

厚生労働科学研究委託費
新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業

(委託業務題目) 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
平成26年度 委託業務成果報告書

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

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：

多様な血清群で構成される赤痢菌のすべてに効果を示すワクチンは実用化されていない。分担者は、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3種類の赤痢菌に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。これまで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、病原遺伝子の一部を欠損させ弱毒化したものである。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は宿主の免疫から逃れていることが考えられる。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抑制的な役割を果たしていることを報告してきた。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)の発現が野生型よりも増大し、通常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、TTSS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*rpoS*や*rpoE*というシグマ因子の発現に必須で

あり、赤痢菌以外のサルモネラ、コレラ、レジオネラでは*hfq*欠損株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。これはストレス条件下で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では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、この病原蛋白の発現量が増加しながら、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ワクチン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難しい。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の腸管でも赤痢を発症させることができることが示された[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、良好な結果が得られた。今年度はワクチンの弱毒化の評価と、他の血清型の赤痢菌に対する効果、論理的背景を明らかにするため、血清中の赤痢菌に対する抗体の検出を試みた。

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。動物実験はNICEDの動物実験施設のP2A区画で飼育、感染実験を行った。

感染実験はモルモットの結索した大腸ループに 1×10^9 個の菌を接種し、6時間、24時間後に組織をゲンタマイシン-PBSで洗浄し、ホモジェネートした組織をプレートに撒いてコロニー数をカウントした。

乳飲みマウスモデルは6週令の母マウスを 1×10^7 個の菌で1週おきに計4回経口免疫し35日-40日後に交尾させ、56日-61日後に乳飲み子マウスに 1×10^9 個の*S. flexneri* Type 3a, *S. flexneri* Type 6, *S. boydii* Type 4を経口投与し症状を観察した。

ウエスタンブロット：ワクチンで免疫したモルモット血清を57-30分加熱で非働化し、1%ホルマリンで固定した大腸菌株BL21で2回吸収処理した後、1000倍で使用した。ブロットは*S. sonnei*の野生型、*invE*、*spa-ipa*(TTSS全領域)、*virG (icsA)*、*icsP*欠損株を10%ゲルで泳動した。

(倫理面への配慮)他に代替手段のない動物実験は動物愛護に配慮し、苦痛軽減のため全てケタミン・キシラジンで麻酔を行い、動物の固定は最小限にとどめた。感染動物に対しては人道的エンドポイントを設定した。

C. 研究結果

Hfq変異による弱毒化の効果を観察するため、野生型とワクチン候補株をモルモットの結索した大腸に投与した。24時間後の観察では、ワクチン投与部位に炎症と血性の液体貯留は見られず(図1A)、上皮の顕微鏡観察でも組織の正常な腺管構造が保たれていた(図1

B)。組織への菌の侵入は6時間後ではワクチン株の方が高く、24時間後では野生型の方が高い傾向が見られた(図1C)。これはワクチン株の方が早く組織に侵入するがその後の増殖が進まないことを示唆する。

多種類の血清型に対する効果を観察するため、乳飲みマウスモデルを用いて3種類の血清型の赤痢菌に対する効果を判定した。その結果 *S. flexneri* 6型に対して80%、*S. flexneri* 3a型に対して75%、*S. boydii* 4型に対して75%の効果が認められた(表1)。これは異種の血清型で母マウスを免疫し、その母乳の免疫グロブリンで間接的に仔マウスを防御する系であることを考えると、高い値をとっていると考えられ、赤痢菌群に対する共通な免疫グロブリンが誘導されていることを示唆した。

免疫後の血清で菌体の凝集反応を調べると、免疫に用いた *S. flexneri* に2aは凝集し、*S. sonnei* に対しては凝集能がない。ところが、*S. sonnei* と血清を混ぜたものを加温したところ、補体系の作用で菌体が破壊された(図3)。この結果は菌体を破壊する補体複合体をリクルートする抗体が存在することを強く示唆している。

そのため、免疫血清を用いて赤痢菌蛋白に対するウエスタンブロットを行った。もともと血清にはグラム陰性菌に対する非特異的な抗体が多く存在するため、大腸菌実験室株 BL21 で吸収を行い、免疫前血清でシグナルが完全に消失するのを確認した。

この条件では免疫後血清でも4本のバンドのみが検出された。このうち2本のバンドは病原性のマスターレギュレーターである *invE* の欠損株で消失することから、赤痢菌特異的な病原蛋白と考えられた。40 k Da 付近のバン

ドは *spa- ipa* (TTSS全領域)欠損株で消失することから IpaB と考えられ、95 kDa のバンドはサイズから SenA 蛋白の可能性が高く、どちらも外膜蛋白ではなく、分泌されるエフェクター蛋白であることが報告されている(図4)。

