小児気道由来 nontypable *Haemophilus influenzae* の 付着因子と biofilm 形成能

西 順一郎, 藺牟田直子, 亀之園 明, 徳田浩一, 田中 覚, 真砂州宏
(鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・小児発達機能病態学)

要旨: 本邦の小児気道由来 nontypable *Haemophilus influenzae* (NTHi) の付着因子と biofilm 形成能についての報告はない。NTHi 108株について, 線毛遺伝子 *hifA*, 付着遺伝子 *hmw*, *hia*, *hap*, biofilm 関連遺伝子 *siaB* を PCR で検出し, biofilm 形成能を microtiter plate 法で測定した。保有頻度は, *hifA* 22.2%, *hmw* 48.1%, *hia* 55.6%, *hap* 22.2%, *siaB* 38.0%。保有状況と biofilm 形成能には多様性がみられた。*hifA* と *hia* 陽性株には biofilm 形成株が多く ($p=0.0245$, 0.0360), *hifA* と *hia* は biofilm 形成能と関連していた。反復性下気道感染症患者9名19株には, 急性患者に比べて biofilm 形成株が多く (89.5% vs. 63.2%), 下気道感染症の遷延に biofilm の関与が示唆された。

Prevalence of adhesin genes and biofilm formation among clinical isolates of nontypable *Haemophilus influenzae*

Junichiro Nishi, Naoko Imuta, Akira Kamenosono, Koichi Tokuda,
Satoru Tanaka, Kunihiro Manago
(Department of Pediatrics, Graduate School of Medical and Dental Sciences,
Kagoshima University, Kagoshima, Japan)

Summary: The pathogenesis of respiratory infections due to nontypable *Haemophilus influenzae* (NTHi) begins with bacterial colonization of mucosa. Adhesins such as hemagglutinating pili (HifA), HMW1/2, Hia, Hap are important in this process. Recently, biofilm formation of NTHi was reported to play a role in the pathogenesis of otitis media and the respiratory infections. However, there are few reports on the prevalence of adhesins and the biofilm formation among clinical isolates of NTHi. We examined 108 strains of NTHi for adhesin genes and a biofilm-related gene by PCR, and for biofilm formation by a quantitative biofilm assay. The prevalence of adhesin genes were as follows: *hifA* 22.2%, *hmw* 48.1%, *hia* 55.6%, *hap* 22.2%, *siaB* 38.0%. Variability among isolates was observed in their ability to form biofilms. The rate of a biofilm-positive strain was significantly higher in *hifA* or *hia* positive strains than negative strains ($p=0.0245$ and 0.0360 , respectively). Furthermore, the incidence of a biofilm-positive strain was higher among strains from patients with recurrent respiratory infections than those from patients with acute infections (89.5% vs. 63.2%). We conclude that hemagglutinating pili and Hia are associated with biofilm formation, and that biofilm formation plays an important role in recurrent respiratory infections.

Key word : nontypable *Haemophilus influenzae*, 付着因子, biofilm, 反復性気道感染症, 小児

はじめに

Nontypable *Haemophilus influenzae* (NTHi) は, 小児の中耳炎, 副鼻腔炎, 気管支炎, 肺炎などの気道感染症の主要な原因菌である。成人では慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) の急性増悪に関与している。これらの疾患は, NTHi が粘膜細胞へ付着することから始まるが, その付着メカニズムに関して分子レベルの研究が進められている。

付着因子は, これまで線毛 hemagglutinating pili, 付着蛋白 HMW1 または HMW2, Hia, Hap などが知られている (図 1)^{1, 2)}。線毛 pili は, 当初 *H. influenzae* type b (Hib) で見出された 25kDa の蛋白で, 大腸菌の type 1 線毛とホモロジーがある³⁾。NTHi の一部の株は, この線毛を保有しており, *hifA* 遺伝子とその主要な構造蛋白をコードしている¹⁾。線毛を持たない NTHi もヒト上皮細胞に付着能を持ち, High-molecular-weight (HMW) surface-exposed protein として HMW1 と HMW2 が同定されている⁴⁾。120kDa の蛋白で, HMW1 と HMW2 はアミノ酸レベルで 71% の同一性があり, 百日咳菌の filamentous hemagglutinin

