

総説

髄膜炎発症機序の解析

宮崎 修一

東邦大学大学院医学研究科先端医科学研究センター教授

要約：髄膜炎の発症機序は明らかになっておらず，特に小児髄膜炎は死亡率が高くかつ後遺症を残す患者が多い．そこで，髄膜炎の発症機序の解析を行うために髄膜炎モデルの確立を行った．小児に髄膜炎や呼吸器感染症を起こす特性のある *Haemophilus influenzae* を用いて，細胞に付着・侵入した cell-bound organism (CBO) を感染菌とすることで呼吸器感染症モデルを確立した．さらにこのモデルを応用し，髄膜炎モデルの作製を試みた．血中に直接 CBO を接種しても髄膜炎を起こすことはできず，経鼻感染し呼吸器感染症を起こすことにより，二次感染症として髄膜炎を起こすことが可能となった．次に，このモデルを用いて髄膜炎発症機序の解析を進めた．呼吸器感染症を発症すると炎症性サイトカインを産生することから，ヒトの blood-brain barrier (BBB) 由来単層培養細胞を炎症性サイトカイン処理したところ，tumor necrosis factor alpha (TNF α) 処理によりこの単層培養細胞を通過する CBO 数が明らかに増加する成績を得た．CBO は細胞間壁を通過すると想定されることから，無処理および TNF α 処理単層培養細胞膜から蛋白質を抽出しその量的変動を調べた．その結果，TNF α 処理群では，細胞と細胞を接着する機能を持つ zyxin が減少していた．さらに，この zyxin^{-/-}マウスを作製して CBO を経鼻感染させたところ，親マウスに比べ死亡率が明らかに高くなり，BBB に存在する zyxin の減少が BBB 間壁の脆弱化をもたらすことで髄膜炎を起こしやすくすることを明らかにした．

東邦医学会誌 60(3) : 168-173, 2013

索引用語：インフルエンザ菌，髄膜炎，zyxin，CBO

感染症の予防対策の構築や新たな治療法を開発するためには，感染症モデルを作製して発症機序を解析する必要がある．全世界における小児感染症死亡者の約 30% を占め，かつ後遺症を生じやすい髄膜炎に関しても，1980 年代，予防対策構築のため感染モデルの確立が待望されていた^{1,2)}．小児髄膜炎や呼吸器感染症の原因菌として知られている *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) をはじめ微生物による髄膜炎の解析は当時，病原体を直接実験動物の髄液中に接種する方法で検討されていた．さらに *H. influenzae* による呼吸器感染モデルについても，好中球減少症(免疫抵抗性減弱)マウスや *H. influenzae* 菌を軟寒天 (agar beads) で包んだ方法による報告がなされていた³⁻⁵⁾．しかし，これら 2 つの方法を試したがモデルを再現することは

困難であった．

髄膜炎は原発巣の影響を受けた二次感染症であるとの仮説をたて，まず呼吸器感染症モデルの作製に着手した．感染症の解析用モデルには「ヒトと同様の感染様式であり，かつ症状が現れること」「患者と同様の応答があること」が必須条件であると考え，種々の検討を加えた．その結果，細胞に侵入した菌 (cell-bound organism : CBO) を用いることにより呼吸器感染症モデル，さらには髄膜炎モデルを作製することに成功した．以下は，モデル作製過程と今までに解析できた髄膜炎発症機序についての概要である．

CBO を感染菌とした呼吸器感染症モデルの作製

扁桃などの常在菌である *H. influenzae* による呼吸器感染

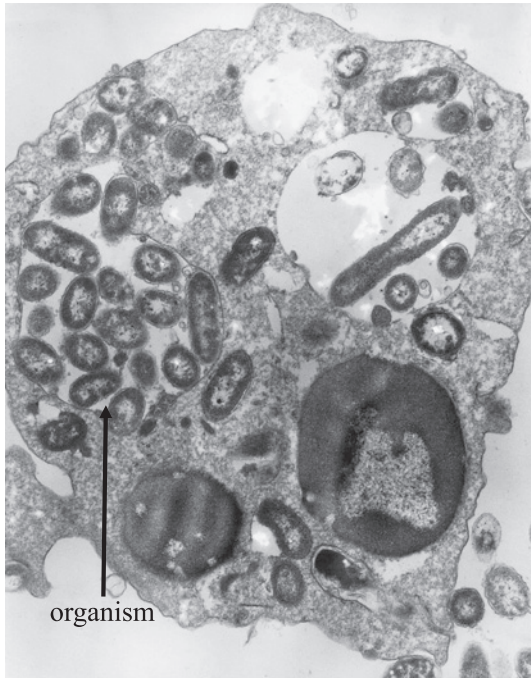


Fig. 1 The intracellular organism in a macrophage

A mixture of *Haemophilus influenzae* organisms and macrophages was incubated in a CO₂ incubator at 35°C for 4 h. After incubation, a sample was observed by transmission electron microscopy (×5000).

