

表1 経鼻インフルエンザワクチン接種後中和抗体価

			Neutralizing Titer			
			in NW (1mg/ml)		in Serum (1/10)	
			pre	4*3w	pre	4*3w
P1	H3N2	A/Uruguay/716/07	1	16	4	16
		A/New York/55/04	4	> 128	> 128	> 128
		A/Panama/2007/99	4	32	64	64
		A/Sydney/05/97	8	64	> 128	> 128
	H1N1	A/Brisbane/59/07	1	4	8	16
	H1N1 pdm	A/Narita/1/09	< 1	< 1	1	< 1
P3	H3N2	A/Uruguay/716/07	2	128	2	8
		A/New York/55/04	32	> 128	16	64
		A/Panama/2007/99	16	32	32	64
		A/Sydney/05/97	32	64	32	32
	H1N1	A/Brisbane/59/07	2	1	< 1	< 1
	H1N1 pdm	A/Narita/1/09	4	2	1	1

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

RS ウイルス感染とヒト鼻粘膜タイト結合との関係

研究分担者 堤 裕幸 札幌医科大学医学部小児科学講座教授
研究協力者 平川賢史 札幌医科大学医学部小児科学講座大学院

研究要旨

ヒト正常鼻粘膜に hTERT 遺伝子を導入することで、細胞の性格を大きく変化させずに、その寿命を延長することができたが、その細胞は RS ウイルスに良好な感受性を示した。RS ウイルスの感染に対し、タイト結合は防御的に作用した。これは単純なバリア機能の増強によるものではなく、タイト結合がウイルスを取り込む機序を apical 側に限定することによると考えられた。更に、RS ウイルス感染自体が幾つかのタイト結合を有意に発達させることを確認した。発達したタイト結合は細胞に極性を与えるが、これは、細胞内で増殖した RS ウイルスが効率よく apical 側から分泌され、他の細胞に感染を広げる機序を RS ウイルス自体が誘導していると考えられることができる。

A. 研究目的

インフルエンザや RS ウイルスなどの呼吸器ウイルスの侵入箇所は、鼻粘膜を初めとした上気道の粘膜である。そこでは杯細胞より分泌される粘液や、粘液中の SP-A, ラクトフェリン、分泌型 IgA などが防御の第一線として働くが、次には上気道粘膜細胞に存在するタイト結合が重要な防御因子として働く。つまり、タイト結合は自然免疫応答の重要な構成成分と考えられている。しかし、インフルエンザや RS ウイルスなど、個々のウイルス感染とタイト結合との関係についての検討は今までなされていない。今回、*in vitro* において、ヒト鼻粘膜細胞のタイト結合が、RS ウイルス感染においてどのような役割を果たすかについて検討した。

B. 研究方法

ヒト下鼻甲介切除術で得られた鼻粘膜を用いて鼻粘膜上皮細胞を初代培養する。それに、hTERT 遺伝子を導入し継代可能な細胞としたのちに、RS ウイルスを感染させる。この細胞の形態変化を経時的に観察するとともに、我々が作成した、抗 RS ウイルス単クローン抗体 (anti-RSV F, anti-RSV G) を用いた、間接蛍光抗体法によりウイルス蛋白の局在を観察する。更に、培養上清を採取し、ウイルス価を HEp-2 細胞を用いたプラーク法により測定し、この鼻粘膜細胞における RS ウイルス感染の成立と、そこでの増殖について確認する。

鼻粘膜のタイト結合を FBS 添加培養により発達させた後に、RS ウイルスを感染させて感染効率を検討し、タイト結合の持つ抗 RS ウイルス効果について検討する。更に、RS ウイルス感染後、鼻粘膜細胞の種々

のタイト結合がどのように変化するかを、種々タイト結合に特異的な単クローン抗体 (anti-ZO-1) を用いた、間接蛍光抗体法により観察し検討する。観察には共焦点蛍光顕微鏡も用いる。

(倫理面への配慮)

鼻粘膜は、手術の際に適切に採取されたものであり、研究に当たっては採取した個人を特定できないように配慮されている。本研究については、札幌医科大学医学部の倫理審査委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

1. ヒト鼻粘膜細胞へのRSウイルス感染の成立 (図1, 2)

手術で採取された鼻粘膜細胞は酵素処理により単離され、それに hTERT (human Telomere Reverse Transcriptase) を導入した後に培養すると 2~3 日で単層を形成する。そこに、RS ウイルス (Long 株) を MOI=1 で感染させた。感染細胞は 24 時間後には細胞変性効果 (Cytopathic effect: CPE) を示した (図 1)。また、培養上清中の RS ウイルス価を経時的に測定したところ、感染後 48 時間には、MOI = 1, MOI = 0.1 のいずれの場合にも約 10^6 PFU/ml の生ウイルスの存在が確認された (図 2)。これは、鼻粘膜細胞において *in vitro* で RS ウイルスの増殖が活発に起きていることを示している。

次に、感染 24 時間後の鼻粘膜を、RS ウイルス特異的な単クローン抗体を用いて蛍光抗体染色を行い、共焦点顕微鏡にて観察した。エンベロップ蛋白である、F、G 蛋白は細胞質膜直下の細胞質、特に apical side に存在した。一方、核蛋白である NP、M2-1 は核周囲の細胞質に存在していた。

2. ヒト鼻粘膜タイト結合はRSウイルス感染阻止に働く (図3)

hTERT を導入したヒト鼻粘膜を一時的に FBS 添加メディウムにて培養すると、タイト結合が発達することが知られている。その細胞に RS ウイルスを感染させたところ、2~3 割の細胞のみに感染が成立した (図 4)。一方、FBS 非添加メディウムで培養し、タイト結合の発達が無かった鼻粘膜細胞においてはほぼ 100% の細胞に感染が成立した。このことは、タイト結合は RS ウイルス感染に対してバリアの役目を果たしていることを示している。

3. タイト結合が発達しているヒト鼻粘膜細胞へのRSウイルスの感染・侵入は細胞の apical side のみから成立する (図4)

タイト結合の発達は、RS ウイルスに対して防御的に働いたことから、その機序が、タイト結合のバリア機能によるものであることを確認するために、ダブルチャンバーを用いた感染実験を行った。FBS 添加培養にてタイト結合を発達させた細胞に、apical 側から RS ウイルスを感染させたところ、30% 程度の細胞で感染が成立したが、basolateral 側からは感染が成立しなかった。このことからタイト結合は RS ウイルスの侵入に対しバリアの働きをしているのではなく、タイト結合が発達することで、RS ウイルスのレセプター、あるいは RS ウイルスを取り込む機序が、apical 側のみに限定されたと考えられた。

