HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	補中益気湯は肺炎球菌保菌マウスモデルにおいてマクロファージ活性化とIL-17A産生亢進を介してクリアランスを向上させる
Author(s)	中久保, 祥
Description	配架番号：2546
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14081号
Issue Date	2020-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14081
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94625
Type	doctoral thesis
File Information	Sho_Nakakubo.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

補中益気湯は肺炎球菌保菌マウスモデルにおいて
マクロファージ活性化と IL-17A 産生亢進を介して
クリアランスを向上させる
(Traditional Japanese Herbal Medicine Hochu-ekki-to
Promotes Pneumococcal Colonization Clearance via
Macrophage Activation and Interleukin 17A
Production in Mice)

2020 年 3 月

北　海　道　大　学
中　久　保　　祥

学　位　論　文

補中益気湯は肺炎球菌保菌マウスモデルにおいて
マクロファージ活性化と IL-17A 産生亢進を介して
クリアランスを向上させる
(Traditional Japanese Herbal Medicine Hochu-ekki-to
Promotes Pneumococcal Colonization Clearance via
Macrophage Activation and Interleukin 17A
Production in Mice)

2020 年 3 月

北　海　道　大　学
中　久　保　　祥

目　　次

発表論文目録および学会発表目録 ‥‥‥‥‥　1 頁

要旨 ‥‥‥‥‥

本研究の一部は以下の学会で発表した。

1. 中久保祥、木村聡一郎、三村一行、梶原千晶、石井良和、舘田一博.
「肺炎球菌保菌マウスモデルにおける補中益気湯の保菌除去効果の検討.」
第 93 回日本感染症学会総会・学術講演会. 2019 年 4 月 5 日.

2. Sho Nakakubo, Soichiro Kimura, Kazuyuki Mimura, Chiaki Kajiwara, Yoshikazu Ishii, Kazuhiro Tateda. 'Japanese Traditional Herbal Medicine 'Hochu-ekki-to' Promotes Clearance of Pneumococcal Colonization via Macrophage Activation and Subsequent Interleukin 17A Production in Mice'. 29th European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, Amsterdam, Netherland. 13th April, 2019

要旨

【背景と目的】

肺炎球菌は感染症学領域では古典的な存在のグラム陽性球菌だが、昨今でも市中肺炎で最も頻度の高い原因菌であり、髄膜炎や菌血症などの致命的な侵襲感染症をおこす。抗菌薬が普及した現在でも高い罹患率と死亡率であり、世界的に重い疾病負荷をかけている。肺炎球菌ワクチン戦略で小児と高齢者の侵襲感染症が減少した一方で、血清型の疫学変化やワクチン非カバー株による感染症の増加が報告され、新たな課題に局面している。ワクチン以外の新しい予防戦略が望まれている。

肺炎球菌は鼻腔内に定着し、保菌状態になり、次いで感染症や周囲への伝播を引き起こす。そのため、保菌を制御することが、肺炎球菌予防戦略において重要である。

肺炎球菌を保菌すると宿主の動的な自然免疫と獲得免疫の相互作用が介在し、保菌のクリアランスが導かれていくことがわかっている。免疫系に作用し、保菌のクリアランスを高めるような薬剤が肺炎球菌感染症の予防として有望である。

我々は今回漢方薬に着目し、その中でも過去に免疫賦活作用が報告されている補中益気湯（TJ-41）に注目した。肺炎球菌保菌モデルにおけるその効果を検証し、細胞実験を行いその機序の解明に取り組んだ。

【材料と方法】

TJ-41 は、エキス乾燥粉末製剤を、適宜溶解して利用した。マウスを用いて、肺炎球菌の鼻腔内保菌モデルを確立した。同モデルに対して、保菌前 2 週から保菌後 4 週まで TJ-41 の経口投与を行うことで、肺炎球菌の鼻腔内保菌量に対する効果を検証した。また、その背景を探るため、フローサイトメトリーや real time PCR 法を用いて細胞解析、遺伝子解析を行った。Interleukin 17A (IL-17A) knock out (KO)マウスを用いて、同様に保菌モデルへの効果を検証した。

マウスモデルで得られた知見をさらに深く検証するため、細胞実験を行った。マウスの鼻腔内細胞を分離し、白血球を well に接種し、殺菌処理を施した肺炎球菌抗原（whole cell antigen, WCA）と TJ-41 を投与し、その後の細胞の状態変化をフローサイトメトリーで解析し、マクロファージの

貪食能の変化を検証した。同実験系を用いて、WCA と TJ-41 による IL-17A messenger RNA (mRNA)の発現の変化を測定した。

TJ-41 のマクロファージへの効果を検証するため、cell line のマクロファージを中心に、肺炎球菌貪食能、殺菌能を測定した。最後に、TJ-41 のもたらすマクロファージの肺炎球菌抗原提示能への効果を確認するため、T 細胞を用いて IL-17A の産生量を ELISA で測定した。

【結果】

TJ-41 を投与した肺炎球菌保菌マウスでは、control マウスと比較して、保菌後 14 日目、28 日目の時点の鼻腔内菌量が有意に減少し、TJ-41 が保菌クリアランスを高めることが判明した。同時点の鼻腔内細胞のフローサイトメトリーによる解析では、TJ-41 投与群のマクロファージ数と CD86 陽性の活性型マクロファージ数がいずれも control 群よりも有意に高くなっていた。また、保菌後 28 日の鼻腔関連リンパ組織（NALT）中の IL-17A 産生 T 細胞の割合が、TJ-41 群で大幅に上昇していた。これらの実験を、IL-17A KO マウスで同様に検証した結果、両群で鼻腔内菌量に差は見られず、TJ-41 群のマクロファージ数の上昇も見られなかった。TJ-41 の保菌クリアランスを高める作用機序としてマクロファージと IL-17A の関わりが推定された。

鼻腔内細胞を用いた細胞実験では、WCA に曝露した群で、TJ-41 を投与した群は control 群に比して 3 日目の活性型マクロファージのカウント数が有意に上昇しており、マクロファージの肺炎球菌貪食能を測定したところ、TJ-41 群の方で貪食能が高い結果が得られた。一方で同じ実験系を IL-17A KO マウスの細胞を用いて行ったところ、TJ-41 群と control 群の間で、活性型マクロファージの数も、肺炎球菌貪食能も差は見られなかったため、TJ-41 のマクロファージ活性化と貪食能向上には IL-17A が必須であることが判明した。

同じく鼻腔内細胞を用いた実験で IL-17A mRNA の発現を測定したところ、WCA 曝露群間で TJ-41 投与群は control 群に比して IL-17A mRNA の発現が有意に高い結果が得られた。この現象は、事前にマクロファージを薬剤で除去したのちに行うと、観察されなくなり、マクロファージの機能制御が IL-17A 産生の亢進に必要であることが推察された。

Cell line を用いたマクロファージへの TJ-41 による直接効果を検証した結果、TJ-41 を投与すると肺炎球菌貪食能、殺菌能が上昇することがわかった。また、マクロファージからの抗原提示量を、接触する T 細胞からの

IL-17A 産生量で評価したところ、TJ-41 投与群で有意に高い結果が得られ、マクロファージの抗原提示能も上昇させることがわかった。

【考察】

TJ-41 が、肺炎球菌保菌モデルにおいて保菌のクリアランスを高めることが示された。これはすなわち肺炎球菌の感染症への進展や周囲への伝播のリスクを下げる可能性を秘めており、新規の肺炎球菌予防戦略として期待できる。今後、ヒトでの検証を行うことが課題である。

肺炎球菌を保菌している状態もしくは肺炎球菌抗原に曝露した状態で TJ-41 を作用させると、鼻腔内細胞で IL-17A 産生が亢進する現象が確認され、IL-17A の相対的な高まりが、鼻腔内のマクロファージを相加的に活性化し、肺炎球菌の貪食、クリアランスの向上につながっていることが推察される。肺炎球菌保菌モデルにおいて、内因性の IL-17A の上昇がクリアランスを高める知見は本研究の新規性の一つである。

TJ-41 が IL-17A を高める機序として、マクロファージが必須であることが示され、マクロファージへの直接効果を検証した結果、肺炎球菌貪食能、殺菌能の向上に加え、T 細胞への抗原提示能を上昇させることもわかった。TJ-41 は、マクロファージを活性化し抗原提示を活発に行わせ、続く T 細胞からの IL-17A 産生を中心として免疫応答を賦活化することが作用機序と推察された。TJ-41 の IL-17A に関連した免疫学的機序は既報にはない。また、肺炎球菌の保菌に関する研究で、自然免疫系を賦活化することが、より高い T 細胞系の免疫応答をもたらすことを示した報告もこれまでになく、これらは本研究の新規性である。

