

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590514

研究課題名（和文）新型インフルエンザに続発する市中感染型MRSA感染症の病態解析と治療戦略

研究課題名（英文）Influence of prior pandemic A(H1N1)2009 virus infection on invasion of MDCK cells by community-acquired MRSA.

研究代表者

高山 陽子（TAKAYAMA YOKO）

北里大学・医学部・講師

研究者番号：80286278

研究成果の概要（和文）：A(H1N1)pdm09を用いて市中感染型MRSA（ATCC BAA-1680：USA300）、院内感染型MRSA（ATCC BAA-1699：USA100）のMDCK細胞への侵入性について検討した結果、ATCC BAA-1680の侵入性はATCC BAA-1699よりも高いこと、いずれもA(H1N1)pdm09の先行感染存在下で侵入率が増強していたことが判明した。本研究により、A(H1N1)pdm09先行感染後のCA-MRSA感染のメカニズムを解明する上で、その一つとして侵入性がかかわることを示唆する重要な知見を得た。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated whether prior infection with pandemic A(H1N1)2009 virus (A(H1N1)pdm09) led to increased invasion of airway epithelial cells by CA-MRSA. We performed the gentamicin killing assay using Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells and various bacteria to investigate whether prior A(H1N1)pdm09 infection led to increased invasion of these epithelial cells by CA-MRSA. We found that the invasion rate of two MRSA strains (ATCC BAA-1680 (USA 300) and ATCC BAA-1699 (USA 100)) into intact MDCK cell monolayers was  $0.29 \pm 0.15\%$  and  $0.007 \pm 0.002\%$ , respectively ( $p < 0.01$ ,  $n \geq 3$ ). In addition, the relative invasion rate of both ATCC BAA-1680 and ATCC BAA-1699 was significantly increased by prior A(H1N1)pdm09 infection of MDCK monolayers from  $1 \pm 0.28$  to  $1.38 \pm 0.02$  and from  $1 \pm 0.24$  to  $1.73 \pm 0.29$ , respectively ( $p < 0.01$ ). These results indicate that ATCC BAA-1680 displays much stronger invasiveness of MDCK cells than ATCC BAA-1699, although invasion of both strains was increased by prior A(H1N1)pdm09 infection. In conclusion, this study provided the first evidence that prior A(H1N1)pdm09 infection facilitates the invasion of MDCK cells by CA-MRSA, presumably due to cellular injury caused by the virus.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：A(H1N1)pdm09・community-acquired MRSA・invasion

## 1. 研究開始当初の背景

2009年3月の新型インフルエンザH1N1(以下A(H1N1)pdm09)報告以降、交通網の発達に伴い、過去のパンデミックインフルエンザと比較して感染は短期間で世界中に拡大し、6月にはWHOによるパンデミック宣言がなされた。10月11日現在、確定診断例40万人以上がWHOに報告されているが、疑い例や未受診例は含まれていないため、実数は未知である。わが国でも5月に国内初の感染事例が確認され、宮城県では10月8日発表の県内全患者報告数は533人(96定点医療機関)であり、仙南地域は注意報が発令されている。

スペイン風邪など過去の新型インフルエンザでは、死亡原因の大多数が肺炎球菌肺炎であったと報告がされている(*J Infect Dis* 198:962-70, 2008)。季節性インフルエンザについても同様の傾向が認められ、2003-2004年のインフルエンザ流行期に米国で若年者を中心としたMRSA重症肺炎の併発が17件発生し、うち5例が死亡したとの報告がある(*Emerg Infect Dis* 12:894-9, 2006)。病因として、インフルエンザウイルスが黄色ブドウ球菌に特有のアドヘジンを経道で分泌し、プロテアーゼがインフルエンザウイルスの複製を亢進させていると考えられている(*Proc Soc Exp Biol Med* 185:120-8, 1987、*Virology* 157:421-30, 1987、*Infect Immun* 32:118-26, 1981)。アドヘジンとしては、フィブロネクチン、コラーゲン、ラミニン、ピトロネクチン、ムチン各結合蛋白がある。次に付着部位での増殖が起こり、様々な毒素・酵素を産生することが分かっている。これらの産生物質が黄色ブドウ球菌を殺菌するための食細胞の集合阻害や集合した食細胞などの融解、サイトカインの異常産生、組織の崩壊を起こし、症状が重症化する。

今回我々は、深刻な市中肺炎や敗血症に関連するCA-MRSAに着目した。HA-MRSAは、1961年の分離以来院内感染の主要な原因菌であった。しかし1990年代後半からCA-MRSAが出現し、グローバル感染症の病原体として注目されている。CA-MRSAは侵襲性や伝播性が非常に強いという特徴がある。主に皮膚感染によって健康な小児や若年運動選手などに感染し(*J Clin Microb* 47:73-8, 2009)、皮膚・軟部組織疾患を惹起するが、深刻な市中肺炎や敗血症にも関連することが知られている。CA-MRSAには疫学的に多様な菌型が存在し、代表的なPVL産生CA-MRSAにもいくつかのタイプが存在することが分かっている。

