

- いた *Aspergillus fumigatus* の細胞表層および分泌蛋白質の網羅的同定.  
第 52 回日本医真菌学会総会、長崎、2008.
- 2) 大川原明子、山越 智、橋本ゆき、大野秀明、新見昌一、宮崎義継  
*C. albicans* 細胞壁表層のマナン構造の違いによる初期免疫応答の解析.  
第 52 回日本医真菌学会総会、長崎、2008.
- 3) 田辺公一、中山浩伸、山越 智、知花博治、新見昌一、宮崎義継  
*Candida glabrata* ステロールトランスポーターのアゾール剤耐性化における役割.  
第 52 回日本医真菌学会総会、長崎、2008.
- 4) 山越 智、大川原明子、田辺公一、新見昌一、大野秀明、宮崎義継  
SST-REX (signal sequence trap by retrovirus-mediated expression screening) 法を用いた *Aspergillus fumigatus* の細胞表層および分泌蛋白質の網羅的同定.  
第 8 回糸状菌分子生物学コンファレンス、金沢、2008.
- 5) 田辺公一、名木 稔、中山浩伸、山越智、台由紀、知花博治、新見昌一、宮崎義継  
*Candida glabrata* ステロールトランスポーターによるアゾール剤耐性化  
第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会、神戸、2008.
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

## 8. COPD等における難治性感染症の病態把握等に関する研究

～新たな抗原検索と診断応用に関する研究～

研究分担者 泉川公一 長崎大学大学院医歯薬総合研究科 感染免疫学

### 研究要旨

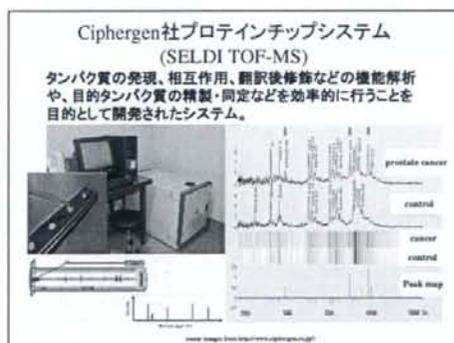
COPDや結核後遺症などの慢性呼吸器疾患を有する患者における難治性感染症の一つである肺アスペルギルス症について、診断には真菌培養検査のほか、血清診断などがあるが、その診断率は低く信頼性が低いため新たな診断法が必要である。プロテインチップシステム・プロテオミクスを用い、アスペルギルス由来の新たな新規抗原を検索したところ、アスペルギルスの抽出タンパクのうち、ユビキチン様タンパクがアスペルギルス感染症の診断マーカーとなる可能性が示された。現在、本タンパクに対する抗体作成を行っており、新規診断法として開発を進めている。

### A. 研究目的

COPD 等における難治性感染症として肺アスペルギルス症があげられるが、その診断率は低く、精度の高い診断システムが求められている。本研究は、プロテインチップシステム・プロテオミクスを用い、アスペルギルス感染症の早期に原因菌由来の特異タンパク質を検出・同定し、臨床的に応用できる診断系を確立することが目的である。

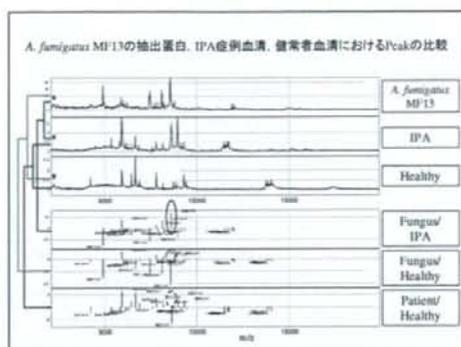
### B. 研究方法

肺アスペルギルス症の患者血清（感染群と非感染群）とアスペルギルス菌体からのタンパク収集、プロテインチップシステムを用いた臨床プロテオミクス（タンパク質のプロファイリング）を行い、診断マーカーの候補となるピーク（タンパク）を選定、精製とアミノ酸シーケンスを行い、同定する。本新規抗原に対する抗体の作成とELISA法にて確立、臨床検体での再評価（他の診断法との比較・検討（特異度、感度など）を行う。



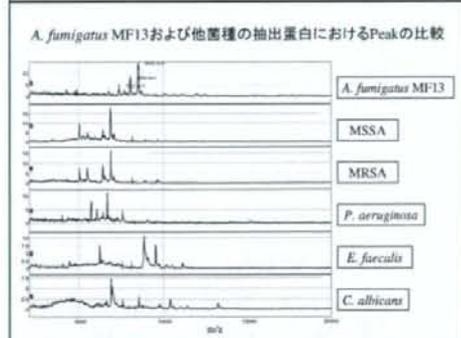
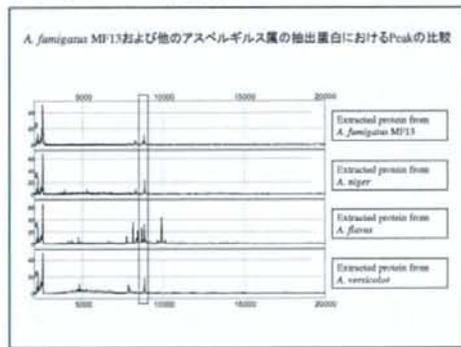
### C. 研究結果

