

氏名(本籍) いし 塚 さとし
石 塚 聡

学位の種類 博 士 (医 学)

学位記番号 医 第 3 2 7 3 号

学位授与年月日 平 成 14 年 3 月 6 日

学位授与の条件 学位規則第4条第2項該当

最終学歴 平 成 5 年 3 月 25 日
東北大学医学部医学科卒業

学位論文題目 Effects of rhinovirus infection on the adherence
of S.pneumonia to cultured human airway
epithelial cells
(ライノウイルス感染による培養ヒト気道上皮細胞への肺炎球菌付着の効果)

(主 査)

論文審査委員 教授 佐々木 英 忠 教授 菅 村 和 夫

教授 賀 来 満 夫

論文内容要旨

気道へのウイルス感染後に、細菌感染を合併した場合、呼吸器症状や肺炎を重篤にすることが知られており、臨床の場でもしばしば遭遇する。ウイルス感染後の気道の細菌叢には肺炎球菌などの微生物が認められる。ウイルス感染後の肺炎球菌の感染はしばしば疾患を重篤化させる。インフルエンザウイルスやアデノウイルスは、粘液線毛輸送系に障害を与え、細菌の付着・増殖を促進するが、ライノウイルスに関しては細胞障害性が主要な病因ではなく、肺炎球菌の感染助長の効果に関しては不明な点が多い。

肺炎球菌の気道上皮への付着は感染を助長させる重要なステップである。肺炎球菌は気道上皮や血管内皮に血小板活性化因子受容体 (PAF receptor) を介して付着し、炎症性サイトカインで気道上皮や血管内皮を処理すると、肺炎球菌の PAF receptor への付着が誘導されることが知られている。ウイルスは気道上皮障害のみでなく、炎症性サイトカインの産生も誘導しており、これらのことより我々は、ライノウイルス感染が気道上皮細胞の PAF receptor の発言を誘導し、それにより肺炎球菌感染を助長するという仮説を立てた。

ライノウイルス感染による肺炎球菌の気道上皮への付着に関する効果をみるために、我々は初代培養ヒト気道上皮細胞を使用して実験を行った。ヒト気道上皮細胞は剖検気管から上皮を剥離し、プロテアーゼ処理して単離し滅菌したプレートに培養した。単層に培養された細胞にライノウイルスを暴露し、その後時間をえながら、予め FITC (蛍光色素) をラベリングしておいた肺炎球菌を 10^6 CFU/ml で 37°C 、30 分間暴露した後、洗浄して非特異的に付着している菌を除き、上皮細胞 100 個あたりの付着数を位相差蛍光顕微鏡でカウントするという方法をとった。同時に、ライノウイルス暴露後に PAF 及び PAF receptor に対する拮抗剤 (Y-24180) を使用して肺炎球菌の付着に変化が見られるか検討した。また、実際に PAF receptor の発現を確かめるために分子生物学的手法を用いてこれを調べた。

ウイルス暴露後 3 時間までは肺炎球菌の付着の増加は認められなかったが、6 時間から 24 時間の間で徐々に肺炎球菌の付着数が増加した。

また、PAF 及び PAF receptor に対する拮抗剤 (Y-24180) に関して、これらを単独で暴露しても付着数に変化は見られないが、ライノウイルスを暴露した後これらで処理すると、肺炎球菌の付着増加は明らかに抑制された。

IL-1 α , IL-1 β , TNF- α 等の炎症性サイトカインは肺炎球菌の付着を促進することが報告されているが、今回の実験系では気道上皮細胞にライノウイルスを暴露してもこれらのサイトカインの増加は認められなかった。

気道上皮細胞にライノウイルスを暴露した後、実際に PAF receptor の発現が増加しているか否かを確認するために、フローサイトメトリーを行なった。無刺激と比較して、ライノウイルスを暴露後 4 時間後には、明らかに発現が増加していることがわかった。

