

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 9 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860769

研究課題名(和文) インフルエンザ後の二次性肺炎球菌性肺炎の発症および重症化における関連因子の解明

研究課題名(英文) The Investigation to identify the virulent factors responsible for the severity of secondary pneumococcal pneumonia

研究代表者

中村 茂樹 (NAKAMURA, SHIGEKI)

国立感染症研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：20399752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：野生型マウスを麻酔下にインフルエンザPR8株および肺炎球菌D39株を経鼻感染し、二次性肺炎球菌肺炎マウスモデルを作成に成功した。肺炎球菌病原因子欠損株を用いた生存率解析において、CbpA, NanA, BgaA, SpxBにおいてマウスの生存率が有意に回復した。またマクロライド系薬によるインフルエンザと肺炎球菌の共感染によって誘導されるTNF- $\alpha$ 過剰産生の有意な抑制(ex vivo)、および生存率の改善傾向(in vivo)が認められた。本研究によって二次性肺炎球菌性肺炎の重症化に関わる菌側因子の同定と、マクロライド系薬による重症化抑制の可能性について明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：We successfully established the experimental model of post-influenza secondary pneumococcal pneumonia. Next we found the candidate genes responsible for the severity of secondary pneumococcal pneumonia by using deleted mutants. The percent survival was significantly restored in the mice co-infected with influenza and deleted mutants, CbpA, NanA, BgaA, SpxB compared with wild strain. In addition, the excessive production of TNF- $\alpha$  induced by co-infection from the murine peritoneal macrophages was significantly reduced by macrolide antibiotics. Furthermore the percent survival of co-infected mice treated with intraperitoneal administration of 50mg/kg azithromycin for 3 days after pneumococcal co-infection is prone to restore compared with control mice. Taken together of these results, we are able to elucidate the bacterial factors related to the severity of secondary pneumococcal pneumonia and the potency of macrolides to improve the prognosis by its immunomodulatory effects.

研究分野：呼吸器内科学、感染症学

キーワード：肺炎球菌 インフルエンザウイルス 二次性肺炎球菌性肺炎 マクロライド

## 1. 研究開始当初の背景

インフルエンザに合併する肺炎はウイルスそのものによって発症する原発性ウイルス性肺炎と、細菌感染が関与する二次性もしくは重複感染性に大きく分類される。インフルエンザ感染後の二次性細菌性肺炎は、特に小児や高齢者などのハイリスク群を中心に罹患率および死亡率が高い。その発症機序は、主に先行するインフルエンザ感染による宿主自然免疫の減弱および細菌感受性の亢進が考えられているが、細菌の病原因子との関連性についての報告は極めて少ない。また、発症メカニズムの解明が進む一方で、二次性細菌性肺炎の予防・治療法への応用には至っていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、インフルエンザ後の二次性肺炎球菌性肺炎に関連する細菌側因子の同定と、臨床応用可能な治療法の開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 二次性肺炎球菌性肺炎モデルの確立

- ・使用マウス：C57BL/6 (6週齢、雌)
- ・使用ウイルス：influenza A/PR/8/34 (PR8)
- ・使用細菌：*Streptococcus pneumoniae* (D39, serotype 2)、D39株の病原因子欠損株 *ply* (菌体内毒素ニューモリシン欠損株)、*ply<sub>W433F</sub>* (ニューモリシン孔形成能欠損株)、*spxB* (ピルビン酸代謝酵素欠損株)、*NanA* および *BgaA* (複合糖質末端切断酵素欠損株)、*CbpA* (多量体Ig受容体結合タンパク欠損株)
- ・感染スケジュール：インフルエンザPR8 100 TCID<sub>50</sub>/animal の経鼻接種を行った5日後、*S.*

*pneumoniae* 1X10<sup>5</sup> CFU/animal を経鼻接種

- ・評価方法：生存率、肺内生菌数

### (2) マクロライド系薬による二次性肺炎球菌性肺炎の予後改善効果の検討

インフルエンザ後に二次性肺炎球菌性肺炎では、過剰な炎症性サイトカイン産生が誘導されることで肺胞出血や急性肺障害が惹起されることが報告されている。マクロライド系抗菌薬は、宿主免疫調整薬としての側面を有しており、炎症性サイトカイン産生の抑制、好中球遊走およびエラスターゼ産生の抑制など、様々な報告が認められている。我々はマクロライド系薬の炎症性サイトカイン産生抑制作用に着目し、二次性細菌性肺炎で誘導される過剰な炎症性サイトカイン誘導に対するマクロライド系薬の有効性について *in vitro* による検討を行った

