

## 平成24年度 分担研究報告書

分担課題名：汎赤痢菌群に対するユニバーサル・ワクチンの共同研究

研究事業名：「アジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークの促進と共同研究体制の強化に関する研究」(H23-新興-指定-020 )

分担研究者 三戸部治郎 国立感染症研究所・細菌第一部

協力研究者 小泉信夫、志牟田健、寺嶋淳 国立感染症研究所・細菌第一部  
Hemanta Koley インド国立コレラ腸管感染症研究所・細菌部

### 研究要旨：

細菌に対するワクチンは、毒素を免疫原としたトキシイドを除いて、血清型特異的な防御効果を主体としたものが多く、多様な血清型で構成される菌群全てに効果のあるものは開発されていない。担当者は赤痢菌の病原性発現機構の基礎研究の応用として血清型を超えた防御効果を示すワクチン候補の開発を行っている。赤痢はこれまで適当な動物実験モデルがないことが研究上のネックになっていた。本研究ではアジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークを活用し、モルモットを用いた新しい腸管感染モデルを開発したインド国立コレラ・腸管感染症研究所との共同研究を進めた。

### A. 研究目的

細菌性赤痢は東南アジアを中心に年間9千万人近くが罹患し、小児を中心に約40万人が犠牲になっていると推定されている。赤痢に対して、種々のワクチン候補が開発され、トライアルが行なわれている。これらのワクチン株は赤痢菌に代謝系の変異を導入して弱毒化したものか、大腸菌に赤痢菌の病原遺伝子群をプラスミドで導入したものであるが、一般的な細菌ワクチンと同様にワクチン株と同じ血清型の菌には防御効果は認められるものの、血清型が異なる赤痢菌に対しては無効で、汎赤痢菌群に有効なワクチンは開発されていない[1]。

その理由として血清型特異的な表面抗原に対する抗体価は上昇するが、赤痢菌群に共通な病原蛋白抗原は宿主の免疫から逃れている

機構が考えられる。実際、幾つかの赤痢菌の病原蛋白は宿主細胞細胞へ侵入した後にしか発現しないことが報告されている。

ワクチン開発という側面からもこうした赤痢菌の病原性発現機構の基礎的な解析は重要である。担当者は細菌のRNA結合蛋白として知られているHfqが赤痢菌の病原性発現調節に重要な役割を果たしていることを報告した。赤痢菌で*hfq*遺伝子の欠損株を作製したところ、その病原性に必須なType III Secretion system (TTSS)の発現が脱抑制され、TTSSが発現しない低温や低浸透圧の条件でもその発現が起こることが分かった。また、通常TTSSが発現する高温(37℃)ではその発現が増大することで、HeLa細胞に対する侵入性が野生型の5～30倍以上に増加することが示された[2]。

一方、Hfqは細菌のストレス応答遺伝子群の制御因子でもあり、赤痢菌以外の病原細菌で

あるサルモネラ、コレラ、レジオネラの *hfq* 欠損株では動物に対する病原性が低下することが報告されている。これは病原性よりもストレス条件下の生存性が低下していることが原因と考えられ、赤痢菌の *hfq* 欠損株も同様に動物実験における病原性が低下していた[2]。このように、病原性蛋白の発現量が増加するにも関わらず、生存性が低下している *hfq* 欠損株は、貧食細胞で殺菌されやすく、免疫担当細胞に提示される抗原量が多いため、生ワクチンとして効果が高い可能性がある。

分担者はこれまで、*S. flexneri* 血清型 2a の *hfq* 欠損株を用いて *S. sonnei* に対するワクチン効果をモルモットの角結膜炎モデルで評価し有意な防御能を認めた。一方、感染の場が腸管である赤痢菌に対して眼球の感染で評価することは限界があると考えられた。赤痢菌はこれまで、腸管感染の動物実験系が確立していなかったが、近年、胃酸を抑制し、盲腸を結索することでモルモット腸管でも赤痢を発症させることができることが報告されている[3]。当研究ではこの方法を開発したインド国立コレラ・腸管感染症研究所と共同研究を開始し、予備実験を行った。

## B. 研究方法

ワクチン候補株とコントロールの野生型株 2457T は、細菌第一部よりインド国立コレラ腸管感染症研究所(NICED)に分与した。実験に先立って、NICEDの実験動物倫理審査委員会の審査を受け承認された。実験はNICEDの動物実験施設のP2A区画で飼育、感染実験を行った。

3群計18匹の6週齢モルモットに、ワクチン候補株である *S. flexneri* 2a 2457T株の

*hfq*欠損変異株(6頭)、コントロールとして野生型2457T株(6頭)、およびPBS(6頭)を二週間隔で  $1 \times 10^9$ 個を計4回、鎮静下で左眼球に投与した(図1)。4週目、鎮静下で右眼球にSd1株  $1 \times 10^9$ 個を計2回、投与したのち、6日間症状を観察した。

