

気道上皮細菌付着における phosphorylcholine の役割

川 島 雅 樹 田 中 紀 充 黒 野 祐 一
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 聴覚頭頸部疾患学

The Role of Phosphorylcholine in Adherence of *Streptococcus pneumoniae* and Non Typeable *Haemophilus influenzae*.

Masaki KAWABATA, Norimitsu TANAKA and Yuichi KURONO

Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Science

Streptococcus pneumoniae and *Haemophilus influenzae* are major causative agents of acute otitis media (AOM). Phosphorylcholine (PC) is a structural component of a wide variety of pathogens including *S.pneumoniae* and *H.influenzae*. Phosphorylcholine epitope is expressed in phase variation, and contributes to the virulence of bacteria. We have examined the capability of PC as a vaccine against AOM. In this study, we examined the relation between PC expression and bacterial adhesion to the pharyngeal epithelium, in *S.pneumoniae* and *H.influenzae*. Our data indicated that some of *S.pneumoniae* and *H.influenzae* depend on PC for adhesion to human pharyngeal epithelium, but not all of them.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*, non typeable *Haemophilus influenzae*, Phosphorylchoine, PAF receptor

はじめに

肺炎球菌とインフルエンザ菌は中耳炎の主要な起炎菌である。中耳炎予防ワクチンとして7価蛋白結合肺炎球菌ワクチン(PCV7)が実用化されている。しかし、PCV7により肺炎球菌による中耳炎の発症が抑制された一方で、インフルエンザ菌による中耳炎が増加していると報告されており¹⁾両菌を含めた広域スペクトルの予防ワクチンの開発が望まれる。そこで、我々は肺炎球菌とインフルエンザ菌の共通抗原である

Phosphorylcholine (以下、PC)に注目し、中耳炎予防粘膜ワクチンの可能性について検討している。PCは細菌表面に位相変異により表出され、その病原性に関係していると考えられており、細菌表面のPCと上皮のPAFレセプターの相互作用が細菌の上皮への接着・進入に関与するといわれている²⁾。今回、肺炎球菌とインフルエンザ菌の上気道上皮への接着性とPCの関与について複数菌株で検討を行ったので報告する。

方 法

1. 細菌

滲出性中耳炎患者の上咽頭由来の肺炎球菌5菌株とインフルエンザ菌9菌株を用いた。それぞれ血液寒天培地とチョコレート寒天培地で一晚培養した後、上皮接着実験に使用。同時にELISAに使用する為の菌を10%中世緩衝ホルムアルデヒド液で固定した。

2. ELISA

ホルマリン固定した菌を吸光度計で一定濃度に調整した後、Polystyrene microtiter plate (Nunc) にコーティングを行った。1次抗体に抗PC特異的マウスモノクローナルIgA抗体であるTEPC15 (Sigma) を使用。2次抗体にHRPで標識された抗マウスIgA抗体 (Southern Biotechnology Associates) を使用。OD₄₅₀ 値を測定した。同時に1ng/ml ~ 1 mg/ml で段階希釈したPC-KLHのOD₄₅₀ 値も測定し、PC-KLH濃度とOD₄₅₀ 値の関連をグラフにし、先の菌のOD₄₅₀ 値を当てはめることで、細菌表面のPCのおおよその定量値を求めた。

3. 細菌の上皮接着実験

PAFレセプターを発現しているヒト咽頭上皮細胞由来のD562 (ATCC CCL-138)³⁾ を24穴プレートに1 × 10⁵ cells/wellとなるように播き37℃で一晩培養した。抗生物質を含まない培養液に交換後、1 × 10⁵ CFU/mlに調整した菌を100 μl ずつ加え、37℃、5%CO₂ 下で1時間接着させた。細胞をHank's balanced salt solution (HBSS, pH7.2) で洗浄後、0.05%Trypsin-0.01% EDTA (Sigma) で細胞に接着した菌を回収し、血液寒天培地あるいはチョコレート寒天培地に播き、形成されるコロニー数を計測し生菌数 (cfu) を求めた。同時に、菌を加える30分前にPAFレセプターのアンタゴニストである1-hexadecyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phospho-[N,N,N-trimethyl]-hexanoloamine (Calbiochem) を1 μMになるように加え、菌の上皮接着阻害の程度を求めた。

結 果

1. 各菌株のPC発現量と上皮接着性の比較

肺炎球菌の方がインフルエンザ菌と比較し、よりPCの発現量が多い結果であった。細菌の咽頭上皮への接着数はインフルエンザ菌のほうが多い結果であった (Fig.1a, 1b)。