【結論】

肺炎球菌保菌マウスモデルと細胞実験を用いることで、TJ-41 の肺炎球菌保菌クリアランスにおける保護的な効果を示し、その背景にある免疫学的な機序を明らかにした。TJ-41 は肺炎球菌予防戦略として有望であり、TJ-41 の今後の臨床応用の拡大を見据えて、さらなる究明や知見の蓄積が望まれる。また本研究を通して、漢方薬の科学的解明に、また、肺炎球菌保菌の機序解明に寄与することができた。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

ANOVA	analysis of variance
BL6	C57BL/6J　（マウス系統名）
CFU	colony forming unit
CCL2	C-C motif chemokine ligand 2
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
IFN-γ	interferon-gamma
IL-17A	interleukin 17A
IL-17A KO	interleukin 17A knock out mouse
IPD	invasive pneumococcal disease
MOI	multiplicity of infection
mRNA	messenger RNA
NALT	nasal associated lymphoid tissue
Nod2	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2
NT	nasal tissue
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PFA	paraformaldehyde
PMA	phorbol myristate acetate
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
Sp	*Streptococcus pneumoniae*
Th17	T helper 17 cell
WCA	whole cell antigen
WT	wild type

緒言

肺炎球菌は、1886 年に Fränkel によって発見されたグラム陽性双球菌であり、ヒトに感染症を引き起こす微生物としては古典的な存在の細菌である。市中肺炎で分離される起炎菌としては最も頻度が高く、また、中耳炎、副鼻腔炎などの原因にもなり、時に髄膜炎や菌血症を来し、侵襲性肺炎球菌感染症（IPD）として猛威をふるう(Bogaert et al., 2004)。抗菌薬やワクチンが普及した現在においてもなお、世界中で毎年 200 万人が死亡し、関連する医療コストは 100 兆円規模とされ、世界中の社会に重い疾病負荷をかけている(Dockrell et al., 2012)。

2000 年以降、肺炎球菌の血清型のうち臨床上重要な株をカバーした、肺炎球菌結合型ワクチン（プレベナー）が開発、普及したことで、肺炎球菌感染症の疫学は大きく変化した。プレベナーの小児への接種が普及したことにより、乳幼児の IPD が激減し、それに伴い非接種者である高齢者の IPD、肺炎も減少したという報告が世界中でなされた(Pilishvili et al., 2010; Sando et al., 2019; Suga et al., 2015)。肺炎球菌ワクチン戦略は導入当初は目覚ましい効果をあげたが、一方で、プレベナーがカバーしていない血清型の株による IPD、肺炎の割合が相対的に上昇する serotype replacement と呼ばれる現象が相次いで報告され、高齢者においてはワクチン非カバー株による IPD の罹患数が上昇した(Balsells et al., 2017; Stockmann et al., 2016)。また一部のワクチンカバー株はプレベナーによる減少効果が乏しいこともわかってきている(Ladhani et al., 2018)。新規のワクチン開発も相次いでおり、肺炎球菌感染症とワクチンを取り巻く環境は刻一刻と変化しているものの、課題が多く残されている。ワクチンの他に、肺炎球菌感染症の予防に有効な手立ても現状存在しない。肺炎球菌感染症に対する、新規の予防戦略が望まれる。

肺炎球菌は通常、ヒトに感染症を引き起こす前に、鼻腔内に定着し保菌状態(colonization)を形成することが知られている(Weiser et al., 2018)。小児の 27-65%、成人では 10%未満が肺炎球菌を鼻腔内保菌しているとされる(Abdullahi et al., 2012; Yahiaoui et al., 2016)。保菌自体は無症状であるが、鼻腔内に定着した肺炎球菌が下気道に落ち込むことで肺炎を発症し、直接近隣組織に侵入して中耳炎や副鼻腔炎、髄膜炎に進展すると考えられている。保菌者が接触を介して、他者に伝播させることも知られており、成人の肺炎球菌感染症の多くは、小児からの伝播が原因と考えられている。また、鼻腔内の保菌量、保菌の頻度が高いと侵襲感染、伝播のリスクが上昇することが基礎実験、臨床研究で示されている(Short et al., 2012; Wolter et al., 2014)。肺炎球菌感染症に対する新規の予防戦略を検討するにあたり、「保菌」を制御する因子、薬剤を見出すことが重要であると考えられる。

肺炎球菌の鼻腔内保菌には、宿主側の多彩な免疫反応が引き起こされることが、こ

の十数年の基礎研究により示されてきている。2004 年の McCool らによる肺炎球菌の鼻腔内保菌を成立させたマウスモデル研究では、B 細胞欠損マウスを用いても保菌期間が延長しないことから、抗体産生が関与していないことが示された(McCool and Weiser, 2004)。その後、Toll like receptors (TLR) などの pattern recognizing receptors (PRR)の欠損が背景にあると、保菌のクリアランスが遅延することから、抗原提示細胞による自然免疫が保菌のクリアランスに必須であることがわかった(van Rossum et al., 2005)。マクロファージの除去や、マクロファージに関連する因子（Macrophage Receptor with Collageneous Structure, MARCO や macrophage migration inhibitory factor, MIF）の欠損も同様に保菌クリアランスを阻害するため、自然免疫における主要な effector cells としてマクロファージの重要性が認識されている(Das et al., 2014; Dorrington et al., 2013)。抗原提示を含めた自然免疫反応を受けて、CD4 陽性細胞を介した T 細胞系の免疫応答がなされるが、その中でも、Interleukin-17 (IL-17) 産生が特に重要であることが示された(Lu et al., 2008; Malley et al., 2005)。肺炎球菌保菌を通じて IL-17 が産生されることで、マクロファージ/単球の鼻腔内への集積が促され、最終的な菌のクリアランスをもたらし、IL-17A が欠如するとその現象は消失した(Zhang et al., 2009)。ヒト小児を対象とした研究で、肺炎球菌保菌をしている群と比較して、保菌をしていない群では扁桃腺内の T helper 17 cells (Th17)の割合が有意に高くなっていることが報告された(Mubarak et al., 2016)。保菌率の高い小児の中で、保菌していない群はすでに Th17 による応答が高まって肺炎球菌が排除されている可能性が示され、基礎実験と合わせて IL-17A 産生の保菌クリアランスにおける重要性が強調された。肺炎球菌の保菌から、最終的にクリアランスされるまでには、自然免疫と T 細胞系の免疫応答のダイナミックで相互作用的な機序が関わっており、保菌を制御する因子を検討するには、これらの機序に注目する必要がある。

肺炎球菌保菌に対し保護的に働く薬剤を検討し、今回我々は漢方薬に注目した。漢方薬は中国起源の東洋医学の薬剤で、日本でも古くから幅広く医療に用いられてきた生薬配合剤の総称だが、「傷寒論」などに記載されているように、急性の熱性疾患や感染症にも使用されてきた。経験的、古典的な知見のみならず、昨今は科学的根拠に基づいた感染症への効果が確認されている。例えば季節性インフルエンザへの麻黄湯の効果は臨床研究、基礎実験共に有効性が報告されており(Nagai et al., 2014; Yoshino et al., 2019)、肺炎球菌性副鼻腔炎に対し辛夷清肺湯が保護的に働くという知見もある(Minami et al., 2017)。

本研究で取り上げた補中益気湯は、李東垣（1180 年－1251 年）によって生み出された方剤であり、「内外傷辯惑論」、「脾胃論」にその記載があり、10 種類の生薬で構

成されている。日本にも伝来し、古くから使用されてきた方剤である。東洋医学的には「補剤」として気を補い上昇させる方剤であり、脾気虚の状態で疲労、倦怠感、食思不振、急性疾患後の消耗状態などに用いられる。一方で、免疫不全者における感染症予防の有用性を示す症例報告が散見されており、高齢者への投与で natural killer 細胞の活性化をもたらすなど、宿主の免疫賦活作用を示す報告がある(Kuroiwa et al., 2004)。基礎実験レベルでは細菌（*H. pylori*, Listeria）、ウイルス（cytomegalovirus, influenza virus)、真菌(Candida)に対する保護的作用が報告されており、その背景として、インターフェロンγ産生の上昇、natural killer T 細胞の活性化、マクロファージの活性化など、研究毎に異なる多彩な免疫機序が推測されている(Abe et al., 1999; Dan et al., 2013; Hossain et al., 1999; Kiyohara et al., 2006; Ohgitani et al., 2014; Short et al., 2012; Yamaoka et al., 2001)。宿主免疫を賦活し、病原体に対する防御能を上昇させることが期待できる薬剤であるが、これまでに肺炎球菌の感染症、保菌に対する効果が検証されたことはない。

