

Haemophilus Influenzae 菌による 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感染・免疫学部門教授

要約：インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) の付着・侵入した上皮細胞 (cell-bound organism : CBO) が剥離して気管に入り、宿主の防御メカニズムから逃れて下気道に定着することで感染が引き起こされると考え「CBOによる気管支肺炎モデル」を樹立した。この気管支肺炎が髄膜炎に至るには、原因病原体が脳脊髄関門 (blood-brain barrier : BBB) を通過する必要があるため、次に、病原体の BBB 通過メカニズム解明を目指した。そこで、髄膜炎モデルマウスの血中サイトカインである tumor necrosis factor alpha (TNF α), interleukin (IL)-1 β , IL-6 量を測定したところ、マウスが死亡し始める時期と TNF α が上昇する時期が一致していた。また、human brain microvascular endothelial cell (HBMEC) を用いて解析した結果、TNF α 前処理した単層培養細胞を通過する CBO 数は IL-1 β や IL-6 で前処理した場合より有意に多いことが明らかとなった。ここで、TNF α 処理 HBMEC の膜構成蛋白質で抽出量が無処理群に比べ 1.5 倍以上増減した 41 種類の中から細胞と細胞の接着に関与しているとされる zyxin に着目した。Zyxin 遺伝子欠損マウスを用いると、髄膜炎発症率が野生型に比べ有意に高くなった。一方、野生型や zyxin 遺伝子欠損マウスに CBO を静脈内接種するだけでは髄膜炎発症を認めなかった。これらのことから髄膜炎発症には、原発巣で産生された TNF α が血流を介して BBB に到達することが重要であり、その結果 TNF α の働きで zyxin が減少し BBB 通過が容易になることで髄膜炎の発症に至ることが判明した。

東邦医学会誌 63(1) : 25-30, 2016

索引用語：髄膜炎, cell-bound organism (CBO), 脳脊髄関門, tumor necrosis factor alpha (TNF α), ジキシン

インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae* : *H. influenzae*) は、ヘモフィルス属の代表的なグラム陰性小桿菌で、特に幼児・小児の化膿性髄膜炎の原因として重要な位置にある。本菌種は莢膜型と無莢膜型に分類され、無莢膜型 *H. influenzae* (non-typeable *H. influenzae* : NTHI) は健常者の 40~80% が保菌しており、主として中耳炎、副鼻腔炎、気管支炎などの表在性感染症を引き起こす。莢膜型は a~f の 6 種類の血清型があり、化膿性髄膜炎、喉頭蓋炎、肺炎などの侵襲性感染症を引き起こす。特に細菌性髄膜炎の原因菌は *H. influenzae* が 57%、肺炎球菌が 19% と半数以上が *H. influenzae* とされている¹⁾。さらに 5 歳までの小児のうち年間約 600 人が本菌による髄膜炎を発症すると推

定され、25% には聴覚障害、神経学的障害、発達遅延など何らかの後遺症が残り、致死率 5% との報告もある²⁾。この予後の悪い感染症の 95% は b 型によって引き起こされ、侵襲性 *H. influenzae* 感染症の 90% を占める化膿性髄膜炎の分離菌の 97% は *H. influenzae* type b (Hib) であった³⁾。

莢膜の存在する菌は好中球の貪食から免れているが、莢膜に抗体が結合し、補体が結合すると好中球がオプソニン化され、好中球に貪食されるようになる。莢膜はポリサッカライドからなり、これらに対する抗体は immunoglobulin (Ig) G2 (IgG2) 分画に属している。この分画は母から児へ移行するが、移行する量が IgG1 とは異なり成人の 60%

