

平成 26 年 6 月 22 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790427

研究課題名(和文)肺炎球菌による劇症型感染症の細菌学的解析

研究課題名(英文)Analysis of mechanism for causing fulminant infections of Streptococcus pneumoniae

研究代表者

常 彬(CHANG, BIN)

国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官

研究者番号：50370961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：本研究は劇症肺炎球菌感染症から分離された肺炎球菌の病原性を解明する目的で、非劇症感染症や上咽頭保菌由来同一の血清型と遺伝子型を示す肺炎球菌との比較研究を行った。ヒト末梢血由来好中球内での生存、血小板活性化の促進、マクロファージ系培養細胞のサイトカイン(IL-8、IL-6、IL-1)の分泌への影響を調べた結果、劇症感染症由来肺炎球菌と非劇症感染症由来肺炎球菌には明らかな違いが見られなかった。劇症型肺炎球菌感染症の発生メカニズムには、細菌側より、宿主側(ヒト)のファクターが重要である可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Streptococcus pneumoniae is a major etiologic agent of otitis media, pneumonia, sepsis, and meningitis. It is rare that the organism causes fulminant infections. During 1998 to 2013, a total of 22 sporadic fulminant pneumococcal infections were reported to us. In order to reveal the mechanism by which S. pneumoniae causes fulminant disease, pathogenicity of the bacteria was investigated. S. pneumoniae strains isolated from fulminant infections and other type of disease, which showed same serotypes and sequence types, were used to compare pathogenicity in vitro. Survival in human peripheral blood neutrophil, stimulation of platelet activation, effect on the induction of cytokine (IL-6, IL-8, IL-1 beta) of macrophage cell line THP-1 were investigated. But no significant difference between S. pneumoniae isolated from various types could be found. All of these results showed the possibility that the host factor(s) may be important for occurrence of overwhelming pneumococcal infection.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学(含真菌学)

キーワード：肺炎球菌 劇症型肺炎球菌感染症

### 1. 研究開始当初の背景

肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) は血液培地上で  $\alpha$  溶血性を示すグラム陽性球菌で、成人にも乳幼児にも、中耳炎、肺炎、菌血症/敗血症、髄膜炎などを引き起こす臨床重要細菌である。本菌の病原因子として、これまでに莢膜、付着因子、pneumolysin、proteinase などが報告されていた。そのうち、莢膜は食細胞による貪食から免れる役割を果たし、肺炎球菌感染が成立するためにもっとも重要な病原因子と考えられている。

肺炎球菌による感染症は有効な抗生物質の治療によって症状は改善する症例が多かった。しかし、近年肺炎など感染巣がなく突然に発症する、症状の進行が極めて急速で発症から 24 時間以内に死亡する劇症型感染症例が多く見られる。その発症メカニズムを説明するために、1. 劇症肺炎球菌の莢膜は特種で、宿主の好中球の貪食に抵抗する作用が強い、2. 薬剤耐性度が高いために難治であり重症化する、3. 宿主側要因として、脾臓摘出術後などリスクがある患者において、免疫力が低下したため、肺炎球菌感染症が迅速に広がり、劇症化するケースが多い、などの仮説が出されている。しかし、劇症型感染から分離された肺炎球菌には特定の血清型に属さず、莢膜を有しない肺炎球菌による症例もあること、約 70% の株はペニシリンに感受性であった。さらに、劇症型感染症例の中に、リスクがない健常人に突然発症したのもあったため、発症メカニズムには上記の仮説ではまだ説明できない部分が多く残され、劇症型感染を起こす本菌の感染経路および発症メカニズムは未解決であり、実態を説明することが求められている。そこで、申請者は劇症型感染症を引き起こす肺炎球菌の発症メカニズムの解析および重症化に関連する病原因子を、宿主-細菌相互作用の解析お