以上をふまえて、我々は以下の仮説を立てた。

「補中益気湯が、肺炎球菌保菌のクリアランスを促進する。その背景として、肺炎球菌に対する自然免疫、獲得免疫に作用し、免疫賦活を通して菌のクリアランスを早める。」

仮説が証明されれば、補中益気湯が肺炎球菌保菌を減らし、続発する感染症に移行するリスクを減らす可能性があり、新規の肺炎球菌予防戦略の一端を担うかもしれないと考えた。

本研究ではマウスを用いて肺炎球菌保菌モデルを構築し、補中益気湯の効果を検証した。また、マウスモデルから得られた結果を深く追求するため、細胞実験を用いて細胞レベルの機序を検証した。

尚、本論文で記述された実験系とその結果は主に、2017 年度、2018 年度に在籍した、研究委託先の東邦大学医学部微生物・感染症学教室において行われ、得られたものである。

方法

【実験動物】

Wild type マウスは 6-10 週齢メスの C57BL/6J (BL6)マウス、もしくは BALB/c マウス(日本チャールズリバー)を受注してから 1 週間隔離して使用した。IL-17A ノックアウトマウス(Il-17a-/-)は BALB/c を背景にもつ、東京大学医科学研究所で以前から使用が確立しているものであり(Ishigame et al., 2009)、これらも 6-10 週齢のメスを使用した。

全てのマウスは実験に使用するまで、特定の微生物や寄生虫が除去された環境下、東邦大学実験動物センターで飼育された。実験は東邦大学の動物実験の倫理規定と遺伝子操作実験の安全規定に則り、動物実験のプロトコールは東邦大学動物実験委員会の承認を経て施行された(承認番号 18-51-386)。

【微生物と培養条件】

肺炎球菌菌株は東邦大学微生物教室に保存されている臨床由来株の *S. pneumoniae* strain 741 (serotype 19F) 、the American Type Culture Collection (ATCC)より購入した S. pneumoniae strain 'ATCC 6303' (serotype 3) を使用した。Serotype 19F は東邦大学の過去のマウス研究でも用いられている(Yoshioka et al., 2016)。菌株は Mueller-Hinton agar (Becton, Dickinson [BD] & Co., Sparks, MD, USA)に 5%脱繊維ヒツジ血液を加えて作成した血液寒天培地上に塗布し、37℃、5%CO_2 条件下で一晩培養した。形成されたコロニーを剥離し、Todd-Hewitt broth (Difco, Detroit, MI, USA)と 0.5% yeast extract (BactoTM Yeast Extract, BD)の混合液に懸濁し、37℃、5%CO_2 条件下で 5-7 時間培養した。培養時間を複数に分けて、それぞれ吸光計で波長 600nm の吸光度を測定し、血液寒天培地での菌数カウントの結果と照らし合わせ、規定の菌数を含む懸濁液を作成した。

【使用薬剤】

補中益気湯（TJ-41）は株式会社ツムラ（Tokyo）から研究目的の無償提供を受けた（Lot No.2170041010）。TJ-41 は以下の 10 種類の生薬の煎じ液を濾過、乾燥凍結した粉末製剤である：黄耆 *Astragali radix* (4.0 g), 蒼朮 *Atractylodis lanceae rhizoma* (4.0 g), 人参 *Ginseng radix* (4.0 g), 当帰 *Angelicae radix* (3.0 g), 柴胡 *Bupleuri radix* (2.0 g),大棗 *Zizyphi fructus* (2.0 g), 陳皮 *Auranti nobilis pericarpium* (2.0 g), 甘草 *Glycyrrhizae radix* (1.5 g), 升麻 *Cimicifugae rhizome* (1.0g), 生姜 *Gingiberis rhizoma* (0.5 g)。マウスモデルでは、TJ-41 を滅菌水に懸濁し、2000 mg/kg/day を胃ゾンデで経口投与した。投与量は、既報に倣って決定した(Utsuyama et al., 2001; Yan

et al., 2002)。コントロール群のマウスには、同量の水のみを投与した。細胞実験に使用する際は、Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium に各濃度になるよう混合し、60℃で 30 分間処理をした。

なお「結果」でも述べるが、保菌モデルの予備実験では TJ-41 の他、十全大補湯（TJ-48)、麻黄附子細辛湯（TJ-127）の乾燥エキス製剤も用いた。また、予備実験では各エキス製剤は飲水ボトルに溶解した。マウスが 1 日約 4 ml の飲水をすることを事前に測定し、2000 mg/day 相当になるように調整して溶解し、ボトルは 2-3 日ごとに交換して管理した。

【マウス肺炎球菌保菌モデル】

マウスは ketamine 50 mg/kg、xylazine 10 mg/kg を腹腔内投与して麻酔した。麻酔されたマウスに、肺炎球菌が生食 10μl 中 6×10^4 CFUs になるよう調整された菌液を、経鼻で投与した。鼻腔内の菌数カウントは、CO_2 でサクリファイス後、下顎を切断し、気管を露出させた後、逆さにつるした状態で気管内にピペットチップを挿入し、400 μl の PBS を注入し、鼻腔から流れ出る液を回収した。回収した鼻腔洗浄液を血液寒天培地上に 10 倍希釈系列で塗布し、37°C 、5% CO_2 条件下で 24 時間培養し、colony forming units (CFU)のカウントを行った。

【フローサイトメトリー】

マウスの鼻腔組織（nasal tissue, NT）と鼻腔内リンパ組織（nasal associated lymphoid tissue, NALT）は、既報に倣って採取した(Asanuma et al., 1997; Wu et al., 1997)。具体的には、マウスをサクリファイス後、下顎を切断し、口蓋を切離し、その裏に付着したリンパ組織が NALT である。NALT 採取後は、鼻部を切断し、表皮、筋肉、頬骨、歯牙を除去し、残った骨、軟骨を含んだ一塊を NT とした。採取された組織はそれぞれハサミで細断し、RPMI 1640 medium に 2% fetal bovine serum、0.5 mg/mL collagenase D (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)、150 μg/mL DNase (Roche Diagnostics)を加えた溶液に懸濁し、37°C 、5% CO_2 条件下で 30 分培養した。懸濁液は 70 μm cell strainer (BD Falcon)を通して細胞を濾過し、BD Pharm Lyse (BD Biosciences)を加えて溶血処理を施し Buffer (PBS に 2% fetal bovine serum albumin (FBS)を加えたもの)で洗浄、遠心後、細胞数をカウントした。以下、蛍光抗体染色の手順を記す。

① 400 g、4℃で 5 分間遠心して上清を除き(以下すべて同条件)、各検体に Fc Block を 50 μl ずつ入れ、氷冷で 15 分間静置する。
② 遠心して上清を除き、各検体に Buffer 500 μl を加える
③ 遠心して上清を除き、各検体に蛍光標識抗体またはコントロール抗体を加えて、

氷冷で 30 分間静置する

④ 各検体に Buffer 500 µl を加える

⑤ 遠心して上清を除き、各検体に 4%パラホルムアルデヒド(PFA) 100 µl を加え氷冷で 20 分間静置する

⑥ 遠心して上清を除き、Buffer で洗浄、遠心後 Buffer 500 µl を加える。

蛍光標識抗体として Peridinin chlorophyll protein complex (PerCP)/Cy5.5 anti-mouse CD11b antibody (clone M1/70)、allophycocyanin (APC)/Cy7 anti-mouse/human CD11c antibody (clone N418)、fluorescein isothiocyanate (FITC) anti-mouse Ly6G antibody (clone 1A8)、phycoerythrin (PE) anti-mouse CD86 (clone GL-1)、PE/Cy7 anti-mouse F4/80 antibody (clone BM8) (以上 BioLegend)、APC anti-mouse MHC class II (I-A/I-E) antibody (clone M5/114.15.2) (Tonbo Biosciences) が用いられた。Flow cytometry は BD FACS-Canto II (BD Biosciences)で測定し、FlowJo software (TreeStar)をもちいて解析した。

【NALT の細胞内サイトカイン測定】

NALT の細胞内サイトカイン測定は Cytofix/Cytoperm Plus kit (BD Biosciences)を用いた。【フローサイトメトリー】の項で記述した細胞分離、細胞カウントまで同様に細胞の処理を行った後、phosphomolybdic acid (PMA; 25 ng/mL)、 ionomycin (1 µg/mL)、 GolgiPlug (1 µg/mL; BD Biosciences)を加え、4 時間培養した. その後 APC anti-mouse IL-17A (clone eBio17B7) もしくは APC IgG isotype control.を用いて蛍光抗体染色を行った。