4. RS ウイルスのヒト鼻粘膜細胞への感染はタイト結合を発達させる (図5)。

FBS 非添加で培養し、タイト結合が未発達で、RS ウイルスに易感染性とした状態のヒト鼻粘膜細胞に、RS ウイルスを感染させると、ZO-1、JAM-A、CL-4 などのタイト結合の発現が経時的に亢進した。これは、

細胞の電気抵抗(transsepithelial electrical resistance: TER)の増大からも確認された。

D. 考察

今回、ヒト正常鼻粘膜に hTERT 遺伝子を導入することで、細胞の性格を大きく変化させずに、その寿命を延長することができたが、その細胞は RS ウイルスに良好な感染性を示した。その結果、RS ウイルス感染系として大きく研究の幅を広げることができた。中でも、ヒト鼻粘膜の有する種々のタイト結合と、RS ウイルス感染の関係について幾つか新しい知見を得ることができた。一つは、タイト結合が RS ウイルス感染に対して防御的に働くことである。これは単純なバリア機能の増強によるものではなく、タイト結合がウイルスを取り込む機序を apical 側に限定することによると考えられた。ビタミン D が腸管上皮のタイト結合を有意に増強させることが知られている。夏場に日光浴を沢山すると、丈夫になって冬に風邪を引かなくなると言われるが、日光浴により産生が亢進したビタミン D がタイト結合を増強し、RS ウイルスを初めとした呼吸器ウイルス感染に抵抗性を与えるのかもしれない。

もう一つの興味ある知見は、RS ウイルス感染自体が幾つかのタイト結合を有意に発達させることである。発達したタイト結合は細胞に極性を与えることとなるが、これは、細胞内で増殖した RS ウイルスが効率よく apical 側から分泌され、他の細胞に感染

を広げる機序を RS ウイルス自体が誘導していると捉えることができよう。この現象の蛋白・遺伝子レベルでの機序の解明を進めている。

E. 結論

ヒト鼻粘膜のタイト結合は RS ウイルス感染に対して防御的に働く。また、RS ウイルス感染自体がヒト鼻粘膜において、幾つかのタイト結合を有意に発達させる。

F. 研究発表

論文発表

Masaki T, Kojima T, Okabayashi T, Ogasawara N, Ohkuni T, Obata K, Takasawa A, Murata M, Tanaka S, Hirakawa S, Juchimoto J, Ninomiya T, Fujii N, Tsutsumi H, Himi T, Sawada N. A nuclear factor- κ B signaling pathway via protein kinase C δ regulates replication of respiratory syncytial virus in polarized normal human nasal epithelial cells. *Mol Biol Cell.* 2011; 22: 2144-2156