## C. 研究結果

平成23年度にNICEDで行われた複数の予備実験の結果を検討したところ、ワクチン効果が一定の頻度でばらついていることが判明した。そこで平成24年度初頭(5月末)に渡印し、ワクチン株の検査を行った。

ワクチン株となる *S. flexneri* 2aの *hfq* 欠損変異株は野生型2457T株と比較し生育が遅い。LB平板にストリークした時に現れる大多数の小型のS型のコロニーは、病原性プラスミドを保持しており、病原遺伝子とそのレギュレータ、*ipaB*, *virF*, *invE*が増幅されるが、比較的高い頻度で出現する大型のR型のコロニーは病原性プラスミドを失うことがこれまでの経験から知られている。

現地で-80℃で保存されていたワクチン株は20%のグリセロールを含むストックにシャーベット状に保存されており、LBプレート上でコロニーを生育させると小型のS型のコロニーがほとんど出現せず大多数が大型のR型のコロニーを形成した。また、保存株から直接、*ipaB*, *virF*, *invE*遺伝子群に対するコロニーPCRを行ったが野生型と比べて、ごく弱いシグナルしか得られず、最終的にストック株から正しいワクチン株を分離するのは不可能であった。

以上のことより、これまで得られた予備実

験の信頼性に疑問が生じたため、急遽ワクチン株を再送し、送付した株を用いて再実験を行う必要が生じた。そこで感染研よりワクチン候補株を再分与し、それを用いた免疫後の感染実験に立ち会うスケジュール(図1)で免疫してもらい、11月末に再度渡印し、自らワクチン効果を判定した。

\* \* \*

再実験は、志賀菌(Sd1)に対する効果を判定するため、眼球へのワクチネーションとSd1によるチャレンジを再度行った。これまでの予備実験から眼球へのワクチネーションは動物個体に強い免疫を与えることが明らかであり、左眼球に2週間おきに2回ワクチネーションを行い、4週後、右眼球にSd1をチャレンジした。

初回免疫後、野性型菌は強い病原性を示し、3日以内に全てが角結膜炎を発症した。予想外に、6頭のうち1頭は全身に感染が拡大し2週間後に死亡した。他の3頭は完全に回復し2回目の免疫時の症状は軽微であった。残り2頭は4週間後のチャレンジまで左目の症状が持続した。

ワクチン投与群も角結膜炎を発症したが、野性型と比較して症状は非常に軽微であり、6頭全てで角膜炎の形成と膿汁を含む涙液は認められず、2回目の免疫時には症状は認められなかった。免疫群計11頭の観察では左目から右目への感染の拡大は見られなかった。

分担者も参加したSd1による防御効果判定では、PBS投与群は3日以内に6頭すべてが角結膜炎を発症した。野性型投与群は残った5頭中2頭に軽微な結膜炎が認められた。左目に角結膜炎が持続している2頭を含む残り3

頭には肉眼的な症状は認められなかった。ワクチン投与群は6日間に及ぶ観察期間中、6頭全てに肉眼的な症状は認められなかった(図2)。

#### D. 考察

ワクチン株が保存中に変質したことに對しては、今後薬剤耐性マーカーを病原性プラスミドに挿入するなどの対策が必要だと考えられた。ただし、NICEDでのワクチン株の保存並びに平板培地からの釣菌は、当初こちらが指示したマニュアルが守られておらず、また、高濃度のグリセロールストックは一般的にプラスミドが落ちやすいことが周知の事実となっていることを説明し、小型のS型コロニーから新たに多数のシードストックを作ることでも対処した。

ワクチン効果の判定では、以前に行った実験と同様に、明らかに*hfg*変異株は病原性が減弱していることが示された。また、血清型が異なる志賀菌Sd1に対しても同様なワクチン効果があることが示された。

さらに今回は左目に免疫して右目で判定を行なうことで、強い液性免疫が誘導されていることが示された。これについては血清に加えて動物の涙液も採取して分泌型のIgAの測定を行う予定である。

左目と右目を分けたため、感染研で行った両目に免疫した実験のように、免疫後に症状の持続している個体への介入的治療(テトラサイクリンの点眼)は行わなかった。その結果、野生型投与群では予想以上に症状が重く、1頭は死亡し2頭は感染が持続した。感染が持続していた関係もあったためか、Sd1が感染し

た症状は明らかに軽微であった。野生型を感染させた群は*S. sonnei*で判定した第一回目の実験も症状が明らかに軽く、野生型の感染にはワクチンほど完全ではないものの、何かしらの免疫効果はあるものと考えられた。これは基本的に相同性の高いIII型分泌装置遺伝子を持つ赤痢菌群同士では感染後に相互免疫を誘導するポテンシャルが高い可能性を示している。

