

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19583

研究課題名(和文)肺炎球菌の嫌気培養による病原性の変化の検討

研究課題名(英文) Effects of Aerobic vs. Anaerobic Culture on In-Vivo and In-Vivo Virulence of *Streptococcus pneumoniae*

研究代表者

長岡 健太郎 (Nagaoka, Kentaro)

北海道大学・大学病院・医員

研究者番号：20750962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、通性嫌気性菌である肺炎球菌の下気道における病原性が、嫌気培養により好気培養と比較してどのように変化するかを検証した。嫌気培養後の肺炎球菌はオートリシンの産生亢進がみられず、より長期に安定すること、好気培養による肺炎と同等以上の肺炎を起こすことが明らかになった。本研究は、通性嫌気性菌の嫌気環境と好気環境での病原性の違いを示した初めての研究となる。肺炎球菌のみならず、病原細菌の臨床・基礎研究などを考える上で有用な知見と考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined whether the culture condition of either aerobic or anaerobic might be influential to the virulence of *Streptococcus pneumoniae*, which is a facultative anaerobic bacterium. We here demonstrate that the virulence of *S. pneumoniae* is highly enhanced in vivo when pre-cultured under anaerobic condition compared with aerobic condition. This is the first report, which validated the difference of pathogenicity between aerobic and anaerobic condition. We consider that the results of our study is important for investigating the pathogenesis of facultative bacterium.

研究分野：呼吸器感染症

キーワード：肺炎球菌 肺炎 ニューモリシン 嫌気性菌

1. 研究開始当初の背景

肺炎は現在本邦の死亡原因の第3位とされ、特に高齢者で死亡頻度が高くなり、近年の本邦の高齢化に伴い、より重症な肺炎患者が増加することが懸念されている。肺炎球菌は全世界の市中気道感染における最も頻度の高い病原菌である。肺炎球菌感染のリスク因子としては、高齢、糖尿病、脾摘の既往、インフルエンザ後2次感染などが知られているが、肺炎の重症化や菌血症合併については未解明な部分が多い。

これまでの我々は、肺炎球菌の新たなリスク因子として、歯周病原菌の生成物の関与を指摘している。(Nagaoka et al. *Infect Immun.* 2014;82:587-93.) 一方、肺炎球菌を含めて、実際に肺炎を発症する病原菌の多くは、嫌気的環境下でも好気環境下でも発育が可能である通性嫌気性菌である。臨床上、肺内で嫌気的環境の形成が疑われるのは、画像上、誤嚥性肺炎、肺化膿症など、嫌気性菌の感染が疑われる画像所見を呈する際が多い。これまで肺炎球菌の病原性については好気培養を使用した検証がなされてきたが、嫌気培養による病原性の変化を検証することも必要と考えられた。

そこで、肺炎球菌を嫌気培養し、好気培養時との病原性の変化について、*in vitro/in vivo* について検証することとした。予備実験として、嫌気培養した肺炎球菌をマウスに経気管投与し、好気培養した肺炎球菌感染群との比較実験を行った。BALB/c マウス(n=3-5)に対し、表左欄に示す菌量調節をした肺炎球菌の菌液を投与し、生存率を観察した(菌液投与~168時間)。そうしたところ、嫌気培養した菌液を接種した群では、より少ない菌量でも感染が起きる現象がみられた。

表・肺炎球菌 好気培養 vs 嫌気培養 致死率

菌液(CFU/mL)	aerobic	anaerobic
10 ⁹	100%	100%
10 ⁸	100%	80%
10 ⁷	60%	100%
10 ⁶	0%	75%

肺炎球菌による経気管投与は繰り返し検証されたが、好気培養にて作成された菌量が10⁶ CFU/mLでは、マウスの死亡は確認されないため、上記予備実験の結果は、肺炎球菌は嫌気培養でより感染性が高まることを示唆するものと考えられた。

肺炎球菌は好気培養下では自己融解酵素を産生し、コロニーでは溶血が生じるのが特徴である。このため、肺炎球菌を24時間以上放置した場合、コロニーでの生菌は減少~消失する。一方、肺炎球菌を嫌気培養した際には、白色のコロニーを形成し、溶血、コロニ

