

令和元年6月21日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15690

研究課題名(和文)肺炎球菌の宿主間の伝播におけるボトルネック効果の解明

研究課題名(英文)Single cell bottleneck in the pneumococcal transmission between host and host

研究代表者

河野 正充 (Kono, Masamitsu)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：20511570

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：肺炎球菌の保菌が成立するためには保菌者から新たな宿主へ伝播することが必要であることに着目し、仔マウスを用いた宿主間伝播モデルを確立した。これまでの研究において肺炎球菌の兄弟間伝播の過程において強いボトルネック効果が存在することを見出した。本研究において、肺炎球菌の宿主間伝播におけるボトルネック効果を調節する重要な因子であると考えられている鼻腔から体外への排菌量と宿主自然免疫との関連をToll-like receptor (TLR)を中心に検討し、病原微生物の核酸成分を認識するTLR3、TLR7/8およびTLR9の刺激がボトルネック効果を調節する宿主側の因子として重要であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在蛋白結合型肺炎球菌ワクチンは世界的に普及しているが、鼻咽腔における保菌に対する予防効果は低く、依然として急性中耳炎を主とした上気道感染症では肺炎球菌が主要な原因菌の一つとなっている。本研究は保菌が成立するために必要な宿主間伝播の機序の解明と伝播予防に関する基礎的知見を得るものであった。すなわち、宿主間伝播に存在する強いボトルネック効果を調節する宿主側の因子として病原微生物の核酸を認識するTLRシグナルが重要であり、乳幼児期にも存在する自然免疫の調節が伝播を予防する戦略の一つとして重要であることが示された。

研究成果の概要(英文)：To investigate a mechanism of host to host transmission, a critical event for establishing pneumococcal colonization in the nasopharynx, an infant mouse model was introduced. We have demonstrated a tight population bottleneck effect during a transmission event among infant siblings.

In this project, host innate immunity were evaluated as one of factors regulating a pneumococcal transmission event. TLR3, TLR7/8 and TLR9 signaling were important which significantly increase the number of bacteria shed from infected host which is critical factor for promoting host to host transmission.

研究分野：感染免疫

キーワード：肺炎球菌 宿主間伝播 Toll様受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肺炎球菌は、無症候性にヒトの鼻咽腔に細菌叢を形成するのみでなく、乳幼児などの免疫学的未成熟者において、様々な部位に侵入し、急性中耳炎、肺炎、菌血症、髄膜炎などを引き起こす。蛋白結合型肺炎球菌ワクチンが臨床導入されてから、肺炎球菌感染症の減少が報告される一方で、非ワクチン血清型の肺炎球菌感染症の増加が報告されている (DiNubile MJ. Lancet. 2012)。さらに蛋白結合型荚膜ワクチンは、肺炎球菌感染症が多くみられる 2 歳未満の乳幼児における免疫誘導が不十分である。肺炎球菌は、生後数ヶ月以内に新生児の鼻咽腔に定着するが、Roche らは新生児マウスモデルにおいて、肺炎球菌の鼻咽腔定着後に抗体誘導を行っても、十分な除菌効果が得られないことを報告している。(Roche AM, et al. Mucosal Immunology. 2015)このことは、肺炎球菌は、免疫応答が非常に未熟な新生児期に鼻咽腔への定着を開始しており、現行のワクチン接種のみでは鼻咽腔の保菌を十分に予防することは難しいことを示唆する。以上のことから、肺炎球菌感染症予防における問題点として、1) 90 種以上の血清型を有する肺炎球菌の遺伝的多様性、2) 生後早期に起こる肺炎球菌の鼻咽腔定着防止の難しさが挙げられる。なかでも、肺炎球菌の生後早期における鼻咽腔定着のメカニズムの解明と防御策の確立が急務である。

### 2. 研究の目的

肺炎球菌の伝播の過程は、鼻咽腔における炎症誘導による鼻汁中への排菌(exit)、濃厚接触による新たな宿主の鼻咽腔への到達(entry)、新たな宿主の鼻咽腔への定着と増殖(establishment)に分類できる。Richard らはインフルエンザウイルス重感染によって、鼻汁中への肺炎球菌の排菌が増加した結果、兄弟間での伝播が促進されることを報告している(Richard AL, et al. PLoS Pathog. 2015)。本研究では、肺炎球菌が宿主の鼻咽腔から体外に排菌され、新たな宿主の鼻咽腔へと定着するメカニズムを解明する。なかでも、肺炎球菌伝播の過程に存在するボトルネック効果の機序について、宿主の自然免疫の関与を解明する。本研究は、これらの結果を基礎にさらに発展させ、細菌およびウイルスの特定の構造物を認識する TLR (TLR2, TLR3, TLR4, TLR7/8, TLR9)の刺激による鼻汁中の排菌量を検討するとともに、新生児マウスの兄弟間伝播モデルに TLR 作動薬および各 TLR ノックアウトマウスを導入することで、TLR を介した刺激が宿主間伝播におけるボトルネック効果に關与する機序を解明する。

