

## グラム陰性菌の病原性と敗血症

### Pathogenicity of Gram-Negative Bacteria and Sepsis

京都府立医科大学麻酔科学教室 教授

佐和 貞治

Teiji Sawa

京都府立医科大学大学院医学研究科機能制御・再生医学分野麻酔科学

加藤 秀哉

Hideya Kato

安本 寛章

Hiroaki Yasumoto

細菌感染が臓器障害を引き起こして敗血症化する病態は、細菌の病原毒性とそれに対する宿主側の生体反応の複合から形成される。これまでに主要な病原性グラム陰性菌の全ゲノム解析が報告され、新しい病原性や薬剤耐性獲得のメカニズムが遺伝子レベルで解明されてきた。インテグロンに代表される多剤薬剤耐性メカニズム、クオラム・センシングに関わる病原因子の発現、細胞・臓器障害を引き起こすⅢ型&Ⅳ型分泌などが敗血症の病態形成に関わることは間違いない。敗血症の病態理解と治療には、これら詳細を理解した上で、生体全体をシステムとして捉えて、頑強性の保持と生体の脆弱性について学問的に再整理して理解していく必要がある。

#### はじめに

敗血症という難治性の致死性疾患に対して、現在はThe Surviving Sepsis Campaign Guidelines (SSCG)<sup>1)</sup>に代表される総合戦略で対処するが、医療の高度化や患者の免疫力低下、細菌の高度な薬剤耐性化などの複合的要因が複雑に関与し、いまだ決定的な治療成績の改善には至っていない。この領域での今後の進展を考えると、昨今のゲノム科学の進歩に基づく、少なくとも病原性細菌の敗血症の病態形成に関わる分子メカニズムに対する正確な理解と、生体全体の仕組みやその破綻についてシ

ステム・バイオロジ的な考え方に沿って、病態に照らし合わせて理解していくことが重要である。1995年にグラム陰性桿菌であるインフルエンザ桿菌の全ゲノムが解析されて以来<sup>2)</sup>、わずか10年あまりの短い期間に、主要な病原性グラム陰性菌の全ゲノムが次々と解析されてきた。その結果、今まで知られてこなかった新しい病原性や薬剤耐性獲得のメカニズムが遺伝子レベルで解明され、それらに基づいて敗血症に対しても、新しい予防・治療戦略を探索するポストゲノム時代に突入したといえる。

## 全ゲノム解析に基づく病原性細菌への理解

インフルエンザ桿菌の全ゲノム解析の報告<sup>2)</sup>を皮切りに、各種病原性真性細菌の全ゲノム解析プロジェクトが今日まで進められてきた(図1)。1.2Mbpの小さなゲノムを持つ偏性細胞内寄生性の肺炎クラミジア (*Chlamydomphila pneumoniae*)では、それ自身が外環境では単独では増殖できず、宿主細胞内でのみ増殖可能である。一方、7Mbpにせまる最大級のゲノムサイズを持つ緑膿菌は、消毒剤に対しても高い抵抗性を示すように、様々な外環境での生存が可能な仕組みがゲノムに組み込まれている。敗血症に関わる起炎菌には、グラム陰性菌ではバクテロイデス、エンテロバクタ、大腸菌、インフルエンザ桿菌、クレブシエラ、プロテウス、緑膿菌、セラチア、一方、グラム陽性菌では、腸球菌、ブドウ球菌、レンサ球菌と極めて多種多様であり、臨床病態も多彩である。また最近では、エロモナス・ハイドロフィラ菌、ピブリオ・プリニフィカス菌なども新興感染症として重症敗血症の病態に関わる。

## 病原性細菌の全ゲノム解析と株による遺伝変異

多くの病原性細菌種については、ある典型的な臨床株においては全ゲノム解析プロジェクトが完了しているとはいえ、様々な臨床分離株のゲノム構成には遺伝子改変メカニズムが関わることで非常に大きな違いが認められる症例が報告されてきた。例えば、2011年5～6月にドイツで溶血性尿毒症症候群と出血性下痢症の大規模アウトブレイクを起こした腸管凝集性大腸菌O104:H4株では、O157:H7株に代表される腸管出血性大腸菌(enterohemorrhagic *E. coli*: EHEC)が持つ赤痢菌由来と考えられる大腸菌溶原化ファージ由来のペロ毒素遺伝子(stx2)に加えて、発展途上国での乳幼児下痢症や旅行者下痢症を引き起こすO25:H4株などの腸管毒素原性大腸菌(enterotoxigenic *E. coli*: ETEC)の持つ、第3世代以後のセファロsporinやモノバクタム系薬を加水分解するCTX-M型ESBL(extended spectrum  $\beta$ -lactamase)遺伝子を持つプラスミドpESBL由来の薬剤耐性が加わったことで強毒性、多剤耐性の特徴を持つ高

