

## 論文の内容の要旨

論文題目 脾摘後重症感染症(Overwhelming PostSplenectomy  
Infection (OPSI))を中心とした肺炎球菌感染症に対するガンマグロ  
ブリン投与における、肺炎球菌特異抗体/非特異抗体の意義の検討

氏名 中村謙介

肺炎球菌はマクロファージの貪食に抵抗する莢膜を持つ細菌で、現在でも死亡率の高い重症感染症を引き起こす。中でも脾臓摘出患者に生じる脾摘後重症感染症 Overwhelming postsplenectomy infection(OPSI) は、肺炎球菌を主として急激に菌血症となり悪化する極めて予後の悪い病態である。

脾臓は血液中の細菌を trap し貪食する主たる場である一方で、B 細胞が病原生物に対する特異抗体を産生する場としても重要であり、実際に OPSI の起炎菌は、莢膜があるがゆえに貪食に特異抗体を必要とする肺炎球菌が大半を占めている。特に脾臓中の marginal zone B (MZB) cell が血液中の菌に対する特異抗体産生の主役となり、脾摘患者は全身の MZB cell の大半を失い特異抗体産生が低下した状態といえることができる。

OPSI はワクチンなどによる予防策が推奨されガイドラインも作成されているが、ひとたび発症した後の治療として有効とされるものがないのが問題である。ガンマグロブリン投与 intravenous immunoglobulin (IVIG)などの特異抗体を補充する治療は、理論的に肺炎球菌を主とする OPSI の起炎菌の貪食を促進し有効であると考えられる。2つの他の OPSI モデルの動物実験で有効性は確認されているものの、作用機序について解析が行われたものは存在しなかった。

IVIG には様々な有効作用があると考えられており、特異抗体の補充以外にも抗炎症を主とした免疫修飾や補体活性化の抑制などが挙げられ、感染症だけでなく自己免疫疾患での利用を考慮して様々な解析が行われている。しかし IVIG の作用機序を特異抗体とそれ以外の非特異抗体に分けた解析はこれまでに行われていない。

そこで本研究は、肺炎球菌によるマウス OPSI モデルを作成し、IVIG の意義と作用機序に関して蛍光染色などを利用して検討した。また、菌特異抗体と非

特異抗体を分けた作用の解析を、新しい手法として菌を用いた免疫沈降法で全ての菌特異抗体を除去した IVIG を作成することで実現した。

8 週令 C57BL/6Jcl マウス♂に脾臓摘出または sham 手術を実施、4 週間後に肺炎球菌 ATCC6303 を静注し菌血症、OPSI モデルを作成した。それぞれに対してガンマグロブリン製剤 IVIG (human IgG) 300mg/kg の投与を行う IVIG 群を作成した。それぞれの群として、後述する IVIGdep を投与する群も含めて、1) Splenectomy (SPX) +IVIG; 2) SPX alone; 3) Sham operation (control) +IVIG; 4) Sham operation alone (control); and 5) SPX+IVIG<sub>dep</sub> の 5 群で検討を行った。

一方で IVIG 製剤に対して、肺炎球菌 ATCC6303 を十分量混合して免疫沈降させ、その上清を得る作業を 3 回繰り返すことで、感染に使用する肺炎球菌に対する特異抗体を全て除去した IVIG 製剤 (IVIGdep) を作成し、実験に使用した。

この方法で作成した IVIGdep の特異抗体除去率を検討するため、IVIGdep 調整で作られる沈降物に対して抗 human IgG 抗体 (免疫沈降物中で反応するのは菌特異抗体と考えられる) を用いた Western blot を実施した。7 回までの免疫沈降物を確認したが 3 回まででほぼ全ての特異抗体が沈降物に含まれている結果が得られ、Densitometry analysis によって免疫沈降 1 回目で 62.2%、2 回目で 85.4%、3 回目で 97.9%の特異抗体除去が可能であることが示された。

OPSI モデルにおける生存の解析では、IVIG 投与により splenectomy 群も sham 群も著明かつ有意に生存率が上昇した。特に splenectomy 群における IVIG による生存率改善の方が有意に高く、脾摘後病態に特に有効に IVIG が作用している可能性が考えられた。IVIGdep 投与群では有意な生存時間の延長はみられたが、致死率の改善は得られなかったため、最終的な生存には特異抗体が必要であると考えられた。

