

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K10034

研究課題名(和文) ウェルシュ菌敗血症における致死的血管内溶血機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of lethal intravascular hemolysis mechanism in *Clostridium perfringens* sepsis

研究代表者

須崎 愛 (SUZAKI, Ai)

日本大学・医学部・兼任講師

研究者番号：90251454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ウェルシュ菌による広範な血管内溶血性敗血症の主要病原因子を解明する目的で、溶血を伴う敗血症患者から分離した血液由来株(H群)と伴わない患者から得た株の2群間で生物学的特徴を比較検討した。ヒト赤血球に対する溶血作用はH群菌の培養上清で有意に高い事が明らかになった。この溶血作用は上清中の毒素量と有意な相関関係を示した。また、毒素は、ヒト末梢血単核細胞障害作用、IL-6・IL-8産生量との間にも有意な相関関係を示した。さらに毒素はTNF- $\alpha$ 、IL-5、IL-6、IL-8の産生を毒素より強く誘導した。これらの結果から、毒素がこの致死的な溶血性敗血症の主要病原因子の一つであると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウェルシュ菌による敗血症のうち広範な血管内溶血を伴う症例は、頻度は少ないものの予後が非常に悪く、現在でも致死的な疾患である。しかしその稀少性と極めて電撃的な経過をとるため生前診断が困難で、病原因子については長い間不明のままであった。また平均在院時間が8時間と極めて短時間であることから、現在の抗菌薬の治療では救命が極めて困難であることも知られている。今回この病態の主要病原因子の一つとして、毒素の関与が明らかになった。今後他のClostridium属の治療と同様、抗菌薬以外にトキシイドを使用するなど、新たな治療法の開発に寄与できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism of massive intravascular hemolysis (MIH) in *Clostridium perfringens* sepsis, biological characteristics were compared in two groups: blood-derived strains from patients with MIH (group H) and those from patients without MIH. The culture supernatant of group H have significantly higher hemolytic activity on human erythrocytes. Hemolytic effects were correlated with  $\alpha$ -toxin levels in culture supernatant of clinical isolates.  $\alpha$ -toxin also showed a significant correlation with cytotoxicity in human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and IL-6 and IL-8 production from human PBMCs. Furthermore,  $\alpha$ -toxin induced production of TNF- $\alpha$ , IL-5, IL-6, and IL-8 more strongly than  $\beta$ -toxin. These results suggest that  $\alpha$ -toxin is one of the major virulence factors of lethal sepsis with MIH.

研究分野：感染症内科

キーワード：ウェルシュ菌 敗血症 血管内溶血 溶血毒 トキシン サイトカイン 急性呼吸窮迫症候群

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) は、破傷風菌と同じクロストリジウム属の芽胞形成性偏性嫌気性菌 (Gram 陽性桿菌) で、ヒトや動物の腸管内や土壌などの自然界に広く分布し、ヒトを含む動物に対して強い病原性を持つ。ウェルシュ菌は主要毒素  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\iota$ -毒素、エンテロトキシン、壊死性腸炎毒素の6大毒素の産生性により、A、B、C、D、E、F、Gの7タイプに分類されるが、ヒトから分離される菌の殆どはA型とF型である。A型は、 $\alpha$ -毒素のみを産生し、ガス壊疽、肝胆道感染、敗血症を引き起こし、F型は $\alpha$ -毒素とエンテロトキシンを産生し、食中毒や非食中毒性の下痢を引き起こす。ウェルシュ菌による敗血症は、ガス壊疽や食中毒に比べて頻度は低いが致死率の高い疾患である。特にこの菌による広範な血管内溶血 (MIH) を生じた敗血症患者の場合、平均在院時間 8 時間という極めて電撃的な経過をとるため生前診断は困難で、死亡率は 74~80%という現在でも致死的な疾患である。しかし、広範な血管内溶血を呈す敗血症については、その稀少性と急速な進行のために詳細な病態は依然として不明で、症例報告も殆どが一例報告で、起因菌もA型菌という以外は判っていない。これはウェルシュ菌感染症について、標準株、ヒト食中毒・ガス壊疽由来株、動物腸管由来株などでは様々の検討がなされているにもかかわらず、血管内溶血性敗血症例は頻度が低く、培養検査が陽性になる以前に患者が死亡するため認知度が低いことも、症例の集積・解析が進まない要因の一つである。つまり現在でも致死的な疾患である血管内溶血性敗血症の病態に、ウェルシュ菌が産生する 20 以上の毒素・酵素のうちどれが主要病原因子であるかは、いまだ不明のままである。

### 2. 研究の目的

我々はウェルシュ菌による広範な血管内溶血性敗血症の主要病原因子と病態を解明する目的で、敗血症患者から分離した血液由来の臨床分離株を、MIHを伴う患者から分離した株 (H群) と伴わない患者から分離した株 (NH群) に分け、2群間で生物学的特徴を比較検討することにより、1) ヒト血管内溶血性敗血症を生じる溶血毒を同定し、2) 溶血性敗血症における溶血毒の病態形成機序の検討を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) ウェルシュ菌が産生する多種類の毒素・酵素の産生性の検討