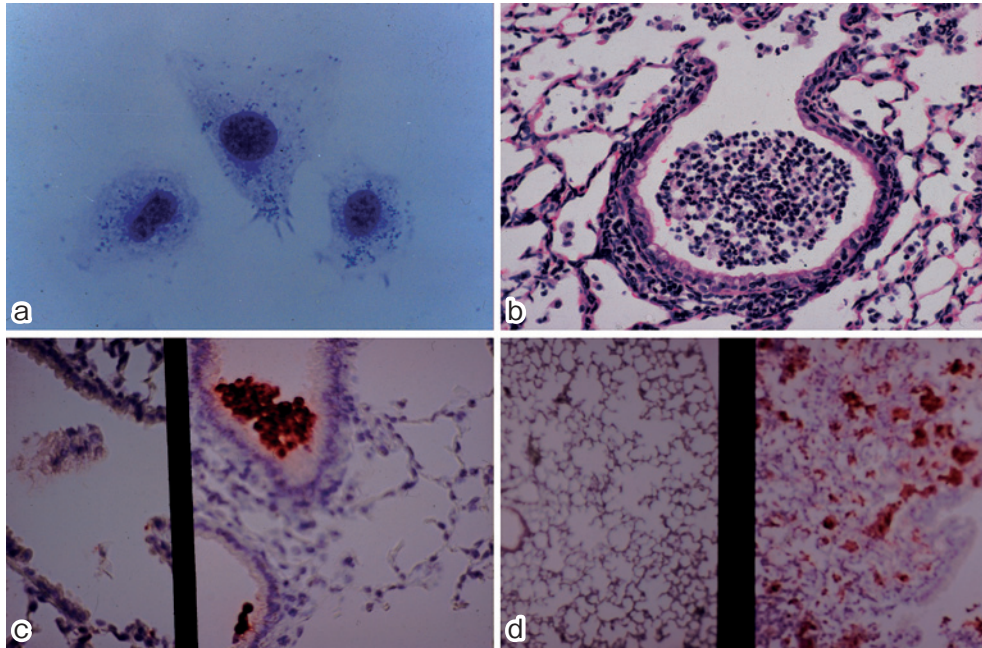


Fig. 1

- a: Cell-bound organisms (CBOs) as an inoculum.
 b: Secondary bronchial mucosa and pneumonic focus in mice infected with non-typeable *Haemophilus influenzae* (NTHI) as a CBO.
 c, d: Immunohistochemical detection of the bacterial antigen of *Haemophilus influenzae*.

ほどであり、生後3カ月頃に消失する。乳幼児ではIgG2分画に属する抗体の産生能が低いため、Hibによる髄膜炎の発症頻度が高いとされてきた。この分画に属する抗体産生能は4歳頃まで未成熟であることが、乳幼児にHib髄膜炎が多い重要な理由の1つである。

NTHIによる呼吸器感染症 発症機序の確立

1) *H. influenzae* の細胞への吸着

従来 *H. influenzae* の感染は、気道組織の上皮細胞へ菌体が吸着するという細菌定着機能により引き起こされると推察されてきた。NTHIの上皮細胞への吸着能はHibより高い事が既に報告されている⁴⁾。NTHI株とHib株それぞれ5株のmouse fetal lung cell細胞への吸着・侵入した菌数を比較した結果、NTHI株の吸着・侵入菌数がHib株の15倍以上であり、NTHI株の吸着・侵入能力はHibに比ベ有意に高いことを確認した。この吸着に関わる物質を解析する目的で、NTHI株とHib株それぞれを超音波破碎後phosphate buffered saline (PBS)で抽出し、単層培養細胞をそれぞれの抽出物で前処理すると、NTHI株の吸着・侵入能力は75%以上阻止されたが、Hib株の吸着・侵入阻害割合は10~20%であった。さらに、熱処理した抽出

物での前処理では、吸着・侵入阻害効果は消失したことから、このアドヘジンは蛋白質と推定された。

2) マウス呼吸器感染症モデルの作製

呼吸器感染症モデルについては、気道粘液によるクリアランスを阻害するために、*H. influenzae*をアガービーズで包んだいくつもの報告がある⁵⁻⁷⁾。このアガー法では気管切開による接種と好中球減少症実験動物が使用されたが、下気道感染症発症への経過を生理的に再現するものではなかった。

