

図1 定期接種としてIPVを使用する国、地域  
(2006年7月現在の状況, WHO資料より作成)

ることの確定には分離ウイルスの分子疫学的解析が必要である。長期のウイルス増殖や伝播を反映した遺伝子の性状を有し、主要なウイルス表面抗原蛋白VP1において、対応するOPV株から1%以上の塩基置換が存在する<sup>3)</sup>。

### 3. 免疫不全宿主における生ワクチン由来株の長期排泄 (immunodeficient vaccine-derived poliovirus ; iVDPV)

免疫不全宿主では、OPV由来株の糞便中への排泄が長期に持続することがある。また、ウイルスは長期に代を重ねるうちに、遺伝子変異により神経毒性を回復している場合がある。1960年代以降、全世界で20例以上の報告があるが、幸いこれまでに二次感染例の報告はない。

## Ⅲ. 不活化ポリオワクチン(IPV)の歩み

不活化ポリオワクチン (inactivated poliovirus vaccine ; IPV) 自体は決して新しいワクチンではなく、OPVと同じく1950年代に、ソーク博士により開発された<sup>4)</sup>。OPVに先駆けて使用が開始され、わが国でも1950年代から試験接種が行われた。しかしその後、一斉投与によ

る劇的な効果や経口ワクチンであるという簡便性の点からOPVが広く普及し、世界そしてわが国のポリオを制圧した。一部の北欧諸国を除いては、OPVが長期にわたってポリオ予防の主戦略となった。

近年、定期接種ワクチンとしてOPVの代わりにIPVを用いる国が増えた理由は、野生株ウイルスによるポリオ患者の減少に伴い、OPVの神経毒性復帰がもたらす健康被害が問題視されるようになったからである。長期にポリオの流行がなく、OPVに比べて高価なIPVの予算確保が可能な先進諸国では、定期接種としてIPVを用いる国が多い(図1)。そのなかでわが国は、2009年3月現在でもOPVを使用しており、先進国のなかでは例外的な存在となった。

IPVには改良も加えられ、濃縮精製工程やD抗原定量法の導入により、現在のIPVはソーク博士のころと比較して、さらに良質なワクチンとなった。初期のワクチンより濃度が高く設定され、強化不活化ポリオワクチン (enhanced potency IPV ; eIPV) と改良当初は呼ばれたが、今ではすべてのIPVがeIPVである。IPVがポリオを予防できる理論的根拠は、①ポリオウイ

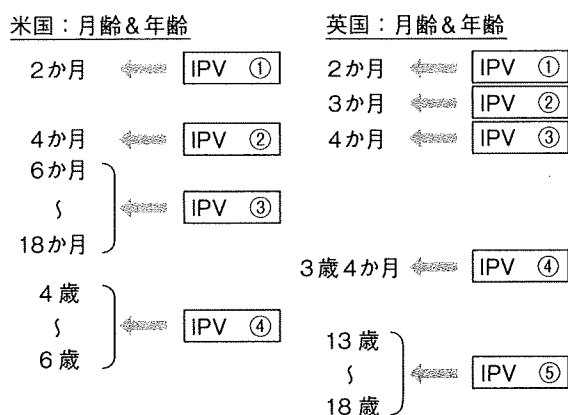


図2 米国および英国におけるポリオ定期接種スケジュール

[CDC: Recommended Childhood and Adolescent Immunization Schedule, USA, 2008/NHS (National Health Service): The UK Immunisation Schedule より作成]

ルスに感染すると麻痺に先んじてウイルス血症が認められること、②血中に中和抗体が存在すれば麻痺発症を予防できることである<sup>4)</sup>。したがって現在のIPVは、開発当初のものと比較して高い予防効果が期待できると考えられる。

#### IV. IPVの有効性と安全性

##### 1. 免疫原性

IPVもOPV同様、I・II・III型のウイルスが混合されている。規定回数を接種した場合、麻痺性ポリオを予防できる有効率はソークワクチンで80~90%、現在のIPVでは90%以上とされる<sup>4)</sup>。ただし、IPVはOPVと比較して腸管局所免疫を付与できる期待が薄い。

##### 2. 副反応

海外ではすでに広く用いられ、おおむね安全に接種できるワクチンと位置付けられている。接種部位の発赤：数%以内、硬結：数~10%、圧痛：10~30%などが報告されているが、重篤な副反応は認められていない<sup>4)</sup>。DPTなどとの混合ワクチンを用いた場合でも、IPVの副反応が増強することはない。

#### 3. 接種の実際

IPVは、生後2か月から接種が可能である。1~2か月間隔で計2~3回の初期免疫を行い、6~12か月後の追加免疫により基礎免疫が完了する。小学校就学前に、再度追加接種を実施する場合も多い。例として、米国と英国のスケジュールを図2に示す。

注射製剤であるIPVは、欧米では、DPT・B型肝炎・b型インフルエンザ菌(Hib)などとの混合ワクチンとして使用されている<sup>5)</sup>。簡便さの点からは経口投与のOPVに及ばないが、他のワクチンとの混合製剤を用いて、一度で多種類の疾患に対する免疫を付与できることはメリットである。

#### V. 日本におけるIPV開発の現状

海外のIPVはポリオウイルスの強毒野生株を不活化するが、わが国で開発中のIPVはOPVの成分である弱毒セービン株から製造される。製造施設の安全管理やバイオセーフティーの面からも注目されるワクチンである。定期接種をOPVからIPVへ転換することを念頭において、DPTとの混合製剤を用いた臨床試験が現在行われている。

…………… 文 献 ……………

- 1) Sutter RW, Kew OM, Cochi SL: Poliovirus vaccine—live. eds Plotkin SA, Orenstein WA, In *Vaccines*, 4th ed, WB Saunders, Philadelphia, 2004; 651-705.
- 2) Bosley AR, Speirs G, Markham NI: Provocation poliomyelitis: vaccine associated paralytic poliomyelitis related to a rectal abscess in an infant. *J Infect* 2003; 47: 82-84.
- 3) 国立感染症研究所感染症情報センター: 世界のワクチン株由来ポリオウイルス (VDPVs)—2006年1月~2007年8月におけるアップデート. *IASR* (病原微生物検出情報) 2007; 28: 328-329. <http://idsc.nih.gov/iasr/28/333/fr3333.html>
- 4) Plotkin SA, Vidor E: Poliovirus vaccine—inactivated. eds Plotkin SA, Orenstein WA, In *Vaccines*, 4th ed, WB Saunders, Philadelphia, 2004; 625-649.
- 5) 中野貴司: 不活化ポリオワクチン. 加藤達夫監修, 予防接種のすべて 2006, 日本小児医事出版社, 東京, 2006; 167-171.

### <特集関連情報>

#### 小児における侵襲性細菌感染症の全国サーベイランス調査

##### 1. はじめに

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）「ワクチンの有用性向上のためのエビデンスおよび方策に関する研究」により、2007～2009（平成19～21）年度の3年間、小児における侵襲性細菌感染症のサーベイランス調査を全国多施設共同研究により実施した。対象とした細菌は、インフルエンザ菌、肺炎球菌、B群レンサ球菌（Group B *Streptococcus*, GBS）であり、いずれも細菌性髄膜炎など、特に年少児で重篤な疾病の原因となる頻度の高い細菌である。

この中でインフルエンザ菌b型（*Haemophilus influenzae* type b, Hib）と肺炎球菌については、欧米には10～20年の遅れをとってしまったが、最近になり、ようやくわが国でも予防のための結合型ワクチンが発売された。これらのワクチンが普及すれば、疾患の疫学は変化し、流行様式に変化が来ることは海外の状況からも予想されるが、わが国ではこれまでHibや肺炎球菌による侵襲性細菌感染症に特化した大規模な前方視的疫学調査結果はほとんどない。また、ワクチン普及前後で疾病負担の程度を比較し、わが国での予防接種導入による効果を評価することは是非とも必要である。本研究は、これらの事項を検討する目的で実施された。

##### 2. 研究組織と調査方法（前ページ表1）

本研究において報告対象とした患者は、生後0日～15歳未満で、インフルエンザ菌、肺炎球菌、GBSによる侵襲性細菌感染症（血液、髄液、関節液など、本来は無菌環境である身体内部から採取した検体から起原菌が分離された感染症）に罹患した全例とした。罹患

率の算出に関しては、諸外国での報告と比較検討できるように、5歳未満の小児を対象とした。実際、本調査で報告された患者の大多数は、5歳未満児であった。調査期間は、2007年1月～2009年12月までの3年間とした。研究班が組織された初年度の調査は夏に開始されたため、初年度の2007年は一部後方視的調査となったが、次年度と最終年度は前方視的に全数把握調査を実施した。

調査対象地域は、初年度は1道8県、次年度と最終年度調査には沖縄県も加わり1道9県となった。調査地域の選定基準は、県下の小児入院患者に関する情報を漏らさず把握できることと、地域的な偏りがなく全国に分散するようにした。これらの地域で、人口ベースの患者発生状況調査（県下患者数全数把握）を行った。病原体診断の精度を高めるために、菌の同定・血清型判定と薬剤感受性解析は、国立感染症研究所で実施した。なお、北海道地域についてはすでに独自の体制で調査が始められていたこともあり、報告対象疾患は細菌性髄膜炎のみとし、菌株の解析は北里生命科学研究所生方公子教授が担当された。

##### 3. 調査結果—2010年2月時点での中間報告

現在、解析の最終段階であり、中間報告として2010年2月時点での暫定値を記載する。一部は後方視的調査となった初年度の2007年1月～12月に報告された患者数は、Hib 髄膜炎64例、Hib 非髄膜炎13例、肺炎球菌髄膜炎28例、肺炎球菌非髄膜炎59例、GBS 髄膜炎10例、GBS 非髄膜炎4例であった。すべての患者を前方視的に登録した次年度（2008年）と最終年度（2009年）の集計結果は、それぞれHib 髄膜炎100例、91例、Hib 非髄膜炎38例、55例、肺炎球菌髄膜炎35例、32例、肺炎球菌非髄膜炎191例、213例、GBS 髄膜炎13例、17例、GBS 非髄膜炎14例、15例であった。

2年目からは調査地域として沖縄が加わり、調査対象人口母数が増えたわけであるが、対象人口の拡大比率よりも患者報告数は増加した。この理由は、年間

表1. 調査対象地域と人口

	北海道	福島	新潟	千葉	三重	岡山	高知	福岡	鹿児島	沖縄	全国
5歳未満人口	210,000	88,000	94,000	260,000	81,000	85,000	30,000	222,000	75,000	81,000	5,434,000
出生数	41,550	17,101	18,724	51,821	15,716	17,099	5,717	46,393	15,090	16,588	1,089,818
調査協力病院数	59	17	41	56	15	17	11	34	18	17	-
担当者	富樫武弘	細矢光亮	内山聖 鳥谷部真一	石和田稔彦	神谷齊 中野貴司	小田慈	脇口宏 前田明彦	岡田賢司	西順一郎	安慶田英樹	-

表2. 小児期侵襲性細菌感染症の罹患率  
(5歳未満人口10万人当たり)

		2007年	2008年	2009年
Hib	髄膜炎	5.6	8.2	7.4
	非髄膜炎	1.4	3.7	5.4
肺炎球菌	髄膜炎	2.4	2.9	2.6
	非髄膜炎	6.3	18.8	21.0
GBS	髄膜炎	0.9	1.1	1.4
	非髄膜炎	0.4	1.4	1.5