症モデルを作製するにあたり、本菌種に関する文献検索を行った。すると、培養細胞に本菌を添加すると細胞内に侵入するという報告、および感染症以外の疾患患者から摘出した扁桃組織中に常在菌である本菌種が細胞内寄生していたという報告があった^{6,7)}。これらの基礎的・臨床的報告は「本菌種が細胞内に寄生できる」という事実を示している。この事実に基づき、培養細胞に *H. influenzae* 菌を添加して一定時間 CO₂ 培養器内に置くと、菌が培養細胞内に侵入することを確認できた (Fig. 1)。このような細胞内に侵入または細胞に付着した状態の菌を CBO と名づけた。 *H. influenzae* 菌が細胞内に侵入するのは、菌にとって都合の良い何らかの目的があるからであろうと想定し、その目的が何かを検討した。その結果、本菌種は血清殺菌や好中球の貪食殺菌作用を受けやすいという性状を持っているが、細胞内に侵入した菌はこれらの殺菌作用から免れることが明らかとなった⁸⁾。次に、 *H. influenzae* 菌による呼吸器感染症のほとんどは莢膜を持たない株によって発症していることから、莢膜非保有株を用いた CBO をマウスに経鼻感染させた⁹⁾。菌は呼吸器系組織で感染 7 週間後まで増殖し、以後減少した。同時に血清中の抗体価を測定すると、immunoglobulin M (IgM) 量は感染 3 日後から出現増加して感染 7 日後より減少に転じ、immunoglobulin G (IgG) 量は

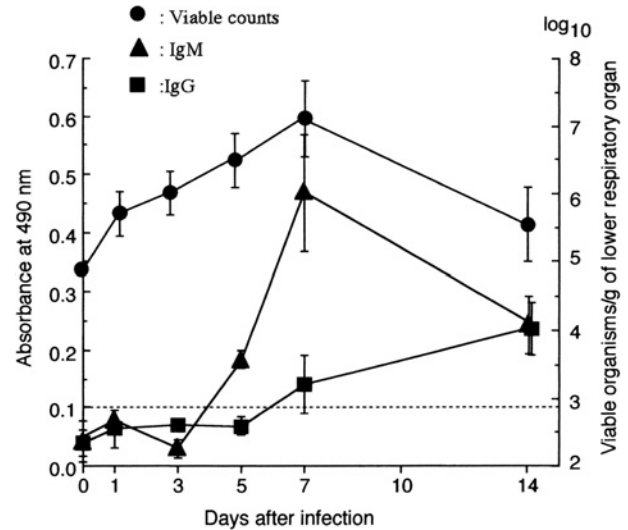


Fig. 2 Viable organisms in lower respiratory organs and humoral response at various times after inoculation.

Mice were inoculated with 10⁵ cfu of *Haemophilus influenzae* TUM8. On days 0, 1, 3, 5, 7, and 14 after infection, groups of 5 mice were killed to count viable bacteria in lower respiratory organs and measure immunoglobulin G (IgG) and immunoglobulin M (IgM) content in serum. The bar indicates standard deviation (SD). Mouse fetal lung cells were used to prepare a suspension of cell-bound organisms.

感染 5 日後から漸次増加し、IgG の増加に伴い菌数は減少した (Fig. 2)¹⁰⁾。感染モデルにおいて得られた生菌数の変動やそれに対する IgG 量の変動、ならびに IgG より先に IgM が出現するという成績は、ヒトにおける呼吸器感染症患者での病態と類似している。また、確立した *H. influenzae* 菌による呼吸器感染症モデルを用いて抗菌薬の *in vivo* 評価等ができることを確認し報告している¹¹⁾。