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

Control

After 24h RSV infection

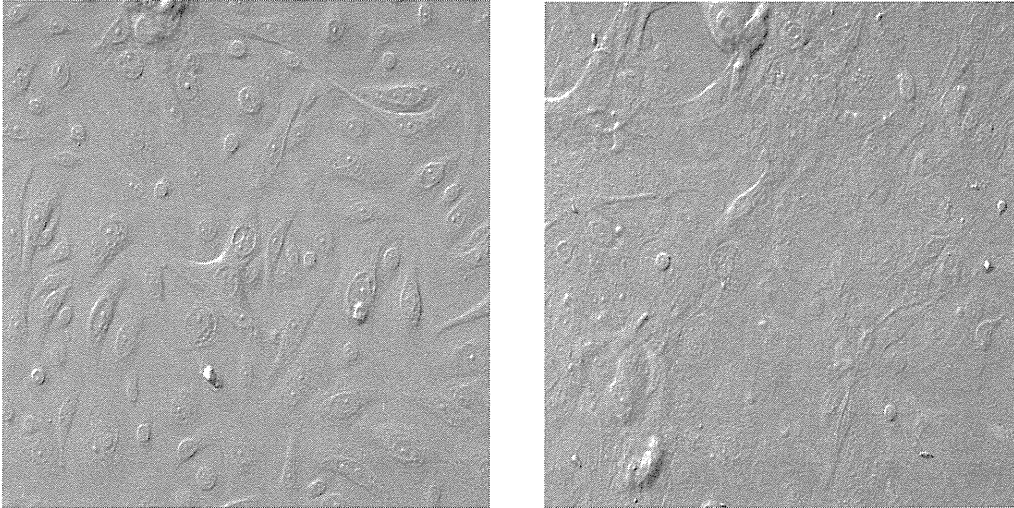


图 1

RSV titration

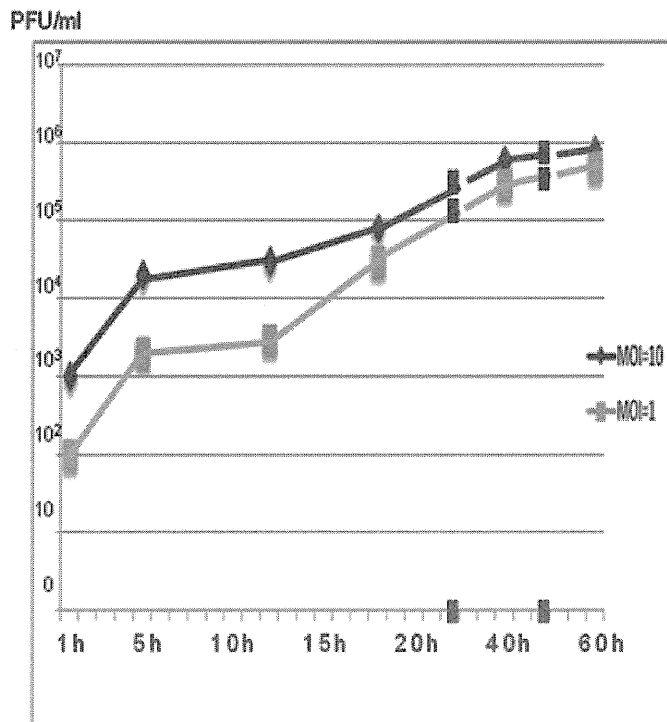


图 2

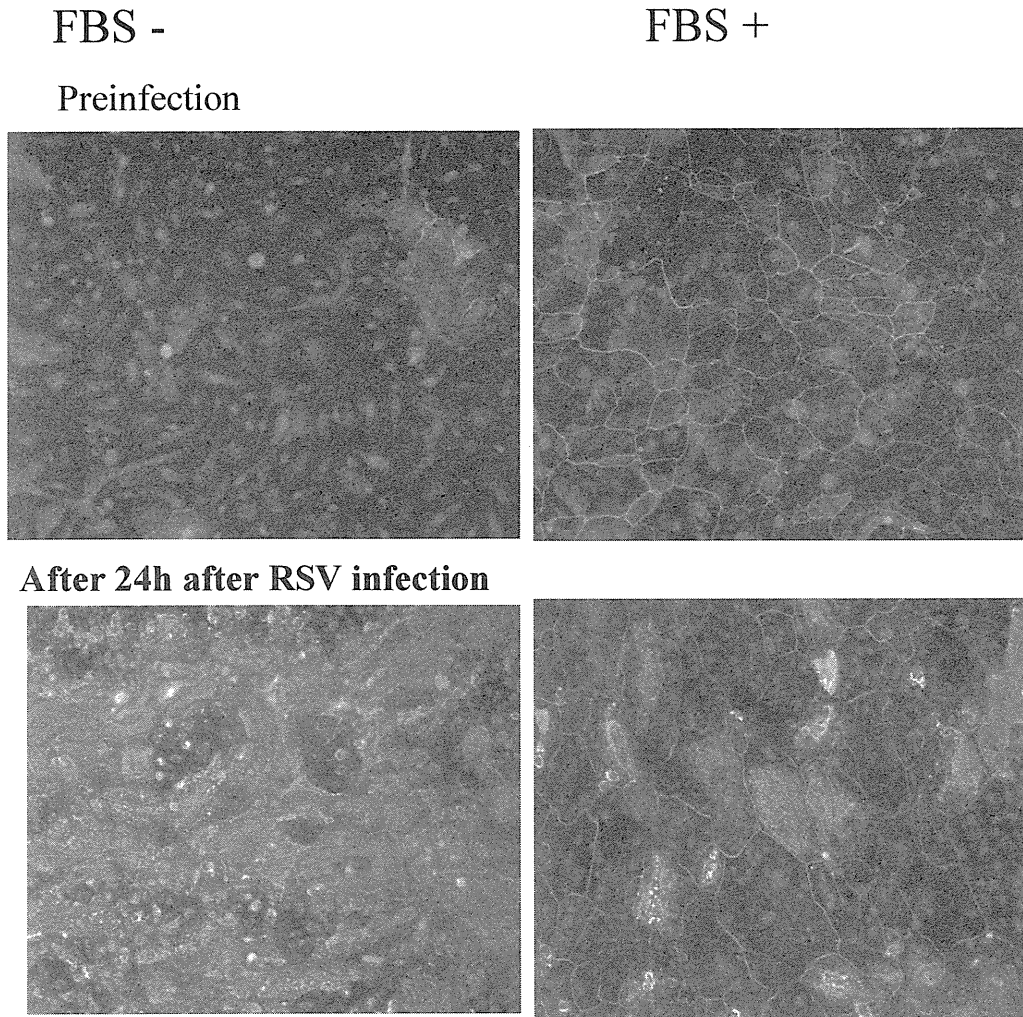


図 3 (ZO-1 and anti-RSV F 染色)

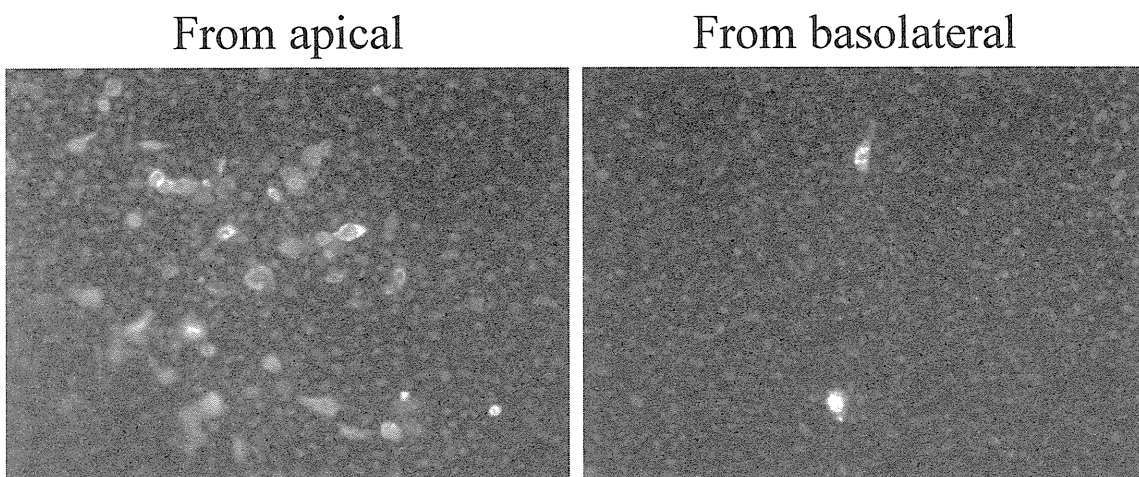


図 4 (anti-RSV G 染色)

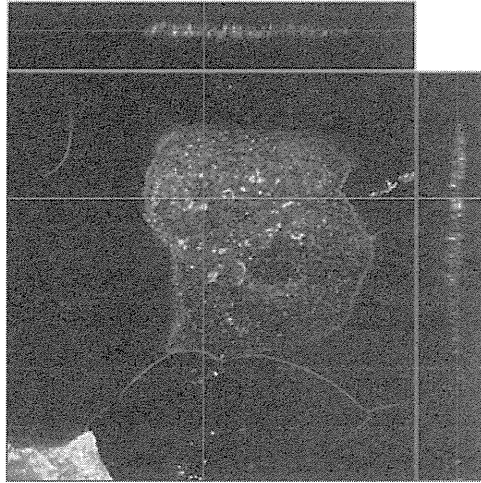


图 5

(ZO-1 and anti-RSV G 染色)

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

ホルマリン不活化RSVワクチンの失敗モデルの作製

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 教授

研究要旨

Respiratory syncytial virus (RSV)に対するワクチンは1960年代にホルマリン不活化ワクチン(FI-RSV)が開発されたがRSV感染を防御できずかえって重症化したことからRSVワクチン開発の大きな障壁となっている。その原因を探求するためにFI-RSVを作製しコottonラットに免疫しRSVでchallengeし肺組織の病理組織の検討とともにサイトカインmRNAを検討した。FI-RSV免疫群では炎症性細胞浸潤と著明な間質性肺炎の所見を認めIL-4, IL-10, IL-13といったTh2サイトカインとRANTESのmRNAが上昇した。RSV Fタンパク遺伝子を導入した組換え麻疹ウイルスMVAIK/RS F、ヒト型単抗体(シナジス)投与群は軽度の間質性肺炎を示した。MVAIK/RS F接種群ではIL-1 β , IFN- γ のTh1サイトカインの産生とともにIL-4も増加していた。FI-RSVはTh2に偏った免疫応答を誘導するがMVAIK/RS FはTh1応答も誘導しシナジスと同等の感染防御を示した。

