

## 細菌学講座

講座担当教授：金城 雄樹	感染症学, 細菌学, 真菌学
准教授：杉本 真也	細菌学, 分子生物学
講師：田嶋亜紀子	細菌学, 分子生物学
講師：奥田 賢一	細菌学, 応用微生物学

### 教育・研究概要

#### I. 新規肺炎球菌ワクチンによる感染防御効果の解析

肺炎球菌は市中肺炎の主な起因菌であり、時に小児及び高齢者を中心に敗血症や髄膜炎などの侵襲性肺炎球菌感染症 (IPD) を引き起こす。肺炎球菌は莢膜ポリサッカライドの構成の違いにより、約 100 種類の血清型に分類される。現行ワクチンは、13 または 23 種類の血清型のポリサッカライドを抗原として用いている。小児での現行ワクチンの定期接種導入により IPD 罹患率の低下が認められたものの、近年、現行ワクチンに含まれない血清型による IPD が増加している。そのため、多くの肺炎球菌に対応可能なユニバーサルワクチンの開発が求められている。当講座では、全ての肺炎球菌がもつ肺炎球菌蛋白を抗原とし、強力な免疫賦活作用のある糖脂質をアジュバントとして用いた新規肺炎球菌ワクチンの感染防御効果を解析するとともに、防御免疫機構の解析を行った。その結果、新規ワクチンは幅広い血清型の肺炎球菌に対して感染防御効果をもたらすことが示唆された。

#### II. 成人の IPD 由来菌株の細菌学的解析

現行の肺炎球菌ワクチンはポリサッカライドを抗原としたワクチンで、23 価肺炎球菌ポリサッカライドワクチン (PPSV23) 及び 13 価肺炎球菌結合型ワクチン (PCV13) があり、それぞれ 65 歳以上成人及び小児で定期接種されている。厚生労働科学研究費「成人の侵襲性細菌感染症サーベイランスの充実化に資する研究班」では、成人の IPD の発生动向と原因菌の血清型などの細菌学的特徴の関連性を解析している。本研究班の分担研究として、国立感染症研究所の常博士とともに、成人 IPD 症例から分離した菌株を用いて、肺炎球菌表面蛋白 A (Pneumococcal surface protein A: PspA) の clade 解析を行った。PspA は、3 つの family に分類され、family 1 には clade 1 と clade 2, family 2 には clade 3,

clade 4 と clade 5, family 3 には clade 6 が存在する。今年度は 2018 年に成人 IPD 症例から分離された 387 株の PspA の clade 解析を行い、clade を決定した。本研究にて血清型分布のみならず、PspA clade 分布にも変化がおきていることが示唆された。今後も PspA clade 分布の推移の解析が必要と考えられる。

#### III. ユニバーサル肺炎球菌ワクチンの開発

小児での現行肺炎球菌ワクチンの定期接種導入により IPD 罹患率の低下が認められたものの、近年、非ワクチン血清型による IPD が増加している (血清型置換)。小児 IPD での血清型置換は成人にも影響を及ぼし、成人 IPD においても血清型置換が進んでいる。そのため、肺炎球菌に対して幅広い感染防御効果をもたらす新規ワクチンの開発が求められている。私達は、産学連携で新規肺炎球菌ワクチンの開発に取り組んでいる。私達の開発した新規ワクチンは PspA をワクチン抗原とし、大部分の肺炎球菌の PspA clade をカバーしている。本研究での解析の結果、新規ワクチンは血清型に依存しない幅広い感染防御効果をもたらすことが示唆された。私達が開発した新規肺炎球菌ワクチンは、ユニバーサル肺炎球菌ワクチンとしての有用性が期待される。