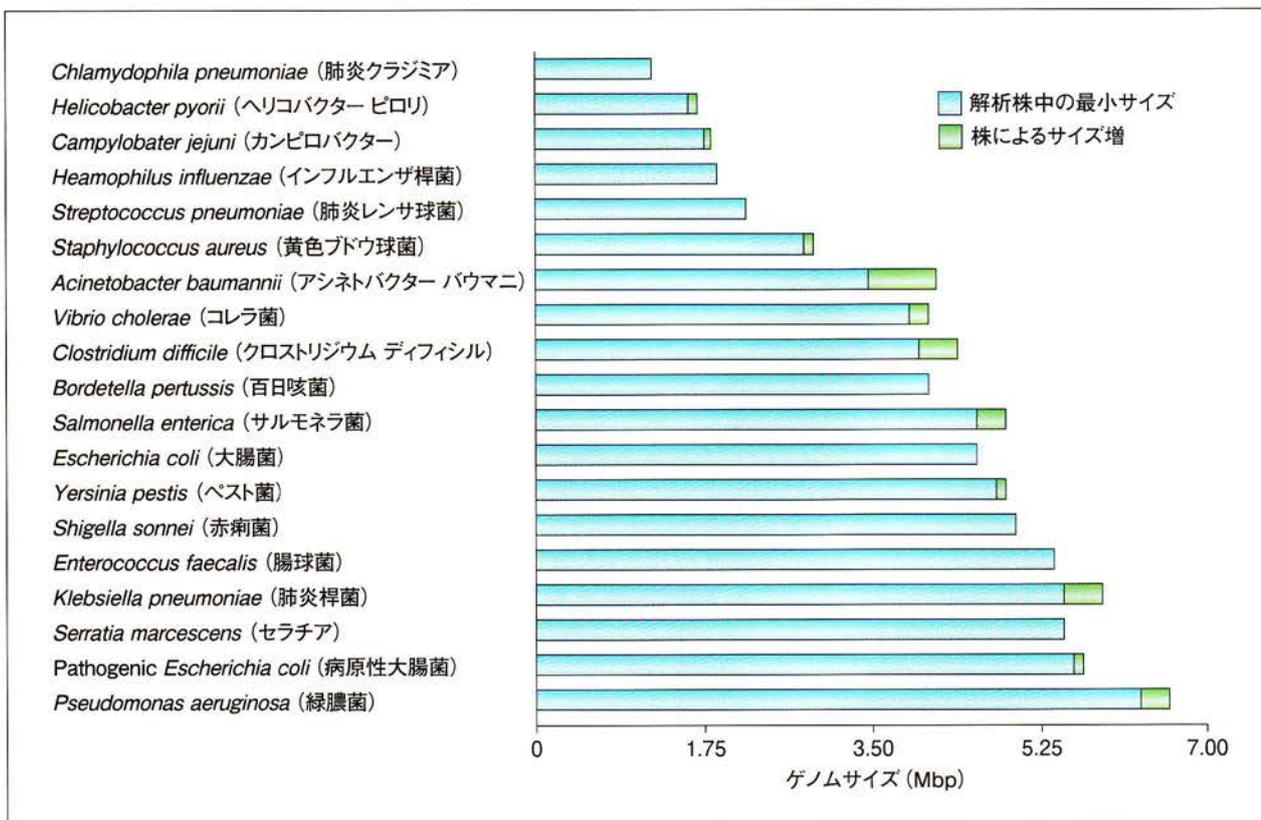


図1 病原性細菌のゲノムサイズ

GenBankに登録されている全ゲノム解析が行われた病原性細菌のゲノムサイズ (Mbp, 100万塩基対)。最小の肺炎クラミジア1.2Mbpから、最大の緑膿菌6.3~6.6Mbpまで、ゲノムサイズには相当な違いがある。

