

感染症発症が相関することをすでに明らかにしてきた。今回はびまん性肺疾患または呼吸不全の原因となる細菌の関与について、病原性発現と発症メカニズムの重要な要因となる咽頭上皮細胞への細菌付着の細胞側レセプターの検討を行なった。これまで明らかにしていたブランハメラ (*B. catarrhalis*) では糖鎖の中で付着に重要なものとしてGM2に加えて新しい糖鎖の関与についての可能性も検討しつつある。さらに、インフルエンザ菌 (*H. Influenzae*) についてはGD2ブランハメラ (*Branhamella catarrhalis*) のヒト咽頭上皮細胞の付着に及ぼす S-carboxymethyl cysteine の影響 (in vitro) - 濃度依存性に付着抑制がみられるが付着因子となる糖鎖であることを明らかにした。さらにこれまでの日常的に呼吸器感染症疾患者に去痰薬として用いられてきた一部の薬 ( S-Carboxymethyl cysteine, N-Acetylcysteine) で咽頭上皮細胞への細菌付着性を阻害する作用がみられることを初めて明らかにした。(表 1, 2, 3) また、AFM と電子顕微鏡による研究によりブランハメラとインフルエンザ菌の菌体表面の荷電がマイナスであり、ヒトの咽頭上皮細胞のマイクロプリキエ (突起) 部分がプラス荷電であることから、細菌と細胞の付着における荷電の関与をも明らかにしつつある。一方、マウス肺炎モデルにおいて塩酸吸引は緑膿菌性肺炎を増悪させることを明らかにした。この肺炎増悪の機序は、SEM により塩酸吸引により障害された気管上皮への菌付着の増加が示されたことから、塩酸吸引により障害された気管上皮への菌付着の増加によると結論された。この成績により致死率の高い胃内容物の吸引性肺炎の発症機序の一つが解明された。

#### D. & E. 考察と結論

今回の検討で、これまで不明確であった菌と細胞が付着するその最初のステップで、菌と細胞の荷電についてAFMを用いて研究した。さらにその結果を電子顕微鏡下に再確認することでマイナスに荷電した病原細菌がヒト咽頭上皮細胞の突起部分がプラスに荷電していることを世界的に初めて明かにすることで感染症発症メカニズムにとって重要な知見の一部を解明した。呼吸器親和性病原細菌の多くはまず上気道上皮細胞への

付着性を感染発症のファースト・ステップとすることから上気道のクリーニング (ガーグリングなど) で上皮細胞への菌付着を減らすことで下気道感染症を減少させることが出来る。(表 4, 5) また、ブランハメラのような細菌で上気道上皮細胞への菌付着性に季節変動があり冬に付着率が増加し、夏に付着率が減少することと本菌の下気道感染症の症例数が比例して増減することからも細菌感染症における上気道と下気道のかかわりを明らかにしてきた。これらの上皮細胞と菌との付着因子として細胞表面の糖鎖が重要な役割を担っており、細菌の種類によって付着に関与する糖鎖の種類がそれぞれ異なることから、糖鎖をブロックすることで感染発症防止につながる薬物の存在をも証明しつつある。また、マウス塩酸吸引後の肺炎モデルにおける成績から致死率の高い胃内容物の吸引性肺炎の発症機序の一つが解明された。今後びまん性肺疾患または呼吸不全における細菌感染の関与について精細な検討を行うと共にこれらの細菌感染の治療・予防にも新しい展望が開けるものと考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Tsuyoshi Nagatake, Kamruddin Ahmed, Kazunori Oishi : Prevention of respiratory infection by povidone - iodine gargle. *Dermatology*. in press
2. Satoshi Sato, Kazunori Oishi, Akitaka Iwagaki, Masachika Senba, Takaaki Akaike, Moritoshi Akiyama, Naohumi Muakida, Kouji Matsushima, Tsuyoshi Nagatake: Dexamethasone impairs pulmonary defence against *Pseudomonas aeruginosa* through suppressing iNOS gene expression and peroxyhitrite production in mice. *Clin. Exp. Immunol.* 126. 266-273. 2001
3. Hiroshi Watanabe, Hironori Masaki, Norichika Aso, Kiwao Watanabe,

- Kazunori Oishi, Akiyoshi Sato, Rinya Sugita, Tsuyoshi Nagatake: Low Concentrations of Mupirocin in the Pharynx following Intranasal Application May Contribute to Mupirocin Resistance in Methicillin - Resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 39(10) 3775-3773, 2001
4. Cheikh Tidiane Ndour, Kamruddin Ahmed, Tomomi Nakagawa, Yamaji Nakano, Akitoyo Ichinose, Gulnur Tarhan, Masamichi Aikawa, Tsuyoshi Nagatake: Modulating effects of mucoregulating drugs on the attachment of *Haemophilus influenzae*. *Microbial Pathogenesis*. 30, 121-127, 2001
  5. Hiroshi Watanabe, Hironori Masaki, Norichika Asoh, Kiwao Watanabe, Kazunori Oishi, Shinobu Kobayashi, Akiyoshi Sato, Tsuyoshi Nagatake: Molecular Analysis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* as a Causative Agent of Bronchopulmonary Infection : Relation to Colonization in the Upper Respiratory Tract. *Journal Of Clinical Microbiology*. 38(10) 3867-3869, 2000
  6. Kamruddin Ahmed, Tomomi Nakagawa, Yamaji Nakano, Glenda Martinez, Akitoyo Ichinose, Can Hong Zheng, Mayumi Akaki, Masamichi Aikawa, Tsuyoshi Nagatake : Attachment of *Moraxella catarrhalis* occurs to the positively charged domains of pharyngeal epithelial cells. *Microbial Pathogenesis*. 28.203-209, 2000
  7. Hiroshi Watanabe, Satoshi Sato, Kenichi Kawakami, Kiwao Watanabe, Kazunori Oishi, Naoto Rikitomi, Tsuyoshi Ii, Hideaki Ikeda, Akiyoshi Sato, Tsuyoshi Nagatake : A comparative clinical study of pneumonia by penicillin-resistant and -sensitive *Streptococcus pneumoniae* in a community hospital. *Respiration*. 5.59-64, 2000
  8. Borann Sar, Kazunori Oishi, Akihiro Wada, Toshiya Hirayama, Kouji Matsushima, Tsuyoshi Nagatake : Induction of monocyte chemoattractant protein - 1 (MCP - 1) productio by *Pseudomonas nitrite reductase* in human pulmonary type II epithelial - like cells. *Microbial Pathogenesis* 28.17-23, 2000
  9. Hideaki Amano, Hidefumi Yamamoto, Masachika Senba, Kazunori Oishi, Shoichi Suzuki, Kenichi Fukushima, Naofumi Mukaida, Kouji Matsushima, Katsumi Eguchi, Tsuyoshi Nagatake : Impariment of Endotoxin-Induced Macrophage Inflammatory Protein 2 Gene Expression in Alveolar Macrophages in Streptozotocin - Induced Diabetes in Mice. *Infection and Immunity*. 68 (5) 2925-2929, 2000
  10. Can Hong Zheng, Kamruddin Ahmed, Naoto Rikitomi, Glenda Martinez, T. Nagatake: The effect of S-Carboxymethylcysteine and N-Acetylcysteine on the Adherence of *Moraxella catarrhalis* to Human Pharyngeal Epithelial Cells. *Microbiol. Immunol.* 43(2); 107-113, 1999

#### H. 知的所有権の取得状況

なし

表 1 Effects of S-carboxymethylcysteine treatment of pharyngeal epithelial cells on the attachment of *H. influenzae*

Control	Attachment S-CMC ( $\mu\text{g/ml}$ )	Percentage decrease of mean attachment	P value
$17.5 \pm 2.9$	$8.8 \pm 2.4$ (100)	49.7	<0.0001
$15.5 \pm 3.1$	$9.2 \pm 2.5$ (10)	40.6	<0.001
$18.8 \pm 6.8$	$15.4 \pm 5.7$ (1)	18.1	<0.01
$14.3 \pm 2.5$	$14. \pm 2.6$ (0.1)	n.d.	n.s.

Attachment is expressed as number of bacteria attached per pharyngeal epithelial cell. For each sample five experiments were performed in duplicate.

n.d. = not decreased, n.s. = not significant.