上記のフローサイトメトリー、細胞内サイトカイン染色の手順は、東邦大学から発表されている既報に従い行った(Kusaka et al., 2018)。

【鼻腔内免疫細胞の分離、細胞実験】

前述と同様に鼻腔組織を採取したのち、NT と NALT を両者とも含んだ細胞を flow cytometry と同様の手技で分離し、その後 Percoll solution を用いて密度勾配遠心法を行い、白血球のみを分離した。分離した白血球を complete RPMI medium に懸濁し、5×10^5 cells/100 µl/well になるように細胞数を調整して 96 穴プレートに接種した。肺炎球菌 serotype 19F を 70%エタノールで殺菌処理し作成した、whole cell antigen (WCA)を作成し、それを 10 µl/well (生菌で 10^7 CFU 相当の抗原量)を加える群を設けた。また、TJ-41 (1 mg/ml)をそれぞれ投与する、しない群に分けて、WCA と TJ-41 投与後 3 日の時点で、well 中の細胞のフローサイトメトリーや real time PCR による解析を行った。WCA の作成は既報に倣った(Wilson et al., 2015)。マクロ

ファージの除去による実験も行ったが、その方法として、WCA, TJ-41 を投与する 1 日前に、well にビスホスホネート製剤でありマクロファージに選択的に取り込まれる clodronate liposome (30 μg/well, Hygieia Bioscience)を投与し、処理することで達成した。

【Messenger RNA の抽出と遺伝子発現解析】
各検体に TRIzol Reagent (Invitrogen)をプロトコールに従って使用し、細胞を溶解させ、RNA を抽出した。Total 1 μg の RNA を High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて cDNA に変換した。cDNA は下記のプライマーと SYBR Green real time RT-PCR technique を用い、QuantStudio3 Real Time PCR System (Applied Biosystems)で特定の領域の DNA を増幅し、測定した。主なプライマーとして、
IL-17A： 5'-TTTAACTCCCTTGGCGCAAAA-3' (forward)
5'-CTTTCCCTCCGCATTGACAC-3' (reverse);
beta-actin：5'-AGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3' (forward)
5'-CAATAGTGATGACCTGGCCGT-3' (reverse) を用いた。
Beta-actin をエンコードするハウスキーピング遺伝子を cDNA の合成量と質の reference standard とし、相対的な IL-17A の転写レベルを $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (CT の閾値は 45)を用いて、倍数であらわした。

【マクロファージの肺炎球菌貪食能評価】
96 穴プレート上で培養したマクロファージ細胞に、TJ-41 が各濃度（0～10 mg/ml）に溶解された RPMI 液を投与し、2 時間処理した（前処理）。洗浄後、前処理と同濃度で TJ-41 が溶解された RPMI 溶液に肺炎球菌を 1×10^6 CFU/well になるように調整した懸濁液を投与し、1 時間 37℃、5% CO_2 で反応させた。反応後、2 回洗浄し、penicillin (20 U/ml)で 30 分処理し、細胞外の菌を除去した。2 回洗浄後、滅菌蒸留水を投与し、マクロファージを溶解させた。溶解液中の菌数カウントを行うことで、マクロファージが細胞内に取り込んだ菌数（貪食した菌量）を評価した。
使用したマクロファージは複数種類あり、種類と細胞数は「結果」の項で適宜説明する。このプロトコールは既報(Domon et al., 2016)と東邦大学の実験手法を参考にした。

【マクロファージの肺炎球菌殺菌能評価】
96 穴プレート上で培養したマクロファージ（MH-S, 1×10^5 cells/well）に 1×10^6 CFU (Multiplicity of infection, MOI =10)の肺炎球菌が懸濁された RPMI medium を投与

し、貪食能実験と同条件で 1 時間反応させた。洗浄し、penicillin で処理後、各濃度（0-1 mg/ml）の TJ-41 を溶解した RPMI medium を投与し、2 時間反応させた。2 回洗浄後、滅菌蒸留水を投与しマクロファージを溶解させた。溶解液中の菌数カウントを行うことで、TJ-41 非投与群と比して、投与群の細胞内菌数に差があるか、つまりは殺菌能に違いがあるかを評価した。

【マクロファージの抗原提示能評価】

マクロファージに肺炎球菌を反応させ、洗浄後に TJ-41 溶解 RPMI を投与し、2 時間反応させるまでは、前述の殺菌能評価の方法と同じである（MH-S、1×10^5 cells/well、MOI =10）。2 時間の反応後、マクロファージを洗浄し、2% PFA in PBS を投与し、20 分静置し細胞を固定した。十分な洗浄後、complete RPMI medium を投与した。T 細胞を採取するため、BALB/c マウスをサクリファイスし、脾臓を採取した。細胞をフィルターで濾過、洗浄、遊離したのちに MACS Pan T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec)を用いた。具体的には、すりつぶした脾臓を 70μm フィルターに通し、細胞懸濁液に抗体（B 細胞、好中球、マクロファージ、上皮細胞に特異的に結合する抗体）とそれに結合する micro beads を反応させ、マグネットフィルターの中を通し、T 細胞を分離した。T 細胞懸濁液（1×10^6 cells/well）を調整しマクロファージの well に接種し、共刺激を促すための anti-mouse CD3 Ab (10 μg/ml; BioLegend) と anti-mouse CD28 Ab (5μg/ml; BioLegend)、Th17 分化を促すための mouse IL-6 (20 ng/ml; BioLegend)、mouse TGF-b (1 ng/ml; BioLegend)、 anti-mouse IFN-γ Ab (1 μg/ml; BioLegend)、 anti-mouse IL-4 Ab (1 μg/ml; BioLegend)を投与した。2 日目の時点の上清を採取し、mouse ELISA kits (R&D Systems, MN, USA)で IL-17A を測定した。具体的には、あらかじめ capture 抗体を結合させておいた 96 well plate に、上清を 1 検体 50μl ずつ well に接種し、1 時間反応させた。洗浄後、detection 抗体を接種し、2 時間反応させ、洗浄して西洋わさびペルオキシダーゼ酵素（HRP）を接種、次いで色素反応液を追加し、最後に停止液を投与し反応を終了させた。測定は吸光度計を用いて 450nm の波長で測定された。測定された IL-17A は、マクロファージの抗原提示量を反映していると考えられる。マクロファージを固定したのは、マクロファージ側のサイトカイン産生を抑止するためである。

【統計解析】

全てのデータは GraphPad Prism 8 software (GraphPad, Inc., La Jolla, CA, USA) を用いて解析した。2 群間の差を評価するために the Student t-test を用いた。3 群以上のグループ間の有意差を評価するために、one-way analysis of variance (ANOVA)、グループ間の差を検出するために Tukey's multiple comparison post hoc

test を用いた。 P 値<0.05 を統計的に有意とした。

結果

・肺炎球菌保菌マウスモデルの確立

仮説を検証するにあたり、検証に向く、肺炎球菌を保菌するマウスモデルの確立が最初の課題であった。肺炎球菌をマウスに鼻腔内接種すると、侵襲感染を起こすことなく鼻腔内に一定期間とどまることは、過去の保菌モデルを用いた研究で明らかである(Matthias et al., 2008; McCool and Weiser, 2004; van Rossum et al., 2005; Zhang et al., 2009)。鼻腔内保菌を確立させるための手法は、既報の Methods の項を参照すると、麻酔したマウスの鼻腔に肺炎球菌が懸濁された生食もしくは PBS 10μl を、鼻腔内投与すると記述されている(McCool and Weiser, 2004; van Rossum et al., 2005; Zhang et al., 2009)。しかしながら、それ以上の詳細な方法はほとんど書かれていなかった。本研究の最初の実験は、マウスの肺炎球菌鼻腔内保菌モデルを確立させる手技を確定させるものとなった。

まずは通常のピペットとチップを用いて、麻酔を施した BALB/c マウスを把持し、ゆっくりと鼻腔内注入を行った（B method とする)。結果、図 1 に示すように、鼻腔内への保菌は day28 時点まで達成されるのだが、問題点として、鼻腔内の保菌量に個体間のばらつきが大きかった。また、serotype 3 を用いて手技を行うと、1 週間程度以内に、30-40%の個体が死亡してしまう事態も生じた。死亡した個体を解剖すると、肺炎を起こしていることが分かった。Serotype 3 はマウスにおいて強毒で肺炎致死率が高いことが知られており、この手法では下気道への菌液の誤嚥が多いことが予想された。

単純にピペットで注入するのみの手法では、個体の死亡が少なく、ばらつきの少ない結果を得ることが難しかったため、同教室では新しい手法を考え、実行した。具体的には、マウスを麻酔処理した後、側臥位にして寝かせ、オートピペッターを用いて、1 回あたりの注入量を少なく頻回に鼻腔内注入した。結果、図 1 に示すように B method に比較して、新法（A method）は個体間の結果のばらつきが少なくなることが判明した。また、個体の死亡も 10%前後と大きく低下した。側臥位にして、かつ微量をすこしずつ注入することで、下気道への菌液の落ち込みを最小限にしていることが推測された。

