

第10回臨床試験指導者制度講習会講演抄録

日 時: 平成12年10月7日(上) 15:20~17:00
場 所: 旭川グランドホテル

※この講習会は第47回日本化学療法学会東日本支部総会の【シンポジウム2】に該当しました(図表は投稿規定外と致しました)。

「感染症と粘膜免疫:将来への展望」

司会のことば

嶋田 甚五郎

聖マリアンナ医科大学微生物学

佐藤 昇志

札幌医科大学医学部第1病理

ヒトの粘膜内腔の表面積は広大である。たとえば胃腸管内腔や気道粘膜のそれらは、ともにテニスコートの広さに匹敵するといわれている。これらの粘膜は日々体外環境と接しているわけであり、粘膜における免疫学的機構は生体の恒常性を保持すべく免疫学的寛容や活性化の両側面が巧妙に分子レベルで制御されているはずである。また、粘膜免疫は当然のことながら第一線の生体防御システムのひとつとしてきわめて重要であることはいまさらいうまでもなく、ここに感染免疫との四六時中の

接点がある。実際、急速な免疫学の進歩は粘膜局所で、免疫学的な独自の寛容と活性化機序が巧妙に制御されていることを明らかにしつつある。

本シンポジウムでは以上のような観点から4人の演者に最近の知見を発表していただき、感染免疫と粘膜免疫の相関、および近年明らかにされてきた分子機序をクローズアップし、さまざまな臨床応用の展望もあわせて行ってみた。

粘膜免疫とその臨床への展望

清野 宏

大阪大学微生物病研究所免疫・生体防御研究部門免疫化学分野

粘膜免疫システムは厳しく変化する体外環境から第一線のバリアとして体内環境を守り、生体の免疫学的恒常性をコントロールする免疫機構の根幹といっても過言ではない。近年、粘膜免疫を誘導制御するシステムの詳細が特定遺伝子発現または欠損動物モデルを駆使することで明らかになってきている。特に上皮細胞、粘膜系T細胞群、抗原提示細胞、IgA前駆B細胞が構成するダイナミックな粘膜細胞間イントラネットがその中心的役割を担っている。このシステムを基本として考えられている粘膜ワクチンは病原微生物の侵入門戸である粘膜面と末梢系免疫システムの両方に感染防御免疫を誘導することができる¹⁾。現在までは腸管免疫機構の詳細な解析とその経口ワクチン開発への応用性の検討が進められてきた。たとえば、GALTに総称される腸管関連リンパ組織を中心としたIgA誘導のための循環帰巢経路(CMIS)と呼ばれるIgA誘導系を駆使した感染防止免疫の誘導である²⁾。最近、われわれはCMISに依存していないCMIS独立型のIgA誘導機構の存在についても明らかにしている^{3,4)}。これは粘膜面で働くIgA誘導にあたって2つのシステムが働いていることを示唆している。また、呼吸器粘膜免疫システムにも注目し、その中心的役割を果たす鼻咽頭関連リンパ組織(NALT)の免疫生物学的検討とそれを応用した経鼻ワクチンの可能性について研究を進めている⁵⁻⁷⁾。病原微生物由来のタンパク抗原を新規粘膜アジュバントとして期待されている無害化コレラ毒素(mCT)と混合して経鼻免疫すると効果的に抗原特異的Th2型細胞とIgA産生細胞が粘膜面に誘導される⁸⁻¹⁰⁾。たとえば、肺炎球菌の共通抗原として注目を浴びているPspAとmCTの混合ワクチンを経鼻投与すると粘膜系と全身系にPspA特異的免疫応答が誘導された。さらに、肺炎球菌感染防止効果のある抗原特異的免疫応答が経鼻免疫により惹起された。粘膜免疫用ハイブリッドワクチンデリバリーシステムとして、最近、注目されている膜融合型リポソームにワクチン抗原を封入して経鼻免疫すると効果的に生殖器を含めた粘膜免疫系と全身免疫系両方にワクチン抗原特異的免疫応答の誘導が確認された。これらの結果は、NALT免疫システムを使った経鼻ワクチン開発に向けて貴重な情報を提供している。

文 献

- 1) Kiyono H, Ogra P L, McGhee J R (eds): Mucosal vaccines, pp.1~479, Academic Press, San Diego, 1996
- 2) McGhee J R, Kiyono H: The Mucosal immune system. In: Fundamental Immunology 4th Edition, Paul W E (ed), Lippincott-Raven Press, Philadelphia pp.909~945, 1999
- 3) Hiroi T, Yanagita M, Iijima H, et al.: Deficiency of IL-5 receptor α chain selectively influences on the development of the common mucosal immune system independent IgA producing B-1 cells in mucosal-associated tissues. J. Immunol. 162: 821~828, 1999
- 4) Hiroi T, Yanagita M, Ohta N, et al.: Interleukin 15 and IL-15 R selectively regulate differentiation of common mucosal immune system-independent B-1 cells for IgA responses. J. Immunol. 165: 4329~4337, 2000
- 5) Hiroi T, Iwatani K, Iijima K, et al.: Nasal immune system: Distinctive Th 0 and Th 1 Th 2 type environments in murine nasal associated lymphoid tissues and nasal passage, respectively. Eur. J. Immunol. 28: 3346~3353, 1998
- 6) Yanagita M, Hiroi T, Kitagaki N, et al.: Nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissue (NALT) immunity: fimbriae-specific Th 1 and Th 2 cell-regulated IgA responses for the inhibition of bacterial attachment to epithelial cells and subsequent inflammatory cytokine production. J. Immunol. 162: 3559~3565, 1999
- 7) Kurono Y, Yamamoto M, Fujihashi K, et al.: Nasal immunization induces *Haemophilus influenzae*-specific Th 1 and Th 2 responses with mucosal IgA and systemic IgG antibodies for protective immunity. J. Infect. Dis. 180: 122~132, 1999
- 8) Yamamoto S, Kiyono H, Yamamoto M, et al.: A nontoxic mutant cholera toxin elicits Th 2-type responses for enhanced mucosal immunity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 5267~5272, 1997
- 9) Yamamoto M, Briles D E, Yamamoto S, et al.: A nontoxic adjuvant for mucosal immunity to pneumococcal surface protein A. J. Immunol. 161: 4115~4121, 1998
- 10) Saito M, Otake S, Ohmura M, et al.: Protective immunity to *Streptococcus mutans* induced by nasal vaccination with surface protein antigen and mutant cholera toxin adjuvant. J. Infect. Dis. (in press), 2001

