

Fig. 4 Pm 欠損株の分布

1990-2000年、2001-2009年に分離されたPm 欠損株 ( $pm\Delta SP$ ,  $pm::IS481$ ) の分離地域を示した

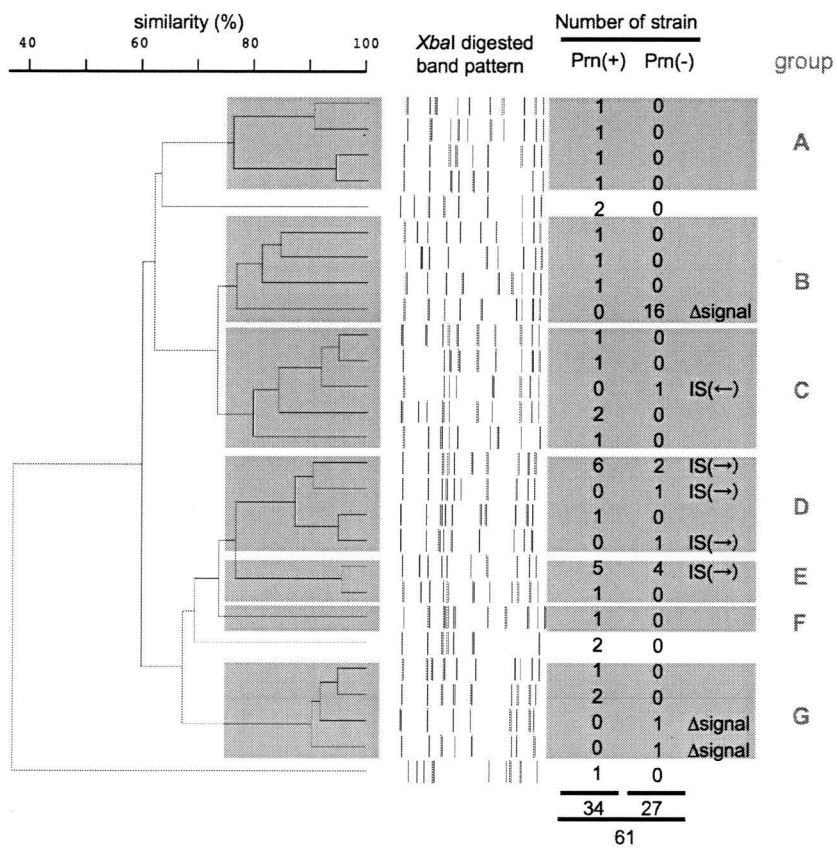


Fig. 5 ワクチン型流行株におけるPm 欠損株とPm 発現株の系統樹解析

UPGMA 法 (tolerance 1%) にて解析した

## Nontypeable *Haemophilus influenzae* が産生した バイオフィルムに対する抗生物質の抑制効果に関する基礎的検討

研究分担者 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 Nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi)が産生したバイオフィルムに対する抗生物質の抑制効果について検討した。β-lactamase-negative ampicillin (ABPC)-susceptible (BLNAS) 及びβ-lactamase-negative ABPC-resistant (BLNAR) を48時間培養後、imipenem (IPM)単剤及び clarithromycin (CAM)-IPM, levofloxacin (LVFX)-IPM の二剤を投与し、それぞれバイオフィルムに対する抑制効果を比較検討した。Microtiter biofilm assay では、BLNAR 株に対し IPM, CAM-IPM, LVFX-IPM の順に0.01x MICで1.26, 0.89, 0.93, 1x MICで1.10, 0.13, 0.08, 100xMICで0.80, 0.07, 0.06であった。走査型電子顕微鏡による観察でも IPM 単独に比べ、CAM-IPM, LVFX-IPM の併用においてより強いバイオフィルム抑制効果が認められた。カルバペネム剤である IPM ではキノロン剤やマクロライド剤と併用することにより、BLNAR を含めた NTHi が産生するバイオフィルムに対し強い抑制効果をもつことが示唆された。

### A. 研究目的

近年、人に中耳炎や下気道感染症を引き起こし、時に難治化することがある Nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi)がバイオフィルムを産生することが明らかとなってきた。現在、本邦ではβ-lactamase-negative ampicillin (ABPC)-resistant (BLNAR)株の増加が臨床上的の問題となっているが、薬剤耐性菌のバイオフィルムに対する抗生物質の効果は明らかではない。我々は、NTHi が産生したバイオフィルムに対する抗生物質の効果について、特に重症感染症に用いられることが多いカルバペネム剤を中心に臨床的に用いられることがある併用療法も含めて基礎的研究を行った。

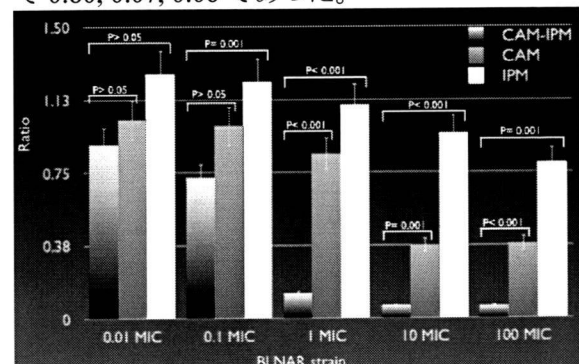
### B. 研究方法

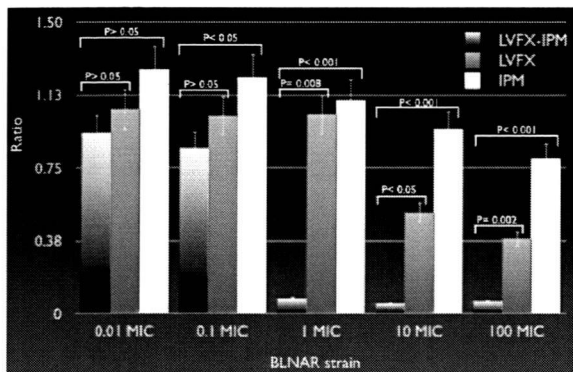
バイオフィルム産生能をもつことが確認されたβ-lactamase-negative ABPC-susceptible (BLNAS)及びBLNARの臨床株それぞれ1株を96穴マイクロプレートに接種して48時間培養し、*in vitro* でバイオフィルムを産生させ、その後各種抗生物質 imipenem (IPM)単剤及び clarithromycin (CAM)-IPM, levofloxacin (LVFX)-IPM の二剤を投与をそれぞれ0.01, 0.1,