一般に *Shigella* 属, *Legionella* 属, *Listeria* 属などの病原体は、細胞内寄生菌であることが広く知られている。単層培養細胞, cytochalasin Dおよびcolchicineを用いた検討により、NTHIも細胞に侵入することが報告された⁸⁾。またNTHIは、臨床的に感染を起こしていない子供の扁桃組織の細胞内に認めることが報告されている⁹⁾。これらの事象を基礎的に検討することで、*H. influenzae*の吸着・侵入した口腔咽頭の上皮細胞が剥離して気管に入り、宿主の防御メカニズムから逃れて下気道に定着することができるので最終的に感染を引き起こすという新しいモデルを確立した¹⁰⁾。

単層培養細胞に培養菌を加えて細胞に吸着・侵入したcell-bound organism (CBO)を作製し (Fig.1a)、気道障

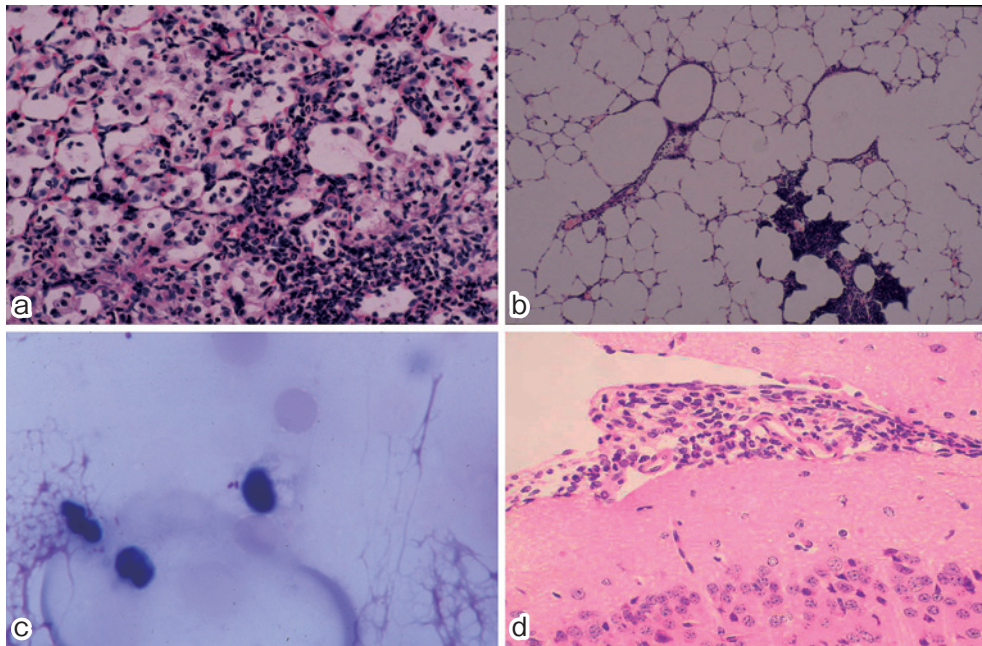


Fig. 2 Histopathologic characteristics of bronchopneumonia and brain/spinal marrow samples (Hematoxylin-Eosin (HE) staining)

a, b: Pneumonic focus showing alveolar exudates of neutrophils in mice infected with non-typeable *Haemophilus influenzae* (NTHI) (a) and *Haemophilus influenzae* type b (Hib) (b) as a cell-bound organism (CBOs).

c: Spinal fluid was obtained from a mouse by suboccipital puncture.

d: A brain/spinal marrow sample showing neutrophils in mice infected with Hib.