度な病原性<sup>3)</sup>がゲノム解析により説明された。

例えば、緑膿菌においては2000年に基幹株PAO1において5,570の遺伝子を持つ、およそ6.3Mbpの全ゲノム解析が終了した<sup>4)</sup>。緑膿菌には、臨床分離株ごとに、急性感染症を起こす株、慢性感染症に関わる株、異なる薬剤耐性性、ムコイド産生性などの感染性や表現型の違いを認める。この緑膿菌では、現在までに8株において全ゲノム解析が報告され、比較ゲノミクスの観点からこれらの違いについての研究が進められている<sup>5)</sup>。その結果、その表現型の違いには、ゲノムのバックボーンに加わる病原性遺伝子群 (pathogenicity island)、溶原化ファージ (prophage)、プラスミド、トランスポゾン、インテグロンなどの遺伝子水平伝搬 (Horizontal Gene Transfer)<sup>6,7)</sup> (図2,3) による遺伝子の獲得や消失が大きく関わることが報告されてきた<sup>8)</sup>。

インテグロンは、細菌において新しく発見された環境適応に関与する多くの遺伝子カセットを外的に取り込むことができる可動性遺伝子ユニットである (図3)<sup>9)</sup>。この遺伝子カセットがどのように形成されて、外環境に存在しているのかは不明である。インテグロンは、その中に遺伝子が組み込まれているインテグラーゼ (integrase: IntI) の働きで複数の抗菌耐性遺伝子カセットを集積させることで多剤耐性遺伝子連結機構として作動し、またインテグロン全体がトランスポゾンと同様に染色体やプラスミドDNA上に転位して、これらの遺伝子を水平伝

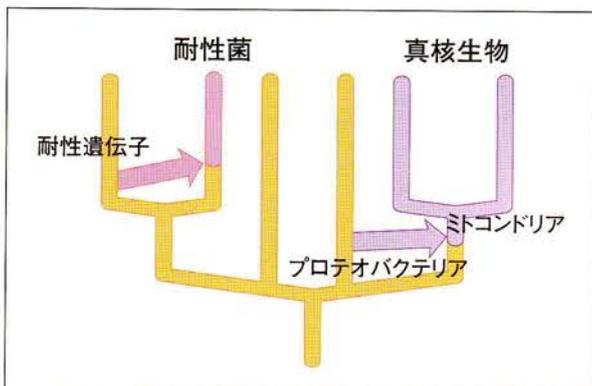


図2 遺伝子水平伝搬

進化の系統図において生物種の分岐と垂直に伸びる親から子への遺伝子の移動に基づく遺伝的な進化軸で形成されているが、進化のある時点において、好気性のプロテオバクテリアがミトコンドリアとして細胞内に寄生した時点で、好気的なエネルギー産生能力を持った真核生物が誕生した。このような種や亜種間での水平への遺伝子の移動が遺伝子水平伝搬 (horizontal gene transfer) の典型例であるが、細菌における病原性遺伝子群 (pathogenicity island) や薬剤耐性遺伝子の伝搬もこの遺伝子水平伝搬のメカニズムが関わる。

搬させる<sup>10)</sup>。緑膿菌の高度多剤耐性に関わるメタロ-β-ラクタマーゼ産生遺伝子は、アミノ配糖体系薬に対する耐性遺伝子らとともに、このインテグロン遺伝子構造上に存在することが報告されている。