個体間の結果のばらつきが少ないということは、今後治療介入による保菌量の差を検討するにあたり、差を見出しやすいことにつながる。以後の実験の保菌手技はすべて A method を用いることとした。

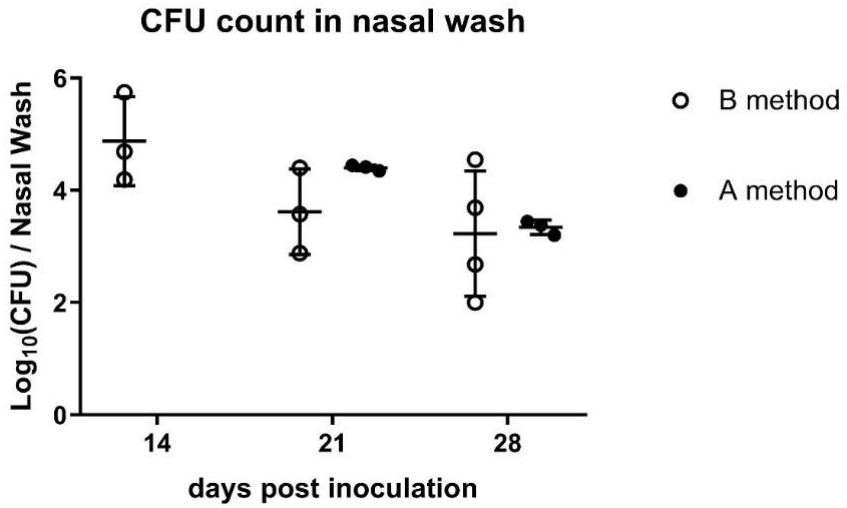

図 1.　従来法(B method)と新法(A method)による鼻腔内保菌量.　一つの plot がマウス一個体の結果を示す. マウスは BALB/c , 肺炎球菌は serotype 19F, 注入した菌量は 6×10^4 CFU/10μl.

・マウス、菌株による保菌量の推移の違い

これまでの保菌モデルを用いた研究では、ほとんどで C57J/BL6 (BL6)マウスが用いられていた。東邦大学微生物学教室で肺炎球菌関連の研究で通常使用されているマウスは、BALB/c、C57BL/6J (BL6)であり、本研究では 2 種類を保菌モデルに用いた。肺炎球菌は、同教室で過去の肺炎球菌関連の実験に主に用いられていた serotype 19F (strain 741, Sp 19F)と、serotype 3 (ATCC 6303, Sp 3)を使用した。いずれのマウス、菌株も上記の A method を用いて保菌し、保菌後 1-6 週の時点での鼻腔内保菌量の推移を確認した。

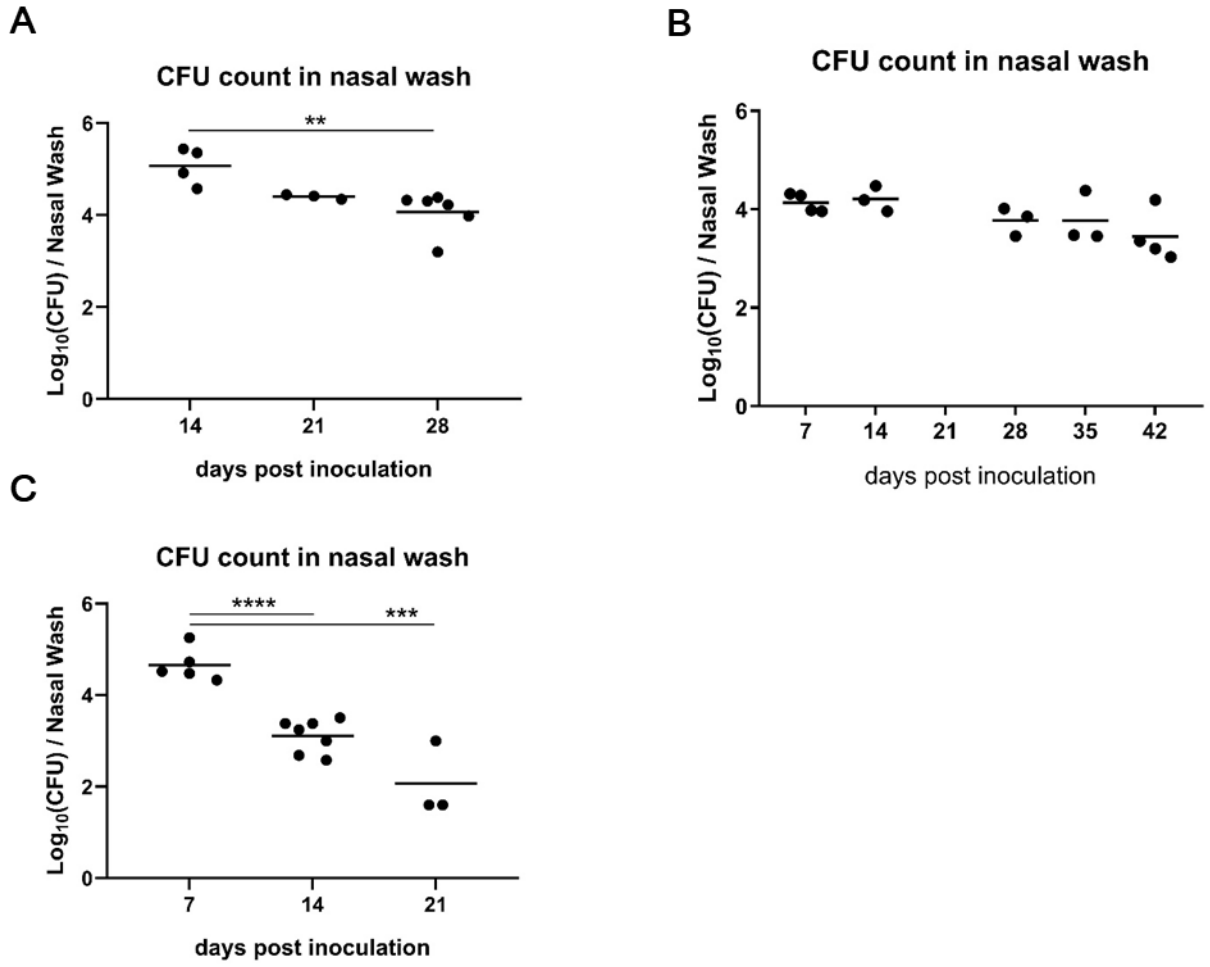

図 2. モデル毎の鼻腔内保菌量の推移. マウスと菌株の組み合わせはそれぞれ A. BALB/c と Sp 19F, B. BALB/c と Sp 3, C. BL/6 と Sp 19F. 一つの plot がマウス一個体の結果を示す. ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001.

図 2 に示すように、用いるマウスと菌株の組み合わせで、保菌量の推移が異なることが確認された。2A の BALB/c と Sp 19F の組み合わせは、他研究員の実験データで、day 35 以降は急速に菌量が低下することがわかっていた（in preparation）ため、マウスの使用個体数のことも考慮し、day28 までの測定にとどめた。Day 28 にかけて経時的に、保菌量が低下していく現象が再現性をもって確認できた。一方 2B の BALB/c と Sp 3 の組み合わせでは、保菌量が低下傾向にはなるものの、day 42 に至っても 10^3 CFU を超える菌量が維持されていることがわかった。2C は BL6 と Sp19F の組み合わせだが、BALB/c に比べると急速に保菌量が低下し、day 21 には検出限度近くまで菌がクリアランスされることがわかった。この推移は概ね既報と同様であった。BL6 と Sp3 の組み合わせは、BALB/c と Sp3 の結果をふまえて、行わ

なかった。

今後、保菌モデルへの治療介入の効果を見るにあたり、Sp 3 を用いた場合では、保菌が遷延しているため適切な観察期間を定めるのが難しく、必要マウス量も増えてしまうことが懸念された。そのため、今後のマウス実験に用いる菌株として、Sp 19F を選択した。マウスは、BALB/c と BL6 の 2 種類を用いて検討することとした。

・肺炎球菌保菌マウスモデルにおける漢方薬の効果、予備実験

次に、マウスに Sp19F を鼻腔内保菌させた状態に、漢方薬の投与が保菌量に変化を与えるのかどうかを検証した。「緒言」で述べた補中益気湯（TJ-41）の他に、補剤として代表的な十全大補湯（TJ-48）、マクロファージへの修飾作用などが基礎実験で判明しており非結核性抗酸菌症への効果が報告されている麻黄附子細辛湯（TJ-127）も候補薬として選択した。果たして保菌モデルに効果があるのか、この時点では全く不明であり、漢方のエキス製剤の製造元に実験目的の試薬提供を依頼することはできなかったため、市販のエキス製剤（ツムラ株式会社）を購入し、予備実験に使用した。

