

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007 年 ～ 2008 年
 課題番号：19791225
 研究課題名（和文） PspA ファミリー解析と肺炎球菌に対する新しいワクチンの開発
 研究課題名（英文） PspA family analysis and development of new vaccine of *S. pneumoniae*
 研究代表者 酒井 章博
 (SAKAI AKIHIRO)
 和歌山県立医科大学 医学部 博士研究員
 研究者番号：50423950

研究成果の概要：

PspA 母体経鼻免疫により、母マウス母乳および結成、仔マウスの血清中に抗 PspA 特異的 IgG4 が誘導された。また、PspA 母体経鼻免疫群の仔マウスは、コントロール群に比べて鼻腔への肺炎球菌のコロニー形成は有意に低下していた。このことより母体のワクチン接種により児の肺炎球菌感染症の予防が可能であることが期待できる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	1600000	0	1600000
20 年度	1500000	450000	1950000
年度			
年度			
年度			
総計	3100000	450000	3550000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：肺炎球菌、ワクチン、急性中耳炎、髄膜炎

1. 研究開始当初の背景

肺炎球菌は乳幼児から幼小児、高齢者を中心としてヒト鼻咽腔に無症候性に常在するとともに、急性中耳炎および急性副鼻腔炎をはじめとする非侵襲性の上気道感染症から重症肺炎や髄膜炎などの致死性侵襲性感染の起炎菌となる。肺炎球菌は従来までは、ペニシリン系抗菌薬に良好な感受性を示していたため、多くの場合には抗菌薬治療が奏功していた。しかし、1996 年頃より肺炎球菌の薬剤耐性化が進行し現在では肺炎球

菌臨床株の約 40%が多剤耐性を示すのが現状である。そのため、従来までは比較的良好な臨床経過をとっていた非侵襲性肺炎球菌感染症である急性中耳炎や急性副鼻腔炎の難治化や、髄膜炎などの重症侵襲性致死性肺炎球菌感染症における後遺症例の増加など臨床上の大きな問題となっている。これら肺炎球菌の薬剤耐性化に伴う処々の問題に対しては、従来の抗菌薬治療のみに頼る対策では限界があり、今後は長期視点に立った肺炎球菌感染症の予防法の確立す

なわちワクチンによる肺炎球菌感染症の予防が望まれる。肺炎球菌感染が成立する第一段階は、鼻咽腔への本細菌の生着であり、ワクチンによる肺炎球菌感染症の予防を考える場合、全身的な感染予防のみでなく、鼻咽腔局所での肺炎球菌の生着とコロニー形成の予防が重要となる。現在までに臨床応用がなされている肺炎球菌ワクチンとしては、肺炎球菌の莢膜多糖体抗原を用いた23価多価コンポーネントワクチンが用いられ、成人における肺炎球菌性肺炎の予防に効果が認められている。一方、莢膜多糖体抗原は、免疫原性が低いことに加えて、T細胞非依存性抗原であることから、有効な免疫学的メモリーが得られないため、幼児に対する有効性が低いことが問題とされる。このような多糖体抗原のもつ弱点を克服し、T細胞依存性抗原とするためにジフテリア毒素を中心とした蛋白結合型ワクチンの開発がなされており、すでに7価の蛋白結合型莢膜多糖体抗原ワクチンの臨床応用がなされている。しかし、この蛋白結合型ワクチンにおいても、肺炎などの全身性感染症の予防には有効であるが、肺炎球菌の鼻咽腔での保菌に対する予防効果は低い。近年では、10価のインフルエンザ菌Protein Dを用いた蛋白結合型ワクチンの急性中炎に対する予防効果が報告されている。しかし、これらの莢膜多糖体抗原ワクチンの急性中耳炎に対する予防効果を検討した報告では、ワクチンに含まれる血清型による急性中耳炎の予防効果は認めるものの、非ワクチン型の血清型による急性中耳炎への菌交代現象が見られている。以上のことから、肺炎球菌ワクチンの開発には、本細菌の持つタンパク抗原を用いたワクチンの開発に期待が寄せられている。肺炎球菌表面タンパク抗原：Pneumococcal

surface protein (PspA)は、抗原性が大きく3つ(PspA family: PspA1, PspA2, PspA3)に分類されるとともに肺炎球菌に共通して存在する。また、本抗原に対する血清学的反応が交差反応性を示すことより次世代の肺炎球菌ワクチン抗原として注目される。