呼吸器領域

高橋 洋

東北大学加齢医学研究所呼吸器腫瘍研究分野

I. はじめに

呼吸器感染症に対する宿主側の広義の感染防御機構としては、粘液繊毛運動や嚥下反射、口腔～上気道の常在細菌叢、各種オプソニン蛋白、ラクトフェリン、補体系、食細胞、さらには液性免疫、細胞性免疫など多彩な要素が含まれるが、感染の急性期にはこれらの各種因子は相互に影響をおよぼし合うと同時に TNF, IL-1 などの炎症性サイトカインによる制御を受けているものと考えられる (Table 1)。これらの感染防御機構に何らかの障害や欠損が生じれば宿主の易感性が惹起されることになるが、われわれ呼吸器科医が臨床の場で日常的に出会う反復性呼吸器感染症例においては、これらの感染防御機構には一見して明らかな異常を認めないにもかかわらず気道感染を繰り返す患者がむしろ多数を占めている。このような原因不明の繰り返し感染症、難治性感染症における背景因子として、近年では宿主の易感性に影響をおよぼす可能性のあるさまざまな遺伝子多型が見いだされ、解析が進められている (Table 2)。呼吸器領域においては、感染刺激に対するサイトカインの過剰産生を惹起する TNF- α プロモーター多型、IgG2 と食細胞上の Fc γ R IIa 多型などが潜在的な易感性因子として近年注目されてきている。

innate immunity の重要な構成因子のひとつである mannose-binding lectin (MBL) は、微生物表面のマノースおよび N-アセチルグルコサミンを直接認識してオプソニン活性および補体活性化能を発揮する急性相

蛋白である。この MBL は補体成分 C1q とよく似た構造を有しており、同じく構造的に類似した Ca 依存性の C 型レクチンである SP-A や SP-D とともにいわゆるコレクチンファミリーに分類されている。この MBL が認識する病原体は一般細菌の他にも抗酸菌、真菌、ウイルスなど非常に広汎である (Table 3)。

MBL を構成する個々のサブユニットの分子量は 32 kDa であり、Cystein-rich domain, Collagen domain, Neck domain, Carbohydrate recognition domain の 4 つのドメインから構成されている。このサブユニットがジスルフィド結合によって結合した 3 量体構造が基本的な MBL の構造単位となるが、実際には MBL はさらに数個の構造単位がジスルフィド結合によって結びついた 200~600 kDa の大きさのホモポリマーの形態で存在している (Table 4)。

この MBL の遺伝子上には collagen domain における Arg 52→Cys, Gly 54→Asp, Gly 57→Glu の 3 種類の variant が存在する。そのタイプおよび頻度は人種によりさまざまに異なり、たとえばアフリカ系で見いだされ

Table 1. 呼吸器系における広義の感染防御機構

- 物理的
 - ・粘液・繊毛輸送機構
 - ・口腔・上気道常在細菌叢
 - ・嚥下反射、咳反射
- 化学的
 - ・ラクトフェリン、トランスフェリン
 - ・サーファクタント、フィブロネクチン
 - ・補体系
- 細胞性因子
 - ・好中球、マクロファージ
 - ・NK 細胞
- 特異的防御機構
 - ・液性免疫: IgG, IgA, IgM
 - ・細胞性免疫: T 細胞
- サイトカインによる制御
 - ・TNF, IL-1, IFN など

Table 2. 宿主の易感性との関連が示唆される遺伝子多型

- TNF α -308 遺伝子多型, TNF β +250 遺伝子多型
感染刺激に対して TNF の過剰産生が誘導されやすいマラリア、敗血症、あるいは髄膜炎などの重症化/予後因子としての報告あり
- IL-1 RA 遺伝子多型
感染刺激時に IL-1 RA や IL-1 β の産生が強く誘導される重症敗血症の背景因子として有意であったとの報告あり
- Fc γ R IIa (=CD 32) 遺伝子多型
食細胞上の Fc γ R IIa 遺伝子上の 131 番のアミノ酸において His/Arg の SNP が報告されている
Arg 多型では IgG 2 が関与する菌のクリアランスが低下する小児の髄膜炎や敗血症併発の危険因子としての報告あり

Table 3. マノース結合レクチン: MBL(mannose-binding lectin)

- ヒトの自然免疫系における非特異的感染防御因子
- 肝由来の急性相蛋白
- 1978 年に発見
- 補体成分 C1q と類似した構造を有する
- 類似した基本構造を持つ SP-A や SP-D と共にコレクチンファミリーに分類
- マノースや N-アセチルグルコサミンなど微生物表面の糖鎖成分を直接認識・結合
- 一般細菌の他に抗酸菌、真菌、ウイルスなど広汎な菌種を認識する
- オプソニン活性および補体活性化能を有する

る多型は Gly 57→Glu が中心となるが、日本人を含むアジア系の場合には Gly 54→Asp が中心に見いだされ、またその頻度は人口の約 30% を占めることが報告されている。これらの variant においては、MBL は本来の 3 重らせん構造の形成が阻害されるため血中で早期に分解され、さらにはその補体活性化能も阻害されることから宿主の感染防御能は潜在的に低下する。

近年、この MBL における遺伝子多型が髄膜炎や肝炎などの各種感染症の発症背景因子として重要であることが種々の報告より明らかになり、さらには一部の感染性疾患においては発症の背景因子としてばかりでなく、早期からの発症、治療抵抗性、あるいは生命予後などに関与する重要な因子であることが徐々に解明されてきた (Table 5)。しかし呼吸器感染症領域における MBL の意義を解析した報告はまだ乏しいのが現状である。

II. 検討方法

われわれは、呼吸器感染症領域における MBL 遺伝子多型の意義に着目し、明らかな免疫異常や基礎疾患なしに気道感染を繰り返す反復性気道感染症例群における MBL 遺伝子多型の頻度、MBL 血中濃度、BALF 中の検出状況などの解析を試みた。

対象症例は 1995～2000 年に反復性呼吸器感染のために当科および関連病院を受診した患者のうちで成因不明の 34 例 (男/女:17/17, 20～80 歳) とした。これら症例の感染増悪時の主な起炎菌はいずれも *S. pneumoniae* や *H. influenzae* など一般的な市中感染症病原菌であった。陈旧性肺結核など先行する器質的疾患を有する症例は成因不明群には加えず、また解析を進めていく過程で低ガンマグロブリン血症などの明らかな易感染性因子の併発が判明した症例も成因不明群からは除外した。対照群としては 53 例の健常成人を選んで同様に MBL の遺伝子多型を検討した。また原因不明の反復感染群と比較するために統発性反復感染群 12 例 (慢性誤

嚥、低ガンマグロブリン血症、肺結核後遺症、重度肝硬変などに続発したと考えられる繰り返し感染症例)、および重症肺炎群 14 例における MBL 遺伝子多型の頻度も解析を試みた。

MBL 遺伝子多型の解析に関しては、各症例の全血ないし咽頭粘液から DNA を抽出し、MBL 遺伝子 Exon 1 の Codon 52, 54, 57 を含む 298 bp の断片を Polymerase chain reaction (PCR) を用いて増幅し、codon 54 部位を認識する制限酵素 *BanI* を用いた RFLP およびダイレクトシーケンス (一部) にて解析を試みた。また反復性呼吸器感染症例における血清 MBL 値は Sandwich ELISA 法を用いて測定した。

