

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02905

研究課題名(和文) 緑膿菌病原性抗原の血清抗体価大規模疫学調査と抗緑膿菌ガンマグロブリン製剤試作

研究課題名(英文) An epidemiological investigation of serum titers of anti-Pseudomonas aeruginosa virulent antigens and a trial of a specific anti-Pseudomonas gamma-globulin product

研究代表者

佐和 貞治 (Sawa, Teiji)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10206013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：緑膿菌による肺炎は、抗菌剤以外に未だ有効な治療法は無く、多剤耐性化が加わって治療に難渋する。抗緑膿菌ワクチン・抗体療法の開発に取り組む中で、緑膿菌毒素分泌システムに対する高力価のガンマグロブリン製剤を試作し、その抗緑膿菌作用について動物緑膿菌性肺炎モデルにて検証した。その結果、緑膿菌だけでなく、他のグラム陰性菌の型分布蛋白に対する抗体価も存在が同定でき、交差抗原性や自然感染による抗体価の上昇等が関わっている可能性が推測された。病原性グラム陰性菌の毒素分泌システムに高力価を示すガンマグロブリン製剤の開発が、多剤耐性菌感染に対する治療薬として効果を発揮する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化社会進行や医療高度化に伴い、致死的な細菌性肺炎が増加している。中でも日和見感染菌として代表的な緑膿菌による肺炎は、抗菌剤以外に未だ有効な治療法は無く、多剤耐性化が加わって治療に難渋する。申請者は、抗緑膿菌ワクチン・抗体療法の開発に取り組む中で、ヒトの血液中のガンマグロブリンには、緑膿菌毒素分泌システムを阻害できる抗体分画が多く含まれていることを発見した。このことから、今回の研究成果では、ヒト血清由来のガンマグロブリンが持つ抗緑膿菌作用について動物緑膿菌性肺炎モデルにて検証し、緑膿菌肺炎治療に有効な特殊ガンマグロブリン製剤の開発につながられる結果を示した。

研究成果の概要(英文)：Pneumonia caused by Pseudomonas aeruginosa has no effective treatment other than antibacterial agents, and it is difficult to treat it due to the addition of multidrug resistance. While working on the development of the anti-Pseudomonas aeruginosa vaccine and antibody therapy, we prototyped a high-potency gamma globulin preparation for the Pseudomonas aeruginosa toxin secretion system and verified its anti-P. aeruginosa action using an animal P. aeruginosa pneumonia model. As a result, the existence of antibody titers against not only P. aeruginosa but also other bacterial type III secretion proteins could be identified, and it is speculated that cross-antigenicity and natural infection may be involved. It has been shown that the development of a gamma globulin preparation leading to a high titer in the toxin secretion system of pathogenic Gram-negative bacteria may be effective as a therapeutic drug for infection with multidrug-resistant bacteria.

研究分野：集中治療医学

キーワード：緑膿菌 肺炎 多剤耐性菌 ガンマグロブリン 型分泌システム 受動免疫 PcrV 急性肺傷害

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会進行や医療高度化に伴い、致死的な細菌性肺炎が増加している。中でも日和見感染菌として代表的な緑膿菌による肺炎は、抗菌剤以外に未だ有効な治療法は無く、多剤耐性化が加わって治療に難渋する。申請者は、抗緑膿菌ワクチン・抗体療法の開発に取り組む中で、一部高齢者の血液中のガンマグロブリンには、緑膿菌毒素分泌システムを阻害できる抗体分画が多く含まれていることを発見した。このことは、血漿からのガンマグロブリン精製過程において、献血者年齢や測定抗体価等を指標にして分別精製することで、緑膿菌感染に対する高力価グロブリン製剤開発が可能であることを示唆している。そこで、緑膿菌抗原に対する血清抗体価について大規模疫学調査を実施し、血液供与者年齢や血液抗体価での分別精製を行ったガンマグロブリン製剤を試作し、その抗緑膿菌作用について動物緑膿菌性肺炎モデルにて検証し、緑膿菌肺炎治療に有効な特殊ガンマグロブリン製剤の開発につなげる。