#### E . 結論

汎赤痢菌群に効果があるワクチンの候補として、赤痢菌の病原性発現に関わるRNA結合蛋白遺伝子*hfq*の欠損変異株を用いて、モルモットの角結膜炎モデルで効果を判定した。過去に行われた角結膜炎モデルと同様に*hfq*欠損株は免疫時の症状が軽く、血清型が異なる志賀菌Sd1に対してワクチン効果が再現された。

#### F . 健康危機情報

緊急性をもって報告すべき内容は特になし。

#### G . 研究発表 (発表誌名巻号・頁・発行年等)

##### 1. 論文発表 なし

##### 2. 学会発表

Mitobe J, Yamamoto S, Watanabe H, and Ohnishi M. 第85回日本細菌学会総会ワークショップ 細菌における遺伝子発現制御の普遍性と特異性 2012年3月27日長崎ブリックホ

ール :

Bacterial cytoskeleton RodZ and virulence gene expression of *Shigella* type III secretion system

2012 Dec.12-14 US-Japan Cooperative Medical Science Program. 47 th Conference. Cholera and Other Bacterial Enteric Infections. Chiba Univ. Chiba Japan: Multimer formation of bacterial cytoskeletal protein RodZ. Mitobe J, Itaru Yanagihara I, Ohnishi K, Yamamoto S, Watanabe H and Ohnishi M,

#### < 参考文献 >

1. Kotloff, K.L., et al., *Global burden of Shigella infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies*. Bull World Health Organ, 1999. 77(8): p. 651-66.
2. Mitobe, J., et al., *Involvement of RNA-binding protein Hfq in the osmotic-response regulation of invE gene expression in Shigella sonnei*. BMC Microbiol, 2009. 9: p. 110.
3. Barman, S., et al., *Development of a new guinea-pig model of shigellosis*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2011. 62(3): p. 304-14.

図 1

## Immunization Protocol

CONTROL 1 (PBS): 6 Animals  
 CONTROL 2 BY *S. flexneri* 2a wild-type: 6 Animals  
 VACCINATION BY *S. flexneri* 2a  $\Delta hfq$ : 6 Animals

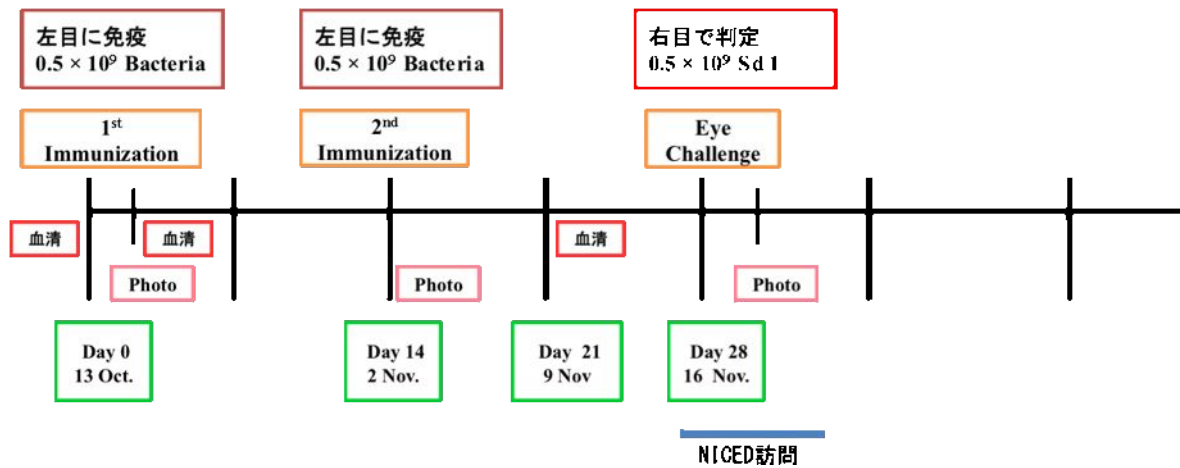
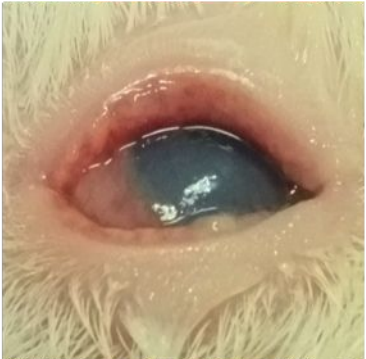




図 2

## Effect of vaccination (Photo: 3 days after infection)

Control 1	Control 2	Vaccine
PBS Sd1	Wild-type <i>S. flexneri</i> Sd1	$\Delta hfq$ , <i>S. flexneri</i> Sd1
		
6 / 6 +++	2 / 5 + 3 / 5 -	0 / 6 -