

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：37604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460183

研究課題名(和文)RSウイルス肺炎重症化への肺炎球菌の作用と汎用難燃物質の影響の解析

研究課題名(英文)Analysis for the effects of Streptococcus pneumoniae on the exacerbation of pneumonia in RSV-infected mice compared with a brominated flame retardant

研究代表者

渡辺 渡 (Watanabe, Wataru)

九州保健福祉大学・薬学部・教授

研究者番号：50399218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：RSV肺炎の重症化には肺炎球菌が関与する、という知見を基にRSVマウス感染モデルを用いて不活化肺炎球菌の感染病態重症化の作用機序について、汎用難燃剤と比較して明らかにすることを目的とした。本研究ではホルマリン不活化肺炎球菌を用いたが、これによる明確なRSV肺炎の増悪化現象は認められなかった。むしろ不活化肺炎球菌の複数回の前投与により、感染初期における強い炎症抑制作用が見出され、肺におけるRSV増殖のピーク時においても有意なウイルス増殖抑制効果が認められた。これらの作用機序を解析することで、新たなRSV感染症対策に応用できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：To reveal effects of Streptococcus pneumoniae on the exacerbation of RSV-induced pneumonia, effects of formalin-inactivated the bacteria (SP) on RSV infection in mice were investigated. Single intranasal exposure to SP did not show any exacerbation of pneumonia in RSV-infected mice on day 5 post-infection, compared with a brominated flame retardant TBBPA. By three times exposure to SP, the levels of proinflammatory cytokines, such as TNF- and IL-6, in bronchoalveolar lavage fluid were strongly suppressed rather than enhancement of inflammation in RSV-infected mice on day 1 post-infection. The tendency to alleviate pneumonia due to the SP-exposure was also found in histopathological analysis. Pulmonary viral titers were significantly decreased due to SP-exposure in RSV-infected mice compare with the control on day 5 post-infection. Analysis for the mechanism of action of our findings should contribute to establish novel approach for reduction of exacerbation of RSV-induced pneumonia.

研究分野：微生物学

キーワード：RSウイルス 肺炎球菌

1. 研究開始当初の背景

Respiratory syncytial (RS) ウイルスは、ほぼすべての乳幼児に感染し上・下気道炎など風邪症状を発症するが多くの重症化しないのに対して、循環器系への障害や免疫系の機能・発達に障害がある小児が感染すると重篤な肺炎を併発することが知られている。そして現在、感染流行の拡大とそれに伴った肺炎など重症化症例数の増加は医療行政上の重要な問題である。この重症化のメカニズムについては、今まで宿主側の免疫低下と考えられており、実際私たちの確立した環境化学物質の評価系は、この RS ウイルス感染病態が宿主の免疫状態を良く反映することに着目したものである。近年、肺炎球菌などの重複感染が重症化に関与することが分かってきたが、詳細は未だ不明である。肺炎球菌はほぼ全ての人の口腔内に常在しているため、RS ウイルス肺炎重症化へのリスク要因であるとする予防が困難である。そして RS ウイルス感染症と肺炎球菌の相互作用は今まで報告されていない。私たちの研究グループは RS ウイルス感染マウスモデルを利用して臭素化難燃剤の免疫影響など多くの知見を得てきた。本研究テーマで RS ウイルス重症化と肺炎球菌の因果関係を細胞レベルで明らかにできれば、重症化を抑制するための多くの情報が得られると思われた。

2. 研究の目的

RS ウイルス感染マウスモデルを用いて、今まで環境化学物質の影響評価で蓄積した RS ウイルス感染病態の増悪化や初期感染応答の不具合などの様々な知見を利用し、臨床上で問題になってきた RS ウイルス感染病態の重症化に関する肺炎球菌の作用について、汎用難燃物質テトラプロモビスフェノール A (TBBPA) をツールに用いて解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 肺炎球菌

三種類の肺炎球菌を用いた (SP-1, ATCC49619 標準株; SP-2, JCSP16 マクロライド耐性株; SP-3, JI2001-13 莢膜型)。これらの菌は 5% 羊血液寒天培地で増やしたのち、10% ホルマリン / phosphate buffered saline (PBS) 中で室温、60 時間インキュベートして不活化した。なお、鏡検と追加培養確認試験後に生物実験に利用した。