よび細菌の遺伝学的、生化学的解析から明らかにすることを目的として、本研究を始めた。

### 2. 研究の目的

劇症型感染症を引き起こした肺炎球菌の発症機構や肺炎球菌の病原性変化の分子基盤に係る病原因子について解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1). 劇症型肺炎球菌感染症の発症における宿主-細菌相互作用の解析：

劇症型肺炎球菌感染症由来肺炎球菌（以下、劇症型 SP と略す）およびそれらと同一の血清型と遺伝子型を示す非劇症由来肺炎球菌（以下、非劇症型 SP と略す）をヒト末梢血由来好中球に感染させ (MOI=0.01)、貪食に抵抗し、生存する菌数を調べて、好中球の貪食に抵抗する作用の違いがあるかどうかを比較した。

(2). 劇症型由来肺炎球菌感染症のヒト血小板の凝集作用：

劇症型 SP、特に電撃性紫斑病から分離された株およびそれらと同一の血清型と遺伝子型を示す非劇症型 SP のヒト血小板の凝集作用に違いがあるかどうかを調べた。

(3). 細菌学的解析：

劇症型 SP のゲノムを解読し、すでにゲノム情報が公開された肺炎球菌の配列と比較し、重症化する病原因子や外来遺伝子の有無を調べた。

(4). ヒト由来マクロファージ系培養細胞からのサイトカイン誘導に関する研究：

劇症型 SP およびそれらと同一の血清型と遺伝子型を示す非劇症型 SP をヒト由来マクロファージ系培養細胞 THP-1 に感染させ、

宿主細胞に由来するサイトカイン（IL-8、IL-6、IL-1 $\beta$ ）の分泌量を測定した。

#### 4. 研究成果

(1) 劇症型 SP およびそれらと同一の血清型と遺伝子型を示す非劇症型 SP を、ヒト末梢血由来好中球に感染させ、貪食に抵抗し、生存する菌数を調べた結果、好中球の貪食に抵抗する作用は劇症型 SP と非劇症型 SP の間に有意差がみられなかった。

(2) 劇症型肺炎球菌感染症、特に電撃性紫斑病は急激に皮膚の出血性壊死が進行する病態である。血小板の減少または過剰活性化は出血しやすくなる原因と考えられた。我々は劇症型 SP およびそれらと同一の血清型と遺伝子型を示す非劇症型 SP の、ヒト由来血小板を凝集する作用と活性化作用を調べた。その結果、劇症型 SP および非劇症型 SP の血小板の活性化作用には有意差はなかった。

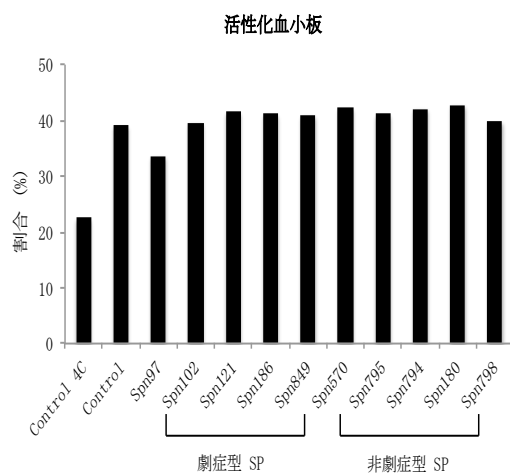


図 1. 肺炎球菌の血小板凝集作用の比較

(3) マクロファージに分化させたヒト由来培養細胞 THP-1 に肺炎球菌を感染させ、宿主細胞に由来するサイトカイン（IL-8、IL-6、IL-1 $\beta$ ）の分泌量を測定した。その結果、肺炎球菌は THP-1 細胞のこれらのサイトカイン

の分泌を誘導するが、劇症型 SP と非劇症型 SP の間に有意差はみられなかった。

(4) ゲノムの塩基配列の解読および比較解析を行った。同一の血清型と遺伝子型を示す電撃性紫斑病由来肺炎球菌と非劇症型 SP、各 2 株の全ゲノム塩基配列を決定した。これら配列情報とすでに公開されているリファレンス株のゲノム情報と比較し、電撃性紫斑病由来肺炎球菌だけが保有する遺伝子群の有無を検索した結果、突然変異はあったものの、電撃性紫斑病の発症に関連するような遺伝子群または外来遺伝子は見られなかった。