1) アスペルギルス菌由来のタンパク抽出、並びに、実際の患者血清、健常人の血清を用いたタンパクのプロファイリング



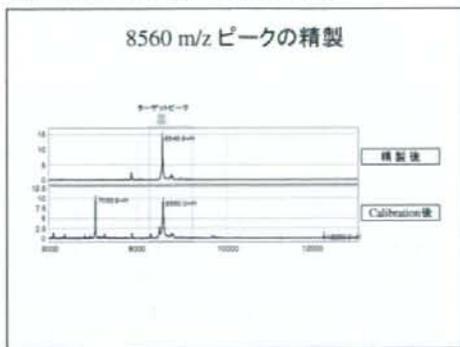
アスペルギルス感染患者の血清にのみ認められ、健常人には認められず、かつ、アスペルギルス抽出タンパクにも認められる特異タンパクのピークを複数発見できた。

2) アスペルギルス属の菌種間や他菌種間によるピークの差異



アスペルギルス属間や他の病原微生物の菌由来の抽出タンパクとの比較も併せて検討し、候補となるタンパク(分子量:8560m/z)がアスペルギルス由来の特異抗原である可能性が高いことが示された。

3) 標的タンパクの精製、同定



ポリアクリルアミドゲルを用いた二次元電気泳動法、peptide mass fingerprint法、アミノ酸シーケンスを行い、本タンパクがアスペルギルス由来のユビキチン様タンパクであることが判明した。

D. 結論と今後の予定

プロテインチップシステム・プロテオミクスを用いたタンパクのプロファイリングにて、肺アスペルギルス症においては、アスペルギルス菌由来のユビキチン様タンパクが新しい抗原として、診断のマーカーとなる可能性があることが示された。ただし、ユビキチンは進化的な保存性が高く、すべての真核生物で似たようなアミノ酸配列を有するために、ヒト由来のユビキチンとの鑑別が必要であり、現在、アスペルギルス由来のユビキチンを検出できる抗体を作成中である。将来的に、患者血清などの臨床検体での評価やELISA法による迅速診断キット開発までを予定している。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

1. 論文発表
1. Melting curve analysis for rapid detection of topoisomerase gene mutations in Haemophilus influenzae. Nakamura S, Yanagihara K, Morinaga Y,

- Izumikawa K, Seki M, Takeya H, Yamamoto Y, Kamihira S, Kohno S. *J Clin Microbiol.* 2009 Jan 7.
2. A clinical comparative study of piperacillin and sulbactam/ampicillin in patients with community-acquired bacterial pneumonia. Seki M, Higashiyama Y, Imamura Y, Nakamura S, Kurihara S, Izumikawa K, Takeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Tashiro T, Kohno S. *Intern Med.* 2009;48(1):49-55.
  3. [Candidiasis] Imamura Y, Izumikawa K, Kohno S. *Nippon Rinsho.* 2008 Dec;66(12):2341-4.
  4. [Efficacy of sivelestat for acute lung injury due to severe bacterial pneumonia with systemic inflammatory response syndrome] Nakamura S, Yanagihara K, Izumikawa K, Seki M, Takeya H, Yamamoto Y, Mukae H, Tashiro T, Kohno S. *Nihon Kogyoku Gakkai Zasshi.* 2008 Oct;46(10):793-7.
  5. A patient with fulminant influenza-related bacterial pneumonia due to *Streptococcus pneumoniae* followed by *Mycobacterium tuberculosis* infection. Seki M, Suyama N, Hashiguchi K, Hara A, Kosai K, Kurihara S, Nakamura S, Yamamoto K, Imamura Y, Izumikawa K, Kakaya H, Yanagihara K, Yamamoto Y, Mukae H, Tashiro T, Kohno S. *Intern Med.* 2008;47(23):2043-7.
  6. [Clinical characteristics of pneumonia in the oldest old patients] Nakamura S, Yanagihara K, Mihara T, Izumikawa K, Seki M, Takeya H, Yamamoto Y, Soejima Y, Tashiro T, Kohno S. *Nihon Kogyoku Gakkai Zasshi.* 2008 Sep;46(9):687-92.
  7. Pulmonary Cryptococcosis in Late Pregnancy and Review of Published Literature. Nakamura S, Izumikawa K, Seki M, Takeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kohno S. *Mycopathologia.* 2008 Oct 18.
  8. In vivo efficacy and pharmacokinetics of tomopenem (CS-023), a novel carbapenem, against *Pseudomonas aeruginosa* in a murine chronic respiratory tract infection model. Morinaga Y, Yanagihara K, Nakamura S, Yamamoto K, Izumikawa K, Seki M, Takeya H, Yamamoto Y, Yamada Y, Kohno S, Kamihira S. *J Antimicrob Chemother.* 2008 Dec;62(6):1326-31.
  9. *Mycobacterium avium* pleuritis in a non-immunocompromised patient. Kakugawa T, Mukae H, Kajiki S, Tanaka A, Yamayoshi T, Inoue M, Ohtani H, Sakamoto N, Izumikawa K, Tasaki H, Ooe N, Kohno S. *Intern Med.* 2008;47(19):1727-31.
  10. A case of *Legionella pneumophila* pneumonia followed by invasive aspergillosis. Saijo T, Izumikawa K, Takazono T, Kosai K, Kurihara S, Nakamura S, Imamura Y, Miyazaki T, Seki M, Takeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Fukushima K, Kohno S. *Jpn J Infect Dis.* 2008 Sep;61(5):379-81.
  11. The roles of the quorum-sensing