二次感染症としての髄膜炎モデルの作製

呼吸器感染症モデルを応用して髄膜炎モデルの作製を検討する前に、呼吸器感染症は莢膜を持たない株で発症するが、髄膜炎は莢膜 b 型株で発症することに着目し、この莢膜 b 型株の細胞への付着・侵入能について *in vitro* で検討した。その結果、莢膜 b 型株の細胞への付着・侵入能は莢膜を持たない株に比べ明らかに低かったが、付着・侵入可能であることを確認した⁹⁾。次に、この莢膜 b 型株による CBO をマウス静脈内に直接接種したが髄膜炎は発症しなかった。CBO 単独では blood-brain barrier (BBB) を通過できないというこの結果を受け、原発巣で産生された炎症性サイトカインが血流により BBB に到達して BBB に変化を起し、CBO が通過しやすくなっているのではないかと考えた。この仮説に基づき呼吸器感染症モデル同様に CBO を経鼻感染させたところ、呼吸器系組織の hematoxylin-eosin (HE) 染色標本および感染後の菌数変

Table 1 Effect of vaccines on mortality rate in mice infected with *Haemophilus influenzae*

(a) Mortality rate				(b) Quantitation of immunoglobulins in serum of mice 7 days after last injection of HbOC vaccine					
Vaccine	Trade name	Dose	Mortality ^a (%)	Dose	Average (range) in mg/l				
					IgG	IgM	IgA		
Large challenge dose									
HbOC	HibTITER [®]	1	14/47 (30)	1	0.026	0.220	0.172		
		2	8/47 ^b (17)		(0.003-0.08)	(0.071-0.308)	(0.094-0.261)		
		3	11/50 ^b (22)						
Control	—	—	18/40 (45)	2	0.259 ^a	1.271 ^b	0.177		
		PRP-T	ActHIB [®]		1	19/50 (38)	(0.008-0.539)	(0.207-2.402)	(0.123-0.261)
					2	10/50 ^b (20)			
		3	9/50 ^b (18)	3	0.361 ^a	0.477	0.124		
					(0.03-0.539)	(0.071-1.291)	(0.065-0.224)		
Small challenge dose									
Control	—	—	20/45 (44)						
HbOC	HibTITER [®]	1	2/40 ^b (5)						
		2	3/40 ^b (8)						
		3	4/40 ^b (11)						
PRP-T	ActHIB [®]	1	3/40 ^b (8)						
		2	5/40 ^b (13)						
		3	3/40 ^b (8)						
Control	—	—	10/36 ^c (28)						

^aNumber of dead mice/number of test mice.

^bp<0.05, compared with saline-injected control.

^cp<0.05, compared with control in large challenge dose.

動成績から呼吸器感染症を起こしていることを確認した。同時に血中の炎症性サイトカイン量を測定したところ、interleukin-1 (IL-1) は感染1日後、tumor necrosis factor alpha (TNF α) は感染3日後、IL-6 は感染5日後から検出された。また感染3日後より、呼吸器感染モデルでは認められなかった血液および脳内から菌が検出されるマウスがみられ、かつ死亡するマウスを認めた。この成績は、呼吸器感染症から髄膜炎へ波及したことを示している。こうして髄膜炎モデルが確立したちょうどその頃欧米2社が開発していた *H. influenzae* 菌ワクチンの有効性について、この髄膜炎モデルを用いて評価を行った。その結果、両ワクチン投与群ではワクチン無投与群に比べ有意差をもって死亡率の減少が認められた (Table 1a)¹²⁾。これらワクチン投与群のマウス血中 IgG および IgM 抗体価を測定した結果、死亡率の減少した群では血中 IgG 抗体価がワクチン無投与群に比べ明らかに高くなっていった (Table 1b)。この IgG 抗体価の上昇により死亡率が減少したことが裏付けられ、確立した髄膜炎モデルはワクチン有用性の評価等に応用可能であることが示された。この時検討したワクチンが現在市販されているヒブワクチンである。

髄膜炎を起こしやすくする炎症性サイトカインの解析

髄膜炎を起こしやすくする炎症性サイトカインについて

in vitro で解析した。血中から感染菌が検出された感染3日後の血中 IL-1 β 、TNF α および IL-6 濃度はそれぞれ 3890 \pm 1120 pg/ml, 375 \pm 195 pg/ml, 検出限界以下であった。これら炎症性サイトカインまたは *H. influenzae* 菌外膜にある lipopolysaccharide (LPS) が CBO の BBB 通過を促進している可能性があると考え、BBB 由来細胞による単層培養細胞を BBB と想定してあらかじめサイトカインや LPS 処理し単層培養細胞を通過する CBO 数を測定した。その結果、IL-1 および LPS をそれぞれ最終濃度 10 ng/ml と 1 mg/ml で処理しても通過する CBO 数は無処理群とほぼ同等であったが、最終濃度 1 ng/ml の TNF α 処理群では無処理群の2倍以上であった。さらに、処理する TNF α 濃度と通過 CBO 数との間には相関性が示された。

