

〈研究報告〉

高粘稠性 *Klebsiella pneumoniae* に対するリファンピシンの有用性

並川浩己¹⁾・老沼研一^{2,3)}・金子幸弘^{2,3)}・掛屋 弘^{3,4)}

¹⁾ 大阪市立大学大学院医学研究科総合医学教育学／総合診療センター

²⁾ 大阪市立大学大学院医学研究科細菌学

³⁾ 大阪市立大学大学院医学研究科感染症科学研究センター

⁴⁾ 大阪市立大学大学院医学研究科臨床感染制御学

(2019年10月10日受付)

近年、日本を含めた東・東南アジアを中心として、高粘稠性の *Klebsiella pneumoniae* (hvKP) が臨床上問題となっている。本菌の高病原性には、莢膜多糖合成遺伝子である regulator of mucoid phenotype A (*rmpA*) 等の働きによる莢膜多糖の過剰産生が関与している。今まで hvKP の高病原性のメカニズムに関する研究は数多くされてきているが、抗病原性療法に焦点をあてた研究はない。我々は、hvKP の高粘稠性を抑制することができる薬剤を既存の抗菌薬の中から探索した。結果、リファンピシン (RFP) に強い粘稠性抑制作用があることを発見した。また RFP は莢膜の厚さを減少させ、さらに *rmpA* を中心とした莢膜関連遺伝子の転写を抑制することが判明した。以上のことから、リファンピシンが本菌による難治性感染症に対する治療薬として役立つ可能性があることが示唆された。

I. 序文

Klebsiella pneumoniae は市中・院内感染症の原因として、ありふれたグラム陰性菌である。*K. pneumoniae* は主に肺炎、尿路感染症ならびに胆道感染症を引き起こす日和見感染菌として知られている。しかしながら近年、日本を含めた東・東南アジアを中心として、極めて病原性の高い高粘稠性の *K. pneumoniae* (hypermucoviscous *K. pneumoniae*: hvKP) が臨床上問題となっている¹⁾。高粘稠性の有無は string test により判断される。HvKP は膿瘍を形成し多臓器に感染しやすい特徴を持つ。

HvKP は、菌血症、肝膿瘍、肺炎、眼内炎そして髄膜炎を含む重篤な感染症を引き起こす²⁾。HvKP による菌血症患者は、non-hvKP による菌血症患者と比較して、死亡率が有意に高いことが報告されている^{3,4)}。HvKP は、一般的に知られている *K. pneumoniae* と同様の抗菌薬感受性を示すが、上記のような高病原性を持ち、さらに感染局所より菌が排除されにくいことから、治療に難渋する場合が多い。実際に我々は、治療に難渋した hvKP による感染症を 2 例経験している⁵⁾。

高病原性には、菌体外多糖から成る粘性物質の関与が指摘されている⁶⁾。高粘稠性関連遺伝子として、莢膜合成に関与している mucoviscosity-

associated gene A (*magA*) および転写活性に関与している regulator of mucoid phenotype A (*rmpA*) が知られている⁷⁾。今まで hvKP の高病原性のメカニズムに関する研究は数多くされてきているが、抗菌薬による高粘稠性抑制療法に焦点をあてた研究はない。我々は、hvKP の高粘稠性抑制が治療の鍵となる可能性があるのではないかと考えた。研究の結果、リファンピシン (RFP) に hvKP に対する強い粘稠性抑制効果があることを発見した。本稿では、最近 International Journal of Antimicrobial Agents 誌上で発表した内容⁸⁾ を中心として、我々の研究成果を概説する。

II. 材料と方法

1. 使用菌株

大阪市立大学医学部附属病院にて患者検体より分離された hvKP 4 株を主な研究対象として、non-hvKP である ATCC 700603 (標準株) を比較対象としてそれぞれ使用した。

2. 使用薬剤

Benzylpenicillin, ampicillin, meropenem, metronidazole, streptomycin, kanamycin, gentamicin, amikacin, ciprofloxacin, ofloxacin, azithromycin, clarithromycin, tetracycline, chloramphenicol, RFP, vancomycin, polymyxin B, colistin の計 18 種の抗菌薬を使用した。

3. 多糖抽出液の粘度測定

最小発育阻止濃度より 2 管低い濃度の抗菌薬を含む液体培地 (Mueller Hinton II) で、標準株と hvKP 株を培養した (37°C, 一晚)。その培養液を界面活性剤の添加後熱処理し、菌体外多糖を可溶化した。本サンプルを遠心分離とろ過により透明化した後、オストワルド粘度計を用いた粘度測定に供し比粘度 (サンプルの流下時間と水の流下時