- system in the release of extracellular DNA, lipopolysaccharide, and membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* Nakamura S, Higashiyama Y, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Mizuta Y, Kohno S. *Jpn J Infect Dis.* 2008 Sep;61(5):375-8.
12. Lung fibrosis 10 years after cessation of bleomycin therapy. Tashiro M, Izumikawa K, Yoshioka D, Nakamura S, Kurihara S, Sakamoto N, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Mukae H, Hayashi T, Fukushima K, Tashiro T, Kohno S. *Tohoku J Exp Med.* 2008 Sep;216(1):77-80.
  13. Efficacy of ME1036 against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-insensitive *S. aureus* in a model of haematogenous pulmonary infection. Yanagihara K, Ohnishi Y, Morinaga Y, Nakamura S, Kurihara S, Seki M, Izumikawa K, Kakeya H, Yamamoto Y, Yamada Y, Kohno S, Kamihira S. *Int J Antimicrob Agents.* 2008 Nov;32(5):401-4.
  14. A 52-year-old male with fever and rapidly progressive dyspnea. Nakamura S, Yanagihara K, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Kohno S. *Respiration.* 2008;76(4):454-7.
  15. [Detection methods and changes in metallo-beta-lactamase-producing Gram-negative rod isolates at Nagasaki University Hospital from 1991 to 2005] Hirakata Y, Yanagihara K, Matsuda J, Izumikawa K, Yamaguchi T, Takemura H, Tanaka H, Yoshida R, Aoki S, Kondoh A, Yamamoto K, Kaku M, Yamaguchi K, Kohno S. *Kansenshogaku Zasshi.* 2008 Jul;82(4):285-91.
  16. An autopsy case of *Erysipelothrix rhusiopathiae* endocarditis. Yamamoto Y, Shiohita K, Takazono T, Seki M, Izumikawa K, Kakeya H, Yanagihara K, Tashiro T, Otsuka Y, Ohkusu K, Kohno S. *Intern Med.* 2008;47(15):1437-40.
  17. Single-cell observation of phagocytosis by human blood dendritic cells. Ishimoto H, Yanagihara K, Araki N, Mukae H, Sakamoto N, Izumikawa K, Seki M, Miyazaki Y, Hirakata Y, Mizuta Y, Yasuda K, Kohno S. *Jpn J Infect Dis.* 2008 Jul;61(4):294-7.
  18. Severe pulmonary tuberculosis complicating ileocecal intussusception due to intestinal tuberculosis: a case report. Nakamura S, Yanagihara K, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Miyazaki Y, Suyama N, Kohno S. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2008 Jul 13;7:16.
  19. A case of pulmonary cryptococcosis followed by pleuritis in an apparently immunocompetent patient during fluconazole treatment. Izumikawa K, Zhao Y, Motoshima K, Takazono T, Saijo T, Kurihara S, Nakamura S, Miyazaki T, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Hayashi T, Kohno S. *Med Mycol.* 2008 May 9;1-5.

20. Spontaneous pyogenic spondylitis caused by *Klebsiella pneumoniae*. Kosai K, Seki M, Yanagihara K, Imamura Y, Nakamura S, Kurihara S, Izumikawa K, Kakeya H, Yamamoto Y, Tashiro T, Kohno S. *Intern Med.* 2008;47(12):1121-4.
21. Severe Legionnaires' disease successfully treated using a combination of fluoroquinolone, erythromycin, corticosteroid, and sivelestant. Kakeya H, Ehara N, Fukushima K, Seki M, Izumikawa K, Yamamoto Y, Yanagihara K, Saito A, Kohno S. *Intern Med.* 2008;47(8):773-7.
22. Reversible visual disturbance due to cryptococcal uveitis in a non-HIV individual. Nakamura S, Izumikawa K, Seki M, Fujimoto K, Mishima K, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Mizuta Y, Kitaoka T, Kohno S. *Med Mycol.* 2008 Jun;46(4):367-70.
23. Potency of SMP-601, a novel carbapenem, in hematogenous murine bronchopneumonia caused by methicillin-resistant and vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. Kihara R, Yanagihara K, Morinaga Y, Araki N, Nakamura S, Seki M, Izumikawa K, Kakeya H, Yamamoto Y, Tsukamoto K, Kamihira S, Kohno S. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Jun;52(6):2163-8.
24. Gabexate mesilate suppresses influenza pneumonia in mice through inhibition of cytokines. Kosai K, Seki M, Yanagihara K, Nakamura S, Kurihara S, Izumikawa K, Kakeya H, Yamamoto Y, Tashiro T, Kohno S. *J Int Med Res.* 2008 Mar-Apr;36(2):322-8.
25. Two-dimensional gel electrophoresis analysis in simultaneous influenza pneumonia and bacterial infection in mice. Kosai K, Seki M, Yanagihara K, Nakamura S, Kurihara S, Imamura Y, Izumikawa K, Kakeya H, Yamamoto Y, Tashiro T, Kohno S. *Clin Exp Immunol.* 2008 May;152(2):364-71.
26. Comparison of usefulness of plasma procalcitonin and C-reactive protein measurements for estimation of severity in adults with community-acquired pneumonia. Hirakata Y, Yanagihara K, Kurihara S, Izumikawa K, Seki M, Miyazaki Y, Kohno S. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008 Jun;61(2):170-4.
27. Efficacy of SPK-843, a novel polyene antifungal, in comparison with amphotericin B, liposomal amphotericin B, and micafungin against murine pulmonary aspergillosis. Kakeya H, Miyazaki Y, Senda H, Kobayashi T, Seki M, Izumikawa K, Yanagihara K, Yamamoto Y, Tashiro T, Kohno S. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 May;52(5):1868-70.
28. Efficacy of SPK-843, a novel polyene antifungal, in a murine model of systemic cryptococcosis. Kakeya H, Miyazaki Y, Senda H, Kobayashi T, Seki M, Izumikawa K, Yamamoto Y, Yanagihara K, Tashiro T, Kohno S. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 May;52(5):1871-2.