(2010年2月11日現在の集計)

を通じての前方視的調査の継続と、調査地域における本研究の認知度が高まったことにより、初年度よりも漏れなく患者が報告されるようになったためと考えられた。また、血液培養が奨励され、非髄膜炎 (occult bacteremia を含む) の報告数が著明に増加したことも一因であろう。

上記の報告数より、5歳未満人口における各疾患の罹患率を計算すると、表2のようになる。また、初年度はわが国の5歳未満人口の21.1%、次年度と最終年度は22.6%をカバーした調査であり、研究班での患者報告数から日本全国で毎年発症している小児期侵襲性感染症の患者数を推計すると表3のように算出された。

#### 4. おわりに

Hib と肺炎球菌は、小児期における侵襲性感染症の起因菌として頻度が高い。細菌性髄膜炎はその代表的

表3. 人口比率で算出した国内の患者発生数(人/年)

		2007年	2008年	2009年
Hib	髄膜炎	304	443	403
	非髄膜炎	76	203	294
肺炎球菌	髄膜炎	133	155	142
	非髄膜炎	343	1,022	1,139
GBS	髄膜炎	47	58	75
	非髄膜炎	23	75	80

(2010年2月11日現在の集計)

な疾患であり、現在国内においては毎年 Hib による髄膜炎が400数十例、肺炎球菌による髄膜炎が150例程度発症していると推計される。さらには、抗菌薬投与前の血液培養採取など病因診断に心がければ、髄膜炎以外に毎年、Hib では300例近く、肺炎球菌では1,000例以上の子どもたちが、これら細菌の脅威に曝されている。ワクチンの普及に努め、予防に努めることが何よりも大切である。

また本研究班では、報告された患者の予後調査、季節別の発生状況なども解析中である。最終年度の時点で Hib ワクチンの接種本数 (推定) と1歳未満人口から計算すると、各地域の Hib ワクチンカバー率は2010年1月時点で5~10%という結果である。今後のワクチン普及による疫学状況の変化については継続して検討する予定である。

国立病院機構三重病院 神谷 齊 中野貴司



## アウトブレイク への対応

# 高知大学医学部および附属病院で発生した百日咳アウトブレイク

有瀬和美 (Kazumi ARISE)<sup>1,2</sup>, 武内世生 (Seisho TAKEUCHI)<sup>1,3</sup>, 竹内啓晃 (Hiroaki TAKEUCHI)<sup>1,4</sup>, 前田明彦 (Akihiko MAEDA)<sup>5</sup>, 脇口宏 (Hiroshi WAKIGUCHI)<sup>6</sup>, 倉本秋 (Shu KURAMOTO)<sup>7</sup>

<sup>1</sup>高知大学医学部附属病院 ICT <sup>2</sup>高知大学医学部附属病院感染管理認定看護師

<sup>3</sup>高知大学医学部附属病院総合診療部 <sup>4</sup>高知大学医学部附属病院検査部

<sup>5</sup>高知大学医学部附属病院小児科 <sup>6</sup>高知大学医学部長 <sup>7</sup>高知大学医学部附属病院長

### ◆はじめに

高知大学医学部附属病院感染対策チーム (infection control team : ICT) は、他大学における百日咳集団発生と休講措置の報道を受け、水際阻止対策を講じていた。百日咳抗体価高値の医学部学生が認められた直後から、感染状況の把握と感染経路遮断を目的に対策を徹底した結果、終息を向かえることができた。国立感染症研究所の支援調査を受けて実施した疫学調査の結果を合わせて報告する。

### ◆経過と対応

#### ■1. 水際阻止対策

2007年5月25日他大学の百日咳集団発生が報道された。高知大学医学部では、百日咳の高知浸透を念頭に置き、百日咳症例を早期発見するための水際阻止対策を講じることとした。当時持ち得た情報では、成人百日咳は「①症状が軽く、典型的でない場合が多いが、小児への感染源として重要。②感染経路は飛沫感染と接触感染。③感染性のある期間は3週間であるが、抗菌薬を内服すれば5日目まで。④年長児、成人例では基礎免疫が残存する例が少ないので、ペア血清による血清診断も困難。⑤確定診断には百日咳菌の培養 (咳嗽飛沫を直接あるいは鼻咽腔ぬぐい液を専用培地に接種)、あるいは鼻咽腔ぬぐい液でポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction : PCR) が必要」であった。

当院では、百日咳抗体価の血清診断は外部委託の

ため検査結果を得るまでに5日から7日間を要することと、成人例を対象とするので有用な方法と考えられなかった。検査室の百日咳専用培地は毎年10枚程度を購入するのみであったので、集団発生に備え追加発注を行ったが、10日間の培養期間が必要とされた。また、PCR検査は国立感染症研究所か特定の都道府県衛生所に依頼するしかなかった。百日咳症例の早期発見のために検査室スタッフが研修し、独自にPCR検査を行える体制を院内に構築した。

準備の整った6月12日、百日咳注意報として感染対策委員長 (病院長) から「職員 ALL メール」で成人百日咳を想定した診療を全診療科の医師に依頼した。6月26日、「学生食堂で咳をする学生が多い」との情報提供があり、学生に自発的な受診を求めるポスターを掲示した。これに呼応した5人の学生が受診したが、いずれもPCR陰性であった。

7月18日夕刻、小児科からICTに、「7月11日に1ヵ月以上続く咳と肋骨骨折のため受診した医学部学生が百日咳抗体価を聞くために本日再診したが抗体価が高値であった」との一報が入った。以降実施した対策を表1にまとめた。

#### ■2. 学 生

直ちに感染拡大状況の把握・感染経路遮断のために病院長、副病院長、医学部長、医学部学務委員長、ICD、ICNで緊急会議を開催し、①翌19日の病院

表1 高知大学医学部における百日咳アウトブレイクへの対応

7月18日	<ul style="list-style-type: none"> <li>百日咳抗体価高値の医学部学生が1名いることが判明</li> <li>緊急会議（病院長，副病院長，医学部長，医学部学務委員長，ICD，ICN）</li> </ul>
7月19日	<ul style="list-style-type: none"> <li>「検体採取は40歳以上のスタッフで行おう」と判断<sup>†</sup></li> <li>学生146名にPCR検査実施（日中），24/28で陽性と判明（夕刻）</li> <li>結果的に，学生の最終発症日となる</li> <li>鼻腔からの検体と咽頭からの検体のPCR陽性率を検証<sup>‡</sup></li> </ul>
20日	<ul style="list-style-type: none"> <li>学生から院内臨床実習で接触した患者さんを聞き取り，症状調査，必要に応じてPCR</li> <li>院外実習施設へ百日咳集団発生を連絡</li> <li>面接，検体採取に関与した職員へのクラリス<sup>®</sup>配付（58人）</li> <li>福祉保健所に報告，入院患者に掲示</li> <li>学生に課外活動，対外試合，グループ学習，帰省の禁止，外出の自粛を要請<sup>¶</sup></li> <li>有症状者，予防内服希望者の学生にクラリス<sup>®</sup>処方</li> <li>時間外の患者さんからの問い合わせ対応マニュアル作成</li> <li>報道発表</li> </ul>
21日	<ul style="list-style-type: none"> <li>臨床実習で学生と接触したハイリスク患者（30人）へのクラリス<sup>®</sup>予防投与</li> </ul>
23日	<ul style="list-style-type: none"> <li>職員（抜けない咳，最近始まった咳・鼻水のある人，心配な人）にPCR検査実施（212人）<sup>※</sup></li> </ul>
25日	<ul style="list-style-type: none"> <li>23日の職員PCRの結果82人中59人が陽性（72%）</li> <li>職員有症状者，ハイリスク部署勤務者，および予防内服希望者にクラリス<sup>®</sup>配付</li> <li>PCR陽性職員には，①クラリス<sup>®</sup>10日間内服，②2週間以内に咳が始まった人は5日間自宅待機，③無症状者はマスク着用，ただしハイリスク患者には接触禁止を指示</li> <li>PICU医師，看護師全員クラリス<sup>®</sup>予防内服</li> <li>23日のPCR陽性者に依頼して再検査：陽性一致率72.2%（13/18）<sup>‡</sup></li> <li>全職員にメールでマスク着用と手洗いを再度徹底，ミーティングの自粛を依頼</li> </ul>
26日	<ul style="list-style-type: none"> <li>手術室医師，看護師全員クラリス<sup>®</sup>予防内服</li> <li>国立感染症研究所へFETPチームの派遣を非公式に打診</li> <li>感染対策委員長（病院長）から全職員に口頭説明会</li> <li>外注業者責任者に現状説明<sup>*</sup></li> </ul>
27日	<ul style="list-style-type: none"> <li>全職員の症状アンケート開始</li> <li>23日のPCR陽性者20人に依頼して血清抗体価測定</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>院内保育所児童のワクチン接種歴確認と症状聞き取り<sup>**</sup></li> <li>県を通して国立感染症研究所へFETPチームの派遣を公式に依頼</li> </ul>
30日	<ul style="list-style-type: none"> <li>院内保育所児童の検診</li> </ul>
8月1-2日	<ul style="list-style-type: none"> <li>学生症状調査開始（携帯電話アンケートを用いた詳細調査：回収率100%）</li> </ul>
2日	<ul style="list-style-type: none"> <li>FETPチーム来高</li> </ul>
3日	<ul style="list-style-type: none"> <li>無症状学生に帰省許可，グループ行動は禁止，非治癒，新たな感染疑いの学生には面接とPCR検査</li> <li>「7月19日無症状でPCR陰性→予防内服せず→8月1日のアンケートでも無症状」の学生に依頼して試験的にPCR検査を実施<sup>§</sup></li> </ul>
8-10日	<ul style="list-style-type: none"> <li>FETPチームと合同で学生および職員に詳細アンケート実施</li> </ul>
12日	<ul style="list-style-type: none"> <li>最終発症日（職員）となる</li> </ul>
20日	<ul style="list-style-type: none"> <li>条件（マスクなどの感染対策の遵守，現場の実習責任者による日々の学生の体調管理）を設定して臨床実習開始</li> </ul>
9月1日	<ul style="list-style-type: none"> <li>学生の学外活動（他施設における実習，対外試合など）の再開を許可</li> </ul>
23日	<ul style="list-style-type: none"> <li>終息宣言（最終発症日から最長潜伏期間の2倍〔42日間〕の期間監視後）</li> </ul>
<p>十 年齢による抗体価の高低はあるが，菌が生着しない年齢層はないので，結果的には意味のある判断ではなかった。</p> <p>‡ 34人のうち鼻腔29人，咽頭24人が陽性，いずれか陽性は33人，両方とも陽性だったのは20人，鼻腔，咽頭両検体からの陽性率はほぼ同じと考えられる。</p> <p>¶ 麻疹の集団発生で帰省して感染を拡大した事例を参考に，帰省も禁止した。</p> <p>※ 「学生はともかく，“大人”は大丈夫だろう」という予断が職員の検査を後回しにすることになった。</p> <p>‡ 信じがたい，驚異的な陽性率であったので，検体採取時の偽陽性を否定するため行った。</p> <p>* ** 外注業者や院内保育所職員への対応は結果的に後手になってしまった。</p> <p>§ 6人中2人陽性であった。</p>	

