紙，文房具等）	27,50 円
合 計	300,000 円

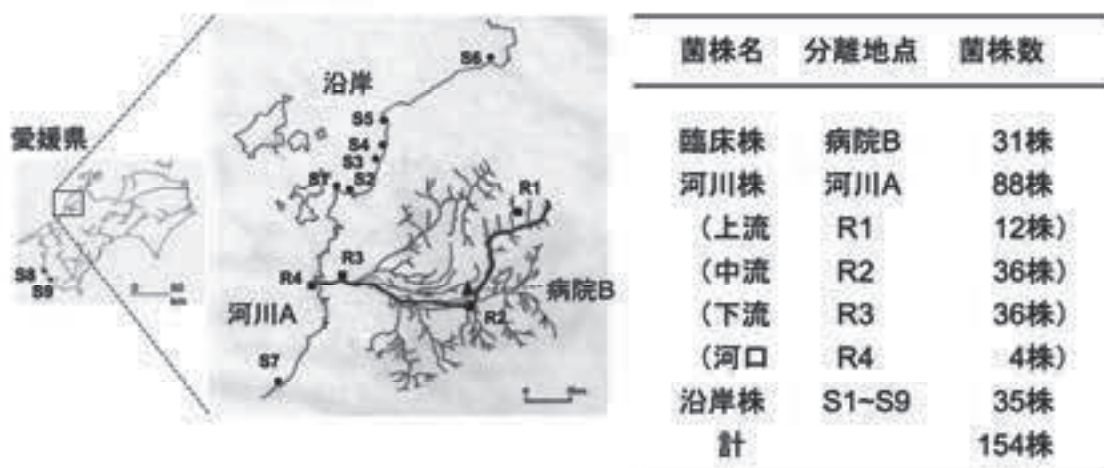


図1. 緑膿菌株の採取地点と内訳

図2. 各緑膿菌株の遺伝子型

菌株ゲノムDNAを制限酵素(SpeI)で切断後、パルスフィールド電気泳動でDNA断片を分離し、バンドパターンを解析した。
60%相同性レベルで13グループに分かれた。

分離株の各グループ(右図1-13)での分布

臨床株 = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 13
 上流株 = 2
 中流株 = 1, 2, 4, 5, 7, 8, 11, 12, 13
 下流株 = 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12
 河口株 = 7
 沿岸株 = 4, 6

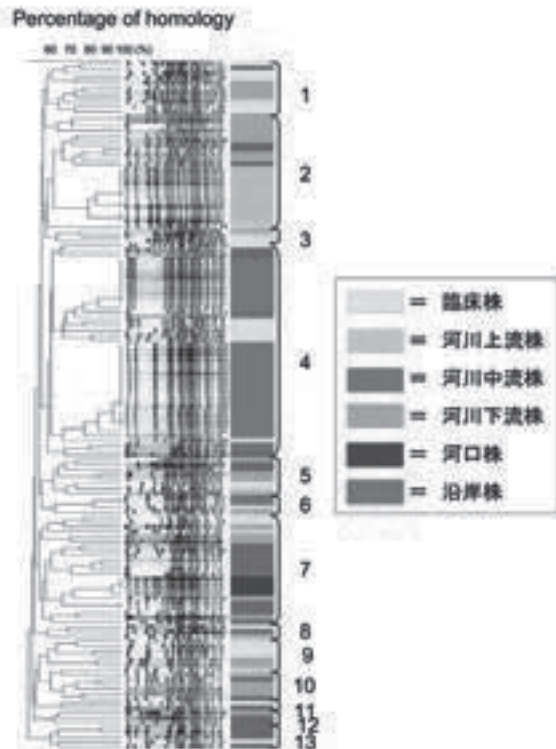


表1. クオラムセンシング遺伝子の緑膿菌株における保有率

緑膿菌株	<i>lasI</i>	<i>lasR</i>	<i>rhlI</i>	<i>rhlII</i>
臨床株 (31 株)	100%	100%	100%	100%
河川株 (88 株)	100%	100%	100%	100%
沿岸株 (35 株)	100%	100%	100%	100%

表2. タイプIII分泌機構関連遺伝子の緑膿菌株における保有率

緑膿菌株	Translocator 遺伝子			Effector 遺伝子			
	<i>pcrV</i>	<i>popB</i>	<i>popD</i>	<i>exoT</i>	<i>exoS</i>	<i>exoU</i>	<i>exoY</i>
臨床株 (31 株)	100%	100%	100%	100%	64.5%	35.5%	87.1%
河川株 (88 株)	100%	100%	100%	100%	100%	1.1%	98.9%
沿岸株 (35 株)	100%	100%	100%	100%	11.4%	88.6%	100%