表 2 Ability of S-carboxymethylcysteine treatment to detach *H. influenzae* from human pharyngeal epithelial cells

Control	Attachment S-CMC ( $\mu\text{g/ml}$ )	Percentage decrease of mean attachment	P value
$5.9 \pm 1.9$	$3.1 \pm 0.8$ (100)	47.5	<0.05
$6.8 \pm 4.0$	$5.3 \pm 2.9$ (10)	22.1	n.s.
$8.8 \pm 1.7$	$8.1 \pm 1.6$ (1)	n.d.	n.s.

Attachment is expressed as the number of bacteria attached per pharyngeal epithelial cell. For each sample five experiments were performed in duplicate.

n.d. = not decreased, n.s. = not significant.

表 3 Effects of S-carboxymethylcysteine and ambroxol ( $100 \mu\text{g/ml}$ ) treatment on the surface potential of human pharyngeal epithelial cells

Drugs	Surface	Surface potential (mV)		P value
		Control	Test	
S-CMC	Elevations (+)	$18.7 \pm 6.1$	$10.9 \pm 4.1$ (58.2%)	<0.05
S-CMC	Depression (-)	$14.4 \pm 4.8$	$12.0 \pm 5.4$ (83.3%)	n.s.
Ambroxol	Elevations (+)	$35.0 \pm 23.5$	$25.3 \pm 8.8$ (72.3%)	n.s.
Ambroxol	Depressions (-)	$27.3 \pm 13.8$	$12.7 \pm 6.4$ (46.5%)	<0.05

Parentheses in test column indicate percentage change of mean surface potential compared to the respective controls.

n.s. = not significant.

(+) and (-) indicate positive and negative electric charge.

表 4 Prevetion of chronic respiratory infections by povidone iodine gargle  
(Excluding infections by *P.aeruginosa* and *S.aureus*)

Case No. Name Age Diag.	Duration of observation (months)	Number of episodes of acute exacerbaton		Effectiveness of povidone iodine gargling (E)
		Before(B)	After(A)	
1. K. N. 73 CB	28	8	2	75.0%
2. K. M. 53 CPE	26	9	2	77.8%
3. J. I. 75 CB	24	7	3	57.1%
4. S. M. 75 CB	24	3	1	66.7%
5. H. O. 73 CB	24	6	4	33.3%
6. M. T. 64 BE	24	8	2	75.0%
7. H. H. 73 CB	24	2	1	50.0%
8. T. F. 55 CB	18	5	2	60.0%
9. S. F. 51 BE	17	2	2	0
10. T. H. 54 CB	12	4	2	50.0%
11. T. S. 63 BE	12	2	1	50.0%
12. K. H. 57 CB	12	2	0	100.0%
13. K. I. 22 CB	8	6	4	33.3%
14. T. O. 25 BE	6	3	2	33.3%
Total	259	67	28	/
Average	18.5	4.8	2.0	58.2%

CB: Chronic bronchitis, BE: Bronchiectasis, CPE: Chronic pulmonary emphysema+infection

$$(E) = \frac{(B) - (A)}{(B)} \times 100$$

表 5 Prevention of chronic respiratory infections by povidone iodine gargle  
(Including repeated infecitons by *P.aeruginosa* and *S.aureus*)

Case No. Name Age Diag.	Duration of observation (months)	Number of episodes of acute exacerbaton		Effectiveness of povidone iodine gargling (E)
		Before(B)	After(A)	
1. T.N. 73 BE	28	7	6	14.3%
2. M.M. 53 CPE	28	13	6	53.5%
3. K.Y. 67 CB	24	4	0	100.0%
4. T.I. 62 CB	24	6	3	50.0%
5. S.F. 62 BE	24	10	5	50.0%
6. F.K. 80 CB	24	3	1	66.7%
7. S.O. 73 DPB	12	3	3	0
8. M.M. 70 BE	12	6	3	50.0%
9. C.N. 71 DPB	12	5	3	40.0%
Total	188	57	30	/
Average	20.9	6.3	3.3	47.4%

CB: Chronic bronchitis, BE: Bronchiectasis,  
CPE: Chronic pulmonary emphysema+infection, DPB: Diffuse panbronchiolitis

$$(E) = \frac{(B) - (A)}{(B)} \times 100$$

## 12. 慢性肺気腫あるいは呼吸不全における ウイルス感染に関する研究

分担研究者 山谷 睦雄（東北大学医学部附属病院老人科講師）

**研究要旨** (1) マクロライド抗生物質のライノウイルス感染抑制作用を、培養気道細胞を用いて調べた。マクロライド抗生物質は培養液ライノウイルス放出と接着分子 ICAM-1 および炎症性サイトカイン合成を抑制した。(2) マクロライド抗生物質の風邪防止効果を調べた。慢性閉塞性肺疾患患者において、マクロライド抗生物質を内服した群では風邪の回数、急性増悪の回数ともに減少した。

### A. 研究目的

気管支喘息や慢性肺気腫に代表される Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) はウイルス感染が引き金になって急性増悪し、呼吸不全をきたすことが多い。ライノウイルス、インフルエンザウイルス、RS ウイルスなどが同定され、二次性の細菌感染が更に症状を悪化させる。ウイルス感染は気道上皮の剥離脱落や気道壁の浮腫を介して気道内腔を狭窄すると言われている。また、炎症性サイトカイン、ヒスタミンやキニンが気道炎症や気管支平滑筋収縮を生じて気流障害を促すと考えられている。私たちは、これまでの研究において、ライノウイルスが気道上皮細胞およびマスト細胞を刺激して、炎症性サイトカインや気道ムチン分泌・ヒスタミン合成を促進することをこの研究班で報告してきた。接着分子 ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1) は風邪の主因であるライノウイルスの感染受容体であり、炎症性サイトカインはライノウイルスによる気道炎症に関係することを私たちは報告してきた。また、ライノウイルス等の気道ウイルス感染により慢性肺気腫や気管支喘息の呼吸不全になった患者で、血中可溶性接着分子やサイトカイン Interleukin-6、好酸球塩基性蛋白 (ECP)、および尿中ロイコトリエンが増加することを明らかにしてきた。そして、これらの因子が気道炎症や気道収縮・喀痰過剰分泌を生じて呼吸不全を

引き起こす病態を明らかにしてきた。他方で、ライノウイルスは 100 種類以上の血清型があるため、有効なワクチンはこれまで開発が困難であった。また、ライノウイルスの感染病態の解明が遅れていたために、ライノウイルス感染を阻止する医薬品の開発がなされていなかった。マクロライド抗生物質であるエリスロマイシンは炎症性サイトカインや接着分子 ICAM-1 の合成を低下させて気道炎症を鎮めるとの報告が最近なされている。Major type ライノウイルスは接着分子 ICAM-1 を感染受容体として細胞に付着・感染し、細胞内に侵入するが、一部分は酸性エンドゾームを通過してライノウイルス RNA が細胞内に移動する。Minor type ライノウイルスは低比重リポ蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 受容体への結合を介して細胞に感染し、酸性エンドゾームを通過してライノウイルス RNA が細胞内に移動することが知られている<sup>1) 2)</sup>。マクロライド抗生物質の一種であるバフィオマイシンは酸性エンドゾームの pH をアルカリ側に変化させるために、ライノウイルスなどの細胞内移動を阻止することが最近になって、気道上皮以外の細胞を用いた研究で明らかにされていた<sup>2)</sup>。しかし、臨床的に広く用いられているマクロライド抗生物質であるエリスロマイシンの気道上皮細胞におけるライノウイルス感染抑制効果は不明であった。これをもとに、本年度はマクロライド抗生物質エリスロマイシンのライノウイルス感染抑制作用

について、培養ヒト気管上皮細胞を用いて検討した。また、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は、日本人においてはそのほとんどの患者が肺気腫である。慢性肺気腫患者に生ずる呼吸不全の多くがライノウイルスなどの呼吸器ウイルス感染で惹起することをこれまで、この研究班において報告してきた。本年度はエリスロマイシンを内服した COPD 患者の風邪の回数と急性増悪の回数について調べ、エリスロマイシンの風邪予防効果を検討した。