#### IV. 黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成機序と制御法の開発

バイオフィーム形成細菌である黄色ブドウ球菌による感染症の制圧に向けた基盤的研究を行い、いくつかの知見を得た。第一に黄色ブドウ球菌のバイオフィーム内に RNA が存在することを見出した。この細胞外 RNA は多糖や壁タイコ酸と結合することでバイオフィーム内に局在していた。さらに、ヒト血液から抽出した RNA が *in vitro* の血管内カテーテルのモデルでバイオフィーム形成を促進することを見出した。第二に、細胞壁結合タンパク質である SasG は、従来からの報告とは異なる機序によりバイオフィーム形成を促進していることを見出した。第三に、納豆菌が黄色ブドウ球菌に対する発育阻止効果を有することを見出した。その効果は、黄色ブドウ球菌の保有する自己分解酵素の活性を介している可能性を見出した。また、次世代シーケンサーの解析により、納豆菌の芽胞形成亢進と運動性低下が関与する可能性を見出した。第四に、グルコース誘導体がメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) のバイオフィーム形成を抑制するだけでなく、抗菌薬の感受性を改善させることを見出した。

## V. トランスグリコシラーゼ遺伝子の欠損が MRSA の抗菌薬感受性に与える影響

細菌のトランスグリコシラーゼは、細胞壁を分解することで細胞分裂に関わる酵素であるが、多様な表現型に関与することが複数の菌種で報告されている。本研究では、MRSA が保有する2つのトランスグリコシラーゼである *IsaA* と *SceD* に着目し、その機能を解析した。*isaA* と *sceD* の遺伝子欠損株を作製し、各株の抗菌薬感受性を調べたところ、*isaA* 欠損株では $\beta$ -ラクタムに対する耐性が野生株と比較して顕著に低下し、オキサシリンの最小発育阻止濃度は野生株の1/256~1/64であった。また、プラスミド相補実験により、*isaA* 欠損株においてはMRSAにおける主要な耐性因子である *mecA* の発現レベルに関わらず $\beta$ -ラクタム感性化が誘導されることが明らかになった。以上の結果は、*IsaA* がMRSAによる感染症の難治化要因であるバイオフィーム形成と薬剤耐性を制御する上での新たな標的分子となり得ることを示唆している。

## VI. 休眠移行メカニズムの解析

生きているが培養できない、休眠状態の細菌は、通常の培養法で培養できないため、細菌学的検査で検出できなくなる可能性があり、临床上問題となりうる。病原細菌を含む多くの細菌がストレス暴露(低温や栄養飢餓、抗菌剤等)により、休眠状態になることが知られているがその機序は不明なところが多い。腸管出血性大腸菌を含むグラム陰性菌について、低温・低栄養ストレスに暴露されると休眠状態になる株とならない株があることを見出した。これまでの検討により休眠状態への移行は一遺伝子の変異に起因し、酸素呼吸によりペリプラズム内に生じたヒドロキシラジカルが、細胞死を引き起こすことのために培養できないことが明らかになった。本メカニズムを基に開発した休眠細菌用の培地を用いることで、休眠状態の腸管出血性大腸菌(食中毒細菌)を分離培養することが可能になった。

## VII. バイオフィーム離脱細菌の解析

バイオフィームからの菌の離脱は、生体内において新たな部位への感染を引き起こし、感染の悪化に関与していると考えられる。これまで、黄色ブドウ球菌バイオフィームから離脱した菌は、好中球による貪食・殺菌に抵抗性を示すこと、マウス感染モデルにおいて血中菌数・臓器内菌数が高く、マウス生存率を優位に低下させ、高い病原性を保持していることを見出した。本研究では、さらに離脱細菌の性

状について、カタラーゼの発現により $H_2O_2$ に抵抗性を持つこと、アミノグリコシド系抗菌薬への感受性が低下していることを明らかにした。このことから、離脱細菌は浮遊細菌と異なる性状を有し、バイオフィームからの菌の離脱は、感染を悪化させる可能性が示唆された。

## 「点検・評価」

### 1. 教育について

教育に関しては、コース臨床基礎医学のユニット「細菌・真菌と感染」、「感染症総論」の講義を担当した。ユニット「細菌学実習」は本プログラム内容の理解促進のため、112名を数班に分け、8名のスタッフが学生に密着した指導を行った。ユニット「免疫学実習」においても当講座の教員がスタッフとして参加し、学生の指導を行った。また、演習としてユニット「感染・免疫テュートリアル」を担当し、ユニット「症候学演習」においてもテューターとして学生の指導を行った。