まずは、マウスのケージにセットする飲水ボトルにエキス製剤を溶解し、投与する方法を行った。事前にマウスの飲水ボトルからの 24 時間飲水量を測定し、4 ml/day であることを確認した。滅菌した水道水に 2000 mg/kg/4ml/day となるようにエキス製剤を溶解し、漢方入り飲水ボトルとした。飲水ボトルは衛生面を考慮し、2-3 日ごとに交換した。コントロールには水道水のみをボトルで投与した。漢方投与群は、保菌を行う 2 週前からエキス製剤入りボトルをセットし、菌数カウントを行うまで終始投与した。マウスの使用個体数を最小限にするため、各マウス種で鼻腔内保菌量の測定日を 1 点にし、保菌量の減少傾向が明らかになるポイントとして、BALB/c では day 28 に、BL6 では day 14 に設定した。

結果は図 3 に示す。図 3A は初回の BALB/c の結果で、各群の個体数は n=3-4 と少ないため、有意差は検出されないが、TJ-41 群は control と比して菌量が少ない傾向にあり、TJ-48 群も有望であった。TJ-127 群は差が見られず、候補薬として削除した。図 3B は 2 回目、n=5 に増やして行った再現性実験であるが、同様に、有意差はつかないものの、TJ-41, 48 群ともに control 群よりも菌数が少ない傾向にあった。BL6 の予備実験でも同様の結果であり、control 群に比して TJ-41 群は day14 での鼻腔内菌量が少ない傾向にあり、TJ-127 群の菌数減少はみられなかった（図 3C）。

これらの結果から、TJ-41, TJ-48 いずれも鼻腔内保菌量を減らす可能性のある薬剤と考えられた。本実験に進むにあたり、使用マウス数が増えること、後述するように胃ゾンデによる直接経口投与に切り替えたことから、費用、労力いずれの面からも、両薬を同時に実験対象として用いることは現実的ではなかった。TJ-41 は健常人における投与でインフルエンザ予防効果が示されており、日常臨床で TJ-48 に比較して一

般的に使用頻度が高いことなどを鑑みて、本実験は今後の汎用性を考慮して TJ-41 を用いて進めることとした。

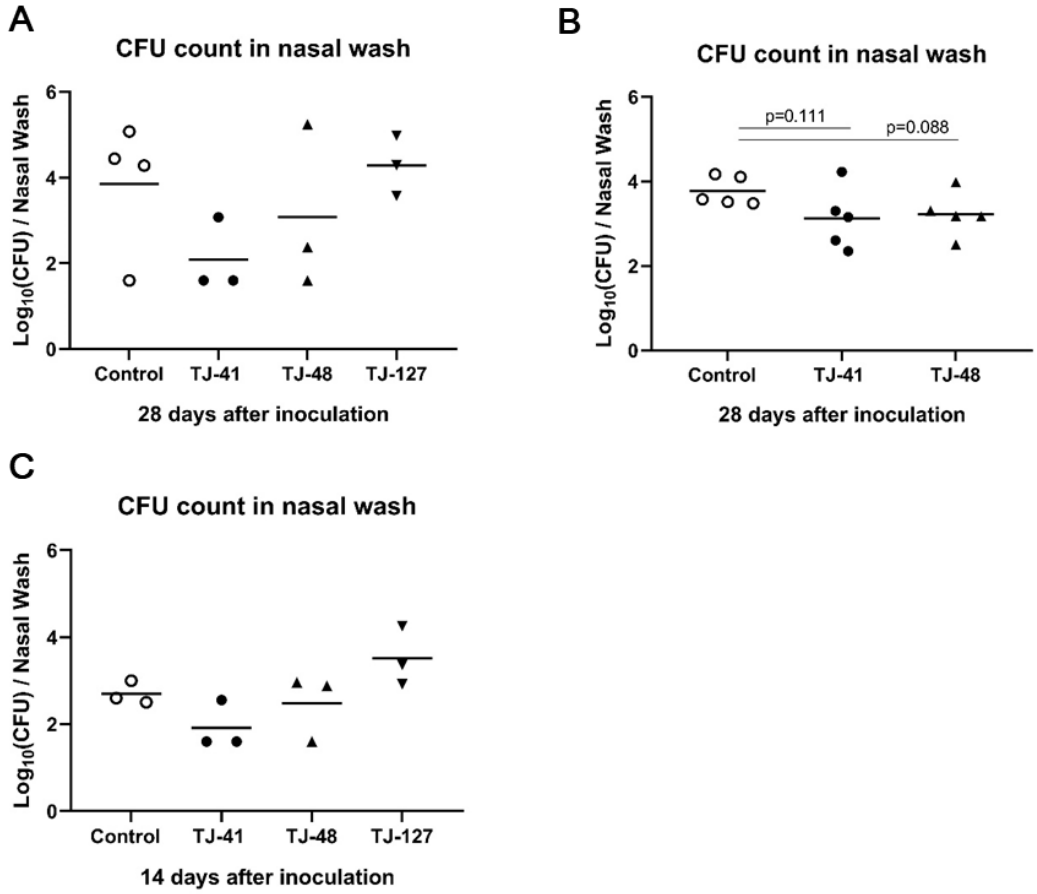

図 3. 保菌モデルにおける漢方薬の効果, 予備実験. A. BALB/c, Sp19F の組み合わせの保菌後 day 28 における鼻腔内保菌量.　B. A の再現性確認実験. C. BL6, Sp19F の組み合わせの保菌後 day 14 における鼻腔内保菌量. 一つの plot がマウス一個体の結果を示す.

・肺炎球菌保菌モデルにおける補中益気湯の鼻腔内保菌量への影響

上記の予備実験の結果を受けて、緒言で述べた、「補中益気湯が、肺炎球菌保菌のクリアランスを促進する。その背景として、肺炎球菌に対する自然免疫、獲得免疫に作用し、免疫賦活を通して菌のクリアランスを早める。」という仮説を本実験として検証することを決めた。ツムラ株式会社に基礎研究目的の試薬提供を申請し、受理されたため、TJ-41 のエキス乾燥粉末製剤の無償提供を受けた。

本実験にあたり、マウスへの TJ-41 の投与方法も変更した。過去の多くの研究で行

われている、胃ゾンデを用いた経口投与を採用し、滅菌水道水に溶解した TJ-41 を、2000 mg/kg/day で投与することとした。BALB/c モデルにおける実験の流れを図 4 に示す。Day 14 と 28 の時点でサクリファイスし、鼻腔洗浄液の菌数をカウントした。また、後述するが、本実験の結果を受けて、その後同様のスケジュールで複数回実験を繰り返し、再現性の確認と、real time PCR による mRNA の発現の解析や、flowcytometry による鼻腔内の細胞解析を行った。BL6 を用いた実験では、菌数カウントを day 15 に行った。

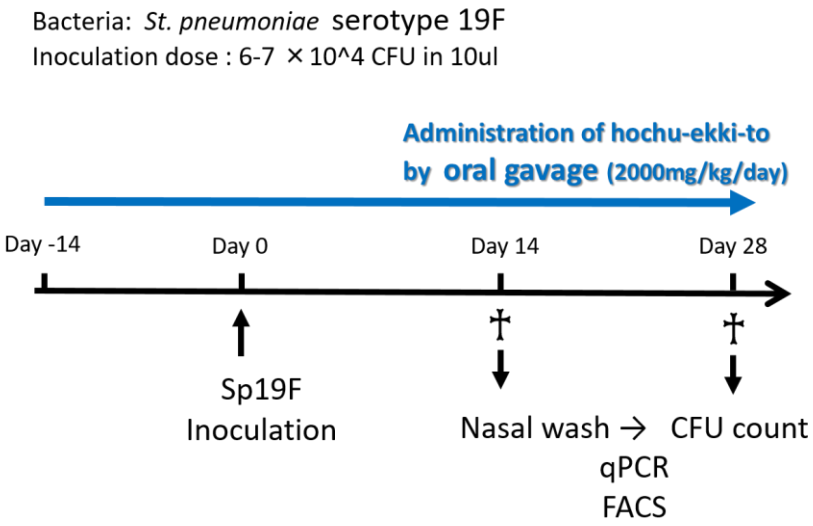

図 4. BALB/c の肺炎球菌保菌モデルへの TJ-41 投与実験のスケジュール. 治療群は保菌 14 日前から TJ-41 を連日経口投与し, day 28 まで継続した. コントロール群には, 胃ゾンデで同量の水を投与した.