(FHA) とシーケンスの類似性がみられる。HMW1 と HMW2 に対する免疫血清は, NTHi の約 75% に反応する⁴⁾。HMW1 は, シアル酸を有する多糖体構造を持った糖蛋白レセプターに結合するとされている⁵⁾。約 20% の NTHi は HMW1/HMW2 を保有していない⁶⁾。St Geme JW らは, これら HMW 陰性株中約 80% の株が 115kDa の *Haemophilus influenzae* adhesin (Hia) を保有しており, NTHi 全体の約 20% が Hia を保有すると報告した^{6, 7)}。一方 Ecevit IZ らは, Hia は全体の 33% にみられ, また HMW 保有株にも検出されるとしている⁸⁾。線毛 pili を保有する株が同時に Hia を持つことが多く, 線毛と Hia が共同して付着機能を発揮していると考えられる¹⁾。他に, Hap という serine-type IgA1 protease とホモロジーのある 155kDa の付着蛋白が報告されており⁹⁾, 粘膜への付着と同時に細菌の細胞間接着にも関与している¹⁰⁾。

また本菌は中耳炎, 副鼻腔炎, 気道粘膜などの感染局所粘膜上で biofilm を形成することが報告されており^{11~15)}, 株により biofilm 形成能が異なることや biofilm 形成に線毛 pili が重要であることが報告されている¹⁶⁾。また, biofilm 形成には, 菌体表面構造である lipooligosaccharide のシアル化が必要であるとされている^{17, 18)}。

図 1 Nontypable *H. influenzae* の付着因子。

線毛 pili と Hia は共同して付着機能を発揮している。線毛を持たない株は, HMW1 と HMW2 を持つ。Hap は, 粘膜への付着と同時に細菌の細胞間接着にも関与している。(参考文献 1 の図を一部改変)

Biofilm 形成は気道細菌感染症, 特に持続感染・遷延性感染と関連していることが推測されているが, NTHi の biofilm 形成メカニズムの詳細はまだ明らかになっていない。Biofilm 形成は菌が粘膜に付着することから始まるが, 臨床分離株における付着因子の保有状況と biofilm 形成能との関連についての疫学的報告はない。これらの関連を調べることは, biofilm 形成メカニズムを分子レベルで解明するために, また NTHi に対するワクチンの標的分子を選択するためにも重要であると考ええる。

今回我々は, 小児呼吸器感染症における NTHi の病原性発現メカニズムの一端を明らかにする目的で, 付着因子と biofilm 形成能に着目して臨床分離株の検討を行った。

対象と方法

対象は, 1999年から2005年にかけて鹿児島県で分離された小児気道由来 NTHi 108株。喀痰(洗浄喀痰)由来40株 (37.3%), 鼻咽腔・咽頭・扁桃由来18株 (16.7%), 鼻汁・鼻腔48株 (44.4%), 耳漏2株 (1.9%)。免疫不全, 先天異常, 神経筋疾患などの基礎疾患を持ち下気道感染を

年3回以上繰り返す反復性下気道感染症9名19株を含む。同一患児からの分離株は1年に1株に限定した。

インフルエンザ菌の分離と同定は, 鹿児島大学病院検査部と鹿児島市医師会臨床検査センターにおいて通常どおり行い, スキムミルク内で-80℃に保存した。莢膜型別は, a~f の莢膜関連遺伝子 *bexA* を検出する PCR を行い陰性株を NTHi とした¹⁹⁾ (表1)。陽性コントロールには, Hib と莢膜型 a の臨床分離株を用いた。

付着因子の遺伝子は, 線毛遺伝子 *hifA*, 付着蛋白遺伝子 *hmw1/2*, *hia*, *hap*, および biofilm に関連する lipooligosaccharide シアル化酵素遺伝子 *siaB* を PCR で検出した。プライマーは参考文献^{19~21)} によるか, Genbank シークエンスから設定した (表1)。*hmw* のプライマーは, *hmw1* と *hmw2* 両方を検出できるように設定した。また *hia* も, C 末端側の保存領域を標的に設定した。PCR 反応は常法どおり行い, 反応時間は94℃ 1分, アニーリング54℃ 1分, 伸張反応72℃ 1分の30サイクル (*hifA* のみアニーリング温度50℃), アガロースゲル電気泳動で標的バンドを確認した。