一の融解の所見はみられない。また、24-48時間の経過においても、生菌数の減少はみられず、自己融解が起こっていることは考え難い。自己融解酵素には、肺炎球菌の感染に重要とされるニューモリシンが含まれるが、コロニー性状からは、嫌気培養ではニューモリシンの産生亢進は考え難い。

肺炎球菌は好気培養において自己融解酵素を産生し、そのうちの一つであるニューモリシンが肺炎球菌感染では重要と認識され、これまで様々な基礎研究が展開されてきた。これより、今回の研究で肺炎球菌の嫌気培養下に病原性が增強することが証明された場合、肺炎球菌の感染性の理解において、強いインパクトをもつ報告となると考えられた。

2. 研究の目的

肺炎球菌が嫌気培養、好気培養において以下の点でどういった相違があるかを検証する。

- (1) *In vitro* における肺炎球菌の増殖
- (2) *In vitro* における肺炎球菌の毒素発現
 - ① ニューモリシン(ply)、オートリシン(lytA)の mRNA
 - ② Ply の蛋白発現の継時的変化
- (3) *In vivo* (マウス肺炎モデル) における肺炎球菌の病原性
 - ① 生存率
 - ② 体内生菌数
 - ③ 肺、血液中の炎症性サイトカインの変化
 - ④ 肺内生菌中の毒素 mRNA の変化
 - ⑤ 肺内生菌中の ply 蛋白量の変化

3. 研究の方法

In vitro の研究として、肺炎球菌の増殖曲線、肺炎球菌の主要な毒素であるニューモリシンの蛋白発現量 (Western Blot (WB) 法にて検証)、およびニューモリシン、自己融解酵素 (オートリシン) 発現に関連する mRNA 発現量の経時的变化を比較検討した。*In vivo* の研究として、嫌気/好気培養した肺炎球菌をマウスに経気管投与し、肺炎モデルを作成し、病原性の相違について検証した。

- (1) *In vitro* における肺炎球菌の増殖

肺炎球菌の培養は以下のように行った。
好気培養：Brain Heart Infusion を使用し、振盪培養器を用いて振盪培養を行った。
嫌気培養：変法 GAM 培地を使用し、嫌気チャンバーを使用し、静置培養を行った。
各培養開始後、増殖曲線を確認し、培養開始~21 時間後までの菌数変化を定量培養にて検証した。
- (2) *In vitro* における肺炎球菌の毒素発現
 - ① ニューモリシン(ply)、オートリシン(lytA)の mRNA

肺炎球菌を各液体培養後、early log phase、late log phase、24 時間後に菌液より RNA 抽出を行った。RNA 抽出には NucleoSpin RNA (Takara) を使用した。その後、cDNA 合成し、gyrB、ply、lytA について、既報のプライマーを使用して SYBR Green を使用し、real time PCR にて各遺伝子発現の定量解析を行った。

② Ply の蛋白発現の継時的変化

肺炎球菌を各培養後、early log phase、late log phase、18 時間、21 時間後に菌液より蛋白抽出を行った。蛋白抽出には CellLytic B plus キット (Sigma Aldrich) を用いた。その後、Ply ポリクローナル抗体を使用し、Western Blot にて蛋白産生について解析を行った。

(3) In vivo (マウス肺炎モデル) における肺炎球菌の病原性

マウスは BALB/c マウス (♂、8 週齢) を使用した。肺炎球菌を好気培養、嫌気培養し、菌液を 2×10^8 CFU/mL に調整後、0.05mL/mouse を気管投与し、肺炎球菌肺炎モデルを作成。以下の項目について、好気培養群、嫌気培養群の比較検討を行った。

