

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591490

研究課題名(和文)多剤耐性アシネトバクターの新規病原因子の探索と重症化に関する宿主側要因の解析

 研究課題名(英文) Analysis of the predisposing host factors to severe pathological conditions caused by *Acinetobacter baumannii* infections and the search the new virulence factors of multi-drug resistant strains

研究代表者

斧 康雄 (ONO, YASUO)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：10177272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：1) *A. baumannii* (A.b) は緑膿菌に比べて好中球の貪食殺菌作用に抵抗性で、好中球細胞外トラップ形成も少なかった。2) 肺感染マウスモデルでの致死性は、緑膿菌がA.bより強かった。3) A.b標準株、多剤耐性株(MDRA)由来のリポ多糖(LPS)で刺激すると、好中球内の炎症性サイトカインの遺伝子発現はほぼ同等に増強した。A.b由来膜小胞は好中球の活性酸素誘導能はないが遊走因子として作用した。4) A.b由来LPSはマスト細胞からのTNF- α 、IL-8産生を増強した。5) LAMP法によるMDRAの検出法を開発した。6) 液性免疫不全が感染病態重症化要因となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：1) *Acinetobacter baumannii* (*A.baumannii*) were resistant to phagocytosis and bactericidal activity by neutrophils as compared with *Pseudomonas aeruginosa*, neutrophil extracellular traps (NETs) formation was very little. 2) The lethality in a pulmonary infection mouse model caused by *P. aeruginosa* was higher than that of *A.baumannii* infection. 3) When neutrophils were stimulated with the lipopolysaccharides (LPS) derived from an *A.baumannii* standard strain or a multi-drug resistant strain (MDRA), gene expression levels of inflammatory cytokines in neutrophils were equally upregulated. Membrane vesicles derived from *A.baumannii* could not stimulate the production of reactive oxygen in neutrophils, but acted as a chemoattractant. 4) *A. baumannii*-derived LPS enhanced the TNF- α and IL-8 production in mast cells. 5) We have developed a LAMP method to detect MDRA. 6) Humoral immunodeficiency may be a predisposing factor to severe pathological conditions during *A. baumannii* infections.

研究分野：感染免疫学

 キーワード：アシネトバクター・バウマニ 好中球機能 好中球細胞外トラップ リポ多糖 膜小胞 遺伝子発現
多剤耐性アシネトバクター LAMP法

1. 研究開始当初の背景

近年、多剤耐性グラム陰性桿菌による院内感染症や市中感染症が問題となっている。その中で、多剤耐性 *Acinetobacter baumannii* (MDRA) の病原性は、まだ十分調べられておらず、発展途上国では市中肺炎も多く報告されている。申請者らは、本菌の莢膜形成による食細胞の貪食作用抵抗性が病原因子として重要と考えているが、発症/重症化に關与する宿主側要因の詳細な解析も十分なされていない。2009年～2010年にかけて、当大学医学部附属病院で国内ではこれまでにないMDRA院内感染のアウトブレイクを経験し、大きな反省と同時に多数の感染症例の診療実績から本研究の必要性を痛感している。MDRAに対する特効薬であるコリスチンの承認が予定されているが、既に臨床使用された諸外国の治療効果は、菌血症や肺炎に対して70%程度の有効率である。このことは、新規抗菌薬の開発や既存薬を用いた投与法の工夫が必要であること、さらに薬剤感受性以外の病原因子の解析とその対処や免疫補助療法などの必要性を示唆している。また、生活環境における本菌の疫学調査やMDRAの早期検出法の開発も待たれている。

2. 研究の目的

本研究は、MDRAの新規病原因子の探索と発症/重症化に關与する宿主側要因を解析することを目的とする。さらに、本菌の病原性低下や宿主感染防御能増強効果をねらった新たな免疫補助療法に關する基礎的検討も行なう。MDRAの環境疫学調査と迅速検出法の開発を行う。

3. 研究の方法

(1) ヒト好中球とMDRAとの相互作用の解析:

MDRAに対する感染防御は、好中球などの食細胞が中心的役割を担っている。本研究では、MDRAに対する好中球の貪食殺菌能や遊走能について多剤耐性緑膿菌(MDRP)を対

照に比較検討する。本菌に対する好中球細胞外トラップ(NETs)形成能を緑膿菌と比較する。本菌は莢膜保有菌で、その貪食には莢膜特異抗体が必要であるが、抗体や補体を除去した血清の本菌に対するオプソニン活性も調査する。