研究期間中、劇症型 SP およびそれらと同一の血清型と遺伝子型を示す非劇症型 SP の病原性の違いを見出す目的で、*in vitro* の解析を行ったが、有意差のあるポイントが見つけられなかった。劇症型肺炎球菌感染症の発生には、細菌側より、宿主側（ヒト）のファクターが重要である可能性が示唆された。

#### 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 5 件）

① Masahiro Ueno, Yoshikazu Ishii, Kazuhiro Tateda, Yoshiko Anahara, Akiko Ebata, Masaei Iida, Seiko Inamura, Kahori Takahata, Yoko Suzuki, Bin Chang, Akihito Wada, Minoru Sugita, Taichiro Tanaka, Yuji Nishiwaki. Prevalence and risk factors of nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in healthy children in Japan. Japanese Journal of Infectious Diseases. 査読有、66 巻、2013、pp. 22-25、[https://www.jstage.jst.go.jp/article/yoken/66/1/66\\_22/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/yoken/66/1/66_22/_pdf)

② Taketo Otsuka, Bin Chang, Takatoshi

Shirai, Atsushi Iwaya, Akihito Wada,  
Noboru Yamanaka, Minoru Okazaki, on behalf  
of the SADO-study Working group.

Individual risk factors associated with  
nasopharyngeal colonization with  
*Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus  
influenzae*: A Japanese birth cohort study.  
The Pediatric Infectious Disease Journal.  
査読有、32 巻、2013、pp. 709-714、  
DOI:10.1097/INF.0b013e31828701ea.

③ Junko Tanaka, Naruhiko Ishiwada,  
Akihito Wada, Bin Chang, Haruka Hishiki,  
Tomomichi Kurosaki, and Yoichi Kohno.  
Incidence of childhood pneumonia and  
serotype and sequence-type distribution  
in *Streptococcus pneumoniae* isolates in  
Japan. *Epidemiology and Infection*. 査読  
有、140 巻、2012、pp.1111-1121、  
DOI: 10.1017/S0950268811001592.

④ Tomohiro Oishi, Naruhiko Ishiwada,  
Kousaku Matsubara, Junichiro Nishi, Bin  
Chang, Kazuyo Tamura, Yukihiro Akeda,  
Toshiaki Ihara, Moon H. Nahm, Kazunori  
Oishi, the Japanese IPD Study Group. Low  
opsonic activity to the infecting serotype  
in pediatric patients with invasive  
pneumococcal disease. *Vaccine*. 査読有、  
31 巻、2013、pp.845-849、  
DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.11.010.

⑤ Taketo Otsuka, Bin Chang, Akihito Wada,  
and Minoru Okazaki. (The authors T. O. and  
B. C. contributed equally to this work).  
Molecular epidemiology and serogroup 6  
capsular gene evolution of pneumococcal  
carriage in a Japanese birth cohort study.  
*Journal of Medical Microbiology*. 査読有、  
62 巻、2013、pp.1868-1875、  
DOI: 10.1099/jmm.0.066316-0.

[学会発表] (計 1 件)

① 常彬、細矢光晃、石和田稔彦、大石智洋、  
小田慈、佐藤哲也、岡田賢司、西順一郎、安  
慶田英樹、大西真、庵原俊昭。小児用肺炎球  
菌結合型ワクチン PCV7 導入が小児侵襲性感  
染症へ及ぼす影響の細菌学的解析。第 87 回  
日本感染症学会学術講演会、第 61 回日本化  
学療法学会総会 合同学会、横浜、2013 年 6  
月。

[図書] (計 1 件)

① 常彬 他、科学評論社、解説 病原微生物  
肺炎球菌、2013、187

[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：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

常 彬 (Bin Chang)

国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官

研究者番号：50370961

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：