① 生存率

感染後、240 時間までの生存率を比較検討した。

② 体内生菌数

感染後、マウスを頸椎脱臼にて安楽死せしめ、血液・肺を採取。肺はホモジナイザーで処理、血液は右心穿刺にて採血後、定量培養を行った。

③ 肺、血液中の炎症性サイトカインの変化

感染後にえられた肺の、ホモジナイズ後の上清、および血清を使用。TNF- α 、MIP-2 について ELISA を行い、サイトカイン発現量を測定した。

④ 肺内生菌中の毒素 mRNA の変化

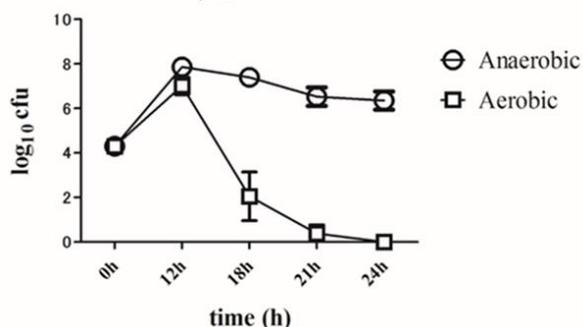
感染後にえられた肺をホモジナイズし、NucleoSpin を用いて RNA 抽出を行った。その後、cDNA 合成し、gyrB、ply、lytA について、既報のプライマーを使用して SYBR Green を使用し、real time PCR にて各遺伝子発現の定量解析を行った。

4. 研究成果

(1) In vitro における肺炎球菌の増殖

- ① 図 1 の通り、肺炎球菌は嫌気培養では 24 時間後にも生菌が残るのに対し、好気培養では培養後 15 時間を過ぎた後から生菌数が著減、21 時間後には生菌が得られなくなった。
- ② 肺炎球菌の好気培養、嫌気培養の菌増殖における viability の差を明らかにした。

図 1



(2) In vitro における肺炎球菌の毒素発現

① ニューモリシン(ply)、オートリシン (lytA) の mRNA

図 2 に示すように、肺炎球菌は好気培養群では培養 24 時間後に lytA が有意に亢進することに対し(図 2-1)、嫌気培養群では lytA の継時的な亢進はみられなかった。Ply については両群で、継時的に有意な増減はみられなかった(図 2-2)。

図 2-1

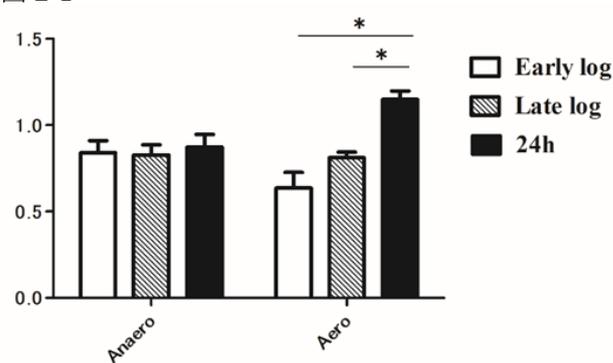
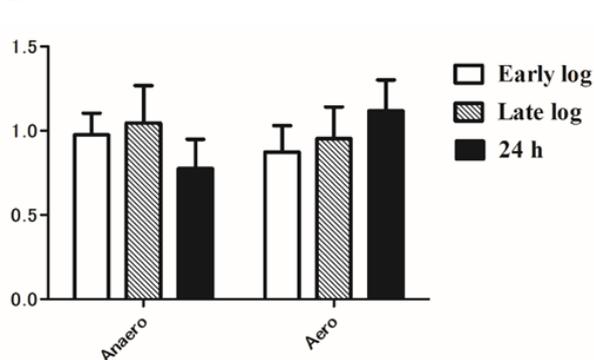


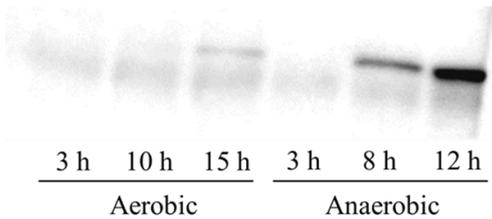
図 2-2



② Ply の蛋白発現の継時的変化

図 3 に示すように、嫌気培養群でも継時的なニューモリシン産生がみられた。これらの結果より、嫌気性菌は Ply を産生すること、lytA を保有するも、好気培養と比較し、lytA 産生の増加が少ないことが明らかになった。