臓器 (脾臓、肝臓) 及び血液培養の検討では、splenectomy 群は sham 群に対して圧倒的な菌量の増加がみられた。IVIG 投与群は有意な菌量減少が認められたが、IVIGdep 製剤では菌量に有意な変化はなかった。よって特異抗体含有 IVIG は bacteria killing を介して生存率を改善させ、一方で IVIGdep は bacteria killing を改善させられないことが示された。

また IVIG と IVIGdep を適当な割合で混合し特異抗体量を変化させて投与した生存解析では、特異抗体量依存性に生存率の改善がみられた。また通常の IVIG の 50%の特異抗体含量以上で致死率の改善が得られていた。以上から特異抗体量は多ければ多いほど生存に寄与すること、生存死亡を分ける最低限の特異抗体量が存在することがわかった。

7種の炎症性サイトカイン解析では、splenectomy 群で早期の IFN $\gamma$  産生の抑制され、IVIGにより24時間後の IFN $\gamma$  が抑制されることがわかった。これらは既存の IFN $\gamma$ 、IL-12 産生機序から考えて妥当であることを考察した。

CD69 を用いた Flow cytometry によって脾臓、血液中の MZB cell の活性化の検討を行った。感染によって血液中の MZB cell 分画が増加するが血液中では活性化していないこと、脾臓中では MZB cell の著明な活性化が起こっているが IVIG、IVIGdep 投与により著明かつ有意な MZB cell 活性化の抑制がおこることが示された。IVIGdep 投与は bacteria killing を介していないことを前述のように示したため、IVIG は元来の特異抗体を産生する MZB cell を抑制する作用があると言える。

感染後の肝臓、脾臓での菌の trapping rate を定量するために、肺炎球菌の LytA 遺伝子の real time PCR で菌量の定量を行った。結果は IVIG 治療の有無によって菌量の有意な変化は見られず、bacteria trap に関して IVIG は寄与しないことが示された。

最後に、蛍光染色によって脾臓、肝臓での肺炎球菌の貪食を観察し、貪食の定量化を行った。あらかじめ CFDA/SE 処理した肺炎球菌 ( $\rightarrow$ FITC 標識) を静注・感染させたマウスの肝臓、脾臓を摘出し、抗 F4/80 抗体 (マクロファージ)、抗 human IgG 抗体 (投与 IVIG に反応) を用いて多重蛍光染色を行い、菌貪食と IVIG の利用について検討した。IVIG 投与により、human IgG 陽性の肺炎球菌、すなわち投与された特異抗体が付与された菌の貪食が有意に増加し、非投与群や IVIGdep 群では control としてそれが認められなかった。100 個の FITC 陽性肺炎球菌をカウントし貪食率を計算したところ、IVIG 投与群で有意に貪食率の亢進がみられた。先に示した trapping rate、菌量が一定であることと合わせて、IVIG で貪食絶対量が増加することが示された。また貪食の亢進は脾臓よりも肝臓で有意に大きく、特に肝臓での貪食に IVIG が有効であることが示された。これは脾臓がない OPSI に IVIG が特に有効であることを支持する。

今回の研究により、IVIG は特異抗体補充を介して、肝臓を中心とした貪食亢進により、肺炎球菌による OPSI の生存率を改善させることが示された。OPSI は発症後の特異的な治療がなく予後が極めて悪い病態のため、IVIG が有効な治療となればこれを改善できる見込みがある。少なくとも血液中の肺炎球菌に対して IVIG は有効に作用することが示された。

本研究のように特異抗体と非特異抗体を分けて IVIG の作用を検討した報告は調べた限りで存在しなかった。OPSI においては特異抗体が生存に極めて重要なことがわかったが、非特異抗体による作用も生存時間の延長、炎症性サイトカインや B 細胞活性化の抑制などの形で存在することが示された。今後同様の手

法を用いて、感染症に対して特異抗体／非特異抗体の作用を分けて解析していくことができると考える。

OPSIに対する IVIG 治療の実臨床での推奨にはさらなる検討が必要だが、IVIG は OPSI の有効な治療選択肢の 1 つと考えられ、今後の臨床使用経験を重ねる意義があると考えられた。