2. 研究の目的

細菌感染に有効なモノクローナル抗体医薬品は、最近認可を受けた破傷風毒素に対するものを除いて、未だ無い。加えて、緑膿菌に対するワクチン療法開発は、依然困難な道途中にある。一方で、人類は未曾有の高齢化社会に突入し、また細菌は年々多剤耐性化してきている。抗菌剤だけに頼らない新しい細菌感染に対する予防・治療法の開発は人類にとって喫緊の課題である。本研究は、ヒト緑膿菌肺炎治療に有効な非抗菌剤治療の開発として、特殊ガンマグロブリン製剤の開発につなげることである。通常、抗破傷風や抗 B 型肝炎ウイルス等の数少ない特殊ガンマグロブリン製剤の精製には、選定された特定の血液ドナーに対する事前のワクチン投与と、供与血液からのグロブリン分画の抽出が必要である。本邦では日本赤十字社による既存の献血システムによる血液供与由来の血漿成分を原資として、各製薬会社がグロブリン分画を抽出して非特異的ガンマグロブリン製剤を生産している。抗 PcrV 抗体価に関する我々の小規模疫学調査において、測定抗体価には個体により 10 倍以上の開きがあり、高齢者に高い傾向が認められた。加えて、国内ガンマグロブリン製剤が海外製よりも抗 PcrV 抗体価が高い傾向にあった。その理由としておそらく日本の幅広い年齢層と低いリピーター献血率を保つ献血システムに由来している可能性がある。超高齢化社会を迎える本邦においても、今後、益々少子高齢化の中で健康な高齢者からも献血が期待されるなかで、年齢、あるいは事前の特定の抗体価測定による原資血漿製剤の選別だけを行うことだけで、特定の病原体、もしくは特定の範囲内に含まれる病原体に対する高力価のガンマグロブリン製剤の精製が可能である可能性を秘めており、この仮説を検証することにある。

3. 研究の方法

本研究では、ヒトを対象とした大規模の抗緑膿菌抗体価体の疫学調査と少量の供与血液からのガンマグロブリン分画抽出による年齢層分別(あるいは抗体価分別)の混合ガンマグロブリン製剤の精製を行う。手術を受ける患者にボランティア協力を依頼し、少量(1mL 程度)の血液を供与頂き、その血漿成分(約 0.5mL)における各種緑膿菌病原性抗原に対する抗体価を測定する。続いて、血漿よりガンマグロブリン分画を抽出する。抽出したガンマグロブリンは、マウス緑膿菌肺感染モデルにおいて、受動免疫もしくは IVIG での治療効果を判定する。結果に応じて実際の献血由来の原資血漿の効率的な分別法を見出して臨床応用につなげる。

1. ボランティアからの血漿サンプル採取:

京都府立医科大学附属病院にて全身麻酔管理を受ける 20 歳以上の患者に協力を頂き、全身麻酔管理に必要な気管挿管前後の動脈血ガス分析検査の採血時(通常 2 mL)に約 1 mL の追加採取の血液を供与して頂く。20~49 歳 20%、50~69 歳 50%、70 歳以上 30% の比率を目標とする。集めた個々の血液 1 mL より、遠心分離で血漿成分約 0.5mL を冷凍保存する。

2. 遺伝子組換え緑膿菌抗原の精製:

血清抗体価測定に必要な主要病原性

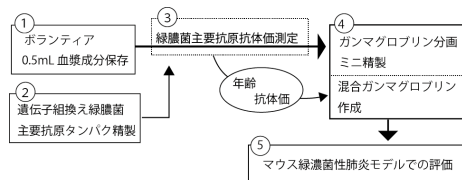


図. 研究計画フロー図

6 抗原 (PcrV, OprF, a-type & b-type flagellin, exotoxin A, elastase) については、既に遺伝子組換えタンパク精製を行っている PcrV と OprF に加えて、a & b 型 flagellin, exotoxin A, elastase に対しても同様に遺伝子クローニングを行い、タンパクベクター作成を通じて、遺伝子組み換えタンパクを精製する。遺伝子配列から抗原の coding region を増幅させるための特異的プライマーを作成して、細菌ゲノム DNA をテンプレートに PCR 法により目的遺伝子

