

令和元年6月27日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08796

研究課題名(和文) 無莢膜型インフルエンザ菌の血中侵入機構の解明

研究課題名(英文) Invasion Mechanism of non-typeable Haemophilus influenzae into blood stream

研究代表者

大石 和徳 (Oishi, Kazunori)

国立感染症研究所・感染症疫学センター・センター長

研究者番号：80160414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：血液由来NTHi株(n=20)と喀痰由来NTHi株(n=21)の血清感受性試験による(Log killing)には有意差を認めなかった。また、血清抵抗性に相関するとされるvacJ遺伝子の発現は侵襲性NTHiに特異的ではなかった。これらのNTHi株のPangenome及びPan-GWAS解析では、血清抵抗性株は16個の遺伝子を保有する傾向があった。またtype 1遺伝子群保有株は血清感受性で、type 2遺伝子群保有株は血清抵抗性であった。特異的なLOS関連遺伝子群がtype 1遺伝子群に含まれることから、特徴的なLOS構造が血清感受性に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

侵襲性インフルエンザ菌感染症(IHD)は感染症法の5類全数把握疾患である。本症は5歳以下の65歳以上の成人に罹患率が高く、致死率は約20%と高い。b型莢膜株(Hib菌)によるIHDは2009年からの小児におけるHibワクチンの導入によりほぼ消失した。現時点で、小児、成人におけるIHDは全国で年間に約700例が報告されその原因菌のほとんどは無莢膜株(NTHi)である。このような背景から、本研究「無莢膜インフルエンザ菌の血中侵入機構の解明」は、NTHi株に対するワクチンの標的の特定に繋がる可能性が考えられることから、その学術的意義や社会的なインパクトは大きい。

研究成果の概要(英文)：No difference in the serum bactericidal activity (Log killing) was found in between blood isolates of NTHi (n=20) and sputum isolates of NTHi (n=21). Expression of vacJ gene did not correlate with bactericidal activity. Analyses with pangenome and Pan-GWAS for these NTHi strains demonstrated that serum resistant strains tended to have the selected 16 genes. Two types of genogroups were identified in these genes. Strains with type-1 genogroup were tend to be serum-sensitive, strains with type-2 genogroup were tend to be serum-resistant. Because LOS-related genes were included in the type-1 genogroup, a specific structure of LOS may be associated with serum-sensitivity of NTHi strains.

研究分野：感染症学、細菌学

キーワード：インフルエンザ菌 無莢膜株 血清抵抗性 ゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) は小児、成人において髄膜炎、菌血症を伴う肺炎などの侵襲性インフルエンザ菌感染症 (invasive *H. influenzae* disease; IHD) ならびに中耳炎等の非侵襲性感染症を起こす。本菌は、莢膜株と無莢膜株 (non-typable *H. influenzae*: NTHi) に大別される。これまでの厚生労働省研究班の検討において、検査した IHD 患者由来の 31 菌株の検討ではすべての菌株が莢膜遺伝子を欠く NTHi であることが判明している。一方では、成人の市中発症肺炎において、インフルエンザ菌は肺炎球菌に次いで重要な原因菌であり、これらの成人肺炎由来の菌株も莢膜及び莢膜遺伝子を欠く NTHi である。これまでに、菌血症を伴う肺炎を惹起する (血中侵入性の) NTHi については菌の血清 (補体) 抵抗性が関与することが予想され、実際に菌の血中侵入機序の一つとして菌体表面への補体結合 (C3b 沈着) 阻止が報告されている。一方、菌側要因として NTHi の lipooligosaccharide (LOS) へのシアル酸取り込みに関与する *siaB* (CMP-Neu5Ac 合成遺伝子) が血清抵抗性に関与すること、NTHi の LOS 合成遺伝子 *IgtC* が血清抵抗性に寄与すること、慢性閉塞性肺疾患の増悪の原因菌 (喀痰由来) では、菌の外膜脂質二重層に存在する *vacJ* (仮想リポタンパク質遺伝子), *yrb* (ABC トランスポーター遺伝子) の発現増強がその血清抵抗性に相関することが報告されている (Nakamura S, et al. PLoS Pathogen 2011)。しかしながら、これまで国内外において臨床分離株を用いた NTHi 株の血中侵入機構に関する検討は皆無である。また、申請者はこれまでに IHD 由来 (血液分離) の Hib 株と NTHi 株, 肺炎由来株 (喀痰分離) を用いて血清抵抗性の予備実験を行い、血液分離の NTHi 株と Hib 株の血清抵抗性はほぼ同等であり、喀痰分離の NTHi 株は血清抵抗性と血清感受性に二分されることを確認している。以上の背景から、気道親和性の NTHi 株がどのような細菌学的機序により血中に侵入し、侵襲性感染症を発症するのかを明らかにするという発想に至った。