間の差を水の流下時間で除した値) を算出した。

4. 顕微鏡による菌体外多糖の観察

墨汁染色法を用いて、標準株、RFP 未処理の hvKP 株、RFP 処理後の hvKP 株を光学顕微鏡にて直接観察した。

5. リアルタイム PCR による転写量の測定

先行研究⁹⁾ を参考にし、RFP 未処理の hvKP と RFP 処理後の hvKP の全 RNA を抽出し、*magA* および *rmpA* 遺伝子の転写量の変化を、リアルタイム PCR により測定し比較した。

図1. 標準株と hvKP 株の粘度の比較

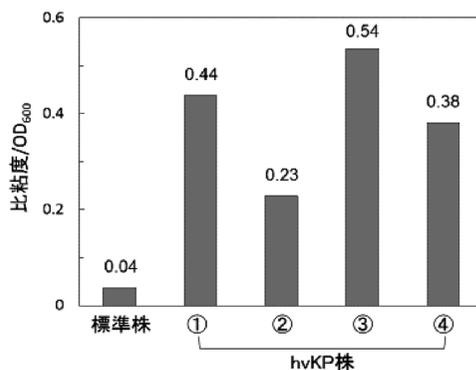


図2. hvKP 株に対する RFP の粘性抑制効果

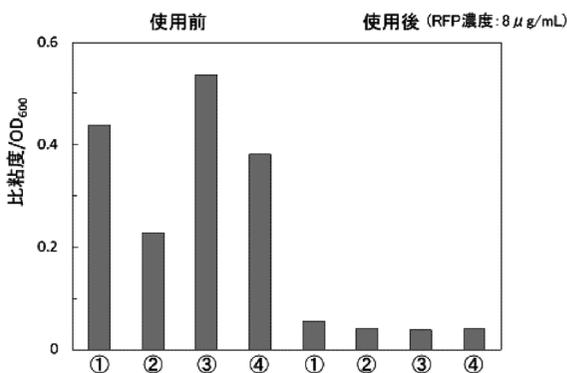


図3. 墨汁染色法を用いた莢膜の観察

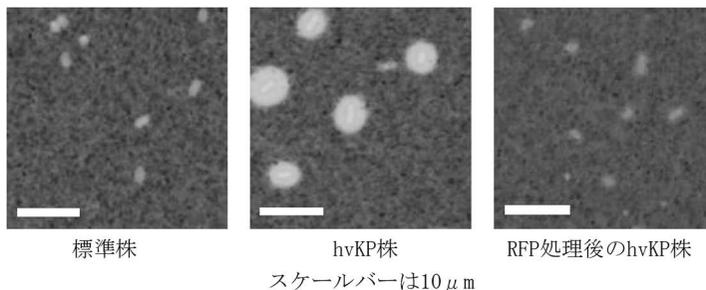
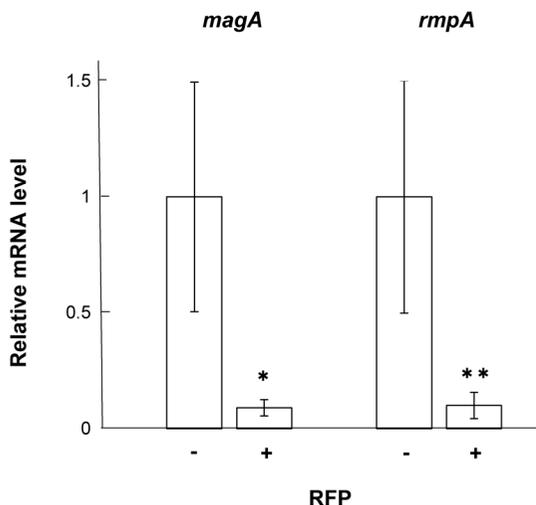


図4. 莢膜関連遺伝子の転写量に及ぼすRFPの効果



*magA*は4回、*rmpA*は6回の独立した実験による結果。バーは標準偏差を示している。検定はMann-Whitney U testを使用し、*は $P < 0.05$ 、**は $P < 0.01$ を示す。