A. 研究目的

RSVは小児において2歳までにほぼ全員が感染し高齢者においてもその感染の重要性が認識されており世界中で毎年6000万人が罹患し16万人が死亡している。特に低出生児で肺拡張不全、心奇形を持つ乳幼児には重篤な下気道感染をおこし入院死亡例も増加するところからヒト型単クローン抗体(シナジス)が予防投薬されている。しかし、高価なもので医療費の高騰とともに低開発国では使用できずワクチンの開発が期待されている疾患である。1960年代にホルマリン不活化ワクチンが開発され試験的に31例に接種し接種を受けた子供達の中でRSV流行期に80%が入院し2例が死亡しその原因を究明し安全性の確証がRSV開発の大きなハードルとなった。その原因として

- 1) Fタンパクが変性し結合抗体は誘導した

が中和抗体を誘導できなかった。

- 2)不活化ワクチンで細胞性免疫能、IgA抗体を誘導しなかった。
- 3)アルミ添加によりTh2応答に偏った免疫応答を誘導した。
- 4)RSV FタンパクはTLR4に刺激が入るがホルマリン不活化でTLR4への刺激が入らない。等が原因であると考えられる。

RSVはG, Fの外殻タンパクを有し中和反応に関連しているとされている。Fタンパクが感染防御に重要な働きをしておりウシパラインフルエンザウイルスにヒトパラインフルエンザウイルスGタンパク、RSV Fタンパク遺伝子を組み込んだ組換えウイルスはサルで免疫原性を確認しヒトのPhase IIまで臨床試験まで進んだがヒトでは抗体反応を認めなかったことから頓挫している。その他バキュロウイルス-昆虫細胞で発現

したFタンパクを精製したVLPなどが試験されている。我々は麻疹ワクチン AIK-C をベースとした組換えRSVを検討している。RSVワクチン開発はFI-RSVの失敗が大きなハードルとなっておりその原因を理論的に究明することでより有効で安全性の高いワクチン開発が望まれる。

B. 研究方法

1) ワクチン製剤の作製

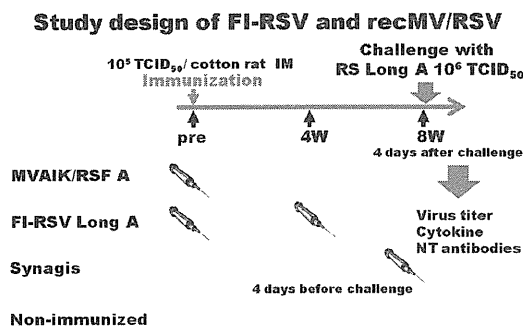
麻疹ワクチン AIK-C の P/M junction に RSV subgroup A からクローニングした F タンパク遺伝子を導入し reverse genetics の手技を用いて感染性組換え麻疹ウイルス MVAIK/RSF A を作製した。

FI-RSV Long A は Long 株 (2×10^6 TCID₅₀) のウイルス液にホルマリンを最終濃度 0.02 Vol% になるように添加後 800 rpm, 8 分間攪拌し水酸化アルミニウムアジュバント 0.3 mg/ml に調整し等量混和し 4°C に 4 週間保存し実験に供した。

2) 接種のスケジュール

10^6 TCID₅₀ の MVAIK/RSF A をコットラットに筋注免疫し 8 週後に RSV Long A 10^6 TCID₅₀ を経鼻投与した。FI-RSV は 4 週間隔で 2 回接種し 4 週後に challenge した。シナジスは challenge の 4 日前に 1.25 mg/kg 筋注した。

RSV challenge 4 日後に肺を採取し感染価、サイトカイン mRNA の定量、組織検査材料とした。



3) 肺組織のウイルス・免疫学的検討

肺組織ホモジネートを作成し RSV 感染価は 10 倍階段希釈を作成し HEp-2 細胞に接種し寒天を重層し Plaque 数を算定し肺組織 20 mg あたりの感染価を示した。

肺組織ホモジネートから total RNA を抽出し 1 μ g の RNA から random hexamer, oligo T プライマーを用いて cDNA を合成した。既に報告されているコットラットのサイトカインの遺伝子配列を参照し TaqMan real-time PCR プライマーを設計した。IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, IFN- α , IFN- γ , TNF- α , MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES mRNA コピー数を測定した。検査群の肺の mRNA コピー数を未免疫・非感染の正常コットラットの肺のコピーで割り正常の肺組織の何倍のコピー数で表示した。

片肺はホルマリン浸けにして保存しパラフィン埋没切片を作成し HE 染色と RSV, N, F タンパクに対する 4 種類クローンの monoclonal 抗体を用いて免疫染色をおこなった。

4) 血清抗体価の測定

RSV challenge 直前に採血を行い麻疹ウイルス、RSV に対する抗体を測定した。麻疹ウイルス抗体は PA 抗体、RSV に対しては中和(NT)抗体を測定した。コットラットの血清は 1:10 希釈から 4 倍階段希釈し 100 pfu の RSV Long 株と中和反応を行い HEp-2 細胞に接種し Agar を重層し 1 週後の plaque 数を測定し NT 抗体価は 50% plaque 減少法で算出した。

C. 研究結果

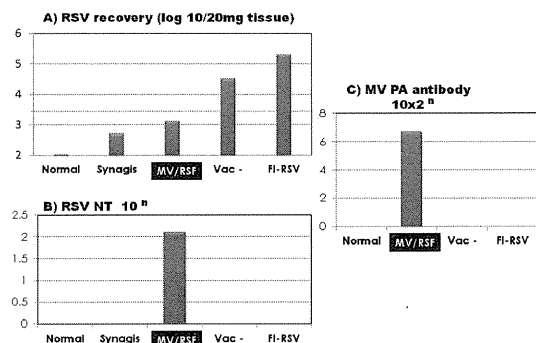
1) 血清抗体

各群コットラット 3 匹を用いその平均値を示した。RSV challenge 前の血清の麻疹 PA 抗体価、RSV NT 抗体価を下図に示した。麻疹 PA 抗体価は MVAIK/RSF A 接種群

にのみ検出され免疫後8週で $10 \times 2^{6.7}$ であった。RSV NT抗体価は同様にMVAIK/RSF A接種群にのみ検出され $10^{2.1}$ を示した。シナジス投与群では接種4日後であるが血清中にはNT抗体としては検出できなかった。

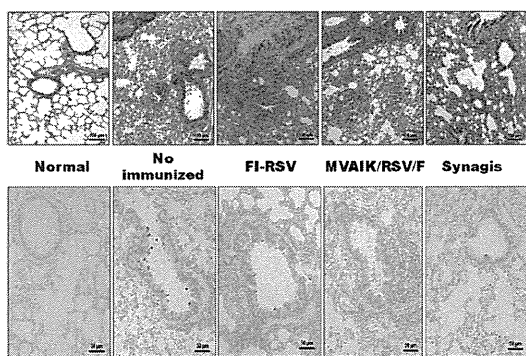
RSV challenge 4日後の肺内RSVの感染性ウイルス力価を示した。非免疫群に 10^6 pfuのRSV challenge群で $10^{4.5}$ pfuが回収されシナジス投与群では検出限界レベルの $10^{2.7}$ pfuと感染を抑えていた。

