

[原 著]

Klebsiella K 抗原血清型標準株におけるバイオフィーム形成能と莢膜多糖
および菌体表面タンパク質との関連性に関する検討石原由華^{1,2)*}・太田美智男^{1,2)}¹⁾ 椋山女学園大学看護学部看護学科²⁾ 名古屋大学医学系研究科分子病原細菌学

(平成 22 年 6 月 2 日受付, 平成 22 年 8 月 9 日受理)

Klebsiella の主要病原因子である莢膜多糖 (K 抗原) と線毛は, バイオフィーム形成に深く関与していることが指摘されている。そこで *Klebsiella* の 76 の K 抗原型標準株においてコロニー表現型, プロテアーゼ処理とバイオフィーム形成能を調べ, バイオフィーム形成における莢膜多糖と菌体表面タンパク質 (おそらくは線毛) の関連性を検討した。25°C および 37°C 培養でバイオフィームを高度に形成した K8, K17, K27, K37 株はすべて non-hypermucoviscosity 型のコロニーを呈し, 一方で 25°C, 37°C の両方でバイオフィーム形成が検出されなかった K1, K2, K3 株は hypermucoviscosity 型であった。したがってコロニーの mucoviscosity はバイオフィーム形成に直接的に関与していないか, あるいは逆の相関がある可能性が示された。さらに 37°C 培養で形成したバイオフィームがプロテアーゼ処理により顕著に減少したのは K8, K27, K79 株で, 25°C 培養で同処理により減少したのは K27 株であった。これらの株は, バイオフィームの形成過程において菌体表面タンパク質が莢膜多糖よりも優位に関与している可能性が考えられた。一方, バイオフィーム形成において莢膜多糖のほうが菌体表面タンパク質よりも強く関与していると思われたのは K37 株であり, 25°C および 37°C でバイオフィームを高度に形成したがプロテアーゼ処理効果が全く見られなかった。以上から, *Klebsiella* のバイオフィームは K 抗原型株によって異なり, 莢膜多糖が優位に関与する株と菌体表面タンパク質が優位に関与する株, どちらともはっきりしない場合があることが見いだされた。

Key words: *Klebsiella* K 抗原血清型標準株, バイオフィーム, 莢膜多糖, 菌体表面タンパク質, プロテアーゼ処理

I. はじめに

Klebsiella は腸内細菌科に属し, 主要な *Klebsiella* 属細菌は *Klebsiella pneumoniae* と *Klebsiella oxytoca* である。どちらの菌種も感染抵抗力の低下した入院患者に敗血症, 肺炎, 腹膜炎, 胆道感染, 尿路感染などを起こし, 日和見感染の病原菌としてはグラム陰性桿菌の中で大腸菌と並んで重要な菌として知られている¹⁾。しかし病原性に関する基本的ならびに臨床細

菌学的研究がほとんど行われていないために, 菌株ごとの病原性の違いが不明で, その知見に基づいた予防対策などは全く行われていない。本研究は *Klebsiella* の莢膜型とバイオフィーム形成の関係を中心として解析を行い, その結果に基づいた菌株ごとの疫学解析と感染予防のための知見を得ることを目的とする。

米国の National Institutes of Health (NIH) の報告によれば, バイオフィームは医療現場では非常に重要であり, バイオフィームによって引き起こされる感染症は感染症全体の 80% 以上に上る²⁾ と言われている。*Klebsiella* は, 線毛, O 抗原, 莢膜多糖を含む多くの病原因子をもつが, *K. pneumoniae* のバイオフィーム形成には線毛と莢膜多糖が関係していることが指摘されている³⁾。しかも線毛に関しては, type 1 ばかりではなく type 3 線毛もヒト細胞やプラスチックなどの

著者連絡先: (〒464-8662) 名古屋市千種区星が丘元町
17 番地 3 号
椋山女学園大学看護学部
石原由華
TEL: 052-781-9251
FAX: 052-781-9207
E-mail: y-ishihara@sugiyama-u.ac.jp