III. 結果

まず第一に、hvKP株は標準株と比較して、粘稠度が約10倍高かった(図1)。さらにRFPにhvKP4株全てに対して強い粘稠抑制効果があることを確認した(図2)。

次に、hvKP株は標準株と比較して、莢膜が厚いことを確認した(図3)。また、RFPで処理することにより、hvKPの厚い莢膜が消失することが

判明した(図3)。

最後に、RFPは*magA*、*rmpA*の両遺伝子の転写を抑制することが判明した(図4)。

IV. 考察

本研究の目的は、菌の発育抑制とは異なるメカニズムにより、hvKPの粘稠性を抑制することができる抗菌薬を発見することである。この目標を達成するために、我々はまず、hvKPの粘稠性を評価する方法を確立することを試みた。これまでの研究では、主にstring test、細菌培養液の遠心分離後のOD₆₀₀測定、莢膜の成分であるグルクロン酸定量が、hvKPの粘稠性の評価法として使用されてきた^{10,11}。String testやOD₆₀₀測定は、定量性・再現性に乏しい方法のため、本研究では用いなかった。またグルクロン酸量の測定に関しては、莢膜多糖の粘稠性を正確に反映するものかどうかの確証がなかったため、今回は使用を見送った。既存の方法のかわりに、我々は粘度計を用いた菌体外多糖の直接的な粘性評価を試みた。実際には、粘度計で測定した比粘度をOD₆₀₀値で除した値を、粘稠性抑制効果の比較に使用した。この方法は、定量性・再現性に優れており、hvKPの粘稠性を評価するのに十分なものであった。この方法は、抗菌薬の粘稠抑制を評価するのに理想的であり、結果として我々はhvKPに対するRFPの

高い粘稠抑制作用を見出すことに成功した。

次にhvKPに対するRFPの効果を評価するために、墨汁染色を用いて莢膜の厚さを光学顕微鏡で直接確認した。墨汁染色は、古くから顕微鏡にて莢膜の存在を確かめるために使用されてきた¹²⁾。この方法を用いることで、莢膜は菌周囲のclear haloとして観察することができる。墨汁染色は非常に簡便かつ有用な方法であるにもかかわらず、今まで墨汁染色を用いてhvKPとnon-hvKPの莢膜の厚さを比較した研究はなかった。もし莢膜の厚さがhvKPの高病原性に関連するのであれば、墨汁染色は高病原性スクリーニング法に適した方法であるかもしれない。

*K. pneumoniae*の莢膜多糖合成遺伝子クラスターは、少なくとも3つのプロモーターを含んでいる。それらは*galF*, *wzi*そして*manC*の上流領域に位置する¹³⁾。RmpAはこれらすべてのプロモーターの活性を増加させる役割を持つ¹⁴⁾。本稿にはデータは示していないが、本研究ではRFPをhvKPに作用させることにより、*magA*と*rmpA*だけでなく、*galF*, *wzi*そして*manC*の転写も抑制することを確認している⁸⁾。以上のことから、hvKPに対するRFPの効果は、*rmpA*の発現抑制を介して発揮されるものと考えられる。しかしながら、その機序の解明は十分ではなく、今後更に研究を進めていく必要がある。

*K. pneumoniae*の莢膜は好中球や補体の貪食作用に対する抵抗力を増加させる¹⁵⁾。莢膜多糖の過剰産生は膿瘍形成や多臓器への転移と強く関連している¹⁶⁾。これらのことから、RFPによりhvKPの粘稠性を抑制することで、hvKP感染症の効率的な治療が可能になると推察される。*K. pneumoniae*は一般的にはRFPに感受性は示さない。そのため、hvKPの治療としてRFP単独では効果がないと考えられる。従って、*K. pneumoniae*に対し有効な他の一般抗菌薬との併用が選択肢にあがる可能性がある。

本研究は緒に就いたばかりであり、臨床応用の実現に向け、今後多くの課題に取り組んでいく必要がある。例えば、RFPの作用機序に関しては、未だ不明な点が多く、今後解明していく必要がある。また、hvKPに対するRFPの効果は*in vitro*のみでしか確認できていない。今後、動物モデルを使用して、hvKPに対するRFPの効果を確認する必要がある。

結論として、RFPは*rmpA*を中心とした莢膜関連遺伝子の発現を強力に抑制し、莢膜多糖産生を減少させることで、hvKPに対して強い粘稠抑制作用を示すことが明らかとなった。*In vivo*の実験でその効果が証明されれば、RFPがhvKP感染症に対する治療薬の選択肢の一つとなる可能性がある。

謝辞

研究奨励金を交付いただいた、公益財団法人日本感染症医薬品協会に深謝致します。

利益相反

なし

[この研究報告は、2018年度奨励賞受賞者 並川浩己先生が受賞後の研究をまとめたものです。]

引用文献

- 1) Yu VL, Hansen DS, Ko WC, *et al.*: Virulence characteristics of *Klebsiella* and clinical manifestations of *K. pneumoniae* bloodstream infections. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13: 986–93.
- 2) Shon AS, Bajwa RP, Russo TA: Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: A new and dangerous breed. *Virulence.* 2013; 4: 107–18.
- 3) Togawa A, Toh H, Onozawa K, *et al.*: Influence of the bacterial phenotypes on the clinical manifestations in *Klebsiella pneumoniae* bacteremia patients: A retrospective cohort study. *J Infect Chemother.* 2015; 21: 531–7.

