

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591559

研究課題名(和文) ファイブロネクチンを用いた多剤耐性緑膿菌制御の検討

研究課題名(英文) Purified human plasma fibronectin prevents multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections.

研究代表者

権 雅憲 (KWON A-HON)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：70225605

研究成果の概要(和文)：30%熱傷マウスモデル、担癌マウスや Cyclophosphamide 誘導免疫低下マウス、streptozotocin 誘導糖尿病モデルに多剤耐性緑膿菌(U-31)を接種した。それぞれのモデルにファイブロネクチン(Fn)を投与し、Control 群には同量のヒト血清アルブミンを投与した。それぞれのモデル共に Fn 投与群の生存率は60～90%であり、Control 群の0～10%より有意に良好であった。Fn 投与により血中及び肝臓内の多剤耐性緑膿菌数が有意に減少し、多剤耐性緑膿菌に対する食細胞貪食能を用量依存性に促進された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the protective action of plasma fibronectin (pFn) against burn wound sepsis caused by multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDR *P. aeruginosa*). Mice with 30% thermal injury, tumor bearing mice or immunosuppressive and streptozotocin-induced diabetic mice, were inoculated with MDR *P. aeruginosa* into, and immediately administered human pFn (FN group) or albumin (Alb group). In thermal injury model, 90% of the mice in the Alb group had died, however, in the FN group survival was significantly improved to 80%. In immunosuppressive condition, all mice had died in the Alb group, 60% of the mice in the FN group was well survived. In diabetic model, survival rate in the Alb group and the FN group was 10% and 80%, respectively. At 6 and 24h after infection with the bacteria, the administration of pFn significantly depressed the count of viable bacteria within the liver and blood of mice compared with the Alb group. Supplementation with pFn increased the phagocytic activity against MDR *P. aeruginosa* in a dose-dependent manner. Single intravenous administration of pFn may serve as an effective strategy to prevent MDR *P. aeruginosa* infections in burn wounds, immunosuppressive condition and diabetic mellitus by enhancing the phagocytic activity of macrophages.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：ファイブロネクチン、多剤耐性緑膿菌、熱傷、免疫低下、糖尿病

## 1. 研究開始当初の背景

フィブロネクチン (Fn) は血液、体液、組織細胞間質に存在し、細胞保持と細胞移動を制御する高分子糖蛋白であり、細胞増殖や分化、組織修復や創傷治癒にも関与している。さらに、血漿 Fn 濃度はショック、敗血症、熱傷、外傷時に低下し、Fn 投与により病態の改善が認められることより、Fn の網内皮系賦活作用の重要性が指摘されている。また、Fn はそのレセプターであるインテグリンと結合し、着床等の癌細胞の転移過程で重要な役割も果たしている。

近年、抗菌薬の発展とともに市中感染症の多くは、比較的容易にコントロールできるようになってきたが、耐性菌による感染の重篤化が問題となっている。緑膿菌は弱毒菌であり、蒸留水中でも増殖可能なほど栄養要求性が低く、温度を含む種々の条件に耐えて環境に適応し、病院内の湿潤な環境に生息しているが、健常人に対して感染症を惹起する事は稀である。しかし、免疫不全患者や術後患者などにおいては、肺炎や敗血症などの急性感染症を引き起こしやすく、一旦発症すると重症化しやすい。緑膿菌はアンピシリンなどのペシリン系抗菌薬や第1および第2世代セフェム抗菌薬に自然耐性を示すが、カルバペネム系、ニューキノロン系、アミノ配糖体系の3系統の薬剤に耐性になったものは多剤耐性緑膿菌と定義される。多剤耐性株に対する有用な抗菌薬は存在しないため、感染症を発症した場合は独立した死亡のリスク因子となっている。したがって、多剤耐性緑膿菌に対する新規抗菌薬、またはメタロβ-ラクタマーゼ阻害剤の開発が待たれるところである。

## 2. 研究の目的

(1) 緑膿菌は免疫不全患者や術後患者などにおいては、肺炎や敗血症などの急性感染症を引き起こしやすく、一旦発症すると重症化しやすい。さらに、緑膿菌は抗菌薬に対して耐性を獲得しやすく、メタロβ-ラクタマーゼ産生緑膿菌で、アミノ配糖体やフルオロキノロンにも耐性を示す多剤耐性株に対する有用な抗菌薬は存在しない。フィブロネクチン (Fn) は、食細胞による緑膿菌の貧食において重要なオプソニンであり、食細胞は補体 C3 および Fn レセプターを介して緑膿菌を貧食し、殺菌するとされている。そこで、マウスの熱傷モデルでの多剤耐性緑膿菌感染に対するフィブロネクチンの生体保護効果を検討した。

