

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460546

研究課題名(和文) 新たな百日咳起因菌 *Bordetella holmesii* に対する宿主免疫応答研究課題名(英文) Protective immunity against *Bordetella holmesii*

研究代表者

渡辺 峰雄 (Watanabe, Mineo)

北里大学・大学院感染制御科学府・准教授

研究者番号：40279245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：*Bordetella holmesii*は百日咳の起因菌であるが、従来のワクチンはこの菌に対して無効である。欧米諸国だけでなく、我が国においても発生が見られ、有効なワクチンの開発が必須となっている。本研究では、*B. holmesii*に対して有効な試作ワクチンを完成しその作用機構を明らかにした。さらにワクチンの感染防御抗原(有効成分)を特定し、より安全かつ有効なワクチンの開発を可能とした。

研究成果の概要(英文)：Pertussis (whooping cough) is a highly contagious respiratory disease caused by *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*. Recently, *Bordetella holmesii* has been mentioned as the third causative agent of pertussis. Epidemiological studies clearly suggested importance of control of *B. holmesii* infection in humans.

In this study, we developed effective vaccines against *B. holmesii* infection in a mouse model. Also, we determined a protective antigen of *B. holmesii*. Our results will help development of modified pertussis vaccines that are effective to all causative agents of pertussis.

研究分野：病原細菌学、ワクチン学

キーワード：ワクチン 百日咳 病原性 *Bordetella* 再興感染症 新興感染症 小児 呼吸器

1. 研究開始当初の背景

百日咳は咳嗽発作を主訴とする感染症であり、主に百日咳菌によって引き起こされる。近年、ワクチン高接種率国において百日咳の再興が報告され、その制御は困難を極めている。このため百日咳は「ワクチンがあるのに制御できない感染症」と評されている¹。

そのような状況下、百日咳菌の近縁菌である *Bordetella holmesii* が百日咳を引き起こすことが明らかとなった。国内では宮崎、大阪をはじめとした散発例が検出され、*B. holmesii* に対する速やかな対応が求められている²⁻⁴。

我々は、マウス気道感染実験系が *B. holmesii* の感染免疫解析に使用できることを明らかにした。また、この系を使用して国内メーカー全ての百日咳ワクチンが *B. holmesii* に対して無効であることを報告した⁵。この結果は、百日咳菌と *B. holmesii* は同様の疾患を起こすものの、免疫学的に大きく異なることを示唆していた。

2. 研究の目的

B. holmesii 試作ワクチンの接種によって誘導される免疫を解析し、*B. holmesii* に対する感染防御免疫の作用機構を明らかにする。また、ワクチンの有効成分となる特異抗原を特定する。

3. 研究の方法

(1) ワクチンの調製

沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチンは国内メーカー全社のものを購入して使用した。

百日咳菌および *B. holmesii* 全菌体ワクチンは、スタイナーション液体培地で培養した菌体を集菌し、ホルマリン不活化して調製した。

B. holmesii 無細胞ワクチンは、上記同様の液体培養で得られた培養上清を原料とした。培養上清を濃縮しホルマリン不活化の後、アジュバントを加えて作製した。

(2) マウス気道感染実験モデル

3.5 週齢の BALB/c マウスに、ワクチンを二週間間隔で二回接種した。最終免疫から二週間後に、麻酔下で *B. holmesii* を経鼻感染させた。経鼻感染から 2 時間、1 日、2 日、または 3 日後に肺を摘出し、*B. holmesii* 生菌数を算定した。ワクチン無接種群の肺内生菌数に比べ、肺内生菌数が統計学的に有意に少ない場合、当該ワクチンは有効であると判定した。