無生物への付着を促進させることが報告されている⁴⁾。その一方で、莢膜多糖はバイオフィルムの立体構造の構築に欠かせないことが示されている⁵⁾。

Klebsiella の最も主要な病原因子である莢膜多糖 (K 抗原) には、少なくとも 77 の異なる多糖体があることが報告されている⁶⁾ が、それらの K 抗原型とバイオフィルム形成との関係について、今まで全く研究されていない。そこで今回筆者らは、*Klebsiella* の K 抗原標準株 (K1~K81, 除外された K 型を除いて計 76 の K 型) を用いて、莢膜多糖体の違いによるバイオフィルム形成能への影響を調べ、さらに、バイオフィルムに対するプロテアーゼ処理により *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* および *K. planticola*, *K. terrigena* のバイオフィルム形成における莢膜多糖およびタンパク質成分 (おそらくは線毛) の関連性を検討した。

II. 材料と方法

1. 使用菌株

Klebsiella の K 抗原標準株である K1~K81 (76 の K 型株) を使用した。これらの菌株は、Statens Serum Institute (デンマーク血清研究所) から分与された菌株である。使用菌株の一覧を表 1 に示す。

2. コロニー形態の観察

Klebsiella の K 抗原標準株について、Fang らの方法⁷⁾ を修正して String Test を行い、コロニーの表現型を調べた。-80°C 保存ストックより標準株を Tryptic Soy Agar (TSA) 培地 (Becton, Dickinson and Company, BD) に接種し、37°C で一夜培養した。その後、白金耳で 1 コロニーを採取したときに粘性状の糸が伸びるかどうかを調べた。粘性状の糸が 5 mm より長く伸びたものを hypermucoviscosity (HV) 型とし、そうでないものを non-hypermucoviscosity (NHV) 型と定義した。

3. バイオフィルム形成能の定量的分析とプロテアーゼ処理

バイオフィルム形成能の定量的分析は、George ら⁸⁾ や Xin ら⁹⁾ の方法を修正して行われた。*Klebsiella* の K 抗原標準株を TSA 培地に 37°C で一夜培養後、5 ml の Tryptic Soy Broth (TSB) 培地 (BD) に 1 コロニーを接種し、37°C で一夜培養した。その菌液を約 9.0×10^9 CFU/ml に調製し TSB で 10^2 倍希釈後、新鮮な TSB を 100 μ l 入れた 96 well microplate (IWAKI) の 12 ウェルに 100 μ l ずつ滴下し、37°C、あるいは 25°C で 48 時間静置培養した。その菌液を捨てて滅菌水で 3 回洗浄後、バイオフィルムに対するプロテアーゼ処理を、Xin ら⁹⁾ や Grigorij ら¹⁰⁾ の方法を

表 1. *Klebsiella* K 抗原標準株の一覧

K type	Strain	K type	Strain
1	A 5054	39	7749
2	B 5055	40	8588
3	C 5046	41	6177
4	D 5050	42	1702
5	E 5051	43	2482
6	F 5052	44	7730
7	4140	45	8464
8	1015	46	5281
9	56	47	9682
10	919	48	1196
11	390	49	6115
12	313	50	1303/50
13	1470	51	4715/50
14	1193	52	5759/50
15	Michigan 61	53	1756/51
16	2069/49	54	Stanley
17	2005/49	55	3985/51
18	1754/49	56	3534/51
19	293/50	57	4425/51
20	889/50	58	636/52
21	1702/49	59	2212/52
22	1996/49	60	4463/52
23	2812/50	61	5710/52
24	1680/49	62	5711/52
25	2002/49	63	?
26	5884	64	NCTC 8172
27	6613	65	SW 4
28	5758	66	438 (3a)
29	5728 y	67	264 (1)
30	7824	68	265 (1)
31	6258	69	889
32	6837	70	167
33	6168	71	4349
34	7522	72	1205
35	7444	74	371
36	8306	79	325
37	8238	80	708
38	8414	81	370