害3日後マウスに経鼻感染した。感染後下気道組織におけるNTHI菌数は漸次増加し、感染7日目には組織1gあたり 10^7 cfuとなり、以後次第に減少した。組織学的解析においても、感染3日後の肺や気管支組織のHematoxylin-Eosin (HE)染色像を観察し、炎症性細胞浸潤を確認した (Fig. 1b)。さらに、免疫組織分析により、これら組織病変が*H. influenzae*抗原と関連していることを明らかにした (Fig. 1c, d)。さらに、免疫応答についても解析し、正常にIgG, immunoglobulin M (IgM)が産生されていることを確認した。

このように、アガービーズの代わりに細胞に吸着・侵入した*H. influenzae*を経鼻感染させることで気管支肺炎を引き起こす新しいモデルを樹立した。

Hibによる髄膜炎発症機序の確立

1) 感染時のサイトカインの役割

NTHIに感染したマウスの気管支や隣接する肺胞は、炎症性細胞で満たされており、Hib感染時の組織病理学的所見は限局した肺炎巣を示す (Fig. 2a, b)。しかし、免疫システムの活性化や炎症の促進における*H. influenzae*のリポオリゴサッカライド (lipooligosaccharide : LOS) の

関与を裏付ける成績はなく、さらに*H. influenzae*に感染した動物でのサイトカインの産生と効果は解明されていない。そこで、肺における組織病理学的な違いを明確にするため、NTHI770235f-b-株とHib770235f-b+株を用いて、気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid : BALF) と血清中のサイトカイン量の変動と病理組織学的相違との関係を解析した。いずれの株に感染したマウス肺の生菌数もほぼ同じであった。Hib株感染マウスにおいて、感染に用いた菌体が血液/脳検体中に確認されており、組織学的にも菌血症および髄膜炎モデルとして成立していることを確認した (Fig. 2c, d)。

BALF中のtumor necrosis factor alpha (TNF α)はNTHI770235f-b-株に感染5時間目から検出できるようになるが、24時間経過すると検出できなくなった。

Hib770235f-b+株感染では、感染後72~168時間まで低濃度のTNF α を検出した。Interleukin (IL)-6は、NTHI770235f-b-株感染5時間後に検出され、24時間後には検出できなくなった。さらに、IL-1 β 産生は、NTHI770235f-b-株に感染したほうが、Hib770235f-b+株に感染した群に比べ早期に産生された。一方、血清中のTNF α はNTHI770235f-b-株では24時間から72時間までしか検出され

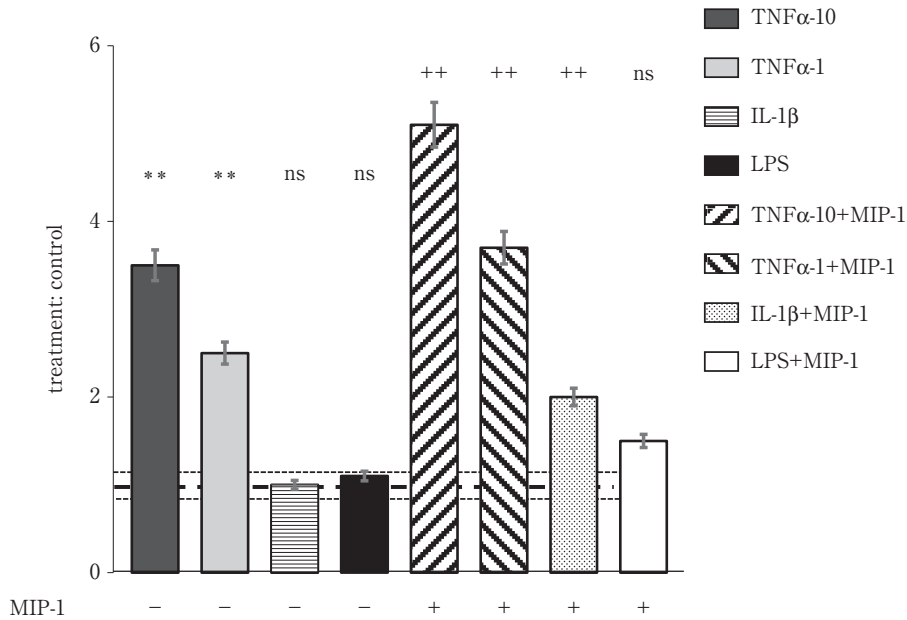


Fig. 3 Treatment of human brain microvascular endothelial cells (HBMECs) and the ability of cell-bound organisms (CBOs) to transmigrate. Mean values of CBO transmigration in treated cells normalized to the null treatment control.