1, 10, 100x MIC の濃度で12時間おきに計4回添加し、Microtiter biofilm assay を行った。また同様に BLNAR 株に対し、0.1, 1, 10,x MIC の各種抗生物質濃度下に走査型電子顕微鏡(SEM)による観察を行った。

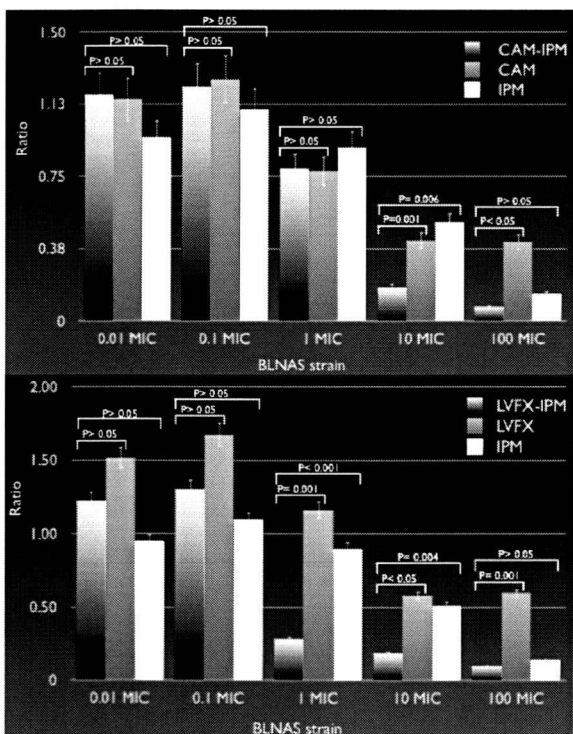
### C. 研究結果

BLNAR 株が産生したバイオフィルムに対して、Microtiter biofilm assay の結果は IPM, CAM-IPM, LVFX-IPM の順に0.01x MICで1.26, 0.89, 0.93, 1x MICで1.10, 0.13, 0.08, 100x MICで0.80, 0.07, 0.06であった。

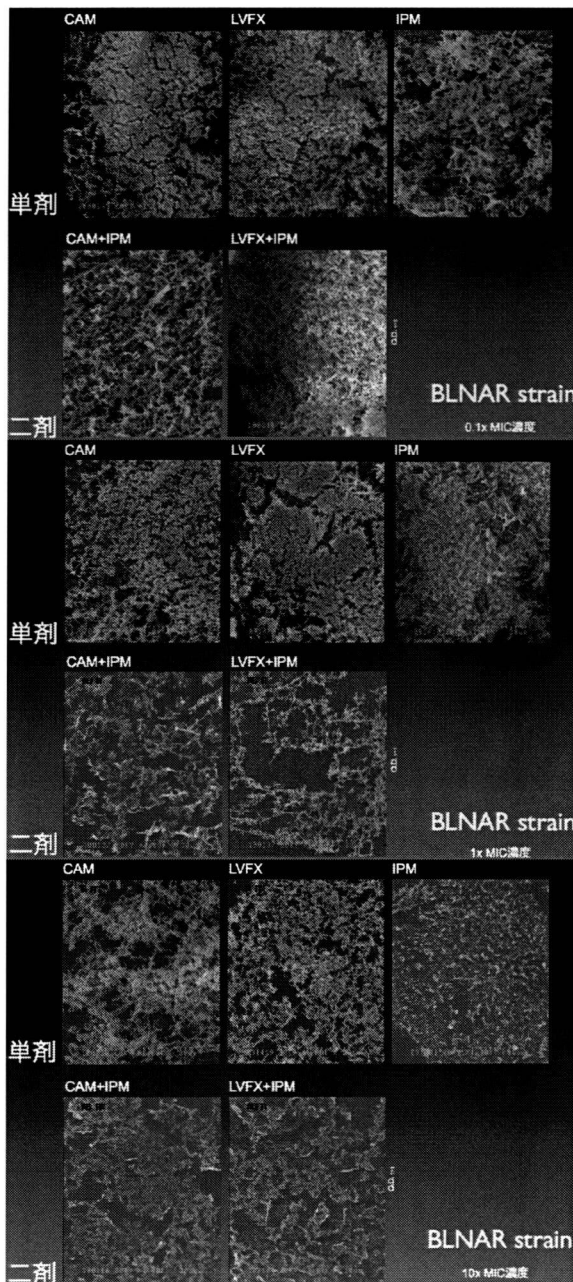




BLNAS 株が産生したバイオフィームに対して、Microtiter biofilm assay の結果は IPM, CAM-IPM, LVFX-IPM の順に 0.01x MIC で 0.95, 1.17, 1.22, 1x MIC で 0.90, 0.79, 0.29, 100x MIC で 0.14, 0.08, 0.10 であった。



SEM による観察でも BLNAR 株が産生したバイオフィームに対し、IPM 単独に比べ CAM-IPM、LVFX-IPM の併用においてより強いバイオフィーム抑制効果が認められた。



#### D. 結論および考察

カルバペネム剤は重症感染症に切り札的に用いられることが多い抗生物質である。カルバペネム剤である IPM ではキノロン剤やマクロライド剤と併用することにより、薬剤耐性、感受性に関係なく、BLNAR を含めた NTHi が産生するバイオフィームに対し、より強い抑制効果をもつことが示唆された。

E. 健康危険情報  
特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Morinaga Y, Yanagihara K, Masunaga K, Hashiguchi M, Okamura T, Watanabe H, Kohno S, and Kamihira S. Invasive pneumococcal diseases in a traveler who returned from the philippines: A case report and in vivo study of the isolate. J Travel Med, 17: 63-65, 2010.
2. 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, 48:797-803, 2009.
3. 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, 48:791-796, 2009.
4. 今村宜寛、濱田信之、大津 寧、原 好勇、渡邊 浩 「入院を必要とした乳幼児の下気道感染症に關与するウイルスの検討」 医学検査 58: 287-293, 2009.