- ・使用細胞：マウス腹腔内マクロファージ (4% チオグリコレート溶液腹腔注により誘導)
- ・使用薬剤：EM900, クラリスロマイシン (CAM), アジスロマイシン (AZM)
- ・使用ウイルス：influenza A/PR/8/34 (PR8)
- ・使用細菌：*S. pneumoniae* (AZM 耐性株)

マウス腹腔内マクロファージを抽出後、96 well plate に接種 (2.5X10<sup>4</sup> cells/well) し 24 時間培養する。EM900・CAM・AZM をそれぞれ 100 μM を加え 1 時間共培養を行なう。その後、インフルエンザPR8株 50TCID<sub>50</sub>/well (MOI 0.013) および heat-killed *S. pneumoniae* 1X10<sup>6</sup> CFU/well を加え 24 時間培養。培養上清中の炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  量を ELISA にて定量する。

## 4. 研究成果

(1) 二次性肺炎球菌性肺炎マウスモデルの確立と遺伝子欠損株を用いた重症化関連病原因子の同定

*S. pneumoniae* 接種 10 日後、共感染群では全てのマウスが死亡したが、インフルエンザ単独群、肺炎球菌単独群では全てのマウスが生存した (図 -A)。また共感染 24 時間後、48 時間後にマウス肺をサンプリングし、肺内生菌数を定量培養にて測定したところ、どちらも有意に肺内生菌数の増加が認められた (図 -B)。以上より、インフルエンザ後の二次性肺炎球菌性肺炎マウスモデルの確立が確認できた。さらに上記にて確立したマウスモデルを用いて遺伝子欠損株による感染実験を行った。その結果、野生株 (WT) と比較し、*spxB*・*nanA*・*bgaA*・*cbpA* において、インフルエンザとの共感染後の生存率が有意に改善した (図 -A, B)。このことより、これら 4 遺伝子が二次性肺炎球菌感染症の重症化に影響を及ぼす細菌側因子の候補として考えられた。

図 -A 生存率の比較

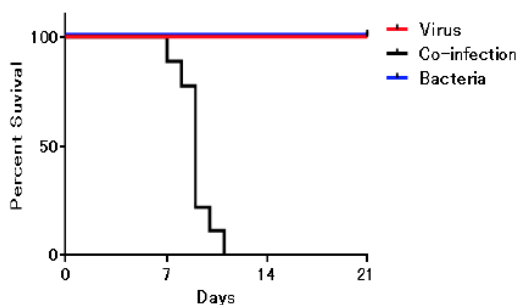


図 -B 肺内生菌数

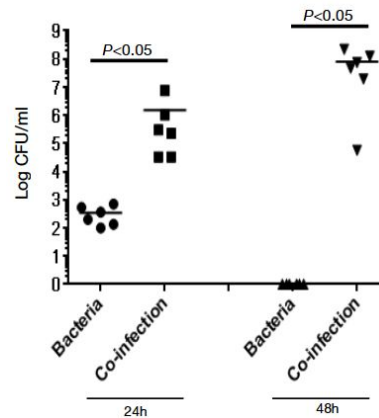


図 -A 生存率の比較

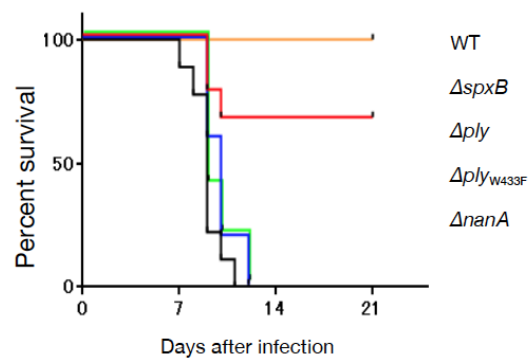
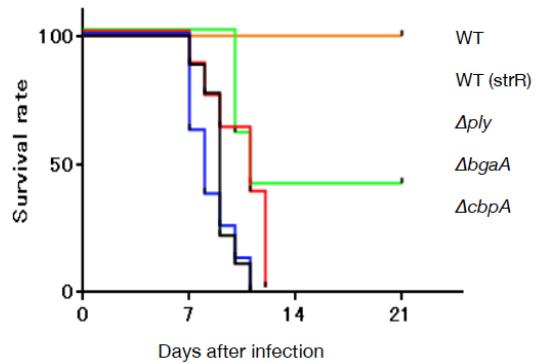