表1 本研究で使したプライマーリスト

primers	genes	Sequence (5' to 3')	Map coordinates	Genbank accession No. or references
hifA-F	<i>hifA</i>	ATGAAAAAAACACT(AT)CTTGGTAGC	1-24*	AF020909-AF20917, 18)
hifA-R		TTAT(CT)CGTAAGCAATT(GT)GGAAATC	601-624*	
hmw-F	<i>hmw1</i>	ATGAACAAGATATATCGTCTC	351-371	U08876, AY497552
hmw-R	<i>hmw2</i>	CCGTGATTACAAATTCAGC	933-952	
hia-C-F	<i>hia</i>	GCTTCACAGTTACCAACAAGC	3350-3369	U38617
hia-C-R		TTACCACTGGTAACCAACACC	3527-3547	
hap-F	<i>hap</i>	TGTAGTGTACGTAACGGCG	291-310	U11024
hap-R		CCGATACGAACACGTTCTGG	580-598	
siaB-F	<i>siaB</i>	AACCGCATATTCTTGAGG	-	19)
siaB-R		TAACCGATTGTATCATCC	-	
BexA-HI-F	<i>bexA</i>	CGTTTGTATGATGTTGATCCAGAC	3551-3574	X54987, 17)
BexA-HI-R		TGTCCATGTCTTCAAAATGATG	3872-3893	

*AF020909 の番号を示す。

定量的 biofilm アッセイは, これまで報告されたものを参照し一部改変した^{16,22)}。96穴ポリスチレン・マイクロタイタープレートを用い, 0.25% グルコース添加の Brain heart infusion (BHI) 液体培地 (10 μ g/ml の hemin と10 μ g/ml の nicotineamide adenine dinucleotide を含む) 内で一晚 (5 % CO₂, 約18時間) 培養, 洗浄後0.5% クリスタル紫で染色, エタノールで溶解し, ELISA プレートリーダーで吸光度 570nm を測定し, biofilm 形成能を OD で定量

的に示した。これまでの報告²²⁾を参照し OD₅₇₀ 0.2以上を biofilm 形成株とした。実験は duplicate で行い平均を biofilm 形成能とした。

結 果

付着遺伝子保有頻度は, *hifA* 24株 (22.2%), *hmw* 52株 (48.1%), *hia* 60株 (55.6%), *hap* 24株 (22.2%), *siaB* 41株 (38.0%) であった (図 2)。Biofilm 形成能は, OD₅₇₀ が 0 から2.3に分布し株間で大きな違いがみられた (図 3 A)。

図 2 付着遺伝子 *hifA*, *hmw1/2*, *hia*, *hap* と biofilm 関連遺伝子 *siaB* の PCR 法による保有頻度。

図 3 (A) NTHi 全株の biofilm 形成能 (B) 検出部位別の biofilm 形成能 (Box-plot 図)

検出部位別の biofilm 形成能には、有意差はみられなかった (図 3 B)。

hmw, *hap*, *siaB* と biofilm 形成能との明らかな関連はみられなかったが、*hifA* 陽性株では OD₅₇₀ 0.2 以上の biofilm 形成株は 87.5% (21/24), *hifA* 陰性株では 60.7% (51/84) であり、有意に *hifA* 陽性株に biofilm 形成株が多かった ($p = 0.0245$, Fisher's exact test) (図 4 A)。また、*hia* 陽性株では biofilm 形成株は 76.7% (46/60), 陰性株では 54.1% (26/48) であり、有意に *hia* 陽性株に biofilm 形成株が多かった ($p = 0.0361$, Fisher's exact test) (図 4 B)。さらに、*hifA* と *hia* が共に陽性の株では、biofilm 形成株は 85.0% (17/20) を占めたが、共に陰性の株では 52.4% (22/42) であり、有意に *hifA*・*hia* 陽性株に biofilm 形成株が多かった ($p = 0.0230$, Fisher's exact test)。