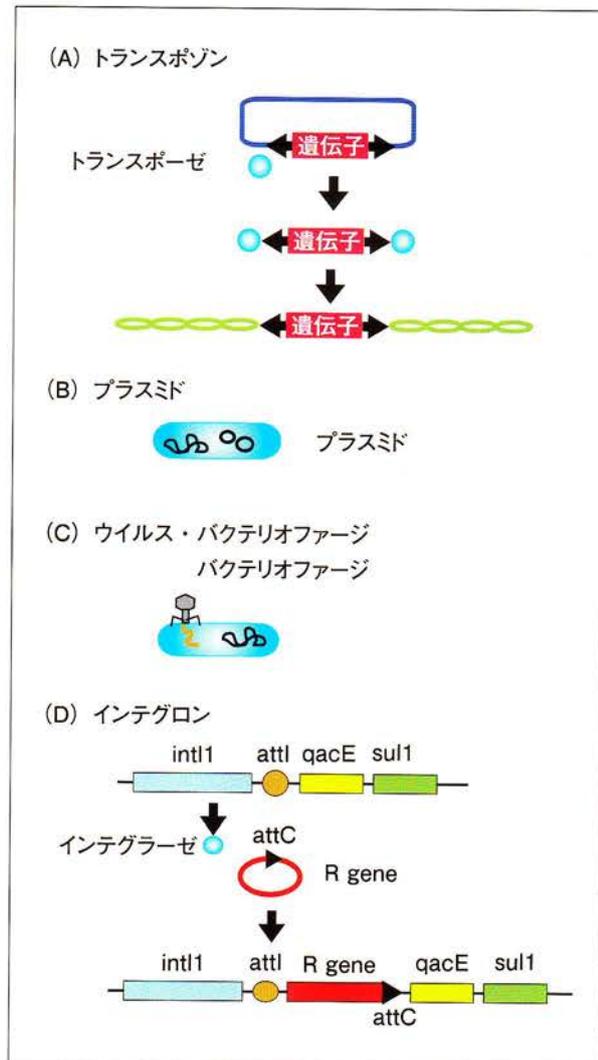
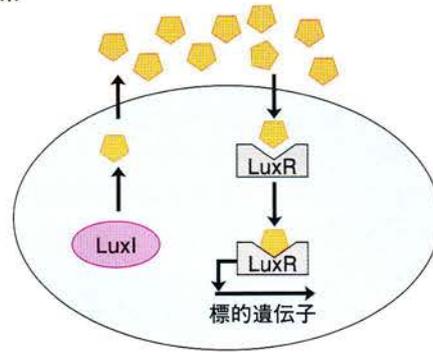
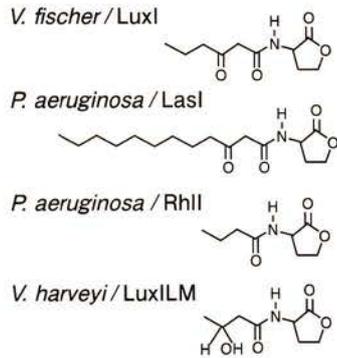


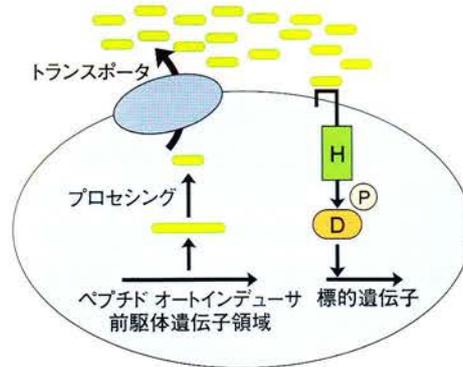
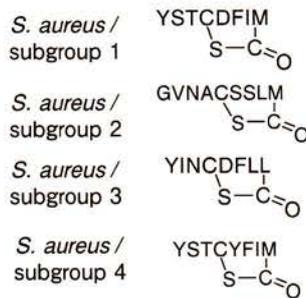
図3 病原性、薬剤耐性に関わる移動遺伝子 (Mobile genes)

新たな病原性や薬剤耐性の獲得には、水平移動可能な遺伝子群が関わる。これらの移動遺伝子にはトランスポゾン、プラスミド、ウイルス・バクテリオファージ (溶原化ファージ: prophage)、インテグロンがある。インテグロンは、それ自身が移動可能でありながら、さらに環境適応に関与する多くの遺伝子カセットを外的に取り込むことができる可動性遺伝子ユニットである。インテグラーゼ (integrase: IntI) の働きで複数の抗菌耐性遺伝子カセットを集積させることで多剤耐性遺伝子連結機構として作動し、またインテグロン全体がトランスポゾンと同様に染色体やプラスミドDNA上に転位して、これらの遺伝子を水平伝搬させる。IntIによる遺伝子の組み換えでは、インテグロン本体上の attIと、遺伝子カセット上の attCと呼ばれる2つの短い挿入配列の間へ目的DNAが挿入される。

