

百日咳起因菌に対する新規感染防御抗原の探索

感染制御科学専攻 感染制御・免疫学履修コース ワクチン学

齋藤 桃子

【背景および目的】

百日咳ワクチンは、最も安全性が高く有効なワクチンの一つであり、百日咳患者数を劇的に低下させてきた。しかし 1990 年前後から百日咳の再興が世界的に報告されてきており、日本においても 2000 年代から報告患者数が増加し、現在も周期的な流行を繰り返している。

百日咳の再興と百日咳菌の抗原変異には関連性があることが示されており、ワクチンによる選択圧のもと、ワクチンによって誘導された感染防御免疫を回避するために抗原変異株が出現した可能性が示唆されている。抗原変異を起こした百日咳菌流行株に対して、より有効なワクチンを作るためには、①現行ワクチンに含まれるワクチン抗原を流行株と同様の変異型に変更すること、②流行株の多くが発現している線毛 Fim3 を現行ワクチンに追加すること、そして、③現行ワクチンに含まれない新規防御抗原をワクチンに追加することなどが戦略として考えられた。所属研究室では、前二者について成果を報告してきたが、新規防御抗原に関する検討には着手してこなかった。本研究発表の前半では、主要病原因子を産生しない特異な臨床分離株の解析によって見出されたユニークな新規抗原 peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL) の百日咳菌に対する感染防御抗原としての可能性を検討したので報告する。

一方、百日咳再興のもうひとつの要因として、現行ワクチンが無効であるパラ百日咳菌および *Bordetella holmesii* による百日咳が挙げられる。*B. holmesii* は敗血症や心内膜炎などの起因菌として知られていたが、近年、百日咳様疾患の患者から分離され、百日咳起因菌の一つあることが明らかとなった。本研究発表の後半では、*B. holmesii* の感染防御抗原を明らかにし、同菌に有効性を示す成分ワクチン開発の可能性を示したので報告する。

【方法】

1. 百日咳菌新規感染防御抗原の探索

(1) PAL の検出

国内の百日咳様疾患患者から分離した主要病原因子非産生百日咳菌 (KF19 株) とリファレンス株である東浜株との間で、培養上清に産生されるタンパク質の違いを SDS-PAGE のバンドパターンを比較して調べた。KF19 株において特異的に検出されたタ

ンパク質のバンドを切り出し、Peptide Mass Fingerprint (PMF) 解析にて同定した。

(2) rPAL の精製

Escherichia coli Rosetta 2 (DE3) と Overnight Express Autoinduction System 1 を用い、組換えヒスチジンタグ (HisTag) 融合タンパク質として PAL (rPAL) を発現させた。rPAL は、HisTrap HP カラムを用いた affinity カラムクロマトグラフィーにて精製した。

(3) 混合ワクチンの調製

ベースワクチンとして沈降精製百日せきジフテリア破傷風不活化ポリオ混合ワクチン (DTaP-IPV ワクチン; 北里第一三共ワクチン, 北本) を使用した。DTaP-IPV ワクチンに rPAL を添加した混合ワクチン、および rPAL 単成分ワクチンを調製した。各ワクチンには、Alum アジュバントおよび 2-phenoxyethanol を添加した。

(4) ワクチンの評価

3.5 週齢の SPF BALB/c 雌性マウスにワクチンを接種し、その 2 週間後に追加免疫を行った。追加免疫から 2 週間後に百日咳菌東浜株約 5×10^6 CFU (colony-forming unit) を経鼻接種し、マウスに感染させた。感染 0 (2 時間)、5 および 8 日後にマウスを安楽死させ、肺を無菌的に摘出した。回収した肺内の百日咳菌生菌数を算定し、その抑制をワクチンによる感染防御効果の指標とした。

(5) 抗体価の測定

ワクチンで免疫したマウスの血中抗体価を enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 法にて測定した。

2. *B. holmesii* 感染防御抗原の探索

(1) *B. holmesii* 無細胞 (aBH) ワクチンの作製

カザミノ酸加 Stainer-Scholte 培地にて *B. holmesii* BH2 株 (野生株) および *B. holmesii* BH2 Sm^r - Δ BipA 株 (BipA 欠損株) を培養し、得られた培養上清を限外ろ過濃縮した。濃縮した培養上清をホルマリン不活化し、Alum アジュバントおよび 2-phenoxyethanol を添加した。

(2) ワクチンの評価

3.5 週齢の SPF BALB/c 雌性マウスにワクチンを接種し、その 2 週間後に追加免疫を行った。追加免疫から 2 週間後に *B. holmesii* BH2 株約 5×10^6 CFU を経鼻接種し、マウスに感染させた。感染 0 (2 時間)、および 1 日後にマウスを安楽死させ、肺内の *B. holmesii* 生菌数を算定した。

(3) 感染防御抗原の探索

aBH ワクチン免疫マウス血清が認識した *B. holmesii* 培養上清中のタンパク質を二次元電気泳動で分離し、PMF 解析にて同定した。

【結果および考察】

1. 百日咳菌新規感染防御抗原の探索

国内の百日咳患者から分離された百日咳菌の分子疫学解析を行う過程で、主要病原因子を産生しない KF19 株を見出した。KF19 株とリファレンス株である東浜株間で培養上清中に産生されているタンパク質を SDS-PAGE にて比較したところ、KF19 株培養上清に特異的なタンパク質 (16 kDa) を検出した。このタンパク質を PMF 解析したところ、PAL であることが明らかとなった。