III. 検討結果

反復呼吸器感染群 34 例中における MBL 遺伝子多型の検出頻度は 34 例中の 22 例、64.7% を占め、健常対照群の 53 例中 17 例、32.1% と比較した場合明白に高値を示し、MBL 遺伝子多型の存在は本邦における原因不明の反復呼吸器感染症例の発症背景因子として有意と判断された。また一方では統発性反復感染群における頻度は 25.0%、重症肺炎群における頻度は 35.7% と、ともに健常対照群との間に有意差は認められなかった。

原因不明の反復呼吸器感染症例 34 例を MBL 遺伝子多型群 22 名と正常群 12 名とに分けてその病像を比較したところでは、MBL 遺伝子多型群の方ではより発症年齢が高く (34.1 歳/20.0 歳)、緑膿菌の気道定着率は低く (40.9%/66.7%)、副鼻腔炎の併発率も低値 (40.9%/58.3%)、また胸部レ線上的気管支拡張像の陽性率も低い (59.1%/83.3%) 傾向を示していた。MBL の血中濃度は健常群と比較して多型群において有意に低値を示していた。

IV. 考察

特別な持病はないが「気管が弱い」ためにしょっちゅう風邪をひく患者、一見健康そうだが病歴を聞くと何度も肺炎に罹患している患者など、われわれが日常臨床で稀ならず出会う反復性気道感染症例のなかにはその成因が

Table 4. MBL の基本構造と遺伝子多型

- 相同性な 3 つの subunit からなる 3 量体が MBL の基本的な構造単位
- 1 つの subunit は分子量で 32 kD で、以下の 4 つの Domain より構成される
Cysteine-rich Domain-Collagen Domain-Neck Domain-糖鎖認識 Domain
- この構造単位が 2～6 個ジスルフィド結合で結びついてホモポリマーを形成する (200～600 kDa)
- MBL 遺伝子の exon 1 の codon 52, 54, 57 には SNP が存在する
- 一般人口における MBL 遺伝子多型の頻度やタイプに関しては人種差が大きい
- アジアにおける MBL 遺伝子多型の頻度は codon 54 の variant が大部分で人口の約 30% を占める
日本人では codon 54 の variant のみが見いだされている
- この多型の存在下では MBL 本来の 3 重らせん構造の形成が阻害される
すなわち血中 MBL は早期に分解され、また補体化能も減弱する

Table 5. MBL 遺伝子多型による宿主の感染症感受性の報告例

- 感染症の発症背景/重症化因子として
髄膜炎、HIV 感染症、マラリア、小児の重症感染症、慢性 B 型肝炎など多数報告あり
- 感染症の早期発症因子として (Mullighan Scand J Immunol 2000)
小児の免疫不全症例では MBL 多型群は原疾患の発症が正常群より約 10 年早かった
- 感染症における治療抵抗性因子として (Matsushita Arch Virol 1998)
C 型肝炎症例の IFN への反応性が MBL 多型群において有意に不良だった
- 感染症における予後不良因子として (Garred JCI 1999)
Cystic Fibrosis 症例中では MBL 多型群は平均生存期間の予測値が正常群より 7 年間短かった

まだに明らかではないケースが多く残されている。本検討においてわれわれはそのような原因不明の反復気道感染例に焦点をあてて、近年髄膜炎や肝炎などの発症背景因子として注目されている MBL の遺伝子多型の解析を試みた。結果として MBL 遺伝子多型の頻度は成因不明の反復感染群においては一般健常人群、あるいは続発性の反復感染群と比較して有意に高値を示し、呼吸器領域においても MBL 遺伝子多型の存在はたしかに繰り返し感染の発症背景因子となっていることが示された。ただしこの MBL 遺伝子多型は健常人でも約 3 割に認められる高頻度なものであり、単独で易感染性を規定する特殊

な変異というよりは、むしろおそらく他の遺伝的素因や種々の環境因子などと重複することによってはじめて反復感染を惹起するひとつの易感染性素因と解釈すべきものであろう。

なお今回の検討では症例数が十分ではないため詳しい解析は加えなかったが、上述したように MBL 遺伝子多型は一部の感染症についてはたんなる発症背景因子のみならず、早期からの発症、治療に対する抵抗性、あるいは生命予後などに影響をおよぼす因子であることが示されており、これらの点に関しても今後症例数の集積とともに検討を加える予定である。

消化器領域（赤痢菌感染を中心に）

岡村 登

東京医科歯科大学医学部保健衛生学科病因検査学

I. はじめに

腸管感染症の病態に関与する微生物の病原因子の解析研究は分子遺伝学的技術の進歩とあいまって飛躍的に進歩しつつある。特に腸管毒素やその分泌機構、宿主組織への微生物の侵入増殖、また生体防御の機構をかいくぐって細菌が増殖できる能力など多くの病原性に関与する遺伝子群が単純化された実験系を用いることによって明らかにされている。しかし、赤痢、コレラ、感染型食中毒に見られる急性胃腸炎などの局所性の腸管感染では、宿主の生体防御を研究するための適切な実験動物モデルがなく、宿主の感染免疫、特に粘膜免疫についての知見は少ない。また多くの腸管感染症においては自然感染後の免疫は弱く、その効果も比較的短期である。

赤痢菌は腸管上皮細胞に侵入し、局所に炎症を起すが、全身性の感染はごくまれにしか起こさない。ボランティアによる感染実験では、赤痢における感染防御免疫は赤痢菌種（すなわちO抗原）に特異的であり、B群赤痢菌（*Shigella flexneri*）に感染したヒトは感染後B群赤痢菌の再感染では発症しないが、D群赤痢菌（*Shigella sonnei*）には感染する。D群赤痢菌の感染においても同様の結果が得られる。しかし死菌の非経口接種などの通常の抗原投与によるO抗原の免疫刺激では効果的な感染防御は得られない。本論文で赤痢菌感染やサルモネラ感染などについて、腸管感染免疫の研究の現状を報告する。

II. 世界における赤痢菌感染の現状

世界における細菌性赤痢患者の発生は、WHOによれば¹⁾、年間1億6,470万の患者発生があると推定され、そのうちのほとんど（1億6,320万人）が開発途上国の患者である。また110万人が死亡していると推定されている。赤痢患者、およびそれによる死者の大部分（60–70%）は5歳以下の子供が占めている。赤痢菌は生化学的性状や血清学的性状により4つの種に分類されるが、原因となる赤痢菌の菌種内訳は、開発途上国では*S. flexneri* 60%、*S. sonnei* 15%、*S. boydii* 6%、*S. dysenteriae* 6%となっているが、先進工業国ではそれぞれ16%、77%、2%、1%となっており、途上国と先進工業国で菌種の内訳が異なっている。先進国では*S. sonnei*が赤痢の原因菌種の大部分を占めている。また*S. flexneri*の中の血清型は*S. flexneri* 2aが大部分を占めている。