3年次医学科生のコース研究室配属では5名を受け入れ、多岐にわたる研究指導を行った。またMD-PhDコースの学生を2名受け入れ研究指導を行った。指導した医学科生が第136回成医会総会にてポスター発表を行い、優秀ポスター発表賞を受賞した。

看護学科(国領校)2年次学生に微生物学、看護専門学校(新橋)1年次学生に感染と免疫、柏看護専門学校1年次学生に微生物学の講義を行った。

大学院教育では、医学研究科医学系専攻博士課程の大学院生1名の研究指導を行った。

### 2. 研究について

昨年度に引き続き、基礎細菌学的研究、感染免疫学的研究及びワクチンの開発研究を行った。学内の研究室(呼吸器内科、内視鏡科、感染制御科、総合医科学研究センター等)及び学外の研究機関(国立感染症研究所、大阪大学、東北大学、千葉大学、熊本大学、筑波大学、産業技術総合研究所等)とも積極的に共同研究を実施し、研究を進展させた。特に、黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成機序と制御法の開発に関する研究、真菌感染症の感染防御機構の解明に関する研究等に関して、合計6報の英文原著論文を発表した。そのなかには雑誌の表紙に掲載されたものもある。また、これらの研究成果について、種々の関連学会にてシンポジウムや一般演題で発表した。さらに、競争的研究資金の申請を積極的に行い、文部科学省科学研究費補助金、AMED、JST ERATO、厚生労働科学研究費補助金、及び各種財

団助成金の獲得に繋がっている。今後も、学内外の研究室との共同研究を推進し、最新の研究成果を発表していくとともに、若手研究者の育成にも努めたい。

## 研究業績

### I. 原著論文

- 1) Yonemoto K, Chiba A, Sugimoto S, Sato C, Saito M, Kinjo Y, Marumo K, Mizunoe Y. Redundant and distinct roles of secreted protein Eap and cell wall-anchored protein SasG in biofilm formation and pathogenicity of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 2019; 87(4) : e00894-18.
- 2) Abe M, Nakamura S, Kinjo Y, Masuyama Y, Mitsuyama J, Kaku M, Miyazaki Y. Efficacy of T-2307, a novel arylamidine, against ocular complications of disseminated candidiasis in mice. *J Antimicrob Chemother* 2019; 74(5) : 1327-32.
- 3) Okai C, Itani Y, Furuta A, Mizunoe Y, Iwase T. Rapid identification and quantification of *Lactobacillus rhamnosus* by real-time PCR using a TaqMan probe. *Jpn J Infect Dis* 2019; 72(5) : 323-5.
- 4) Lopes AA, Yoshii Y, Yamada S, Nagakura M, Kinjo Y, Mizunoe Y, Okuda K. Roles of lytic transglycosylases in biofilm formation and  $\beta$ -lactam resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2019; 63(12) : e01277-19.
- 5) Ueno K, Yanagihara N, Otani Y, Shimizu K, Kinjo Y, Miyazaki Y. Neutrophil-mediated antifungal activity against highly virulent *Cryptococcus gattii* strain R265. *Med Mycol* 2019; 57(8) : 1046-54.
- 6) Kunoh T, Morinaga K, Sugimoto S, Miyazaki S, Toyofuku M, Iwasaki K, Nomura N, Utada AS. Polyfunctional nanofibril appendages mediate attachment, filamentation, and filament adaptability in *Leptothrix cholodnii*. *ACS Nano* 2020; 14(5) : 5288-97. Epub 2019 Dec 5.

### II. 総説

- 1) 佐藤主税, Memtily N, 佐藤真理, 杉本真也. 親水環境での電子顕微鏡：クライオ電顕と ASEM 組織観察。表面と真空 2019; 62(4) : 198-204.

### III. 学会発表

- 1) 田嶋亜紀子, 金城雄樹. (ポスター) バイオフィルム dispersed 細菌の病原性. 第 92 回日本細菌学会総会. 札幌, 4 月.
- 2) 大石和徳, 常 彬, 大西 真, 金城雄樹. (ポスター)

わが国における 12F 血清型による成人侵襲性肺炎球菌感染症の臨床像. 第 92 回日本細菌学会総会. 札幌, 4 月.