- 4) Namikawa H, Yamada K, Sakiyama A, *et al.*: Clinical characteristics of bacteremia caused by hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* at a tertiary hospital. *Diag Microbial Infect Dis.* 2019; 95: 84–8.
 - 5) Namikawa H, Yamada K, Fujimoto H, *et al.*: Two unusual cases of successful treatment of hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* invasive syndrome. *BMC Infect Dis.* 2016; 16: 680.
 - 6) Paczosa MK, Mecsas J: *Klebsiella pneumoniae*: Going on the offense with a strong defense. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2016; 80: 629–61.
 - 7) Yu WL, Ko WC, Cheng KC, *et al.*: Association between *rmpA* and *magA* genes and clinical syndromes caused by *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *Clin Infect Dis.* 2006; 42: 1351–8.
 - 8) Namikawa H, Oinuma KI, Sakiyama A, *et al.*: Discovery of anti-mucoviscous activity of rifampicin and its potential as a candidate anti-virulence agent against hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents.* 2019; 54: 167–75.
 - 9) Hanaoka N, Takano Y, Shibuya K, Fugo H, Uehara Y, Nimi M: Identification of the putative protein phosphatase gene *PTC1* as a virulence-related gene using a silkworm model of *Candida albicans* infection. *Eukaryot Cell.* 2008; 7: 1640–8.
 - 10) Choi MJ, Kim S, Ko KS: Pathways regulating the *pbgP* operon and colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* strains. *J Microbiol Biotechnol.* 2016; 26: 1620–8.
 - 11) Ares MA, Fernández-Vázquez JL, Rosales-Reyes R, *et al.*: H-NS nucleoid protein controls virulence features of *Klebsiella pneumoniae* by regulating the expression of type 3 pili and the capsule polysaccharide. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016; 6: 13.
 - 12) Hoogerheide JC: Studies on capsule formation: I. The conditions under which *Klebsiella pneumoniae* (Friedländer's bacterium) forms capsules. *J Bacteriol.* 1939; 38: 367–89.
 - 13) Shu HY, Fung CP, Liu YM, *et al.*: Genetic diversity of capsular polysaccharide biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *Microbiology.* 2009; 155: 4170–83.
 - 14) Cheng HY, Chen YS, Wu CY, Chang HY, Lai YC, Peng HL: RmpA regulation of capsular polysaccharide biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *J Bacteriol.* 2010; 192: 3144–58.
 - 15) Siu LK, Yeh KM, Lin JC, Fung CP, Chang FY: *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: A new invasive syndrome. *Lancet Infect Dis.* 2012; 12: 881–7.
 - 16) Fang CT, Chuang YP, Shun CT, Chang SC, Wang JT: A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. *J Exp Med.* 2004; 199: 697–705.
-

Usefulness of rifampicin against hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae*

Hiroki Namikawa¹⁾, Ken-Ichi Oinuma^{2,3)},
Yukihiro Kaneko^{2,3)} and Hiroshi Kakeya^{3,4)}

¹⁾ Department of Medical Education and General Practice,
Osaka City University, Graduate School of Medicine,
1-4-3 Asahi-machi, Abeno-ku, Osaka 545-8585, Japan

²⁾ Department of Bacteriology, Osaka City University,
Graduate School of Medicine,
1-4-3 Asahi-machi, Abeno-ku, Osaka 545-8585, Japan

³⁾ Research Center for Infectious Disease Sciences, Osaka City University,
Graduate School of Medicine, 1-4-3 Asahi-machi,
Abeno-ku, Osaka 545-8585, Japan

⁴⁾ Department of Infection Control Science, Osaka City University,
Graduate School of Medicine,
1-4-3 Asahi-machi, Abeno-ku, Osaka 545-8585, Japan

In recent years, the increase in the incidence of hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* (hvKP) infections has become a clinical concern worldwide. The high pathogenicity of hvKP is in part attributed to the overproduction of capsular polysaccharide (CPS), which is achieved by the action of a positive regulator of capsular polysaccharide synthesis genes, named *rmpA*. There have been many studies on the mechanism of hvKP virulence, but no study has focused on the development of anti-virulence therapies. We tried to identify antimicrobial drugs that can suppress the hypermucoviscosity of hvKP. As a result, we found that rifampicin (RFP) has a strong anti-mucoviscous activity against hvKP. RFP treatment caused a drastic reduction in the thickness of the CPS layer around hvKP cells and suppressed transcript levels of capsule-related genes including *rmpA*. Our data suggest that RFP may be useful as a potential anti-virulence agent for intractable infections caused by hvKP.