修正して行った。6 ウェルにプロテアーゼ含有溶解液【Proteinase K (10 mg/ml, SIGMA), 5 M NaCl, 1 M Tris-HCl (pH 7.5), H₂O】を 200 μ l ずつ入れて、37°C で 24 時間放置した。対照には、プロテアーゼ含有溶解液の代わりに 0.85% 生理食塩水を残りの 6 ウェルに同量添加した。それらの作用液を破棄して滅菌水で 3 回洗浄後、各ウェルに 0.1% クリスタルバイオレット溶液を 200 μ l 入れて、30 分間室温で放置した。クリスタルバイオレット溶液を捨て、滅菌水で 3 回洗浄して乾燥後、各ウェルに 200 μ l のジメチルスルホキ

シドを入れて1時間 Shaker でゆっくり振とうさせた。その後、プレートリーダー (Tecan Austria GmbH) にて $A_{540\text{nm}}$ で吸光度を測定した。これらの実験を2回繰り返して、すべてのデータから average ± SD を算出した。

III. 結 果

1. コロニー形態について

コロニー形態に関しては、HV 型であった標準株は K1, K2, K12, K15, K18, K20, K22, K36, K49, K57, K64 の 11 株であり、それ以外の株はすべて NHV 型であった (表2)。

2. バイオフィーム形成能について

Klebsiella では、25°C において莢膜多糖が最も産生することが以前から指摘されている¹¹⁾ ため、今回は 37°C および 25°C でのバイオフィーム形成能を調べた。OD_{540nm} で 2.0 以上のバイオフィーム形成株は、37°C, 48 時間培養においては、標準株の K8, K27, K37 であった。それに対して、25°C 培養では K17, K37 であった。OD_{540nm} で 1.0 以上 2.0 未満のバイオフィーム形成株は、37°C, 48 時間培養では K11, K14, K22, K25, K29, K34, K53, K79, K80 であった。その一方で、25°C 培養では K8, K16, K20, K29, K46, K51, K60, K63, K66, K80 であった。OD_{540nm} で 0.5 以上 1.0 未満のバイオフィーム形成株は、37°C, 48 時間培養では K4, K7, K10, K13, K15~K19, K21, K23, K26, K28, K31, K33, K36, K43, K45~K48, K50~K52, K54, K56~K63, K66, K69~K71, K81 であった。それに対して、25°C 培養では K7, K10, K11, K13, K18, K19, K22, K23, K25~K28, K30, K33, K34, K36, K39, K41, K44, K45, K47, K50, K53~K55, K58, K59, K62, K65, K69~K71, K79, K81 であった。OD_{540nm} で 0.2 未満すなわちバイオフィームをほ

とんど形成しない株は、37°C, 48 時間培養では K1~K3, K5, K6, K35, K42 であったが、25°C 培養では K1~K6 であった (図 1, 2)。以上のことから、*Klebsiella* のバイオフィーム形成能は莢膜型株の違いによりさまざまな違いがあることがわかった。またバイオフィーム高度形成株はすべて NHV 型コロニーであった。バイオフィームをほとんど形成しない K1, K2, K3 株は HV 型コロニーであることから、コロニーの mucoviscosity はバイオフィーム形成に関係しないか、あるいは mucoviscosity が高いほうがバイオフィーム形成が促進されない可能性が示された。