III. 赤痢菌感染における生体防御

細菌性赤痢はヒトを宿主とする限局性の腸管感染症であり、サル以外の動物は赤痢に自然感染しない。ボランティアに赤痢菌を経口接種したDuPontらの実験結果²⁾によると、接種菌量が 10^6 以上で約80%のボランティアが赤痢を発症する（Table 1）。また感染菌量は少なく、10個の菌量でもヒトに赤痢を起こしうる³⁾。赤痢においてはほとんどが局所感染で敗血症になる例はきわめてまれである。同じくDuPontらのボランティア実験の結果によると、下痢、発熱などの症状を呈したヒトの70%前後にLPSに対する抗体価の上昇が見られる²⁾。このようなボランティア実験、臨床報告、動物実験での結果から赤痢に対する免疫は主に赤痢菌のO抗原に特異的であると考えられている。

IV. 赤痢菌感染における赤痢菌O抗原およびIpa抗原に対する抗体産生

筆者らは赤痢菌O抗原LPSに対する赤痢患者の血清中の抗体を測定した。その結果、原因赤痢菌のO抗原に対する抗体はIgA、IgG、IgMそれぞれの抗体価の上昇がみられた。発症後8日から21日の間で抗体価のピークが見られ、以後減少した。免疫グロブリンのクラスではIgA抗体がもっとも特異性が高かった。一方、赤痢菌O抗原に対する糞便中のIgA抗体（total IgAあたりの抗体価として測定）についても同様の実験を行った。その結果*S. flexneri* 2aによる赤痢患者および保菌者の糞便中IgA抗体価は大部分が健康成人の平均値プラス2SDを上回ったが、*S. sonnei*による赤痢患者および保菌者のほとんどでは*S. sonnei* O抗原に対する高い抗体価は見られなかった。赤痢菌のすべての血清型に共通している細胞侵入性に関与するIpa蛋白（IpaA, B, C, D）に対する抗体産生についても検討した。方法としてウエスタンブロットによりIpa蛋白に反応する抗体が血清中に検出されたかどうかで調べた。*S. flexneri* 2a患者が*S. sonnei*患者よりも高い検出率を示した。以上の結果から、O抗原、Ipa蛋白に対する抗体産生について赤痢菌の血清型による検出率の違いが見られた。このことは赤痢菌の菌種により病原性に違いがあるということを反映しているのかもしれない。

赤痢の感染においては赤痢菌O抗原やIpa蛋白に対する抗体産生が認められたが、これらの抗体が感染防御に密接に関与しているのか、関与しているとする血清抗体なのか分泌型のIgA抗体なのかは不明である。ま

たボランティア実験での結果から、Th 1 タイプの T リンパ球が主に活性化されるという報告⁴があるので、細胞性の免疫が主に関与している可能性もある。

V. 赤痢の予防ワクチンの開発

赤痢の自然感染の宿主がヒトおよびサルだけという宿主特異性が *in vivo* の実験、特に宿主の生態防御に関する実験を困難にしている。しかし、いろいろな実験系を用いることにより赤痢菌の病原因子が解明されているので、これらの病原因子に変異を起こし、弱毒にした変異株をワクチン株として最終的にヒトに投与して防御効果を判定するということが行われている。Table 2 に現在開発されつつある赤痢ワクチンを示す。Table 3 にメリーランド大学のワクチン開発センター (Center for Vaccine Development) で開発された経口生ワクチンについてボランティアを用いた安全性および免疫応答に関する結果を示す⁵。CVD 1207 は大量の接種でも副作用が認められず以前開発された CVD 1203 よりもワクチンとして有望視されている。Table 4 にアメリカ陸軍の Walter Reed 研究所で開発したワクチン株のボランティアでのチャレンジ試験の結果を示す⁶。このワクチン株 *S. flexneri* 2 a SC 602 は、Table 3 の *virG* 変異株 CVD

1203 株と同様、接種菌量を 10^6 以上にすると野性株と同様に赤痢症状になる例が出るが、 10^4 だと副作用は起こらないという safety margin の狭い株である。Table 4 に示すようにチャレンジ試験では下痢の症状を示す例はあるものの、赤痢症状、発熱などを予防できたという結果が出ている。一方、病原因子のひとつであり、感染防御抗原としての O 抗原多糖と carrier protein を共有結合させたコンポーネントワクチンが現在野外試験でその有効性の検討が行われている (Table 2-2)。これは血清中の IgG が防御免疫に重要であるという仮説にもとづいており、preliminary な結果として *S. sonnei* LPS のワクチン接種により 70% の防御効果があったという報告が発表された⁷。

VI. その他の腸管感染症に対するワクチン開発

コレラのワクチンについてもいくつか臨床試験が試みられている。コレラ菌の病原性の主な因子としてはコレラ毒素があるが、いままでのところコレラ毒素のみをターゲットとしたワクチンはいずれも成功していない。コレラにおいても O 抗原が感染防御抗原として重要な働きを担っていることが知られている。コレラ菌は組織に侵入せず腸管に付着して毒素を放出することによって発症させると考えられているので、おそらくコレラ菌の定着を阻害することによって感染を防御していると考えら

Table 1. Clinical response of man to varying challenge doses of virulent *Shigella flexneri* 2 a

	Challenge dose				
	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8
Total number	4	4	8	19	8
Number ill	1	3	7	13	7
Percent ill	25	75	88	68	88

DuPont et al. J Infect Dis. 119: 296, 1969

Table 2. *Shigella* vaccine candidates

1. Live attenuated vaccines
Mutations in the genes encoding either virulence factors ($\Delta virG$, Δsen , Δset) or essential metabolic enzymes ($\Delta guaBA$, $\Delta araA$)
2. Conjugate component vaccine
Shigella O-specific polysaccharide bound to *Pseudomonas aeruginosa* exoprotein A

Table 3. Clinical and immunological responses to live attenuated *Shigella* vaccines and to the wild-type parent in the phase 1 clinical trial

Immunogen	Dose	No. of subjects	No. (%) of subjects with:			Anti-LPS IgA ASC	
			Diarrhea	Fever	Dysentery	No. (%) of responder	Geometric mean
CVD 1207	10^6	7	0	0	0	0	0.1
	10^7	7	0	0	0	6 (100)	6.1
	10^8	3	0	0	0	2 (67)	5.3
	10^9	12	1 (8)	0	0	7 (64)	8.7
	10^{10}	6	1 (20)	0	0	5 (100)	35.2
CVD 1203	10^6	10	0	0	0	6 (60)	13
	10^8	11	2 (18)	1 (9)	1 (9)	10 (91)	43
	10^9	11	3 (27)	7 (64)	3 (27)	11 (100)	175
Wild-type	10^2	7	3 (43)	2 (29)	3 (43)	5 (71)	18.4
	10^3	12	10 (83)	10 (83)	10 (83)	11 (92)	239

