

【要約】

**Tolerance induction of polyhexamethylene
biguanide on *Purpureocillium lilacinum* strains**

(*Purpureocillium lilacinum* 株におけるポリヘキサ
メチレンビグアニド耐性誘導に関する研究)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：亀井克彦 教授)

ALIMU YIKELAMU

研究の背景及び目的

ポリヘキサメチレンピグアナイド塩酸塩 (PHMB、ポリヘキサニド) は、工業生産、公衆施設および臨床に広く使用されている水溶性高分子カチオン抗菌剤である。PHMB は、グラム陽性およびグラム陰性の細菌、真菌および特定のウイルスに対して強力な抗菌効果を示し、皮膚、眼および鼻の上皮に使用される場合には副作用は報告されていない。用途には、水処理、うがい薬溶液、コンタクトレンズの保存溶液、サルモネラ感染を防ぐための孵化卵の処理、プールの消毒剤、化粧品の保存、および工業プロセスにおけるライン洗浄が含まれる。臨床における消毒剤として、PHMB が感染性角膜炎において真菌およびアcantアメーバに対して有効であることが実証されている。その優れた抗菌特性と安全性プロファイルのために、PHMB は創傷感染を防ぐために局所投与されることが多い。PHMB は臨床では 40 年以上使用されているが、この薬剤に対する抵抗性についての報告は少ない。しかし、我々は PHMB 製品の原液 (PHMB 濃度は 200,000 µg/mL) に真菌が混入していることを発見し、この単離された真菌は、*Purpureocillium lilacinum* として同定された。

P. lilacinum は、世界中に広く生息する糸状菌 (hyaline hyphomycete) である。それは土壌や空气中に分布し、穀物、食品、紙の劣化を引き起こす可能性がある。抗真菌薬に対する潜在的な抵抗性、臨床で使用されるクリームおよびローション製剤の汚染、ならびにカテーテルおよびプラスチックインプラントなどの臨床材料へのコロニー化により臨床的重要性が高まっている。*P. lilacinum* は日和見病原体であり、免疫不全患者等に重度の感染症を引き起こす可能性があり、その発生頻度が高まっている。

分離した菌体は 100,000 µg/mL の PHMB を含むジャガイモ寒天 (PDA) 培地での生育を確認された。しかし、メーカーの推奨によると、水処理用途や洗浄前の固体表面の殺菌には、それぞれ 20~200 µg/mL、200~400 µg/mL の PHMB を使用する。そこでは、「この汚染菌株は、なぜそんなに高い濃度の薬剤で生育するのか？」の問題を解明すべく以下の研究を開始した。まずはこの菌の正体を明確にするために分子系統 (ITS region) に基づいて同定した。その結果、糸状菌の一種で *P. lilacinum* と同定された。これまで、糸状菌、特に *P. lilacinum* に対するこの PHMB 耐性研究は行なわれていない。そのため、この耐性機構を解明すべく、*P. lilacinum* の PHMB 耐性誘導研究を行なった。ゲノム配列解析に基づき、PHMB 耐性株 IFM 63780 (R) には、基準株 CBS 284.36^T と比較して数万個の変異塩基が存在しているため、両株の比較では、耐性遺伝子の確認は困難であった。一方、Elsztein ら (2016) は、*Saccharomyces cerevisiae* の PHMB に対する耐性機構に *NCW2* 遺伝子が関与していることを報告した。*NCW2* に類似した遺伝子因子が *P. lilacinum* ゲノムにも存在するか、ローカル・ベーシック・アライメント検索ツールを用いて検索を行った。しかし、そのような因子は同定されなかった。従って、糸状菌 *P. lilacinum* には別の耐性因子が存在すると考えられる。

本研究では、*P. lilacinum* CBS 284.36^T を高濃度の PHMB を含む培地で培養し、

PHMB 耐性誘導(IR)株 IFM 67050 (IR)および IFM 65838 (IR)を作製した。これらの菌株は、同じ培養条件下で CBS 284. 36^Tの PHMB 耐性よりも高い耐性を示した。遺伝子変異の解析から、*P. lilacinum*の PHMB に対する遺伝的耐性機構の解明を試みた。

研究方法

耐性誘導株を作製するために PHMB を含む培地で *P. lilacinum* 基準株 CBS 284. 36^Tを繰り返し培養した。得られた誘導株の PHMB 耐性を希釈平板法や微量液体希釈法で最小生育阻止濃度(MIC)として測定した。

得られた誘導株 IFM 67050 (IR)および IFM 65838 (IR)について遺伝子変異を調べるために、次世代シーケンサー(Illumina)によるゲノムシーケンスを行なった。NGS データを解析して、基準株と誘導株の DNA 配列を比較し、変異配列を探索した。さらに、変異遺伝子の PHMB 暴露前後で基準株と誘導株ゲノムの RNA 発現量を比較した。

抗菌剤をマーカーとした試験系で耐性誘導株 IFM 65838 (IR)から変異遺伝子に形質転換を試した。*P. lilacinum*はマーカーとした Hygromycin B、Zeocin 及び Geneticin(G418)に高い耐性を示した。そのため、代替方法として *P. lilacinum*の栄養要求性株を作成し、ゲノム編集システムの一つである“CRISPR-Cas9”を利用し新たな形質転換法を開発した。