2. 学会発表

1. 渡邊 浩。タイ国北部地域における HIV 陽性患者に合併した市中肺炎の臨床的検討。第 2 回福岡県医学会総会、福岡、2010.1.31.
2. Watanabe H, Goto K, and Hara K. Clinical study concerning the relationship between community-acquired pneumonia and influenza in northern Thailand. US-Japan Cooperative Medical Science Program Acute Respiratory Infections Panel. San Francisco, USA, 2010.1.25
3. 秦 亮、渡邊 浩。Construction of Capsular Polysaccharide Impaired *Streptococcus pneumoniae*。第 79 回日本感染症学会西日本地方会学術集会、福岡、2009.11.20.
4. 渡邊 浩、後藤憲志。タイ国における市

中肺炎とインフルエンザの關連についての臨床的検討。第 50 回日本熱帯医学会大会、沖縄、2009.10.22, 23.

5. 升永憲治、川野佐由里、三浦美穂、秦 亮、柏木孝仁、岩橋 潤、原 好勇、今村宜寛、濱田信之、渡邊 浩。当院における新型インフルエンザ (SOI:swine-origin influenza A/H1N1)対策の現状。第 13 回日本渡航医学会学術集会、福岡、2009.7.18.
6. 後藤憲志、日高秀信、升永憲治、渡邊 浩。当院で経験した高地渡航者の現状。第 13 回日本渡航医学会学術集会、福岡、2009.7.17.
7. 渡邊 浩。ICD 講習会、病院感染制御のストラテジー、久留米大学病院における空気・飛沫感染対策の実際。第 20 回日本臨床寄生虫学会学術講演会、大阪、2009.6.20.
8. 渡邊 浩。ICD 講習会、Tでつなぐ感染対策—抗菌薬適正使用への貢献— ICD:「使わない」という選択肢。第 57 回日本化学療法学会総会学術講演会、東京、2009.6.5.
9. 渡邊 浩。教育講演 8, 感染症に対する分子疫学的アプローチ。第 83 回日本感染症学会総会学術講演会、東京、2009.4.24.
10. 原 好勇、大津 寧、後藤憲志、渡邊 浩。ヒト・メタニューモウイルス感染乳幼児における抗体価とサイトカインの変動。第 83 回日本感染症学会総会学術講演会、東京、2009.4.23.
11. Qin L, Watanabe H. Impaired *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide promotes biofilm formation. US-Japan Cooperative Medical Science Program Acute Respiratory Infections Panel. Chiba, Japan, 2009.1.17.
12. Hara K, Watanabe H. The immune response to human metapneumovirus in hospitalized infants. US-Japan Cooperative Medical Science Program Acute Respiratory Infections Panel. Chiba, Japan, 2009.1.16.

G. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし

厚生労働科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）

分担研究報告書

## 中耳炎の病因微生物と免疫応答の解析

研究分担者：山中 昇（和歌山県立医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科）

研究協力者：保富宗城（和歌山県立医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科）

### 研究要旨

小児急性中耳炎症例より採取した無莢膜型インフルエンザ菌臨床分離株において、安定したバイオフィルム測定システムを確立することができた。この測定システムにより中耳炎分離株 70 株のうち 59 株（84%）にバイオフィルム形成を認めた。薬剤感受性とバイオフィルム形成との関連を見ると、ABPC の耐性株に比較して、感受性が高い株ほどバイオフィルム形成株を多く認めた。急性中耳炎の臨床経過とバイオフィルム形成との関連について検討すると、抗菌薬治療非改善例から分離されたインフルエンザ菌では、抗菌薬治療改善例からの分離菌よりも有意に高いバイオフィルム形成能を認めた。

### A. 研究目的

近年、小児急性中耳炎や鼻副鼻腔炎などの上気道感染症が難治化しており日常臨床において大きな問題となってきた。このような小児感染症の臨床像の変貌の原因として、薬剤耐性菌の急増および乳幼児の鼻咽腔における保有率が高いこと、低年齢保育の普及などの環境の変化などがあげられている。さらにその原因の一つとして細菌の形成するバイオフィルムの関与が指摘されている。バイオフィルムとは細菌が感染病巣

局所において産生する菌体外多糖からなる粘液状のマトリックスであり、その内部に菌体が存在する。多くの細菌が生体内ではバイオフィルムの状態で存在しており、抗菌薬や生体の感染防御に対して抵抗性を示す。本研究では急性中耳炎の難治化における無莢膜型インフルエンザ菌のバイオフィルム形成の役割について検討した。

### B. 研究方法

#### ①インフルエンザ菌バイオフィルム検出

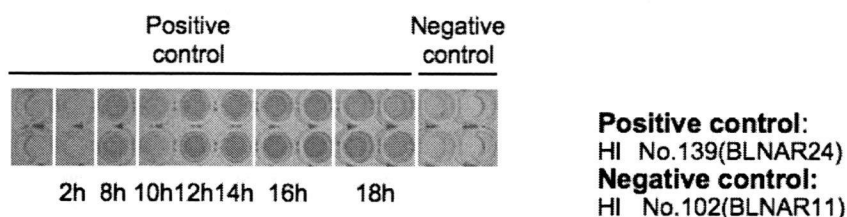
## 法の確立

インフルエンザ菌によるバイオフィルムの検出は、O'tooleらの原法に従いクリスタル・バイオレット染色により検出した。すなわち、インフルエンザ菌をブレインハート・インフュージョン培養液にて OD650 が 0.5 まで前培養したのち、ブレインハート・インフュージョン培養液でインフルエンザ菌液を OD650=0.1 に調整した後、96 ウェル・ポリスチレン培養プレート(菌液量:各ウェル 100 $\mu$ l)にて 37 度にて炭酸ガス培養を行った。培養中経時的にポリスチレン・ウェルを滅菌リン酸緩衝液 (PBS) にて洗浄し、ポリスチレン非付着細菌 (バイオフィルム非産生菌) を洗い流し、ウェルに付着残存したポリスチレン付着菌 (バイオフィルム産生菌) をクリスタル・バイオレットにて染色した。染色液を十分に洗浄した後に、30%酢酸溶液によりクリスタル・バイオレットを溶出し、各ウェルについてクリスタル・バイオレ