(A) アシルホモセリンラクトン (AHL) LuxI 型酵素



(B) オリゴペプチド型オートインデューサ



(C) *Vibrio Harveyi* 型 HAI-1 (AHL型)

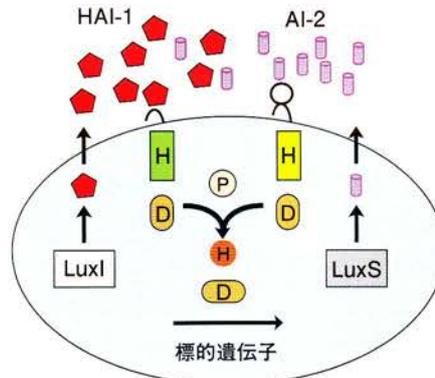
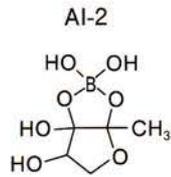


図 4 クオラム・センシング・システム (文献 11 より引用・改変)

クオラム・センシング・システム (Quorum-sensing system) は 3 つに分類される。(A) アシルホモセリンラクトン (AHL) 型: ビブリオや緑膿菌に代表されるグラム陰性菌に広く発見されているシステム。LuxI 型酵素により産生され、分泌されたオートインデューサ (autoinducer) であるアシルホモセリンラクトンは、一定の濃度に達した段階で菌体内の LuxR 型タンパクに結合し、LuxR-AHL 複合体を形成して、転写因子として QS 制御遺伝子のプロモータ領域に結合し、転写を促進する。(B) オリゴペプチド型: 黄色ブドウ球菌を含むグラム陽性菌のシステム。オートインデューサは環状のペプチド鎖であり、能動的に細胞外へ輸送され、細胞膜上のセンサータンパクの細胞外ドメインと結合。リン酸化シグナルが転写を制御。(C) *Vibrio harveyi* 型: *Vibrio harveyi* に代表される生物発光を制御するシステム。オートインデューサ (autoinducer-2, AI-2) はフランホウ酸ジエステル型で、結合タンパク LuxP (periplasmic protein) と結合し、その結果のリン酸化シグナルが転写を制御。AI-2 は多くのグラム陰性、陽性菌により産生される。

## 病原性細菌の集団的遺伝子発現制御系 (Quorum-sensing system)

クオラム (quorum) とは、議会における議決に必要な定足数のことを意味する。細菌のクオラム・センシング (quorum sensing) とは、周辺環境に存在する同種の細菌密度を細菌自身が感知して、周りの細菌の数が一定数を越えたときに初めてそれに応じて遺伝子の発現をオンにして、特定の物質の産生を行なう機構のことである (図4)<sup>11)</sup> 代表的な例としては、イカの発光器官に寄生する発光バクテリア (*Vibrio fischeri*) による発光機構や、緑膿菌の外毒素やバイオフィーム産生機構などがこの制御にある。このクオラム・センシング・システムでは、細菌は細胞内で産生されたオートインデューサ (autoinducer) と呼ばれる物質を菌体外へ分泌し、細菌数が増加し、オートインデューサが外環境において一定の濃度に達した段階で、環境中に生存する同種細菌の菌体内へ拡散が達成され、それによってコントロールされている環境に存在する同種細菌群の遺伝子の転写が促進

され特定の物質産生が起きる。この現象の生物学的な意義は、個々の細菌だけの単独活動ではほとんど意味がないが、集団で発現することによって細菌にとって有利な環境形成が構築できる行動などの理由が考えられる。グラム陰性菌の多くでは、アシルホモセリンラクトン (AHL) 類、グラム陽性菌では環状のペプチド鎖がオートインデューサとして働く。