以上の成績は、髄膜炎発症と TNF α との間には密接な関係があることを示唆している。

BBB の間壁を脆弱化する zyxin

TNF α 処理により BBB 由来細胞から成る単層培養細胞を通過する CBO 数が増加した要因について解析を行った。BBB を通過する際、CBO は細胞間壁を通過すると考えられている。TNF α 処理することによりこの細胞間壁の接着に関わる蛋白質に変化が起り、接着能が減弱化することで間壁が脆弱化し、CBO が通過しやすくなったと想定した。そこで無処理および TNF α 処理単層培養細胞

の細胞膜から蛋白質を抽出し、その量的変動を2次元電気泳動で調べた。この中で蛋白質量が1.5倍以上増減している50種類以上の蛋白質の同定を行い、細胞と細胞の接着および細胞の形態維持に関わると報告されているzyxinが半減していることに着目した。そこで、zyxinの発現を支配している messenger ribonucleic acid (mRNA) レベルについて検討した結果、mRNA量も蛋白質量同様にはほぼ半減していることを確認した。以上の成績を基に、zyxin^{-/-}マウスを作製すると髄膜炎発症におけるzyxinの重要性がより明らかになると考え、C56BL/6Jマウスからzyxin^{-/-}マウスを作製し髄膜炎の発症率について検討した。

zyxin^{-/-}マウスにおける髄膜炎発症率

親マウスであるC56BL/6Jマウスとzyxin^{-/-}マウスに経鼻感染させた後に死亡率を検討した結果、それぞれ20%と50%であり、knockout (KO) マウスでの死亡率が高くなった。この成績は、CBOがKOマウスのBBBを通過しやすくなっていることを示している。また、死亡直前または死亡直後のマウスの呼吸器組織および脳内生菌数を測定した結果、菌数的には親マウスとzyxin KOマウスの2群間に差は認められなかった。この成績から、親マウスとKOマウス両群の呼吸器感染症および髄膜炎の発症能には差がないと考えられる。

以上、呼吸器感染症モデルと髄膜炎モデルの確立過程および発症機序について述べたが、感染予防法構築に向け今後このモデルを用いてさらなる解析を加えたい。

文 献

- 1) Levy O: Innate immunity of the newborn: Basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol* **7**: 379-390, 2007
- 2) Velilla PA, Rugeles MT, Choungnet CA: Defective antigen-presenting cell function in human neonates. *Clin Immunol* **121**: 251-259, 2006
- 3) Maciver I, Siverman SH, Brown MRW, et al.: Rat model of chronic lung infectious caused by nontypable *Haemophilus influenzae*. *J Med Microbiol* **35**: 139-147, 1991
- 4) Slater LN: A rat model of prolonged pulmonary infection due to nontypable *Haemophilus influenzae*. *Am Rev Respir Dis* **142**: 1429-1435, 1990
- 5) Smith GM, Abbott KH: Development of experimental respiratory infections in neutropenic rats with either penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* or β -lactamase-producing *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* **38**: 608-610, 1994
- 6) St. Geme JW III, Falkow S: *Haemophilus influenzae* adheres to and enters cultured human epithelial cells. *Infect Immun* **58**: 4036-4044, 1990
- 7) Forsgren J, Samuelson A, Ahlin A, et al.: *Haemophilus influenzae* resides and multiplies intracellularly in human adenoid tissue as demonstrated by *in situ* hybridization and bacterial viability assay. *Infect Immun* **62**: 673-679, 1994
- 8) Miyazaki S, Matsumoto T, Furuya N, et al.: The pathogenic role of fimbriae of *Haemophilus influenzae* type b in murine bacteremia and meningitis. *J Med Microbiol* **48**: 383-388, 1999
- 9) Miyazaki S, Matsunaga T, Kobayashi I, et al.: The other mediator for adherence of *Haemophilus influenzae* organisms without involvement of fimbriae. *Microbiol Immunol* **36**: 205-212, 1992
- 10) Miyazaki S, Nunoya T, Matsumoto T, et al.: New murine model of bronchopneumonia due to cell-bound *Haemophilus influenzae*. *J Infect Dis* **175**: 205-209, 1997
- 11) Miyazaki S, Hosoyama T, Furuya N, et al.: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of L-084, a novel oral carbapenem, against causative organisms of respiratory tract infections. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 203-207, 2001
- 12) Miyazaki S, Shintani M, Matsumoto T, et al.: Comparative evaluation of conjugate vaccines in the *Haemophilus influenzae* infection model. *Can J Microbiol* **46**: 358-362, 2000
- 13) Miyazaki S, Nunoya T, Matsumoto T, et al.: Lipooligosaccharide indirectly enhances inflammatory lesions in lungs as a primary infection site by non-encapsulated and type B *Haemophilus influenzae* through production of cytokines. *Cytokine* **15**: 171-174, 2001