3. バイオフィームに対するプロテアーゼ処理効果について

Klebsiella K 抗原標準株のバイオフィーム形成におけるタンパク質の影響を排除するために、形成されたバイオフィームにプロテアーゼ処理を行った。プロテアーゼによりバイオフィーム形成が 1/7~1/10 に減少した株は、37°C, 48 時間培養では標準株の K8, K27, K79 であった。それに対して、25°C 培養で形成されたバイオフィームがプロテアーゼにより約 1/5 に減少した株が、1 株のみで K27 であった。プロテアーゼによりバイオフィーム形成が 1/2 に減少した株は、37°C, 48 時間培養では K25, K52, K59 であったが、25°C 培養では K8, K25, K35, K44, K79 であった。これら以外の株はすべて、25°C または 37°C で形成されたバイオフィームにおいてプロテアーゼ効果がほとんど見られなかった (図 1, 2)。以上からバイオフィーム形成に菌体表面タンパク質が強く関与する株と、ほとんど関与しない株、どちらとも言えない株があることがわかった。見方を変えるとバイオフィーム形成に表面タンパク質ではなく莢膜多糖が強く関与する莢膜型株が存在することがわかった。

表 2. *Klebsiella* K 抗原標準株のコロニー形態

コロニー形態	HV 型	NHV 型
莢膜型標準株	K1, K2, K12, K15, K18, K20, K22, K36, K49, K57, K64	K3, K4, K5, K6, K7, K8, K9, K10, K11, K13, K14, K16, K17, K19, K21, K23, K24, K25, K26, K27, K28, K29, K30, K31, K32, K33, K34, K35, K37, K38, K39, K40, K41, K42, K43, K44, K45, K46, K47, K48, K50, K51, K52, K53, K54, K55, K56, K58, K59, K60, K61, K62, K63, K65, K66, K67, K68, K69, K70, K71, K72, K74, K79, K80, K81