(2) RSV マウス感染実験

不活化肺炎球菌を PBS に均一懸濁・稀釈した。ウイルス感染前にこれらの試料を 100 μ L ずつ $2-4 \times 10^6$ cfu になるように BALB/c マウス (雌性、6 週齢) に麻酔下 (ketamine 40 μ g/g, xylazine 6 μ g/g、筋注) で経鼻投与した。なお、対照には PBS を投与した。投与後、RSV A2 株 5×10^5 PFU を麻酔下で経鼻感染させた。RSV 感染 1 および 5 日後に麻酔

下でマウス気道にカテーテル経由で冷 PBS 0.8 mL を注入し、肺胞洗浄液 (BALF) を取得した。BALF は使用時まで -80 に保管した。BALF 中のケモカイン・サイトカインレベルは、ELISA やタンパクアレイで解析した。肺は中性ホルマリンを気道より注入し、結索後に摘出しホルマリン固定を行った。肺組織は、HE 染色法で解析した。なお、ウイルス量を測定するための肺組織は、液体窒素で急速凍結し、-80 に保管した。

(3) *In vitro* 感染実験

RAW264.7 細胞を懸濁した三種類の不活化肺炎球菌と共に 24 時間培養した。その後、RS ウイルス (MOI=1) を感染させて、さらに培養を継続した。培養上清中の TNF- α 量を ELISA で測定した。

4. 研究成果

(1) 不活化肺炎球菌の RS ウイルス感染培養マクロファージへの影響

RS ウイルス感染の初期標的細胞と考えられている肺胞マクロファージへの作用を検討するため、培養マクロファージ RAW264.7 細胞への作用を調べた。3 種類ともに添加量に依存して TNF- α 産生増強効果が認められた。一方、RS ウイルス非感染条件下では、SP-1 と -2 では高用量においても TNF- α 量の増加が見られた。これらの結果から SP-3 が選択的に RS ウイルス感染に影響を及ぼすと考え、*in vivo* 試験に使用することとした。なお、動物実験は九州保健福祉大学動物実験に関する規則に従って、安全面および倫理面に配慮して適正に実施した。

(2) 不活化肺炎球菌の RS ウイルス感染マウスにおける肺炎への影響

不活化肺炎球菌 SP-3 投与 5 日後に RS ウイルスを感染させ、感染 5 日後の BALF 中の CCL5 などを ELISA で測定した。その結果、ばらつきは大きいですが、肺炎増悪化現象と思われる産生増強が認められた。これらの結果の再現性を確認するため、難燃剤 TBBPA を対照に増悪化の最適条件を探索することに注力した。しかしながら、肺炎球菌 SP-3 刺激のタイミング (感染 5, 3 あるいは 1 日前) や刺激量を変えた一連の実験で、使用するウイルスのロットが替わったところ、RS ウイルス肺炎増悪化現象を確認することができなかった。そこで、マウスにウイルスを感染させず、SP-1 (ATCC49619 標準株) と SP-3 刺激のみで翌日の BALF 中の TNF- α 量を指標に影響検討を実施したところ、SP-1 による応答性が高いことが判明し、ウイルス感染初期への検討など以後の試験に利用することにした。

(3) 不活化肺炎球菌の RS ウイルス感染マウスにおける感染初期応答への影響

SP-1 を感染 5, 3, 1 日前に投与後、ウイルス感染 1 日後での影響評価を試みた。その結果、

RSV 感染で誘導される BALF 中の TNF- α 量が、不活化 SP-1 投与で顕著に減少することが判明した(図-1)。そこで、この BALF 中のケモカイン/サイトカインの変動について、タンパクアレイを用いて網羅的に解析した。その結果、CCL3 や IL-6 など炎症性サイトカイン類も顕著に抑制されることが判明した。

Effects of inactivated *S. pneumoniae* on the levels of TNF- α in BALF of mock or RSV-infected mice