TNFα: tumor necrosis factor alpha, IL: interleukin, LPS: lipopolysaccharide, MIP: macrophage inflammatory protein

なかった。Hib770235f-b+株群では TNFα は NTHI770235f-b-株よりもさらに遅れて出現した。この実験において、感染したマウスの血清中の IL-1β, TNFα, IL-6 の出現はそれぞれ感染後 1 日後, 3 日後, 5 日後に始まり, マウス血清中の TNFα の出現は髄膜炎によってマウスが死亡し始める時期と一致していた。

2) CBO の HBMEC 細胞単層培養通過へのサイトカインや LPS の効果

Blood-brain barrier (BBB) は、循環と中枢神経系の間で構造的・機能的界面となっている。髄膜炎を発症する際にはさまざまな病原体が BBB を通過・侵入し、細胞間や傍細胞経路を通して、また感染した食細胞によって中枢神経組織に感染を引き起こす。この BBB の透過性を調整する因子として、TNFα, IL-1β, IL-6, interferon-gamma (INF-γ) などいくつかの炎症性サイトカインが増加することが示唆された。筆者も病原体の BBB 通過において、これらサイトカインおよび lipopolysaccharide (LPS) が何らかの役割を果たしていると考えた。BBB を構成する human brain microvascular endothelial cell (HBMEC) 単層培養細胞を用いて、これら物質の CBO 通過への影響を検討した。TNFα で前処理した HBMEC 単層培養を通過する CBO 数は、IL-1β や LPS で前処理した細胞層通過よりも有意に多かった (Fig. 3)。さらに、CBO の通過細胞数は

TNFα の濃度と相関していた。これらの成績から、TNFα が CBO の BBB を通過して髄液内に侵入するのを容易にしていることが示唆された。

3) TNFα 処理 HBMEC 細胞膜から抽出した膜成分のプロテオーム解析

BBB の tight junction は、オクルディンやクローディンと言った膜蛋白質によって構成されている。急性肝不全の発症時における BBB の通過性の上昇は、血清中の抗 TNFα IgG 抗体によってブロックされる¹¹⁾。TNFα によって発現の変化する蛋白質を同定するため、TNFα に暴露または非暴露の HBMEC 単層培養の膜抽出物をプロテオミクス解析した。41 種類の蛋白質が、TNFα に暴露されたものの方が無処理群に比べ 1.5 倍以上の増減変化があった。37 種類の蛋白質が同定でき、注目すべき蛋白質は moesin と zyxin で共に産生量が 1.8 倍減少していた。Moesin は細胞の機能や形態の調整に関与し、zyxin は細胞の形態の他に細胞と細胞の接着に深く関与していると考えられている。この zyxin 量が TNFα 処理を受けて減少することで、菌の BBB 通過性が増大している可能性を想定した。そこで、さらに TNFα 処理した HBMEC を用い、real time-polymerase chain reaction (RT-PCR) により zyxin 転写発現を測定し、蛋白質での減少と同様に、コントロールに比べ 1.5 倍減少していることを確認した。

4) マウス髄膜炎モデルにおける zyxin の役割

C57BL/6J と zyxin 遺伝子欠損 C57BL/6J マウスに CBO を経鼻または静脈内接種した。経鼻接種における死亡率は、野生型マウスでは 20%、zyxin 遺伝子欠損マウスでは 50% であり、zyxin 遺伝子欠損マウスの死亡率が有意に高かった。死亡マウス脳からは接種した Hib 生菌が組織 1 g あたり $10^3 \sim 10^4$ 検出された。しかし、CBO を静脈内接種したマウス血中から速やかに菌が消失し脳から菌は検出されず、初感染巣に起因して産生される TNF α による zyxin の減少を誘発することが髄膜炎発症には必要であることが示唆された。