MVAIK/RSF A免疫群でも $10^{3.1}$ pfuと感染防御効果が認められた。一方、FI-RSV免疫群では $10^{5.3}$ pfuと非免疫群よりも高いウイルスが回収された。



2) 肺の病理組織所見

肺組織のHE染色、免疫染色の結果を示した。上段にHE染色、下段にはRSVの免疫染色を示した。

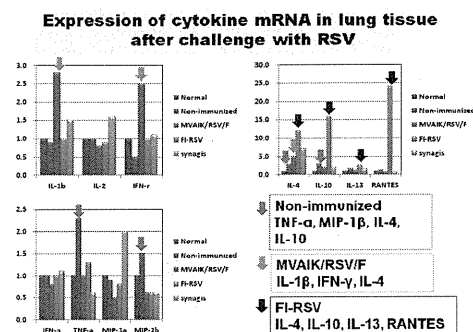


左端に正常の肺組織を示した。非免疫群では肺胞構造が崩れ炎症細胞が浸潤し気管支内腔にも炎症細胞の浸潤が認められる。シナジス投与群では肺胞構造は保たれているが肺胞壁の肥厚、炎症細胞の浸潤が認めら

れ軽度の間質性肺炎が認められる。一方、FI-RSV免疫群では全体に炎症細胞が浸潤し肺胞構造は認めず重症の間質性肺炎の所見が認められる。

3) サイトカイン

肺ホモジネートからRNAを抽出しサイトカインの応答を検索した。



非免疫群のRSV challengeによる感染モデルではTNF- α , MIP-1 β , IL-4, IL-10 mRNAが増加していた。MVAIK/RSV/F免疫群ではIL-4だけでなくIL-1 β , IFN- γ mRNAが増加しTh2サイトカインだけでなくTh1応答も誘導していた。FI-RSV免疫群ではIL-4, IL-10, IL-13のTh2サイトカインとRANTESが誘導された。

D. 考察

FI-RSVは感染防御能が認められずRSVに感染すると重症化する原因としてTh2に偏った免疫応答が原因の一つとして考えられている。コットンラットモデルとしてのFI-RSV接種群ではRSV challenge後重度の間質性肺炎を認め感染性ウイルスも感染モデルよりも高いウイルスが回収された。Th2サイトカインの誘導とRANTESのmRNAの高値を認めた事は病理組織学的な所見と合致していた。高い感染性ウイルスが回収された事は自然免疫系が働いていない可能性が考えられる。シナジス投与群は感染を防御しサイトカイン応答は非免疫群と同様にTNF- α が動いており中和抗体は検出できな

いが肺組織からは感染性 RSV は検出されず微量の抗体が有効に作用しているものと考えられる。組換えウイルス MVAIK/RSV F 免疫群では Th1 サイトカインの誘導が観察され Th2 とのバランスのとれた免疫を誘導しているものと推察された。

ウイルス感染と自然免疫系との関連性が詳しく解析され RSV の F タンパクは TLR4 のリガンドとして作用し NFkB を活性化し IL-6, TNF- α を誘導し TRIF IRF-3 の系から type I IFN を誘導する。FI-RSV は F タンパクが変性する事で TLR4 のリガンドとして働く事がなくアラムアジュバントの作用は NOD like receptor を刺激し IL-1 β を誘導する。炎症性サイトカインは MHC II と同時に CD4 陽性 T 細胞が認識する co-stimulator molecule の発現を誘導する事で Th2 優位の免疫応答を誘導することになる。これらの応答がアレルギー性の反応を示し RANTES の強い誘導が病理組織学的にも強い炎症性反応を起こしているものと推察される。

E. 結論

組換えウイルスはシナジスと同様に RSV 感染防御作用を示し Th1 応答も誘導しており FI-RSV の Th2 に偏った免疫応答ではなく有効なワクチン候補と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ji Yi-Xin, Ihara T, Komase K, Nakayama T. Amino acid substitutions in Matrix, Fusion, and Hemagglutinin proteins of wild measles virus for adaptation to Vero cells. Intervirology 54, 217-228, 2011.
- 2) Seki F, Yamada K, Nakatsu Y, Okamura K, Yanagi Y, Nakayama T, Komase K, Takeda M. The SI strain of measles virus derived from a patients with subacute sclerosing panencephalitis possesses typical genome alterations and unique amino acid changes that modulate receptor specificity and reduce membrane fusion activity. J Virol 85, 11871-11882, 2011.

2. 学会発表

- 1) 澤田成史、中山哲夫. ホルマリン不活化 RSV ワクチン失敗モデルの作製 第 15 会 日本ワクチン学会 2011,12, 10 東京

G. 知的財産権の出願・登録状況

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（国際医学協力研究事業）
分担研究報告書

「モンゴルにおいて流行したアデノウイルス」

研究分担者 押谷 仁 東北大学医学系研究科 微生物学分野 教授
共同研究者：鈴木陽、当広謙太郎（東北大学）

研究要旨

モンゴルで流行しているアデノウイルスの血清型を明らかにするため、インフルエンザサーベイランス定点より採取した検体よりアデノウイルスの検出を試みた。2010年1月から2011年の5月の観察期間中、スクリーニングを行った1,950検体のうち40検体(2.1%)からアデノウイルスが検出された。塩基配列解読を行うことができた31検体の解析結果より、7つの異なる血清型(HAdV-C1:3検体, -C2:4検体, -B3:5検体, -C5:3検体, -C6:1検体, -B7:10検体, -D8:5検体)が流行していたことがわかった。

A. 研究目的

アデノウイルス(Human adenovirus: HAdV)は、急性呼吸器感染症の5から10%を占める主要な起因ウイルスとされている。7つの亜群に属する52の血清型が報告されているが、近年分子生物学的解析より、HAdV-D53、-D54、-B55、-D56、-C57、及び-D58とあたらしいウイルスが報告されている。地域によりHAdV流行株が異なる事がわかっているが、モンゴル国における流行状況は明らかになっていない。

B. 研究方法

2010年1月から2011年の5月まで、モンゴル国全土に設定されたインフルエンザサーベイランス定点をインフルエンザ様疾患(influenza-like illness: ILI)にて受診した患者より、咽頭拭い液を採取した。眼球結膜症状を呈していた患者からは、結膜

拭い液の採取も行った。検体は首都ウランバートルにあるNational Influenza Center, National Center of Communicable Diseasesに輸送され、各月約20-200検体を無作為に抽出し、蛍光抗体法もしくはPCRにてHAdVの検出を試みた。HAdVが陽性であった検体を対象に、遺伝子型を特定するためhexon領域のloop1およびloop2のPCRによる増幅および塩基配列の同定を行った。