29. Subinhibitory concentrations of telithromycin, clarithromycin and azithromycin reduce methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* coagulase in vitro and in vivo. Yanagihara K, Morinaga Y, Nakamura S, Seki M, Izumikawa K, Kakeya H, Yamamoto Y, Yamada Y, Kamihira S, Kohno S. *J Antimicrob Chemother.* 2008 Mar;61(3):647-50.

2. 学会発表

1. 第 82 回日本感染症学会総会 ミニ特別講演「私たちの研究は今 肺真菌症の診断と治療」
2. 第 48 回日本呼吸器学会総会 イブニングシンポジウム「呼吸器内科における深在性真菌症（特に治療について）」神戸
3. 第 52 回日本医真菌学会総会 シンポジウム「The Frontline of Respiratory

Fungal Infections in JAPAN」

4. 第 55 回日本化学療法学会東日本地方会 教育セミナー「市中肺炎における注射用ニューキノロン系薬」
5. 第 56 回日本化学療法学会西日本支部総会・第 78 回日本感染症学会西日本支部総会 合同シンポジウム「感染制御の新時代に向けて：基礎・臨床・コメディカルのパートナーシップー真菌へのアプローチ」

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 9. 慢性壊死性肺アスペルギルス症における 微生物側の病原因子に関する検証

分担研究者 亀井 克彦 千葉大学真菌医学研究センター  
病原真菌研究部門 真菌感染分野

研究協力者 豊留 孝仁 同

研究要旨 肺気腫では肺胞腔の拡大を伴い、その肺胞腔がときに糸状菌の感染巣となって慢性壊死性肺アスペルギルス症(CNPA)を引き起こす。*A. fumigatus* はCNPAの重要な原因菌であり、本菌の病原因子とその感染成立の機構を解明することは本感染症の基盤的知見を得ることのみならず、本感染症治療法や治療薬開発にも役立つものと期待できる。本研究課題では *A. fumigatus* の生育における血清添加の影響について検討し、バイオフィーム様構造物の構築が血清添加により促進することを確認した。またこの構造物構築に重要な役割を果たす血清成分として fetuin を同定した。今回の成果を元にさらなる検討を進め、宿主側のバイオフィーム様構造物構築のための因子が明らかとなれば、CNPA の治療法や治療薬開発に役立つことが期待される。

### A. 研究目的

肺気腫は慢性気管支炎と並び COPD の代表的疾患である。肺気腫では肺胞壁の破壊を伴い、この肺胞壁の破壊により肺胞腔が著しく拡大する。このような拡大した肺胞腔内では病原真菌の胞子が侵入しても、宿主側の防御機構により十分に排除ができず感染が成立する。このような感染において原因となる真菌の中では *Aspergillus fumigatus* によるものが最も重要であり、慢性壊死性肺アスペルギルス症(CNPA)として知られている。本感染症は COPD に合併する感染症として重要な位置を占めているにも関わらず、その感染機構や真菌側の病原因子の詳細はほとんど分かっていない。

本研究では上述のような慢性感染の局所において *A. fumigatus* が接する宿主血清成分が感染成立や病原因子の発現に寄与していると考え、検討を行った。

### B. 研究方法

#### 1. 使用菌株

本研究では千葉大学真菌医学研究センター保存の臨床分離株である *A. fumigatus* IFM49896 株を用いた。

#### 2. *A. fumigatus* の分生子回収

*A. fumigatus* を PDA スラントに接種し 25℃ にて 2 週間培養して十分な胞子形成を得た後、0.05% Tween-20 を添加し、その溶液中に分生子を懸濁した。懸濁液は 3G3 ガラス濾過器(岩城硝子)により濾過し、菌糸を除去した。0.05% Tween-20 にて 2 回洗浄を行い、最終的に得られた胞子懸濁液を実験に用いた。

#### 3. *A. fumigatus* の液体培地中での培養

培養には Dulbecco's modified

Eagle's (DME) 培地 (Sigma) を用いた。必要に応じて、ウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum: FBS; Invitrogen)、健常人血清等を添加した (詳細はそれぞれの項に記述)。35mm ディッシュに  $3 \times 10^5$  個もしくは6ウェルプレートに1ウェル当たり  $3.6 \times 10^5$  個の分生子を接種し、37℃、5%CO<sub>2</sub> 存在下で30時間培養を行った。