HV 型は hypermucoviscosity で、string test で粘性の糸を >5 mm 形成したことを示す。NHV 型は形成しないことを示す。

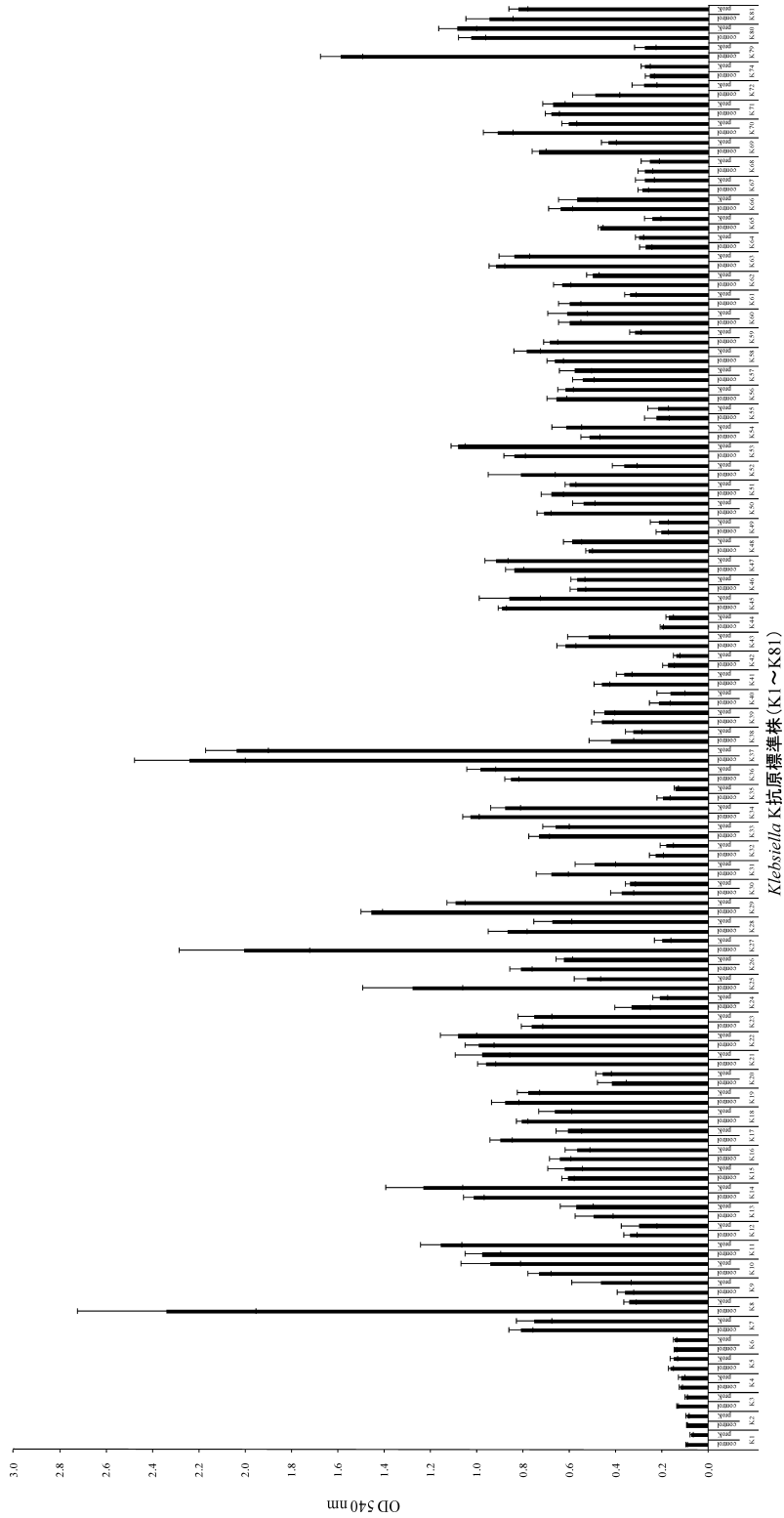


図1. *Klebsiella* K抗原標準株の37°Cにおけるバイオフィルム形成能とプロテアーゼ処理効果。縦軸は吸光度 (OD_{540nm}) で測定したバイオフィルム量を示す。