ットの吸光度を評価した(図1)。バイオフィルムの形成は、1 時間、2 時間、4 時間、6 時間、8 時間、10 時間、12 時間、24 時間培養により経時的に評価した。急性中耳炎患児より分離された無莢膜型インフルエンザ菌を用いて、ピン付き 96well プレート上でバイオフィルム形成能を検討した。バイオフィルムの定量的解析法として crystal violet 染色法を用い、画像的解析法として共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。定量における陽性株判定法としては、陽性コントロール株の OD 値に対する各菌株の OD 値の割合を biofilm formation index(BFI)と定め、BFI  $\geq 0.4$  である株をバイオフィルム形成株とした。さらに共焦点レーザー顕微鏡による画像評価を行った。すなわち 96ピン付き 96 well プレートを用い、共焦点レーザー顕微鏡によりバイオフィルム形成(シアル酸染色)とインフルエンザ菌(核酸染色)の観察を行った。

# Biofilm formation assay

- $OD_{660}=0.3$ まで振蕩培養
- BHI+NAD+Heminにて $OD_{660}=0.01$ まで希釈
- 96-well microtiter plateにて $37^{\circ}\text{C}$ で 8-18時間 incubation
- 各時間ごとに蒸留水洗浄し、乾燥
- 0.5% crystal violetにて15分染色
- 30% iced acetic acid を加え pipetting し  $OD_{562}$  測定



## ②インフルエンザ菌臨床分離株によるバイオフィルム産生の検討

急性中耳炎患児より分離同定されたインフルエンザ菌臨床分離株を用い、バイオフィルム産生株の検出をおこなうとともに、バイオフィルム形成と急性中耳炎の臨床経過をスコアリング・システムにより評価し、両者の比較検討を行った。

### C. 研究結果

クリスタルバイオレット染色法によるバイオフィーム形成の定量的評価は、共焦点レーザー顕微鏡による画像評価を反映することが判明し、小児急性中耳炎症例より採取した無莢膜型インフルエンザ菌臨床分離株において、安定したバイオフィーム測定システムを確立することができた(Fig.1)。

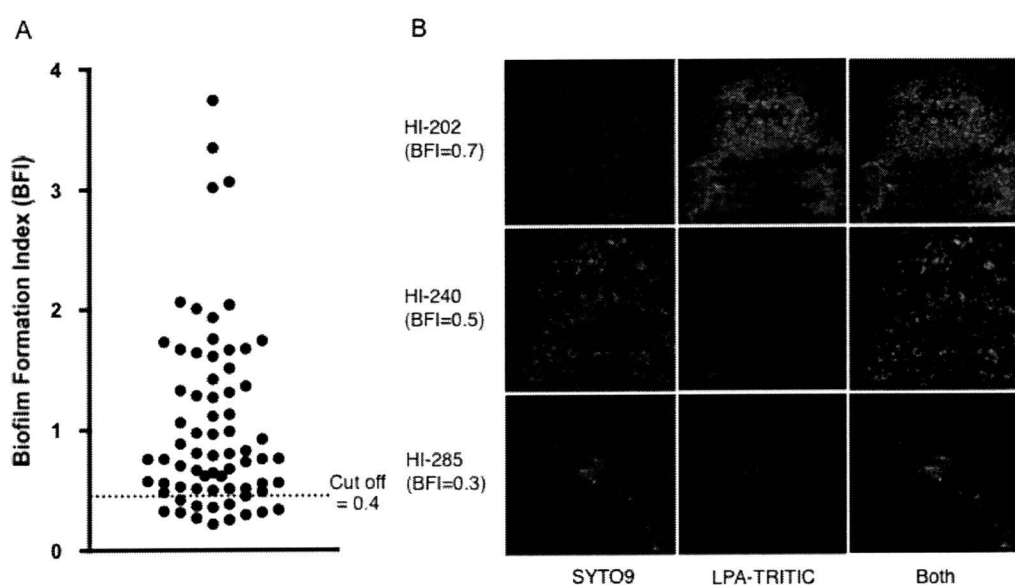
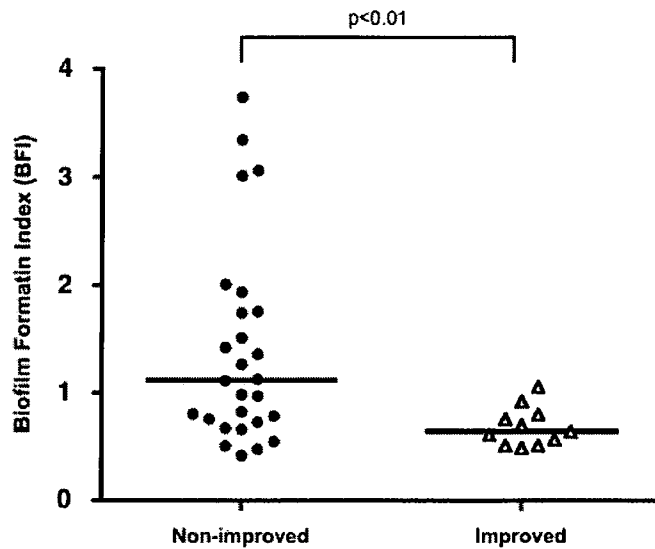