2. 研究の目的

PspAによる肺炎球菌ワクチン開発を視野に入れ、非侵襲性感染症である急性中耳炎と侵襲性致死性感染症である髄膜炎より分離された肺炎球菌において、本邦における肺炎球菌のPspA familyの分布について検討する。また、PspAによるワクチン予防の可能性について、健常児および急性中耳炎患児において、血清中のPspAに対する免疫応答について検討する。

3. 研究の方法

BALB/cマウス(4週齢、メス)にコレラトキシンをアジュバントとしてPspAを経鼻的に2回(月曜および金曜)3週間免疫を行った。初めの2週間はコレラトキシンを併用して最後の1週間はPspAのみで免疫を行った。コントロール群は初めの2週間はコレラトキシンのみで点鼻を行い、最後の1週間は生理食塩水のみを点鼻した。最終免疫後免疫されたメスマウスはオスマウスと交配して新生児マウスを得た。(Fig. 1)マウスはグループA:PspA免疫母マウスがその新生児マウスを母乳栄養、グループB:PspA免疫母マウスが免疫されていない母マウスから生まれた新生児マウスを栄養、グループC:PspAで免疫されなかった母マウスがPspA免疫母マウスから生まれた新生児を栄養、グループD:PspAで免疫されなかった母マウスがPspAで免疫されていない母マウスから生まれた児を栄養。と4群に分けられた。(Fig. 2)経鼻免疫後の母マウスおよび新生児マウスへのPspA特異的抗体の誘導を検討するとともに、新生児マウス生後7日目に肺炎球菌TIGR4(血清型4型)を経鼻接種させ、鼻咽腔定着の予防効果の検討を行った。

Fig. 1. Maternal intranasal immunization with PspA and CTB

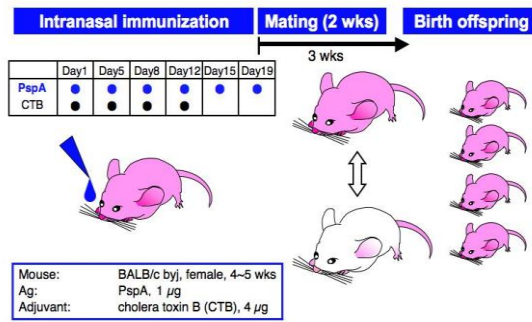
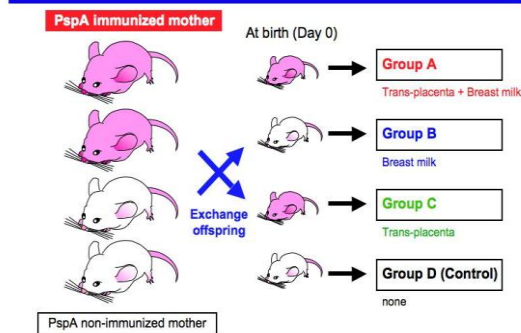


Fig. 2. Changes of anti-PspA IgG in sera by feeding status



4. 研究成果

PspA 免疫マウスから生まれた児の血清中抗PspA特異的IgG抗体は出生直後から高値を示した。一方 PspA で免疫されなかったマウスから生まれた児は血清中に抗 PspA 特異的は認めなかった (Fig. 3)。

