

平成23-25年度 総合分担研究報告書

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 国立感染症研究所・細菌第一部

Ritam Sinha, 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：

毒素蛋白を免疫源としたトキシイドを除いて、多様な血清型で構成される病原菌群に共通に効果を示すワクチンは実用化されていない。分担者は基礎的な研究から、赤痢菌群に共通する病原蛋白の発現が増加する一方、ストレス応答の低下により病原性が低下する変異体を分離した。これが血清型を超えた防御効果を示すユニバーサル・ワクチンとして利用できないか調べるため、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、モルモットの腸管感染モデルを初めて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行った。*S. flexneri* で作製したワクチン候補株は、病原性が高度に減少する一方、血清型が異なる強毒株である志賀菌(*S. dysenteriae* type 1)並びに現在の流行株である *S. sonnei* に対し明確な防御効果が認められた。

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、赤痢菌の病原遺伝子を欠損させ弱毒化したものである。一般的な細菌に対する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]。

その理由として抗原性の高い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。ワクチン開発という側面から赤痢菌の病原性発現機構の基礎的な解析は重要であり、分担者は細菌の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に関わる遺

伝子群の転写因子である *rpoS* や *rpoE* というシグマ因子の発現に必須であり、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]。逆にワクチンとしての利用を考えるならば、病原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困難であった。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[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(NICED)のDr. Koleyらと共同で実験を行い、*S. sonnei* のみならず、志賀毒素遺伝子を持ち毒性が強い志賀菌(*S. dysenteriae* Type 1, 以下 *Sd1* と表記)に対する効果を調べた。

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。

実験(1): 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 の *hfq* 欠損変異株(6頭)、コントロールとして *S. flexneri* 2a の野生型(6頭)、およびPBS(6頭)を二週間隔で 1×10^9 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 1×10^9 個を計2回、投与したのち、6日間症状を観察した。さらに全身的な免疫誘導を調べるため、*Sd1* 投与の2週間後、同じ個体に、開腹下で結腸に *S. sonnei* 株 1×10^9 個を、投与したのち、閉腹し48時間症状を観察した(図1)。

実験(2): 経口免疫系の再実験として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 の *hfq* 欠損変異株を 1×10^7 個(6頭)、コントロールとして *S. flexneri* 2a の野生型 1×10^6 個(6頭)、およびPBS(6頭)を1週間隔で計4回、経口カテーテル下で胃に投与した(図1)。免疫終了後、開腹下で結腸に *Sd1* 株 1×10^9 個を投与したのち、閉腹し48時間症状を観察した。

C. 研究結果

平成23年度からNICEDで予備実験を開始したが、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。そこで急遽平成24年度初頭に渡印し、ワクチン株の検査を行った。

現地で保存されていたワクチン株は保存が悪く、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。R型からは、赤痢の病原性プラスミドに存在する *ipaB*, *virF*, *invE* 遺伝子群のPCRが陰性であり、保存中に病原性プラスミドが脱落しており、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。

以上のことより感染研よりワクチン株を再分与し、それを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、平成24年11月末に再度渡印し、ワクチン効果を判定した。

* * *

実験(1)：全身的な免疫誘導を確認し志賀菌(*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。

野性型菌投与群は初回免疫後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流涙は認められず、2回目の免疫時には症状は認められなかった。死亡例1頭を含む免疫群計12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。

分担者も参加した防御効果判定は免疫した眼球と反対側の右目に*Sd1*の感染を行った。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)。

さらに*Sd1*の感染の2週間後、全身的な免疫誘導を調べるため、同じ個体に、開腹下で結腸に*S. sonnei*株 1×10^9 個を接種したのち、閉腹し48時間症状を観察した。

PBS投与群は6頭すべてが血性下痢を発症し48時間以内に死亡した。ワクチン投与群は6頭中2頭(33%)が水様性下痢を発症したが、血性下痢と比較して症状は非常に軽微であり、死亡例はなかった。野生型投与群も同様に5頭中2頭(40%)が水様性下痢を発症し死亡例はなかった(表1)。