(2) *A. baumannii* の病原性の発現に關与する菌体成分の解析:

A. baumannii のリポ多糖(LPS)やMDRAおよびMDRPのLPSを精製した。これらLPS、外膜蛋白、精製した*A. baumannii* 膜小胞の好中球やマスト細胞などの免疫担当細胞に及ぼす影響を検討する。精製した各種LPSの好中球の応答性の違いを、活性酸素産生能、遊走能、免疫に關与する好中球内遺伝子の発現変化などを指標にして検討し、薬剤耐性化することによるLPSの病原性の変化を検討する。マスト細胞に対しては、*A. baumannii* 菌体およびLPSによる炎症性サイトカイン産生能やその細胞内遺伝子発現について検討する。*A. baumannii* が分泌する膜小胞の好中球機能に及ぼす影響は、好中球の殺菌能や遊走能について検討する。

(3) マウス肺炎モデルを用いた *A. baumannii* の病原性の解析:

これまでの報告では、*A. baumannii* 定着患者の中では、肺炎を併発する頻度が高いことから、マウス肺炎モデルを作成し、緑膿菌と比較しながら肺での定着と病態の違いについて解析し、さらに気道上皮細胞への付着性や侵入性などの*A. baumannii* の病原性を明らかにする。

(4) MDRAの迅速検出法の確立:

近年注目されている遺伝子検査技術の一つLoop-mediated isothermal amplification(LAMP)法を用いて、検体からのMDRAの迅速検出法を開発する。

(5) 家畜における *Acinetobacter* 属菌の保有状況の調査:

家畜(牛・豚)およびその畜産業従事者の

糞便と鼻汁を採取し、常在菌を分離培養する。TOF-MS 解析や 16SrRNA の DNA 塩基配列の解読などで菌種を同定する。また薬剤耐性の状況を調査する。

4. 研究成果

1) MDRA、薬剤感受性 *A. baumannii* の標準株 (ATCC19606) を含め、多数の臨床分離株を用いて健康人好中球や単球に対する抗食菌性を、多剤耐性緑膿菌 (MDRP) などと比較検討した。その結果、*A. baumannii* (MDRA を含む) の食細胞の食作用に付随する活性酸素産生能は他の細菌に比較して著明に低下していた。血清存在下で、Gram 染色/ギムザ染色し鏡検で MDRA と MDRP の好中球による貪食能を比較すると、MDRA は MDRP に比較して、いずれの条件下でも貪食されにくく、これは FITC 標識 *A. baumannii* を貪食させ FACS 解析した場合もほぼ同様であった。しかし、菌を遊走因子とした場合の好中球の遊走作用に及ぼす影響は同等であった。次に、*A. baumannii* の貪食に必要なオプソニン因子を調べるために、多数の型の違う *A. baumannii* を用いて、易感染宿主の血清を想定し、抗体除去血清、補体除去血清、両者除去血清を用いて検討した。その結果、MDRA においては、補体よりも抗体除去によりオプソニン作用が低下したので、感染防御因子として血清中の莢膜特異抗体が重要であることが示唆された。ヒト好中球を *A. baumannii* 標準株や緑膿菌 (PAO-1 株) で刺激し、1 時間培養後の好中球細胞外トラップ (NETs) 形成をみた。緑膿菌株刺激では NETs 形成がみられたが、*A. baumannii* 刺激では NETs 形成は少なく、殺菌能をみても緑膿菌に比較して殺菌されにくかった。

2) *A. baumannii* の新規病原因子の探索において今回は、本菌由来 LPS の病原性を大腸菌や緑膿菌由来 LPS と比較検討した。まず、本菌を大量培養し LPS の精製を行った。