臨床分離株を嫌気培養後、DNAを抽出し、既知の病原性関連遺伝子 ( $\alpha$ 毒素、 $\theta$ 毒素、 $\kappa$ 毒素、ヒアルロニダーゼ遺伝子等) や病原性関連調節遺伝子 (二成分制御系 *virR/virS* 遺伝子や VR-RNA) の遺伝子レパートリーを解析し、血管内溶血株 (H群) と非溶血株 (NH群) 間で比較検討した。

#### (2) ヒト赤血球に対する溶血反応

健康なボランティアからインフォームド・コンセント後に提供された 40%ヒト洗浄赤血球液に、臨床分離株の培養上清を加え、60 分後の溶血率を両群間で比較した。この研究は日本大学病院倫理委員会の承認を得て行った。

#### (3) 臨床分離株培養上清中の $\alpha$ 毒素 (PCA) と $\theta$ 毒素 (PF0) の測定

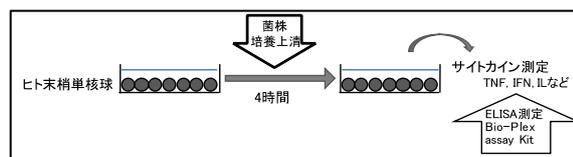
菌株培養上清中の  $\alpha$  毒素は、ELISA 法で、 $\theta$  毒素はウエスタンブロット法で測定した。

#### (4) ヒト末梢単核球への細胞障害作用

健康なボランティアからインフォームド・コンセント後に提供されたヒト末梢単核球に、臨床分離株の培養上清を加え、4 時間後の障害細胞数を測定した。この研究は日本大学医学部倫理委員会の承認を得て行った。

#### (5) ヒト末梢単核球からの炎症性サイトカイン産生量

臨床分離株の培養上清を加えることにより、ヒト末梢単核球から産生される炎症性サイトカイン量を、ELISA 法と Bio-Plex Pro human cytokine assay kit で測定し、両群間で比較した。



#### (6) ウェルシュ菌による MIH 敗血症患者の臨床像の解析

MIH 敗血症患者の病態を解明する目的で、MIH を発症した敗血症患者 6 名と MIH を生じない患者 54 名の医療データをレトロスペクティブに分析し、比較検討した。

#### 4. 研究成果

(1) ウェルシュ菌の増殖速度、病原性関連遺伝子

ウェルシュ菌の増殖速度や、既知の病原性関連遺伝子・病原性関連調節遺伝子の発現を両群間で比較したが、差異を認めなかった。

(2) ヒト赤血球に対する溶血反応

臨床分離株培養上清のヒト洗浄赤血球液に対する溶血率は、H群で有意に高かった (H群  $12.2 \pm 5.4\%$  vs. NH群  $4.4 \pm 3.2\%$ ,  $p < 0.05$ ) (図 1-A, B)。

(3) 分離株培養上清中の $\alpha$ 毒素 (PCA) と $\theta$ 毒素 (PFO) 産生量

菌株培養上清中の $\alpha$ 毒素産生量は、両群間で差異を認めなかった (図 1-C, D)。 $\theta$ 毒素産生量はH群で多い傾向にあり (図 1-E)、菌株培養上清によるヒト赤血球溶血率は $\theta$ 毒素産生量と有意な相関を認めた ( $r = 0.91$ ,  $p < 0.001$ ) (図 1-F)。

(4) 分離株培養上清のヒト末梢単核球障害作用  
ヒト末梢単核球障害性はH群に強い傾向があり、細胞障害作用は $\theta$ 毒素産生量と有意な相関を認めた ( $r = 0.96$ ,  $p < 0.001$ )。

(5) 分離株培養上清がヒト末梢単核球から誘導するIL-6・IL-8産生量

H群の菌株培養上清が誘導するIL-6とIL-8産生量は、NH群と比較して有意に多かった (IL-6: H群  $636.9 \pm 429.0\%$  vs. NH群  $331.4 \pm 196.6\%$ ,  $p < 0.01$ ; IL-8: H群  $310.1 \pm 122.0\%$  vs. NH群  $210.2 \pm 89.1\%$ ,  $p < 0.01$ ) (図 2-A, B)。また菌株培養上清中の $\theta$ 毒素量とIL-6・IL-8産生量との間に、相関を認めたが (IL-6:  $r = 0.84$ ,  $p = 0.002$ ; IL-8:  $r = 0.96$ ,  $p < 0.001$ ) (図 2-C, D)、 $\alpha$ 毒素量とIL-6・IL-8産生量には相関を認めなかった (図 2-E, F)。