図 3



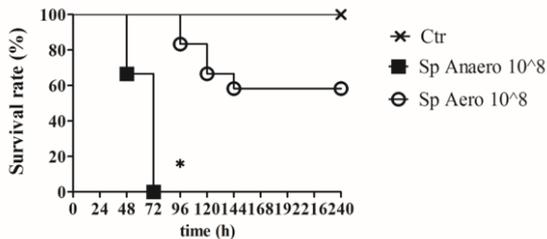
(3) In vivo (マウス肺炎モデル) における肺炎球菌の病原性

マウスモデルを使用した実験により、以下のことが明らかになった

- ・肺炎球菌は嫌気培養群で有意に生存率が増悪し(図 4)、肺内・血中生菌数も増加(図 5-1,2)、感染後の炎症性サイトカインが肺内、血中ともに増加することが明らかになった(図 6)。
- ・さらなる検証で、嫌気培養群では感染後に好気培養群と比較し、有意に Ply の発現が亢進することが明らかになった(図 7)。

① 生存率

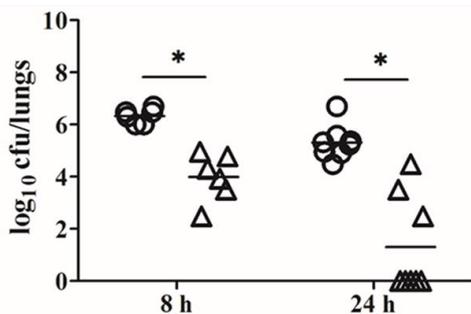
図 4



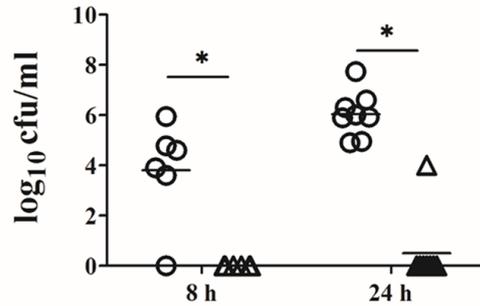
② 体内生菌数

図 5

5-1 (肺内生菌数 : ○嫌気培養、△好気培養)



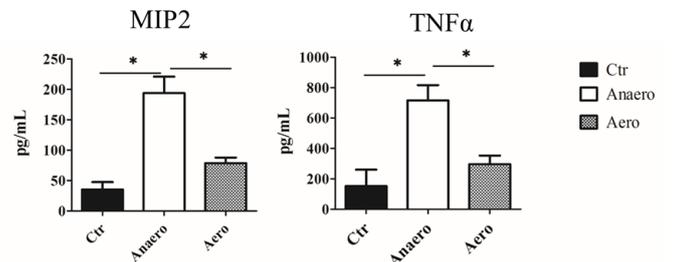
5-2 (血中生菌数 : ○嫌気培養、△好気培養)



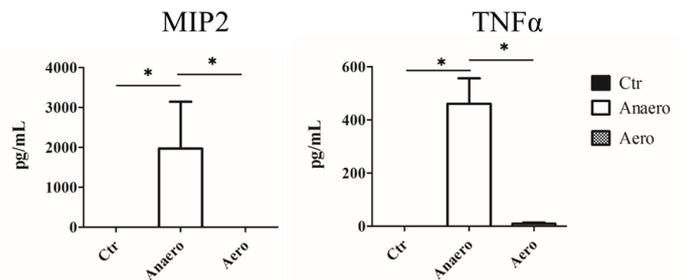
③ 肺、血液中の炎症性サイトカインの変化

図 6

(BALF at 12 h after inoculum)