(3) 抗体価の測定

麻酔下のマウスから採血し、血清を調製した。得られた血清の *B. holmesii* ライセートに対する抗体価を Enzyme-linked

immunosorbent assay (ELISA) 法で測定した。

(4) 養子免疫移入実験

前述(2)と同様に免疫したマウスから血清および脾細胞を調製した。レシピエントマウス (BALB/c, 8 週齢) にそれらの血清または脾細胞を移入(移植)し、その1日後に *B. holmesii* を経鼻感染した。肺内生菌数の推移を確認し、対照群(無免疫マウスの血清または脾臓を移入した群)に比べて統計学的に低値を示した場合、感染防御免疫が成立したと見なした。

(5) イムノプロテオミクス解析

B. holmesii の培養上清を二次元電気泳動で分離し、PVDF 膜へ電氣的に転写した。*B. holmesii* に対する感染防御免疫を確認したマウスの血清で膜を染色し、認識されるタンパク質スポットを確認した。対応するスポットをポリアクリルアミドゲルから切り出し、MALDI-TOF-MS 解析を行ってタンパク質の特定を行った。

(6) 感染防御抗原欠損株の作製

相同組み換え法によって、*B. holmesii* の感染防御抗原遺伝子を破壊し、欠損株を作製した。

4. 研究成果

(1) *B. holmesii* から調製したワクチンの効果

国内市販ワクチン、百日咳菌全菌体ワクチン、および *B. holmesii* 全菌体ワクチンをマウスに接種し、その後 *B. holmesii* 生菌を感染させて感染防御免疫の誘導を調べた。その結果、*B. holmesii* の全菌体または培養上清から試作したワクチンは、*B. holmesii* に対する有効性を示した。しかし国内市販ワクチンと百日咳菌全菌体ワクチンは *B. holmesii* に対して無効であった。

一方、ワクチン接種後に百日咳菌を感染させ、百日咳菌に対する各ワクチンの効果を調べたところ、市販ワクチンおよび百日咳菌全菌体ワクチンは有効性を示したが、*B. holmesii* から調製したワクチンは無効であった。

これらのことから、百日咳菌と *B. holmesii* は同様の疾患をひき起こすが、免疫学的に大きく異なり、免疫学的な交差性を有さないことが示された。両菌に対して有効なワクチンを開発する場合は両菌由来の抗原を混合したワクチンにする必要があると考えられる。

(2) *B. holmesii* に対する感染防御免疫の解析

B. holmesii 全菌体ワクチンを接種したマウスから血清を調製し、*B. holmesii* 特異抗体を定量した。*B. holmesii* ライセートをブ

レートに固相化し、ELISA法を用いて総IgG、IgG1サブクラス、IgG2aサブクラスの抗体価を測定した。その結果、総IgGおよびIgG1サブクラスの*B. holmesii*特異抗体価が高値を示し、それらの値は感染防御と相関した。一方、IgG2aサブクラスの特異抗体価は低く、感染防御と相関しなかった。これらのことから*B. holmesii*全菌体ワクチンによって誘導される有効な感染防御免疫はTh2指向性であると考えられた。

養子免疫移入実験を行ったところ、免疫血清を移入した場合、レシピエントマウスに感染防御が誘導された。これは*B. holmesii*に対する感染防御免疫が血清抗体依存的である事を示すと考えられた。一方、脾細胞を移入した場合は感染防御が成立せず、*B. holmesii*に対する感染防御免疫では、細胞性免疫の関与は少ないと予測された。

(3) 感染防御抗原の特定

*B. holmesii*に対する感染防御が血清抗体依存的である事が明らかとなったため、*B. holmesii*に対する感染防御が成立したマウスから血清を調製し、それが認識する抗原の特定を行った。

*B. holmesii*の可溶性菌体および培養上清を二次元電気泳動で展開し、PVDF膜へ電気的に転写した。その後、上記血清を使用して染色したところ、複数のタンパク質スポットが染色された。ポリアクリルアミドゲル上の対応したタンパク質を切り出し、MALDI-TOF-MS解析を行ったところ、すべてのスポットが同一のタンパク質由来であった(本報告書では仮に*Bordetella holmesii* antigen, BHAと呼称)。