基礎疾患があり反復性の下気道感染症患者 9 名から分離された NTHi 19 株の付着遺伝子と biofilm 形成能を表 2 に示す。19 株中 17 株は biofilm 形成株であり形成能も高値を示す株が多くみられた。とりわけ無ガンマグロブリン血症患者 2 名では、付着遺伝子の分布は一部異なるが、biofilm 形成能の強い株が数年にわたり連続して検出されていた。急性患者由来株にお

ける biofilm 形成株の割合は 63.2% (55/87) であったのに対し、反復性下気道感染症患者では 89.5% (17/19) であり、有意に反復性下気道感染症患者で biofilm 形成株の割合が高かった (図 5)。

考 察

付着遺伝子の検出頻度については、海外からの報告がみられる。線毛 pili は 32%²³⁾ にみられたとされており、我々の検討はこれと大差はなかった。*hmw* は、St Geme JW ら⁷⁾ の Southern blot による検討では 79.7%, Ecevit IZ ら⁸⁾ の DNA hybridization 法では 55.6% であった。我々の結果は 48.1% とやや低値であったが、PCR 法という方法の違いが反映している可能性がある。Ecevit IZ ら⁸⁾ は、*hmw1* が 51%, *hmw2* が 23% にみられたとしているが、我々の PCR は両者を区別しておらず、詳細な分析には今後の検討が必要である。Hia は、これまでの検出率 20~33%^{7,8)} に比べて我々の検討では 55.6% と高値を示した。また Ecevit IZ⁸⁾ らが指摘したように *hmw* 陰性株にもみられ、*hmw* と *hia* 両保有株が 20.4% (22/108) を占めた。また *hmw* または *hia* のどちらかを保有する株は、St Geme JW ら⁷⁾ の検討では 95% を占めて

図 4 (A) *hifA* 陰性株と陽性株の biofilm 形成能の比較。(B) *hia* 陰性株と陽性株の biofilm 形成能の比較。(C) *hifA* と *hia* 両遺伝子陰性株と両遺伝子陽性株との biofilm 形成能の比較。OD₅₇₀が0.2 (破線) 以上を biofilm 形成株とする。(Box-plot 図)

表 2 反復性の下気道感染症患者由来の NTHi の付着遺伝子と biofilm 形成能

Patient	Disease	Year	Sample	<i>hifA</i>	<i>hmw</i>	<i>hla</i>	<i>hap</i>	<i>siaB</i>	Biofilm (OD ₅₇₀)
A	XLA	1999	Sputum	-	+	-	-	-	0.532
		2001	Sputum	-	-	-	-	-	0.014
		2002	Sputum	+	+	-	-	-	0.502
		2003	Sputum	+	+	-	-	-	1.429
		2004	Sputum	-	+	-	-	-	1.192
		2005	Sputum	-	+	-	-	-	1.053
B	XLA	2002	Sputum	-	+	-	-	-	0.053
		2004	Sputum	-	+	-	-	+	0.563
		2005	Sputum	-	+	-	-	+	0.771
C	CA	2000	NP	-	+	-	-	-	0.219
		2001	Sputum	+	-	+	-	+	0.258
		2002	Nose	-	+	-	-	-	0.580
D	NMD	2000	Sputum	-	-	+	-	+	0.260
		2002	Sputum	+	-	+	-	-	0.476
E	CA	2001	Sputum	-	-	+	-	-	0.477
F	NMD	2001	Sputum	-	-	-	-	-	0.445
G	NMD	2001	Sputum	-	-	-	-	-	0.978
H	NMD	2003	Sputum	-	+	+	+	-	1.435
I	ID	2003	Sputum	-	+	+	-	+	0.411

XLA: X-linked agammaglobulinemia, CA: congenital anomaly, NMD: neuromuscular disease, ID: immunodeficiency (unknown), NP: nasopharynx