### 3. ファンギフローラ Y 染色

ファンギフローラ Y (バイオメイト) を用いた。染色は添付文書に従って行った。

### 4. 血清成分の分画

血清成分の分画には Centriprep YM-30 (Millipore) を用いた。遠心により限外濾過された画分を 30kDa 以下の画分として実験に用いた。一方、保持された画分は濃縮と DME での希釈を繰り返し、最終的に DME で初期血清と同容量とした。これにより、30kDa 以上の画分について濃度をほとんど変えずに、30kDa 以下の画分を除いた (計算上、720 倍に希釈)。これを 30kDa 以上の画分として以下の実験に用いた。

健常人血清は、健常成人ボランティアより採取、常法通り分離した血清を -80℃ にて保存し、適宜使用した。ボランティアからの採血およびその使用は、千葉大学真菌医学研究センター倫理委員会の定めるところに従って行なった (倫理面への配慮)。

### 4. 血清中糖タンパク質の分離

血清中の糖タンパク質分離には Glycoprotein Isolation kit, ConA/WGA (Pierce) を用いて、添付文書に従って糖タンパク質の分離を行った。

## C. 研究結果

### 1. FBS 存在下での *A. fumigatus* 培養によるバイオマスの増大

*A. fumigatus* を 30 時間培養後に観察し

たところ、FBS を添加した条件下ではバイオフィルム様の非常に厚い構造からなる菌塊を形成することが分かった (図 1a)。そこで得られた菌塊について乾燥重量を測定した結果、FBS 添加においておよそ 10 倍の菌体重量となっていることが明らかとなった (図 1b)。このことから FBS が *A. fumigatus* の生育を促進していることが強く示唆された。また、この現象はヒト健常人血清を用いても認められ、FBS 特異的な現象ではないことが明らかとなった (図 2)。

### 2. FBS 存在下での *A. fumigatus* 培養において菌体外多糖が確認される

FBS 添加もしくは非添加での培養において、*A. fumigatus* 菌体を一部取り、ファンギフローラ Y にて染色を行った。その結果、DME で培養した菌体は菌体部分のみが強く染色され、菌体外に染色される成分は認められなかった (図 3a)。一方、FBS を 10% 含む DME 培地で培養した *A. fumigatus* 菌体周囲には網状の被染色物質を認めた (図 3b)。ファンギフローラ Y は  $\beta$  構造を持つ糖鎖を染色することから、FBS 含有培地での培養により、菌体バイオマスが増大するのみならず、 $\beta$  構造からなる菌体外多糖が大量に産生されて菌体周囲に存在していることが明らかとなった。更に走査型電子顕微鏡での観察においても菌体外に膜状の構造物が確認された。

### 3. *A. fumigatus* 生育促進に関わる血清因子

血清添加により *A. fumigatus* の生育が大きく促進されることから、血清中にバイオマスを増大させる因子が存在することが強く示唆された。これまでに血清中に含まれる鉄イオンやアルブミンが *A. fumigatus* の生育を促進するとの報告があるが、我々のこれまでの検討ではアルブミンで一定の生育促進が認められるものの、血清を添加したような大幅な生育促進効果は得られな

かった。そこで新規の *A. fumigatus* 生育促進因子を同定するために以下の実験を行った。

Centriprep を用いた限外濾過により、FBS 中の 30kDa 以上の画分と 30kDa 以下の画分に分離した。これらの画分を添加し、同様に *A. fumigatus* を培養した。その結果、30kDa 以上の画分を添加した場合のみ FBS 添加時と類似のバイオマスの増大が構築された。

30kDa 以上の画分にはアルブミンが含まれているため、アルブミン以外の生育促進因子を同定するために、糖タンパク質を精製分離するキットを用いた。 $\alpha$  結合型マンノースと末端グルコースを認識するコンカナバリン A (ConA) と、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) とシアル酸を認識する小麦胚凝集素 (WGA) を用いて、ConA および WGA に結合する血清中糖タンパク質を 30kDa 以上の血清タンパク質画分より分離し、これらを添加した培地で *A. fumigatus* を培養した。その結果、ConA で分離したタンパク質画分を添加しての培養では DME のみでの培養と差は認められなかったが、WGA で分離したタンパク質画分を添加しての培養においては血清添加時と類似の生育を示すことが明らかとなった (図 4a)。この WGA により精製された糖タンパク質画分に生育を促進する因子が存在すると考え、ConA および WGA に結合したタンパク質画分を SDS-PAGE で展開した (図 4b)。二つの画分を比較した結果、55kDa 付近に含まれるタンパク質が WGA により精製された糖タンパク質画分にのみ多量に認められた。本タンパク質を質量分析により同定した結果、fetuin A ( $\alpha$ -2-HS-glycoprotein) であることが明らかとなった。

これらの結果から、fetuin A が生育促進に重要と考えられた。そこでウシ血清由来 fetuin を終濃度 2mg/ml となるように添加し、*A. fumigatus* 培養を行った。その結果、fetuin 添加により *A. fumigatus* の発育状

態は血清添加時と完全に同一にはならないものの、BSA 添加時に比べると明らかに血清添加時に近似した生育形態をとっていることが観察された。このことから血清中の fetuin が生育促進に重要な役割を果たしていることが強く示唆された。