(2) 緑膿菌は弱毒菌であり、健常人に対して感染症を惹起する事は稀であるが、免疫不全患者や術後患者などにおいては、肺

炎や敗血症などの急性感染症を引き起こしやすい。そこで、担癌モデルや免疫低下モデルでの多剤耐性緑膿菌感染に対するフィブロネクチン (Fn) の防御作用を検討した。

(3) 糖尿病患者は、高血糖により、好中球走化性や血管内皮への付着、貪食能、細胞内殺菌能、オプソニン化、細胞性免疫能などの低下が起こる。また、糖尿病による血管障害は局所の組織虚血をもたらし、微好気性、嫌気性菌の発育を助長し、さらには、酸素依存性の好中球殺菌能の低下もきたす。そこで糖尿病モデルを用いて、多剤耐性緑膿菌感染に対するフィブロネクチンの防御作用を検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 熱傷モデルでの検討

ネブタール麻酔下で DDY 雄性マウスの背部の毛を全体表面積の約 30% を剃毛し、沸騰水で 5 秒間さらして熱傷作成後、 $10^2$ - $10^{10}$ cfu/ml の多剤耐性緑膿菌 (U-31) 浮遊液 0.2ml を熱傷部位の皮下に接種した。熱傷作成前に Fn を 30-300mg/kg (i. v.) 投与し、Control 群には同量のヒト血清アルブミンを投与した。

### (2)

#### ① 担癌末期の多剤耐性緑膿菌感染に対する Fn の生体保護作用の検討

Ehrlich 腹水癌細胞を接種した 18 日目の担癌マウスに多剤耐性緑膿菌 (U-31) を  $1.3 \times 10^4$  ~  $10^5$  個を皮下に接種し、Fn またはヒト血清アルブミンを 100mg/kg を静脈投与した。

#### ② 免疫低下マウスの多剤耐性緑膿菌感染に対する Fn の防御作用の検討

8 週齢の BALB/c 雌性マウスに Cyclophosphamide を腹腔内に投与した。4 日後に  $10^2$ - $10^{10}$ cfu/ml に調整した多剤耐性緑膿菌 (U-31) の 0.5ml をマウスの腹腔内に接種した。多剤耐性緑膿菌の接種前後にフィブロネクチンを 30-300mg/kg (i. v.) し、Control 群には同量のヒト血清アルブミンを投与した。

### (3) 糖尿病モデルでの検討

5-6 週齢の C57BL/6 マウスに 160 mg/kg 体重の streptozotocin を腹腔内投与し、1 週間後の採血にて血糖値が 300mg/dL 以上を呈したものを糖尿病マウスとして使用した。糖尿病マウスに  $10^2$ - $10^{10}$ cfu/ml の多剤耐性緑膿菌 (U-31) 浮遊液 0.2ml を接種し、接種前後にフィブロネクチンを 30-300mg/kg (i. v.) 投与し、Control 群には同量のヒト血清アルブミンを投与した。

## 4. 研究成果

(1) 熱傷ラットの Control 群の生存率は 10%であったが、Fn 投与群では 80%と有意

に良好であった。熱傷後のラットの血漿 Fn 濃度は低下し、4 時間後に最低値となった。熱傷後のラットに Fn を投与すると血漿 Fn 濃度は 1 時間でピークとなり、6 時間高濃度を持続した。また、通常マウスの肝臓内の多剤耐性緑膿菌数は、Fn 投与群では Control 群よりも有意に減少していたが、血中の細菌数には差がなかった。熱傷マウスでは、Fn 投与により血中及び肝臓内の多剤耐性緑膿菌数が有意に減少した。さらに、血漿 Fn 投与は多剤耐性緑膿菌に対する食細胞貪食能を用量依存性に促進し、1000  $\mu$ g/ml 投与では 90% の多剤耐性緑膿菌が貪食されたが、アルブミン投与では食細胞貪食促進効果は認められなかった。

(2)

① 担癌マウスでは、Fn 投与による有意な救命効果は認めなかったが、細網内皮系機能の回復をみとめた。

② 免疫低下モデルでは、Control 群の生存率は 0% であったが、Fn 投与群では 60% と有意に良好であった。また、Fn 投与により血中及び肝臓内の多剤耐性緑膿菌数が有意に減少した。補体存在下で Fn を添加した群では、菌数は経時的に減少し、120 分後には 50% になった。

(3) 糖尿病モデルの Control 群の生存率は 10% であったが、Fn 投与群では 80% と有意に良好であった。また、補体存在下で Fn を添加した群では、血中及び肝臓内の多剤耐性緑膿菌数が有意に減少した。さらに、血漿 Fn 投与は多剤耐性緑膿菌に対する食細胞貪食能を用量依存性に促進したが、Control 群では食細胞貪食促進効果は認められなかった。

血漿 Fn 投与は、熱傷や免疫機能低下時、さらに糖尿病状態における多剤耐性緑膿菌感染に対して、耐性の出現を伴わない治療法として有用であると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

1) Dexamethasone inhibits the induction of iNOS gene expression through destabilization of its mRNA in proinflammatory cytokine-stimulated hepatocytes. Ozaki T, Habara K, Matsui K, Kaibori M, Kwon AH, Ito S, Nishizawa M, Okumura T. *Shock* 33(1): 64-69, 2010. 査読有