PspA 母体経鼻免疫により、母マウス母乳および血清、仔マウスの血清中に抗 PspA 特異的 IgG4 が誘導された (Fig. 4) が免疫されていないマウスの血清中、母乳には検出されなかった。PspA 母体経鼻免疫マウスから生まれた仔マウスは出生時から血清中に抗 PspA 特異的 IgG 抗体を検出した。(Fig. 5) しかしグループ A の抗 PspA 特異的 IgG 抗体は出生後 14 日まで高値を維持するのにたいしてグループ C は出生後低下した。

また、PspA 母体経鼻免疫群の仔マウスは、コントロール群に比べて鼻腔への肺炎球菌のコロニー形成は有意に低下していた。鼻

Fig. 3. Anti-PspA antibodies in mother's sera

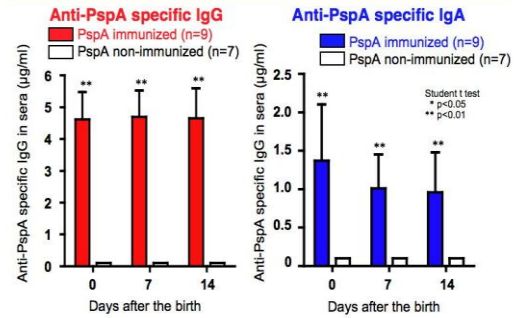


Fig. 4. Anti-PspA antibodies in mother's breast milk

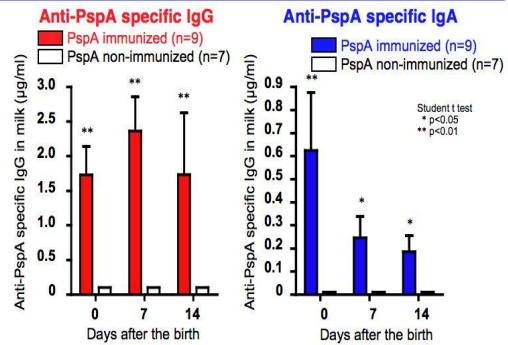
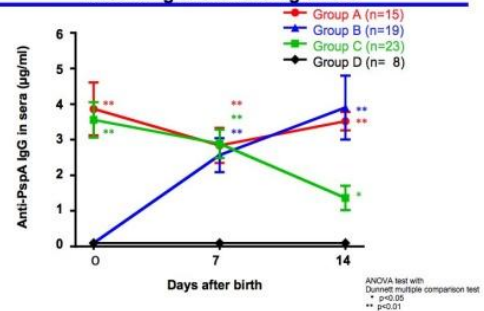


Fig. 5. Changes of anti-PspA IgG in sera according to the feeding status



腔洗浄液中の肺炎球菌の CFU は各群間で差を認めなかった (Fig. 6) が鼻腔組織中の肺炎球菌 CFU での検討ではグループ A でコントロール (グループ D) より有意に低値を示し ($p < 0.05$)、グループ B はコントロールより低い傾向を示したが ($p < 0.1$) グループ C はコントロールと差を認めなかった (Fig. 7)。仔マウスの肺組織をホモジネートし肺炎球菌の CFU はグループ A ($p < 0.05$)、B ($p < 0.01$)、C ($p < 0.05$)、ともにコントロールよりも有意に低値を示した (Fig. 8)。肺炎球菌感染後の仔マウスの生存率を評価すると、グループ A、B、C、の生存率は

コントロールより有意に延長した (Fig. 9)。同様に肺炎球菌血清型 2 の D39 を感染させてもグループ A、B、C、の生存率はコントロールより有意に延長した (Fig. 10)。

Fig. 6. Inhibition of pneumococcal carriage in nasal wash by maternal intranasal immunization with PspA and CTB

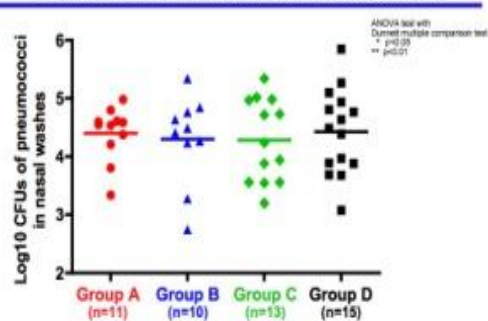


Fig. 7. Inhibition of pneumococcal carriage in nasal tissue by maternal intranasal immunization with PspA and CTB