#### (倫理面への配慮)

ヒト気管上皮細胞培養およびマクロライド抗生物質内服研究については東北大学医学部倫理委員会の承認と患者の同意を得て行なった。

## B. 研究方法

1. ヒト気管上皮細胞培養およびライノウイルス感染は、私たちがこれまで報告してきた方法にしたがって行った<sup>3)</sup>。剖検のヒト気管から上皮細胞を酵素的に単離して、ヒト気管上皮細胞を試験管に培養した。ライノウイルスは 2 型と 14 型ライノウイルスをヒト胎児線維芽に感染させて増殖し、 $10^5$  TCID<sub>50</sub> Unit/ml の濃度で感染させた。ライノウイルスの増殖は培養液のライノウイルス定量とライノウイルス RNA の RT-PCR 法を用いた定性的測定法で行った。培養液ライノウイルスは培養液で 10 倍づつ希釈してヒト胎児線維芽細胞に感染させ、細胞変性効果 (cytopathic effect) の発現する希釈倍率から求めた。エリスロマイシン  $10 \mu\text{M}$  をライノウイルス感染前から培養液に加え、ライノウイルスの培養液放出量、ライノウイルス細胞内 RNA 量、サイトカイン放出量、上皮細胞の ICAM-1 合成量を測定した。培養液サイトカイン量は ELISA 法により測定した。上皮細胞 ICAM-1 は Northern blot 法により mRNA を定量した。また、ライノウイルス RNA の一部分は細胞内酸性エンドゾームを通過して細胞質に移動するとの報告があるため、細胞を色素 LysoSensor Green DND-189 でラベルして蛍光顕微鏡を用いて細胞内酸性エンドゾームの数を調べ、エリスロマイシンの効果を検討した。

2. COPD 患者の風邪および急性増悪の回数に対するマクロライド抗生物質の効果を調べた。COPD 患者 (慢性肺気腫あるいは慢性気管支炎) 109 名を 2 群に分け、エリスロマイシン内服群 55 名 (男性 47 名、女性 7 名、平均年齢 69.1 歳)、非内服群 54 名 (男性 44 名、女性 10 名、平均年齢 71.7 歳) を対象に 1997 年から 12 ヶ月に渡って調査した。患者の同意を得て、内服群はエリスロマイシン (200-400 mg/日) を、非内服群はリボフラビン (10 mg/日) を内服した。風邪の評価は、Jackson の方法<sup>4)</sup>に従って、発熱、咽頭痛などの症状をスコア化して 5 点以上とした。急性増悪は Rodrigues-Roisin の方法<sup>5)</sup>に従って、判定した。

## C. 研究結果

1. ヒト気管上皮細胞にライノウイルスを感染させると、培養液ライノウイルス量は時間とともに増加し、3 日後にピーク値になる。上皮細胞にエリスロマイシン  $10 \mu\text{M}$  を感染 3 日前から作用させると、細胞内ライノウイルス RNA 量、培養液ライノウイルス量は 10% 以下に明らかに減少する (図 1)。ライノウイルスのうち、ICAM-1 を感染受容体とする 14 型ライノウイルスの培養液放出量に対するエリスロマイシンの抑制効果が低比重リポ蛋白 (LDL) 受容体を感染受容体とする 2 型ライノウイルスに比べて強く、感染後 12 時間で抑制効果が明らかになる。培養液 2 型ライノウイルス量に対するエリスロマイシンの抑制効果も感染 3 日後から明らかとなる。さらに、エリスロマイシンはライノウイルス感染前の培養液サイトカイン、および感染によって増加する培養液サイトカインともに減少する (図 2)。上皮細胞 ICAM-1 および LDL 受容体 mRNA 発現は、ともにライノウイルス感染で増加する。エリスロマイシンはライノウイルス感染前の ICAM-1 mRNA 合成も感染によって増加した ICAM-1 mRNA 合成も共に減少させる (図 3)。これに対して、エリスロマイシンはライノウイルス感染で増加した LDL 受容体 mRNA 発現を抑制する。酸性エンドゾーム

は蛍光色素によって細胞内で顆粒状に染色される。エリスロマイシンは蛍光色素で染色した酸性エンドゾームの数も蛍光強度も時間依存的に減少する(図4)。また、炎症性サイトカインや ICAM-1 合成に関与するとされている転写因子 NF- $\kappa$ B 活性はライノウイルス感染で増加するが、エリスロマイシンは感染前および感染によって増加した NF- $\kappa$ B 活性を、共に抑制する(図5)。

2. 風邪をひく回数はエリスロマイシン内服群の COPD 患者で平均 1.2 回/年、非内服群の COPD 患者で平均 4.5 回/年と、明らかにエリスロマイシン内服群で減少した ( $p < 0.001$ )。また、風邪がもとで急性増悪した患者数もエリスロマイシン内服群の COPD 患者で平均 6 名/年 (11%)、非内服群の COPD 患者で平均 30 名/年 (56%) と、明らかにエリスロマイシン内服群で減少した ( $p < 0.01$ )。重症の急性増悪した患者は内服群で 0 名/年、非内服群で 10 名/年であった(表1)。エリスロマイシン内服群で一名のみ食欲低下、下痢症状があり、エリスロマイシンを中止したが、ほかの患者には副作用を認めなかった。

#### D. & E. 考察と結論

今回の研究で私たちはマクロライド抗生物質であるエリスロマイシンが培養液ライノウイルス量、培養ヒト気管上皮細胞における細胞内ライノウイルス RNA 量を減少することを示した。エリスロマイシン前処理は major type ライノウイルス感染受容体である ICAM-1 合成をメッセンジャー RNA および蛋白合成レベルで減少した。エリスロマイシンがライノウイルス感染感受性を低下したため、エリスロマイシンは感染受容体である ICAM-1 合成低下を介して 14 型ライノウイルス感染を抑制した可能性がある。さらに、エリスロマイシンが、他のマクロライド抗生物質である bafilomycin A1 と同様に<sup>6)</sup>、培養ヒト気管上皮細胞における酸性エンドゾーム数を減らした。したがって、エリスロマイシンは bafilomycin A1 を処理した HeLa 細胞<sup>3)</sup>やヒト気管上皮細胞<sup>6)</sup>で観察されたように、14 型ライノウイルスの酸性エンドゾームを経由した細胞内侵入も抑制した可能性がある。同様に、エリスロマイシンは

2 型ライノウイルスの培養液量も減少させた。エリスロマイシンは LDL 受容体合成をライノウイルス感染前に抑制しなかったため、2 型ライノウイルス感染抑制は LDL 受容体合成減少を介した機序ではないことが示唆される。おそらく、酸性エンドゾームを経由した細胞内侵入を抑制して 2 型ライノウイルス感染が抑制されたと考えられる。

ライノウイルスは成人の風邪の主因であるばかりではなく、COPD などの急性増悪を引き起こすことが報告されており、予防法・治療法の開発が急がれていた。ライノウイルスは血清型が 100 種類以上と多く、有効なワクチン開発がなされていない。私たちは、最近ライノウイルスが気道上皮細胞に ICAM-1<sup>3)</sup>あるいは低比重リポ蛋白(LDL)受容体<sup>7)</sup>を介して感染することを明らかにした。他方で、エリスロマイシンなどのマクロライド抗生物質が気道上皮の ICAM-1 合成低下をもたらすことが明らかにされている<sup>8)</sup>。私たちはこれらの背景から、マクロライド抗生物質がライノウイルス感染抑制効果を持つのではないかと考え、研究を進めた。私たちは既に 16 員環マクロライド抗生物質であるバフィロマイシン A1 がヒト気管上皮細胞の ICAM-1 と酸性エンドゾームを減少させてライノウイルス 14 型の感染抑制に作用することを報告した<sup>6)</sup>。本研究はこの研究を発展させた。臨床的に用いられているエリスロマイシンを用い、また、ライノウイルス 14 型の他にライノウイルス 2 型感染に対する作用を調べた。その結果、エリスロマイシンが気管培養液の 2 型および 14 型ライノウイルス放出量を減少させることを見出した。さらに、炎症性サイトカインも減少したことより、エリスロマイシンがライノウイルスによる気道炎症抑制作用を持つことが示唆された。エリスロマイシンは上皮細胞の ICAM-1 を減少させたことより、ライノウイルス 14 型感染抑制にはライノウイルス感染受容体の減少が関与すると考えられる。さらに、ライノウイルス RNA は酸性エンドゾームから RNA を細胞質に放出することが報告されている<sup>9)</sup>。今回の研究で、エリスロマイシンが気道上皮細胞の酸性エンドゾーム数を減少させたことから、ライノウイルス感染抑制に働いていた可能性が示唆される。