抗体が菌体に結合し補体の働きで破壊されることを考えると、菌の外膜蛋白に対する抗体の存在が予想されるが、ウエスタンブロットでは、抗原量が少なく測定感度以下であり、外膜抗原は高感度の免疫蛍光顕微鏡で検出する必要があったと考えられた。

D. 考察

大腸ループのマクロな観察ではワクチン株は病原性をほとんど示さないように見えた。一方、組織から回収した菌のカウントではワクチン株は感染初期に野生型よりも高い効率で組織に侵入していることが示された。これは炎症が軽いにも関わらず、効果が見られるワクチン株の免疫提示に役立っていると考えられた。

乳飲みマウスモデルでは、異なる3種類の血清群の赤痢菌に対して75-80%の効果を認めた。乳飲みマウスモデルは母体から授乳を介した間接的な免疫作用を観察するため、この値が、十分に高いか、不完全と見なすかは、腸管感染モデルでの効果がすでに示されている *Sd1* 並びに、*S. sonnei* の観察も平行して行う必要があると考えられる。

血清による菌体の破壊は菌表面の外膜蛋白に対する抗体の存在を強く示唆した。Protective antigenの存在を示すために行ったウエスタンブロットでは病原蛋白のバンドは2つしか存在せず、そのどちらもが分泌型の蛋白であることが予想された。これはウエスタンブロットではProtective antigenが測

定感度以下、もしくはSDSによる変性状態では血清中の抗体に反応しないことを示唆している。

そのため、抗モルモット蛍光抗体を用いた菌体の免疫染色を行う予定である。具体的には病原蛋白を発現しない*S. sonnei*の*invE*欠損株で一般的な細菌の外膜蛋白を吸収する。また、具体的にどの蛋白に対する抗体が出来ているか調べるため、*S. sonnei*のIII型分泌装置遺伝子群、*virG*ならびに*icsP*遺伝子の欠損株で吸収した血清を用いてこれらの外膜蛋白に対する抗体が出来ていることを証明する予定である。これまでの結果から、少なくとも*S. sonnei*では複数の膜蛋白に対する抗体が検出されており、血清型の壁を超えた抗体が産生されている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*の欠損変異株の効果を判定した。過去に行われた角結膜炎・腸管感染モデルと同様に*hfq*欠損株は乳飲みマウスモデルで、母乳免疫を誘導し血清型が異なる3種類の赤痢菌に対して有意なワクチン効果を示した。また、モルモットの腸管ループモデルでも病原性が減弱していることが示された。ワクチン効果の論理的背景を明らかにするため、赤痢菌外膜蛋白に対する抗体を検出する系を製作した。

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87回日本細菌学会総会 2014年3月26-28日タワーホール船堀: Bacterial cytoskeleton RodZ and virulence gene expression of *Shigella* type III secretion system.