PAL は他のグラム陰性菌において生存および病原性に関与が示唆されていることから、*Bordetella* 属においても病原性に関与する膜タンパク質であると推察された。このため、組換えタンパク質 (rPAL) を作製し、ワクチンの感染防御抗原として有望であるかをマウスモデルにより評価した。

ワクチンを接種したマウスの抗 rPAL-IgG 血中抗体価を調べたところ、rPAL 添加 DTaP-IPV ワクチン (DTaP-IPV+rPAL 混合ワクチン) 免疫群、および rPAL 単成分ワクチン免疫群において高値を示した。一方、無免疫群と DTaP-IPV ワクチン免疫群では抗 rPAL-IgG 血中抗体は検出されなかった。このことから、DTaP-IPV ワクチンに PAL 抗原は含まれていないことがわかった。

各ワクチン免疫群における IgG_{2a} 抗体応答を調べたところ、DTaP-IPV+rPAL 混合ワクチン免疫群では、DTaP-IPV ワクチン免疫群と比較して FHA および rPAL に対する IgG_{2a} 抗体価が高値を示した。このように IgG₁ だけでなく IgG_{2a} 抗体をも強く誘導する抗原は珍しく、無細胞ワクチンでは誘導されない Th₁ の免疫を惹起させる可能性を有していると考えられた。さらに、DTaP-IPV ワクチンに rPAL を添加することにより、混合されている他の抗原に対する免疫応答も Th₁ 方向にシフトする可能性が示唆された。

各ワクチンで免疫したマウスに百日咳菌東浜株を経鼻感染させ、感染 0 (2 時間)、5 および 8 日後の肺内生菌数を測定した。その結果、無免疫群における肺内生菌数は、感染 5 日後では $10^{7.1}$ 、8 日後では $10^{6.4}$ であったのに対し、DTaP-IPV ワクチン免疫群では $10^{4.5}$ および $10^{4.4}$ であり、無免疫群に比べて有意に低く、DTaP-IPV ワクチンの感染防御効果が確認された。一方、DTaP-IPV+rPAL 混合ワクチン免疫群の肺内生菌数は、感染 5 日および 8 日後において共に $10^{3.1}$ であり、DTaP-IPV ワクチン免疫群よりもさらに減少し、感染防御効果の増強が見られた。しかし、rPAL 単成分ワクチン免疫群の肺内生菌数は無免疫群と差が見られず、感染防御効果を示さなかった。

rPAL を DTaP-IPV ワクチンに添加すると感染防御効果が増強されたことから、PAL は百日咳菌の感染防御抗原の一つであり、混合ワクチン用の新規防御抗原として有望であると考えられた。

2. *B. holmesii* 感染防御抗原の探索

B. holmesii 培養上清から調製した無細胞ワクチン (aBH ワクチン) は *B. holmesii* に対して有効であることが既に示されている。しかし、培養上清中には多くの未同定成分が含まれており、安全性のために成分ワクチン化が求められる。そこで培養上清に含まれている感染防御抗原の探索を試みた。

B. holmesii 培養上清中の aBH ワクチン免疫血清が認識した 37-150 kDa の抗原のうち、8 個のスポットを PMF 解析した。その結果、すべてのスポットが bacterial Ig-like domain family protein 由来の断片であった。このタンパク質は、百日咳菌の outer membrane ligand binding protein (BipA) のホモログ (identity 59%, similarity 89%) であった。

同定された *B. holmesii* BipA が感染防御抗原であるか調べるため、BipA を欠損させた株の培養上清から BipA 非含有無細胞ワクチン (aBH- Δ BipA ワクチン) を作製し、その感染防御効果を調べた。aBH ワクチン、または aBH- Δ BipA ワクチンで免疫したマウスに *B. holmesii* を感染させ、感染 1 日後のワクチン免疫群と無免疫群における肺内生菌数を比較した。その結果、aBH ワクチン免疫群の肺内生菌数は無免疫群と比較して有意に低かった。一方、BipA を欠損させた株から作製した aBH- Δ BipA ワクチンで免疫した群では、肺内生菌数は無免疫群と比較して有意な差が見られず、ワクチンとして無効であった。これらの結果から、*B. holmesii* の BipA は主要な感染防御抗原であることが示唆された。

【結論】

DTaP-IPV ワクチンに rPAL を混合させることにより、感染防御効果の増強が見られたことから、PAL は百日咳菌の感染防御抗原であり、混合ワクチン用の新規防御抗原として有望であることが考えられた。しかし、rPAL 単成分ワクチンは感染防御効果を示さなかったことから、抗原性が完全に保持されている native PAL を百日咳菌から精製し、その感染防御効果を調べる必要がある。

また、本研究によって BipA が *B. holmesii* に対する主要な感染防御抗原の一つであることが示唆された。今後、成分ワクチン開発のため、組換え BipA および native BipA の調製を試みる必要がある。