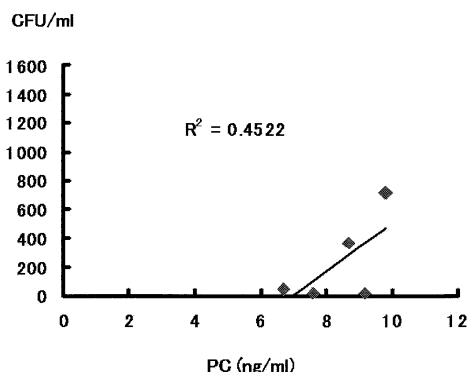


Fig.1a PC expression and adherence of *S.pneumoniae*

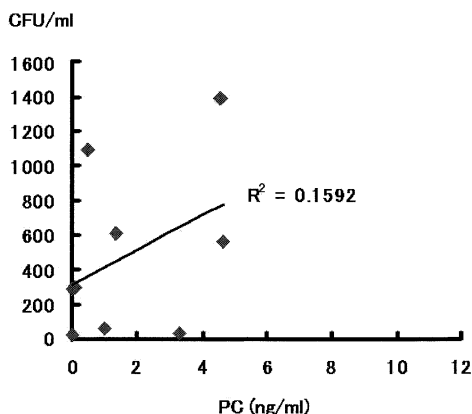


Fig.1b PC expression and adherence of *H.influenzae*

2. PAFレセプターアンタゴニストによる上皮接着阻害

肺炎球菌については5菌株で上皮接着阻害実験を行ったところ、3菌株で上皮接着が阻害された (Fig.2a)。インフルエンザ菌については、PCの発現量の高かった3菌株を用いたが、2菌株で上皮接着が阻害された (Fig.2b)。肺炎球菌・インフルエンザ菌ともPC発現量と接着阻害の関連は認めなかった。

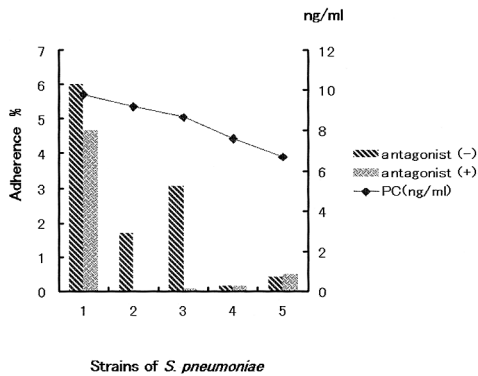


Fig.2a Anti-adhesive effect of PAF receptor antagonist for adherence of *S. pneumoniae*

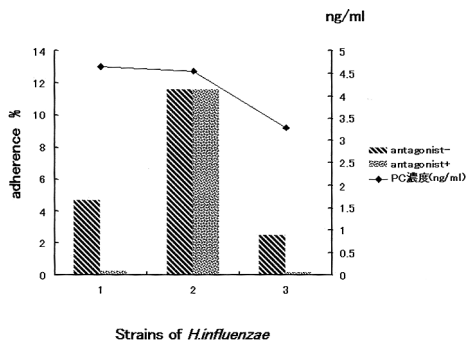


Fig.2b Anti-adhesive effect of PAF receptor antagonist for adherence of *H. influenzae*

考 察

これまでに我々はマウスへのPC経鼻投与にて鼻腔洗浄液や唾液中に誘導されたPC特異的IgA抗体が、肺炎球菌・インフルエンザ菌の鼻腔内クリアランスを促進することを報告してきた⁴⁾。今回の検討では、PAFレセプターの阻害による菌の上皮接着阻害の程度が、両菌とも菌株により異なる結果であった。PCとPAFレセプターの相互作用による菌の上皮接着への関与の程度は、菌株により異なることが示された。SpnではPC以外にEnolase, GAPDH, PsaA, PspC, Pneumolysin⁵⁾など、Hinfについてはpili, OMP-5, β -glucan, OMP-2, OMP-6⁶⁾などの接着因子が存在する。PAFレセプターの阻害により接着が阻害されな

い菌株では、これらの接着因子の関与が大きいものと推察される。今回の検討では上皮側の検討は行っておらず、今後、上皮側の受容体の発現についての検討も必要と考える。

ワクチンにより中耳炎を予防する場合、上咽頭の細菌叢を壊さず、より病原性の高い菌にのみ作用するものが望ましい。PCは細菌表面に位相変異により表出され、その病原性に関係していると考えられている。PCとPAFレセプターの相互作用阻害により上皮接着が抑制される菌株が、より病原性が高い菌株であるかの検討が必要である。また、同一菌株でも位相によるPC発現量の変化と上皮接着性および病原性の関連性についても今後検討する予定である。

文 献

- 1) Eskola J, Kilpi T, Palmu A, et al: Finnish Otitis Media Study Group. Efficacy of a pneumococcal conjugate vaccine against acute otitis media. N Engl J Med 344 : 403-409, 2001.
- 2) Cundell DR, Gerard NP, Gerard C, et al: Streptococcus pneumoniae anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. Nature 377 : 435-438, 1995.
- 3) Gould, J. and Weiser, J: The Inhibitory Effect of C-Reactive Protein on Bacterial Phosphorylcholine Platelet-Activating Factor Receptor -Mediated Adherence Is Blocked by Surfactant. J Infect Dis 186 : 361-371, 2002.
- 4) Tanaka N, Fukuyama S, Fukuiwa T, et al: Intranasal immunization with phosphorylcholine induces antigen specific mucosal and systemic immune responses in mice. Vaccine 25 : 2680-2687, 2007.
- 5) Hammerschmidt S: Adherence molecules of pathogenic pneumococci. Curr Opin Microbiol 9 : 12-20, 2006.
- 6) Erwin AL and Smith AL: Nontypeable

**Haemophilus influenzae: understanding
virulence and commensal behavior. Trends
Microbiol 15 : 355-362, 2007.**

連絡先：川畠雅樹

〒 890-8520

鹿児島市桜ヶ丘 8-35-1

鹿児島大学医歯学総合研究科聴覚頭頸部疾患学

TEL 099-275-5410 FAX 099-264-8296

E-Mail supercar@almond.ocn.ne.jp