- 3) 金城雄樹. (シンポジウム 04: 脂質を介した感染と共生の制御) 糖脂質は肺炎球菌感染に対するワクチンの防御効果を誘導する. 第 92 回日本細菌学会総会. 札幌, 4 月.
- 4) 阿部雅広, 金城雄樹, 上野圭吾, 賀来満夫, 宮崎義継. (口頭) ステロイド投与下の免疫抑制マウスにおける腸管からの *Candida* 属播種モデル構築に関する研究. 第 93 回日本感染症学会総会・学術講演会. 名古屋, 4 月.
- 5) 奥田賢一, 金城雄樹. (口頭) メチシリン耐性黄色ブドウ球菌のトランスグリコシラーゼはバイオフィルム形成と薬剤耐性に関与する. 第 67 回日本化学療法学会総会. 東京, 5 月.
- 6) 金城雄樹, 大石和徳. (ベーシックレクチャー 5) 肺炎球菌感染症とワクチン. 第 67 回日本化学療法学会総会. 東京, 5 月.
- 7) 林崎浩史, 高塚翔吾, 川久保俊, 竹山春子, 川上和義, 大石和徳, 宮崎義継, 金城雄樹. (口頭) 糖脂質アジュバントを用いた肺炎球菌ワクチンの抗体産生誘導及び感染防御機構の解明. 日本比較免疫学会第 31 回学術集会・第 30 回日本生体防御学会学術総会. 福岡, 9 月.
- 8) 高塚翔吾, 林崎浩史, 犬飼達也, 山越 智, 梅山 隆, 星野泰隆, 上野圭吾, 阿部雅広, 宮崎義嗣. (ポスター) インフルエンザ続発性肺炎アスペルギルス症モデルの確立と重症化メカニズムに関する研究. 第 63 回日本医真菌学会総会・学術集会. 千葉, 10 月.
- 9) 千葉明生, 金城雄樹. (口頭) 黄色ブドウ球菌のバイオフィルム形成における細胞外 RNA の重要性. 第 68 回日本感染症学会東日本地方学術集会・第 66 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会. 仙台, 10 月.
- 10) 金城雄樹, 常 彬, 大西 真, 大石和徳. (口頭) 成人侵襲性肺炎球菌症例由来菌株の血清型及び PspA 型の解析. 第 68 回日本感染症学会東日本地方学術集会・第 66 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会. 仙台, 10 月.
- 11) 寺澤友梨香, 杉本真也, 金城雄樹. (ポスター) 細菌のアミロイド線維形成を制御するペリプラズム局在プロテアーゼの発見. 第 136 回成医学会総会. 東京, 10 月.
- 12) Hayashizaki K, Takatsuka S, Kawakubo S, Kamii Y, Takahashi Y, Kawakami K, Kubo M, Kinjo Y. (Workshop10: Regulation of B Cell Development, Activation and Function) The protein and glycolipid vaccine induce long-term protection against pneumococcal infection through differentiation of follicular helper NKT cells. 第 48 回日本免疫学会学術集