実習は中止、② 学生全員にアンケート調査を行う、③ アンケート項目のうち、咳または鼻水がある、またはあった学生には面談を実施する、④ 面談で「症状がある」と認定できる学生に PCR 検査への協力を依頼する、⑤「職員 ALL メール」で注意喚起を行うことを決定した。併せて公表マニュアルに沿って、公的機関への通知やマスコミ対応の準備に入った。翌 19 日 (Day1) だけで、学生 816 人中 711 名 (87%) がアンケート調査に回答し、296 名が面談に応じ依頼した 146 名全員が PCR 検査に協力した。146 人の大半からは「喫煙のせいで咳がある」「花粉症気味」との声があり、医療者の目から見ても百日咳かもしれないと思われるケースは 20 数例に過ぎなかった。しかし同日夜になって、146 サンプルのうち急ぎ検査した 28 サンプル中 24 サンプル (85.7%) は、PCR 法で百日咳菌陽性であることが判明した。即刻医学部と協議の上 1 週間の休講を決定した。

翌 20 日 (Day2) には、翌週の教授会審議を待たず、夏休み期間を含む 2 学期までの医学部休講措置を決定し、学内外への伝播を防止するために課外活動、体外試合、グループ学習、帰省の禁止、外出の自粛を要請し、所轄福祉保健所に報告し、夕刻には報道発表を行った。そして、有症状者、予防内服希望の学生にクラリス<sup>®</sup>を配布した。

### ■ 3. 患者さん

7 月 20 日 (Day2) に、学生から院内臨床実習で接触した患者さんを聞き取り、患者さんの症状調査、必要に応じて PCR 検査を行うとともに、院外実習施設にも百日咳集団発生を連絡した。翌 21 日 (Day3) には学生全員が排菌あるいは保菌者と想定し、学生と接触したハイリスク患者さんにクラリス<sup>®</sup>の予防内服をしていただいた。この際、説明する医師宛と患者さん宛の文書を作成し、統一した説明ができるようにした。

### ■ 4. 職員

7 月 23 日 (Day5) から 3 日間 PCR 検査を行い、7 月 25 日 (Day7) から有症状者、ハイリスク部署勤務者、予防内服希望者にクラリス<sup>®</sup>を配布した。PCR 陽性職員には、① クラリス<sup>®</sup>10 日間内服、② 2 週間以内に咳が始まった人は 5 日間自宅待機、③

表 2 PCR 検査結果

学生 74/162 (45.7%)	医学科 (60.4%)	67/111
	看護学科 (13.7%)	7/51
職員 148/212 (69.8%)	臨床系医師 (60.0%)	18/30
	基礎系講座 (72.7%)	32/44
	看護師 (70.9%)	39/55
	コメディカル (72.2%)	13/18
	その他 (70.8%)	46/65

陽性人数/検査人数 (陽性率)

無症状者はマスク着用、ただしハイリスク患者には接触禁止を指示し、全職員にマスク着用と手洗いの徹底、不急不要のミーティングの自粛を依頼した。

### ■ 5. 外注業者、院内保育所

外注業者には 7 月 26 日 (Day8) に責任者に現状説明を行い、症状出現時は速やかに受診することとマスクの着用を依頼した。院内保育所には、7 月 27 日 (Day9) に責任者に現状説明するとともに児童のワクチン接種履歴確認と症状聞き取りを行い、7 月 30 日 (Day12) に児童の検診を行った。

## ◆ 調査結果および考察

### ■ 1. PCR 結果

PCR 検査の結果を表 2 に示す。学生は 45.7% (162 人中 74 人)、職員は 69.8% (212 人中 148 人) の陽性率であった。しかし、検出結果と症状の有無は必ずしも一致せず、陽性者のうち実に 60% は無症状であった。また、98 検体 (PCR 陽性 63 名陰性 35 名) に対して培養検査を試みたが、菌は 1 例も分離できなかった。

PCR 検査は迅速・高感度な検出法であり、今回は百日咳菌に特異的な 2 遺伝子を標的部位として実施した。PCR 以外の遺伝子診断法として LAMP 法を実施し、今回の結果を検証したが大きな乖離は認めなかった。アウトブレイクした百日咳菌は multilocus sequence typing-1 (MLST-1) 型で、近県で発生した MLST-2 型とは異なっていた。

### ■ 2. 積極的疫学調査結果

PCR の陽性率が高いことから、感染源、感染経

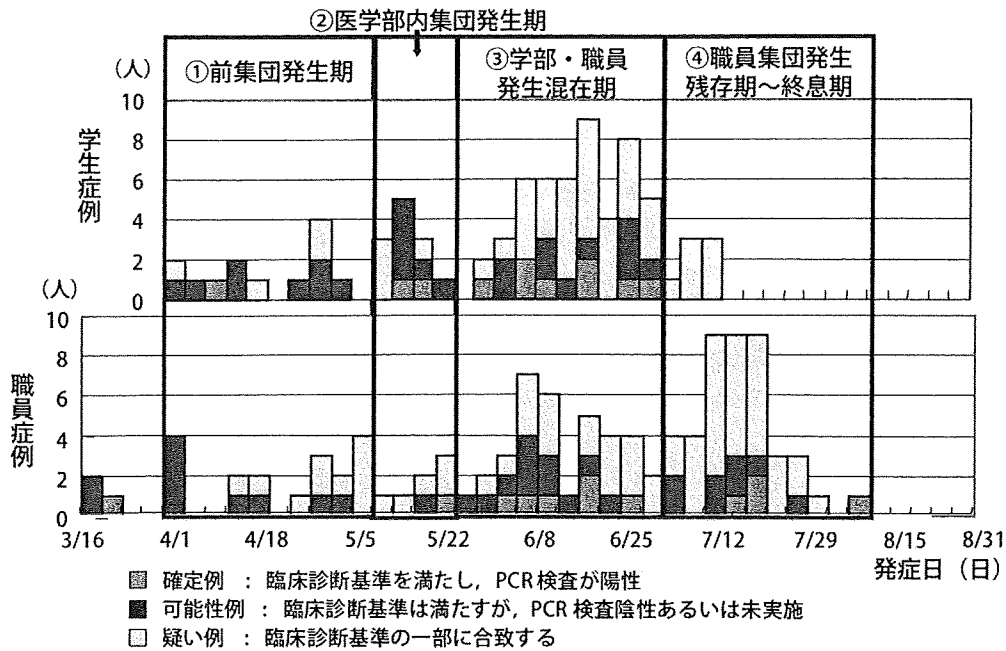


図1 百日咳発生状況と流行曲線からみた集団発生の期間区分

路の特定には 2200 人を対象とした疫学調査が必要であり、公開性・透明性の点からも外部調査が必要と判断し、7月26日国立感染症研究所にコンタクトを行った。

7月27日に職員第1回、8月1日に学生第1回現状調査を行った。Web上でCDCの診断基準に基づいた質問内容に回答する方法とした。職員の回答には、「6月下旬に外来受診した高校生が長期に続く咳があり、近医で抗菌薬をもらっていた」「中学2年生の子供がいるが、同じクラブの子が百日咳で休んでいる」など重要な情報提供があった。また学生からは、翌日までに816人、100%の回答が得られた。

8月2日から国立感染症研究所 (Field Epidemiology Training Program Japan: FETP) による支援調査が開始された。FETPには積極的症例探査、現場および関連施設の観察調査、症例群の特徴把握と図式化、感染源/感染経路やリスクファクターに関する仮説の検証を実施していただいた。積極的症例探査は「症例定義」を作成し、8月7日以前の症例に後向き調査、8月8日以降の症例には前向き調査 (質問票回収率: 学生 90.2%, 職員 93.7%) を行った。症例定義は、4月1日以降に発症し、「①咳が2週間以上続く」and「②吐きそうになる咳 or ③突然連

続して起こる咳 or ④ “woop” のある咳がある」という臨床診断基準を満たすものとした。

4月1日から8月31日までの患者発生状況を学生・職員別に示す (図1)。職員では3月中旬から、学生では4月から発生がみられる。前集団発生期には、症例間における学年・部活動・所属部署などの共通点には乏しく、地域流行の持込が複数回あった可能性が示唆された。第2の医学部内集団発生期には、講義室、臨床実習班、部活動など比較的濃厚な接触による感染伝播が考えられた。次の学部・職員発生混在期には、学生間の伝播がさらに拡大し、一部病棟においては臨床実習生から職員に感染が伝播した可能性が考えられた。そして第4の職員集団発生残存期～終息期に移行していた。感染経路は学生間では講義室・部活動での濃厚接触、学生-職員間では臨床実習等を介した感染伝播が推測され、職員間では特定の部署において感染がより拡大した可能性が示唆された。集団発生の要因としては、乳幼児期のワクチン効果の限界をベースにして、地域の不顕性の流行があり、それが大学に持ち込まれた。そして感染性を有する期間における発症者の登校が続き、比較的長時間狭い空間を共有する講義室や職場の環境でアウトブレイクが潜行しながら広がった。



しかし学生、職員、医師にこの再興感染症に対する認識がなく、あるいは百日咳の感染や発症についての医学知識が up to date されていなかったことが上げられる。

入院患者、退院患者には全期間通じて症例定義に合致する症例はなく、外来患者についてはカルテ調査から数例が百日咳と疑われたが、当院における症例との疫学的な関連性はなかった。患者さんに対して業務を行う場合のマスク着用率は、職員同士での着用率よりも有意に高く、患者さんへの感染伝播防止に有効であったと考えられた。

### ■ 3. 抗菌薬内服状況

抗菌薬内服状況を表 3 に示す。学生は 610 人 (81.9%)、職員は 473 人 (35.9%) が内服し、うちクラリスロマイシンを 5 日以上内服した者は学生 581 人 (96.4%)、職員 396 人 (84.6%) であった。部署別の発症率と抗菌薬予防服用率を見ると、発症率が高い部署ほど、また PICU、小児科、救急部など感染が起きた際のリスクが高いと想定される部署ほど高い服用率を示した。また、26 名の陽性者を対象に服薬 1 週間後の PCR 検査を行い 19 名の陰性化を確認した。

### ■ 4. 終 息

学生については、対策導入後は新規発症者を認めず、休講と、高い抗菌薬内服率 (81.9%) が主たる要因と考えられた。職員については、少数の新規発症者を認めたが、予防内服に加え、就業制限などを強化した結果、終息に向かうことができた。感染対策の強化については咳エチケット、手洗いの徹底など全職員にメールを発信し協力を依頼した。

学生の最終発症日は 7 月 19 日、職員の最終発症日は 8 月 12 日であった。最終発症者から最長潜伏期間の 2 倍の期間 (42 日間) 監視を行い、9 月 23 日に終息と判断した。

終息を迎えられたのは、学生・職員の対策への積極的な協力の成果と考えている。

### ◆ おわりに

私達が行った百日咳水際阻止対策は失敗に終わった。早期検知のために予防措置を講じ、第一例発

表 3 抗菌薬内服状況

	学生 n = 745	職員 n = 1318
抗菌薬内服者数	610 (81.9%)	473 (35.9%)
クラリスロマイシン	603 (98.9%)	468 (98.9%)
エリスロマイシン	3 (0.5%)	2 (0.4%)
その他	4 (0.7%)	3 (0.6%)
クラリスロマイシン 内服日数		
14 日以上	324 (53.7%)	7 (1.5%)
10 日以上	435 (72.1%)	223 (47.6%)
7 日以上	542 (89.9%)	297 (63.5%)
5 日以上	581 (96.4%)	396 (84.6%)