CVD 1207: $\Delta virG \Delta sen \Delta set \Delta guaBA$

CVD 1203: $\Delta virG \Delta araA$

Kotloff et al. Infect Immun 68: 1034, 2000

Table 4. Vaccination against shigellosis with attenuated *Shigella flexneri* 2 a strain SC 602

Characteristic	Controls	Vaccinees
No. of volunteers	7	7
Volunteers excreting <i>S. flexneri</i> 2 a	6	6
Volunteers with diarrhea	6	3
Mean no. of diarrheal stools (range)	11 (6-20)	4 (2-6)
Volunteers with dysentery	4	0
Volunteers with fever	6	0
Volunteers with severe shigellosis	6	0

SC602, $\Delta virG \Delta iuc$

Coster et al. Infect Immun 67: 3437, 1999

Table 5. Cholera vaccine candidates

1. O-polysaccharide-protein conjugate vaccine
2. Recombinant live cholera vaccine
CVD 103-HgR ($\Delta ctxA \Delta hlyA:: mer$)
3. Inactivated whole cell plus cholera toxin subunit B

Table 6. Typhoid fever vaccine candidates

1. Parenteral whole cell vaccine
2. Oral attenuated vaccine: Ty 21 a
3. Parenteral Vi antigen (purified capsule)

れる。Table 5-1のO抗原多糖とcarrier proteinのconjugate vaccineはヒトへの非経口投与で安全性に問題ないという結果が得られている。Table 5-2, Table 5-3のワクチンは野外試験が行われた。弱毒生ワクチン(Table 5-2)はインドネシアで行われたが、コレラの流行が少なかったこともあり、有効性は確認されなかった⁹⁾。Table 5-3の死菌ワクチンと毒素のBサブユニットの経口接種についてはペルーで野外試験が行われ、コレラ感染では60%の有効性、また入院が必要な重症のコレラについては80%の有効性が報告されている⁹⁾。腸チフスのワクチンについてであるが、Table 6に示すようなワクチンが現在試みられており、50-70%の有効性が報告されている。

VII. おわりに

いままで述べた腸管感染症では、自然感染した患者が再感染を防御するのはだいたい70%程度と考えられている。腸管感染症のワクチン開発のこれからの課題としては自然感染以上の安全な免疫刺激を与えるものを追求

していく必要がある。自然感染後の免疫よりも強力かつ持続性のある免疫を生み出すワクチン開発には、トキシイド、死菌や弱毒変異株の開発のみならず、効果的なアジュバントの作製や経口、非経口ワクチンの組み合わせなども必要であろう。もしこのような優れたワクチンが弱毒生ワクチンとして可能であればこの株に他の微生物の感染防御抗原を付加することによってベクターとしても利用できるであろう。

文 献

- 1) Kotloff K L, Winickoff J P, Ivanoff B, et al.: Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. Bull WHO 77: 651-666, 1999
- 2) DuPont H L, Hornick R B, Snyder M J, et al.: Immunity in shigellosis. I. Response of man to attenuated strains of *Shigella*. J Infect Dis 125: 5-11, 1972
- 3) DuPont H L, Levine M M, Hornick R B, et al.: Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission. J Infect Dis 159: 1126-1128, 1989
- 4) Samandari T, Kotloff K L, Losonsky G A, et al.: Production of IFN- γ and IL-10 to *Shigella* invasins by mononuclear cells from volunteers orally inoculated with a Shiga toxin-deleted *Shigella dysenteriae* type 1 strain. J Immunol 164: 2221-2232, 2000
- 5) Kotloff K L, Noriega F R, Smandari T, et al.: *Shigella flexneri* 2 a strain CVD 1207, with specific deletions in *virG*, *sen*, *set* and *guaBA*, is highly attenuated in humans. Infect Immun 68: 1034-1039, 2000
- 6) Coster T S, Hoge C W, VanDe Verg L L, et al.: Vaccination against shigellosis with attenuated *Shigella flexneri* 2 a strain SC 602. Infect Immun 67: 3437-3443, 2000
- 7) Cohen D, Ashkenazi S, Green M S, et al.: Double-blind vaccine-controlled randomised efficacy trial of an investigational *Shigella sonnei* conjugate vaccine in young adults. Lancet 349: 155-159, 1997
- 8) Richie E E, Punjabi N H, Sidharta Y Y, et al.: Efficacy trial of single-dose live oral cholera vaccine CVD-HgR in North Jakarta, Indonesia, a cholera-endemic area. Vaccine 18: 2399-2410, 2000
- 9) Taylor D N, Cardenas V, Sanchez J L, et al.: Two-year study of the protective efficacy of the oral whole cell plus recombinant B subunit cholera vaccine in Peru. J Infect Dis 181: 1667-1673, 2000

小児ウイルス性呼吸器感染症における粘膜免疫、特に respiratory syncytial virus (RS ウイルス) 感染症について

堤 裕 幸

札幌医科大学医学部小児科学講座

小児ウイルス性呼吸器感染症における粘膜免疫について、小児にとって最重要と考えられる respiratory syncytial virus (RS ウイルス) 感染症を例にとって、特にその感染急性期における非特異的な粘膜面の免疫応答について検討した。呼吸器ウイルス感染における生体の防御機構、免疫応答の第一段階は、感染気道上皮における、ウイルス感染に呼応した種々の変化・反応といえる。このことは、遺伝子レベルでは、感染上皮細胞内の、種々の機能を有している遺伝子群の転写の過程の変化と、言い替えることもできる。そのような観点から、主に *in vitro* の系を用いた解析で、RS ウイルス感染細胞において、IL-1 β , IL-6, TNF- α などの炎症性サイトカイン、IL-8, RANTES などのケモカインの産生が、その転写レベルで速やかに行われることが示された。また、アポトーシスに至る caspase 経路のいくつかの遺伝子群が活性化されること、また、強い NO 産生作用のある II 型 (誘導型) 一酸化窒素合成酵素 (inducible nitric oxide synthase: iNOS) 遺伝子の転写活性亢進もやはり *in vitro* の系であるが確認された。これらの反応には、IRF-1, NF- κ B などの核内転写因子の活性亢進がおきることも示された。これらのことより *in vivo* においても、これらサイトカイン、ケモカインが相互に影響し合って、各種炎症細胞を局所へ誘導・活性化し、さらに血管内皮、粘膜下腺などの気道の細胞に働いて気道炎症の全体像を形成するとともに、生体の防御機構である粘膜免疫の第一歩を進める可能性が考えられる。