図 -B 生存率の比較

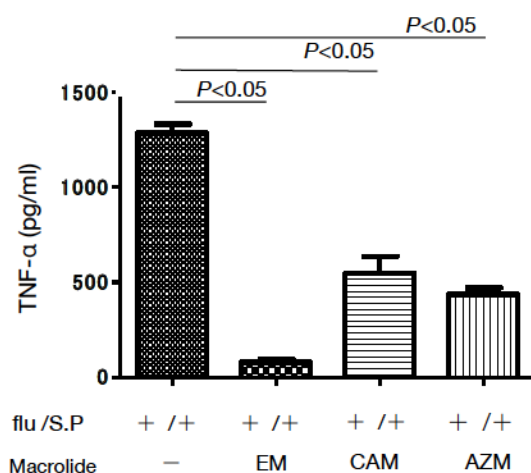


(2) マクロライド系薬による二次性肺炎球菌性肺炎の予後改善効果の検討

マウス腹腔内マクロファージをインフルエンザおよび肺炎球菌で刺激した結果、単独刺激群に比べ、共刺激群では培養上清中の TNF- $\alpha$  産生量の有意な増加が確認できた

(data not shown)。マクロファージ刺激前に、EM900・CAM・AZMにより前処理し、共刺激を行ったところ、いずれのマクロライド系薬においても培養上清中の TNF- $\alpha$  産生量が有意に減少した (図 )。

図 培養上清中 TNF- $\alpha$  の定量



#### <考察と今後の方針>

今回確立したインフルエンザ後の二次性肺炎球菌性肺炎マウスモデルを用いて、その予後と関連する候補 4 遺伝子を同定した。CbpA、NanA、BgaA は気道粘膜への定着に關与する病原因子であり、インフルエンザの先行感染によって気道粘膜に発現誘導された受容体への結合と相関している可能性がある。一方、SpxB はピルビン酸代謝酵素であるが、肺炎球菌性肺炎における役割についてはほとんど解明されていない。ピルビン酸は解糖系のグルコース嫌気性代謝の生成物である。仮説として、急性肺障害によって肺胞領域に生じる低酸素状態下における肺炎球菌の増殖に SpxB が重要であると考えられ、今後、*in vitro*, *in vivo*

の両面から検討を進めていきたい。また、過剰な炎症性サイトカインの、マクロライド系薬による抑制作用についても *in vitro*ではあるが明らかにすることができた。今後はマクロライド系薬が作用すると考えられる TNF- $\alpha$  産生における細胞内シグナル伝達経路を明らかにし、*in vivo*における有効性についても検討を加える。

#### 5. 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] (計 8 本)

Kajihara T, Nakamura S, et al. Clinical characteristics and risk factors of enterococcal infections in Nagasaki, Japan: a retrospective study. BMC Infect Dis 15;426:2015. (査読あり、10 人中 2 番目)

Ide S, Nakamura S, et al. Epidemiology and clinical features of pulmonary nontuberculous mycobacteriosis in Nagasaki, Japan. PLoS One 10;e0128304:2015. (査読あり、15 人中 2 番目)

Iwanaga N, Nakamura S, et al. Macrolides promote CCL2-mediated macrophage recruitment and clearance of nasopharyngeal pneumococcal colonization in mice. J Infect Dis 212;1150-9:2015. (査読あり、12 人中 2 番目)

Tanaka A, Nakamura S, et al. The effect of intravenous peramivir, compared with oral oseltamivir, on the outcome

of post-influenza pneumococcal pneumonia in mice. *Antivir Ther* 20;11-9:2015. (査読あり、14人中2番目)

Iwanaga N, Nakamura S, et al. A fatal case of acute myocardial infarction following the improvement of influenza A(H1N1)pdm2009-related acute myocarditis. *Intern Med* 2014;53:2153-7:2014. (査読あり、2番目)

