

# AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

耳鼻咽喉科免疫アレルギー (2002.06) 20巻2号:82~83.

インフルエンザ菌P6蛋白エピトープの解析

石田芳也, 安部裕介, 柳内充, 野澤はやぶさ, 岸部幹, 高原幹, 原渕保明

### 33. インフルエンザ菌 P6 蛋白エピトープの解析

○石田芳也, 安部裕介, 柳内 充, 野澤はやぶさ, 岸部 幹, 高原 幹, 原淵保明

旭川医科大学耳鼻咽喉科

Epitope Analysis on the outer membrane protein P6 of nontypeable *Haemophilus influenzae*

Ishida Y, Abe Y, Yanai M, Nozawa H, Kishibe K, Takahara M, Harabuchi Y

Dept. of Otolaryngology, Asahikawa Medical College

#### 1. はじめに

夾膜を持たないインフルエンザ菌 Nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHI) は、肺炎球菌、モラクセラ・カタラーリスとともに、中耳炎の3大起炎菌の1つである。以前我々は、NTHI の外膜蛋白の一つである P6 蛋白に対する分泌型 IgA の抗体価と、NTHI の分離頻度、中耳炎の罹患頻度が逆相関することを示した<sup>1,2)</sup>。さらに中耳炎罹患児において、アデノイドリンパ球の P6 蛋白に対する反応性が低下していることを示し<sup>3)</sup>、P6 蛋白が NTHI 感染症に対するワクチンの有力な候補となり得ることを報告した。

また、ワクチンの投与形態としては、従来の P6 蛋白そのものを直接投与する方法のほかに、あらかじめ T 細胞が認識する部位 (エピトープ) を調べておいて、エピトープを含むペプチドを直接投与するペプチドワクチンという方法も考えられている。この場合ペプチドは直接 HLA に結合し、T 細胞に抗原提示することになる。この方法の利点は、抗体を産生する上で必要のない蛋白の部分に投与しないので、余計な免疫反応が動かない点であり、このワクチンは余計な副反応が少ない理想のワクチンになりうると思われる。また、抗原のエピトープ部分のみ投与するため従来の蛋白そのものを投与する場合よりも選択的なより強い免疫応答を起こすことが可能であると考えられ、これらのエピトープを重合させるなどの工夫により、より効果的なワクチンとなる可能性も考えられている。

そこで今回我々は、ペプチドワクチン開発の基礎的研究として、健常人末梢血リンパ球を用いて P6 蛋白のエピトープ解析を行ったので報告する。

#### 2. 方法

P6 蛋白の抽出は、Murphy<sup>4)</sup>らの方法に準じて行った。

オーバーラッピングペプチドの作製として、P6 蛋白のアミノ酸配列をもとに、前後5残基ずつ重複する15残基長のペプチドをデザインし、13種類作製した。また、ネガティブコントロールとして yellow fever の任意のアミノ酸配列より、同様の15残基長のペプチドも作製した。

リンパ球増殖反応は、健常人末梢血より比重遠心法により分離した単核球 ( $2.5 \times 10^5$  cell/well) と、P6 蛋白 (50  $\mu$ g/ml)、ペプチド (5  $\mu$ g/ml) とともに、6日間、37℃、5%CO<sub>2</sub>で培養した後、<sup>3</sup>H-thymidine (1  $\mu$ Ci/well) を加え、18時間後その放射能を測定した。また、ポジティブコントロールとして、T cell mitogen である PHA (5  $\mu$ g/ml) を用いた。

#### 3. 結果

健常人3例について P6 蛋白、およびオーバーラッピングペプチドに対するリンパ球増殖反応を行った。

増殖反応の評価は、stimulation index (SI: それぞれの CPM をバックグラウンドである抗原を入れない medium のみの CPM で除し算出) を用いて、SI が2以上の場合を反応陽性とした。

3例とも、P6 と PHA については明らかな強い反応が認められ、ネガティブコントロールの yellow fever のペプチドでは反応が認められなかった。P6 蛋白のオーバーラッピングペプチドに対しては、1~4番、9~11番、13番のペプチドに対して反応が認められた。

以上の結果からヒトの P6 蛋白のエピトープの部位は少なくとも N 末端側に 2 カ所、中間に 1 カ所、C 末端側に 1 カ所の数カ所存在することが推測された。

今後は、検討例数を増やし、有意なエピトープの部位を絞り込むとともに、HLA type との関連、あるいは、アデノイドのリンパ球を用いた場合の反応などについても検討していく予定である。

#### 4. まとめ

健常者末梢血リンパ球の P6 およびそのオーバーラッピングペプチドに対する増殖反応を検討した。

今回検討した 3 例とも P6 蛋白に対して強いリンパ球増殖反応が認められた。

P6 蛋白のオーバーラッピングペプチドに対しては、1～4 番、9～11 番、13 番のペプチドに対してリンパ球増殖反応が認められた。

今後の課題として、検討例数を増やすとともに、アデノイドのリンパ球を用いた検討などが考えられた。

#### 5. 参考文献

- 1) Harabuchi, Y., Faden H., et al.: Human milk secretory IgA antibody to nontypeable *Haemophilus influenzae*: possible protective effects against nasopharyngeal colonization. *J Pediatr.* 124: 193-8, 1994.
- 2) Harabuchi, Y., Faden H., et al.: Nasopharyngeal colonization with nontypeable *Haemophilus influenzae* and recurrent otitis media. *J Infect Dis.* 170: 862-6, 1994.
- 3) Kodama, H., Faden H., et al.: Cellular immune response of adenoidal and tonsillar lymphocytes to the P6 outer membrane protein of non-typeable *Haemophilus influenzae* and its relation to otitis media. *Acta Otolaryngol.* 119: 377-83, 1999.
- 4) Karalus, R.J., Murphy T.F., et al.: Purification and characterization of outer membrane protein P6, a vaccine antigen of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 26: 159-66, 1999.