BALB/c モデルの結果を図 5 に示す。5A は、本実験初回（各群 n=4-6）の結果であり、有意差をもって、TJ-41 治療群の鼻腔内菌数は、control 群と比較して低下していることが判明した。その後同じ実験で再現性を確認し、2 回分のデータを pool した結果を 5B に示した。Day 14, 28　ともに、TJ-41 を投与することで、control 群よりも鼻腔内の菌量が減少している結果となった。肺炎球菌保菌モデルを用いて、TJ-41 が鼻腔内の保菌量を減少させることができることを証明することができた。

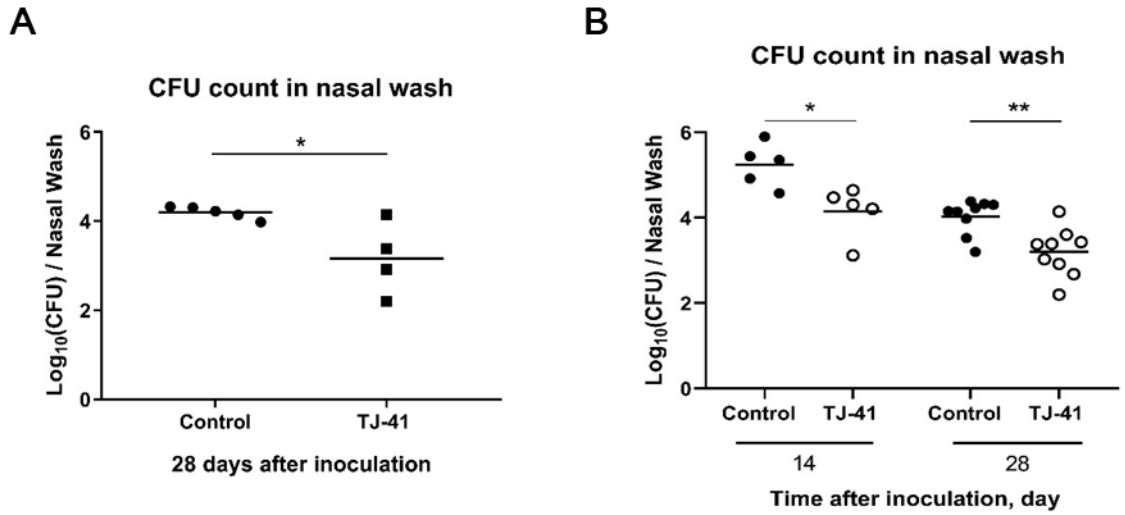

図 5. BALB/c 肺炎球菌保菌モデルにおける TJ-41 の菌量減少効果. A. 初回実験. B. 2 回の実験のデータを合わせたもの.黒丸が control 群, 白丸が TJ-41 投与群. 一つの plot がマウス一個体の結果を示す. *p<0.05, ** p<0.01.

BL6 でも同様の実験を行った。Day 15 の時点での鼻腔洗浄液の菌数カウントを行った。結果、3 回の独立した実験のデータを pool したものを解析しても、有意差のある結果は得られなかったが、TJ-41 群の菌量は control よりも低い傾向であった（図 6 に示す)。個体数を増やして検証すれば、いずれは有意差がつく可能性がある結果ではあった。BALB/c と同様の結果であり、異なるマウス種でも再現性が得られたと考えた。

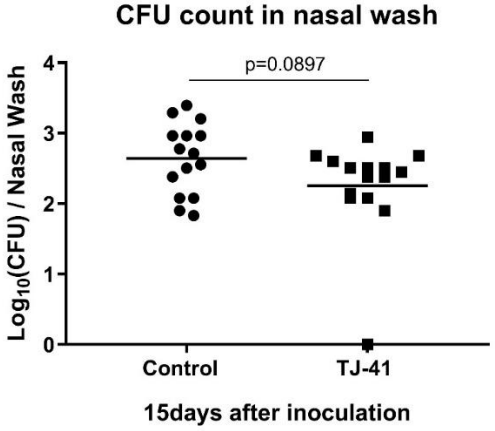

図 6. BL6 肺炎球菌保菌モデルにおける TJ-41 の効果. 3 回の独立した実験のデータを合わせて解析した. 一つの plot がマウス一個体の結果を示す.

予備実験から含めて、肺炎球菌保菌モデルへの TJ-41 の保菌量減少効果は高い再現性をもって認められることが示された。次の段階として、その保菌量減少効果が何によってもたらされるのかを、探ることとした。BALB/c と BL6 を両者とも使用して検討するのは費用、労力共に負担が大きくなることを踏まえて、上記の実験で良好な結果を得た BALB/c マウスに絞って、以後の実験を検討してくこととした。BALB/c を選択したもう一つの理由としては、後述する実験で用いられる IL-17A knock out マウスが BALB/c をベースとしたマウスであるからである。

・鼻腔内細胞の flow cytometry による分析

TJ-41 の保菌量減少効果の背景として、宿主免疫修飾作用を推定していたため、前述の実験系で鼻腔内菌量の測定の他、鼻腔内細胞を flow cytometry によって解析し、各 mRNA の発現の変化を real time PCR 技術によって測定した。Flow cytometry は【方法】で述べたように各抗体を用いて蛍光染色を行った細胞を解析したが、主要な細胞の gating の手順は、図 7 に示す。

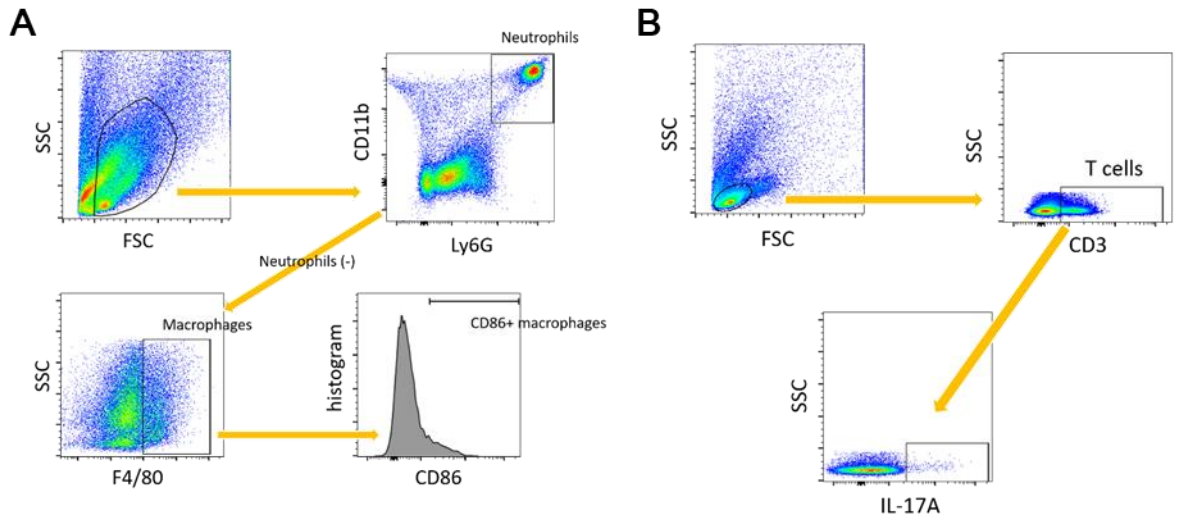

図 7. Flow cytometry による各種細胞の gating. A. Nasal tissue の好中球とマクロファージの gating 手順を示した. B. NALT の IL-17A 産生 T 細胞の gating 手順を示した.

図 8 に、肺炎球菌保菌モデルの day 14, 28 における Nasal tissue 内の各免疫細胞のカウント結果を示す。好中球数は day 28 の時点で TJ-41 治療群の方が有意に上昇

していたが、両群とも day 14 と比較すると大幅に数値が低く、保菌後期に有効な働きをしていたとは考えにくかった（図 8A)。マクロファージは、day 14, 28 ともに、TJ-41 群で有意にカウント数が高いことが判明し、CD86 陽性と定義した活性型マクロファージの数値も、同様に TJ-41 群で高かった(図 8B,C)。樹状細胞も gating してカウントしたが、特に有意差は得られなかった(図 8D)。