BHAの精製および組み換えBHAの作製を試みたが、BHAは非常に不安定であり、研究実施期間中に成し遂げることは出来なかった。そこで*B. holmesii*のBHA欠損株を構築し、同欠損株の培養上清から無細胞ワクチンを調製し、このワクチンの効果を親株から調製したワクチンと比較したところ、親株(BHA発現株)から調製したワクチンは有効性を示す一方、BHA欠損株から調製したワクチンは感染防御効果をまったく示さなかった。

この結果から、BHAは*B. holmesii*の主要な感染防御抗原である可能性が示唆された。

(4) 統括

以上の結果から、現行ワクチンに*B. holmesii*のBHAを混合する事で、百日咳菌だけでなく*B. holmesii*に対しても有効なワクチンを開発できる可能性が示された。BHAは毒素活性を有さず、人体用ワクチンへの適用におけるハードルは高くない。

我々は今後、BHAの大量精製法を開発し、改良百日咳ワクチンの実用化へ寄与していく予定である。

<引用文献>

VanGent (2012) PLoS One 7(9): e464075.
Njamkepo (2011) JCM 49: 4347.
Kamiya (2012) EID 18(7):1166.
Katsukawa (2013) J Infect Chemo 19(3): 534.
渡邊 (2012) 第16回ワクチン学会学術集会.

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0件)

現在2報を投稿し、査読中である。

[学会発表](計7件)

平松征洋, 齋藤桃子, 大塚菜緒, 渡邊峰雄, 柴山恵吾, 蒲地一成. BipA is an autoagglutination inhibitor required for biofilm formation in *Bordetella holmesii*. 第89回日本細菌学会総会. 2016/3/24. 大阪国際交流センター(大阪市淀川区).

齋藤桃子, 大塚菜緒, 蒲地一成, 渡邊峰雄. Protective effects of Vaccines against *Bordetella holmesii* in a Mouse Model of Respiratory Infection. 第89回日本細菌学会総会. 2016/3/23. 大阪国際交流センター(大阪市淀川区).

Saito M, Suzuki E, Yamaguchi T, Kamachi K, Watanabe M. Development of vaccines against *Bordetella holmesii* infection in a murine model of respiratory infection. 115th General meeting of American Society for Microbiology. 2015/6/2. New Orleans, LA (U.S.A.).

平松征洋, 大塚菜緒, 柴山恵吾, 鈴木英里, 渡邊峰雄, 蒲地一成. 百日咳類縁菌 *Bordetella holmesii* の自己凝集抑制因子 BipA に関する研究. 第88回日本細菌学会総会. 2015/3/26. 長良川国際会議場(岐阜県岐阜市).

山口哲矢, 鈴木英里, 大塚菜緒, 蒲地一成, 渡邊峰雄. *Bordetella holmesii* に対する無細胞ワクチンの開発. 第87回日本細菌学会総会. 2014/3/27. タワーホール船堀(東京都江戸川区).

Watanabe M, Suzuki E, Saito M, Yamaguchi T. Unsolved problems in pertussis control. 12th Japan-Korea International Symposium on Microbiology. 2014/3/25. Tower hall Funabori (Edogawa-ku, Tokyo).

山口哲矢, 渡邊峰雄. 国内で分離された *Bordetella holmesii* に対する百日咳ワクチンの効果. 第26回北里大学バイオサイエンスフォーラム. 2013/8/8. 北里大学(相模原市).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.facebook.com/WatanabeLab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 峰雄 (WATANABE, Mineo)

北里大学・大学院感染制御科学府・准教授

研究者番号： 40279245

(2) 研究分担者

蒲地 一成 (KAMACHI, Kazunari)

国立感染症研究所・細菌第二部・室長

研究者番号： 10260275

(3) 研究協力者

鈴木 英里 (SUZUKI, Eri)

(4) 研究協力者

齋藤 桃子 (SAITO, Momoko)

(5) 研究協力者

山口 哲矢 (YAMAGUCHI, Tetsuya)