E. coli 由来 LPS (B4) と *A. baumannii* 標準株

及び MDRA 由来 LPS、緑膿菌由来 LPS、MDRP 由来 LPS を種々の濃度で好中球に作用させ、活性酸素産生能に及ぼす priming 効果をみたところ、大腸菌と同等で緑膿菌由来 LPS より強い priming 効果を示した。種々の LPS 刺激による好中球内のパターン認識受容体、炎症性サイトカイン、ケモカイン受容体、炎症増強因子 *TREM1* の遺伝子発現変化を定量解析した結果、LPS の種類に関わらず *TLR4*、*CD14* の遺伝子発現は抑制され、炎症性サイトカインと *TREM1* 遺伝子発現は増強した。MDRA 由来 LPS による遺伝子発現誘導作用が最も強く、感受性株由来 LPS に比べて好中球内の炎症性サイトカインや *TREM1* の遺伝子発現を増強した。この差異は薬剤耐性化による LPS の立体構造の変化に起因するのかもしれない(論文投稿中)。次に、ヒト由来マスト細胞株である LAD2 を用いて *A. baumannii* への応答を炎症性サイトカイン遺伝子発現とサイトカイン産生を指標に解析した。LAD2 は *A. baumannii* 菌体刺激で TNF- α を放出し、TNF- α 、CCL4、IL-8 の mRNA の発現増強も見られたが、その作用にはマスト細胞表面の Fc γ R II (CD32) の関与が示唆された。*A. baumannii* 由来 LPS もマスト細胞からの TNF- α 、IL-8 産生並びにその遺伝子発現増強を起し、炎症反応を惹起することが示唆された。また、精製 *A. baumannii* 由来膜小胞はヒト好中球活性酸素誘導能を示さなかったが、IL-8 や fMLP に比較して弱いものの好中球遊走因子として作用した(論文作成中)。

3) *A. baumannii* の肺感染マウスモデルを用いた病原性の解析では、*A. baumannii* を正常マウス (C3H/HeN) の肺に感染させ生存率を測定した。*A. baumannii* 標準株と臨床分離の薬剤感受性株 (TK1090) とで比較検討した。*A. baumannii* を肺感染させ 2 週間の生存期間で比較検討すると標準株は薬剤感受性株より致死性が高かった。肺組織では標準株と臨床分離株で組織像に差はみられなかった。しか

し、*A. baumannii* の致死性は、緑膿菌(PA0-1株)より低かった。*A. baumannii* の気道上皮細胞への付着性や侵入性に関しては現在検討中である。

4)MDRA は、カルバペネマーゼ(OXA-51、OXA-23、OXA-58 など)を高度産生することにより耐性化する。遺伝子検査技術の一つである LAMP法を用いてMDRA の迅速検出法を開発した(論文投稿中)

5) 家畜における *Acinetobacter* 属菌の保有状況調査では、牛、豚、畜産業従事者の糞便と鼻汁を収集し、それを分離培養した。アシネトバクター属菌は糞便と鼻汁、いずれからも同様に分離された。特に豚からの検出が多く、20%以上の個体から分離された。分離同定することができたアシネトバクター属菌は 62 株であり、いずれもセフェム系薬に耐性を示し、*A. baumannii* complex と *A. lwoffii* が半数以上を占めた。今回検出したアシネトバクター属菌の中には臨床分離株でみられる代表的な菌種が多く検出されたことから動物を介するヒトへの感染経路の可能性もあることが示唆された(論文作成中)

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 1 件)

1)Kamoshida G, Kikuchi-Ueda T, Tansho-Nagakawa S, Nakano R, Nakano A, Kikuchi H, Ubagai T, Ono Y.: *Acinetobacter baumannii* escape from neutrophil extracellular traps (NETs). *J Infect Chemother.* 21(1): 43-49,2015. (査読あり)
doi: 10.1016/j.jiac.2014.08.032. Epub 2014 Oct 5. PMID: 25287154

[学会発表](計 13 件)

1) 永川茂, 祖母井庸之, 上田たかね, 中野竜一, 中野章代, 斧康雄: 肺感染マウスを用いた *Acinetobacter baumannii* 臨床分離株の病原性の解析. 第88回日本細菌学会学術集会 2015年3月26日-28日. 長良川国際会議場 (岐阜県・岐阜市)

2) 上田たかね, 祖母井庸之, 中野竜一, 永川茂, 中野章代, 斧康雄: *Acinetobacter baumannii* 感染に対するヒト由来マスト細胞の応答. 第88回日本細菌学会学術集会 2015年3月26日-28日. 長良川国際会議場 (岐阜県・岐阜市)

3) 鴨志田剛, 上田たかね, 永川茂, 彦坂健児, 中野竜一, 祖母井庸之, 斧康雄: 好中球を利用したアシネトバクターの新たな細菌移動メカニズムの解析. 第63回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第61回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会 2014年10月29日-31日. 東京ドームホテル (東京都・文京区)

4) 上田たかね, 祖母井庸之, 中野竜一, 鴨志田剛, 永川茂, 彦坂健児, 斧康雄: ヒト由来マスト細胞株の*Acinetobacter*生菌及びLPSに対する応答. 第63回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第61回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会 2014年10月29日-31日. 東京ドームホテル (東京都・文京区)