会、浜松、12月。

- 13) 杉本真也, 山中邦俊, 小椋 光, 金城雄樹. (ポスター) ペリプラズム局在プロテアーゼによる細菌のアミロイド線維形成の制御機構. 第42回日本分子生物学会年会. 福岡, 12月.
- 14) 金城雄樹, 常 彬, 丸山貴也, 藤倉裕之, 砂川富正, 西順一郎, 渡邊 浩, 鈴木 基, 大石和徳. (口頭) 成人の侵襲性肺炎球菌症例から分離した菌株の血清型及び Pneumococcal surface protein A (PspA) 型分布解析. 第23回日本ワクチン学会学術集会. 東京, 12月.
- 15) Sugimoto S, Yamanaka K, Ogura T, Kinjo Y. (Poster) The DnaK/Hsp 70 system modulates the activity of AAA + protease ClpXP. Keystone Symposia: AAA + Proteins: From Atomic Structures to Organisms (A5). Tahoe City, Jan.
- 16) 奥田賢一, Lopes AA, 吉井 悠, 山田聡美, 永倉茉莉, 水之江義充, 金城雄樹. (ポスター) MRSA におけるトランスグリコシラーゼ遺伝子の欠損は mecA 発現レベルに関わらず  $\beta$ -ラクタム感受性を誘導する. 第93回日本細菌学会総会. 名古屋, 2月.
- 17) 川久保俊, 高塚翔吾, 林崎浩史, 竹山春子, 大石和徳, 宮崎義継, 金城雄樹. (ポスター) ナチュラルキラー T 細胞の活性化を介した肺炎球菌蛋白ワクチンの免疫学的解析. 第93回日本細菌学会総会. 名古屋, 2月.
- 18) 田嶋亜紀子, 金城雄樹. (ポスター) バイオフィルム遊離細菌における好中球貪食回避. 第93回日本細菌学会総会. 名古屋, 2月.
- 19) 千葉明生, 金城雄樹. (ポスター) メチシリン耐性黄色ブドウ球菌に対する納豆菌の抗菌活性. 第93回日本細菌学会総会. 名古屋, 2月.
- 20) 金城雄樹. (ワークショップ WS01: 多角的な研究アプローチで再考する肺炎球菌感染症-疫学からワクチン・治療法まで-) 肺炎球菌蛋白ワクチンによる免疫応答の解析. 第93回日本細菌学会総会. 名古屋, 2月.

## V. その他

- 1) 奥田賢一. 最新の技術やニュースの紹介: バイオフィルム形成阻害試験自動化システム. 日本バイオフィルム学会会報 2019; 4: 7.
- 2) 杉本真也. イベント参加報告: 第92回日本細菌学会総会. 日本バイオフィルム学会会報 2019; 5: 5.

## 熱帯医学講座

講座担当教授: 嘉禎 洋陸 衛生動物学, 寄生虫学  
教授: 石渡 賢治 寄生虫感染と粘膜免疫

### 教育・研究概要

#### I. 芽殖孤虫の導入とマウスでの感染性

芽殖孤虫は、成虫が確認されていない条虫の幼虫形(孤虫)で、“わさびの根のよう”に芽が分枝したような形態を呈して人体内で増殖する。初症例は1905年に飯島 魁によって報告されている。以来、これまで世界で21例ほどしか報告がないが、多くの例で死の転帰をとっている。本邦での症例は7例(推定感染地は東京3例, 京都と熊本で2例づつ)と比較的多く、最新症例は虎ノ門病院から報告されている(青島正大他. 日胸疾患誌 1989)。成虫はもとより生活環, 感染経路が全く明らかになっていないが、芽殖孤虫症の病態は次のようにまとめられる。すなわち、皮下を始め、骨を含む全身の臓器で孤虫が無秩序に分枝あるいは出芽などによって増殖・分裂し、時として転移する。現行の抗寄生虫薬が功を奏さない。我々は世界で唯一、患者より分離された孤虫を維持してきた国立科学博物館より分与を受け、貴重な種の維持を分担する中で以下の様な事柄を確認した。1. マウス腹腔内への移植後2ヶ月程で腹腔内で遊離した状態で増殖・分裂して個体数を増やす。2. 時に腹膜, 横隔膜, 肝臓および肺に病巣を認める。3. 組織学的に病巣内に孤虫は観察されないが、孤虫の成分と考えられる物質周囲に円形細胞を主体とする細胞浸潤を認める。4. 3ヶ月ほど培養液中で維持しても増殖・分裂しないが、マウス腹腔内に移植すれば個体数を増やす。5) 孤虫を2分割し、その断片をマウス腹腔内に移植しても増殖する。今後、本培養系および動物実験系を用いて、孤虫の増殖・分裂様式を明らかにし、また治療薬の開発を行う予定である。

#### II. ウイルス媒介蚊のゼノモニタリングを指向した vDNA-LAMP (virus-derived DNA -loop-mediated isothermal amplification) 法の開発

デング熱やジカ熱は、蚊媒介性のウイルスによる感染症である。これらの蚊媒介性ウイルス感染症の包括的なコントロールには、蚊におけるウイルス保有状況を正確かつリアルタイムに明らかにすること