希釈平板法や微量液体希釈法で MIC によって変異遺伝子ノックアウト株 IFM 65839 (KO)の PHMB 耐性を評価し、耐性遺伝子を特定した。

研究の結果及び考察

P. lilacinum 基準株 CBS 284. 36^Tを高濃度の PHMB で培養し、PHMB 耐性株を作製した。また、耐性誘導株である IFM 67050 (IR)、IFM 65838 (IR)と CBS 284. 36^Tとの PHMB 耐性を比較した。PHMB 含まれていない PDA 培地では、CBS 284. 36^Tの増殖率は IFM 63780 (R)、IFM 67050 (IR)、IFM 65838 (IR)より高かったが、PHMB を含む PDA 培地では増殖率に逆の傾向が見られた。PHMB 耐性の順序は徐々に減少し、IFM 63780 (R)、IFM 65838 (IR)、IFM 67050 (IR)、CBS 284. 36^Tの順であった。21 日間培養後、3 種類の菌株の形態的特徴を走査型電子顕微鏡で観察した。0 μg/mL PHMB を含む PDA で培養した 3 種類の株は、いずれも同様の特性を示したが、30,000 μg/mL の PHMB を含む PDA の培養では差異が観察された。IFM 63780 (R)および IFM 65838 (IR)は成熟した分生子を形成したが、CBS 284. 36^Tは分生子形成が不良であった。このことから、PHMB は基準株の生育を阻害したが、IFM 65838 (IR)は PHMB の影響を受けなかったと考えられる。さらに、MIC 値 (50%生育阻害で判定)は、IFM 63780 (R)、次いで IFM 65838 (IR)、IFM 67050 (IR)、CBS 284. 36^Tで漸次低下した。

P. lilacinum CBS 284. 36^Tドラフトゲノムに対し、IFM 67050 (IR)と IFM 65838 (IR)の変異を検索した。その結果、2つの誘導株でそれぞれ 13 個、8 個の SNP が見つかった。また、耐性誘導株の両方に共通する SNP が 8 個存在し、そのうち 2

個は非同義の SNP、PLI-000628 (G602A)、PLI-008146 (G779A)が存在した。さらに、 Δ PLI-008146 遺伝子座の再予測によると、 Δ PLI-008146 の非同義 SNP はスプライシング変化の部位の組み合わせにつながり、部分配列欠失(p. Y251_G281del)を引き起こすことがわかった。欠失配列には、アデノシンデアミナーゼ(ADA) (GeneBank : OAQ82383. 1)にオーソログな部分アデノシン/AMP デアミナーゼモチーフ(PF00962)が含まれることが判明した。

IFM 63780(R)、CBS 284. 36^Tおよび IFM 65838(IR)の RNA 発現量を PCR 法で分析した。PHMB 添加前後で、PLI-008146 の遺伝子発現量は全ての株でほぼ等しかった。変異遺伝子の発現量は、いずれの培養条件においても、すべての株で大きな変化はなかった。

PHMB 耐性誘導株 IFM 65838 (IR)の Δ PLI-008146 遺伝子ノックアウト株作製を検討した。IFM 65838 (IR)栄養要求性株を作製し、*pyrG* 遺伝子をマーカーとした CRISPR-Cas9 形質転換を行なった。次に、ウラシルを含まない培地で形質転換後の生育したコロニーを選択し、電気泳動で選択を行なった。さらに、サンガーシーケンスにより IFM 65839 (KO) 遺伝子の塩基配列を確認した。結果として、*pyrG* 遺伝子座の配列を挿入し、耐性誘導株における Δ PLI-008146 遺伝子をノックアウトすることに成功した。

IFM 65839 (KO)における PHMB 耐性は、PHMB に対する MIC と増殖率で評価した。IFM 65839 (KO)の MIC 値は 400 μ g/mL で、IFM 63780 (R)、CBS 284. 36^T、IFM 67050 (IR)、IFM 65838 (IR)と比較して、劇的に減少していた。さらに、異なる濃度の PHMB (0、10, 000、20, 000 及び 30, 000 μ g/mL)を含む PDA で生育状況を観察した。25°C で 10 日間培養した後、IFM 65839 (KO)は、PHMB を含むどの培地でいずれも成長を示さなかった。従って、IFM 65839 (KO)の PHMB 耐性が低下していることが確認された。

ADA は、細胞内で核酸の代謝に関わる酵素として知られている。ADA に類似したタンパク質群であるアデノシンデアミナーゼ関連成長因子(ADGF)は、様々な生物において以前に報告されている。Sekiya ら(2013)は、担子菌 *Flammulina velutipes* において ADA が菌糸の成長を制御していることを実証した。さらに、ADA の発現を抑制することにより、*F. velutipes* 株の Hygromycin B 耐性が低下することを見出した。以上のことから、耐性誘導株 IFM 65838 (IR)において ADA をノックアウトすると、成長速度の減少し、PHMB に対する耐性が顕著に低下することが説明できる。従って、ADA の生理的な役割はまだ完全には解明されていないが、ADA が *P. lilacinum* の重要な耐性因子として考えられている。

結論

広域に使用される抗菌剤 PHMB に対して強い耐性を有する糸状菌 *P. lilacinum* を分離した。その耐性機構を解明するため、*P. lilacinum* 基準株に PHMB 耐性を誘導し、耐性誘導株の変異遺伝子 Δ PLI-008146 (ADA 関連遺伝子)をノックアウトすると、

PHMB 耐性が低下することを見出した。従って、ADA は *P. lilacinum* の PHMB 耐性に関わる因子の 1 つであることが推定された。