実験(2)：これまで行った予備実験では野生型菌を用いたコントロール群に 1×10^7 個の野生型菌を経口投与したところ、全頭が赤痢症状で死亡したためオーバードーズと考えられた。今年度に行った再実験では野生型株は10%に減量し 1×10^6 個の投与とし、ワクチン候補株はこれまで通り 1×10^7 個を1週間隔で計4回、経口カテーテル下で胃に投与した(図3)。

Hfq変異による弱毒化は初回免疫時のバイタルサインに明確に現れた。今回は野生型投与群に死亡例は無かったが炎症反応を伴う下痢が激しく、39.5 付近の体温上昇と10%近い体重の減少が観察された。対照的にワクチン投与群は野生型菌の10倍の菌量が投与されているにも関わらず実質的に無症状であった(図4)。

初回免疫後ワクチン株接種群は有意な症状を示さなかったが血清中のtotal IgGは4週目までに野生型投与群と同レベルまで誘導された。またワクチン投与群では液性免疫の誘導を示すインターフェロン が免疫期間にわたって増加しており、有効に免疫が誘導されている可能性が示唆された(図5)。

免疫終了後、開腹下で結腸に*Sd1*株 1×10^9 個を注入したのち、閉腹し48時間症状を観察した。PBS投与群は6頭すべてが血性下痢を発症し48時間以内に死亡した。ワクチン投与群は6頭中1頭(16%)が水様性下痢を発症したが、血性下痢と比較して症状は非常に軽微であり、死亡例はなかった。野生型投与群も同様に6頭中2頭(33%)が水様性下痢を発症し死亡例はなかった(表2)。

感染後3日間定量した便中の菌量はPBS投与群と比較して免疫群では1000倍以上少なく、期間を通じて減少傾向であった。大腸組織へのコロナイゼーションも免疫群が有意に少なく、その中でもワクチン投与群の菌量が少ない結果が得られた(図6)。

D. 考察

ワクチン株が保存中に変質したことに対しては、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。当座の対策として小型のS型コロニーから新たに多数のシードストックを作製し保存することにした。その結果平成24年度に新たに送付したワクチン株は、その後の実験では安定した効果を示した。

ワクチン効果の判定では、以前に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頭は全身的な感染に移行し死亡した。このように初回免疫の症状からも*hfq*変異株は病原性が減弱していることが示された。

今回は左目に免疫して*Sd1*を用いて右目で判定を行なうことで、血清型が異なる志賀菌*Sd1*に対しても局所的ではないワクチン効果

があることが示された。さらに引き続き同一の個体群を用いて血清型が異なる*S. sonnei*の腸管感染実験で防御効果が示されたことから、ワクチン投与群と野生型投与群では全身的な液性免疫が誘導されていることが示された。

経口ワクチネーションの実験(2)でもワクチン効果の再現性と*hfq*変異による高度な病原性の減弱が認められた。初回免疫時の観察ではワクチン株は10倍量での免疫でも症状を起こさないこと、体温・体重の推移からも、明らかに*hfq*変異によって病原性が減弱していることが示された。また、今年度は血清中のサイトカインの測定を積極的に行い、血中IgGとIFN- γ の推移から免疫群、特にワクチン接種株で有効に免疫が獲得されていることが示された。

結果的に経口でのワクチネーションでも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。これらの結果から、このワクチンは少なくとも*Sd1*と*S. sonnei*に関して血清型の壁を超えた免疫を誘導するポテンシャルが高い可能性を示した。

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、全身的な免疫を誘導し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, Itaru Yanagihara I, Ohnishi K, Yamamoto S, Watanabe H and Ohnishi M, 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, Yamamoto S, Watanabe H, and Ohnishi M. 第86回日本細菌学会総会 2013年 3月 18-20日 幕張メッセ : Bacterial cytoskeleton RodZ and virulence gene expression of *Shigella* type III secretion system.