さらに、臨床研究において、エリスロマイシンを内服した COPD 患者では風邪および急性増悪の回数が減少した。気道ウイルス感染によって引き

起こされる風邪症候群は慢性肺気腫患者の呼吸不全の原因となるため、臨床医にとって克服すべき重要課題であった。また、風邪症候群に引き続く二次性細菌感染は呼吸不全をさらに悪化させ、たびたび致死的になる。ライノウイルスは慢性肺気腫の急性増悪を引き起こす気道ウイルス感染の主ウイルスとして知られてきた。ライノウイルス感染阻止のための研究はこれまで種々行われている。Pauling はビタミン C が風邪予防効果を持つと報告したが<sup>10)</sup>、無効との反論もある<sup>11)</sup>。WIN52084 は in vitro 研究においてライノウイルスの感染受容体レベルで感染を阻止するが<sup>12)</sup>、臨床的には風邪予防効果のないことが報告された<sup>13)</sup>。ただ一つ、可溶性 ICAM-1 はライノウイルスに結合して感染能力をなくし、実験的にライノウイルスを感染させた場合の風邪の程度を減弱させた<sup>14)</sup>。このように、これまでの研究でライノウイルス感染を含む感冒に対する種々の薬剤の抑制効果が調べられていたが、現在のところ可溶性 ICAM-1 がライノウイルスの実験的感染を阻止するとの報告がなされている<sup>14)</sup>。本研究中で私たちはエリスロマイシンが COPD における感冒予防効果を明らかにした<sup>15)</sup>。エリスロマイシンはこれまでにもびまん性汎細気管支炎や慢性下気道細菌感染症における患者の予後を劇的に改善することが知られている<sup>16)</sup>。また、エリスロマイシンはインフルエンザウイルスを実験的に感染したマウス肺炎モデルにおいて死亡率を低下し、また、気道炎症を抑制する<sup>17)</sup>。これらの効果は抗感染効果というよりはむしろ抗炎症効果から起因すると考えられている。エリスロマイシンは今回の研究で示したように、気道上皮細胞のインターロイキン (IL) -1、IL-6、IL-8、TNF などの炎症性サイトカインや ICAM-1 合成を抑制する。したがって、エリスロマイシンは慢性肺気腫患者において炎症性サイトカイン合成を抑制することによって風邪症状を軽減した可能性がある。

エリスロマイシンは抗炎症効果や抗菌効果以外の作用が知られている。例えば、azithromycin は HIV 患者において P. carini 感染抑制効果のあることが報告されている<sup>18)</sup>。マクロライド抗生物質 bacitracin A1 は H<sup>+</sup>-ATPase 阻害効果を有し、HeLa 細胞や<sup>2)</sup>、すでに私たちが報告しているが<sup>6)</sup>、ヒト気管上皮細胞においても、ライノウイルス感染抑制効果がある。したがって、エリスロマイシンは成人の風邪の主起因ウイルス

であるライノウイルス感染を抑制して、風邪の引く回数を減少した可能性がある。

マクロライド抗生物質投与においては *Haemophilus influenzae* や *Streptococcus pneumoniae* などのマクロライド抗生物質耐性菌が問題となってくる<sup>18)・19)</sup>。今回の研究において、私たちは54名の COPD 患者に12ヶ月にわたってエリスロマイシンを内服してもらった。結果的にこれらの COPD 患者にマクロライド抗生物質耐性菌を生ずる危険性をもたらした可能性がある。しかし、COPD 急性増悪の回数および急性増悪による通院・入院回数はそれぞれ 22% および 0% に、明らかに減少した。したがって、エリスロマイシンは呼吸不全を引き起こすリスクのある COPD などの慢性炎症性肺疾患患者において、風邪の予防として有効である可能性があると考えられる。このように、エリスロマイシンは本来抗生物質であるため、菌交代や耐性菌の問題がある。したがって、エリスロマイシンは風邪がもとで急性増悪する危険性のある慢性肺気腫などの慢性呼吸器疾患患者にのみ限る必要がある。今後、これらの課題を解決する必要がある。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Suzuki T, Yamaya M, Kamanaka M, Jia Y-X, Nakayama K, Hosoda M, Yamada N, Nishimura H, Sikizawa K, Sasaki H. Type 2 rhinovirus infection of cultured human tracheal epithelial cells: role of LDL receptor. *Am J Physiol* 280: L409-L420, 2001.
2. Yamaya M, Hosoda M, Ishizuka S, Monma M, Matsui T, Suzuki T, Sekizawa K, Sasaki H. Relation between exhaled carbon monoxide levels and clinical severity of asthma. *Clin Exp Allergy* 31: 417-422, 2001.
3. Ishizuka S, Yamaya M, Suzuki T, Nakayama K, Kamanaka M, Ida S, Sekizawa K, Sasaki H. Acid exposure



- stimulates the adherence of *S. pneumoniae* to cultured human airway epithelial cells: effects on PAF receptor expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24: 459-468, 2001.
4. Suzuki T, Yamaya M, Sekizawa K, Hosoda M, Yamada N, Ishizuka S, Yanai M, Numazaki Y, Sasaki H. Bafilomycin A1 inhibits rhinovirus infection in cultured human tracheal epithelial cells: effects on endosomal pH and ICAM-1 production. *Am J Physiol* 280: L1115-L1127, 2001.
  5. Yamaya M, Yanai M, Ohru T, Arai H, Sasaki H. Progress in Geriatrics: Interventions to prevent pneumonia among older adults. *J Am Geriatr Soc* 49: 85-90, 2001.
  6. Suzuki T, Yanai M, Yamaya M, Satoh-Nakagawa T, Sekizawa K, Ishida S, Sasaki H. Erythromycin and common cold in COPD. *Chest* 120: 730-733, 2001.
  7. Jia YX, Li JQ, Matsui T, Yamaya M, Ohru T, Sekizawa K, Sasaki H. Neurochemical regulation of swallowing reflex in guinea pigs. *Geriatr Gerontol Internat* 1: 56-61, 2001.
  8. Horvath I, MacNee W, Kelly FJ, Dekhuijzen PNR, Phillips M, Doring G, Choi AMK, Yamaya M, Bach FH, Willis D, Donnelly, Chung KF, Barnes PJ. Haemoxygenase-1 induction and exhaled markers of oxidative stress in lung diseases, summary of the ERS Research Seminar in Budapest, Hungary, September, 1999. *Eur Respir J* 18: 420-430, 2001.
  9. Yamaya M, Yanai M, Ohru T, Arai H, Sekizawa K, Sasaki H. Antithrombotic therapy for prevention of pneumonia. *J Am Geriatr Soc* 49: 687-688, 2001.
  10. Yamaya M, Yanai M, Sasaki H. Angiotensin-converting enzyme inhibitors, angiotensin-II receptor antagonists, and pneumonia in elderly hypertensive patients with stroke. *Chest* 119: 661, 2001.
  11. Ohru T, Namima T, Yamaya M, Sato T, Matsui T, Sasaki H. Risk of prostate cancer in the Japanese elderly asthmatics. *J Am Geriatr Soc* 50: 202, 2002.
  12. Nakayama K, Jia YX, Hirai H, Shinkawa M, Yamaya M, Sekizawa K, Sasaki H. Acid stimulation reduces bactericidal activity of surface fluid in cultured human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26: 106-113, 2002.
  13. Wang HD, Yamaya M, Okinaga S, Jia YX, Kamanaka M, Takahashi H, Guo LY, Ohru T, Sasaki H. Bilirubin ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 165: 406-411, 2002.
  14. Yamaya M, Hosoda M, Suzuki T, Yamada N, Sasaki H. Human airway epithelial cell culture. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press 7-16, 2002.
  15. Suzuki T, Yamaya M, Sekizawa K, Hosoda M, Yamada N, Ishizuka S, Yoshino A, Yasuda H, Takahashi H, Nishimura H, Sasaki H. Erythromycin inhibits rhinovirus infection in cultured human tracheal epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 165: 1113-1118, 2002.