Key words: RS ウイルス, サイトカイン, ケモカイン, アポトーシス, iNOS

I. 序 文

小児、特に乳幼児においては、感染症の多くの部分を呼吸器感染症、特に昨今ではウイルス性呼吸器感染症が占める。これらウイルスは気道上皮に感染を成立させて増殖し、細胞を破壊して発病するため表面感染ともいわれ、感染から発病までの潜伏期が短く、また全身の免疫応答が概して弱く短期間しか継続しないという特徴がある。生体の防御機構、免疫応答はこの過程で非特異的、特異的に働くが、呼吸器ウイルスの場合、感染が気道上皮にある程度限定されることから、感染気道上皮において早期に起こる変化・反応を明らかにすること、つまり、気道上皮細胞の、種々の機能を有している遺伝子群の転写活性が、ウイルス感染の際に、どのように変化するのか、その様相を明らかにしていくことが、感染初期の免疫応答の理解、ひいては免疫病理を含めた病態の解明につながると考えられる。ここでは小児においてもっとも頻度が高く、重要な位置を占める呼吸器ウイルスである respiratory syncytial virus (RS ウイルス) 感染を例にとり、初期の非特異的な免疫応答としてのサイトカインの産生、アポトーシスの関与、一酸化窒素 (nitric oxide: NO) 産生の可能性などについて、いずれも感染局所にフォーカスを絞り、主に *in vitro* においてわれわれが得た知見を中心に述べる。

II. RS ウイルス感染の特徴

RS ウイルスは 1957 年にヒトから分離されて以後、生後 1 歳までに 70% 近くの乳児が、次の 1 年までにほぼ 100% の小児が感染を受けるとされ、乳幼児のもっとも頻度の高い呼吸器ウイルスとして知られる。一本鎖 (-) RNA ウイルスでパラミクソウイルスに属するが、血球凝集能を欠くため、Pneumovirus として分類されている。

その臨床的特徴として、移行抗体が存在する生後 2~3 か月以内の乳児に感染を成立させ、細気管支炎や肺炎などを引き起こすこと、また、先天性心疾患や肺に基礎疾患を有する児においては重篤化しやすく、不幸な転帰をとりうること、未熟児においては頑固な無呼吸を呈して突然死に至る可能性があること、下気道炎からの回復後も長期にわたって肺機能の異常を残し、喘鳴を繰り返すことがあること、さらに、生涯何度でも感染を繰り返すこと、年長者においては重症化しうることも知られている。Fig. 1 に RS ウイルス下気道炎の簡単な臨床 flowchart を示す。

III. RS ウイルス感染局所におけるサイトカイン、ケモカインの産生

RS ウイルス下気道炎乳児の急性期の鼻咽腔分泌物 (NPS) 中に IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α などのサイトカインの活性が認められ、回復期には減少すること

が明らかにされた (Fig. 2)^{1,2)}。その産生の機序の解明のため、II型肺胞上皮細胞由来のA 549細胞にRSウイルスを感染させる系を作成し、RT-PCR法を用いてそれらサイトカインの遺伝子の転写亢進が感染後4時間以内の早期におき、7時間でピークを示した後、減衰していくことを確認した (Fig. 3)。方、RSウイルス感染においては感染気道上皮より放出されたウイルス自体が吸気により、容易に末梢肺まで到達し、肺胞マクロファージに感染がおよぶと考えられ、それらの免疫反応への関与が推定されている。われわれも新生児の臍帯血単球にRSウイルスを感染させる系を作成し、感染後2時間でIL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IFN- γ などの転写活性が亢進することを確認した³⁻⁵⁾。培養上清中にはそれら蛋白の活性が示され、免疫学的には非常に未熟と考えられる新生児においても、そのマクロファージはウイルス感染に対してすでに十分なサイトカイン産生能力を有していることが示された。

また、やはり、*in vitro*の細胞系を用いた検討で、RSウイルス感染が核内転写因子であるNF- κ Bを活性化し、それがRANTES、IL-8、MCP-1などのケモカインの産生を誘導するとの報告もみられる⁶⁾。*In vivo*においても、RSウイルス感染気道上皮、さらに肺胞マクロファージより産生されたこれらサイトカイン、ケモカインが相互に影響し合って、各種炎症細胞を局所へ誘導・活性化し、さらに血管内皮、粘膜下腺などの気道の細胞に働いて気道炎症の全体像を形成しうることが考えられる。

好酸球に対して強い誘導能と活性化作用を有するRANTESが、RSウイルス感染気道上皮より産生されることは、気管支喘息と似た臨床像を呈するRSウイルス下気道炎を好酸球性炎症として捉えることができる可

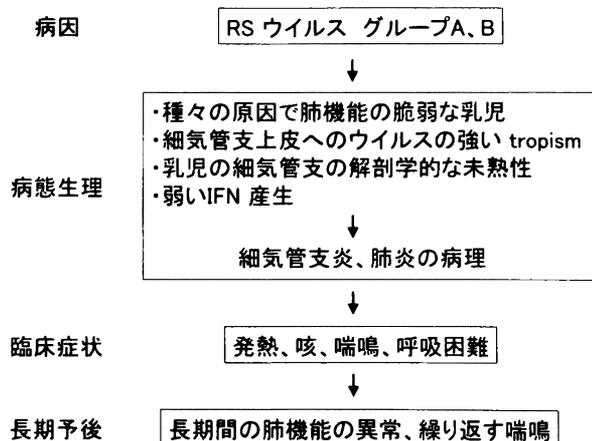


Fig. 1. Clinical flowchart of RS virus lower respiratory tract infection.

能性を示している。

IV. RSウイルス感染気道上皮におけるアポトーシス関連遺伝子の誘導

近年、HIV、インフルエンザウイルスをはじめとしたいくつかのウイルス感染細胞の死にもアポトーシス (programed cell death) が関係していることが示されている。種々の細胞がアポトーシスに至る過程にはいくつかの経路があるが、その代表的なものにカスパーシス経路がある。抗癌剤、マイトゲン、ウイルス感染が刺激となって、いくつかのプロテアーゼ (カスパーシス) が、次々に活性化され (protease cascade)、最終的に poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) というDNA修復に必要な酵素が分解され、アポトーシスに至るというものである。具体的には、ウイルス感染などによって、IRF-1 (interferon regulatory factor-1) という核内転写因子の活性が亢進し、それがICE (IL-1 β -converting enzyme) (caspase 1) の転写を亢進し、続いてCPP 32 (caspase 3) を活性化しPARPを分解する。そこでわれわれは、RSV感染によって、この経路が実際に作働し、ウイルス感染細胞にアポトーシスが誘導されるかどうかについて *in vitro* の系で検討を進めた。RSウイルス感染A 549細胞においては、アポトーシスに密接に関係するとされるIRF-1、ICEなどの転写が感染後数