5) この髄膜炎モデルを用いたワクチンの評価

本研究により髄膜炎の発症機序が解析できたと考えている¹²⁾。細胞内に寄生することで宿主の免疫機能から免れた *H. influenzae* が、下気道に到達して下気道感染症（初感染）を起こす。その感染組織で産生されたサイトカインの 1 つである TNF α が血流を介して BBB に到達し、BBB 構成細胞の膜にある zyxin を減少させる。その結果、BBB 通過性が亢進して CBO が髄液中に侵入でき髄膜炎が発症するというプロセスが解明できた。樹立したこの髄膜炎発症モデルを用いることで、現在世界中で使用されている Hib ワクチンの有用性を実証することができるようになり、Hib による乳幼児髄膜炎の予防が可能になったことは幸いである。

文 献

- 1) 砂川慶介, 生方公子, 千葉菜穂子, ほか: 本邦における小児細菌性髄膜炎の動向 (2005~2006). 感染症誌 **82**: 187-197, 2008
- 2) 砂川慶介, 野々山勝人, 大石智洋, ほか: 本邦における小児化膿性髄膜炎の動向 (2003~2004). 感染症誌 **80**: 27-38, 2006
- 3) Shinjoh M, Iwata S, Yagihashi T, et al: Recent trends in pediatric bacterial meningitis in Japan—a country where *Haemophilus influenzae* type b and *Streptococcus pneumoniae* conjugated vaccine have just been introduced. *J Infect Chemother* **20**: 477-483, 2014
- 4) LiPuma JJ, Gilsdorf JR: Structural and serological relatedness of *Haemophilus influenzae* type b pili. *Infect Immun* **56**: 1051-1056, 1988
- 5) Maciver I, Silverman SH, Brown MRW, et al: Rat model of chronic lung infections caused by non-typable *Haemophilus influenzae*. *J Med Microbiol* **35**: 139-147, 1991
- 6) Slater LN: A rat model of prolonged pulmonary infection due to nontypable *Haemophilus influenzae*. *Am Rev Respir Dis* **142**: 1429-1435, 1990
- 7) 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
- 8) St Geme JW 3rd, Falkow S: *Haemophilus influenzae* adheres to and enters cultured human epithelial cells. *Infect Immun* **58**: 4036-4044, 1990
- 9) 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
- 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) Erwin AL, Smith AL: Nontypable *Haemophilus influenzae*: Understanding virulence and commensal behavior. *Trends Microbiol* **15**: 355-362, 2007
- 12) Miyazaki Y, Yusa T, Matuo S, et al: Zyxin modulates the transmigration of *Haemophilus influenzae* to the central nervous system. *Virulence* **5**: 665-672, 2014

Mechanism by which *Haemophilus Influenzae* Causes Meningitis

Shuichi Miyazaki

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

ABSTRACT: First, a murine model of bronchopneumonia utilizing intranasal instillation of *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) as a cell-bound organism (CBO) was established. Then, meningitis due to *H. influenzae* type b was established, and levels of tumor necrosis factor alpha (TNF α), interleukin (IL)-1 β , and IL-6 in sera collected from mice with meningitis were assayed. The commencing time of mice that died from meningitis was associated with the increasing time of TNF α in murine sera. Analysis of membranous extract from a TNF α -treated human brain microvascular endothelial cell monolayer revealed 41 differentially expressed proteins. Zyxin, which is thought to be essential for tight cell-cell junctions, decreased by 1.8 fold. Intranasal instillation of CBOs in zyxin-deficient mice resulted in a significantly higher mortality rate as compared with wild-type mice. Finally, TNF α produced respiratory infection as the primary infection reached the blood-brain barrier (BBB) and reduced zyxin levels in BBB cell membranes.

J Med Soc Toho 63 (1): 25-30, 2016

KEYWORDS: meningitis, cell-bound organism (CBO), blood-brain barrier (BBB), tumor necrosis factor alpha (TNF α), zyxin