C. 研究結果

観察期間中ILI患者より合計6,774検体を採取した。その内1,950検体を対象にHAdVのスクリーニングを行ったところ40検体が陽性であった。内31検体の遺伝子を増幅する事に成功した。塩基配列より、7つの異なる血清型が検出された。一方、結膜拭い液からはHAdV-C6、HAdV-B7、およびHAdV-D8が検出された(表1)。

表1 検出アデノウイルスの血清型

血清型	検体種類				合計	
	咽頭拭い液		結膜拭い液			
C1	3	11%	0	0%	3	10%
C2	4	15%	0	0%	4	13%
B3	5	19%	0	0%	5	16%
C5	3	11%	0	0%	3	10%
C6	0	0%	1	25%	1	3%
B7	9	33%	1	25%	10	32%
D8	3	11%	2	50%	5	16%
合計	27		4		31	

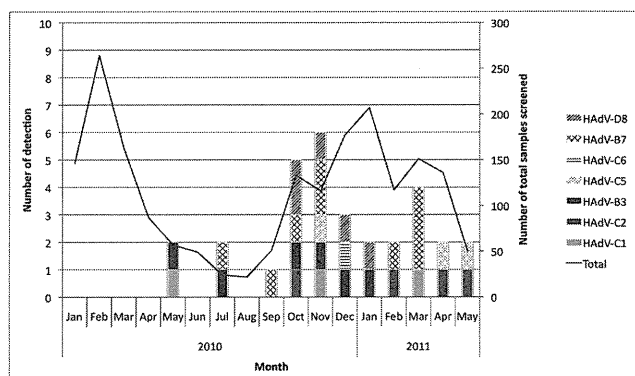


図1. モンゴル・インフルエンザサーベイランスアデノウイルスの検出

それぞれの血清型は分散して検出されており、明らかな季節性の偏在は示していなかった(図1)。

咽頭および結膜から検出された HAdV-D8 を比較したが、病原性に関わるとされる遺伝子変異は認めなかった。

D. 考察

対象期間のモンゴルでは、ILI 患者の 2.1%より HAdV が検出された。HAdV-B7、-B3 が多く検出されていたが、これらの血清型は重症肺炎患者から多く検出されるとされている。本研究では外来患者を対象とした調査のため、患者の転帰や重症化に関する情報を入手する事ができなかった。一方、HAdV-D8 は流行性角結膜炎の起因病原体とされているが、本研究では結膜拭い液のみならず咽頭拭い液からも検出されていた。

E. 結論

重症肺炎を来す HAdV-B7 が多く検出されており、今後も ILI を来す主要ウイルスとして HAdV 各血清型の公衆衛生学的インパクトを量る必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

Fuji N et al. Interruption of the circulation of an indigenous measles genotype and the introduction of other genotypes after a mass vaccination campaign in the Philippines. J Med Virol. 2011 Aug;83(8):1424-7.

2. 学会発表

➤ なし

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

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

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
Fuji N et al.	Interruption of the circulation of an indigenous measles genotype and the introduction of other genotypes after a mass vaccination campaign in the Philippines	J Med Virol	83(8)	1424-7.	2011 Aug

研究要旨：

我々はインフルエンザ後二次性肺炎マウスモデルを構築し、二次性肺炎の発症に関与する新規宿主および細菌因子の探索を行った。マウスにインフルエンザウイルスを経鼻感染させ、5日後に肺炎球菌を経鼻感染させると、二次感染マウス群で有意な生存率の低下がみられ、ウイルス感染後に易感染性になることが確認できた。また二次感染マウス群では肺炎球菌感染後に肺内菌数の増加と菌血症がみられたが、肺炎球菌単独感染マウス群では、肺内菌数の増加および菌血症はほとんどみられなかった。インフルエンザウイルスおよび肺炎球菌感染後のマウスの肺における遺伝子発現を網羅的に検討したところ、IL-6、TNF- α 、I型インターフェロン、インターフェロン- γ 、Mip2などのサイトカイン/ケモカインの発現が二次感染ウイルスにおいて有意に上昇していた。一方で、カテリシジン抗菌ペプチドの発現は有意に低下しており、カテリシジン抗菌ペプチドの発現抑制が肺内菌数の増加に寄与する可能性が示唆された。また、細菌因子としては二次感染時に顕著に発現が上昇している複数のABCトランスポータータンパク質が同定された。

A. 研究目的

季節性インフルエンザやパンデミックインフルエンザ時にみられる二次性細菌性肺炎はしばしば重症化し、肺炎球菌はその主要な原因菌である。実際に、1918年のスペイン風邪や2009年のH1N1によるパンデミックにおける重症例において肺炎球菌による二次性肺炎が報告されている。これまでの研究から二次性肺炎の発症に関与している宿主因子として、インフルエンザウイルス感染後に発現誘導されるinterleukin-10 (IL-10)、interferon- γ (IFN- γ)、I型IFNが考えられており、これらのサイトカインが肺胞マクロファージの貪食やサイトカイン産生を阻害し、その結果、好中球の活性や遊走も阻害されることが報告されている。その他にはイ

ンフルエンザウイルス感染後にマクロファージのToll-like receptor ligandsに対する不応答などが報告されているが、未だに二次性肺炎の発症機構の全貌は解明されていない。

一方、二次性肺炎の発症に関与している細菌因子については、インフルエンザウイルスHA開裂を促進するプロテアーゼ、肺炎球菌の病原因子であるpneumococcal surface protein A (PspA)、ピルビン酸オキシダーゼ (SpxB)の関与が示唆されているが、細菌因子に関する研究はほとんどされていないのが現状である。そこで本研究では二次性肺炎の発症機構の全貌を解明するために、二次感染マウスモデルを用いて新規宿主由来細菌因子の探索を行った。

B. 研究方法

1. 二次性肺炎マウスモデル

BL/6j、雌、6-8 週齢マウスに H1N1 インフルエンザウイルス(ニューカレドニア株)を $30 \mu\text{l}$ (1×10^3 PFU) 経鼻投与し、5 日後に肺炎球菌 D39 株(血清型 2)を $30 \mu\text{l}$ (5×10^5 CFU) 経鼻投与した。

2. 肺内菌数および血中菌数の測定

PBS あるいはインフルエンザウイルスを経鼻投与した 5 日後に肺炎球菌を経鼻投与した。肺炎球菌投与後 2 h、6 h、16 h、24 h、48 h、72 h に肺および血液を回収し、肺については 2 ml の PBS でホモジナイズ後、羊血液寒天培地にて CFU を測定した。

