

論 文 要 旨

肺炎球菌と無莢膜インフルエンザ菌の上皮細胞接着における
ホスホリルコリンの役割

井内 寛之

【序論及び目的】

7 価そして 13 価の結合型肺炎球菌ワクチンは小児の侵襲性肺炎球菌感染症ならびに耐性菌による難治化症例を減少させ、急性中耳炎に対しても鼓膜切開の頻度が減少させたことが報告されている。しかし、急性中耳炎全体の予防効果は 6 % と低く、血清型置換やインフルエンザ菌による急性中耳炎の増加が問題となっている。また、2013 年に定期接種化されたインフルエンザ菌 b 型に対するワクチンも髄膜炎などの侵襲性感染症には優れた予防効果を示すが、中耳炎の起炎菌となるのは莢膜を持たない無莢膜型インフルエンザ菌 (NTHi) であるため、このワクチンは中耳炎には無効である。そのため、すべての肺炎球菌 (Spn) や NTHi に有効な広域スペクトラムを持つワクチンの開発が急務である。そのワクチンの候補として、我々が注目しているホスホリルコリン (PC) がある。PC は Spn および NTHi を含む多種多様な病原体の構成成分であり、PC の発現が高い Spn は発現が低い Spn と比較して侵襲性の感染を引き起こし、PC の発現が高い NTHi は滲出性中耳炎患者の鼻咽頭に長期にわたって定着する。さらに、Spn および NTHi のコロニー形成や細胞内侵入は、PC と宿主粘膜細胞表面上の血小板活性化因子受容体 (PAF-R) との結合を介する細菌の接着によって誘導される。我々は、キャリア蛋白として Keyhole limpet hemocyanin (KLH) を PC に結合させた PC-KLH をコレラ毒素とともに BALB / c マウスに経粘膜投与することで、PC 特異的粘膜および全身免疫応答が誘導され、Spn および NTHi の異なる株の鼻腔からのクリアランスが高まることを示した。Spn および NTHi のクリアランスの亢進は PC 特異的分泌 IgA によってもたらされ、これが細菌の付着を阻害することが知られている。これらの知見は、PC が広域スペクトラムのワクチンとして有効なことを示唆している。しかし、PC ワクチンは、PC の発現が低いすなわち病原性が低い細菌で構成された常在細菌叢に影響を与える可能性が懸念される。そこで、PC をターゲットにしたワクチンの有用性を証明することを目的として、Spn および NTHi における PC の発現、さらにこれら細菌の上皮細胞への接着や細胞内侵入における PC の関与について検討した。

【材料及び方法】

①細菌とその PC 発現

Spn は滲出性中耳炎患者の上咽頭由来の 16 菌株、ATCC 株の 2 菌株、和歌山県立医科大学の保富先生から提供していただいた 5 菌株、鹿児島大学の西先生から提供していただいた 4 菌株合計 27 菌株を使用し、NTHi は滲出性中耳炎患者の上咽頭由来の 18 菌株、西先生から提供していただいた 4 菌株合計 22 菌株を使用し、PC の発現は FACS を用いて測定した。

②培養細胞とその PAF-R 発現

in vitro の系ではヒト咽頭癌由来の Detroit 562 細胞、*in vivo* の系では生後 6 週齢の雌性 BALB/c マウスを使用し、Detroit 562 細胞の PAF-R の発現は FACS を用いて確認した。

③細菌の接着および細胞内侵入

in vitro の系では接着もしくは細胞内侵入した細菌数をコロニー数で判定し、*in vivo* の系では鼻腔粘膜を採取し、それに含まれる細菌のコロニー数で評価した。

④接着と細胞内侵入の阻害

細菌に発現している PC を阻害するために抗 PC-IgA(TEPC-15)を使用し、細胞の PAF-R を阻害するために PAF-R 拮抗薬(ABT-491)または PC-KLH を使用した。

【結 果】

① PC の発現強度と細菌接着

Spn、NTHi の PC 発現は各菌株で異なっており、Spn と NTHi とともに PC の発現と細菌接着数は正の相関を認めた。また、Spn、NTHi それぞれの全菌株の mean fluorescence intensity (MFI)の中央値で PC 高発現株と PC 低発現株に分類し検討し、以下の検討を行った。

② PAF-R の発現

Detroit 562 cells の PAF-R 発現は iso-type control と比較して有意に発現が高かった。

③ 細菌接着における抗 PC-IgA、PAF-R 拮抗薬、PC-KLH の作用(*in vitro*, *in vivo*)

Spn と NTHi の PC 高発現株では、抗 PC-IgA、PAF-R 拮抗薬、PC-KLH で処理することで細菌接着が有意に抑制されたが、PC 低発現株では抑制されなかった。

④ 細胞内侵入における抗 PC-IgA、PAF-R 拮抗薬、PC-KLH の作用(*in vitro*)

細菌接着と同様に NTHi の PC 高発現株では、抗 PC-IgA、PAF-R 拮抗薬、PC-KLH で処理することで細胞内侵入が有意に抑制されたが、PC 低発現株では抑制されなかった。

【結論及び考察】

Spn および NTHi の PC 発現は各菌株で異なるが、その培養上皮細胞への接着性はともに PC 依存性に増加した。Spn および NTHi の接着性は病原性と関連することが知られており、病原性が高い細菌ほど PC の発現が強く、上皮細胞への接着性も強いと考えられる。さらに、細菌に発現している PC を抗 PC-IgA で処理すると、PC 高発現株の Spn および NTHi が細胞へ接着することが有意に抑制された。つまり、PC の発現が高く病原性が高い細菌のみが抗 PC-IgA によって細胞への接着が阻害されることが考えられる。一方、PC 低発現株は抗 PC-IgA で処理しても接着が抑制されなかった。また、PC 高発現株でも抗 PC-IgA で完全に接着が阻止されないことから、細菌の接着には PC 以外の表面タンパクや線毛などの接着因子も関与するが、PC 高発現株では、その影響が少ないと推測される。今回使用した Detroit 562 細胞には PAF-R が発現し、これを PAF-R 拮抗薬や PC-KLH で処理すると、PC 高発現株では細胞への接着が有意に抑制され、PC 低発現株では抑制されなかった。さらに、*in vivo* でも同様の結果が得られた。細菌の細胞内侵入は NTHi のみで観察され、PC 高発現株のみが細菌および細胞の処理によって侵入が抑制された。この結果は、接着する細菌数が減少しそれに伴って細胞内に侵入する細菌も減少したことによるものと推測される。また、口腔内常在菌の PC 発現は、Spn および NTHi より低かった。以上のことから、Spn および NTHi の細菌接着や細胞内侵入に PC の発現が関与し、さらにその発現が高い細菌は病原性が強いことが示唆される。すなわち、PC をターゲットとしたワクチンは病原性が高い Spn および NTHi に有効であり、口腔内常在菌などの PC 発現そして病原性が低い細菌には影響を与えず、安全であると考えられる。

(AURIS NASUS LARYNX IN PRESS)