Mitobe J, Yamamoto S, and Yanagihara I 2013 June.4-8 3rd Conference on regulating

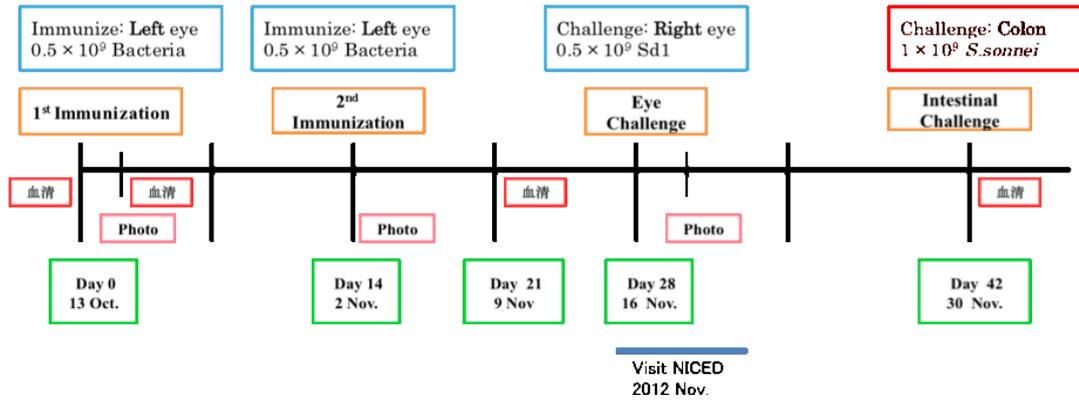
with RNA in bacteria. Wurzburg, Germany. : Multimer formation of bacterial cytoskeletal protein RodZ.

< 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.

☒ 1

CONTROL 1 (PBS): 6 Animals
 CONTROL 2 BY *S. flexneri* 2a wild-type: 6 Animals → 1 dead.
 VACCINATION BY *S. flexneri* 2a Δhfq : 6 Animals



☒ 2

Effect of vaccination (Photo: 3 days after infection)

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

表 1

Immunogen	Challenged Strain	Number of animal	Water diarrhea	Bloody diarrhea	% of death
Control 1 PBS	<i>S. sonnei</i>	6	0% (0/6)	100% (6/6)	100% (6/6)
VACCINE	<i>S. sonnei</i>	6	33% (2/6)	0% (0/6)	0% (0/6)
Control 2 Wild-type	<i>S. sonnei</i>	5	40% (2/5)	0% (0/5)	0% (0/5)