#### D. 考察

*A. fumigatus* はその感染において、宿主の血液成分と接する可能性が高い。特に本菌は血管侵襲性が強く、血管内に侵入する像をしばしば認める。また、直接血管内に侵入していない場合でも、強い炎症を伴う感染においては組織破壊に並行して菌体が血液成分あるいはこれと類似した滲出液の成分にさらされる機会が増えるものと考えられる。血清中には補体などの抗真菌活性を有する成分が存在するが、同時に真菌が血清成分を有効に利用していることも報告されており、血清中のアルブミンは生育を促進する因子として報告されている。しかし、血清が *A. fumigatus* に及ぼす影響は十分に理解されているとはいえない。

今回の検討により、*A. fumigatus* が FBS 存在下において、そのバイオマスが大きく増大すること、またバイオフィーム様の非常に厚い構造を有する菌塊を形成することを明らかとした。このようなバイオフィーム様構造の構築は抗真菌薬の活性を低減させるなど、菌側に有利に働く可能性が高い。

更に血清中に含まれる生育促進因子の解析を進め、fetuin A を同定するとともに、ウシ血清由来 fetuin の添加により、FBS 添加時と類似の生育が見られたことを明らかにした。一方、予備的観察から fetuin 単独では FBS 添加時の生育形態との間にある程度の違いが残存していることも認められており、fetuin 以外の未知の血清成分が存在することが推測される。

今後は FBS や fetuin 添加時の生育について BioCell Tracer 等を用いた菌糸発育速度の定量的解析およびバイオフィーム様構造

物の微視的解析を進めていく予定である。また、並行してバイオフィーム様構造構築に関与する微生物側因子についてマイクロアレイ等を用いて探索なども検討している。

*A. fumigatus*のバイオフィーム様構造の構築は宿主防御能を妨害し、抗真菌薬による治療を難渋させる要因となっている可能性がある。今後の検討により、寄生体側のバイオフィーム様構造構築のための因子が明らかとなれば、慢性壊死性肺アスペルギルス症の治療法や治療薬開発へと発展しうるものと期待される。

#### E. 結論

今回の検討から、*A. fumigatus*をFBS添加した培地にて培養することにより、バイオフィーム様の非常に厚い構造を持つ菌塊を形成することが明らかとなった。また、FBS存在下での培養により菌体周囲には菌体外多糖成分が認められるようになり、これはバイオフィームの一つの特徴と重なる。

更に血清中の*A. fumigatus*生育促進因子の探索を行い、fetuin Aを同定した。精製fetuinの添加により、*A. fumigatus*が血清

添加時と類似の生育を示すことを確認した。

#### F. 健康危機情報：特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

準備中

##### 2. 学会発表

- 豊留孝仁, 渡辺哲, 落合恵理, 田口英昭, 亀井克彦: *Aspergillus fumigatus* 成長に血清が与える影響についての解析. 第82回日本感染症学会総会, 2008.
- 豊留孝仁, 渡辺哲, 田口英昭, 落合恵理, 亀井克彦: *Aspergillus fumigatus* 成長を促進する血清中因子の同定. 第57回日本感染症学会東日本地方学術集会, 第55回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会, 2008.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

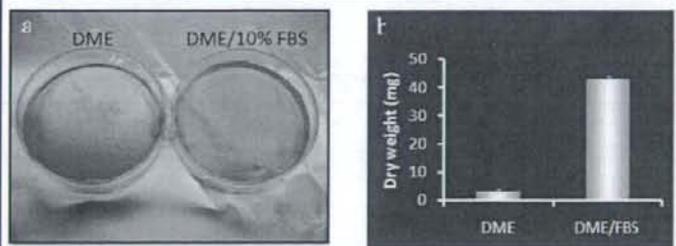


図 1: (a) DME のみでの培養に比べ、DME に 10%FBS を添加した場合はバイオフィーム様の厚い菌塊を形成する。(b) それぞれの培地で培養した菌体の乾燥重量。

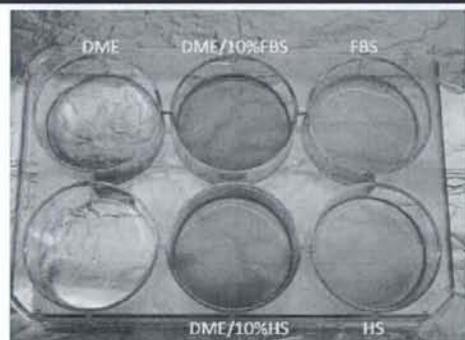


図 2: ヒト血清添加 (HS) においても FBS 添加時と同様の現象が見られる。

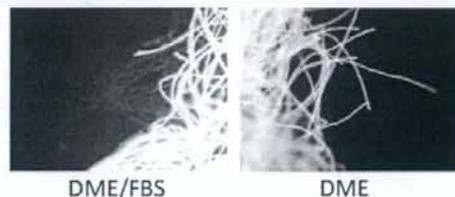


図 3: ファンギフローラ Y 染色像。FBS 添加培養時にはファンギフローラ Y 染色性の菌体外糖鎖が認められる。

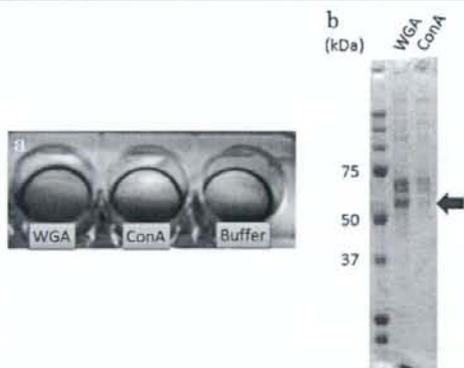


図 4: (a)WGA もしくは ConA で精製された血清糖タンパク質を添加して *A. fumigatus* を培養した像。WGA 添加群のみ FBS 添加時と類似の生育が観察された。(b)各血清糖タンパク質画分を電気泳動した像。それぞれの画分を比較すると矢印部分のタンパク質量が大きく違い、このタンパク質を質量分析で解析した結果、fetuin A であることが明らかとなった。