#### H. 知的所有権の取得状況

なし

#### 参考文献

1. Casasnovas JM, Springer TA: Pathway of rhinovirus disruption by soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) : an intermediate in which ICAM-1 is bound and RNA is released. *J Virol* 1994; 68: 5882-5889.
2. Prchla E, Kuechler E, Blaas D, et al:

- Uncoating of human rhinovirus serotype 2 from late endosomes. *J Virol* 1994; 68: 3713-3723.
3. Terajima M, Yamaya M, Sekizawa K, et al: Rhinovirus infection of primary cultures of human tracheal epithelium: role of ICAM-1 and IL-1b. *Am J Physiol* 1997; 273: L749-L759.
  4. Jackson DD, Dowling HF, Spiesman IG, et al: Transmission of the common cold to volunteers under controlled conditions: I/ The common cold as a clinical entry. *Arch Intern Med* 1958; 101: 267-278.
  5. Rodrigues-Roisin R: Toward a consensus definition for COPD exacerbations. *Chest* 2000; 117: 398S-401S.
  6. Suzuki T, Yamaya M, Sekizawa K, et al: Bafilomycin A1 inhibits rhinovirus infection in human airway epithelium: effects on endosome and ICAM-1. *Am J Physiol* 2001; 280: L1115-L1127.
  7. Suzuki T, Yamaya M, Sekizawa K, et al: Type 2 rhinovirus infection of cultured human tracheal epithelial cells: role of LDL receptor. *Am J Physiol* 2001; 280: L409-L420.
  8. Khair OA, Devalia JL, Abdelaziz MM, et al: Effect of erythromycin on Haemophilis influenzae endotoxin-induced release of IL-6, IL-8 and sICAM-1 by cultured human bronchial epithelial cells. *Eur Respir J* 1995; 8: 1451-1457.
  9. Bayer N, Schober D, Prchla E, et al: Effect of bafilomycin A1 and nocodazole on endocytic transport in HeLa cells: implications for viral uncoating and infection. *J Virol* 1998; 72: 9645-9655.
  10. Pauling L: The significance of the evidence about ascorbic acid and the common cold. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68: 2678-2681.
  11. Hemila H: Vitamin C supplementation and the common cold: was Linus Pauling right or wrong? *Can Fam Physician* 1988; 44: 1037-1042.
  12. Lewis JK, Bothner B, Smith TJ, et al: Antiviral agent blocks breathing of the common cold virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 6774-6778.
  13. Hayden FG, Hipskind GJ, Woerner DH, et al: Intranasal pirodavir (R77,975) treatment of rhinovirus colds. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 290-294.
  14. Turner RB, Wecker MT, Pohl G, et al: Efficacy of tremacamra, a soluble intercellular adhesion molecule 1, for experimental rhinovirus infection: a randomized clinical trial. *JAMA* 1999; 281: 1797-1804.
  15. Suzuki T, Yanai M, Yamaya M, et al: Erythromycin and common cold in COPD. *Chest* 2001; 120: 730-733.
  16. Kudoh S, Azuma A, Yamamoto M, et al: Improvement of survival in patients with diffuse panbronchiolitis treated with low-dose erythromycin. *Am J respir Crit care Med* 1998; 157: 1829-1832.
  17. Satoh K, Suga M, Akaike T, et al: Therapeutic effects of erythromycin on influenza virus-induced lung injury in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 853-857.
  18. Clavo AJ, Giron JA, Lopez D, et al: Multivariate analysis of risk factors for infection due to penicillin-resistant and multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae*: a multicenter study. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 1052-1059.
  19. Rello J: Prescription of macrolides in community-acquired pneumonia: science or art? *Chest* 1998; 113: 1155-1158.

#### 図の説明

図 1. 培養液ライノウイルス 14 型 (A,C) および 2 型 (B,D) 量ともにエリスロマイシン (10  $\mu$ M) で減少する。2 型ライノウイルスは 24 時間以内 (B) では減少せず、エリスロマイシンの抑制効果が弱い。

- 図 2. 2 型 (A) および 14 型 (B) ライノウイルス感染による培養液サイトカイン (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) 量 (白バー) はエリスロマイシン (黒バー) で減少する。
- 図 3. ヒト気管上皮細胞の ICAM-1mRNA 発現は 14 型ライノウイルス感染で増加する (A,B)。また、LDL 受容体 mRNA 発現も 2 型ライノウイルス感染で増加する。ヒト気管上皮細胞の ICAM-1 発現 (A, B) はエリスロマイシン投与で 14 型ライノウイルス感染前および感染後に減少する。ヒト気管上皮細胞の LDL 受容体発現 (C, D) はエリスロマイシン投与で 2 型ライノウイルス感染後に減少する。
- 図 4. ヒト気管上皮細胞の酸性エンドゾームは蛍光色素で顆粒状に染色される (A)。酸性エンドゾームからの緑色蛍光は時間依存性にエリスロマイシンで減少する (B)。
- 図 5. ヒト気管上皮細胞における NF- $\kappa$ B 活性はライノウイルス感染で増加する。エリスロマイシンはライノウイルス感染前の NF- $\kappa$ B 活性、およびライノウイルス感染で増加した NF- $\kappa$ B 活性をともに抑制する。
- 表 1. エリスロマイシン内服 COPD (内服群) においては風邪の回数および急性増悪を生じた患者数ともに減少する。

表1

感冒および急性増悪の回数に及ぼすエリスロマイシンの抑制効果

	コントロール群 (n=54)	エリスロマイシン内服群 (n=55)
感冒の総回数 (回/年)	245	67
急性増悪の総回数 (回/年)	64	14

1

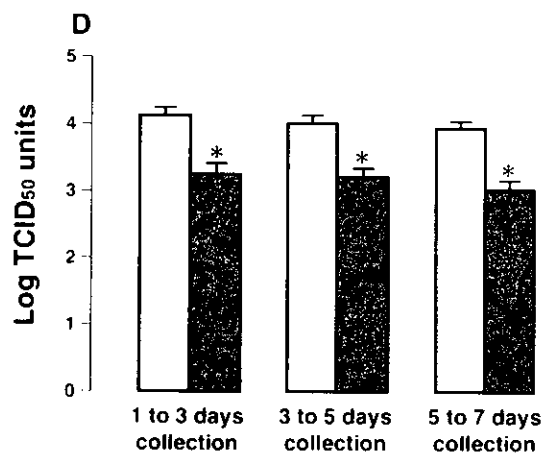
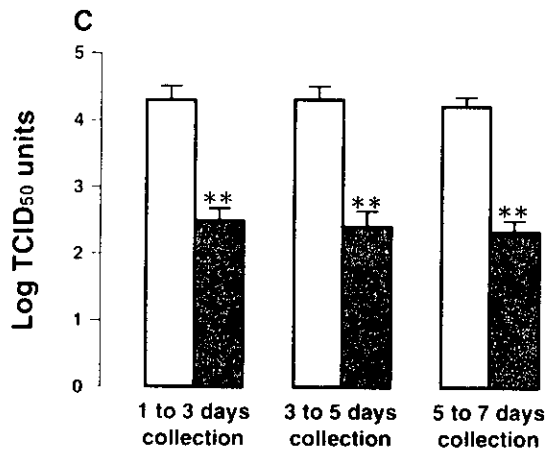
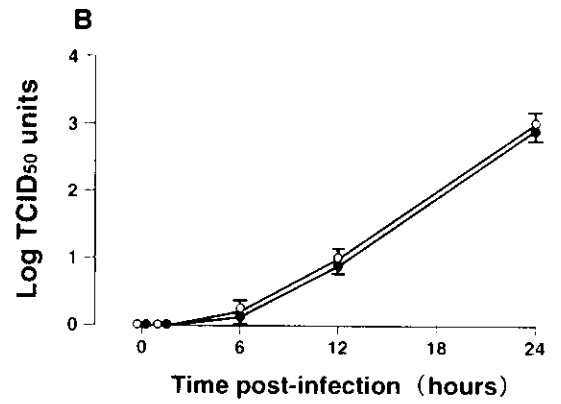
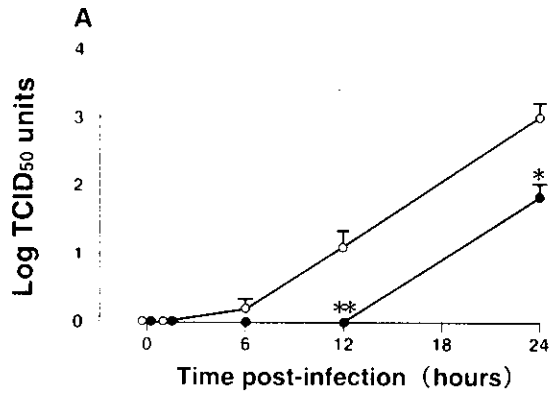