Mechanism of Bacterial Meningitis

Shuichi Miyazaki

Professor, Division of Microbiology and Immunology, Center for Advanced Research,
Graduate School of Medical Science, Toho University

ABSTRACT: Meningitis remains a dangerous disease, especially in young children (among whom it is associated with high mortality). Many patients suffer sequelae despite successful treatment of inflammation. Because the mechanism of meningitis is unknown, we attempted to develop an animal model of meningitis for future study. *Haemophilus influenzae* causes meningitis and respiratory infection in young children, so a model of respiratory infection was developed by means of intranasal inoculation of cell-bound organisms (CBOs). We then established a meningitis model, using CBOs as infectious organisms. In the model, secondary meningitis developed after respiratory infection caused by inoculating CBOs via intranasal, but not intravenous, inoculation. Inflammatory cytokines were induced by primary infection (such as respiratory infection), so monolayer cells derived from the human blood-brain barrier were treated with various inflammatory cytokines. As compared with an untreated monolayer, the number of CBOs passing through a tumor necrosis factor alpha (TNF α)-treated monolayer appeared to be higher. An assay of proteins extracted from TNF α -treated cell membranes showed a lower zyxin content as compared with untreated cell membranes. In addition, the mortality rate in zyxin^{-/-} mice was higher than that in parent mice. The present results suggest that zyxin is a key protein in meningitis development.

J Med Soc Toho 60 (3): 168–173, 2013

KEYWORDS: *H. influenzae*, meningitis, zyxin, CBO

宮崎修一教授 略歴

- 1950年 6月 24日生
1969年 4月 岐阜大学農学部獣医学科入学
1973年 3月 同 卒業
4月 大阪府立大学大学院農学研究科獣医学専攻修士課程入学
8月 獣医師国家試験合格（登録番号第12662号）
1975年 3月 大阪府立大学大学院農学研究科獣医学専攻修士課程修了
4月 同 博士課程入学
1978年 3月 同 博士課程修了
農学博士（大阪府立大学甲第143号）
4月 東邦大学医学部微生物学講座助手（現助教）
1985年 5月 医学博士（東邦大学乙第1070号）
1986年 1月 東邦大学医学部微生物学講座講師
9月 米国 Thomas Jefferson University 海外出張
（1987年8月まで）
1997年 4月 東邦大学医学部微生物学講座助教授（現准教授）
2005年 4月 同 微生物・感染症学講座助教授（現准教授，組織名称変更）
2010年 4月 東邦大学大学院医学研究科先端医科学研究センター教授，
先端医科学研究センター長兼任
現在に至る

受賞

- 1987年 4月 日本感染症学会第32回二木賞
1998年11月 平成10年度東邦医学会賞

専攻分野

感染免疫学

主な学会役職

日本感染症学会評議員，日本環境感染学会評議員・用語委員会副委員長・編集委員長・学会賞選考委員会委員長・理事，日本化学療法学会評議員・PK/PD検討委員会委員・編集委員長・学会賞選考委員・用語委員会委員，日本臨床腸内微生物学会評議員，Editorial Board Member for Journal of Infection and Chemotherapy, The member of organizing committee of 23rd International Congress of Chemotherapy, Editorial Board Member for ASNInet, Editorial Board Member for Clinical & Experimental Immunology, Editorial Board Member for Journal of Innate Immunity

主な公的研究費など

文部科学省科学研究費補助金（基盤研究C），東邦大学大学院医学研究科推進研究費，文部科学省私立大学戦略的研究基盤支援事業