を増幅させる。PCR により増幅した遺伝子をタンパク発現ベクターに移し、タンパクを大腸菌に発現させて Immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) タンパク吸着カラム、エンドトキシン除去等のプロセスを経て、ELISA 抗原用に精製する。

3. 血清抗緑膿菌主要抗原抗体価の測定:

採取した血漿サンプルがまとまった段階で PcrV 抗原を含む各種緑膿菌主要病原性 6 抗原 (PcrV, OprF, a & b 型 flagellin, exotoxin A, elastase) に対する血清抗体価を ELISA 法にて測定する。

4. ガンマグロブリン分画のミニカラム精製と分別混合製剤の作成:

冷凍保存した個々の血漿より、アフィニティーカラムを用いて、ガンマグロブリン分画を精製する。年齢と抗体価から分別・混合比率を考慮し混合ガンマグロブリン製剤を作成する。

5. マウス緑膿菌性肺炎モデルでのガンマグロブリンの予防・治療効果判定:

マウスのシクロフォスファミド(CPM)による免疫不全状態の誘導、肺への致死量の緑膿菌感染は、以前の報告 (Sawa T, et al. Nat Med 5:392, 1999; Moriyama K, Sawa T, et al. Microbiol Immunol 53:587, 2009) に準拠して行う。CD1 マウス(週齢 12 週)を用いて、感染実験前に CPM を腹腔内投与して顆粒球減少症を誘導する。感染実験は致死量の緑膿菌株(PA103 株もしくは臨床分離株 PA08)を短時間の吸入麻酔下に肺内に投与して肺炎を誘導する。感染前後でのガンマグロブリン投与の効果をコントロール群と比較して行う(比較各群 10 匹、全 18 群のマウスで検討する)。

4. 研究成果

緑膿菌による肺炎は、抗菌剤以外に未だ有効な治療法は無く、多剤耐性化が加わって治療に難渋する。抗緑膿菌ワクチン・抗体療法の開発に取り組む中で、緑膿菌毒素分泌システムに対する高力価のガンマグロブリン製剤を試作し、その抗緑膿菌作用について動物緑膿菌性肺炎モデルにて検証した。その結果、緑膿菌だけでなく、他のグラム陰性菌の型分布蛋白に対する抗体価も存在が同定でき、交差抗原性や自然感染による抗体価の上昇等が関わっている可能性が推測された。病原性グラム陰性菌の毒素分泌システムに高力価を示すガンマグロブリン製剤の開発が、多剤耐性菌感染に対する治療薬として効果を発揮する可能性が示された。

高齢化社会進行や医療高度化に伴い、致死的な細菌性肺炎が増加している。中でも日和見感染菌として代表的な緑膿菌による肺炎は、抗菌剤以外に未だ有効な治療法は無く、多剤耐性化が加わって治療に難渋する。申請者は、抗緑膿菌ワクチン・抗体療法の開発に取り組む中で、ヒトの血液中のガンマグロブリンには、緑膿菌毒素分泌システムを阻害できる抗体分画が多く含まれていることを発見した。このことから、今回の研究成果では、ヒト血清由来のガンマグロブリンが持つ抗緑膿菌作用について動物緑膿菌性肺炎モデルにて検証し、緑膿菌肺炎治療に有効な特殊ガンマグロブリン製剤の開発につなげられる結果を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 10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 Mihara T, Kimura T, Momiyama K, Kainuma A, Akiyama K, Ohara J, Inoue K, Kinoshita M, Shimizu M, Moriyama K, Fujita N, Sawa T.	4. 巻 26
2. 論文標題 Secondary in-hospital epidemiological investigation after an outbreak of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ST357.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Infect Chemother	6. 最初と最後の頁 257-265
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jiac.2019.09.014	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 -
1. 著者名 Sawa T, Kinoshita M, Inoue K, Ohara J, Moriyama K.	4. 巻 8
2. 論文標題 Immunoglobulin for Treating Bacterial Infections: One More Mechanism of Action. Development of Therapeutic Antibodies against Toxins and Pathogens.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Antibodies	6. 最初と最後の頁 52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/antib8040052	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 -
1. 著者名 Sawa T, Kooguchi K, Moriyama K.	4. 巻 28
2. 論文標題 Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Intensive Care	6. 最初と最後の頁 13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40560-020-0429-6. eCollection 2020.	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 -
1. 著者名 Sawa T, Momiyama K, Mihara T, Kainuma A, Kinoshita M, Moriyama K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Molecular epidemiology of clinically high-risk <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strains: Practical overview.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiol Immunol.	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.12776.	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 -