图 2

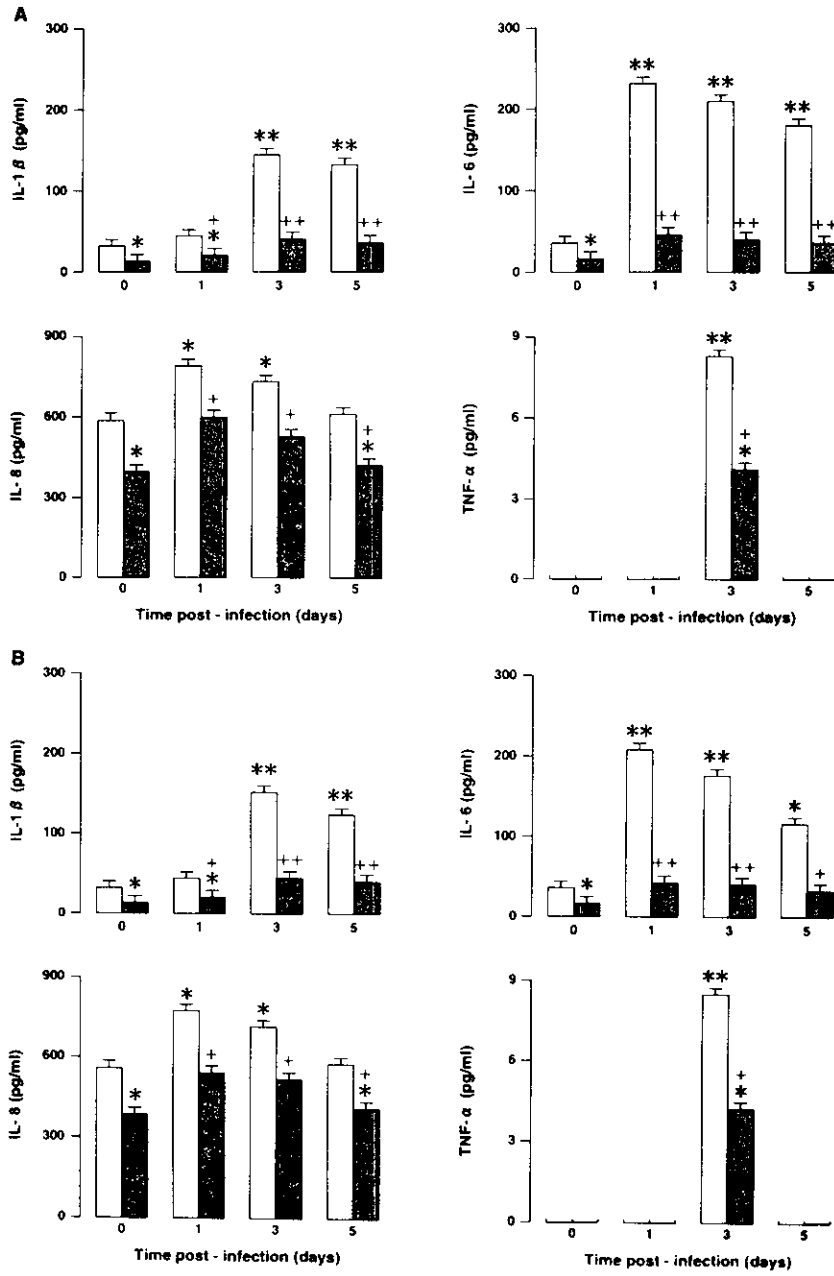
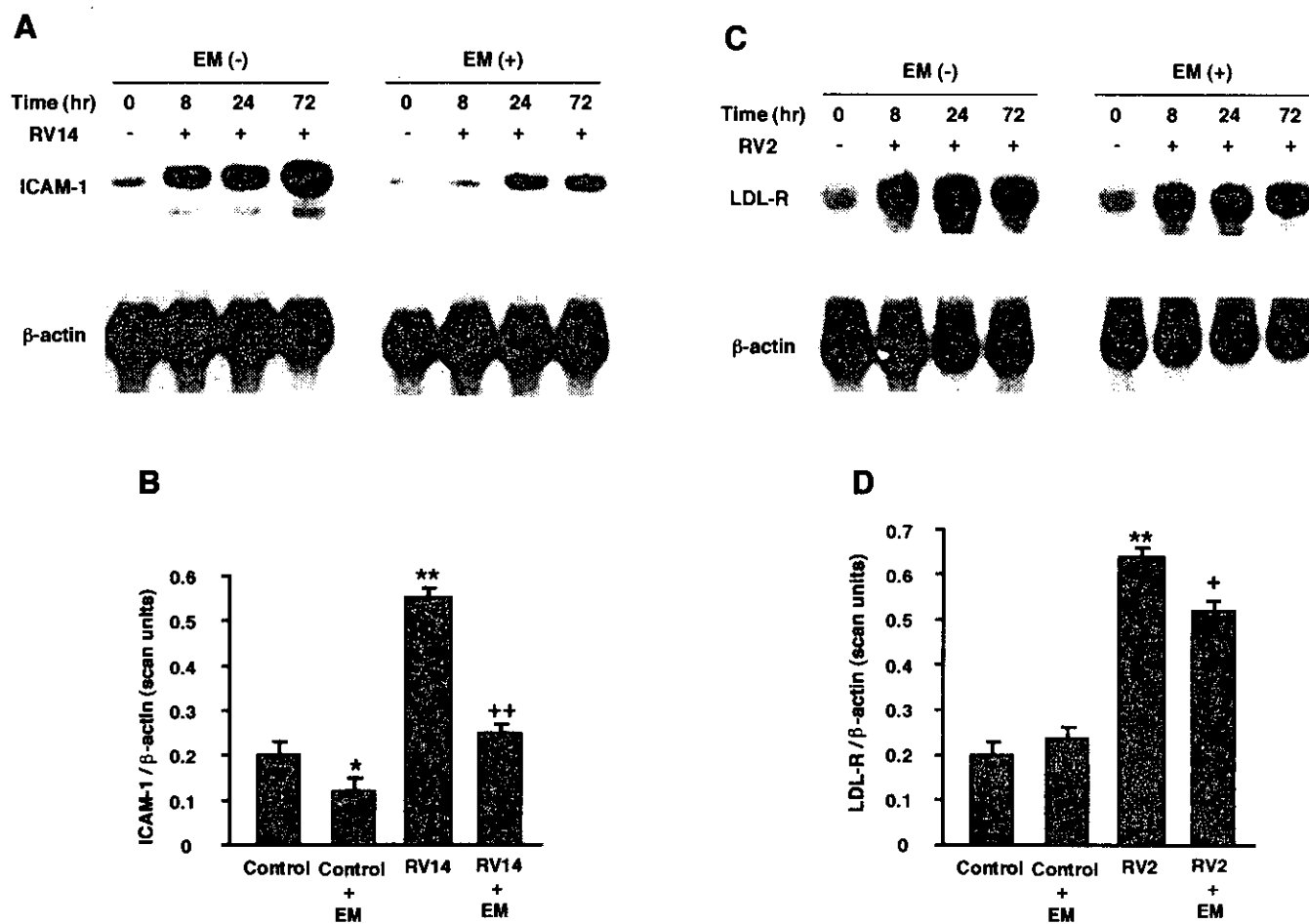
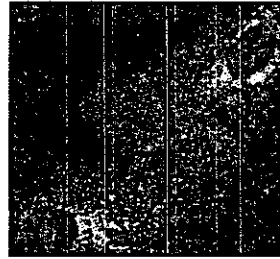