生後は迅速に対応したが、既に 4 ヶ月も前から百日咳は大学に侵入していた。その背景には、市中感染の蔓延、無症状保菌者の存在、百日咳診断の困難さがあった。

アウトブレイクの対応は早期認知と迅速対応が基本である。早期認知のためには、感染症に対する意識の向上、臨床診断に力を注ぐこと、ベースラインの把握が必要である。迅速対応のためには、組織が一体となった対応ができるように、正確な情報の共有と連携、さらには日常的な活動の積み重ねが必須であると実感された。

### 〔文 献〕

- 1) CDC : Manual for the Surveillance of Vaccine-Preventable Diseases 3rd Edition, Chapter 8: Pertussis, 2002.
- 2) CDC : Outbreaks of Respiratory Illness Mistakenly Attributed to Pertussis New Hampshire, Massachusetts, and Tennessee, 2004-2006 . MMWR (56), 2007.
- 3) IDWR 感染症の話 百日咳 [http://idsc.nih.gov/jp/idwr/kansen/k03/k03\\_36.html](http://idsc.nih.gov/jp/idwr/kansen/k03/k03_36.html)

### 著者連絡先

有瀬 和美 (Kazumi ARISE)

高知大学医学部附属病院 ICN

〒 783-0051 高知県南国市岡豊町小蓮

## ***Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus casei* Suppress *Escherichia coli*-Induced Chemokine Expression in Intestinal Epithelial Cells**

Shinji Toki<sup>a, b</sup> Shinji Kagaya<sup>a</sup> Miwa Shinohara<sup>a, c</sup> Hiroshi Wakiguchi<sup>c</sup>  
Takashi Matsumoto<sup>b</sup> Yoshihisa Takahata<sup>b</sup> Fumiki Morimatsu<sup>b</sup> Hirohisa Saito<sup>a</sup>  
Kenji Matsumoto<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Allergy and Immunology, National Research Institute for Child Health and Development, Tokyo,  
<sup>b</sup>R&D Center, Nippon Meat Packers, Inc., Tsukuba, and <sup>c</sup>Department of Pediatrics, Kochi Medical School, Kochi, Japan

### **Key Words**

*Lactobacillus* · Chemokine · Intestinal epithelial cells · Intestinal microbiota

### **Abstract**

**Background:** Recently, some strains of lactic acid bacteria (LAB) have been reported to prevent the development of atopic dermatitis and to improve allergic symptoms, especially in young children. However, the mechanisms involved in these effects are not fully understood. Intestinal microbiota play critical roles in the development of host immune development and are recognized and regulated by the host through intestinal epithelial cells (IECs). We thus hypothesized that LAB influence the host immune system through the activation of IECs. To begin testing this hypothesis, chemokine expression in IECs exposed to intestinal bacteria was investigated. **Methods:** Caco-2 cell monolayers were stimulated with different concentrations of various live or heat-killed intestinal bacteria or bacterial components for up to 3 h. Changes in the gene expressions of various chemokines were measured using quantitative real-time PCR. **Results:** The expressions of CCL20, CXCL8, CXCL10 and CX3CL1 were strongly induced by nonpathogenic *Escherichia coli* in a

dose-dependent manner and were partially induced by some commensal LAB. In contrast, *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) and *Lactobacillus casei* did not induce these chemokine expressions. In addition, LGG significantly suppressed the expressions of CCL20 and CXCL10 induced by *E. coli*, peptidoglycan or flagellin when cultured simultaneously. **Conclusions:** LGG and *L. casei* markedly suppressed *E. coli*-induced chemokine expression, presumably through the suppression of the Toll-like receptor-mediated signal transduction pathway, at least in part. The clinical importance of this suppressive effect and the mechanisms involved require further investigation; however, such effects can be used as a marker to identify clinically useful LAB.

Copyright © 2008 S. Karger AG, Basel

### **Introduction**

The onset of allergic diseases is thought to be regulated by an interaction between genetic and environmental factors [1, 2]. After the first report by Strachan [3] in 1989, several environmental factors, including exposure to viral and bacterial microorganisms during early childhood, have been shown to play important roles in the on-

### **KARGER**

Fax +41 61 306 12 34  
E-Mail karger@karger.ch  
www.karger.com

© 2008 S. Karger AG, Basel  
1018–2438/09/1481–0045\$26.00/0

Accessible online at:  
www.karger.com/iaa

Correspondence to: Dr. Kenji Matsumoto  
Department of Allergy and Immunology  
National Research Institute for Child Health and Development  
2-10-1 Okura, Setagaya-ku, Tokyo 157-8535 (Japan)  
Tel. +81 3 3416 0181, ext. 4955, Fax +81 3 5494 7028, E-Mail kmatsumoto@nch.go.jp

set of allergic diseases [4–6]; these associations are now referred to as the ‘hygiene hypothesis’. On the other hand, intestinal microbiota, an internal environment, might also be involved in the onset of allergic diseases [7].

Intestinal microbiota consist of approximately  $10^{14}$  bacteria that can be classified into more than 400 species, almost half of which remain unclassified to date. Intestinal microbiota are thought to play an important role in the development of the immune system in the host [8] because mucosal immunity is impaired in germ-free mice [9]. Intestinal microbiota have also been reported to play a critical role in the induction and maintenance of oral tolerance [10].

Not just the presence or absence of intestinal microbiota, but the type of bacteria is also a key issue. Children with allergies reportedly have a lower frequency of colonization with lactobacilli, compared with nonallergic children, whereas children with allergies tend to harbor higher counts of aerobic microorganisms [11]. This observation has been further confirmed by a couple of prospective studies [12, 13]. In addition, the colonization of *Bifidobacterium*-like bacteria and *Lactobacillus*-like bacteria in infants born by cesarean delivery was delayed, compared with infants born by vaginal delivery [14], and the prevalence of adulthood asthma is significantly higher among subjects born by cesarean delivery [15]. These epidemiological facts indicate that some mechanisms for recognizing types of bacteria in the gut must exist during early infancy, with subsequent consequences for host immune development.

Indeed, the administration of lactic acid bacteria (LAB) prenatally to pregnant woman at risk and postnatally to newborn infants significantly reduced the prevalence of atopic dermatitis in early childhood [16, 17]. In addition, the administration of LAB also improved the symptoms or severity of young children with atopic dermatitis or food allergy [18–20].

However, the administration of LAB produced no clinical benefits in some interventional trials [21, 22]. This finding can be explained by the heterogeneity of allergic diseases and of patients in terms of age, phenotype, severity or environmental factors [23]. However, an additional possibility is that different strains of LAB may have been used. As a matter of fact, several different strains of LAB were used, including *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) and mixtures containing LGG [16, 19, 24–26], *Bifidobacterium lactis* (Bb-12) [27, 28], *Lactobacillus paracasei* [29] and other strains [30, 31]. The effects of each LAB strain differ, with LGG generally providing a better outcome than the other strains, with a few excep-

tions, suggesting that the host immune system can distinguish beneficial strains of LAB from others or from normal commensal bacteria in the gut microbiota. However, the mechanisms by which some, but not all, LAB exert beneficial effects remain unclear.

So far, several in vitro attempts have been made to clarify the different signals provided by different strains of intestinal bacteria using peripheral blood mononuclear cells [32–34], mouse splenocytes [29] or dendritic cells [35]; these studies have produced valuable information. Of note, commensal bacteria have no opportunity to come into direct contact with peripheral blood mononuclear cells or splenocytes in vivo. In other words, these in vitro models are thought to mimic bacteremia or bacterial invasion in vivo; thus, the production of huge amounts of inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor- $\alpha$  or interleukin (IL)-6, was also observed.

Intestinal epithelial cells (IECs) normally function as a physical barrier and are constantly exposed to intestinal bacteria without inducing inflammatory reactions or the production of inflammatory cytokines [36]. IECs are capable of distinguishing pathogenic from nonpathogenic bacteria [37, 38]; thus, the responses of IECs participate in the formation and function of gut-associated lymphoid tissues (GALT). In particular, chemokines released from IECs play important roles in the selective recruitment of leukocytes to the GALT [39].

We hypothesize that intestinal bacteria influence the host immune system through the induction of chemokines in IECs, which in turn recruit specific types of leukocytes to the GALT to regulate subsequent immune responses, either promoting or suppressing the development of allergies. To begin testing this hypothesis, the chemokine gene expressions in IECs exposed to intestinal bacteria were investigated.

## Materials and Methods

### *Bacteria Strains and Preparation of Heat-Killed Bacteria*

Two LAB strains, LGG (ATCC 53103) and *Pediococcus pentosaceus* (ATCC 33316), as well as *E. coli* (ATCC 29425) were purchased from American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, Md., USA). The other 5 LAB strains, *L. casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* and *B. infantis*, were provided by Nippon Luna Inc. (Kyoto, Japan). All LAB strains and *E. coli* were cultured aerobically at 37°C for 20 h in MRS broth (Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA) or nutrient broth (Difco Laboratories), respectively. After counting the viable bacteria, they were killed by heating at 70°C for 20 min. Heat-killed bacteria were centrifuged at 8,000 rpm for 10 min,

**Table 1.** Primers for RT-PCR and real-time RT-PCR

Target gene	Genbank accession No.	Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (5'-3')	Amplicon size, bp
TLR1	NM_003263	CTATACACCAAGTGTGTCAGC	GTCTCCAACCTCAGTAAGGTG	220
TLR2	NM_003264	GCCAAAGTCTTGATTGATTGG	TTGAAGTTCTCCAGCTCCTG	347
TLR3	NM_003265	GCTGGAAAATCTCCAAGAGC	CCGAATGCTTGTGTTTGCTA	247
TLR4	NM_138554	AGTTGAACGAATGGAATGTGCA	CTGAGGACCGACACACCAATG	111
TLR5	NM_003268	AGATGGCTGGTGCCTTGAA	CCAACCACCACCATGATGA	87
TLR6	NM_006068	CCTCCCAGGATCAAGGTACTTG	ATCAGGCCAGCCCTCTAACAC	327
TLR7	NM_016562	TCTACCTGGGCCAAAACCTGTT	GGCACATGCTGAAGAGAGTTA	388
TLR8	NM_138636	CCGACTTGGAAAGTTCTAGATC	AATGCTTCATTTGGGATGTGCT	316
TLR9	NM_017442	GCTGCGTCTCCGTGACAATTA	AGCTGACATCCAGCCTCCG	158
TLR10	NM_030956	GGCAAACCTTCGAGCTGCTATT	TCCCAACAGTGTATGTGGTCCC	179
CARD4	NM_006092	CCTGCAGCAGAACACAGCTCTCT	GGCAGTCCCCTTAGCTGTGAT	154
CARD15	NM_022162	GGCTCTGTATTTGCGCGATAA	ACAGCCGTCAGTCAATTTGTTG	124
CCL20	NM_002990	GGCCAATGAAGGCTGTGACAT	TGGATTTGCGCACACAGACA	73
CXCL8	NM_000584	GTCTGCTAGCCAGGATCCACAA	GAGAAACCAAGGCACAGTGAA	51
CXCL10	NM_001565	GCCAATTTTGTCCACGTGTTG	AGCCTCTGTGTGGTCCATCCT	193
CX3CL1	NM_002996	TGCTGGCTGGTTAGAGGTTTC	TGTGTGAGATGGGAGGACTG	123
CCL22	NM_002990	TACTCTGATGACCGTGGCCTTG	AGAGAGTTGGCACAGGCTTCTG	100
CCL28	NM_148672	CTGATGGGGATTGTGACTTG	TGTGCCCTGTTACTGTTCCTC	181
GAPDH	NM_002046	GAAGGTGAA GGTCGGAGTC	GAAGATGGTGTATGGGATTTTC	226

washed with PBS and were resuspended at each concentration and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until use.