3. DNA マイクロアレイ解析

PBS/PBS マウス群(PBS 投与 5 日後に PBS を投与)、PBS/Sp マウス群(PBS 投与 5 日後に肺炎球菌を投与)、Flu/PBS マウス群(インフルエンザウイルス投与 5 日後に PBS を投与)、Flu/Sp マウス群(インフルエンザウイルス投与 5 日後に肺炎球菌を投与)において二次感染 16 時間後に肺を回収し、肺の全 RNA を抽出・精製し、DNA マイクロアレイ解析を行った。

4. リアルタイム PCR 法による mRNA の定量

PBS/PBS マウス群(PBS 投与 5 日後に PBS を投与)、PBS/Sp マウス群(PBS 投与 5 日後に肺炎球菌を投与)、Flu/PBS マウス群(インフルエンザウイルス投与 5 日後に PBS を投与)、Flu/Sp マウス群(インフルエンザウイルス投与 5 日後に肺炎球菌を投与)において二次感染 16 時間後に肺を回収し、肺の全 RNA を抽出・精製後、RT-PCR を行い、SYBR Green を用いてリアルタイム PCR を行った。

5. 気管支肺胞洗浄液の抗菌活性

PBS/PBS マウス群(PBS 投与 5 日後に PBS を投与)、PBS/Sp マウス群(PBS 投与 5 日後に肺炎球菌を投与)、Flu/PBS マウス群(インフルエンザウイルス投与 5 日後に PBS を投与)、Flu/Sp マウス群(インフルエンザウイルス投与 5 日後に肺炎球菌を投与)において二次感染 16 時間後に PBS 1 ml で気管支肺胞洗浄液(BALF)を回収し、 $0.45 \mu\text{m}$ 滅菌フィルターに通し、BALF $10 \mu\text{l}$ に対して $90 \mu\text{l}$ (1×10^5 CFU/ml) の肺炎球菌を加えて、 37°C 、5% CO_2 、5 h インキュベートし、羊血液寒天培地にて CFU を測定した。

C. 研究結果

1. ウイルス感染後の易感染性

インフルエンザウイルス感染マウスは、肺炎球菌単独感染マウスと比較して、有意な生存率の低下がみられた。肺内菌数については、肺炎球菌単独感染マウスにおいては、肺内菌数の増加はみられず、菌感染 48 時間後以降に菌を検出することはできなかった。一方、二次感染マウスでは、菌感染 16 時間後以降に顕著な菌数の増加がみられ、72 時間後においても菌数の減少はみられなかった。血中菌数においては、肺炎球菌単独感染マウスでは、ほとんど菌血症はみられなかったが、二次感染マウスでは、菌感染 48 時間後以降に高い頻度で菌血症がみられた。

2. 宿主の遺伝子発現

PBS/PBS マウス群、PBS/Sp マウス群、Flu/PBS マウス群と比較して、Flu/Sp マウス群(二次感染マウス群)において IFN- γ 、I 型 IFN、IL-10、TNF- α 、IL-6、さらに Mip2 などのサイトカイン/ケモカインの発現が有意に上昇していた。一方で、Flu/Sp マウス群において

カテリシジン抗菌ペプチド (CRAMP) 発現が有意に低下していた。

3. 二次感染マウスの肺洗浄液中の抗菌活性の低下

各マウス群から回収した気管支肺胞洗浄液を用いて、肺炎球菌に対する抗菌活性試験を行ったところ、PBS/PBS マウス群および PBS/Sp マウス群と比較して、Flu/PBS マウス群および Flu/Sp マウス群 (二次感染マウス群) において有意な抗菌活性の低下がみられた。

4. 肺炎球菌の遺伝子発現

肺炎球菌単独感染マウス群および二次感染マウス群の肺から、肺炎球菌 mRNA を回収し、DNA マイクロアレイ解析を行ったところ、pneumolysin を除いて、その他の既知の病原因子の発現に有意な変動はみられなかった。しかしながら、二次感染マウス群において、複数の ABC トランスポータータンパク質の発現が有意に上昇していた。

D. 考察

我々の二次感染マウスモデルでは、有意なマウス生存率の低下、肺内菌数の上昇、菌血症がみられた。さらに肺組織の検討を行ったところ、二次感染マウスにおいて広範囲における肺内好中球の浸潤が観察された。また二次感染マウスにおいて TNF- α 、IL-6 などの炎症性サイトカインの有意な発現上昇、さらにこれまで報告されている IFN- γ 、I 型 IFN、IL-10 などの発現も有意に上昇していた。

これまでの二次感染の発症機構に関する研究では、インフルエンザウイルス感染後に発現が上昇するサイトカインを標的するものが多かったが、我々はウイルス感染後に発

現抑制される遺伝子群の探索を行った。その結果、哺乳類における主要な抗菌ペプチドファミリーの 1 つであるカテリシジンの肺における発現が有意に低下していたが、もう 1 つの主要な抗菌ペプチドファミリーであるディフェンシンについては有意な遺伝子発現の変動はみられなかった。従って、ウイルス感染後の易感性には、気道粘膜上におけるカテリシジンの発現低下が関与している可能性が示唆された。

本研究では、これまでにほとんど研究されていなかった二次感染発症に寄与する細菌因子の探索を行った。全ての肺炎球菌株で二次感染後にマウスが重症化することがみられないことから、二次感染の発症には宿主因子だけではなく、細菌性因子も関与していることが考えられる。肺炎球菌においては、これまでの研究から PspA、SpxB の関与が示唆されているが、本研究の結果から ABC トランスポーターの関与が示唆された。Pneumococcal surface antigen A (PsaA) は肺炎球菌の既知の病原因子であり、ABC トランスポータータンパク質である。よって二次感染時に有意に発現上昇していた ABC トランスポータータンパク質が発症に関与している可能性が示唆されているが、今後さらなる検討が必要である。