1. 著者名 三原聡仁, 甲斐沼篤, 初山恭子, 小原潤也, 井上敬太, 木下真央, 清水優, 木村武史, 佐和貞治.	4. 巻 53
2. 論文標題 当院で分離された薬剤耐性緑膿菌株にけるclass 1 integron遺伝子解析	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 第53回緑膿菌感染症研究会公演記録	6. 最初と最後の頁 55-57
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 無
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 -

1. 著者名 Naito Y, Hamaoka S, Kinoshita M, Kainuma A, Shimizu M, Katoh H, Moriyama K, Ishii KJ, Sawa T.	4. 巻 62
2. 論文標題 The protective effects of nasal PcrV-CpG oligonucleotide vaccination against <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pneumonia.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microbiol Immunol	6. 最初と最後の頁 774-785
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12658.	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 -

1. 著者名 Kainuma A, Momiyama K, Kimura T, Akiyama K, Inoue K, Naito Y, Kinoshita M, Shimizu M, Kato H, Shime N, Fujita N, Sawa T.	4. 巻 24
2. 論文標題 An outbreak of fluoroquinolone-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ST357 harboring the <i>exoU</i> gene.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Infect Chemother	6. 最初と最後の頁 615-622
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2018.03.008.	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 -

1. 著者名 Araki R, Hayashi K, Sawa T.	4. 巻 128
2. 論文標題 Dopamine D2-receptor Antagonist Droperidol Deepens Sevoflurane Anesthesia. <i>Anesthesiology</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 <i>Anesthesiology</i>	6. 最初と最後の頁 754-763
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/ALN.0000000000002046.	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 -

1. 著者名 Aoyama T, Kunisawa S, Fushimi K, Sawa T, Imanaka Y.	4. 巻 13
2. 論文標題 Comparison of surgical and conservative treatment outcomes for type a aortic dissection in elderly patients.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Cardiothorac Surg	6. 最初と最後の頁 129-129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13019-018-0814-6.PMID: 30563552.	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 -

1. 著者名 Nakatsuka Y, Vandebon A, Mino T, Yoshinaga M, Uehata T, Cui X, Sato A, Tsujimura T, Suzuki Y, Sato A, Handa T, Chin K, Sawa T, Hirai T, Takeuchi O.	4. 巻 11
2. 論文標題 Pulmonary Regnase-1 orchestrates the interplay of epithelium and adaptive immune systems to protect against pneumonia. Pulmonary regnase-1 orchestrates the interplay of epithelium and adaptive immune systems to protect against pneumonia.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mucosal Immunol	6. 最初と最後の頁 203-1218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41385-018-0024-5.	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 -

1. 著者名 内藤慶史、佐和貞治.	4. 巻 264
2. 論文標題 多剤耐性緑膿菌に対する免疫療法.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 444-449
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 無
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 -