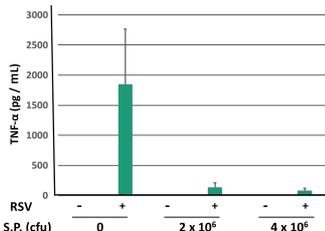


図-1 SP-1 の TNF- α 産生への影響

これらの現象を細胞および組織レベルで確認するため、BALF 中の浸出細胞をライトギムザ染色法で、肺組織を HE 染色で検討した。SP-1 投与のみでは殆どが単核球の浸出であったのに対して、RS ウイルス感染群のマウスでは、単核球と好中球が多くみられた。しかし、SP-1 投与の有無による明確な差はなかったが、投与による浸出細胞の幼若化が一部認められた。肺組織では、SP-1 投与群では軽微な炎症が認められたが、RS ウイルス感染による肺炎像に病理学的な明確な差は認められなかった。

これらの結果を受けて、同様の投与スケジュールで感染 5 日後の肺組織でのウイルス感染価を測定した(図-2)。その結果、有意なウイルス感染抑制効果が認められた。

Effects of inactivated *S. pneumoniae* on pulmonary viral titers 5 days after RSV infection in mice

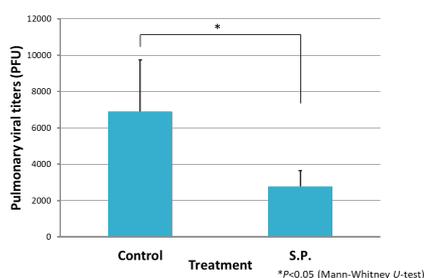


図-2 SP-1 のウイルス感染価への影響

本研究を通して、RS ウイルス肺炎増悪化作用に関しては、不活化肺炎球菌の増量や RS ウイルス感染前後での投与スケジュールを検討したが、明確な RS ウイルス肺炎の増悪化結果は得られなかった。これは、ホルマリンで不活化した肺炎球菌では菌自体の産生因子などが欠如するため、臨床を反映できない可能性が高いと考えられた。一方、初期炎症抑制効果に関しては、不活化 SP-1 投与により肺組織における RS ウイルス増殖のピー

ク時での有意なウイルス増殖抑制効果が認められた。また、病理組織学的には、肺葉でのばらつきはあるが炎症細胞の浸潤抑制も見られ、回復期(感染後 14 日)でもその傾向が認められた。以上の結果より、RS ウイルス肺炎の重症化への肺炎球菌の関与は明確にできなかった。しかし、不活化肺炎球菌の RS ウイルス感染初期での強い炎症抑制効果を見出し、この作用機序を解析することは新たな RS ウイルス感染症対策に応用できる可能性が示された。

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 7 件)

Yoshida, H., Tsuhako, R., Atsumi, T., Narumi, K., Watanabe, W., Sugita, C., Kurokawa, M. Naringenin interferes with the anti-diabetic actions of pioglitazone via pharmacodynamic interactions. *J. Nat. Med.* (2016) DOI: 10.1007/s11418-016-1063-4.

Matsusaki, T., Takeda, S., Takehita, M., Arima, Y., Tsend-Ayush, T., Oyunsuren, T., Sugita, C., Yoshida, H., Watanabe, W., Kurokawa, M. Augmentation of T helper type 1 immune response through intestinal immunity in murine cutaneous herpes simplex virus type 1 infection by probiotic *Lactobacillus plantarum* strain 06CC2. *Int. Immunopharmacol.* (2016) 39, 320-327.

Kurokawa, M., Wadhvani, A., Kai, H., Hidaka, M., Yoshida, H., Sugita, C., Watanabe, W., Matsuno, K., Hagiwara, A. Activation of Cellular Immunity in Herpes Simplex Virus Type 1-Infected Mice by the Oral Administration of Aqueous Extract of *Moringa oleifera* Lam. Leaves. *Phyther. Res.* (2016) 30, 797-804. DOI: 10.1002/ptr.5580.

Hashiguchi, S., Yoshida, H., Akashi, T., Komemoto, K., Ueda, T., Ikarashi, Y., Miyauchi, A., Konno, K., Yamanaka, S., Hirose, A., Kurokawa, M., Watanabe, W. Titanium dioxide nanoparticles exacerbate pneumonia in respiratory syncytial virus (RSV)-infected mice. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* (2015) 39, 879-886. DOI: 10.1016/j.etap.2015.02.017

Yoshida, H., Watanabe, H., Ishida, H., Watanabe, W., Narumi, K., Atsumi, T., Sugita, C., Kurokawa, M. Naringenin suppresses macrophage infiltration into

adipose tissue in an early phase of high-fat diet-induced obesity. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (2014) 454, 95-101.