图 3

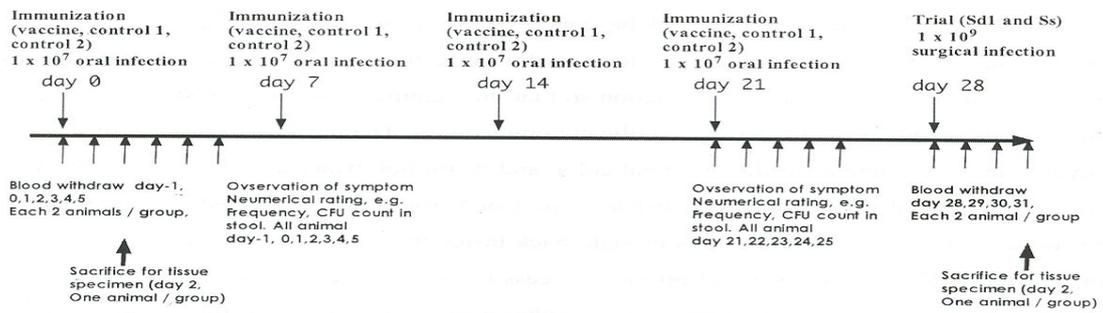
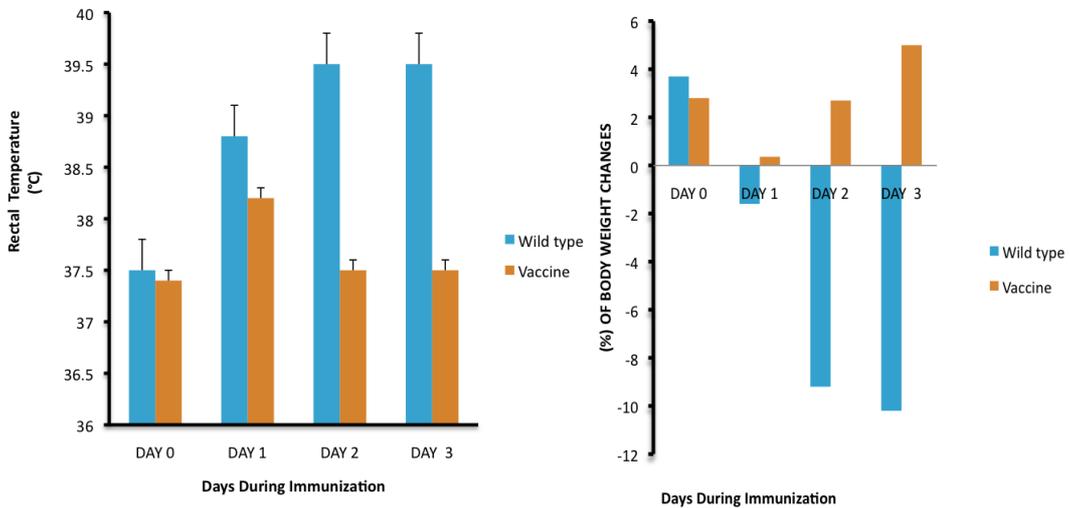


图 4



☒ 5

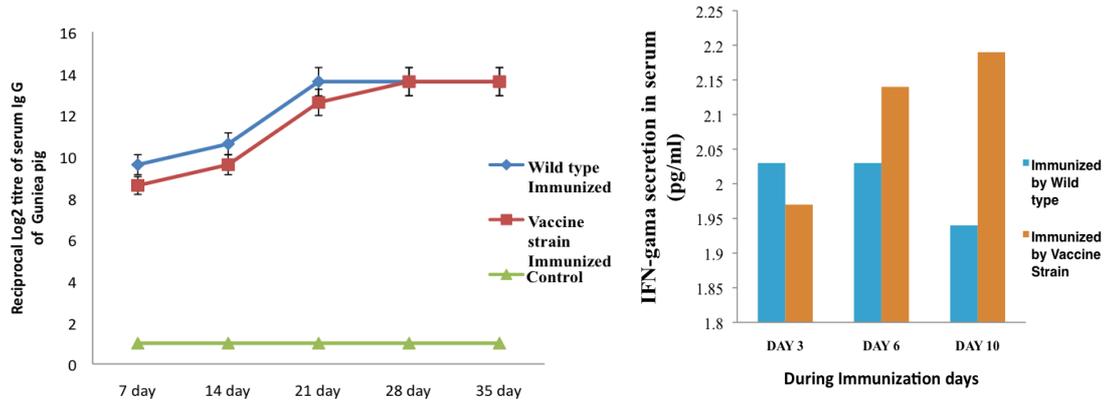


表 2

Immunogen	Challenged Strain	Number of animal	Water diarrhea	Bloody diarrhea	% of death
Control 1 PBS	Sd1	6	0% (0/6)	100% (6/6)	100% (6/6)
VACCINE	Sd1	6	16% (1/6)	0% (0/6)	0% (0/6)
Control 2 Wild-type	Sd1	6	33% (2/6)	0% (0/6)	0% (0/6)

☒ 6