## 10. 肺炎球菌が産生したバイオフィームと莢膜の関連についての研究

分担研究者 渡邊 浩 (久留米大学医学部 感染医学講座 臨床感染医学部門)

研究協力者 秦 亮 (久留米大学医学部 感染医学講座 臨床感染医学部門)

研究要旨 肺炎球菌が産生したバイオフィームと莢膜の関連について検討した。ゲノム配列が解読されている TIGR4 野生株にアンピシリン及びストレプトマイシン耐性遺伝子をもつプラスミドを莢膜形成に関与する cps4D 遺伝子に組み込み、莢膜を損傷させた TIGR4 変異株を作成し、野生株と変異株の間でバイオフィーム産生を比較検討した。Microtiter biofilm assay における OD<sub>595</sub> 平均値は野生株が 0.35 であるのに対し、変異株は 2.27 と変異株で有意なバイオフィーム産生能が確認された。continuous flow cell chamber を用いた confocal laser scanning microscopy による検討においても、産生されたバイオフィームの厚さが野生株では 27 μm であるのに対し、変異株では 40 μm と変異株において有意なバイオフィーム産生が認められた。肺炎球菌が産生するバイオフィームには莢膜は抑制的に作用していることが示唆された。

### A. 研究目的

近年、人に中耳炎、下気道感染症、髄膜炎などを引き起こすことがある肺炎球菌がバイオフィームを産生するという報告がなされるようになった。我々は、肺炎球菌のバイオフィーム産生の機序の解明を目的とし、同菌の産生したバイオフィームと莢膜の関連について基礎的研究を行った。

### B. 研究方法

ゲノム配列が解読されている TIGR4 野生株にアンピシリン及びストレプトマイシン耐性遺伝子をもつプラスミドを莢膜形成に関与する cps4D 遺伝子に組み込み、莢膜を損傷させた TIGR4 変異株を作成した。野生株及び変異株を 96 穴マイクロプレートに接種して 24 時間培養し、Microtiter biofilm assay によるバイオフィーム産生の検討を行った。また、continuous flow cell chamber 内にそれぞれの菌を 2 時間接種後に 24 時間培養し、confocal laser scanning microscopy によるバイオフィームの観察を行った。

### C. 研究結果

ラテックス凝集法により、野生株は血清型 4 型であるが、変異株は 4 型を示さなくなっていた。野生株はアンピシリン及びストレプトマイシンが入った培地では発育がみられなかったが、変異株は発育が認められた。また、走査型電子顕微鏡による観察では変異株は野生株に比べ表面構造がスムーズとなっており、莢膜が薄くなっていることが示唆された。Microtiter biofilm assay では OD<sub>595</sub> 平均値は野生株が 0.35 であるのに対し、変異株は 2.27 と変異株で有意なバイオフィーム産生能が確認された。また、continuous flow cell chamber を用いた confocal laser scanning microscopy による検討でも産生されたバイオフィームの厚さが野生株では 27 μm であるのに対し、変異株では 40 μm と変異株において有意なバイオフィーム産生が認められた。

#### D. 結論および考察

本研究では肺炎球菌が産生するバイオフィルムには莢膜は抑制的に作用していることが示唆された。莢膜は病原性にも関与しているとされることより、今後、バイオフィルム産生と病原性の関連及び肺炎球菌が産生するバイオフィルムへの糸状菌の定着についても検討していきたい。