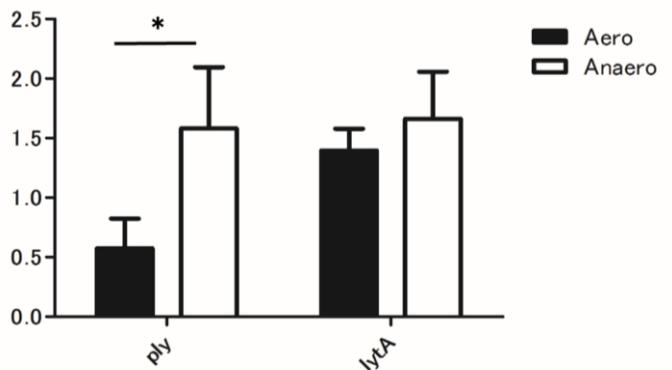


(Blood taken at 36 h after inoculum)



④ 肺内生菌中の毒素 mRNA の変化

図 7



(研究成果：総括)

肺炎球菌は嫌気培養により、好気培養時と比較して、より長期に viable な状態が保たれることが明らかになった。今回、我々はニューモリシン、オートリシンの二つの主要な毒素について嫌気培養が与える影響を検証したが、嫌気培養では長時間の培養後もオートリシンの mRNA 産生亢進がみられない結果となり、長時間嫌気培養で生菌状態が保持される機序の一つと考えられた。

今回の我々の検証では、肺炎球菌の増殖曲線を確認し、early log phase、late log phase ごとの各培養間の病原性の違いをみた。肺炎球菌肺炎モデルにおいて、嫌気培養では late log phase で感染が成立した。一方、好気培養では late log phase での感染性は乏しく、early log phase での菌液投与で嫌気培養の late log 相当の感染性がみられた。

これらから肺炎球菌肺炎においては、感染時の肺炎球菌の viability がより重要と考えられた。一方、嫌気培養後の肺炎球菌感染については、感染後のニューモリシン mRNA が好気培養後の肺炎球菌感染と比較して亢進することが示された。この結果については、肺炎球菌感染後の菌増殖の時期が異なることを反映している可能性が考えられた。いずれにしても、長期に菌の viability が保たれること、ニューモリシン産生が保たれること、好気培養と比較してニューモリシンの産生亢進する可能性があることなどから、嫌気的環境では肺炎球菌の病原性は好気的環境よりも亢進する可能性が示唆された。

実際の臨床では、肺炎球菌感染は血流豊富な環境でおきるため、好気的環境での病原性が観察されているものと考えられる。肺炎球菌感染が嫌気的環境で起きるケースとしては、副鼻腔炎、髄膜炎などがあがる。今回、我々の研究では、肺炎球菌を嫌気培養しても血流感染の頻度は保たれており、侵襲性は減弱しないことが明らかになった。肺炎球菌は化膿性肺炎、膿胸などの嫌気的環境での感染を発症することは稀である。この理由として、嫌気的環境で肺炎球菌がある程度増殖すると肺では早期に血流感染を発症し、感染が顕在化するため、化膿性肺炎、膿胸にまで至る頻度が少ないものと推察された。

本研究は、通性嫌気性菌の好気環境、嫌気環境での病原性の違いを示した初めての研究となる。肺炎球菌のみならず、病原細菌の臨床・基礎研究などを考える上で有用な知見と考えられた。

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 0 件)
今後、学術誌へ投稿予定

[学会発表] (計 2 件)

① Nagaoka, K., Effects of Aerobic vs. Anaerobic Culture on In-Vivo and In-Vivo Virulence of Streptococcus pneumoniae, ASM Microbe 2016, 2016.6.16-2016.6.20, Boston Convention & Exhibition Center (Boston, USA)

② 長岡健太郎、今野哲、西村正治、肺炎球菌下気道感染における嫌気培養による病的影響の検討、日本感染症学会、2016年4月16日、仙台国際センター(宮城県仙台市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長岡 健太郎 (NAGAOKA KENTARO)
北海道大学・北海道大学病院・医員
研究者番号：20750962

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

研究者番号：

(4) 研究協力者

今野 哲 (KONNO SATOSHI)
北海道大学・北海道大学病院・准教授
研究者番号：20399835

西村 正治 (NISHIMURA MASAHARU)
北海道大学・北海道大学病院・教授
研究者番号：00208224