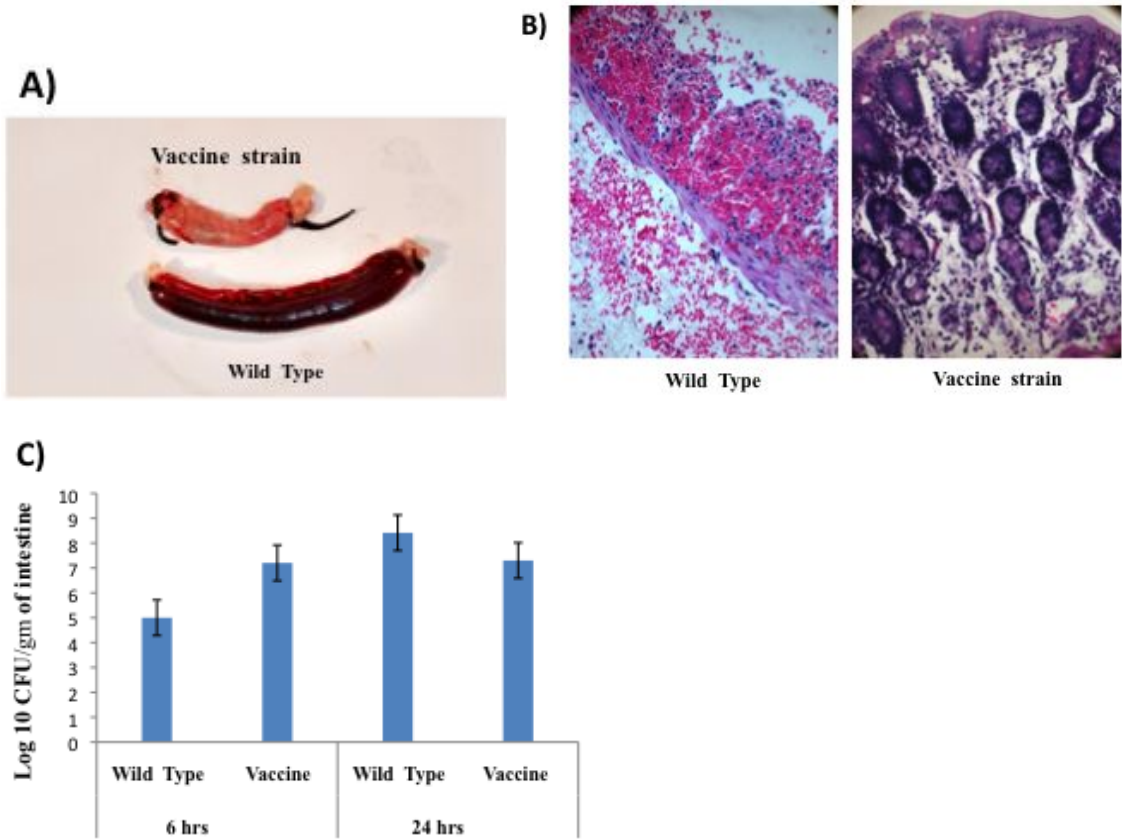
H . 知的財産権の出願・登録状況

なし

<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



2

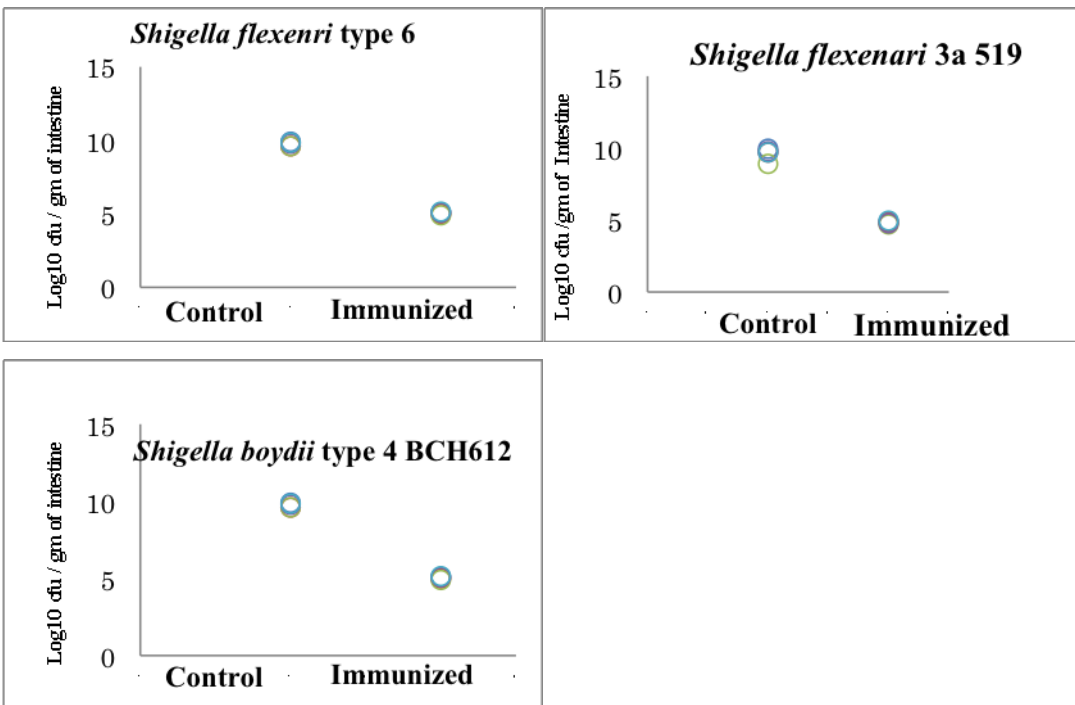


表 1

Challenge strain	Challenge dose	Experimental group	Experimental neonatal	% of survival after first challenge	Protective efficacy (%)
<i>S. flexenari</i> 6	2±1×10 ⁹ /ml	Control	5	0(0/5)	80
		Immunized	5	80(4/5)	
<i>S. flexenari</i> 3a	3±1×10 ⁹ /ml	Control	5	20 (1/5)	75
		Immunized	5	80 (4/5)	
<i>S. boydii</i> type 4	2±1×10 ⁹ /ml	Control	5	20 (1/5)	75
		Immunized	5	80 (4/5)	

图 3

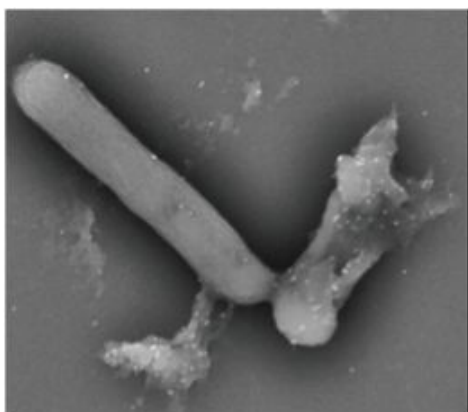


图 4