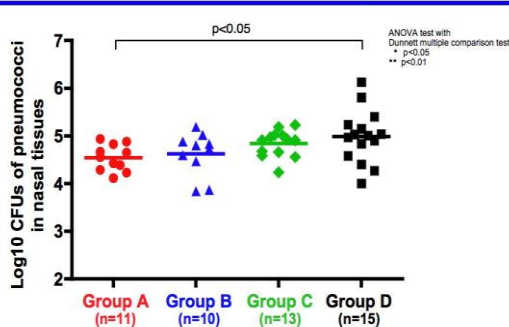
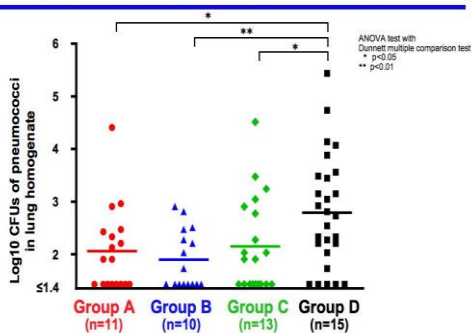


Fig. 8. Inhibition of pneumococcal infections in lung homogenate by maternal intranasal immunization with PspA and CTB



母体の経鼻ワクチン接種は児の肺炎球菌感染予防に有用であり、その他の肺炎球菌の血清型の感染に対しても免疫されると思われる。

Fig. 9. Survival of mice after fetal systemic pneumococcal infection by maternal intranasal immunization with PspA and CTB

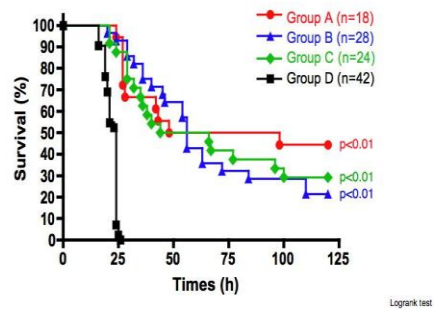
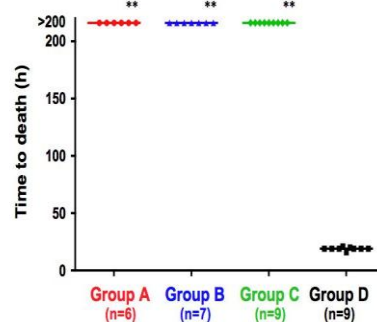


Fig. 10. Survival of mice after fetal systemic infections with D39 by maternal intranasal immunization with PspA and CTB



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Katsurahara T, Hotomi M, Yamauchi K, Billal DS, Yamanaka N; Protection against systemic fatal pneumococcal infection by maternal intranasal immunization with pneumococcal surface protein A (PspA). *J Infect chemother.* 2008;Dec 14(6):393-8. Epub 2008 Dec 17.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒井 章博 (SAKAI AKIHIRO)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員
研究者番号：50423950

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(7) ○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計10件)

- ① 学振太郎、半蔵門一郎、学振花子、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無
- ② 学振太郎、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無
- ③ 学振花子、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無

〔学会発表〕(計5件)

- ①
- ②
- ③

〔図書〕(計2件)

- ①
- ②

[産業財産権]

○出願状況 (計□件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計◇件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

http://○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○

6. 研究組織

(1) 研究代表者

学振 太郎 (GAKUSHIN TARO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：

(2) 研究分担者

学振 花子 (GAKUSHIN HANAKO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：

学振 次郎 (GAKUSHIN JIRO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：

学振 三郎 (GAKUSHIN SABURO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：

(3) 連携研究者

学振 四郎 (GAKUSHIN SHIRO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：