Takeda, S., Hidaka, M., Yoshida, H., Takeshita, M., Kikuchi, Y., Tsend-Ayush, C., Bumbein, D., Kawahara, S., Muguruma, M., Watanabe, W., Kurokawa, M. Anti-allergic activity of probiotics from Mongolian dairy products on type I allergy in mice and mode of anti-allergic action. *J. Func. Foods* (2014). DOI: 10.1016/j.jff.2014.04.013

Kai, H., Obuchi, M., Yoshida, H., Watanabe, W., Tsutsumi, S., Park, Y.K., Matsuno, K., Yasukawa K., Kurokawa, M. In vitro and in vivo anti-influenza virus activities of flavonoids and related compounds as components of Brazilian propolis (AF-08). *J Func Foods* (2014) 8, 214-223. DOI:10.1016/j.jff.2014.03.019

〔学会発表〕(計 6件)

渡辺 渡, 榑藤喜貴, 橋口誠子, 加藤雄大, 広瀬明彦, 宮内亜宜, 明石 敏, 吉田裕樹, 杉田千泰, 黒川昌彦: 多層型カーボンナノチューブ曝露によるRSV感染初期応答への影響, 日本薬学会第137年会, 2017.3.27, 仙台.

宮内亜宜, 明石 敏, 橋口誠子, 加藤雄大, 榑藤喜貴, 吉田裕樹, 杉田千泰, 黒川昌彦, 渡辺 渡: 不活化肺炎球菌曝露によるRSV感染初期応答への影響, 第33回日本薬学会九州支部大会, 2016.12.3, 鹿児島.

宮内亜宜, 明石 敏, 橋口誠子, 加藤雄大, 榑藤喜貴, 吉田裕樹, 杉田千泰, 黒川昌彦, 渡辺 渡: 不活化肺炎球菌曝露によるRSV感染初期応答への影響, 第64回日本ウイルス学会学術集会, 2016.10.24, 札幌.

橋口誠子, 吉田裕樹, 重黒木公也, 明石敏, 黒原俊典, 坂田健太郎, 宮内亜宜, 杉田千泰, 黒川昌彦, 渡辺 渡: -アミノ酪酸(GABA)のRSウイルス感染症への効果, 日本薬学会第136年会, 2016.3.27, 横浜.

Seiko Hashiguchi, Hiroki Yoshida, Toshi Akashi, Akihiko Hirose, Chihiro Sugita, Masahiko Kurokawa, Wataru Watanabe: Effects of multi-walled carbon nanotubes on the pneumonia in respiratory syncytial virus-infected mice. 51st Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2015), 2015.9.14, Porto, Portugal.

Seiko Hashiguchi, Hiroki Yoshida,

Toshi Akashi, Akihiko Hirose, Masahiko Kurokawa, Wataru Watanabe: Effects of titanium dioxide nanoparticles on the pneumonia in respiratory syncytial virus-infected mice. 50th Congress of the European Societies of Toxicology (EuroTox2014), 2014.9.9, Edinburgh UK

〔図書〕(計 2件)

渡辺 渡, 他(共著, 13名中13番目) 廣川書店, 遺伝子工学-基礎から医療まで-, 2017, 92-105頁

渡辺 渡(単著) 講談社, 好きになる微生物学~感染症の原因と予防法, 2015, 170頁

〔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

研究室HP: <http://biochem-kuhw.org/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 渡 (WATANABE, Wataru)

九州保健福祉大学・大学院医療薬学研究科・教授

研究者番号: 50399218

(2) 研究分担者

黒川 昌彦 (KUROKAWA, Masahiko)

九州保健福祉大学・大学院医療薬学研究科・教授

研究者番号: 80186527

吉田 裕樹 (YOSHIDA, Hiroki)

九州保健福祉大学・大学院医療薬学研究科・講師

研究者番号: 90469411

明石 敏 (AKASHI, Toshi)

九州保健福祉大学・薬学部動物生命薬科学科・教授

研究者番号: 10648596