## Ⅲ型およびⅣ型タンパク毒素分泌システム

グラム陰性菌のタンパク毒素分泌は、従来はⅠ型およびⅡ型として分類されてきた。一方、20世紀末に新しく同定分類されたⅢ型およびⅣ型タンパク分泌システムでは、細菌は、標的眞核細胞と直接接触し、特殊な分泌転移装置を用いて、細胞膜に毒素を転移させる孔 (ポア) を形成し、直接、タンパク毒素を標的細胞の細胞質内に転移させる (図5)<sup>12)</sup>。転移されたタンパク毒素は、その酵素作用を用いて、眞核生物の持つ細胞シグナリングに修飾を加えることで毒性を発揮する。Ⅲ型分泌システムは、エルシニア菌、病原性大腸菌、赤痢菌、サルモネラ菌、緑膿菌などの病原性細菌で幅広く同定されている。Ⅳ型分泌システムはピロリ菌やレジオネラ菌において同定されている。Ⅲ型とⅣ型分泌システムでは、ともにタンパク毒素を直接、標的細胞に転移させるが、Ⅲ型では鞭毛 (flagella)、Ⅳ型では細菌接合 (conjugation) システムとの構造上の相同性が認められる。

緑膿菌のⅢ型分泌システムについて図6に示す<sup>13)</sup>。分泌毒素にはADPリボシル化活性を持つExoenzyme S (ExoS)、このExoSと相同性を持ち、同じくADPリボシル化活性を持つExoT、急性肺傷害を起こす主要な緑膿菌毒素と同定したExoU、そしてアデニル酸シクラーゼの作用を持つExoYと、以上4つが同定されている<sup>14)</sup>。緑膿菌は、眞核細胞への接触到続いて、ExoS、ExoT、ExoUそしてExoY等の分泌タンパクの生合成を急速に誘導し<sup>15)</sup>、特殊な分泌装置で細菌内膜、外膜、眞核細胞原形質膜の三重膜トンネルを形成し、直接分泌タンパク毒素を眞核細胞の細胞質内へ送り込む。肺感染においては、緑膿菌は肺上皮細胞にこれらのⅢ型分泌毒素を打ち込むことで、急性肺上皮傷害を引き起こし、菌血症、敗血症をもたらす<sup>16)</sup>。

緑膿菌には、分泌する外毒素の種類が異なる様々な株が存在する<sup>17)</sup>。急性肺傷害およびそれに続発する菌血症を誘発する株は、Ⅲ型分泌システムによる分泌毒素であるExoUを発現している。ExoU遺伝子のノックアウト変異株や、その表現系がネガティブな株では、急性肺傷害・

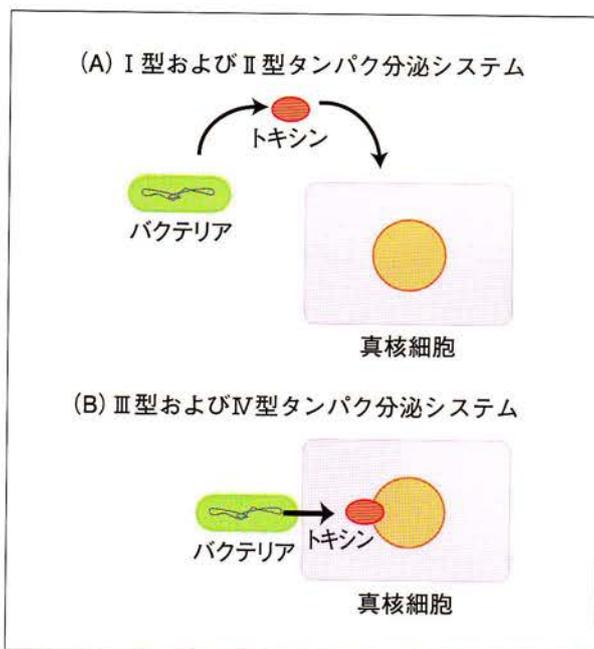


図5 グラム陰性菌のタンパク毒素分泌システム

Ⅰ型およびⅡ型タンパク分泌システムでは、細菌は分泌装置を用いてタンパク毒素を細胞外環境に分泌し、分泌された毒素は、標的眞核細胞の細胞膜を通過する何らかのメカニズムを経て、標的細胞の細胞内に到達し、毒素としての作用を発揮する。一方、20世紀末に新しく同定分類されたⅢ型およびⅣ型タンパク分泌システムでは、細菌は、標的眞核細胞と直接接触し、特殊な分泌転移装置を用いて、細胞膜に毒素を転移させる孔 (ポア) を形成し、直接、タンパク毒素を標的細胞の細胞質内に転移させる。