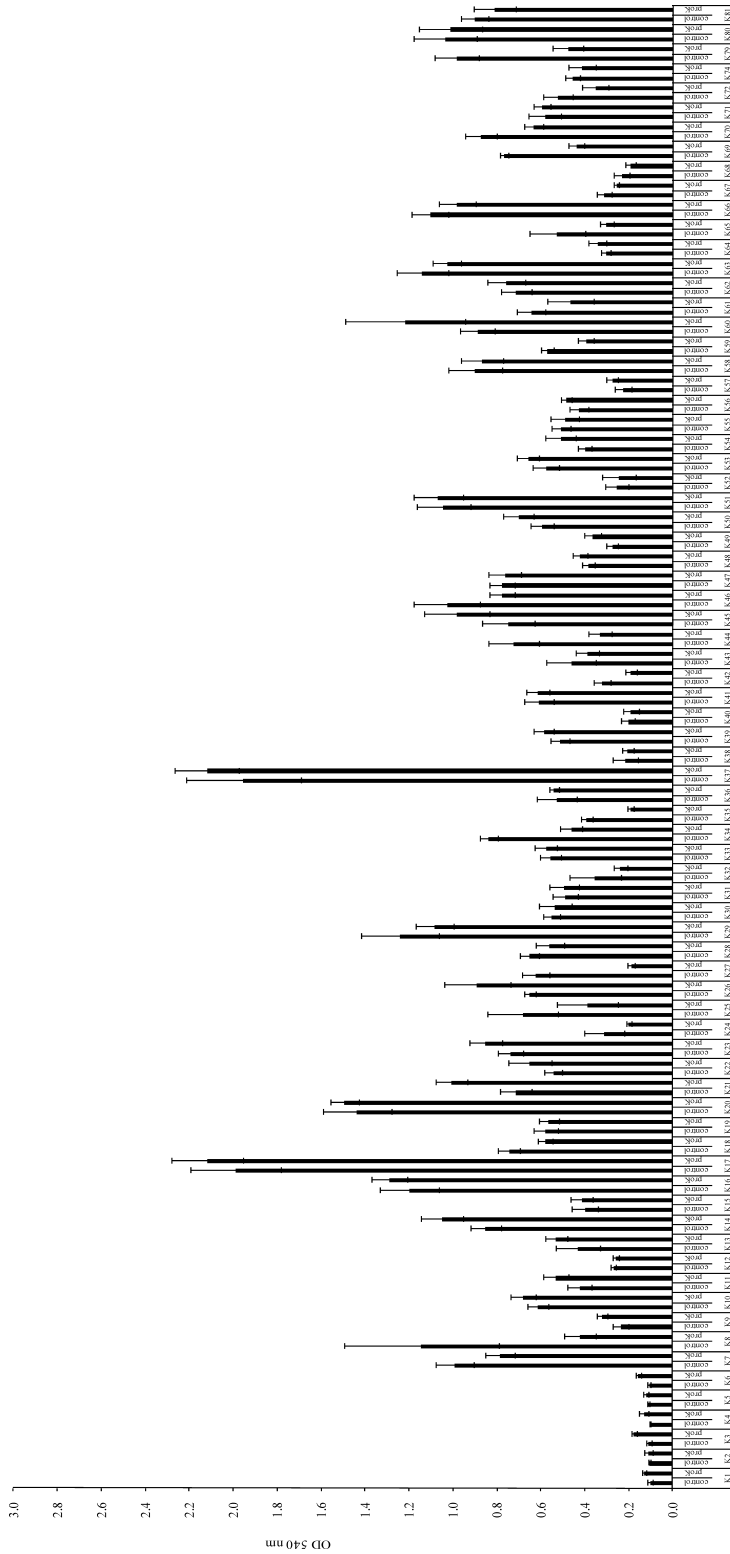


図2. *Klebsiella* K 抗原標準株の 25°Cにおけるバイオフィーム形成能とプロテアーゼ処理効果。縦軸は吸光度 (OD_{540 nm}) で測定したバイオフィーム量を示す。
Klebsiella K 抗原標準株 (K1~K&1)

IV. 考 察

本研究では *Klebsiella* バイオフィルムの形成における莢膜多糖と菌体表面タンパク質のかかわりについて、特に各種莢膜型菌株を用いて検討した。その結果、莢膜菌株によって莢膜多糖が主に関与する菌株と菌体表面タンパク質が大きく影響する株とが見いだされた。またどちらとも言えない莢膜型株も多く見られた。37°C 培養でバイオフィルムを形成し、プロテアーゼによりバイオフィルム形成が大きく減少した莢膜型株は、莢膜多糖の産生が高度になる 25°C 培養では、バイオフィルム形成能自体が 37°C に比べ 1/2~1/3 に減少し、またプロテアーゼ処理によるバイオフィルム形成の減少は 1/2 程度であった。したがってそれらの株は、バイオフィルムが形成される過程で莢膜多糖よりもプロテアーゼ感受性の菌体表面タンパク質（おそらく線毛）のほうがより関与していると考えられる。また、37°C 培養でプロテアーゼ処理によりバイオフィルム形成が約 1/2 に減少した莢膜型株においても同様の結論が考えられる。その一方で、37°C でも 25°C でもバイオフィルムを高度に形成したがプロテアーゼ処理効果が全くなかった株は、バイオフィルム形成において菌体表面タンパク質よりも莢膜多糖が優位に関与している可能性が高い。また 25°C 培養でプロテアーゼ処理効果が全く見られなかった株においても、同様に推論される。したがって、莢膜多糖と菌体表面タンパク質のどちらが *Klebsiella* のバイオフィルム形成に優位に働くかについて、それぞれの産生量の問題があるので一概には結論を出すことができないが、本研究において少なくとも莢膜多糖がバイオフィルム産生に優位に働く株と、菌体表面タンパク質が優位に働く株が見いだされたことは、*Klebsiella* のバイオフィルム形成に関与する因子とそのメカニズムを解析する研究の場合、使用する菌株に注意しないと誤った結論に至る危険性があるので、複数の菌株を用いることが勧められる。