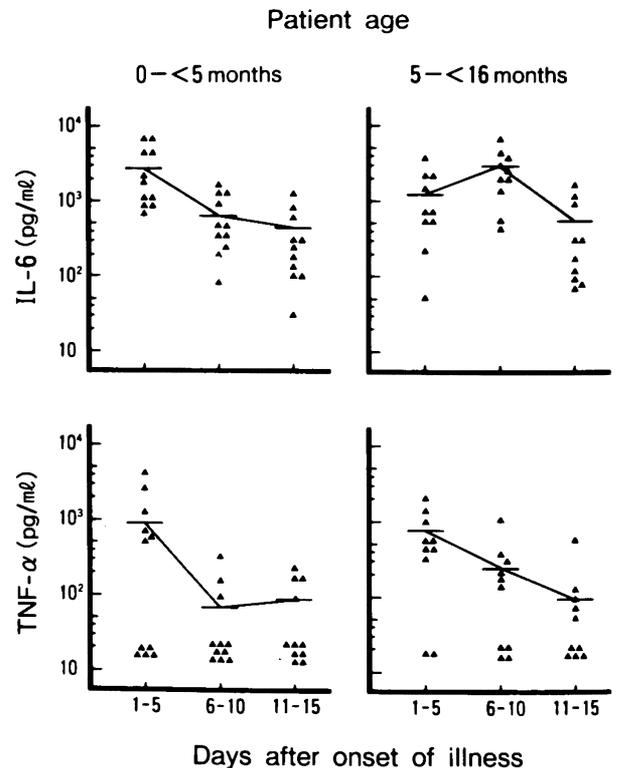


Fig. 2. Temporal pattern of cytokines (IL-6, TNF- α) levels in NPS during primary infection with RS virus. Cytokine levels were corrected to a total IgA content of 0.1 mg/mL. Bars indicate GMT + standard deviation.

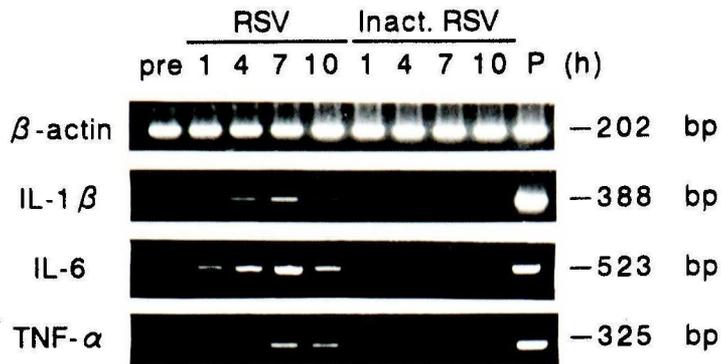


Fig. 3. Time course of cytokine mRNA (IL-1 β , IL-6, TNF- α) expression in RS virus-infected and inactivated RS virus-treated A 549 cells determined by RT-PCR assay.

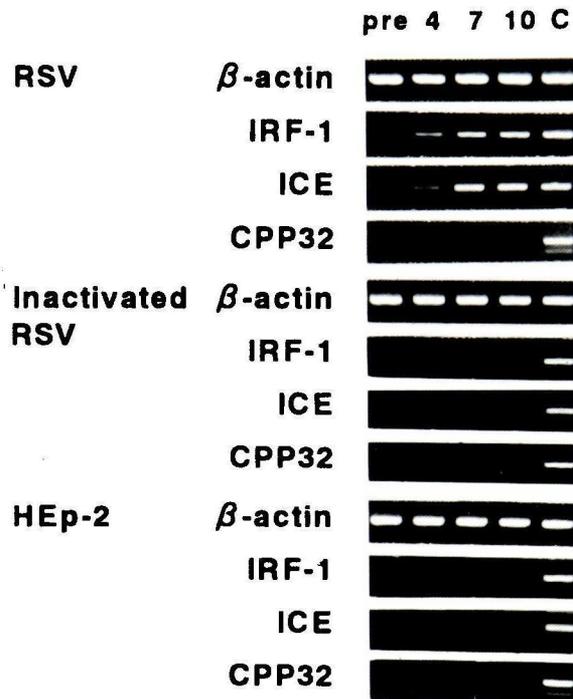


Fig. 4. Expression of IRF-1, ICE and CPP 32 genes in A 549 cells exposed to RS virus determined by RT-PCR assay. mRNA expression was assessed before treatment (pre) and at 4, 7 and 10 h after treatment. Lane C, positive control.

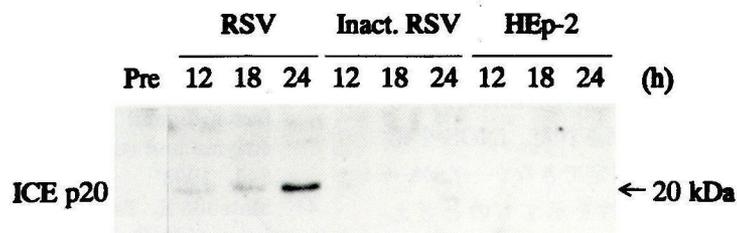


Fig. 5. Western blot analysis of ICE p 20 protein expression. RS virus-infected, inactivated (Inact.) RS virus-treated or HEp-2 cell-treated A 549 cells were lysed after the indicated times (h) of treatment, separated by SDS-PAGE, transferred, and developed with anti-human ICE p 20 antibodies.

時間で有意に亢進し (Fig. 4), 活性化 ICE 蛋白も感染 24 時間には細胞内に蓄積することが確認できた (Fig. 5)⁹⁾。しかし, フローサイトメトリーを用いた詳細な検討においても, 最終的なアポトーシスは確認できなかった。この理由として最終的に CPP32 (caspase 3) が活性化されないことなどが考えられた。しかし活性化 ICE 蛋白が RSV 感染において産生されることは, RSV 感染細胞がアポトーシスをおこしやすい状態に至ることを意味しており, *in vivo* においては, TNF- α をはじめとする炎症性サイトカインが paracrine に働き, アポトーシスを招来する可能性が考えられる。方, 最近, RS ウイルス感染が逆に "IEX-1L" というアポトーシス抵抗遺伝子の発現を亢進させることが明らかにされた⁹⁾。このことも活性化 ICE 蛋白の産生にもかかわらずアポトーシスが生じない機序のひとつかもしれない。