図 5 急性呼吸器感染症と反復性呼吸器感染症由来株の biofilm 形成能の比較. OD₅₇₀が0.2 (破線) 以上を biofilm 形成株とする. (Box-plot 図)

おり、我々の検討でも83.3%と両者がNTHiの主要な付着因子であると考えられる。*hap*と*siaB*は、臨床分離株における報告がなく比較はできないが、我々の検討ではそれぞれ22.0%, 38.0%にとどまっており、PCRプライマー部位のシーケンス多型のために陽性率が低くなっている可能性が考えられる。したがって、DNA hybridization法による検討も今後必要である。これら付着因子の保有状況は、株によりさまざまであり、NTHiの遺伝的多様性を示すものと考えられる。

臨床分離株のbiofilmの検討は少ないが、Murphy TFら¹⁶⁾は株によりbiofilm形成能が異なることを疫学的に報告し、またbiofilm形成に線毛piliが重要であることを欠損株を用いた実験で明らかにしている。我々の検討でもbiofilm形成能には株間で多様性がみられた。検体間では大きな違いはみられなかった。中耳炎由来の株は2株のみで今回は解析の対象にならなかった。付着因子の中では、*hifA*と*hia*がbiofilm形成能の強さに関与していることが明らかになった。線毛pili(*hifA*)と*hia*のbiofilmとの関連について疫学的に検討した報告は今回が初めてである。*Hia*は、線毛pili保有株にみられる場合は、piliの働きを補完する役割があるため、今回の結果もそれを反映していると思われる。

反復性下気道感染症患者から分離された株にはbiofilm形成株の割合が高く、また特に無ガンマグロブリン血症(XLA)患者の気道感染では、biofilm形成能の強い株が数年にわたり連続して検出されていた。これらの結果は、慢性の気道感染症においてbiofilm形成能の強いNTHiが病態に関与していることを示唆している。成人のCOPDの急性増悪にはNTHiが関与しているが、表2のXLA患者は後期にはCOPDの病態を呈していた。Cystic fibrosisの慢性気道感染には緑膿菌のbiofilmが関与するように、COPDなど慢性下気道感染ではNTHiのbiofilm形成株の関与が大きい可能性があると考えられる。また、反復性下気道感染症患者から分離された株におけるbiofilm形成株の割合は高かったが、一方biofilmと関連するとされる*hap*と*siaB*の検出率は低かった。この理

由としては、前述したように、PCR法のプライマー設定部位の多型のため偽陰性が多くなっている可能性が考えられる。今後検出方法について再検討する必要があると考える。

気道におけるbiofilm形成は、気道に分泌される抗菌活性物質やIgAが細菌に直接及ばなくなり、食細胞による貪食作用からの回避につながる。さらに抗菌薬活性もbiofilm内の細菌には及びにくく、治療に影響を与える。遷延性のNTHi気道感染症における新たな治療法を探るためにも、付着因子やbiofilm形成メカニズムの研究が今後とも重要であると考えられる。

謝 辞

インフルエンザ菌の分離、同定、供与にご協力いただいた鹿児島市医師会臨床検査細菌検査室および鹿児島大学病院検査部細菌検査室の皆様、馬場小児科医院馬場泰光先生に深謝いたします。

参考文献

- 1) Rao, V.K., Krasan, G.P., Hendrixson, D.R. et al.: Molecular determinants of the pathogenesis of disease due to non-typable *Haemophilus influenzae*. FEMS Microbiol Rev. 23: 99-129, 1999.
- 2) St Geme, J.W., 3rd: Insights into the mechanism of respiratory tract colonization by non-typable *Haemophilus influenzae*. Pediatr Infect Dis J. 16: 931-5, 1997.
- 3) Guerina, N.G., Langermann, S., Schoolnik, G.K. et al.: Purification and characterization of *Haemophilus influenzae* pili, and their structural and serological relatedness to *Escherichia coli* P and mannose-sensitive pili. J Exp Med. 161: 145-59, 1985.
- 4) Barenkamp, S.J., Leininger, E.: Cloning, expression, and DNA sequence analysis of genes encoding nontypeable *Haemophilus influenzae* high-molecular-weight surface-exposed proteins related to filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. Infect Immun. 60: 1302-13, 1992.
- 5) St Geme, J.W., 3rd, Falkow, S., Barenkamp, S.J.: High-molecular-weight proteins of non-