Klebsiella の莢膜多糖の中で K1 と K2 は、マウスに対する病原性が非常に強い¹²⁾ と以前から報告され、また K1 や K2 のコロニー形態である HV 型の病原性への関与⁷⁾ も指摘されている。しかし今回の結果では、HV 型の K1 や K2 は、25°C でも 37°C でも殆どバイオフィルムを形成しなかった。その一方で、25°C または 37°C でバイオフィルムを高度に形成した K8, K17, K27, K37 はすべて NHV 型であったことから、コロニーの mucoviscosity とポリスチレン表面におけるバイオフィルム形成能にはほとんど関連性はないか、あるいは mucoviscosity が高いほうがバイオ

フィルム形成しにくいと思われる。コロニーの mucoviscosity は莢膜多糖体の性質（親水性あるいは疎水性、酸性度など）ならびに産生量に依存する。hyper-mucoviscosity は生体内 colonization には有利と思われるが、ポリスチレンなどの人工物表面への付着には有利に働いていない親水性の性質であろうと考えられる。

Mori ら⁶⁾ ならびに Kato ら¹³⁾ の報告によれば計 76 の K 抗原型標準菌株は、*K. pneumoniae*, *K. planticola*, *K. oxytoca*, *K. terrigena* の 4 菌種に分類されるが、37°C または 25°C の培養でバイオフィルムを高度に形成した K8, K17, K27, K37 は、K8 が *K. planticola* であったが、他はすべて *K. pneumoniae* であった。植物に付着していることが多い *K. planticola* については、バイオフィルム形成に関する報告がこれまで皆無なため、何もわかっていない現状である。

さらに 76 の K 抗原の中で K1 ならびに K2 株は最も病原性が強く、それぞれの莢膜多糖体構造も決定されている¹⁴⁾ が、今回筆者らは K1 および K2 株が 25°C ならびに 37°C でバイオフィルムを殆ど形成しなかったことを見いだした。したがって *Klebsiella* のヒトならびに動物に対する病原性と *in vitro* におけるバイオフィルム形成能との間には直接の相関関係がないのではないかと思われる。しかし *Klebsiella* バイオフィルムはドレーン管などの医療デバイス表面に形成されることによって、たとえ病原性が低い株であってもそこから菌が体内に播種されることによる感染の発症リスクを高めることは間違いないと考えられる。今回の結果から、*Klebsiella* バイオフィルム形成には莢膜型のタイプと菌体表面タンパク質の両者が菌株によって異なる影響を及ぼすことがわかった。したがって今後臨床分離株の莢膜型と引き起こされた感染の関係についてさらに知見が蓄積されることによって、本菌による感染の予防が有効に行われることが期待される。

謝 辞 本研究にあたって有益な助言をいただいた国立感染症研究所細菌第二部の柴山恵吾室長、名古屋大学医学系研究科分子病原細菌学の山田景子助教ならびに岡本 陽助教に深く感謝します。

文 献

- 1) Podschun, R., U. Ullmann. 1998. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin. Microbiol. Rev. 11: 589-603.