### 3. 研究の方法

#### 仔マウスを用いた肺炎球菌鼻腔保菌モデルの作成

日齢 4 の仔マウス (C57BL/6J) に肺炎球菌 6A 臨床分離株を経鼻接種した。日齢 8~12 においてマウスの前鼻孔の肺炎球菌を寒天培地に採取し、鼻汁中への排菌量を連日測定した。最後に日齢 12 に仔マウスを安楽死させ、鼻腔洗浄液を採取し、鼻腔保菌量を測定した。

#### 肺炎球菌の鼻咽腔保菌量および排菌量に及ぼす宿主自然免疫の役割の検討

##### ・TLR 作動薬を用いた肺炎球菌の鼻腔保菌及び排菌実験

病原微生物の特異的分子構造 (PAMPs) を認識し炎症反応を誘導する TLR シグナルが宿主鼻咽腔からの排菌と伝播におけるボトルネック効果に及ぼす影響を検討した。とりわけ獲得免疫が構築されていない新生児における TLRs の役割に着目し、肺炎球菌伝播モデルを用い以下の TLR アゴニストを日齢 8~11 日に連日経鼻接種し宿主からの排菌量および鼻腔保菌量の変化を観察した。TLR アゴニスト:

TLR2 (Pam3CSK4), TLR3 (polyI:C), TLR4 (LPS), TLR7/8 (R848), TLR9 (ODN2395)

##### ・TLR KO マウスを用いた肺炎球菌の鼻腔保菌及び排菌実験

TLR (TLR3, TLR7, TLR9)のシグナルを抑制することによる宿主鼻咽腔の保菌量および排菌量への影響を TLR KO マウスを用いた肺炎球菌伝播モデルにより検討した。すなわち、各 TLR KO マウスに日齢 4 において肺炎球菌を経鼻接種し、日齢 12 の鼻咽腔における保菌量、および日齢 8~12 における鼻汁中への排菌量を計測した。

### 4. 研究成果

#### ・肺炎球菌鼻腔保菌モデル

日齢 8~12 において野生型仔マウスの前鼻孔から 200CFU (colony forming unit) 前後の安定した排菌を認めた。また全ての仔マウスにおいて日齢 12 に肺炎球菌の鼻腔定着を確認した。

#### ・TLR 作動薬を用いた肺炎球菌の鼻腔保菌及び排菌実験

Pam3CSK, LPS 刺激を行った仔マウスでは鼻腔保菌量および鼻汁中への排菌量は低下した。一方で、polyI:C, R848, ODN2395 にて刺激を行った仔マウスでは鼻腔保菌量の有意な変化は認めなかったが、鼻汁中への排菌量は増加した。

#### ・TLR KO マウスを用いた肺炎球菌の鼻腔保菌及び排菌実験

TLR3 KO マウス、TLR7 KO マウス、TLR9 KO マウスを使用した。各 TLR KO マウスの鼻腔保菌量は野生型マウスと比較して、有意な変化を認めなかった (図 1)。一方で、鼻汁中の排菌量は TLR3 KO マウスおよび TLR9 KO マウスでは有意な減少を認めた (図 2)。

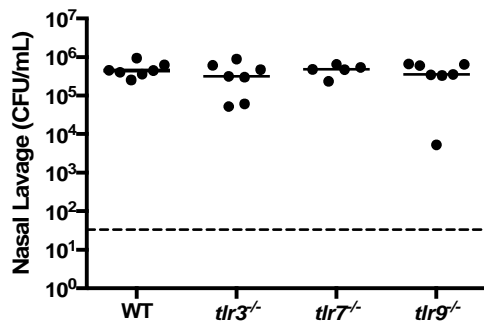


図 1

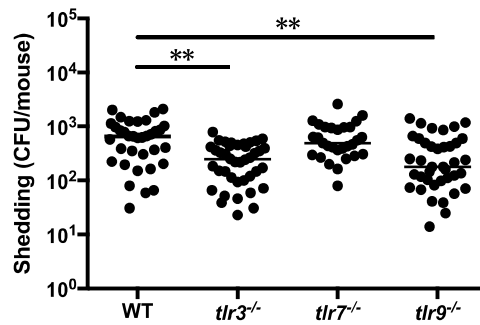


図 2

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

河野正充、インフルエンザウイルス重感染による肺炎球菌の宿主間伝播促進における宿主の局所炎症反応の役割について、第 5 回日本耳鼻咽喉科感染症エアロゾル学会、2017

河野正充、仔マウスを用いた肺炎球菌の兄弟間伝播モデルの確立とボトルネック効果の検討、第 70 回日本細菌学会関西支部総会、2017

河野正充、インフルエンザウイルス重感染による肺炎球菌の宿主間伝播促進における宿主自然免疫の役割について、第 66 回日本化学療法学会西日本支部総会、2018

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年：  
 国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年：  
 国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2)研究協力者  
研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。