图 3

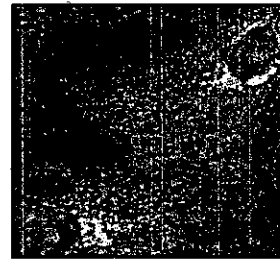


**A**

**Control**

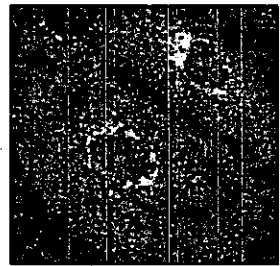


**-100s**

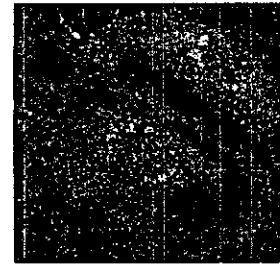


**300s**

**EM**



**-100s**



**300s**

**B**

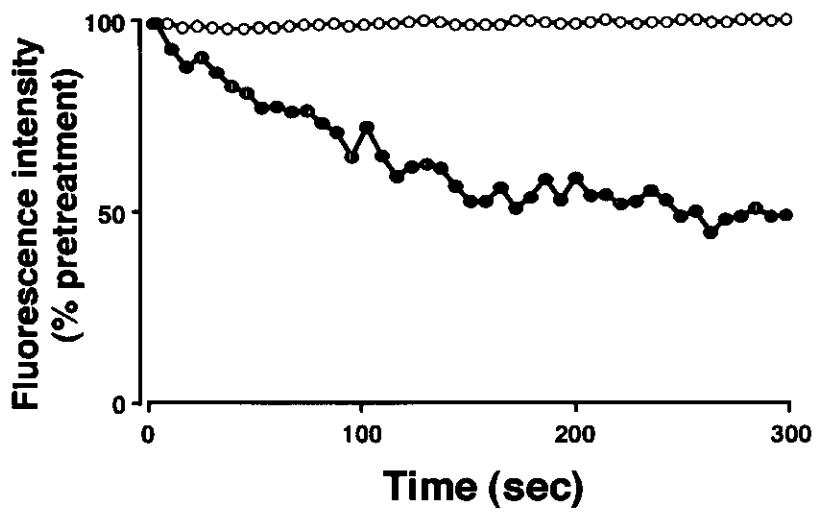
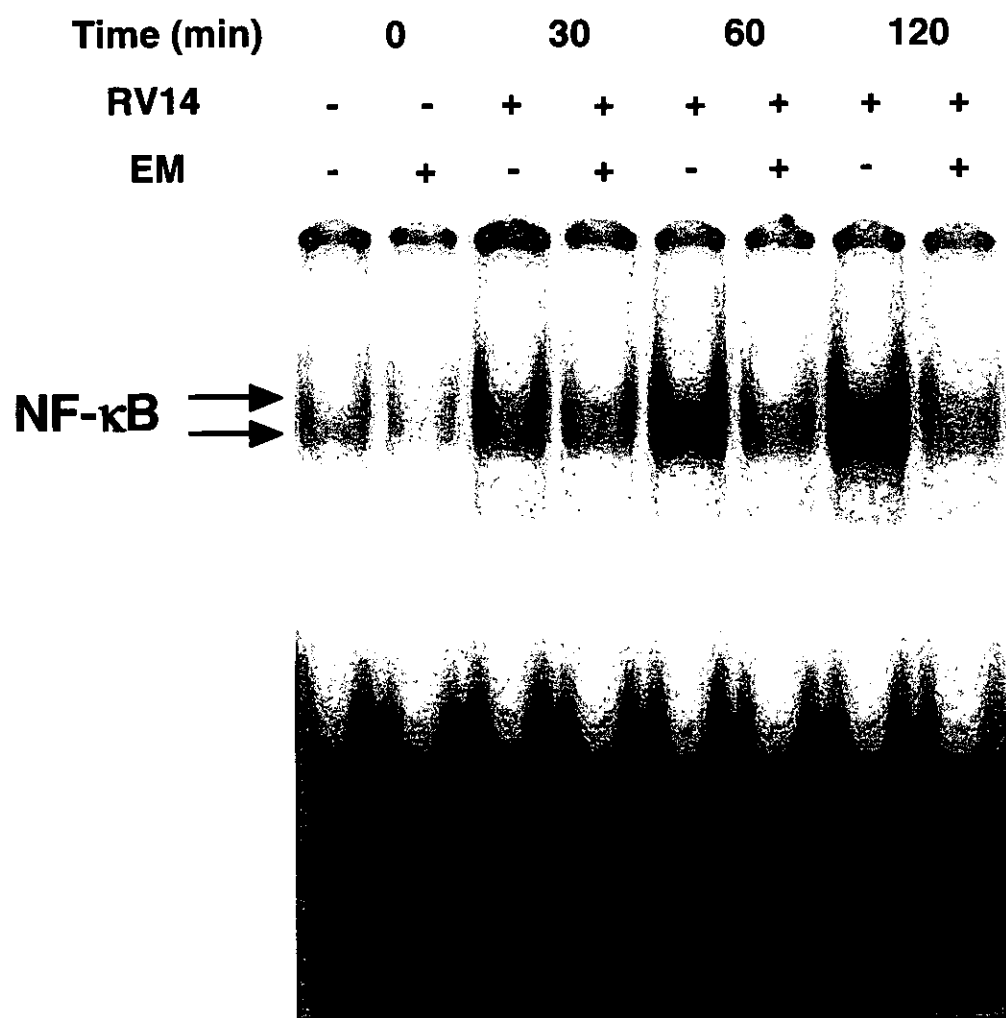




图 5



### 13. 慢性肺疾患における細菌の関与とその治療法の開発

分担研究者 村田 幸作（京都大学大学院農学研究科教授）

協力研究者 橋本 渉（京都大学大学院農学研究科）

**研究要旨** バイオフィルム感染症の治療法として、細菌が産生する酵素アルギン酸リアーゼ（A1-Ⅲ）を利用するためには、その抗原性の除去が不可欠である。本酵素のN末端側に特定された抗原エピトープに含まれるアミノ酸を、部位特異的変異によって他のアミノ酸に置換した変異酵素、及びそのポリエチレングリコール（PEG）修飾体の抗原性を検討した。A1-Ⅲと同様の機能を持つアルギン酸リアーゼ（A1-Ⅱ）についても検討した。また、A-Ⅲの抗原性エピトープの削除範囲を確定するため、本酵素の活性発現におけるタンパク質構造の寄与を詳細に検討した。また、バイオフィルム感染菌の転移を制御する方法論（ポリリン酸キナーゼとアルギン酸リアーゼで阻害剤の開発）の検討を開始した。

#### A. 研究目的

緑膿菌などの病原性細菌が人体に感染すると、感染局所において高粘性の多糖アルギン酸を分泌しバイオフィルムを形成する。このバイオフィルムは抗生物質などの効果を低減させるため、バイオフィルム感染症は難治性となる。バイオフィルム感染症の効果的な治療法は確立されていない。

本研究は、細菌が産生する酵素アルギン酸リアーゼをバイオフィルム感染症の治療に応用することを目的とする（図1）。

そのため、本酵素を無抗原化し、人体に適用可能な酵素を得るため、部位特異的変異による抗原エピトープのアミノ酸を置換した変異酵素を作製し、動物実験によりその安全性を評価する。また、アルギン酸リアーゼの構造と機能の相関をX線結晶構造解析により決定し、抗原性エピトープの削除可能領域に関する情報を得る。

#### B. 研究方法

細菌スフィンゴモナス属細菌 A1 株の酵素アルギン酸リアーゼ A1-Ⅲ（分子量 40kDa）の抗原性部位に存在する数種のアミノ酸を、部位特異的変異法により他のアミノ酸に置換した変異酵素を作製した。これを大腸菌で大量発現させ、精製した酵素を直接、及び PEG 修飾後、モルモットによる抗原性（アナフィラキシー）試験に供した。PEG 修飾と動物試験は、既に報告した方法に従って行った。アナフィラキシー実験は、以下のように行った。モルモットは、6 週齢の Crj; Hartley 系統を日本チャールス・リバー株式会社より購入した。モルモット 1 匹あたり 1 ゲージを用いて、温度（～20℃）、湿度（～50%）、明暗 12 時間ごとに制御された京都大学大学院農学研究科動

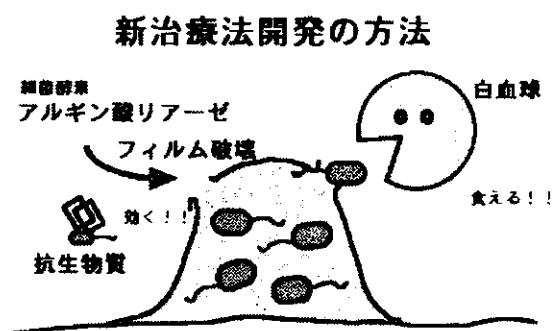


図1 バイオフィルム感染症の新規治療法

物実験室にて飼育を行った。水及び飼料（オリエンタル酵母社製：GOC4）は、自由摂取させた。モルモット 1 匹あたり、1mg の野生型と変異 A1-III、野生型 A1-II、及び陽性対照として卵白アルブミン（OVA）をフロイントの完全アジュバント添加系で背部皮下注射により投与した。投与は 5 日間間隔で、合計 3 回行った。最終免疫から 2 週間後に、後肢静脈注射により大量投与（5mg）を行いアナフィラキシー誘発性を検討した。同じ A1 株が生産する酵素アルギン酸リアーゼ A1-II（分子量 25kDa）も、同様にモルモットを用いた抗原性試験に供した。また、酵素の抗原性除去のための削除可能範囲を特定するため、X線結晶構造解析と生化学的方法で反応機構を詳細に検討した。（倫理面への配慮）動物実験は、京都大学大学院農学研究科の動物実験ガイドラインに則って行った。