Fig. 1

この測定システムにより中耳炎分離株 70 株のうち59株 (84%) にバイオフィーム形成を認めた。薬剤感受性とバイオフィーム形成との関連を見ると、ABPC の耐性株に比較して、感受性が高い株ほどバイオフィーム形成株を多く認めた。急性中耳炎の臨床経過とバイオフィーム形成との関連について検討すると、抗菌薬治療非改善例から分離されたインフルエンザ菌では、抗菌薬治療改善例からの分離菌よりも有意に高いバイオフィーム形成能を認めた(Fig.2)。





#### D. 考察

急性中耳炎の臨床経過は、起炎菌により異なり、なかでもインフルエンザ菌による急性中耳炎では、中耳貯留液が残存し、遷延化することが多い。また、遷延化した中耳貯留液からは PCR 法で効率にインフルエンザ菌が検出されることや、急性中耳炎を繰り返すことによりインフルエンザ菌が検出される率が高くなることが報告されている。これらのことは、インフルエンザ菌が中耳炎の遷延化に関与していることが強く疑わせる結果である。しかし、インフルエンザ菌のバイオフィームに関しては、その多くの研究がバイオフィーム形成の制御因子に関連する研

究であり、実際の中耳炎の遷延化の検討に応用した例は少なく、Post らのグループによるインフルエンザ菌性実験的中耳炎における検討のみである。また、インフルエンザ菌のバイオフィーム形成と急性中耳炎の臨床像との比較検討は国内外においてほとんど見られない。本研究でインフルエンザ菌のバイオフィーム形成株が中耳貯留液より分離されることが解明された。バイオフィームを形成する細菌の特徴としては、抗菌薬感受性である場合にも、バイオフィームが形成されることにより抗菌薬が直接細菌に達することができず、抗菌薬に対して抵抗性を示すようになることであり、細菌が薬剤耐

性を獲得していくこととは大きく異なる。本研究において、従来慢性中耳炎などの長期の感染のみではなく、発症後1ヶ月以内の急性中耳炎においてもすでにバイオフィルムが形成され、薬剤感性株であっても、バイオフィルム形成株では臨床的な有効性が低下する成績が得られたことから、現在本邦において大きな社会問題となっている薬剤耐性菌のみならず、バイオフィルム形成が難治化の大きな原因になっていることが判明した。このような細菌感染の難治化メカニズムを解明することは、局所洗浄などの処置を含め、バイオフィルム抑制機能を有する抗菌薬の選択や併用など、新しい治療法の開発にも継がるものと考えらる。

#### E. 結論

本研究により、急性中耳炎患児から分離された無莢膜型インフルエンザ菌がバイオフィルム形成を行うことが明らかとなった。加えて無莢膜型インフルエンザ菌のバイオフィルム形成が、抗菌薬治療に抵抗し遷延・難治化する急性中耳炎の臨床経過に重要な役割を果たすことが示された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1: Ali MA, Gunduz M, Gunduz E, Tamamura R, Beder LB, Katase N, Hatipoglu OF, Fukushima K, Yamanaka N, Shimizu K,

Nagatsuka H. Expression and Mutation Analysis of Her2 in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Invest.* 2009 Dec 16. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20014947.

2: Hotomi M, Billal DS, Togawa A, Ikeda Y, Takei S, Kono M, Ogami M, Ubukata K, Sugita R, Fujihara K, Yamanaka N. Distribution of fibronectin-binding protein genes (prtF1 and prtF2) and streptococcal pyrogenic exotoxin genes (spe) among *Streptococcus pyogenes* in Japan. *J Infect Chemother.* 2009 Dec;15(6):367-73. Epub . PubMed PMID: 20012726.

3: Katase N, Gunduz M, Beder LB, Gunduz E, Al Sheikh Ali M, Tamamura R, Yaykasli KO, Yamanaka N, Shimizu K, Nagatsuka H. Frequent allelic loss of Dkk-1 locus (10q11.2) is related with low distant metastasis and better prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Invest.* 2010 Jan;28(1):103-10. PubMed PMID: 19995224.

4: Hirohashi Y, Torigoe T, Hirai I, Tamura Y, Nakatsugawa M, Inoue Y,

Kanaseki T, Kamiguchi K, Ikeda H, Sasaki A, Yamanaka N, Sato N. Establishment of shared antigen reactive cytotoxic T lymphocyte using co-stimulatory molecule introduced autologous cancer cells. *Exp Mol Pathol*. 2009 Oct 8. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 19818766.

5: Baba S, Yamanaka N, Suzuki K, Furukawa M, Furuya N, Ubukata K, Totsuka K. [Clinical efficacy, safety and PK-PD analysis of tebipenem pivoxil in a phase II clinical trial in otolaryngological infections]. *Jpn J Antibiot*. 2009 Apr;62(2):155-77. Japanese. PubMed PMID: 19673357.

6: Suzuki K, Kurono Y, Kobayashi T, Nishimura T, Baba S, Harabuchi Y, Fujisawa T, Yamanaka N, Ubukata K, Ikeda F. [Antimicrobial susceptibility surveillance of recent isolates from otorhinolaryngological infections to garenoxacin and other antimicrobial drugs]. *Jpn J Antibiot*. 2009 Apr;62(2):71-8. Japanese. PubMed PMID: 19673349.

7: Katase N, Gunduz M, Beder LB, Gunduz E, Sheikh Ali MA,

Tamamura R, Yaykasli KO, Yamanaka N, Shimizu K, Nagatsuka H. Frequent Allelic Loss of Dkk-1 Locus (10q11.2) is Related with Low Distant Metastasis and Better Prognosis in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Cancer Invest*. 2009 Aug 4:1. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 19657784.

8: Hotomi M, Arai J, Billal DS, Takei S, Ikeda Y, Ogami M, Kono M, Beder LB, Toya K, Kimura M, Yamanaka N. Nontypeable *Haemophilus influenzae* isolated from intractable acute otitis media internalized into cultured human epithelial cells. *Auris Nasus Larynx*. 2009 Jun 7. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 19505782.

9: Gunduz E, Gunduz M, Ali MA, Beder L, Tamamura R, Katase N, Tominaga S, Yamanaka N, Shimizu K, Nagatsuka H. Loss of heterozygosity at the 9p21-24 region and identification of BRM as a candidate tumor suppressor gene in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Invest*. 2009 Jul;27(6):661-8. PubMed PMID: 19488910.