2. 研究の目的

成人肺炎患者の血液から分離されたインフルエンザ菌と喀痰から分離されたインフルエンザ菌の Bactericidal assay (補体溶菌) を検討し、1) 血液由来株が血清抵抗性であるか否か、2) 血清抵抗性遺伝子とされる *vacJ* の発現が (Nakamura S, et al. PLoS Pathogen 2011) 血清抵抗性に関連するか否かを明らかにする。さらには、3) NTHi 菌株の全ゲノム情報を収集して血清抵抗性に関連する遺伝子を探索する。

3. 研究の方法

1) 検討対象菌株

成人の菌血症を伴う肺炎（侵襲性インフルエンザ菌感染症）患者の血液由来株（n=20）、成人の菌血症を伴わない肺炎（非侵襲性インフルエンザ菌）患者の喀痰分離株(n=21)を収集した。これらの菌株についてはPCR法で *bexA*, *bexB* 遺伝子の有無について検討し、全てが non-typeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) 株であることを確認した。

2) Serum bactericidal assay

インフルエンザ菌を Haemophilus Test Medium Broth で増菌後に 10^5 cfu/ml に菌液を調整。ヒト正常血清(normal human serum; NHS)を 56℃、30分インキュベートし非働化し、非働化血清(heat-inactivated serum: inactivated NHS)を作成。アッセイチューブに菌液 20 μ l, NHS あるいは inactivated NHS 10 μ l, バッファー170 μ l: 総量 200 μ l とし、37℃ で 60分インキュベートし、その後、アッセイチューブから 5 μ l をサンプリングし、チョコレート寒天培地に塗布し、一晚培養し、コロニーをカウントした（1菌あたり3アッセイチューブを用いて菌数をカウント）。Serum bactericidal assay による殺菌活性 (serum bactericidal activity; SBA) を $\text{Log (CFU in inactivated NHS)} - \text{Log (CFU in NHS)}$ で算出した。

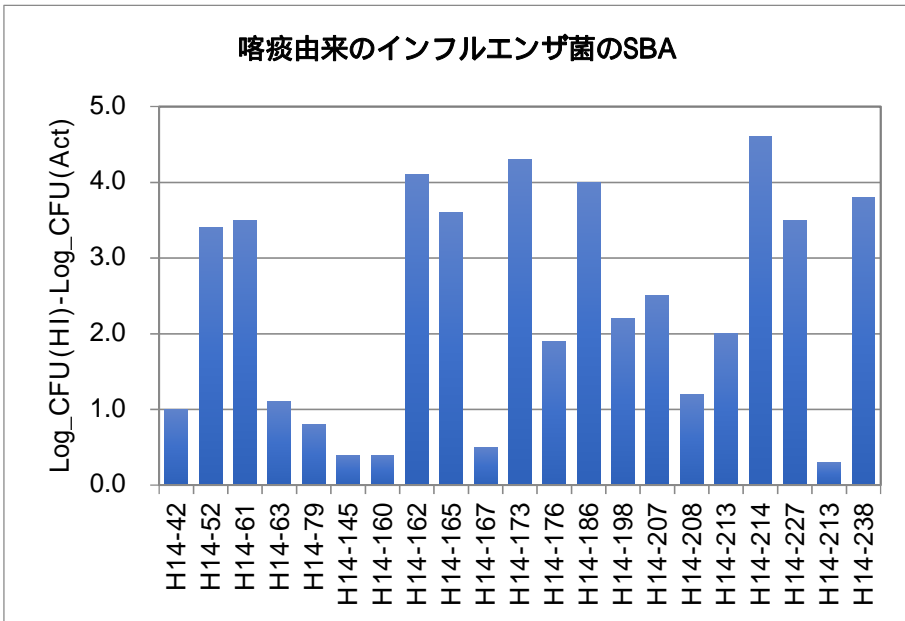
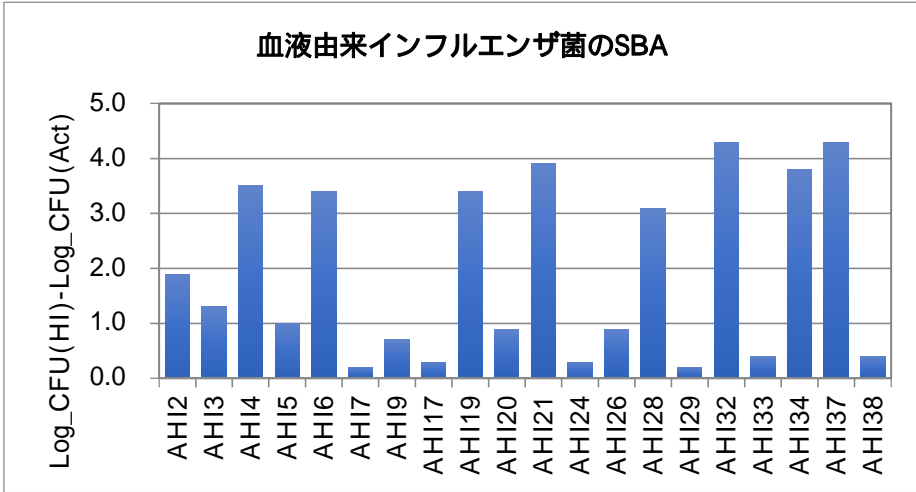
3) インフルエンザ菌ゲノム解析