2) Adult bone marrow cells can differentiate into hemopoietic cells and endothelial cells but not into other

lineage cells in normal growth and normal life. Yanai S, Adachi Y, Shi M, Shigematsu A, Shima C, Imai Y, Kwon AH, Ikehara S. *International Journal of Hematology* 91(2): 213-8, 2010. 査読有

3) Anti-tumor effects of fusion cells of type 1 dendritic cells and Meth A tumor cells using hemagglutinating virus of Japan-envelope. Yanai S, Adachi Y, Fuijisawa J, Jiang S, Okigaki M, Shi M, Shima C, Imai Y, Kwon AH, Ikehara S. *International Journal of Oncology* 35(2): 249-255, 2009. 査読有

4) Effects of medicinal mushroom (*Sparassis crispa*) on the wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. Kwon AH, Qiu Z, Kimura T, Yamamoto K, Hashimoto M. *American Journal of Surgery* 197(4): 503-509, 2009. 査読有

5) Protective effect of neutrophil elastase inhibitor (FR136706) in lethal acute liver failure induced by D-Galactosamine and lipopolysaccharide in rats. Uchida Y, Kaibori M, Hijikawa T, Ishizaki M, Ozaki T, Tanaka H, Matsui K, Tokuhara K, Kwon AH, Kamiyama Y, Okumura T. *Journal of Surgical Research* 145(1): 57-65, 2008. 査読有

6) Edaravone prevents iNOS expression by inhibiting its promoter transactivation and mRNA stability in cytokine-stimulated hepatocytes. Yoshida H, Kwon AH, Kaibori M, Tsuji K, Habara K, Yamada M, Kamiyama Y, Nishizawa M, Ito S, Okumura T. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry* 18(2): 105-112, 2008. 査読有

7) Edaravone prevents Fas-induced fulminant hepatic failure in mice by regulating mitochondrial Bcl-xL and Bax. Miyaso T, Kwon AH, Tsuji K, Qiu Z, Okumura T, Kamiyama Y. *Shock* 30(2): 212-216, 2008. 査読有

8) Protective effect of FR183998, a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger inhibitor, and its inhibition of iNOS induction in hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. Ishizaki M, Kaibori M, Uchida Y, Hijikawa T, Tanaka H, Ozaki T, Tokuhara K, Matsui K, Kwon AH, Kamiyama Y, Nishizawa M, Okumura T. *Shock* 30(3): 311-317, 2008. 査読有

9) Edaravone inhibits the induction of iNOS gene expression at transcriptional and posttranscriptional steps in murine macrophages. Yoshida H, Kwon AH, Habara K, Yamada M, Kaibori M, Kamiyama Y, Nishizawa M, Ito S, Okumura T. Shock 30(6): 734-739, 2008. 査読有

10) Immunological effect of active hexose correlated compound (AHCC) in healthy volunteers: a double-blind, placebo-controlled trial. Terakawa N, Matsui Y, Satoi S, Yanagimoto H, Takahashi K, Yamamoto T, Yamao J, Takai S, Kwon AH, Kamiyama Y. Nutrition And Cancer 60(5): 643-651, 2008. 査読有

〔学会発表〕(計5件)

1) 多剤耐性緑膿菌感染モデルに対するフィブロネクチンの生体保護効果の検討. 権雅憲, 海堀昌樹, 里井壮平, 豊川秀吉, 柳本泰明, 井上健太郎, 徳原克治. 第110回日本外科学会総会 名古屋 名古屋国際会議場 2010.4.10

2) Involvement of the functional food Oligonol in hepatoprotection by reduction of nitric oxide. Nishizawa M, Yamanishi R, Miura T, Kwon AH, Okumura T. 31st European Society of Parenteral and Enteral Nutrition Congress. Reed Messe Congress Centre, Vienna, Austria, 2009.8.30

3) Kampo(Hochuekkito,TJ-41) inhibits the induction of iNOS gene expression in pro-inflammatory cytokine-stimulated hepatocyte. Matsumiya M, Araki Y, Matsuura T, Kaibori M, Okumura T, Nishizawa M, Kwon AH. 31st European Society of Parenteral and Enteral Nutrition Congress. Reed Messe Congress Centre, Vienna, Austria, 2009.8.30

4) Free radical scavenger (edaravone) blocks Fas-induced apoptosis pathway in mice. Kwon AH, Miyaso T, Qiu Z. 73th Annual Scientific Meeting of American College of Gastroenterology. Gaylord Palms Resort & Convention Center, Orland, Florida, 2008.10.6

5) Insulin-like growth factor-I prevents liver injury through the inhibition of inflammatory cytokine and iNOS induction

in a rat model of acute liver failure. Okumura T, Hijikawa T, Uchida Y, Kaibori M, Nishizawa M, Kwon AH. 5th International Conference: Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide. Festspielhaus Bregenz, Bregenz, Austria, 2008.8.26

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

権雅憲 (KWON A-HON)  
関西医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 70225605

### (2) 研究分担者

北出 浩章 (KITADE HIROAKI)  
関西医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 20298855

横井川 規巨 (YOKOIGAWA NORIO)  
関西医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 40460836