米国に分布するST1型CA-MRSA(USA 400)やST8型CA-MRSA(USA 300)、主に欧州に分布するST80型CA-MRSA、我が国を含めて世界中に分布するST30型CA-MRSAなどである(*J Clin Microbiol* 44:108-18, 2006)。我が国や米国は、黄色ブドウ球菌に占めるMRSAの割合が60%以上と高率である。米国ではMRSA深部感染症が深刻な問題となっており、2005年の感染者数は約9万人で死亡率は19.7%に達した。我が国では、米国ほど深刻な状況ではないが、2006年にPVL陽性CA-MRSAによる壊死性肺炎が初めて報告され(感染制御 2009;5:163-6)、以後報告例が散見される。富田らの報告ではインフルエンザB罹患後の続発性肺炎が確認されている(日呼誌 46:395-403, 2008)。

米国感染症学会(IDSA)と米国胸部学会(ATS)は、2007年版ガイドラインの中で、重症急性呼吸器症候群(SARS)や鳥インフルエンザ(H5N1)と同様に、CA-MRSAは深刻な市中肺炎の原因菌であることを結論づけており、厳密な診断の必要性を勧告している。また、CDCもインフルエンザ流行期のMRSA市中肺炎への注意喚起を行っている状況である。H1N1及び季節性インフルエンザにCA-MRSA感染症を併発した臨床報告は認められ(*J Infect* 59, 366-70, 2009)、カニクイザルを用いた実験で、H1N1ウイルスが季節性インフルエンザウイルスと比較して両葉から多く分泌されており、肺炎のリスクが高いことを示唆している(*Nature* 459:931-9, 2009)。医療水準の向上を考慮しても、上記のエビデンスのように、H1N1感染に続発する肺炎は一定の割合で起こると予想される。このような現状を踏まえ、我々は、H1N1に続発するCA-MRSA肺炎に着目し、病態解析と治療戦略を検討することを目標とした。

## 2. 研究の目的

2009年3月、A(H1N1)pdm09感染事例がメキシコで初めて確認されて以降、感染は急速に世界中に拡大した。スペイン風邪など過去の新型インフルエンザでは、死亡原因の大多数は肺炎球菌性肺炎が占めたとの報告がある。季節性インフルエンザにおいては肺炎球菌以外の細菌で細胞接着性や侵入性を検討した報告は少なく、A(H1N1)pdm09については細菌性肺炎の種類や傾向に関するエビデンスはない。本研究では、深刻な市中肺炎や敗血症に関連し、PVL(Panton-Valentine Leucocidin)を産生することで注目された市中感染型MRSA (community acquired MRSA:

CA-MRSA)に着目し、A(H1N1)pdm09に続発する肺炎の病態解析と治療戦略を検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 培養細胞を用いた細胞侵入性の比較

細胞は、BEAS-2B細胞(ヒト正常気管細胞由来)、MDCK細胞(イヌ腎臓細胞由来)、HEp2細胞(ヒト喉頭癌細胞由来)の計3種類を用いた。菌株は、CA-MRSA (USA300 : BAA-ATCC 1680)、HA-MRSA (USA100 : BAA-ATCC 1699)、HA-MRSA (TU 1181 : 臨床分離株)、MSSA (ATCC 29213)、*P. aeruginosa* (PA01 : 陽性コントロール)、*E. coli* (RDEC-1 : 陰性コントロール)を用いた(*J Infect Dis*;181:765-9, 2000)。

細胞培養用24穴マイクロプレートに、ウシ胎児血清加Minimum Essential Mediumを用いて細胞培養を行い、モノレイヤーを形成させた。各菌を3時間感染させた後にgentamicin (200  $\mu$ g/ml)で2時間処理し、非侵入菌を殺菌した。1%Triton-Xで細胞処理後、寒天培地上にコンラージをして細胞内侵入菌をカウントし、接種菌量に対する侵入菌の割合を算出した(gentamicin killing assay)。

#### (2) 細胞内侵入率の算出

本検討は、インフルエンザウイルスでの使用成績が確立しているMDCK細胞を用いた。モノレイヤーとなったところでATCC BAA-1680、ATCC BAA-1699を接種し、(1)と同様にgentamicin killing assayを施行した。

#### (3) 細胞内相対的侵入率の算出

A(H1N1)pdm09先行感染の有無におけるATCC BAA-1680とATCC BAA-1699の相対的侵入率を算出した。MDCK細胞を5% CO<sub>2</sub>下で37°C4日間培養した。A(H1N1)pdm09はMOI0.01とした。1時間培養後、acetylated bovine trypsin (Sigma-Aldrich)を5  $\mu$ g/ml加え、18時間培養した。次に、1晩培養し増殖させたATCC BAA-1680とATCC BAA-1699を、各々10  $\mu$ L (3 $\times$ 10<sup>4</sup> CFU/well: MOI 0.1)追加し、更に37°Cで3時間培養した。その後、gentamicin killing assayを施行した。