- 10: Beder LB, Gunduz M, Hotomi M, Fujihara K, Shimada J, Tamura S, Gunduz E, Fukushima K, Yaykasli K, Grenman R, Shimizu K, Yamanaka N. T-lymphocyte maturation-associated protein gene as a candidate metastasis suppressor for head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Sci.* 2009 May;100(5):873-80. PubMed PMID: 19445022.
- 11: Billal DS, Hotomi M, Yan SS, Fedorko DP, Shimada J, Fujihara K, Yamanaka N. Loss of erythromycin resistance genes from strains of *Streptococcus pyogenes* that have developed resistance to levofloxacin. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009 Jun;64(2):225-8. Epub 2009 Apr 2. PubMed PMID: 19345038.
- 12: Gunduz E, Gunduz M, Beder L, Nagatsuka H, Fukushima K, Sutcu R, Delibas N, Yamanaka N, Shimizu K, Nagai N. Downregulation of TESTIN and its association with cancer history and a tendency toward poor survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2009 Mar;135(3):254-60. PubMed PMID: 19289703.
- 13: Yamanaka N. [Treatment of acute pharyngo-tonsillitis using anti-bacterial agents--current concepts based on meta analysis]. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho.* 2008 Dec;111(12):754-7. Japanese. PubMed PMID: 19288612.
- 14: Hayashi M, Fujihara K, Beder LB, Yamamoto Y, Hotomi M, Yamanaka N. Pathogenic role of tonsillar lymphocytes in associated with HSP60/65 in Pustulosis palmaris et plantaris. *Auris Nasus Larynx.* 2009 Oct;36(5):578-85. Epub 2009 Mar 5. PubMed PMID: 19268507.
- 15: Demircan K, Gunduz E, Gunduz M, Beder LB, Hirohata S, Nagatsuka H, Cengiz B, Cilek MZ, Yamanaka N, Shimizu K, Ninomiya Y. Increased mRNA expression of ADAMTS metalloproteinases in metastatic foci of head and neck cancer. *Head Neck.* 2009 Jun;31(6):793-801. PubMed PMID: 19260128.
- 16: Beder LB, Hotomi M, Ogami M,

Yamauchi K, Shimada J, Billal DS, Ishiguro N, Yamanaka N. Clinical and microbiological impact of human bocavirus on children with acute otitis media. *Eur J Pediatr.* 2009 Nov;168(11):1365-72. Epub 2009 Feb 17. PubMed PMID: 19221788.

17: Al Sheikh Ali M, Gunduz M, Gunduz E, Tamamura R, Beder L, Tominaga S, Onoda T, Yamanaka N, Grenman R, Shimizu K, Nagai N, Nagatsuka H. Lack of B-RAF mutations in head and neck squamous cell carcinoma. *Folia Biol (Praha).* 2008;54(5):157-61. PubMed PMID: 19178815.

18: Moriyama S, Hotomi M, Shimada J, Billal DS, Fujihara K, Yamanaka N. Formation of biofilm by *Haemophilus influenzae* isolated from pediatric intractable otitis media. *Auris Nasus Larynx.* 2009 Oct;36(5):525-31. Epub 2009 Jan 8. PubMed PMID: 19135325.

19: Billal DS, Hotomi M, Yamanaka N. Intermittent preventive treatment with antimalarial drugs. *Lancet.* 2009 Jan 3;373(9657):28-9; author reply 29. PubMed PMID:

19121718.

## 2. 学会発表

1. Yamanaka N: Bacterial infection-a paradigm shift. 6<sup>th</sup> Extraordinary International Symposium on Recent Advances in Otitis Media. 2009.5.6-10 Seoul, Korea

2. 山中 昇:したたかな細菌からヒトは何を学ぶか 第41回日本小児感染症学会総会ランチョンセミナー 2009.11.14 福井市

3. 山中 昇:難治性上気道・耳鼻咽喉科感染症における耐性菌と抗菌薬治療 第52回日本感染症学会中日本地方会学術集会イブニングセミナー2 2009.11.27 名古屋市

## G. 知的所有権の取得状況

- ① 特許取得:なし
- ② 実用新案登録:なし
- ③ その他:なし

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業）  
分担研究報告書

RSV 感染気道上皮細胞における *Haemophilus influenzae*

付着の制御に関する検討

研究分担者：石和田稔彦（千葉大学医学部附属病院小児科 講師）

研究要旨

RSV 感染気道上皮細胞における NTHi の付着に対する DSCG およびステロイド薬の影響について検討した。ヒト肺胞上皮培養細胞 (A549) 細胞において、RSV の先行感染により、NTHi の付着は亢進した。DSCG の添加により、RSV 感染後の NTHi の付着亢進は抑制された。DSCG は、気道上皮細胞表面の NTHi 付着レセプター発現に対し抑制効果を示すとともに、RSV 感染自体に対しても抑制効果を示し、RSV 感染後の細菌二次感染に対して DSCG が予防的効果を有する可能性が示唆された。

A. 研究目的

乳幼児の RSV 感染症は、しばしば下気道炎を呈し、細菌の二次感染を伴うことも多く、なかでも non-typeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) は二次感染の主要な原因菌の一つである。しかし、二次感染に対する予防策は確立されておらず、RSV 急性細気管支炎の治療難渋例にしばしば使用されるクロモグリク酸ナトリウム (DSCG) やステロイド薬の二次感染に対する影響については報告がない。異常のような背景から、RSV 感染気道上皮細胞における NTHi の付着に対する DSCG およびステロイド薬の影響について検討した。

B. 研究方法

ヒト肺胞上皮培養細胞 (A549) に RSV を感染させた後、DSCG またはステロイド薬を添加して 2 日間培養した。その後、NTHi 菌液とともに 1 時間培養し、3 回洗浄してゆるく付着した NTHi を取り除き、細胞に付着・侵入した NTHi の菌量を定量培養にて測定した。さらに、気道上皮細胞表面の NTHi 付着レセプターについての検討、および、薬剤の RSV 感染自体に対する作用についての検討も加えた。