菌血症は起こらない<sup>18)</sup>。つまり、緑膿菌性肺炎による急性肺傷害と、それに続発する菌血症のメカニズムとして、細菌のⅢ型分泌システムにより、肺上皮細胞内に直接転移された分泌毒素が、肺上皮細胞の壊死を起し、肺上皮バリアーを破壊し、急速な細菌の全身播種が発生する。肺上皮バリアーの破壊は、細菌の全身性播種のみならず、肺腔側に誘導・蓄積された腫瘍壊死因子 (TNF) やインターロイキン等の炎症性メディエータの、肺から全身循環への急速な移動を誘発し、全身性炎症性症候群 (systemic inflammatory response syndrome : SIRS) の病態形成に関わり、臨床的予後を悪化させている<sup>19)</sup>。

## 臓器障害と敗血症

感染症が臓器障害を引き起こし、敗血症化する病態には、病原体の病原毒性とそれに対する生体反応の複合から形成される。グラム陰性菌の外膜構成成分であるリポポリサッカライド (LPS) は細菌の持つ内毒素 (endotoxin) として、トール様受容体 (toll-like receptors : TLRs) に代表される生体の持つ先天性免疫機構であるパターン認識 (pattern recognition receptors : PRRs) により病原体の持つパターンとして認識され、そのシグナルを細胞内伝達系に伝え、適切な炎症・免疫反応を誘導する<sup>20)</sup>。しかしながら、病原体との長い進化の関わりの中で、病原体の構成成分を緻密に認識しうる免疫機構を頑強 (robust) に生きるために発達させてきた宿主において、

その仕組みそのものが命取りとなる脆弱性へのトレード・オフを秘めている。その破綻には、①宿主にとって想定外であるかもしれない上記のようなインテグロンに代表される遺伝子水平獲得メカニズムによる多剤薬剤耐性、②クオラム・センシングが関わる細菌生体系が集団的に行動することでその効果が発揮される毒性因子の発現やバイオフィーム産生、そして、③より攻撃的に宿主細胞の免疫を回避して、その体内深部に侵入し、臓器障害を引き起こす仕組みであるⅢ型ならびにⅣ型分泌システムなどが関わる。

## まとめ

LPSに対する宿主側の認識機構が敗血症性ショックの病態形成に関わることは間違いなが、この機構はあくまで宿主側が病原体への認識機構として発達させてきたものであり、この機構がショックの原因となるから単純に抑制するという発想では、逆に宿主が病原体への認識機構を失うことを意味するわけであるから、病原体にとってより有利な状況が予想され、感染が悪化することは必須である。敗血症の病態理解と治療戦略には、このような単純な理解から脱却し、生体全体をシステムとして捉えて、生存のための頑強性 (robustness) の保持とそのため生じた脆弱性トレード・オフについて学問的に再整理して理解していく必要があると考える。