- typable *Haemophilus influenzae* mediate attachment to human epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90 : 2875-9, 1993.
- 6) Barenkamp, S.J. St Geme, J.W., 3rd : Identification of a second family of high-molecular-weight adhesion proteins expressed by nontypeable *Haemophilus influenzae*. 19 : 1215-23, 1996.
- 7) St Geme, J.W., 3rd, Kumar, V.V., Cutter, D. et al. : Prevalence and distribution of the hmw and hia genes and the HMW and Hia adhesins among genetically diverse strains of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun*. 66 : 364-8, 1998.
- 8) Ecevit, I.Z., McCrea, K.W., Pettigrew, M.M. et al. : Prevalence of the hifBC, hmw1A, hmw2A, hmwC, and hia Genes in *Haemophilus influenzae* Isolates. *J Clin Microbiol*. 42 : 3065-72, 2004.
- 9) St Geme, J.W., 3rd, de la Morena, M.L. Falkow, S. : A *Haemophilus influenzae* IgA protease-like protein promotes intimate interaction with human epithelial cells. *Mol Microbiol*. 14 : 217-33, 1994.
- 10) Hendrixson, D.R. St Geme, J.W., 3rd : The *Haemophilus influenzae* Hap serine protease promotes adherence and microcolony formation, potentiated by a soluble host protein. *Mol Cell*. 2 : 841-50, 1998.
- 11) Post, J.C. : Direct evidence of bacterial biofilms in otitis media. *Laryngoscope*. 111 : 2083-94, 2001.
- 12) Ehrlich, G.D., Veeh, R., Wang, X. et al. : Mucosal biofilm formation on middle-ear mucosa in the chinchilla model of otitis media. *JAMA*. 287 : 1710-5, 2002.
- 13) Hall-Stoodley, L., Hu, F.Z., Gieseke, A. et al. : Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media. *JAMA*. 296 : 202-11, 2006.
- 14) Starner, T.D., Zhang, N., Kim, G. et al. : *Haemophilus influenzae* forms biofilms on airway epithelia : implications in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 174 : 213-20, 2006.
- 15) Sanderson, A.R., Leid, J.G. Hunsaker, D. : Bacterial biofilms on the sinus mucosa of human subjects with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope*. 116 : 1121-6, 2006.
- 16) Murphy, T.F. Kirkham, C. : Biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenzae* : strain variability, outer membrane antigen expression and role of pili. *BMC Microbiol*. 2 : 7, 2002.
- 17) Swords, W.E., Moore, M.L., Godzicki, L. et al. : Sialylation of lipooligosaccharides promotes biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun*. 72 : 106-13, 2004.
- 18) Jurcisek, J., Greiner, L., Watanabe, H. et al. : Role of sialic acid and complex carbohydrate biosynthesis in biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenzae* in the chinchilla middle ear. *Infect Immun*. 73 : 3210-8, 2005.
- 19) Falla, T.J., Crook, D.W., Brophy, L.N. et al. : PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol*. 32 : 2382-6, 1994.
- 20) Clemans, D.L., Marrs, C.F., Patel, M. et al. : Comparative analysis of *Haemophilus influenzae* hifA (pilin) genes. *Infect Immun*. 66 : 656-63, 1998.
- 21) Hood, D.W., Makepeace, K., Deadman, M.E. et al. : Sialic acid in the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae* : strain distribution, influence on serum resistance and structural characterization. *Mol Microbiol*. 33 : 679-92, 1999.
- 22) Wakimoto, N., Nishi, J., Sheikh, J. et al. : Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*. *Am J Trop Med Hyg*. 71 : 687-90, 2004.
- 23) Gilsdorf, J.R., Chang, H.Y., McCrea, K.W. et al. : Comparison of hemagglutinating pili of *Haemophilus influenzae* type b with similar structures of nontypeable *H. influenzae*. *Infect Immun*. 60 : 374-9, 1992.