対象としたインフルエンザ菌の血清感受性に関与したと考えられる遺伝子を指標とし、Roary による Pangenome 及び Scory による Pan-GWAS 解析を行った。

4. 研究成果

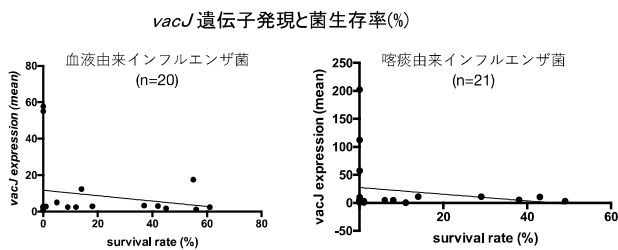
1) インフルエンザ菌の serum bactericidal activity と *vacJ* 遺伝子発現

血液由来インフルエンザ菌と喀痰由来インフルエンザ菌の SBA を以下に示す。侵襲性、非侵襲性株間における SBA (Log killing) には、侵襲性株(中央値: 0.95, range 0.2~4.3)、非侵襲性(中央値: 1.55, range 0.3~4.1)間で有意差を認めなかった。



本結果から、本研究において侵襲性 NTHi 株が血清抵抗性であるとする仮説は否定された。また、非侵襲性 NTHi 株にも血清抵抗性株が存在することが明らかとなった。

また、血清抵抗性に相関するとされる *vacJ* 発現レベルと serum bacterial assay におけるインフルエンザ菌の生存率との相関を如何に示す。*vacJ* 発現レベルとインフルエンザ菌の生存率には相関は認められなかった。



2) インフルエンザ菌の血清感受性と菌のゲノム解析

上記の NTHi 血液由来株 19 株、喀痰由来株 18 株について、血清感受性に関与する遺伝子を指標とし、Roary による Pangenome 及び Scory による Pan-GWAS 解析を行った。その結果、血清抵抗性の株が合計 16 個の遺伝子を保有する傾向にあり、LOS 関連の遺伝子群が一つの領域に含まれていた。

また、遺伝子座単位での比較の結果、解析した菌株には type 1 遺伝子群を保有する菌株グループと type2 遺伝子群を保有する菌株グループとに分けることができ、type 1 遺伝子群保有株は血清感受性で、type 2 遺伝子群保有株は血清抵抗性であった。LOS 関連遺伝子群は type 1 遺伝子群に含まれることから、特徴的な LOS 構造が血清感受性に関与する可能性が示唆された。

さらに、血液由来の血清抵抗性を示す侵襲性 NTHi 株のうち、type 2 遺伝子保有株は特徴的な prophage が染色体上に存在していた。これらの遺伝子が、type 2 遺伝子保有株血清抵抗性に関与する可能性が考えられた。

<引用文献>

Nakamura S, et al. Molecular basis of increased serum resistance among pulmonary isolates of non-typeable *Haemophilus influenzae*. PLoS Pathog. 2011 Jan 6;7(1):e1001247. doi: 10.1371/journal.ppat.1001247.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等: 該当なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 中村茂樹

ローマ字氏名: Nakamura Shigeki

所属研究機関名: 国立感染症研究所

部局名: 真菌部

職名: 室長

研究者番号（8桁）：20399752

研究分担者氏名：村上光一

ローマ字氏名：Murakami Koichi

所属研究機関名：国立感染症研究所

部局名：感染症疫学センター

職名：室長

研究者番号（8桁）：70446839

(2)研究協力者

研究協力者氏名：森本 浩之輔

ローマ字氏名：Morimoto Kounosuke

研究協力者氏名：黒田 誠

ローマ字氏名：Kuroda Makoto