1. 著者名 Kinoshita M, Shimizu M, Akiyama K, Kato H, Moriyama K, Sawa T.	4. 巻 15
2. 論文標題 Epidemiological survey of serum titers from adults against various Gram-negative bacterial V-antigens	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0220924
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0220924.	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Sawa T, Hayashi K, Kainuma A, Inoue K, Kinoshita M.
2. 発表標題 Frequency analysis-linked Poincare plot-integrated score (f-PIS) of the electroencephalogram during general anesthesia.
3. 学会等名 IARS 2018. Annual Meeting and International Science Symposium. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kainuma A, Hayase K, Akiyama K, Naito Y, Shimizu M, Itatani K, Sawa T.
2. 発表標題 Energetic performance index improvement after Glenn and Damus-Kaye-Stansel procedure using vector flow mapping analysis.
3. 学会等名 IARS 2018. Annual Meeting and International Science Symposium. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akiyama K, Wu I, Kainuma A, Nakajima Y, Sawa T, Itatani K, Takayama H.
2. 発表標題 The effect of aortic regurgitant jet directionality on energy loss.
3. 学会等名 IARS 2018. Annual Meeting and International Science Symposium. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sawa T.
2. 発表標題 Experience exchange session. Arterial pulse waveform analysis.
3. 学会等名 Edwards Life Science Limited, Irvine, CA, USA. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sawa T
2. 発表標題 Airway Management.
3. 学会等名 Smith Medical Airway Advisory Panel Meeting. (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計7件

1. 著者名 Sawa T, Kainuma A, Moriyama K, Naito Y.	4. 発行年 2018年
2. 出版社 InTech	5. 総ページ数 312
3. 書名 Construction of a recombinant single-chain antibody fragment against bacterial type III secretion. Antibody Engineering,	

1. 著者名 佐和貞治.	4. 発行年 2018年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 764
3. 書名 専門医認定試験の概要：何のためにどのような試験が行われるか. 麻酔科研修ノート 改訂第3版.	

1. 著者名 木下真央、佐和貞治.	4. 発行年 2018年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 764
3. 書名 麻酔科研修ノート 改訂第3版. 感染症.	

1. 著者名 早瀬一馬, 佐和貞治.	4. 発行年 2018年
2. 出版社 中山書店	5. 総ページ数 360
3. 書名 褐色細胞腫. リスクを有する患者の周術期管理の実際. 麻酔科医のためのリスクを有する患者の周術期管理.	

1. 著者名 甲斐沼 篤, 佐和貞治.	4. 発行年 2018年
2. 出版社 中山書店	5. 総ページ数 360
3. 書名 敗血症患者. リスクを有する患者の緊急手術での対応. 麻酔科医のためのリスクを有する患者の周術期管理.	

1. 著者名 佐和貞治, 竹下秀祐, 橋本悟.	4. 発行年 2018年
2. 出版社 日本麻酔集中治療テクノロジー学会	5. 総ページ数 140
3. 書名 Arterial Pulse Wave Analysis法におけるオンラインlog10(SW)-SVI プロットとリアルタイム回帰直線分析. 麻酔・集中治療とテクノロジー2017	

1. 著者名 竹下秀祐, 佐和貞治, 橋本悟.	4. 発行年 2018年
2. 出版社 日本麻酔集中治療テクノロジー学会	5. 総ページ数 140
3. 書名 ClearSight System™ によるオンラインSW-SVIプロット解析. 麻酔・集中治療とテクノロジー2017	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 病原性グラム陰性菌に対するワクチン	発明者 佐和貞治, 濱岡早枝子, 内藤慶史, 石井健	権利者 京都府公立大学法人、国立研究開発法人医薬基
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2018/3991	出願年 2018年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

京都府立医科大学麻酔科学教室 佐和貞治
<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/anesth/index.php?TeijiSawa>

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	森山 潔 (Moriyama Kiyoshi) (10296717)	杏林大学・医学部・准教授 (32610)	
研究分担者	木下 真央 (Kinoshita Mao) (20816384)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (24303)	
研究分担者	天谷 文昌 (Fumimasa Amaya) (60347466)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (24303)	
研究分担者	清水 優 (Masaru Shimizu) (40800131)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (24303)	削除：2020年9月2日

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
---------	---------