### C. 研究結果

部位特異的変異で調製したアルギン酸リアーゼ A1-III 変異体 4 種類（S27A、Q29A、D32A、K40A）の中、Q29A と D32A 変異体には、明らかな抗原性発現の遅延が認められた。そこで、この変異体に PEG 修飾（Lys 残基の 80% を修飾・残存活性 60%）を施し、更に安全性に関する詳細な検討を加えたが、抗原性を完全に除去するには至らなかった。一方、アルギン酸リアーゼ A1-II には比較的強い抗原性が認められた。酵素の反応機構を詳細に解析した結果、活性中心とは離れた部位にあるループ（N）末端側 64～84 番までのアミノ酸残基よりなるループが柔軟に運動し、基質アルギン酸の触媒中心への固定に重要な機能を有していることを明らかにした。

### D. 考察

酵素 A1-III の抗原性部位を N 末端の 27Ser から 44Cys の約 15 アミノ酸残基に特定した（図 2）。

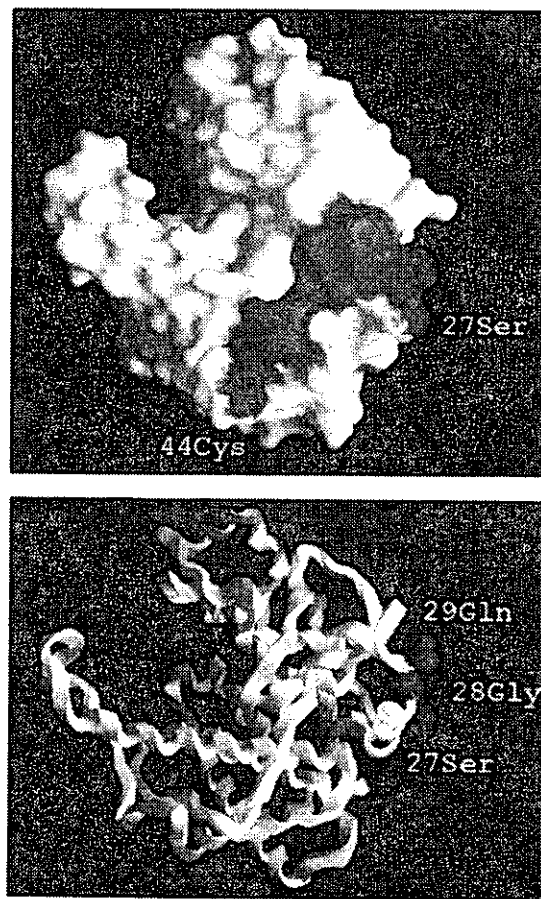


図 2 A1-III 抗原性エピトープ部位

抗原性エピトープに存在するアミノ酸の抗原性への寄与度（タンパク質表面への露出度）をコンピューターで予測した（表 1）。

表 1 アミノ酸の抗原性への寄与度

残基番号- アミノ酸	表面露出度 (%)	残基番号- アミノ酸	表面露出度 (%)
27Ser	77	36Ala	66
28Gly	81	37Ala	12
29Gln	98	38Leu	41
30Leu	23	39Pro	22
31Asp	30	40Lys	81
32Asp	75	41Glu	47
33Arg	10	42Tyr	34
34Leu	0	43Asp	57
35Lys	57	44Cys	7

その結果に基づき、抗原性スコアの高い3種類のアミノ酸残基を対象にして部位特異的変異による変異酵素 (S27A, Q29A, 及び D32A) を作出し、大腸菌で大量発現させ、精製した。また、その中の Q29A 酵素に関しては、PEG2000 によって化学修飾し、活性を充分保持した状態で *in vitro* での抗原性が顕著に低下した標品を得た (図 3)。

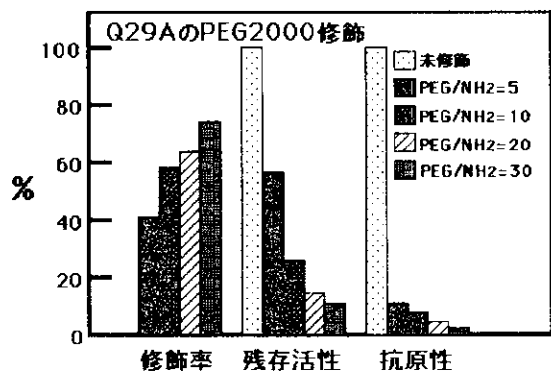


図 3 Q29A の PEG2000 による化学修飾

これらの変異酵素をモルモットを用いた安全性評価試験に供した。対象として用いた OVA では、モルモットは即死したが、D32A と Q29A ではアナフィラキシーは野性型の A1-III よりはるかに軽減した。しかし、抗原性を完全に除くまでには至らなかった。A1-III と一次構造上の相同性を全く示さないアルギン酸リアーゼ A1-II は、A1-III よりも分子サイズが小さいが、比較的強い抗原性を示した。

抗原性を除去する手段として、抗原性エピトープの大幅除去が考えられる。そこで、活性発現における酵素の構造上の関与を検討した。アルギン酸リアーゼ III は、2つの  $\alpha_6/\alpha_5$  バレル構造から成り、そのクレフトに高分子アルギン酸を結合する。触媒中心に位置している His192 を Ala に、Tyr246 を Phe に置換したアルギン酸リアーゼ III の変異酵素のホロ型の構造を決定した。最終モデルは 352 個のアミノ酸、2 個の S-S 結合を含んでおり、その構造をアポ型 (アルギン酸を含まない) の構造と比較した (図 4)。

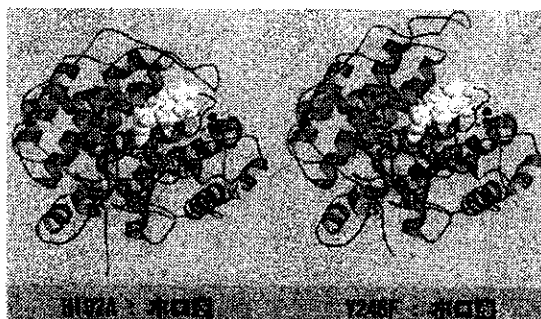


図 4 H192A, Y246F のホロ型構造

その結果、N末端側 64 から 84 番までの 20 個のアミノ酸残基から成るループが特徴的な動きをしていることが判明した。このループは、クレフト上部から内側に移動し、アルギン酸をトンネル様クレフトの内部に閉じ込める様に動いた。つまり、アルギン酸リアーゼ III の触媒中心に基質アルギン酸が結合するとループが 10 度、最大で 16 度閉じて基質を閉じ込め、反応が終わるとループを再び開いて反応産物を遊離させ、次の基質を受け入れる。この反復により、リアーゼ反応が進行することを明らかにした (図 5)。

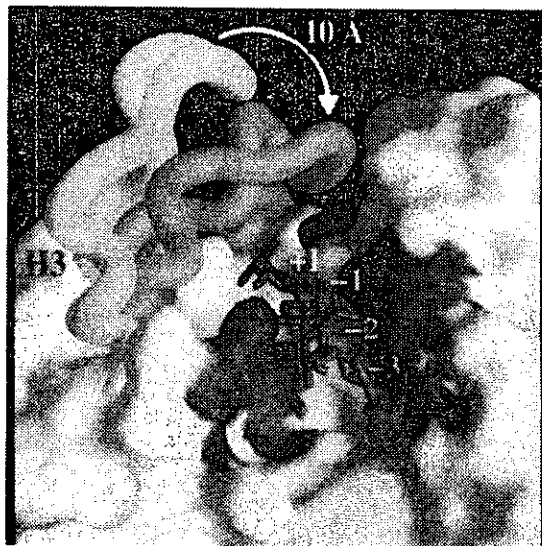


図 5 A1-III のループ構造

アルギン酸リアーゼ III の活性中心のモデルを図 6 に示した。