(6) ウェルシュ菌毒素がヒト末梢単核球から誘導する炎症性サイトカイン量の解析

$\theta$ 毒素は $\alpha$ 毒素と比べ、ヒト末梢単核球からTNF- $\alpha$ 、IL-5、IL-6、IL-8の産生を有意差を持って強く誘導した。

(7) ウェルシュ菌によるMIH敗血症患者の臨床像の特徴

MIHを発症した患者はMIHを発症しない患者と比較して、発症時に激痛、意識障害、ショック、血尿、代謝性アシドーシス、ガス像産生の割合が有意差を持って高く、急速に進行する急性呼吸窮迫症候群により入院後26時間以内に全例死亡した。MIHを発症した患者血清は、強い溶血のため血中サイトカイン濃度の測定は現実には困難だが、上記臨床像からMIH敗血症患者体内ではMIHを発症しない患者と比較して明らかに強いサイトカインストーム状態にあると考えられた。

$\theta$ 毒素はヒト赤血球に対して強力な溶血作用を呈し、ヒト末梢単核球に対しては細胞障害作用と炎症性サイトカインの産生を強く誘導した。 $\theta$ 毒素はウェルシュ菌による広範な血管内溶血性敗血症の主要病原因子の一つと考えられ、 $\theta$ 毒素による強力な炎症性サイトカイン産生作用が、この致死的な敗血症の急激な進行に影響を及ぼしていることが示唆された。

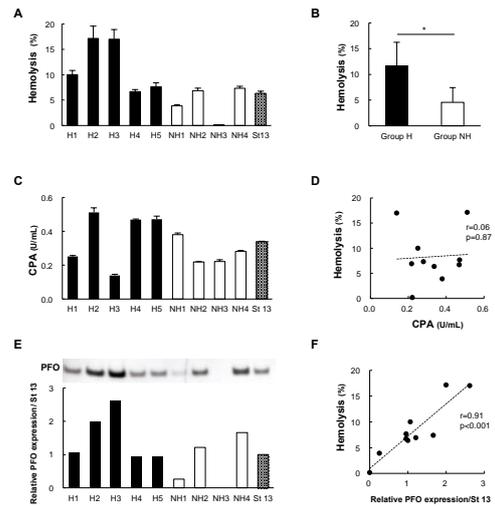


図1 分離株培養上清中の溶血作用と $\alpha$ ・ $\theta$ 毒素産生量

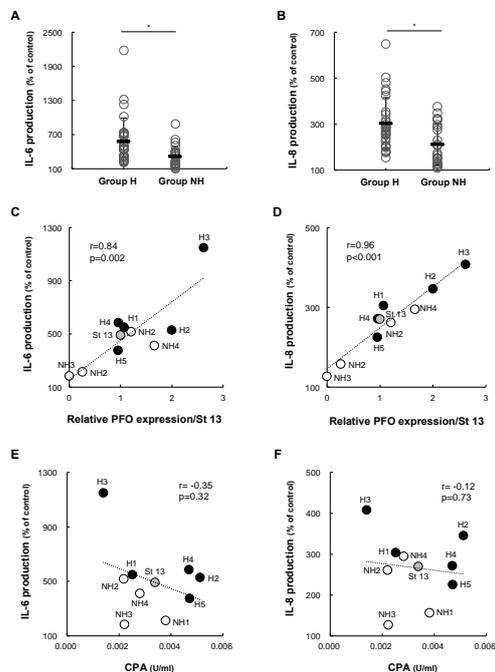


図2 分離株培養上清中で誘導されるIL-6・IL-8産生量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ai Suzaki, Kaori Ohtani, Shihoko Komine-Aizawa, Asami Matsumoto, Shigeru Kamiya, Satoshi Hayakawa	4. 巻 12
2. 論文標題 Pathogenic characterization of Clostridium perfringens strains isolated from patients with sepsis associated with massive intravascular hemolysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2021.713509	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ai Suzaki, Shihoko Komine-Aizawa, Hiroyuki Nishiyama, Satoshi Hayakawa	4. 巻 -
2. 論文標題 Massive intravascular hemolysis is an important factor in Clostridium perfringens-induced bacteremia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Internal and Emergency Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 須崎 愛, 赤羽目翔悟, 下口和雄, 西山宏幸
2. 発表標題 ウェルシュ菌(Clostridium perfringens)菌血症20症例の臨床的検討
3. 学会等名 第93回日本感染症学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	早川 智  (HAYAKAWA Satoshi)  (30238084)	日本大学・医学部・教授    (32665)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	相澤 志保子  (AIZAWA Shihoko)  (30513858)	日本大学・医学部・准教授    (32665)	
研究分担者	TRINH DUYQUANG  (TRINH DuyQuang)  (90647190)	日本大学・医学部・助教    (32665)	
研究分担者	神谷 茂  (KAMIYA Shigeru)  (10177587)	杏林大学・医学部・特任教授    (32610)	
研究分担者	大谷 郁  (OHTANI Kaori)  (30377410)	東海大学・医学部・准教授    (32644)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関