#### Intestinal Epithelial Cells

The human colon adenocarcinoma cell line Caco-2 was purchased from Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd. (Tokyo, Japan) and cultured in Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM; Gibco, Gaithersburg, Md., USA) supplemented with 10% FBS (Equitech-Bio, Ingram, Tex., USA), 1% nonessential amino acid solution (Gibco), 0.1% penicillin and streptomycin (Gibco) at  $37^{\circ}\text{C}$  in an atmosphere of 5%  $\text{CO}_2$ , 95% air. The culture medium was renewed every other day. To obtain a monolayer, Caco-2 cells were seeded on a 12-well cell culture insert (0.4- $\mu\text{m}$  microporous filters; Falcon, BD Biosciences, Franklin Lakes, N.J., USA). Two weeks later, this resulted in a tight polarized monolayer displaying a transepithelial electrical resistance of at least  $150\ \Omega/\text{cm}^2$ .

#### Stimulation of IECs

The apical surfaces of the Caco-2 cell monolayers were stimulated with  $1 \times 10^6$  CFU/ml of live *E. coli*, LGG or *L. casei* for 1 h or with up to  $5 \times 10^{11}$  CFU/ml of heat-killed *E. coli* or an LAB strain for 3 h at  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . The Caco-2 cells were then washed with PBS to remove excess bacteria and lysed in RLT buffer for the following RNA extraction (RNeasy Kit, Qiagen, Valencia, Calif., USA). In some experiments, Caco-2 cells were stimulated with  $1 \times 10^{10}$  CFU/ml of *E. coli* with various concentrations of LAB or 10, 20 and 40 mM of butyrate (Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan) for 3 h. In other experiments, the Caco-2 cells were stimulated with 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of peptidoglycan (PGN; Invivogen, San Diego, Calif., USA), 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of double-stranded RNA (poly I:C;

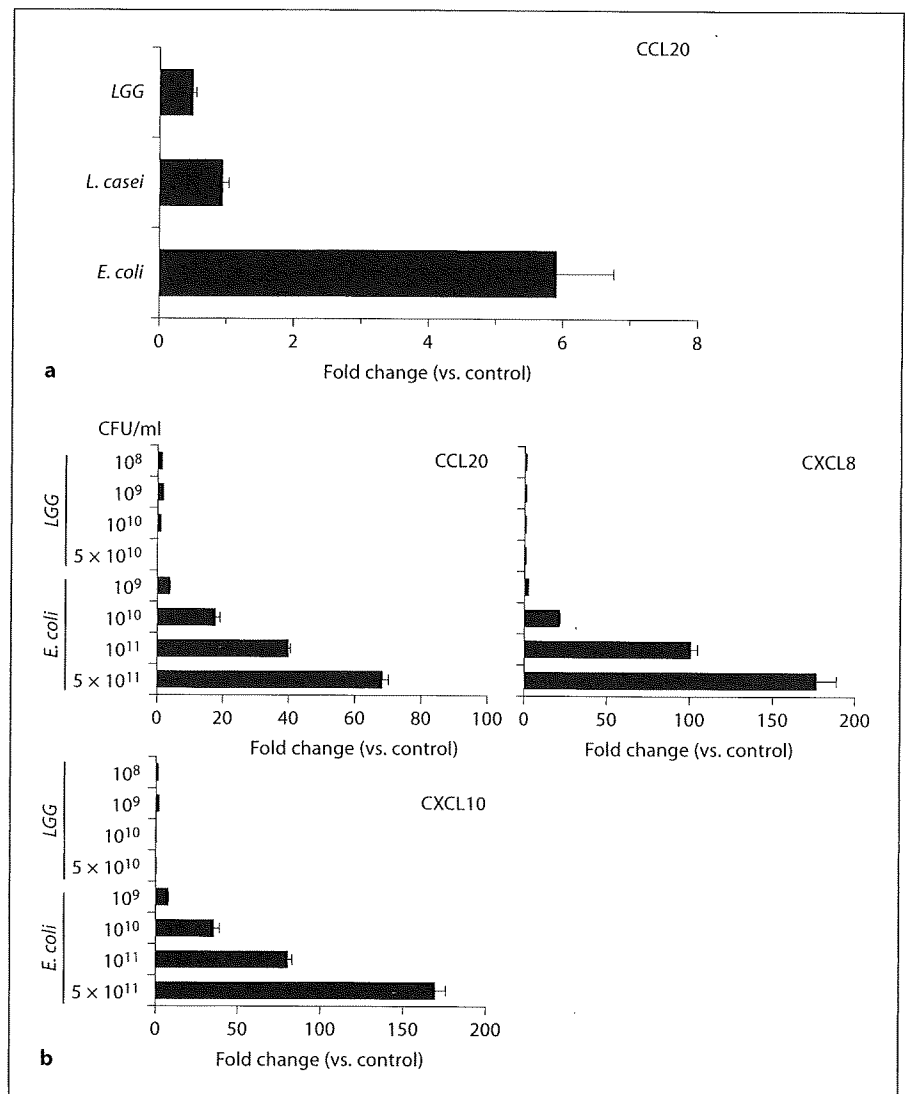
Invivogen), 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of lipopolysaccharide (LPS; Sigma, St. Louis, Mo., USA), 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of flagellin (Alexis Biochemicals, San Diego, Calif., USA), or 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of CpG oligonucleotides (CpG 2006, 5'-tcgtcgtttgtcgttttgcgtt-3', and CpG 2216, 5'-ggGGGACGATC-GTCgggggG-3'; Operon Biotechnology, Tokyo, Japan) [40] for 6 h. The cell culture supernatants were collected from the basolateral compartments and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until further measurement.

#### Real-Time PCR and RT-PCR

Total RNA was extracted from Caco-2 cells using the RNeasy Kit (Qiagen) and was digested using RNase-free DNase I (Qiagen) following the manufacturer's instructions. For RT-PCR, an aliquot of 1  $\mu\text{g}$  total RNA was reverse transcribed using iScript (Bio-Rad, Hercules, Calif., USA). cDNA generated from 50 ng of total RNA was amplified using Platinum Taq PCR SuperMix (Invitrogen Inc., Carlsbad, Calif., USA).

Quantitative real-time PCR analyses were performed using the ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, Calif., USA) and SYBR Green PCR reagents (Bio-Rad), as previously reported [41]. To determine the exact copy numbers of the target genes, the quantified concentrations of subcloned PCR fragments of CCL20 (LARC), CXCL8 (IL-8), CXCL10 (IP-10), CCL22 (MDC), CCL28 (MEC), CX3CL1 (fractalkine), heat shock protein A1 (HSPA1) and HSPA6 were serially diluted and used as standards in each experiment. Aliquots of cDNA equivalent to 5 ng of total RNA samples were used for each real-time PCR. Data were normalized using the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) levels in each sample. All primer sets used for the real-time PCR and RT-PCR were synthesized by Fasmac Co., Ltd. (Kanagawa, Japan) and are shown in table 1.

**Fig. 1.** Chemokine mRNA expression in Caco-2 cells after stimulation with *LGG*, *L. casei* or *E. coli*. **a** Caco-2 cell monolayers were stimulated with  $10^6$  CFU/ml of heat-killed *LGG*, *L. casei* or *E. coli* for 1 h. mRNA expression of CCL20 was examined using real-time PCR. **b** Caco-2 cell monolayers were stimulated with various concentrations of heat-killed *LGG* or *E. coli* for 3 h. mRNA expression of CCL20, CXCL8 and CXCL10 was examined using real-time PCR. Each bar shows the fold change in mRNA expression from the unstimulated control mRNA expression level. Values represent the mean  $\pm$  SEM of 3 separate experiments.



#### Chemokines in the Culture Supernatant

The chemokine concentrations in the culture supernatant from the basolateral compartments of the Caco-2 monolayers were measured using ELISA kits that specifically recognized CCL20, CXCL8 or CXCL10 (R&D Systems, Minneapolis, Minn., USA). The minimal detection limits of these ELISA kits were 7.8, 31.2 and 7.8 pg/ml for CCL20, CXCL8 and CXCL10, respectively.

#### Statistical Analysis

All data are presented as the mean  $\pm$  SEM, unless otherwise noted. Differences between groups were analyzed using the paired Student t test and were considered significant if  $p < 0.05$ .

## Results

### Chemokine Expression in Caco-2 Cells after Stimulation with *LGG* or *E. coli*

After forming a tight monolayer, Caco-2 cells were stimulated with live or heat-killed *LGG* or *E. coli* for up to 3 h, and the expression of mRNA for 3 chemokines, CCL20, CXCL8 and CXCL10, was examined using quantitative real-time PCR with specific primer sets. The expression of CCL20 was significantly induced by live commensal, nonpathogenic *E. coli* but not by live *LGG* or live *L. casei* at a concentration of  $1 \times 10^6$  CFU/ml after 1 h of incubation (fig. 1a). The expressions of CCL20, CXCL8 and CXCL10 were also strongly induced by heat-killed *E. coli* in a dose-dependent manner (fig. 1b). At the highest

concentration of  $5 \times 10^{11}$  CFU/ml, heat-killed *E. coli* induced a 65- to 160-fold increase in mRNA for all 3 chemokines. In contrast, almost no induction of these 3 chemokines was observed in Caco-2 cells stimulated with heat-killed LGG, even at the highest concentration of  $5 \times 10^{10}$  CFU/ml.

#### *Chemokine Expression in Caco-2 Cells after Stimulation with Various LAB*

Caco-2 cells were stimulated with various heat-killed LAB or *E. coli* for 3 h, and the expression of mRNA for 6 chemokines, CCL20, CXCL8, CXCL10, CX3CL1, CCL22 and CCL28, was examined using real-time PCR with specific primer sets. Heat-killed *E. coli* significantly induced the expression of all the chemokines except for CCL28 in a dose-dependent manner (fig. 2). In sharp contrast, heat-killed LGG and *L. casei* showed almost no induction of these 6 chemokines, even at the highest concentrations used. Other LAB strains, *L. acidophilus*, *S. thermophilus*, *L. lactis*, *P. pentosaceus* and *B. infantis*, induced a certain amount of mRNA expression for these chemokines, mostly in a dose-dependent manner. The expression of CCL28, a homeostatic chemokine, was unchanged in Caco-2 cells after stimulation with any of these LAB strains or *E. coli* (fig. 2).

#### *Chemokine Concentration in the Culture Supernatant from the Basolateral Compartment of the Caco-2 Monolayer*

Caco-2 cells were stimulated with various heat-killed LAB or *E. coli* for 24 h at a concentration of  $10^{10}$  CFU/ml or with *S. thermophilus* at a concentration of  $10^9$  CFU/ml. Chemokine concentrations in the culture supernatant from the basolateral compartment were measured with ELISA kits. Heat-killed *E. coli* induced 54.7, 8.9 and 18.3 pg/ml of CCL20, CXCL8 and CXCL10, respectively. In contrast, all LAB strains induced a trace amount of these chemokines, which were close to or below the detection limit of each ELISA kit.