#### E. 健康危険情報

特になし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Qin L, Masaki H, Gotoh K, Furumoto A, Terada M, Watanabe K, and Watanabe H. Molecular epidemiological study of *Moraxella catarrhalis* isolated from nosocomial respiratory infection patients in a community hospital in Japan. Intern Med (in press).
2. Kuroki R, Kawakami K, Qin L, Kaji C, Watanabe K, Kimura Y, Ishiguro C, Tanimura S, Tsuchiya Y, Hamaguchi I, Sakakura M, Sakabe S, Tsuji K, Inoue M, and Watanabe H. Nosocomial bacteremia caused by biofilm-forming *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. Intern Med (in press).
3. Gotoh K, Qin L, Watanabe K, Anh DD, Huong PLT, Anh NTH, Cat NDL, Ha LL, Ai LTT, Tien NM, Minh TT, Oishi K, and Watanabe H. Prevalence of *Haemophilus influenzae* with resistant gene isolated from young children with acute lower respiratory tract infections in Nha Trang, Vietnam. J Infect Chemother, 14: 349-353, 2008.
4. Ogata K, Kashiwagi T, Iwahashi J, Hara K, Honda H, Ide T, Kumashiro R, Kohara M, Sata M, Watanabe H, and Hamada N. Amutational shift from domain III to II in the ribosomal entry site of hepatitis C virus with interferon-ribavirin therapy. Archives of Virology, 153: 1575-1579, 2008.
5. Kaji C, Watanabe K, Apicella MA, and Watanabe H. Antimicrobial effect of fluoroquinolones for the eradication of nontypeable *Haemophilus influenzae* isolates within biofilms. Tohoku J Exp Med, 214: 121-128, 2008.
6. Hamada N, Gotoh K, Hara K, Iwahashi J, Imamura Y, Nakamura S, Taguchi C, Sugita M, Yamakawa R, Etoh Y, Sera N, Ishibashi T, Chijiwa K, and Watanabe H. A nosocomial outbreak of epidemic keratoconjunctivitis accompanying environmental contamination with adenoviruses. J Hosp Infect, 68: 262-268, 2008.
7. Watanabe H, Asoh N, Kobayashi S, Watanabe K, Oishi K, Kositsakulchai W, Sanchai T, Khantawa B, Tharavichitkul P, Sirisanthana T, and Nagatake T. Clinical and microbiological characteristics of community-acquired pneumonia among HIV-infected patients in northern Thailand. J Infect Chemother, 14: 105-109, 2008.
8. Watanabe K, Anh DD, Huong PLT, Nguyet NT, Anh NTH, Thi NT, Dung NT, Phong DM, Rusizoka OS, Nagatake T, Watanabe H, and Oishi K. Drug-resistant pneumococci in children with acute lower respiratory infections in Vietnam. Pediatric Int, 50: 514-518, 2008.
9. 酒井義朗、井上光鋭、執行素美、石橋幹雄、有馬千代子、久保裕子、鶴田美恵子、永田見生、三浦美穂、升永憲治、渡邊 浩。点眼薬の分注に関するアンケート調査—流行性角結膜炎の集団発生を経験して—。医療薬学 34: 1028-1031, 2008.
10. 久保裕子、酒井義朗、有馬千代子、鶴田美恵子、三浦美穂、升永憲治、本田順一、渡邊 浩。抗菌薬の適正使用に関する当院 ICT の取り組み—指定抗菌薬使用届出制導入後におけ

る MRSA 陽性患者数の推移も含めて一。環境感染誌 23: 201-205, 2008.

## 2. 学会発表

1. 秦 亮、真崎宏則、渡邊 浩。  
Characteristics and genetic relatedness of *Moraxella catarrhalis* isolated from a community hospital in Japan. 第 78 回日本感染症学会西日本地方会学術集会。広島、2008.12.5.
2. 渡邊 浩。病理解剖室における空気感染対策。第 61 回日本呼吸器学会・日本結核病学会九州支部秋季学術講演会。沖縄、2008.11.6.
3. 渡邊 浩。ワークショップ 3、臨床症状から診断する熱帯感染症、フィリピン帰国後に発熱、頭痛が出現し短期間で死亡した一症例。第 49 回日本熱帯医学会大会・第 23 回日本国際保健医療学会学術大会合同大会。東京、2008.10.25.
4. 後藤憲志、渡邊 浩。当院海外旅行外来における長期海外滞在者へのワクチン接種の現状。第 12 回日本渡航医学会学術集会。岡山、2008.7.18.
5. Watanabe H. Infection control for airborne and droplet infection. 4th Shanghai International Forum of Infection Control. Shanghai, China, 2008.5.21.
6. 渡邊 浩、後藤憲志。ワークショップ 5、海外旅行者の感染症対策、久留米大学病院における海外旅行外来の現状と問題点。第 82 回日本感染症学会総会。松江、2008.4.17.
7. 原 好勇、渡邊 浩。ミニ特別講演、ヒト・メタニューモウイルス感染症ーウイルス学的性状および集団感染ー。第 82 回日本感染症学会総会。松江、2008.4.18.
8. 後藤憲志、渡邊 浩。Nontypable *Haemophilus influenzae* が産生するバイオフィルムに対する各種抗生物質の効果に関する研究。第 82 回日本感染症学会総会。松江、2008.4.17.
9. 秦 亮、真崎宏則、渡邊貴和雄、古本朗嗣、渡邊 浩。Genetic analysis of *Streptococcus pneumoniae* isolates indicating possible nosocomial transmission routes in Japan. 第 82 回日本感染症学会総会。松江、2008.4.17.
10. Watanabe H, Kaji C, Watanabe K, Apicella MA. Analysis of the effectiveness of different classes of antibiotics for the eradication of nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilms. US-Japan Cooperative Medical Science Program Acute Respiratory Infections Panel. Washington DC, USA, 2008.2.25.
11. 三浦美穂、升永憲治、渡邊 浩。病院建物解体工事に伴う病院内での感染対策について。第 23 回日本環境感染学会総会。長崎、2008.2.23.
12. 渡邊 浩、三浦美穂、升永憲治。久留米大学病院で発生したアデノウイルス 37 型による流行性角結膜炎のアウトブレイク事例。第 23 回日本環境感染学会総会。長崎、2008.2.22.
13. 渡邊 浩。特別講演 2; 注目すべき院内感染の事例とその対策。日本医療マネジメント学会第 8 回福岡地方会。久留米、2008.1.19.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし