

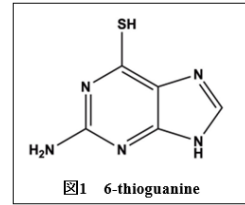
## 公募研究 新規抗菌物質 6-TG を産生する口腔内コアグラエゼ陰性ブドウ球菌の探索と分子疫学的特徴

研究代表者 廣瀬 弥奈 (歯学部 口腔構造・機能発育学系小児歯科学分野)

研究分担者 藤田 裕介 (歯学部 口腔構造・機能発育学系小児歯科学分野)

### 【背景】

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) は今なお世界中で対策が必要とされる最も重要な薬剤耐性菌の一つであり、メチシリン感受性黄色ブドウ球菌 (MSSA) とともに市中・医療関連感染症の主要な原因である。一方で、黄色ブドウ球菌は常在菌としての側面も持ち合わせており、健康成人の約 30% が皮膚や鼻腔に保有するが、本菌種がなぜ一部のヒトのみでしか保有・維持されないか、十分な解明はされていない。この理由の一つに、黄色ブドウ球菌に対する抗菌ペプチド (バクテリオシン) がある。抗菌ペプチドの作用機序は細菌の細胞表層のレセプターに結合することにより細胞膜に膜孔を開け、細胞を破壊、死滅させることによると考えられている。抗菌ペプチドが作用する菌種の範囲は狭く、産生菌の類縁菌に対してのみ有効なものが多い。ブドウ球菌で知られる抗菌ペプチドは少なく、これのみではヒトにおける黄色ブドウ球菌の定着性を説明することは困難である。ごく最近、コアグラエゼ陰性ブドウ球菌 (CoNS) の一部が新規の抗菌物質であるプリン類似分子チオグアニン (6-TG、図 1) を放出し、抗菌ペプチドとは全く異なる機序によって黄色ブドウ球菌の増殖と病原性を抑制することが報告され



た (*Nat. Commun.* 2021, 12:1887)<sup>1)</sup>。TG はグアニンのプリンアナログとして DNA/RNA 合成を阻害する。40 種類以上から成る CoNS は低病原性のブドウ球菌で、一部はヒトの常在細菌叢を構成している。6-TG の産生が確認されたのは *Staphylococcus chromogenes* という菌種で、ヒトからの分離は稀であるが、6-TG 合成遺伝子系はゲノムデータベース上での検索では他の CoNS 菌種にも分布していることが明らかとなっている。ただし人の皮膚・口腔や、環境中に存在する CoNS の中で、どの菌種にどの位の割合で、どのようなクローンに存在するのか全くわかっていない。人体に常在する CoNS における 6-TG 産生の状況を明らかにすることは、抗菌ペプチドとは異なる黄色ブドウ球菌抑制メカニズムの自然界における意義と重要性を提示するものであり、その研究成果は MRSA/MSSA 感染に対するリスク管理や新たな予防法、治療法開発へ向けた応用に結び付く可能性がある。

### 【目的】

本研究では、ヒト由来の CoNS 各菌種における新規抗 MRSA 物質 6-TG 合成遺伝子系 (クラスター) の保有状況を分子疫学的に明らかにする。すなわち、6-TG 合成クラスターの各 CoNS 菌種毎の保有率と、6-TG 陽性菌株の遺伝子型、薬剤耐性や病原性などその他の特徴を解析する。次に、ヒトの皮膚・口腔における 6-TG 保有および非保有 CoNS と MRSA/MSSA との共存状況を解析し、6-TG と黄色ブドウ球菌・MRSA 定着リスクの関連を明らかにする。

### 【方法】

(1) 研究対象・材料: 健康成人・小児の口腔・皮膚由来の CoNS を対象とする。収集先は、本学歯科クリニックと大学病院の歯科受診患者のほか、歯科健診先の受診者である。本研究の主旨を説明し、同意の得られた者を対象として、滅菌綿棒にて口腔底の唾液と手掌をスワブし、これをブドウ球菌選

拭培地にてブドウ球菌を分離・培養後、DNA を抽出する。

今回は、2022 年の春に歯科健診を受診した本学学生 444 名（平均年齢 20 歳）から採取した CoNS を対象に本研究を実施した。（北海道医療大学歯学部倫理委員会 承認番号 第 177 号）

- (2) **遺伝子学的解析**：CoPS(コアグララーゼ陽性ブドウ球菌)と CoNS の判定、メチシリン耐性遺伝子 *mecA*、ACME(アルギニン代謝系可動性遺伝子要素)の同定は多重 PCR で行い、CoNS の菌種同定は 16S rRNA 遺伝子の部分配列を決定し、BLAST 解析による一致率の照合により行った。6-TG 合成遺伝子クラスターの有無は、一部の遺伝子 (*tgsC*: 黄色ブドウ球菌の増殖を抑制する 6-チオグアニンを合成する遺伝子群の 1 つ) を多重 PCR で検出することにより確認した。*S. capitis*については、高病原クローン (NRCS-A) 関連遺伝子 (*nsr*, *ebh*, *tarJ*) を PCR により検出するとともに、*arcC*, *rpoB* 遺伝子の部分配列を PCR-ダイレクトシーケンス法により決定し、MEGA ver. X を用いて系統解析を行った。
- (3) **薬剤感受性試験**：CoNS の抗菌薬に対する薬剤感受性については、微量液体希釈法により測定し、薬剤耐性遺伝子を PCR により検出した。

## 【結果】

- (1) 444 人中、CoNS の分離人数と総株数は、口腔が 10 人/10 株、手掌が 129 人/166 株、口腔・手掌の両方からが 19 人/45 株、合計 158 人/221 株であった。なお、CoPS の株数は合計 137 株分離され、口腔が 101 株、手掌が 36 株であった。
- (2) CoNS は 18 菌種が同定され、*S. capitis*/*S. caprae* (86 株・39%)、*S. warneri* (42 株・19%)、*S. epidermidis* (37 株・17%) の順に多く、*mecA* 保有は 11 株 (5%) で、*S. epidermidis* に多く認められた。
- (3) ACME 保有株は 71 株 (32%) で、*S. capitis*/*S. caprae* (50 株) と、*S. epidermidis* (21 株) に多く認められた。
- (4) *tgsC* 遺伝子を保有した CoNS は、*S. capitis*/*S. caprae* が 86 株中 68 株 (79%)、*S. epidermidis* が 37 株中 1 株 (3%)、*S. lugdunensis* が 9 株中 1 株 (11%) であった。
- (5) 全 86 株の *S. capitis*/*S. caprae* のうち、手掌からの分離株は 78% (59/76 株)、口腔からの分離株は 80% (8/10 株) であった。また、NRCS-A クローンに特徴的な *nsr*, *ebh*, *tarJ* 遺伝子を保有する株は、各 24 株、42 株、11 株で、*S. aureus* との共存状況についてみると、両者が同時に同部位から検出された人数は 4 人で 5% (4/79 人) だった。
- (6) *S. capitis*/*S. caprae* 分離株の遺伝子系統解析 (*arcC*, *rpoB*) では、*S. capitis* は 2 つの cluster に分類され、*tgsC* 遺伝子の保有株は、両方の cluster に認められた。NRCS-A clone 標準株 (CR01) は cluster1 に属していた。本研究で得られた *nsr*, *ebh*, *tarJ* 遺伝子のいずれをも保有する 5 株についても、同様に cluster 1 に分類された。
- (7) *S. capitis*/*S. caprae* 分離株の薬剤耐性率はペニシリンが 24%、アンピシリンが 14%、エリスロマイシンが 8% であった。

## 【考察】

CoNS は代表的な皮膚常在菌であり通常無害であるが、近年、病原性起炎菌として大きな関心を集めている。人工関節など人工器官の周りにバイオフィルムを形成するものや、種々の抗菌薬に耐性を示すものも報告されており、多くの薬剤耐性遺伝子を保有してそれらを MRSA など他のブドウ球菌属へと供給していると考えられている。ごく最近、CoNS の産生する、抗菌ペプチドとは全く異なる物質であるプリン類似体の 6-TG (6 チオグアニン) が、黄色ブドウ球菌の定着・増殖を抑制することが報告された<sup>1)</sup>。この発見はバイオフィルム感染症の予防や治療に突破口を開くものとして大変意義があると考えられる。そこで本研究では、まず 6-TG 産生 CoNS の口腔・手掌における分布状況とその遺伝子学的特徴を解析した。

CoNS は、口腔よりも手掌からの検出率が高く、6-TG を合成する *tgsC* 遺伝子を保有する *S. capitis* が口腔から 8 株 (8/10 株、80%) 分離された。手指からは、59 株 (59/76 株、78%) 分離された。しかし、*tgsC* 遺伝子保有株が CoPS の増殖抑制に寄与しているか否かについては不明である。

一方、NICU で新生児への病原性を高めることで知られる *S. capitis* NRCS-A クローン関連遺伝子を保有する株や、*mecA* 陽性株が健康人から分離されたことから、市中におけるブドウ球菌の薬剤耐性、病原性を今後も継続調査する必要がある。

## 【文献】

1) Chin D. et al., Coagulase-negative staphylococci release a purine analog that inhibits *Staphylococcus aureus* virulence. *NATURE COMMUNICATIONS* (2021) 12:1887.

## 【COI】

本研究に関連し開示すべき事項はない。

## 【共同研究者】

Meiji Soe Aung (札幌医科大学医学部衛生学講座)

小林 宣道 (札幌医科大学医学部衛生学講座)

## 【研究協力者】

加藤 大生 (歯学部 口腔構造・機能発育学系小児歯科学分野)

市村 彰啓 (歯学部 口腔構造・機能発育学系小児歯科学分野)

廣瀬由紀人 (歯学部 口腔機能修復・再建学系クラウンブリッジ・インプラント補綴学)