#### *Effect of LGG or Butyrate on the E. Coli-Induced Chemokine Expression in Caco-2 Cells*

Caco-2 cells were stimulated with  $10^{10}$  CFU/ml of heat-killed *E. coli* and various concentrations of heat-killed LGG, *L. casei* or butyrate for 3 h, and the expression of mRNA for 3 chemokines, CCL20, CXCL8 and CXCL10, was examined using real-time PCR. In the absence of LAB, *E. coli* significantly induced the expression of all 3 chemokines. The addition of LGG and *L. casei* significantly suppressed the *E. coli*-induced expression of all 3 chemokines

in Caco-2 cells and reversed the chemokine expressions to the control levels (fig. 3, upper and middle panels). The addition of butyrate suppressed the expression of *E. coli*-induced CXCL8 and CXCL10 in a dose-dependent manner; however, 10 and 20 mM of butyrate significantly enhanced the expression of CCL20 (fig. 3, bottom panels).

#### *Expression and Function of Toll-Like Receptors in Caco-2 Cells*

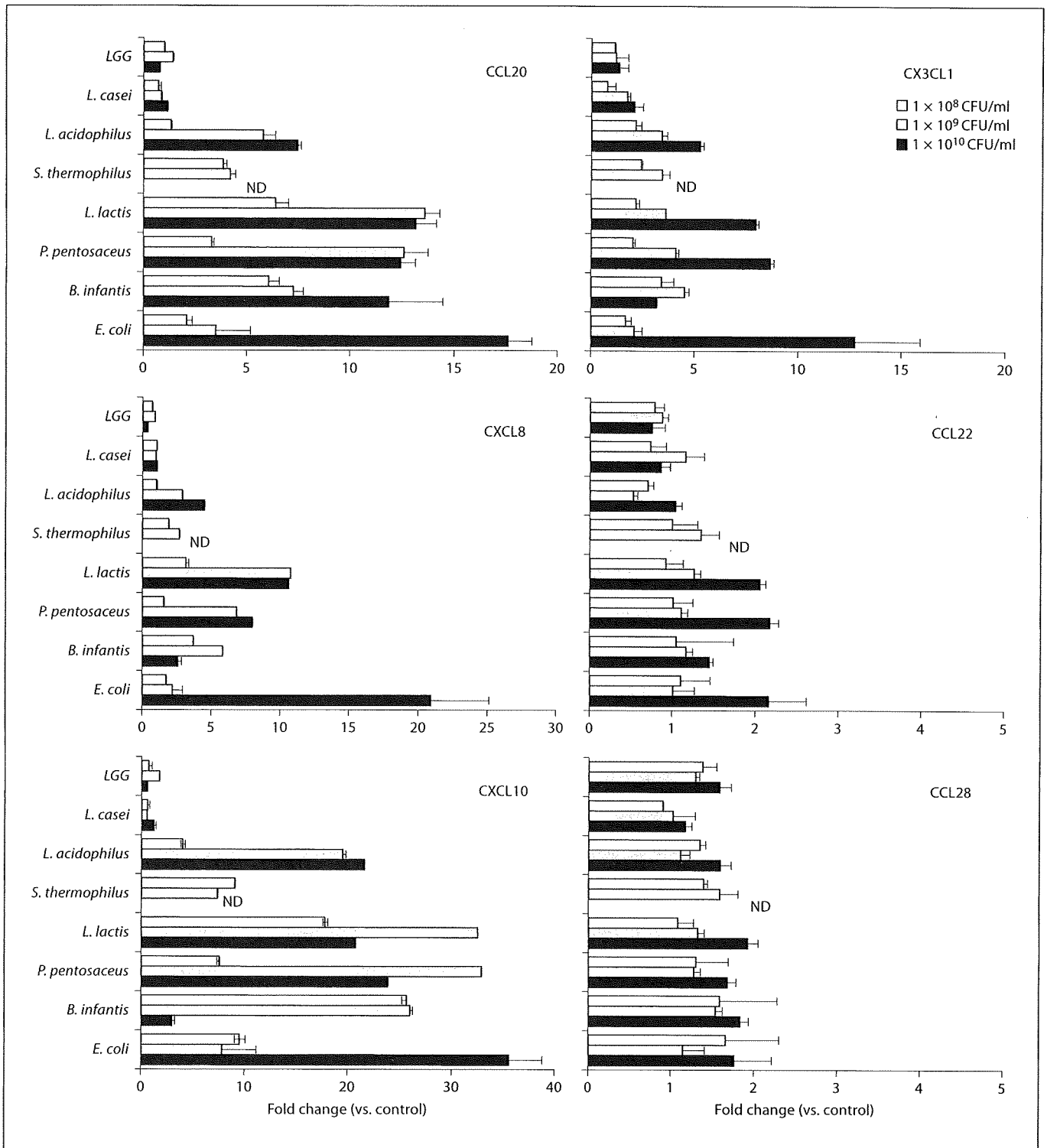
The mRNA expressions of Toll-like receptors (TLRs) in Caco-2 cells were evaluated using conventional RT-PCR and primer sets specific to each TLR (table 1). As shown in figure 4a, the Caco-2 cells expressed TLR2, TLR3, TLR5, TLR6, TLR7, TLR9 and CARD4 (NOD1), but not TLR4, TLR8 or TLR10. The faint expressions of TLR1 and CARD15 (NOD2) were also detected. This result confirms the findings of a previous study [42]. Next, Caco-2 cells were stimulated with 10  $\mu$ g/ml of PGN, 10  $\mu$ g/ml of poly I:C, 1  $\mu$ g/ml of LPS, 1  $\mu$ g/ml of flagellin or 5  $\mu$ g/ml of CpG 2006 for 6 h, and the chemokine expression was examined as described above. As a result, PGN and flagellin significantly induced the expression of CCL20, CXCL8 and CXCL10 (fig. 4b), whereas poly I:C and LPS showed only marginal effects. In addition, CpG 2006 (B-oligo) and CpG 2216 (A-oligo) had no effects on chemokine expression (data not shown).

#### *Effect of LAB on Pathogen-Associated Molecular Patterns Induced Chemokine Expression in Caco-2 Cells*

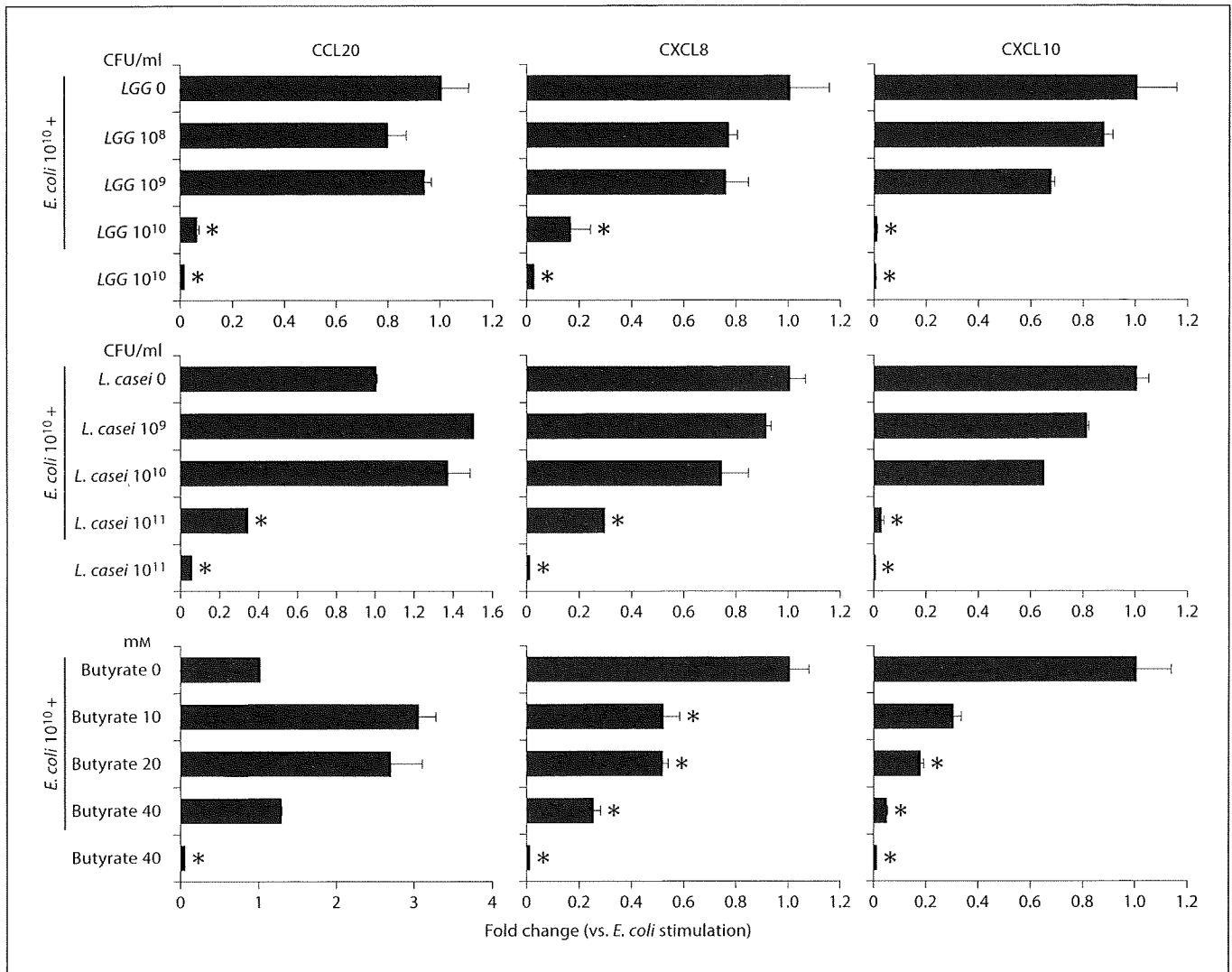
As shown in figure 4, the Caco-2 cells expressed functional TLR2 and TLR5. Thus, Caco-2 cells were cultured with various LAB in the presence of 10  $\mu$ g/ml of PGN or 1  $\mu$ g/ml of flagellin for 3 h, and the expressions of CCL20, CXCL8 and CXCL10 were evaluated in the manner described above. As a result, LGG significantly suppressed the expression of CCL20 and CXCL10 in Caco-2 cells after stimulation with PGN and flagellin. LGG also marginally suppressed the expression of CXCL8 in Caco-2 cells after stimulation with PGN, but did not alter the expression of CXCL8 when Caco-2 cells were stimulated with flagellin (fig. 5).

#### *HSP Expression in Caco-2 Cells after Stimulation with Various LAB and Effect of HSP on E. coli-Induced Chemokine Expression*

The expressions of HSPA1 and HSPA6 were significantly induced by a high concentration of heat-killed LGG. In contrast, the other strains of heat-killed LAB or *E. coli* failed to induce HSPA1 or HSPA6, even at the high-



**Fig. 2.** Chemokine mRNA expression in Caco-2 cells after stimulation with various LAB. Caco-2 cell monolayers were stimulated with various concentrations of different LAB for 3 h. mRNA expression of CCL20, CXCL8, CXCL10, CX3CL1, CCL22 and CCL28 was examined using real-time PCR. Each bar shows the fold change in mRNA expression from the unstimulated control mRNA expression level. Values represent the mean  $\pm$  SEM of 3 separate experiments. ND = Not done, because a concentration of  $1 \times 10^{10}$  CFU/ml of *S. thermophilus* could not be prepared using conventional centrifugation.