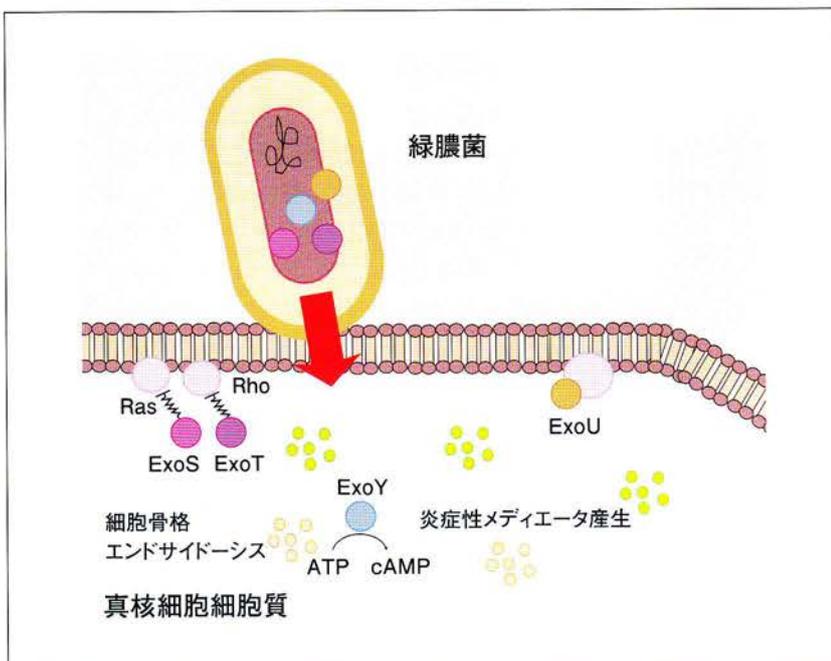


図6 緑膿菌のⅢ型分泌システム

分泌毒素には ADP リボシル化活性を持つ Exoenzyme S (ExoS)、この ExoS と相同性を持ち、GT Pase 活性化作用を持つ ExoT、急性肺傷害の最も主要な緑膿菌毒素と同一した ExoU、そしてアデニル酸シクラーゼの作用を持つ ExoY が同定されている。緑膿菌は、真核細胞への接触に続いて、ExoS、ExoT、ExoU そして ExoY 等の分泌タンパクの生合成を誘導し、Ⅲ型分泌装置を通じて細菌内膜、外膜、真核細胞原形質膜の三重膜トンネルを形成し、直接分泌タンパクを真核細胞の細胞質内へ送り込む。肺感染においては、緑膿菌は肺上皮細胞にこれらのⅢ型分泌毒素を打ち込むことで急性肺上皮傷害を引き起こし、菌血症、敗血症をもたらす。

- 1) Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, et al. : The Surviving Sepsis Campaign : international guidelines for management of severe sepsis and septic shock : 2008. *Crit Care Med* 36 : 296-327, 2008
- 2) Fleischmann RD, Adams MD, White O, et al. : Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 269 : 496-512, 1995
- 3) Buchholz U, Bernard H, Werber D, et al. : German outbreak of *Escherichia coli* O104 : H4 associated with sprouts. *N Engl J Med* 365 : 1763-1770, 2011
- 4) Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, et al. : Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* 406 : 959-964, 2000
- 5) Klockgether J, Cramer N, Wiehlmann L, et al. : *Pseudomonas aeruginosa* genomic structure and diversity. *Front Microbiol* 2 : 150.1-150.18, 2011
- 6) Mel SF, Mekalanos JJ : Modulation of horizontal gene transfer in pathogenic bacteria by in vivo signals. *Cell* 87 : 795-798, 1996
- 7) Groisman EA, Ochman H : Pathogenicity islands : Bacterial evolution in quantum leaps. *Cell* 87 : 791-794, 1996
- 8) Alekshun MN, Levy SB : Molecular mechanisms of anti-bacterial multidrug resistance. *Cell* 128 : 1037-1050, 2007
- 9) Mazel D : Integrons : agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol* 4 : 608-620, 2006
- 10) Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, et al. : Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev* 33 : 757-784, 2009
- 11) Bassler BL : Small Talk : Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell* 109 : 421-424, 2002
- 12) Hayes CS, Aoki SK, Low DA : Bacterial contact-dependent delivery systems. *Annu Rev Genet* 44 : 71-90, 2010
- 13) 佐和貞治 : 緑膿菌性肺炎・敗血症とⅢ型分泌システム. *日集中医会誌* 8 : 305-310, 2001
- 14) Sawa T, Wiener-Kronish JP : A therapeutic strategy against the shared virulence mechanism utilized by both *Yersinia pestis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Anesthesiol Clin North America* : 591-606, 2004
- 15) 森山潔, 佐和貞治 : グラム陰性菌の毒素について - 緑膿菌Ⅲ型分泌毒素を中心に -. *臨床麻酔* 29 : 1279-1286, 2005
- 16) 佐和貞治 : 病原性グラム陰性菌のⅢ型分泌. 抗原ワクチン・抗体療法の開発. *京府医大誌* 120 : 659-671, 2011
- 17) Roy-Burman A, Savel RH, Racine S, et al. : Type III protein secretion is associated with death in lower respiratory and systemic *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Infect Dis* 183 : 1767-1764, 2001
- 18) Kurahashi K, Kajikawa O, Sawa T, et al. : Pathogenesis of septic shock in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J Clin Invest* 104 : 743-750, 1999
- 19) El-Solh AA, Hattemer A, Hauser AR, et al. : Clinical outcomes of type III *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Crit Care Med*. 2011 Nov 10 [Epub]
- 20) 佐和貞治 : 手術侵襲と炎症・免疫反応. *臨床麻酔* 35 : 1483-1489, 2011