また PAF receptor の発現は NF- κ B や SP-1 などの転写因子の活性を介していることが知られており、ライノウイルスの刺激で転写因子の活性が増加しているか否かをゲルシフトアッセイ (EMSA) 法を行なって確かめた。これにより、ライノウイルスを暴露後 30 分より NF- κ B の活性が増加することを確認することができた。また、NF- κ B の活性を抑制する PDTC (pyrrolidine dithiocarbamate) で処理をした場合、ライノウイルスを暴露しても肺炎球菌の付着数の増加は認められなかった。

これらの結果より、気道上皮がライノウイルスに刺激された場合、気道上皮細胞の PAF receptor の発現が誘導されて肺炎球菌の付着が増加すると考えられる。その機序として、PAF receptor の発現は NF- κ B などの転写因子を介することが知られており、今回この NF- κ B 活性がライノウイルス刺激で増加していることから、この発現の増加は NF- κ B を介していると考えられる。NF- κ B 活性を抑制する PDTC が肺炎球菌の付着増加を抑制することが、この機序の可能性を裏付けていると考えられる。

審査結果の要旨

気道へのウイルス感染後に細菌感染を合併した場合、呼吸器症状や肺炎を重篤にすることが知られている。かぜの原因の1/3を占めるライノウイルスに関しては気道の細胞障害性は強くはなく、細菌の感染助長の効果に関しては不明な点が多い。

細菌の気道上皮への付着は感染を助長させる重要なステップである。中でも肺炎球菌は重篤な症状を生じ得る細菌で、これは気道上皮や血管内皮に血小板活性化因子受容体 (PAF receptor) を介して付着することが報告されている。このことから我々は、ライノウイルス感染が気道上皮細胞の PAF receptor の発現を誘導し、それにより肺炎球菌付着を助長するという仮説を立てた。

方法として、単層に培養された初代培養ヒト気道上皮細胞をライノウイルスで刺激し、その後予め FITC (蛍光色素) をラベリングしておいた肺炎球菌を暴露した後、付着数を位相差蛍光顕微鏡でカウントすることを行った。同時に、ライノウイルス刺激後に PAF 及び PAF receptor に対する拮抗剤 (Y-24180) を使用した時の肺炎球菌付着の変化と、分子生物学的レベルでの PAF receptor 発現に関して調べた。

結果的に、ウイルス暴露後、6時間から24時間の間で徐々に肺炎球菌の付着数が増加した。また、ライノウイルスで刺激した後 PAF 及び Y-24180 で処理すると、肺炎球菌の付着増加は明らかに抑制された。気道上皮細胞にライノウイルスを暴露した後、実際に PAF receptor の発現が増加しているか否かを確認するために、フローサイトメトリーを行なった。無刺激と比較して、ライノウイルスを暴露後24時間後には、明らかに発現が増加していることがわかった。また PAF receptor の発現は NF- κ B や SP-1 などの転写因子の活性を介していることが知られており、ライノウイルスの刺激で転写因子の活性が増加しているか否かをゲルシフトアッセイ (EMSA) 法を行なって確かめた。これにより、ライノウイルスを暴露後30分より NF- κ B の活性が増加することを確認することができた。また、NF- κ B の活性を抑制する PDTC (pyrrolidine dithiocarbamate) で処理をした場合、ライノウイルスを暴露しても肺炎球菌の付着数の増加は認められなかった。

これらの結果より、気道上皮がライノウイルスに刺激された場合、気道上皮細胞の PAF receptor の発現が誘導されて肺炎球菌の付着が増加すると考えられる。その機序として、PAF receptor の発現は NF- κ B などの転写因子を介することが知られており、今回この NF- κ B 活性がライノウイルス刺激で増加していることから、この発現の増加は NF- κ B を介していると考えられる。NF- κ B 活性を抑制する PDTC が肺炎球菌の付着増加を抑制することが、この機序の可能性を裏付けていると考えられる。