E. 結論

インフルエンザウイルス感染後の易感性にウイルス感染後の気道中のカテリシジン抗菌ペプチドの発現低下が関与が示唆された。また、細菌因子としては二次感染時に顕著に発現が上昇している複数の ABC トランスポータータンパク質が同定された。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Piao Z, Oma K, Ezoe H, Akeda Y, Tomono K, Oishi K. Comparative effects of toll-like receptor agonists on a low dose PspA intranasal vaccine against fatal pneumococcal pneumonia in mice. *J Vaccines Vaccin* 2:1, 2011
<http://dx.doi.org/10.4172/2157-7560.1000113>
2. Kataoka K, Fujihashi K, Oma K, Fukuyama Y, Hollingshead SK, Fukui M, Sekine S, Kawabata S, Ito H, Briles DB, Oishi K. Nasal dendritic cell targeting Flt3 ligand as a safe adjuvant elicits effective protection against fatal pneumococcal pneumonia. *Infect Immun*, 79: 2819-2828, 2011
3. Kerdsin A, Dejsirilert S, Puangpatra P, Sripakdee S, Chumla K, Boonkerd N, Polwichai P, Tanimura S, Takeuchi D, Nakayama T, Nakamura S, Akeda Y, Gottschalk M, Sawanpanyalert P, Oishi K. Genotypic profile of *Streptococcus suis* serotype 2 and clinical features of infection in humans, Thailand. *Emerg Infect Dis* 17:835-842, 2011.
4. Kerdsin A, Dejsirilert S, Sawanpanyalert P, Boonnark A, Noithachang W, Sriyakun D, Simkum S, Chokngam S, Gottschalk M, Akeda Y, Oishi K. Sepsis and spontaneous bacterial peritonitis in Thailand. *Lancet* 378:960, 2011
5. Akeda, Y, Kodama T, Saito K, Iida T, Oishi, K, Honda T. Identification of the *Vibrio parahaemolyticus* Type III secretion system 2-associated chaperone VocC for the T3SS2-specific effector VopC. *FEMS Microbiol Lett* 324:156-64, 2011
6. Uchida Y, Matsubara K, Wada T, Oishi K, Morio T, Takada H, Iwata A, Yura K, Kamimura K, Nigami H, Fukaya T. Recurrent bacterial meningitis by three different pathogens in an isolated asplenic child. *J Infect Chemother* (in press).
7. Alonzo MTG, Lacuesta TLV, Dimaano EM, Kurosu T, Suarez LC, Mapua CA, Akeda Y, Matias RR, Kuter DJ, Nagata S, Natividad FF, Oishi K. Platelet apoptosis and apoptotic platelet clearance by macrophages in secondary dengue virus Infections. *J Infect Dis* (in press)
8. Takeuchi D, Kerdsin A, Pienpringam A, Loetthong P, Samerchea S, Pakkinee Loetthong P, Khamisra K, Wongwan N, Areeratana P, Chiranairadul P, Lertchayanti S, Petcharat S, Yowang A, Chaiwongsaen P, Nakayama T, Yukihiro Akeda Y, Hamada S, Sawanpanyalert P, Dejsirilert S, Oishi K. Population-based study of

- Streptococcus suis* infection in humans in Phayao Province in Northern Thailand. PLoS ONE (in press)
9. 川上健司、大石和徳. わが国の高齢者に対する肺炎球菌ワクチンの定期接種化は必要か? 呼吸と循環. 59: 1227-1231, 2011.
 10. 大石和徳. 肺炎球菌ワクチンの3回以降接種の可否. 医事新報. No.4575 60-61, 2011
2. 学会発表
1. Ezoe H, Akeda Y, Okuzaki D, Oishi K. Identification of the host and bacterial factors contributing to secondary pneumococcal pneumonia after influenza virus infection. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo. Sep 6-10, 2011.
 4. Nakayama T, Takeuchi D, Akeda Y, Oishi K. Association of haemolytic activity of human isolates of *S. suis* serotype 2 with their capacity of crossing the blood-CSF barrier. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo. Sep 6-10, 2011.
 5. Kerdsin A, Dejsirilert S, Phetcharaj S, Uagvichitpojchana C, Simkam S, Chokngam S, Takeuchi D, Nakayama T, Akeda Y, Oishi K. An outbreak of *Streptococcus suis* infection in humans, Pechabun Province, Thailand in 2010. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo. Sep 6-10, 2011.
 6. Takeuchi D, Nakayama T, Akeda Y, Oishi K. *Streptococcus suis* infection in Thailand. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo. Sep 6-10, 2011.
 7. Piao Z, Ezoe H, Akeda Y, Oishi K. Comparative effects of toll-like receptor agonists on a low dose PspA intranasal vaccine against fatal pneumococcal pneumonia in mice. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo. Sep 6-10, 2011.
 8. Oishi K. Role of apoptotic platelet clearance in thrombocytopenia in dengue, a reemerging infectious disease. Symposium, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo. Sep 6-10, 2011.
 7. Oishi K, Oishi T, Ishiwada N, Wada A and the Pediatric IPD study group. Serotype-specific immunity and unresponsiveness to 7-valent pneumococcal conjugate vaccine in pediatric patients with invasive pneumococcal disease during the introductory phase of this vaccine in Japan IDSA 49 th annual meeting. Boston, USA, October 20-23, 2011.
 9. Oishi K, Alonzo MTG. A role of apoptosis and apoptotic platelet clearance in secondary dengue virus infection. IDSA 49 th annual meeting. Boston, USA, October 20-23, 2011.
 10. Oishi K. Recent topics of bacterial infections in Asian countries. Oriental Congress of Pediatrics. Shanghai, China, Oct 28-30, 2011.
 11. Oishi K, Oishi T, Ishiwada N, Wada A, Akeda Y and the Pediatric IPD study group. Serotype-specific immunity and unresponsiveness to 7-valent pneumococcal conjugate vaccine in pediatric patients with invasive pneumococcal disease during the introductory phase of this vaccine in Japan. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 15 th Acute Respiratory Infection Panel Meeting. Wakayama. Nov 14-15, 2011.
 12. Takeuchi D, Kerdsin A, Nakayama T, Akeda Y, Nakamura S, Iida T, Hamada S, Dejsirilert S, Oishi K. *Streptococcus suis* infection in humans in Thailand. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2012. Kobe. Jan 11-12, 2012.

13. 江副浩和、明田幸宏、奥崎大介、大石和徳。インフルエンザ後二次性肺炎の発症に関与する宿主および細菌性因子の同定。第 54 回日本感染症学会中日本地方会学術集会。奈良。2011 年 11 月 24-25 日。

14. 大石和徳。細菌性ワクチン：その効果と限界。シンポジウム 3：予防医学を考える。第 54 回日本感染症学会中日本地方会学術集会、第 59 回日本化学療法学会。西日本支部総会。奈良市。11 月 24-26 日。

15. 小泉ゆか、明田幸宏、大石和徳。小児におけるインフルエンザ菌 type b ワクチン接種前後の血清殺菌能に関する検討。第 15 回日本ワクチン学会。東京。12 月 10-11 日。

16. 大島信治、永井英明、大石和徳。肺炎球菌ワクチン再接種時の安全性および免疫原性の検討。第 15 回日本ワクチン学会。東京。12 月 10-11 日。

17. 大石智洋、石和田稔彦、田村和世、庵原俊昭、大石和徳。小児の侵襲性肺炎球菌感染症患児における血清型特異免疫に関する検討。第 15 回日本ワクチン学会。東京。12 月 10-11 日。

18. 大石和徳。教育講演。高齢者肺炎とワクチン戦略。日本内科学会第 45 回生涯教育講演。米子、2011 年 11 月 13 日。

19. 大石和徳。教育講演。高齢者肺炎に対するワクチン戦略の新展開。第 78 回日本呼吸器学会近畿地方会。大阪、2011 年 12 月 3 日

H. 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