V. RS ウイルス感染による誘導型 NO 合成酵素 (inducible NO synthase: iNOS) の誘導,

および NO の産生

NO は当初, 内因性の血管弛緩因子として同定されたが, その後神経伝達物質, 細菌やウイルス感染における抗細菌, 抗ウイルス物質, あるいは炎症の mediator としての働きなど広範な生理的活性が確認されている。ウイルス感染においては, 動物モデルを用い, 肺炎や脳炎をおこすいくつかの感染症における誘導型 (II 型) NO 合成酵素 (iNOS) の発現が明らかにされ, NO のウイルス感染症の病態への関与が推察されている⁹⁾。

iNOS の誘導には, アポトーシスに関係するとされる前述した核内転写因子の IRF-1, さらに NF- κ B が関与していることが示されている。今回, 前述した RS ウイルス感染 A 549 細胞の系を用い, iNOS 遺伝子の発現が, IRF-1 の発現とほぼ同時で感染 4 時間以内と早期に見られ, その後数時間持続することを確認した。この RS ウイルス感染自体では NO の産生を確認できなかったが, 感染細胞に IFN- γ , IL-1 β , TNF- α などを用いたところ, iNOS 遺伝子の発現が著明に増強し, RS ウイルス感染特異的と考えられる NO の産生も確認できた¹⁰⁾。このことから RS ウイルス下気道炎において, 感染により産生された炎症性サイトカインが RS ウイルス感染細胞に paracrine に働き, NO 産生を増強する可能性が示された。実際, RS ウイルス下気道炎急性期の乳児の NPS 中の細胞における iNOS mRNA の発現亢進と, 回復期以降の低下が観察された。iNOS を発現している細胞の種類については同定できなかったが, 感染局所における NO 産生の可能性を示すものと考えられる。

VI. ま と め

乳幼児の RSV 下気道炎における急性期の病態, 非特異的な免疫反応に種々の炎症性, 免疫調節性サイトカイン, ケモカインが関与している可能性を示した。さらに,

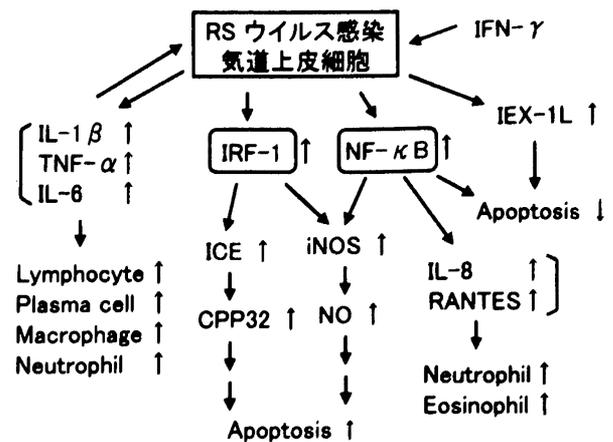


Fig. 6. Schema of intracellular signal transduction in RS virus-infected respiratory epithelial cells and the effects on inflammatory cells.

アポトーシスの発生や NO の産生の可能性についても言及した。Fig. 6 には, *in vitro* の RS ウイルス感染細胞系を用い, 遺伝子レベルで明らかにされてきたことを簡略化して示す。*in vivo* においては, これらのどの部分が, どの程度に下気道炎の病態形成に関与しているのか, あるいは初期の免疫反応の一部となって感染からの回復に寄与しているのかは明らかでなく, さらに検討が必要である。このように乳幼児の代表的な呼吸器感染症である RS ウイルス感染症の病態, 粘膜免疫の解明を進めることは, パラインフルエンザウイルスをはじめとする他のウイルス性呼吸器感染症の病態の解明にも結びつくと考えられる。

文 献

- 1) Matsuda K, Tsutsumi H, Okamoto Y, et al.: Development of interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha activity in nasopharyngeal secretion on infants and children during infection with respiratory syncytial virus. *Clin Diag Lab Immunol* 2: 322~324, 1995
- 2) Noah T L, Henderson F W, Henry M M, et al.: Nasal cytokine production in viral acute upper respiratory infection of childhood. *J Infect Dis* 171: 584~592, 1995
- 3) Takeuchi R, Tsutsumi H, Ohsaki M, et al.: Respiratory syncytial virus infection of neonatal monocytes stimulates synthesis of interferon regulatory factor 1 and interleukin-1 β (IL-1 β)-converting enzyme and secretion of IL-1 β . *J Virol* 72: 837~840, 1998
- 4) Matsuda K, Tsutsumi H, Yoto Y, et al.: Characteristics of IL-6 and TNF- α production by respiratory syncytial virus-infected macrophages in neonate. *J Med Virol* 48: 199~203, 1996
- 5) Tsutsumi H, Matsuda K, Sone S, et al.: Respiratory syncytial virus-induced cytokine production by neonatal macrophages. *Clin Exp Immunol* 106: 442

- ~446, 1996
- 6) Olszewska-Pazdrak B, Casola A, Saito T, et al.: Cell-specific expression of RANTES, MCP-1, and MIP-1 α by lower airway epithelial cells and eosinophils infected with respiratory syncytial virus. *J Virol* 72: 4756~4764, 1998
- 7) Takeuchi R, Tsutsumi H, Ohsaki M, et al.: Respiratory syncytial virus infection of human alveolar epithelial cells enhances interferon regulatory factor 1 and interleukin-1 β -converting enzyme gene expression but does not cause apoptosis. *J Virol* 72: 4498~4502, 1998
- 8) Domachowske J B, Bonville C A, Mortelliti A J, et al.: Respiratory syncytial virus infection induces expression of the anti-apoptosis gene IEX-1 L in human respiratory epithelial cells. *J Infect Dis* 181: 824~830, 2000
- 9) Reiss C H, Komatsu T: Does nitric oxide play a critical role in viral infection. *J Virol* 72: 4547~4551, 1998
- 10) Tsutsumi H, Takeuchi R, Ohsaki M, et al.: Respiratory syncytial virus infection of human respiratory epithelial cells enhances inducible nitric oxide synthase gene expression. *J Leukocyte Biol* 66: 99~104, 1999

Mucosal immunity in viral respiratory tract infection in children, especially in infection with respiratory syncytial virus

Hiroyuki Tsutsumi

Department of Pediatrics, Sapporo Medical University School of Medicine, S-1, W-16, Chuo-ku,
Sapporo 060-8543, Japan

Nonspecific mucosal immune responses in infants and children during acute phase of RS virus infection were analyzed. The first step of host defence mechanisms and immune responses during viral infection has been thought to be functional and organic reactions in virus-infected host cells, that is, in other words transcriptional changes of host cellular genes which charge a variety of functions. Using *in vitro* RS virus infection system, it has been clarified that the transcriptional level of inflammatory cytokine (IL-1 β , IL-6, TNF- α), and chemokine gene (IL-8, RANTES) increased in RS virus infected respiratory cells. In addition, a transcriptional activation of apoptosis-associated proteases and inducible nitric oxide synthase (iNOS) genes were also confirmed. These activation were associated with the upregulation of nuclear transcriptional activator, such as IRF-1 and NF- κ B. These results suggest that, also *in vivo* setting, the cytokines and chemokines produced at the airway attract and activate several inflammatory cells in local infection site, in addition they activate endothels of airway blood vessel and submucosal gland. As a result a whole feature of respiratory tract inflammation may be formed. The first step of mucosal immune responses should be started through these inflammation processes.