C. 研究結果

A549 細胞において、RSV の先行感染

により、NTHi の付着は亢進した。DSCG の添加により、RSV 感染後の NTHi の付着亢進は抑制されたが、ステロイド剤では抑制されなかった。DSCG は、気道上皮細胞表面の NTHi 付着レセプター発現に対し抑制効果を示すとともに、RSV 感染自体に対しても抑制効果を示した。

#### D. 考察

DSCG の RSV 感染後の二次細菌感染抑制効果は、DSCG の RSV に対する直接的な感染抑制が主体であると考えられた。RSV は接着、吸着、転写、蛋白合成、出芽といった感染のサイクルを有することから、今後、DSCG が RSV 感染サイクルのどの部分に作用しているのかを解明する必要がある。

#### E. 結論

RSV 感染後の細菌二次感染に対して DSCG が予防的効果を有する可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Fukasawa C, Ishiwada N, Ogita J, Hishiki H, Kohno Y.

The effects of disodium cromoglycate on enhanced adherence of Haemophilus influenzae to A549 cells infected with respiratory syncytial virus.  
Pediatr Res. 66:168-73, 2009

Oikawa J, Ogita J, Ishiwada N, Okada T, Endo R, Ishiguro N, Ubukata K, Kohno Y.

Human bocavirus DNA detected in a boy with plastic bronchitis.

Pediatr Infect Dis J. 28:1035-6, 2009

#### G. 知的所有権の取得状況

なし

## Respiratory syncytial virus (RSV) F, G タンパクを発現する 組換え麻疹ワクチン AIK-C 株の免疫原性

研究分担者：中山哲夫 北里生命科学研究所 ウイルス感染制御 I

【研究要旨】弱毒麻疹ワクチンAIK-C株は安全で有効なワクチンとして世界的に知られておりAIK-Cの Reverse genetics systemを開発し安全性の確立された生ワクチンウイルスベクターとして利用し、現在ワクチンの開発されていないRespiratory syncytial virus (RSV) subgroup AのF, Gタンパク遺伝子を挿入し感染性組換え麻疹ワクチン株(MVAIK/RSV-F とMVAIK/RSV-G)を作成し本年度はコットンラットに接種し長期免疫原性、再接種による効果を検討した。麻疹PA抗体は16週まで維持されおり16週で再接種後にはブースター効果がみられた。RSV中和抗体についてはMVAIK/RSV/G は接種8週後までは Subgroup Aに対する抗体は維持されていたが、その後減少し再接種後には上昇がみられた。Subgroup Bに対する交叉免疫は誘導されなかった。MVAIK/RSV/F 免疫後にはsubgroup A, Bに対する高い中和抗体が誘導され16週後まで維持され再接種後には上昇したが顕著ではなかった。MVAIK/RSV/Fが有望な候補と考えられ、ウイルス動態を含めた検討が必要である。

### A. 研究目的

麻疹ワクチン AIK-C 株の感染性 cDNA クローンを樹立し、弱毒のマーカ―を検討してきた。弱毒のマーカ―としては 39°C の高温で増殖しない温度感受性(temperature sensitivity: ts)を特徴とし P タンパク 439 位の Pro が ts の性状に関連していることを明らかとしてきた。また、AIK-C 株全長の感染性 cDNA の中に外来遺伝子を導入して多価抗原を発現する弱毒麻疹ワクチンウイルスベクターとして利用することを検討し Respiratory syncytial virus (RSV) の感染防御抗原と考えられている F もしくは G 外殻タンパクを発現する組換え麻疹ウイルスを作成しコットンラットに接種し 16 週までの抗体持続能を検討し、再接種後のブースター効果を検討した。

### B. 研究方法

1) RSV は臨床分離例の Subgroup A の F タンパク、G タンパクの翻訳領域全長を RT-PCR 法で増幅し、P/M junction 部位に導入し、RSV F, G タンパク遺伝子を導入した cDNA を構築した

(図1)。組換え cDNA を 293T 細胞に N, P, L タンパク発現プラスミドとともに組換え cDNA を co-transfection し 2 日後に B95a 細胞と混合培養した。感染性ウイルスを回収した。

2) 7 週齢メスのコットンラットに組換え麻疹ウイルス  $10^{5.0}$  TCID<sub>50</sub> のウイルス液を筋注し、接種前、1、3、5、8、12、16 週で採血した。16 週で再接種し 17 週の血清を採取した。

3) 麻疹ウイルス抗体は PA 法、RSV は 50 PFU に調整した Subgroup A, B ウイルスを用いて 50% plaque 抑制法で測定した。麻疹ウイルス遺伝子は N 遺伝子領域の real-time PCR で検討した。



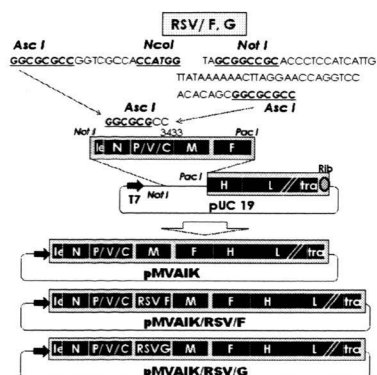


図1. RSV F, G タンパク遺伝子を組み込んだ組換え麻疹ウイルス cDNA の構築

### C. 結果

#### 1) MVAIK/RSV/G 接種後の抗体の持続

MVAIK/RSV/G をコottonラットに接種し抗体の持続を検討し結果を図 2 に示した。麻疹 PA 抗体は接種 3 週から検出されるようになり 8-16 週まで高い抗体価を維持していた。RSV A に対する中和抗体は接種 1 週後から検出されその後減衰し 12 週には検出できなくなり再接種により上昇がみられた。RSV subgroup B に対する中和抗体は誘導されず再接種によっても検出はできなかった。