### 4. 研究成果

#### (1) 培養細胞を用いた細胞侵入性の比較

BEAS-2B細胞では、最も侵入率が高かったのはATCC BAA-1680の32.9%であり、次いでATCC BAA-1699の30%であった。いずれもPA01より有意に高い値を示した。

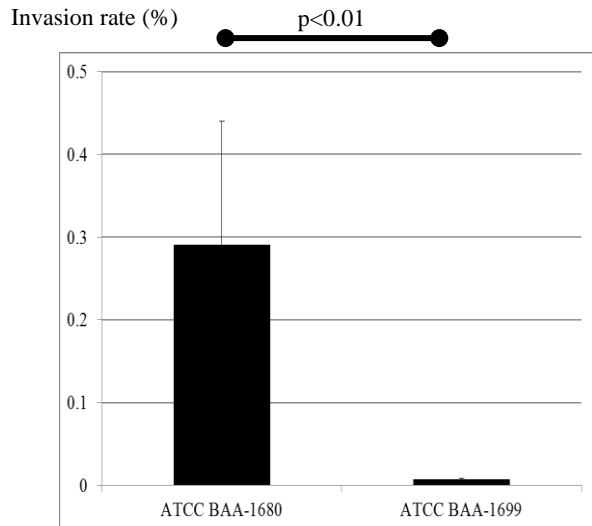
MDCK細胞で最も侵入率が高かったのはATCC BAA-1680の0.29%であり、PA01と比較して有意に高値であった。次いでPA01の0.08%であり、その他の*S. aureus*の侵入率はPA01を下回っていた。

HEp2細胞で、最も侵入率が高かったのはATCC BAA-1680の64.4%であった。*S. aureus*

は、すべてでPA01より有意に高い値を示した。

#### (2) 細胞内侵入率の算出

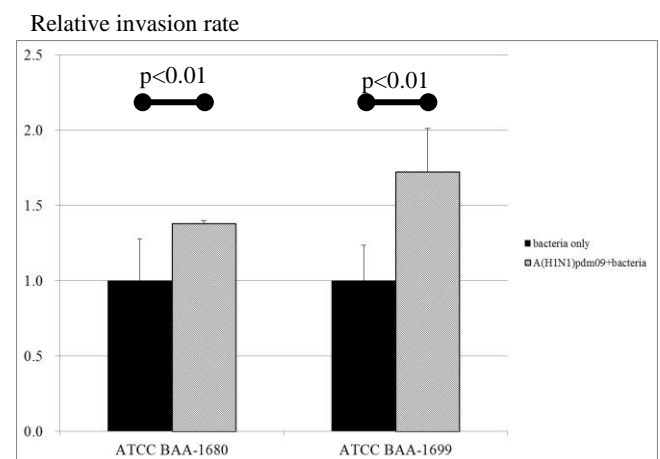
ATCC BAA-1680とATCC BAA-1699のMDCK細胞への侵入率は各々0.29 $\pm$ 0.15%、0.007 $\pm$ 0.002% (p<0.01)であった。



#### (3) 細胞内相対的侵入率の算出

ATCC BAA-1680単独とH1N1+ ATCC BAA-1680、ATCC BAA-1699単独とA(H1N1)pdm09 + ATCC BAA-1699の相対的侵入率は、各々1 $\pm$ 0.28と1.38 $\pm$ 0.02、1 $\pm$ 0.24と1.73 $\pm$ 0.29であった (p<0.01)。

検討の結果、ATCC BAA-1680の侵入性はATCC BAA-1699よりも高いこと、いずれもA(H1N1)pdm09の先行感染存在下で侵入率が増強していたことが判明した。



本研究により、A(H1N1)pdm09先行感染後のCA-MRSA感染のメカニズムを解明する上で、その一つとして侵入性がかかわることを示唆する重要な知見を得た。

## 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)

[学会発表] (計1件)

高山陽子, 矢野寿一, 遠藤史郎, 新井和明,  
石橋令臣, 金森 肇, 青柳哲史, 八田益充,  
山田充啓, 西巻雄司, 山本夏男, 北川美穂,  
國島広之, 平潟洋一, 賀来満夫: 市中感染型  
MRSA の気道上皮培養細胞への侵入性に関する  
検討. 第 58 回日本化学療法学会総会,  
2010.6.4, 長崎.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高山陽子 (TAKAYAMA YOKO)

北里大学・医学部・講師

研究者番号: 80286278

### (2) 研究分担者

矢野 寿一 (YANO HISAKAZU)

東北大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号: 20374944

新井 和明 (ARAI KAZUAKI)

東北大学・大学院医学系研究科・研究補佐

研究者番号: 30547386

平潟 洋一 (HIRAKATA YOICHI)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 50238341

### (3) 連携研究者

なし