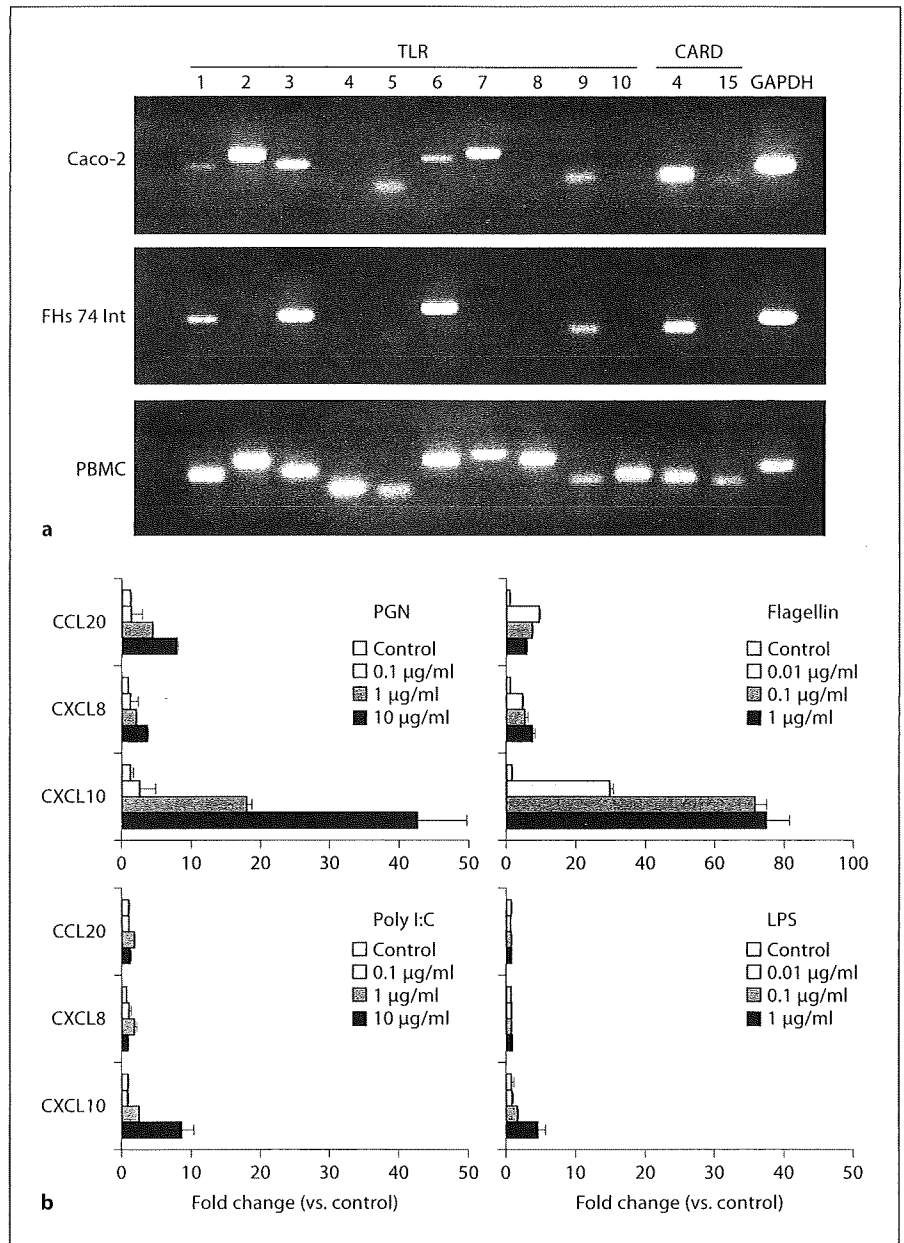
**Fig. 3.** Effect of *LGG* on *E. coli*-induced chemokine expression in Caco-2 cells. Caco-2 cell monolayers were stimulated with  $1 \times 10^{10}$  CFU/ml of *E. coli* and various concentrations of *LGG* or butyrate for 3 h. mRNA expression of CCL20, CXCL8 and CXCL10 was examined using real-time PCR. Each bar shows the fold change in mRNA expression from the unstimulated control mRNA expression level. Values represent the mean  $\pm$  SEM of 3 separate experiments. \*  $p < 0.05$  compared with the mRNA expression level induced by *E. coli* alone.

est concentrations tested (fig. 6a). A high concentration ( $10^{10}$  CFU/ml) of heat-killed *LGG* and butyrate significantly induced both HSPA1 and HSPA6 expression in Caco-2 cells (fig. 6b). In contrast,  $10^{10}$  CFU/ml of *E. coli* did not induce HSPA1 or HSPA6. When the Caco-2 cells were stimulated with *E. coli* and the highest concentrations of *LGG* or butyrate, a significant expression of both HSPA1 and HSPA6 was observed; however, the expression levels were lower than those found in cells simulated with *LGG* or butyrate alone.

## Discussion

Intestinal microbiota, especially during early childhood, are associated with the onset and symptoms of allergic diseases, including atopic dermatitis. However, the mechanisms by which intestinal microbiota affect host immune responses are not fully understood. We hypothesize that in response to the microbiota, IECs produce and release chemokines that participate in the formation of GALT, because IECs are constantly exposed to micro-



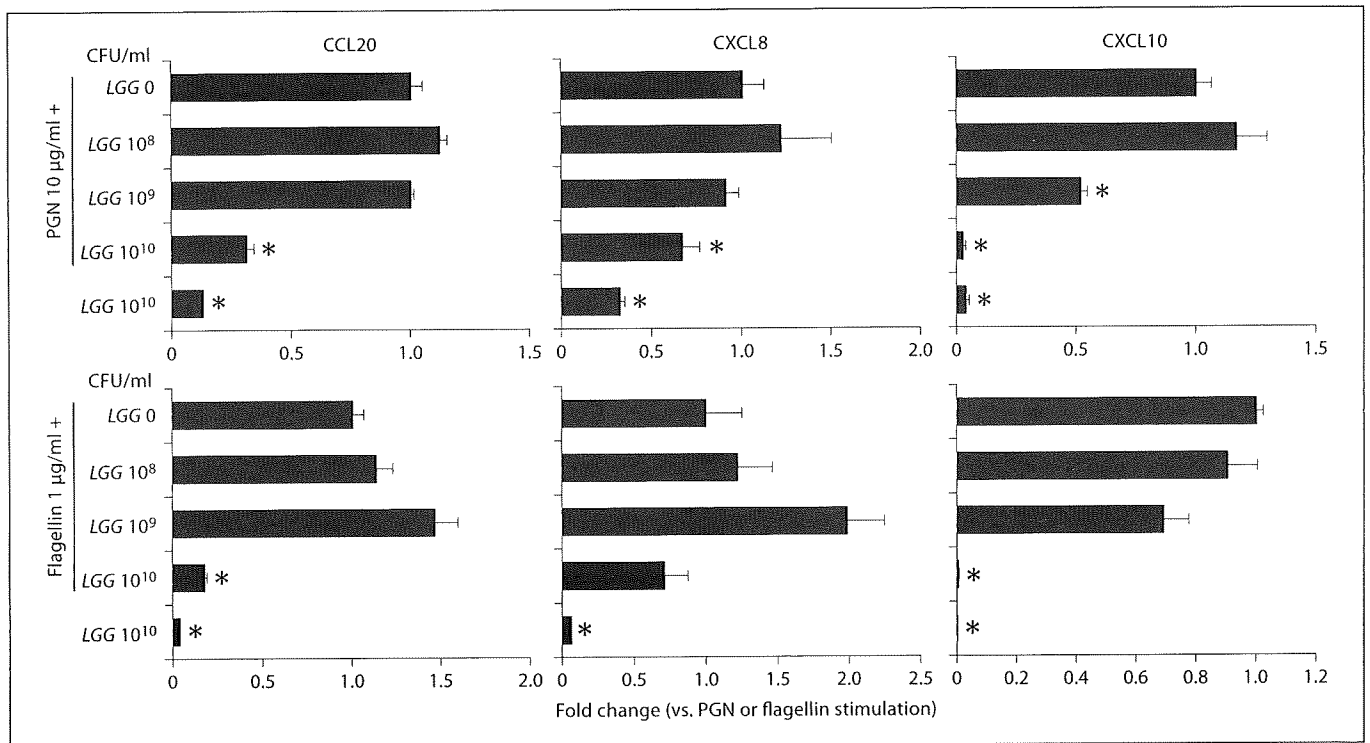


**Fig. 4.** Expression and function of TLRs in Caco-2 cells. **a** mRNA expression patterns of TLR1–TLR10, CARD4 and CARD15 in Caco-2 and human fetal intestinal epithelial cells (FHs 74 Int, ATCC CCL-241) were examined using conventional RT-PCR. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were used as a positive control. **b** Quantitative real-time PCR analysis of mRNA expression of CCL20, CXCL8 and CXCL10 in Caco-2 cells after stimulation with PAMPs. Caco-2 cell monolayers were stimulated with various concentrations of PAMPs for 6 h. Each bar shows the fold change in mRNA expression from the unstimulated control mRNA expression level. The values represent the mean  $\pm$  SEM of 3 separate experiments.

biota and are reportedly capable of distinguishing commensal bacteria from pathogenic strains [37, 38]. To begin testing this hypothesis, we performed in vitro experiments in which IECs were exposed to intestinal bacteria, and the levels of chemokines in the IECs were measured.

In our first series of experiments, we compared chemokine expression in Caco-2 cells after stimulation with live commensal bacteria or LAB at a relatively low concentration ( $1 \times 10^6$  CFU/ml). We found that nonpatho-

genic *E. coli* significantly induced CCL20 expression in Caco-2 cells, whereas live LGG or *L. casei* did not. Next, we tried to confirm this phenomenon using different doses of live *E. coli* and LGG, since the size and shape of these bacteria vary and such differences may affect the distinct induction of chemokine expression shown in figure 1a. However, we found that Caco-2 cells were seriously damaged when they were treated with live bacteria at concentrations of more than  $10^8$  CFU/ml. Therefore, we used different doses of heat-killed bacteria to prove



**Fig. 5.** Effect of *LGG* on PGN- and flagellin-induced chemokine expression in Caco-2 cells. Caco-2 cell monolayers were stimulated with 10 µg/ml of PGN (upper panels) or 1 µg/ml of flagellin (lower panels) and various concentrations of *LGG* for 3 h. mRNA expression of CCL20, CXCL8 and CXCL10 was examined using real-time PCR. Each bar shows the fold change in mRNA expression from the unstimulated control mRNA expression level. Values represent the mean ± SEM of 3 separate experiments. \* p < 0.05 compared with the mRNA expression level induced by PGN or flagellin alone.

the essential differences in the induction of chemokines in Caco-2 cells between *E. coli* and *LGG*.

We found that heat-killed *E. coli* significantly induced chemokine expression in IECs in a dose-dependent manner (fig. 1b), which confirmed the findings of a previous study [43]. In contrast, *LGG* did not significantly induce any of these 3 chemokines even at the highest concentration that was used. In addition, after 3 h of incubation, the viability was virtually unchanged when assessed using the trypan blue dye exclusion test and the amount of mRNA extracted from the cells; cell damage was minimal unless live bacteria were used. This fact clearly indicates that regardless of the size or shape of the bacterial body or its concentration, *LGG* and *E. coli* exerted fundamental differences in their induction of chemokines in IECs.