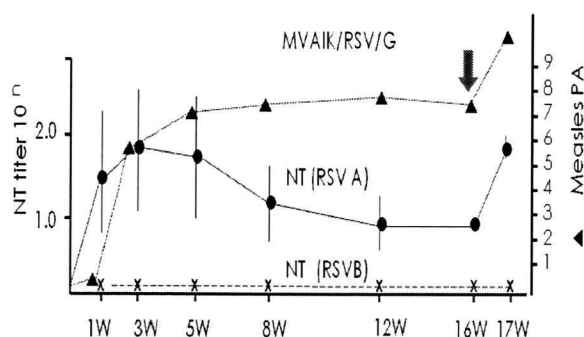


図 2. MVAIK/RSV/G 接種後の抗体の持続

#### 2) MVAIK/RSV/F 接種後の抗体の持続

MVAIK/RSV/F をコottonラットに接種し抗体の持続を検討し図 3 に示した。麻疹 PA 抗体は接種 3 週から検出されるようになり 8-16 週まで高い抗体価を維持していた。RSV A に対する中和抗体は接種 1 週後から検出され 5 週にピークを認め 16 週まで抗体は持続し再接種により上昇をみとめた。Subgroup B に対する中和抗体は A に対する抗体価に比べて低値ではあるが同様に 16 週まで持続していた。

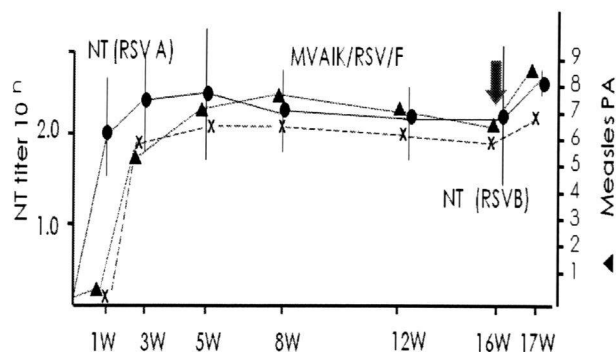


図 3. MVAIK/RSV/F 接種後の抗体の持続

#### 3) 麻疹ウイルス遺伝子の検出

MVAIK/RSV/G、MVAIK/RSV/F、MVAIK 接種 3 週後のコottonラットの肺、肝、腎、脾臓、胸腺、骨髄組織から RNA を抽出し麻疹ウイルス N タンパク遺伝子領域の real-time PCR を行った。MVAIK/RSV/F 接種の 3 頭中 2 頭の胸腺から麻疹ウイルス遺伝子が検出された。MVAIK 接種では 3 頭中 1 頭の胸腺から検出された。MVAIK/RSV/G 接種群では検出できなかった。

### D. 考案

MVAIK/RSV/F, MVAIK/RSV/G で免疫すると麻疹ウイルスに対する抗体は接種 3 週から検出されるが、RSV に対する抗体は接種 1 週後から検出された。組換え麻疹ウイルスの増殖により麻疹ウイルスに対する抗体が誘導され増殖の過程で RSV F, G タンパクは細胞外にも放出されることで早期から RSV に対する中和抗体が検出されたと考えられる。

今回の免疫原性の検討で、RSV subgroup A の遺伝子を導入しておりいずれの組換えウイルスでも subgroup A に対する中和抗体は誘導するが MVAIK/RSV/G では中和抗体の抗体価は低く持続期間も短いこと、異なる subgroup に対する交叉免疫原性がないことが明らかとなり、一方 MVAIK/RSV/F は高い中和抗体を誘導し 16 週にわたって抗体は持続しており subgroup B に対する交叉免疫活性を示し同様に長期間持続していることから MVAIK/RSV/F がワクチン候補として有望であると思われる。

誘導された抗体が RSV F タンパクを確実に認識しているのか、RSV で Challenge して感染防御能があるか検討するための感染モデルを検

討することが必要となる。

## E. 結論

MVAIK/RSV/F は高い中和抗体を誘導し 16 週にわたって抗体は持続しており subgroup B に対する交叉免疫活性を示し同様に長期間持続していることから MVAIK/RSV/F がワクチン候補として有望である。

## F. 研究発表

### 1 論文発表 関連論文

1. Dong JB, Saito A, Mine Y, Sakuraba Y, Nibe K, Goto Y, Komase K, Nakayama T, Miyata H, Iwata H, Haga T. Adaptation of wild-type measles virus to cotton rat lung cells: E89K mutation in matrix protein contributes to its fitness. *Virus Gene* 39: 330-334, 2009

### 2 学会発表

なし

## G. 知的財産の出願、登録状況

なし

### III 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Okumura A, Kidokoro H, Tsuji T, Suzuki M, Kubota T, Kato T, Komatsu M, Shono T, Hayakawa F, Shimizu T, Morishima T	Differences of clinical manifestations according to the patterns of brain lesions in acute encephalopathy with reduced diffusion in the bilateral hemispheres.	American Journal of Neuroradiolog y	30	825-830	2009
Suzuki, Y, Saito, R, Zaraket, H, Dapat, C, Caperig-Dapat, I, Suzuki, H.	Rapid and specific detection of amantadine-resistant influenza A viruses with a Ser31Asn mutation by the cycling probe method.	J Clin Microbiol.	48 (1)	57-63	2010
Takahashi, Y., Hasegawa, H., Hara, Y., Ato, N., Ninomiya, Ai., Takagi, H., Odagiri, T., Sata, T., Tashiro, M., Kobayashi, M.	Protective immunity afforded by inactivated H5N1 (NIBRG-14) - vaccine requires antibodies against both hemagglutinin and neuraminidase in mice.	J. Infect. Dis.	199	1629-1637	2009
Ichinohe, T., Ainai, A., Tashiro, M., Sata, T., Hasegawa, H.	PolyI:PolyC <sub>12</sub> U adjuvant-combined intranasal vaccine protects mice against highly pathogenic H5N1 influenza virus variants.	Vaccine	27	6276-6279	2009
Bertozzi, S., Kelso, A., Tashiro, M., Savy, V., Farrar, J., Osterholm, M., Jameel, S., Muller, C.P.	Pandemic flu: from front lines.	Nature	461	20-21	2009