Harada Y, Morinaga Y, Kaku N, Nakamura S, et al. In vitro and in vivo activities of piperacillin-tazobactam and meropenem at different inoculum sizes of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect* 20;0831-9:2014. (査読あり、9人中4番目)

Takazono T, Nakamura S, et al. Paradoxical response to disseminated non-tuberculosis mycobacteriosis treatment in a patient receiving tumor necrosis factor- inhibitor; a case report. *BMC Infect Dis* 14;114:2014. (査読あり、8人中2番目)

Nagaoka K, Yanagihara K, Morinaga Y, Nakamura S, et al. *Prevotella intermedia* induces severe bacteremic pneumococcal pneumonia in mice with upregulated platelet-activating factor receptor expression. *Infect Immun* 82;587-93:2014. (査読あり、10人中4番目)

#### [学会発表]

##### 国内学会 (計8件)

中村 茂樹. 感染症に対する気管支鏡診断. 第22回日本呼吸器内視鏡学会. 平成27年2月14日、長崎.

中村 茂樹. MRSA感染症の最近の話題. 第63回日本化学療法学会総会. 平成27年6月5日、東京.

中村 茂樹. 動物モデルを用いたマクロライド作用の解析. 第22回マクロライド新作用研究会. 平成27年7月18日、東京.

中村 茂樹. 自然免疫賦活薬による緑膿菌慢性気道感染症に対する新規治療法開発への試み～動物モデルを用いた検討～. 第64回日本感染症学会東日本地方会. 平成27年10月22日、札幌.

中村 茂樹. ウイルス価の経時的推移を追跡した重症熱性血小板減少症候群 (SFTS)の一例. 第26回日本臨床微生物学会総会. 平成27年1月31日、東京.

吉田 将孝、中村 茂樹ほか. インフルエンザウイルスと肺炎球菌の重複感染に対するマクロライド系薬の有効性. 第85回日本感染症学会西日本地方会. 平成27年10月15日、奈良.

中村 茂樹. MRSA肺炎における抗菌薬の適正使用. 第84回日本感染症学会西日本地方会. 平成26年10月25日、岡山.

中村茂樹. 免疫賦活による肺炎球菌

感染症制御への試み. 第 84 回日本感染症学会西日本地方会. 平成 26 年 10 月 24 日、岡山.

[ 国際学会 ] (計 4 件)

Nakamra S, et al. Efficacy of high dose meropenem (6g/day) in the treatment of experimental murine pneumonia induced by the meropenem resistant *Pseudomonas aeruginosa*. 25<sup>th</sup> European society of clinical microbiology and infectious diseases. 2015. (Copenhagen, Denmark)

Nakamura S, et al. A multicenter, randomized controlled study of the clinical efficacy of intravenous peramivir versus oseltamivir against influenza A and B virus infection in high-risk patients. 55<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2015. (San Diego, USA).

Nakamura S, et al. The efficacy of toll-like receptor4/MD-2 complex agonistic antibody UT12 for chronic lower respiratory tract infection caused by *Pseudomonas aeruginosa* in mice. 24<sup>th</sup> European society of clinical microbiology and infectious diseases. 2014. (Barcelona, Spain)

Nakamura S, et al. Immunoprotective

Effects of Oral Administration of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* 1073R-1 with Exopolysaccharides against Pneumococcal Pneumonia and Nasopharyngeal Colonization in Mice. 54<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2014. (Washington DC, USA).

[ 図書 ] (計 7 件)

中村 茂樹 他、医薬ジャーナル社、化学療法の領域、2015、8.

中村 茂樹、ヴァンメディカル、感染と抗菌薬、2015、8.

中村 茂樹 他、ヴァンメディカル、感染と抗菌薬、2015、8.

中村 茂樹 他、近代出版、臨床と微生物、2015、7.

中村 茂樹 他、大道学館出版部、2015 年、9.

中村 茂樹. ヴァンメディカル、感染と抗菌薬、2014、6.

中村 茂樹 他. プラクティス、2014、9.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

中村 茂樹 (NAKAMURA, Shigeki)

国立感染症研究所・真菌部・主任研究官

研究者番号 : 20399752

(2) 研究協力者

Jeffrey Weiser (Jeffrey, WEISER)

砂塚 敏明 (SUNAZUKA, Toshiaki)