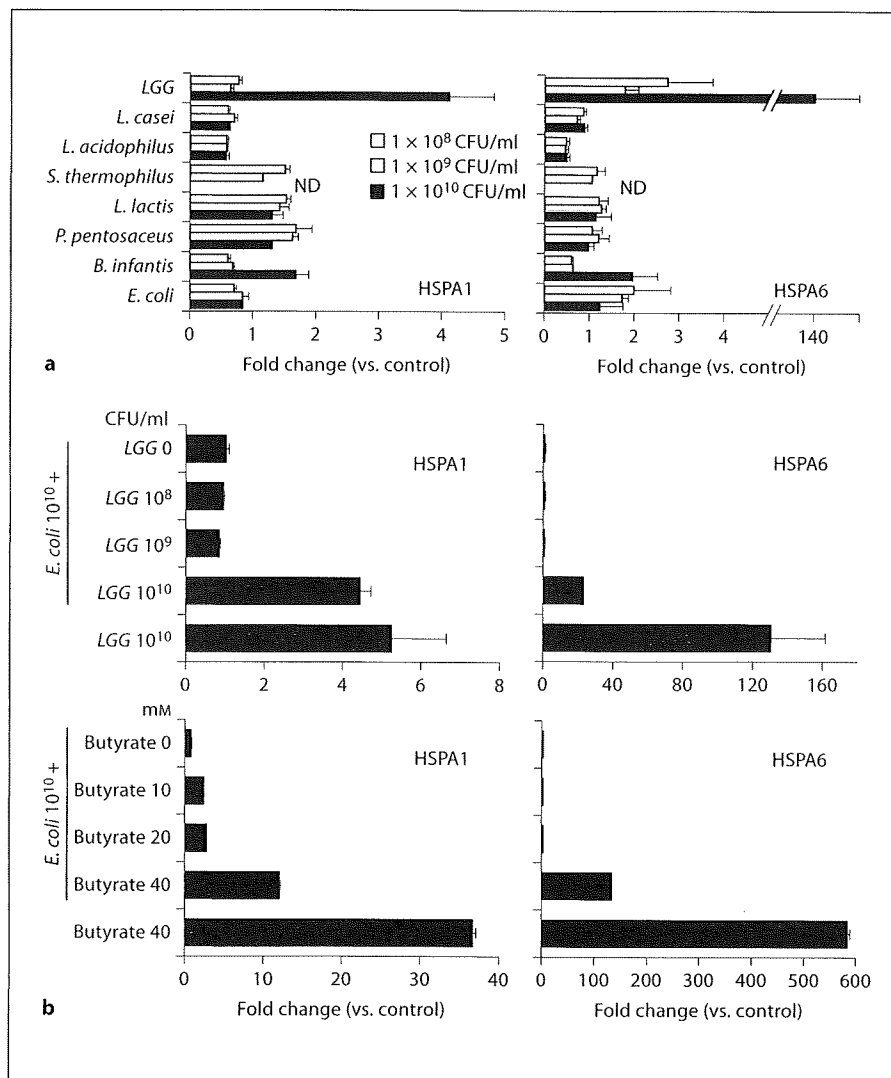
We next compared chemokine expression using different strains of LAB and found that heat-killed *LGG* and *L. casei* produced almost no induction of any of the 6 chemokines that were tested, whereas the other strains of

LAB induced some amounts of mRNA for these chemokines (fig. 2). The induction of these chemokines was not thought to be due to the carryover of LAB-cultured broth with a low pH, because virtually all the LAB-cultured broths had a similar pH. Therefore, some strain-specific signals may exist in IECs when cultured with intestinal bacteria.

To confirm that the chemokines were indeed produced by IECs, we measured the chemokine concentrations in the culture supernatant from the basolateral compartment. Heat-killed *E. coli* induced the release of some amounts of all 3 chemokines from IECs in the supernatant. In contrast, all heat-killed LAB induced almost no release of these chemokines. Thus, the mRNA expression of these chemokines in IECs seems to reflect protein synthesis.

In the following series of experiments, heat-killed *E. coli* and LAB were simultaneously added to wells, and the chemokine expression was investigated, since intestinal microbiota consist of hundreds of different types of

**Fig. 6.** HSP mRNA expression in Caco-2 cells after stimulation with various LAB or butyrate. **a** Caco-2 cell monolayers were stimulated with various concentrations of different LAB or *E. coli* for 3 h. mRNA expression of HSPA1 and HSPA6 was examined using real-time PCR. Each bar shows the fold change in mRNA expression from the unstimulated control mRNA expression level. Values represent the mean  $\pm$  SEM of 3 separate experiments. ND = Not done, because a concentration of  $1 \times 10^{10}$  CFU/ml of *S. thermophilus* could not be prepared using conventional centrifugation. **b** Caco-2 cell monolayers were stimulated with  $10 \times 10^{10}$  CFU/ml of *E. coli* with various concentrations of LGG or butyrate for 3 h. mRNA expression of HSPA1 and HSPA6 was examined using real-time PCR. Each bar shows the fold change in mRNA expression from the unstimulated control mRNA expression level.



Gram-positive and -negative bacteria, and interactions between different strains may exist. As a result, *LGG* significantly suppressed the *E. coli*-induced expression of all 3 chemokines tested in a dose-dependent manner (fig. 3). A suppressive tendency on the expressions of CXCL8 and CXCL10 was clearly found in experiments with *LGG* and *L. casei*, whereas the suppression of CCL20 was only found at a bacterial concentration higher than  $10^{10}$  CFU/ml. These findings suggested that some strain-specific induction and suppression mechanisms may exist and that the effect of LAB differs depending on the strain.

To clarify whether the suppressive effect of some LAB on *E. coli*-induced chemokine expression is mediated by a simple occupation of the surface area or by an inhibi-

tion of some intracellular signaling pathways, we tested whether LAB influenced chemokine expression by pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) or not. Before stimulation with PAMPs, the expression of TLR in Caco-2 cells was examined using conventional RT-PCR, and the function of TLR was assessed by measuring PAMPs-induced chemokine expression using quantitative real-time PCR. The functional expression of TLR2, TLR6 and TLR5 in resting Caco-2 cells was observed (fig. 4), confirming the results of a previous report [43]. Therefore, we stimulated IECs with PGN or flagellin, a ligand for TLR2 and TLR5, respectively, in the presence of *LGG*. As a result, *LGG* significantly suppressed PAMPs-induced chemokine expression in Caco-2 cells (fig. 5). This fact clearly indicates that *LGG* are

capable of suppressing the TLR signal transduction pathway. We believe that this may, at least in part, explain how *LGG* suppress *E. coli*-induced chemokine expression in IECs.

Chemokines play critical roles in the formation and function of GALT [39]. CCL20, a ligand for CCR6, predominantly recruits dendritic cells [38]. CXCL8, a ligand for CXCR1 and CXCR2, predominantly recruits neutrophils. CXCL10, a ligand for CXCR3, predominantly recruits Th1-type T cells and natural killer cells [44], and in contrast, CCL22 predominantly recruits Th2-type T cells. The precise roles of these chemokines released from IECs in the onset of allergic disease mostly remain unknown. In addition, whether the suppression of these chemokines directly or indirectly influences the risk of allergic disease also remains uncertain. Very recently, Th17 cells have been reported to express CCR6, a receptor for CCL20 [45, 46]. Annunziato et al. [47] demonstrated that Th17 cells play critical roles in the pathogenesis of Crohn's disease. The oral administration of LAB has been reported to improve the clinical symptoms of Crohn's disease [48], suggesting that the suppression of CCL20 by LAB found in this study may reflect the mechanisms underlying this clinical observation, at least in part.

However, we would like to emphasize that the in vitro effects of LAB are not the same. Epidemiological [49] and intervention studies [18, 19, 29] also suggest that the in vivo effects of LAB are not the same. Some LAB reportedly suppress pathogenic bacteria-induced chemokine expression [50, 51]. Our study revealed that *LGG* and *L. casei* also suppressed nonpathogenic bacteria-induced chemokine expression in IECs [37, 38], whereas other LAB failed to suppress *E. coli*-induced chemokine expression.

Since *LGG* and *L. casei* are associated with better clinical outcomes, the lack of chemokine induction by IECs or the suppression of signaling pathways may mediate clinical benefits. Our findings shed new light on the potential mechanism for the prevention of or the improvement in allergic diseases. We hypothesized that beneficial LAB strains provide favorable clinical effects through the induction of some beneficial chemokine expression, thereby preventing the development of allergic diseases; however, our results could not prove this hypothesis. The lack of induction of chemokines by LAB themselves or the suppression of *E. coli*-induced chemokines may be a marker to identify beneficial LAB strains. Interestingly, cytokine production from splenocytes showed that most of the substrains of *LGG* and *L. casei* produce more IL-12

and less IL-4, whereas other LAB strains produce less IL-12 and more IL-4 [29].

Recently, apical, but not basolateral, stimulation of TLR9 in IECs was reported to suppress the activation of a transcription factor, nuclear factor (NF)- $\kappa$ B, and to contribute to the maintenance of colonic homeostasis [52]. However, in our preliminary study, the DNA fraction extracted from *LGG* failed to suppress *E. coli*-induced chemokine expression in Caco-2 cells (data not shown). In addition, DNA from *E. coli* also contains CpG motifs. Thus, whether signaling through TLR9 by bacterial DNA really mediates the suppression induced by *LGG* and *L. casei* remains unproven. Recently, the induction of CCL20, CXCL8 and CXCL10 through the activation of NF- $\kappa$ B via TLRs has been reported (CXCL10 is strongly induced by an interferon-dependent pathway; however, an NF- $\kappa$ B-dependent pathway also plays a role) [53]. Thus, we speculate that *LGG* consequently suppresses activation of NF- $\kappa$ B through unknown pathway(s). On the other hand, lipoteichoic acid from LAB has been reported to inhibit LPS-induced cytokine production from IECs [54]. However, whether or not the differences in lipoteichoic acid are responsible for the differences in their functions that we observed remains uncertain [55, 56].

Lastly, the induction of Hsp70 by *L. casei* was reported to be critical for the inhibition of *Salmonella*-induced CXCL8 induction [57]. Actually, the mRNA expression of 2 major components of Hsp70, HSPA1 and HSPA6, in Caco-2 cells was induced by  $10^{10}$  CFU/ml or higher concentrations of heat-killed *LGG*. However, in our experiments, *L. casei* failed to induce both HSPA1 and HSPA6 (fig. 6a), even at a high concentration sufficient to suppress *E. coli*-induced chemokine expression (fig. 3). In addition, as previously reported [58, 59], HSPA1 and HSPA6 are induced by cellular stress, such as exposure to a high concentration of butyrate (fig. 6). However, lower concentrations (10 and 20 mM) of butyrate resulted in the marked suppression of *E. coli*-induced CXCL8 and CXCL10 expression (fig. 3, bottom panels), though such low concentrations of butyrate did not induce either HSPA1 or HSPA6 expression. Moreover, lower concentrations (10 and 20 mM) of butyrate actually suppressed CXCL8 and CXCL10 expression, whereas they enhanced CCL20 expression (fig. 3, bottom panels). Thus, as the induction of HSPA1 and HSPA6 is not correlated with the suppression of *E. coli*-induced chemokine expression, other factors are likely involved in the suppression of *E. coli*-induced chemokine expression by *LGG* and *L. casei*. Most LAB do not produce butyric acid; however, some bacterium strains in the intestinal microbiota are known