5) 永川茂, 祖母井庸之, 上田たかね, 鴨志田剛, 中野竜一, 彦坂健児, 斧康雄: アシネトバクターバウマニ臨床分離株の肺感染マウスを用いた病原性の解析. 第63回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第61回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会 2014年10月29日-31日. 東京ドームホテル (東京都・文京区)

6) 中野竜一, 浅原美和, 古川泰司, 彦坂健児, 鴨志田剛, 祖母井庸之, 永川茂, 上田たかね, 斧康雄: カルバペネマーゼ産生アシネトバクターを検出する新規LAMP法の開発. 第63回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第61回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会2014年10月29日-31日. 東京ドームホテル (東京都・文京区)

7) 祖母井庸之, 永川茂, 上田たかね, 中野竜一, 鴨志田剛, 斧康雄: 各種リポ多糖(LPS)に応じてヒト好中球内で発現化する免疫関連遺伝子群の解析. 第63回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第61回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会2014年10月29日-31日. 東京ドームホテル (東京都・文京区)

8) 鴨志田剛, 上田たかね, 永川茂, 中野竜一, 祖母井庸之, 菊地弘敏, 斧康雄: NETs形成に着目した好中球のアシネトバクターと緑膿菌に対する生体防御反応の差異. 第88回日本感染症学会学術講演会、第62回日本化学療法学会総会合同学会 2014年6月18日-20日. ヒルトン福岡シーホーク (福岡県・福岡市)

9) 祖母井庸之, 小澁陽司, 永川茂, 上田たかね, 中野竜一, 中野章代, 斧康雄: LPS活性化ヒト好中球内の免疫関連遺伝子発現に及ぼす抗菌薬の影響. 第88回日本感染症学会学術講演会、第62回日本化学療法学会総会合同学会 2014年6月18日-20日. ヒルトン福岡シーホーク (福岡県・福岡市)

10) 上田たかね, 祖母井庸之, 中野竜一, 鴨志田剛, 中野章代, 永川茂, 菊地弘敏, 斧康雄: *Acinetobacter baumannii* に対するヒト由来マスト細胞株の応答(2) 第88回日本感染症学会学術講演会、第62回日本化学療法学会総

会合同学会 2014年6月18日-20日. ヒルトン福岡シーホーク (福岡県・福岡市)

11) 永川茂, 祖母井庸之, 上田たかね, 鴨志田剛, 菊地弘敏, 斧康雄: 細菌感染症患者の末梢血好中球の抗原認識とアシネトバクター貪食能の解析. 第62回日本感染症学会東日本地方会学術集会 2013年10月30日-11月1日. 東京ドームホテル (東京都・文京区)

12) 鴨志田剛, 上田たかね, 永川茂, 中野竜一, 祖母井庸之, 菊地弘敏, 斧康雄: アシネトバクターと緑膿菌に対する好中球の NETs 形成の差異. 第62回日本感染症学会東日本地方会学術集会 第60回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会2013年10月30日-11月1日. 東京ドームホテル (東京都・文京区)

13) 上田たかね, 祖母井庸之, 中野竜一, 永川(丹生)茂, 菊地弘敏, 斧康雄: *Acinetobacter baumannii* に対するヒト由来マスト細胞株の応答. 第87回日本感染症学会2013年6月5日-6日. パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
特になし

6．研究組織

(1)研究代表者

斧 康雄 (ONO YASUO)
帝京大学・医学部・教授
研究者番号：10177272

(2)研究分担者

祖母井 庸之 (UBAGAI TSUNEYUKI)
帝京大学・医学部・講師
研究者番号：10311416

菊地 弘敏 (KIKUCHI HIROTOSHI)
帝京大学・医学部・講師
研究者番号：80338681

永川 茂 (NAGAKAWA SHIGERU)
帝京大学・医学部・助教
研究者番号：50266300

上田 たかね (UEDA TAKANE)
帝京大学・医学部・助教
研究者番号：80459312

中野 竜一 (NAKANO RYUICHI)
帝京大学・医学部・助教
研究者番号：80433712

(3)連携研究者

鴨志田 剛 (GO KAMOSHIDA)
帝京大学・医学部・助手
研究者番号：40707410

中野 章代 (AKIYO NAKANO)
帝京大学・医学部・助手
研究者番号：10707441