- 2) Davies, D. 2003. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2: 114-122.
- 3) Mark, A. S., B. Jens, A. K. Karen, et al. 2005. Capsule and fimbria interaction in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* 73: 4626-4633.
- 4) Boddicker, J. D., R. A. Anderson, J. Jagnow, et al. 2006. Signature-tagged mutagenesis of *Klebsiella pneumoniae* to identify genes that influence biofilm formation on extracellular matrix material. *Infect. Immun.* 74: 4590-4597.
- 5) Damien, B., G. Jean-Marc, C. Nicolas, et al. 2008. The characterization of functions involved in the establishment and maturation of *Klebsiella pneumoniae in vitro* biofilm reveals dual roles for surface exopolysaccharides. *Environ. Microbiol.* 10: 685-701.
- 6) Mori, M., M. Ohta, N. Agata, et al. 1989. Identification of species and capsular types of *Klebsiella* clinical isolates, with special reference to *Klebsiella planticola*. *Microbiol. Immunol.* 33: 887-895.
- 7) Fang, C. T., Y. P. Chuang, C. T. Shun, et al. 2004. A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. *J. Exp. Med.* 199: 697-705.
- 8) George A. O., K. Roberto, 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds *via* multiple, convergent signalling pathways: A genetic analysis. *Mol. Microbiol.* 28: 449-461.
- 9) Xin, W., F. P. James, R. Tony, 2004. The *pgaABCD* locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. *J. Bacteriol.* 186: 2724-2734.
- 10) Grigorij, K., S. Irina, C. Philippe, et al. 2006. Biofilms of clinical strains of *Staphylococcus* that do not contain polysaccharide intercellular adhesion. *FEMS Microbiol. Lett.* 255: 11-16.
- 11) Frederick, C. N. 1996. *Escherichia coli* and *Salmonella*. Second Edition, Volume 1, 112-117.
- 12) Mizuta, K., M. Ohta, T. Hasegawa, et al. 1983. Virulence for mice to *Klebsiella* strains belonging to the O1 group: Relationship to their capsular (K) types. *Infect. Immun.* 40: 56-61.
- 13) Kato, N., M. Ohta, T. Hasegawa, et al. 1981. Further studies of the polysaccharide of *Klebsiella pneumoniae* possessing strong adjuvanticity. II. Serological relationship between the adjuvant polysaccharide and the O3 antigen of *Klebsiella*. *Microbiol. Immunol.* 25: 1317-1325.
- 14) Wacharotayankun, R., Y. Arakawa, M. Ohta, et al. 1993. Enhancement of extracapsular polysaccharide synthesis in *Klebsiella pneumoniae* by RmpA2, which shows homology to NtrC and FixJ. *Infect. Immun.* 61: 3164-3174.

Investigation on the Relation of Biofilm Formation to Capsular Types and Surface Proteins in Standard Strains of *Klebsiella*

Yuka Ishihara,^{1, 2)} Michio Ohta^{1, 2)}

¹⁾ School of Nursing, Sugiyama Jogakuen University

²⁾ Department of Bacteriology, Graduate School of Medicine, Nagoya University

Cell surface capsular polysaccharide (K antigen) and pili are known as major virulence factors of *Klebsiella*. Previous reports suggested that these components are also involved in biofilm formation. The present study was undertaken for revealing the relationship between degree of biofilm formation and capsular types as well as colony viscosity. A total of 76 serotype standard strains were cultured at 37°C and 25°C for biofilm formation on polystyrene surface and the effect of proteinase K treatment was measured. Strains K8, K17, K27 and K37 formed high level of biofilm and their colonies were non-hypermucoviscosity type. On the other hand, strains K1, K2 and K3 belonged to a group of very poor biofilm formation and their colonies were hypermucoviscosity type, suggesting that mucoviscosity of colonies was unrelated, or inversely correlated with biofilm formation ability of *Klebsiella*. Biofilm formation of K8, K27 and K79 strains at 37°C and of K27 at 25°C was greatly reduced by proteinase K treatment. Proteinase K-sensitive surface proteins therefore were involved in the biofilm formation of these strains. The high level biofilm formation of K37 strain, however, was not affected by proteinase K treatment. It is therefore likely that the capsular polysaccharide is a major constituent of the K 37 biofilm. Taken together, biofilm formation level of *Klebsiella* varies in K type strains and the biofilm includes proteinase K-sensitive and -resistant types.