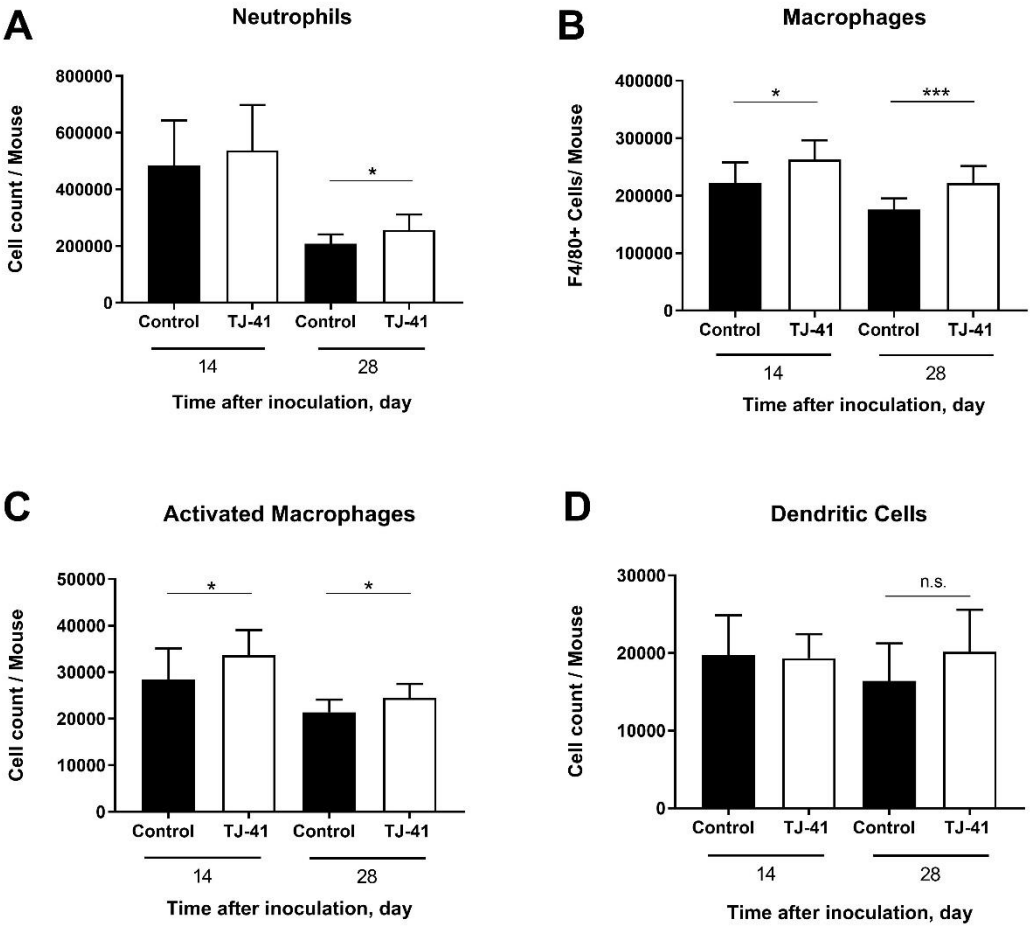

図 8. Nasal tissue 内の免疫細胞の flow cytometry 結果. データは 2 回の独立した実験結果を pool したものを解析している. 各実験の n=5-7. 各群の Bar はデータの mean と SD を示している. *p<0.05, *** p<0.001. n.s., not siginificant.

図 9 に、NALT の細胞解析の結果を示す。【方法】で述べた PMA 刺激を行うと好中球などの細胞が死亡するため正確な細胞数はわからなくなり、結果はあくまで T 細胞

全体の中の比率で示されている。図 9A は CD4 陽性 T 細胞に含まれる、IL-17A 産生細胞の割合を示している。Day 14 と比して day 28 では両群ともその割合が上昇しているが、TJ-41 群は control 群と比較して著明にその割合が高くなっていることが判明した。なお、NALT 中の CD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞の割合、制御性 T 細胞（regulatory T cell）の割合も測定したが、特に有意な結果は得られなかった(図 9B-D)。

これらの結果から、TJ-41 の保菌量減少効果の背景を説明するにあたり、マクロファージ（活性型マクロファージ）の増加、IL-17A 産生の亢進が重要な鍵になるのではないかと推測した。

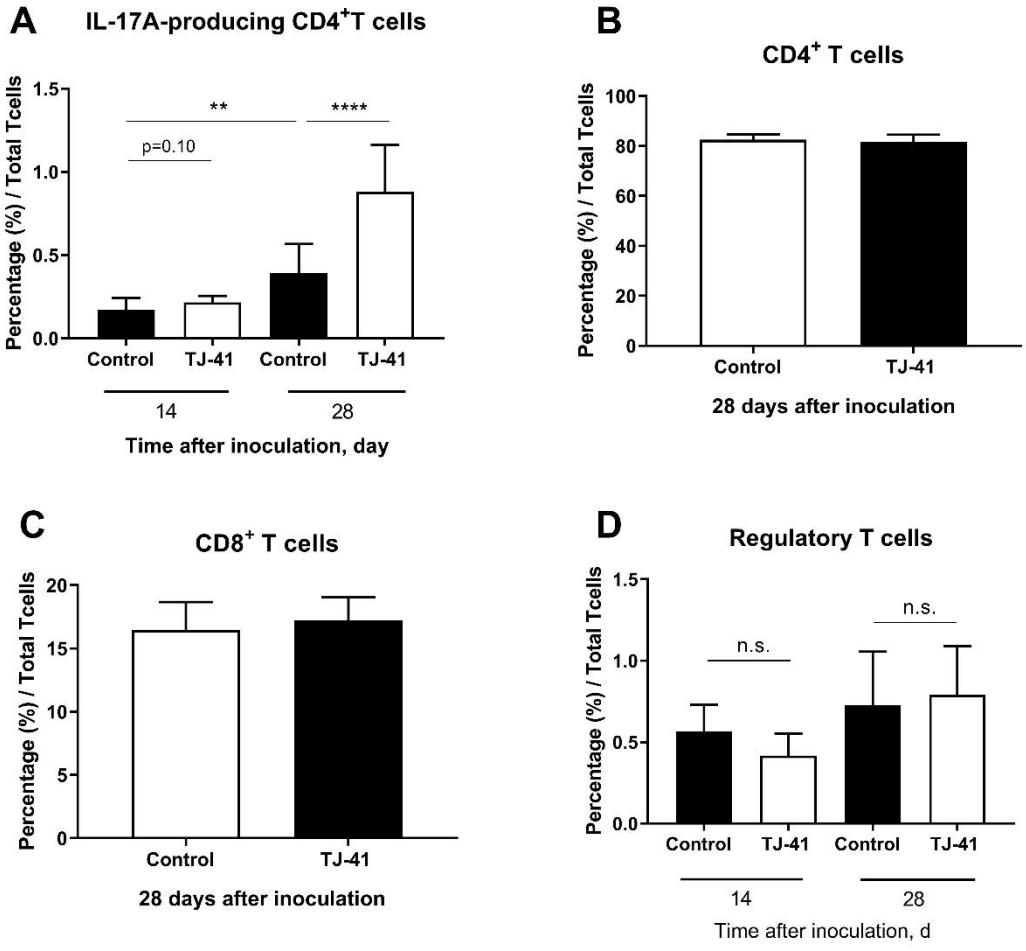

図 9. NALT 中のリンパ球の flow cytometry による細胞解析. それぞれ T 細胞全体の中での割合を示している. データは独立した 2 回の実験結果を pool して解析している。各実験の n=5-7. 各群の Bar はデータの mean と SD を示している. **p<0.01, **** p<0.0001. n.s., not significant.

・鼻腔内の遺伝子発現の解析

Flow cytometry とは別の視点で宿主免疫の状態を知るために、各種サイトカイン、ケモカインの状態を測定しようと試みた。当初、ELISA 法で測定することも考慮したが、鼻腔内の細胞数は肺や脾臓などの他の組織よりも著明に少なく、測定対象が検出限度以下になってしまうことが予想され、また既報でも鼻腔内のサイトカインを ELISA で測定しているものは検索した限り見つけられなかった。そのため、real time PCR による mRNA 発現の測定を選択した。

前述の TJ-41 を投与した保菌モデルと同じ実験系で検体を採取し、Nasal tissue 内の各物質の day 28 における mRNA 発現を解析した。

図 10A に初回実験の測定結果を示す。マクロファージの活性化の指標となるケモカイン CCL2（MCP-1）や、好中球遊走因子として働く炎症性ケモカインの CXCL-1, CXCL-2 の mRNA 発現が TJ-41 群で control 群よりも低いという結果が得られた。前述の flow cytometry の結果ではマクロファージや好中球数は TJ-41 群の方が高くなっていたので、その現象を説明できない結果であった。再現性を確認した 2 回目の実験結果は図 10B の通りだが、初回と異なり、逆に CCL2, CXCL1,2 は TJ-41 の方で高い傾向にあった。IL-6 も同様に高くなっており、こちらの結果の方が flow cytometry の結果と矛盾しないように思われた。2 回の実験で反対の方向の結果が出てしまい、再現性は全く得られなかった。保菌後 28 日も経過している vivo の結果であるため、わずかな条件の違いなどで結果が大きく異なる可能性もあり、またそもそも RNA の抽出、cDNA の合成から PCR までの手技的な要因も否定できなかった。研究に費やせる期間も限られていたことから、vivo の mRNA 発現の結果をさらに追求することは避け、中断した。

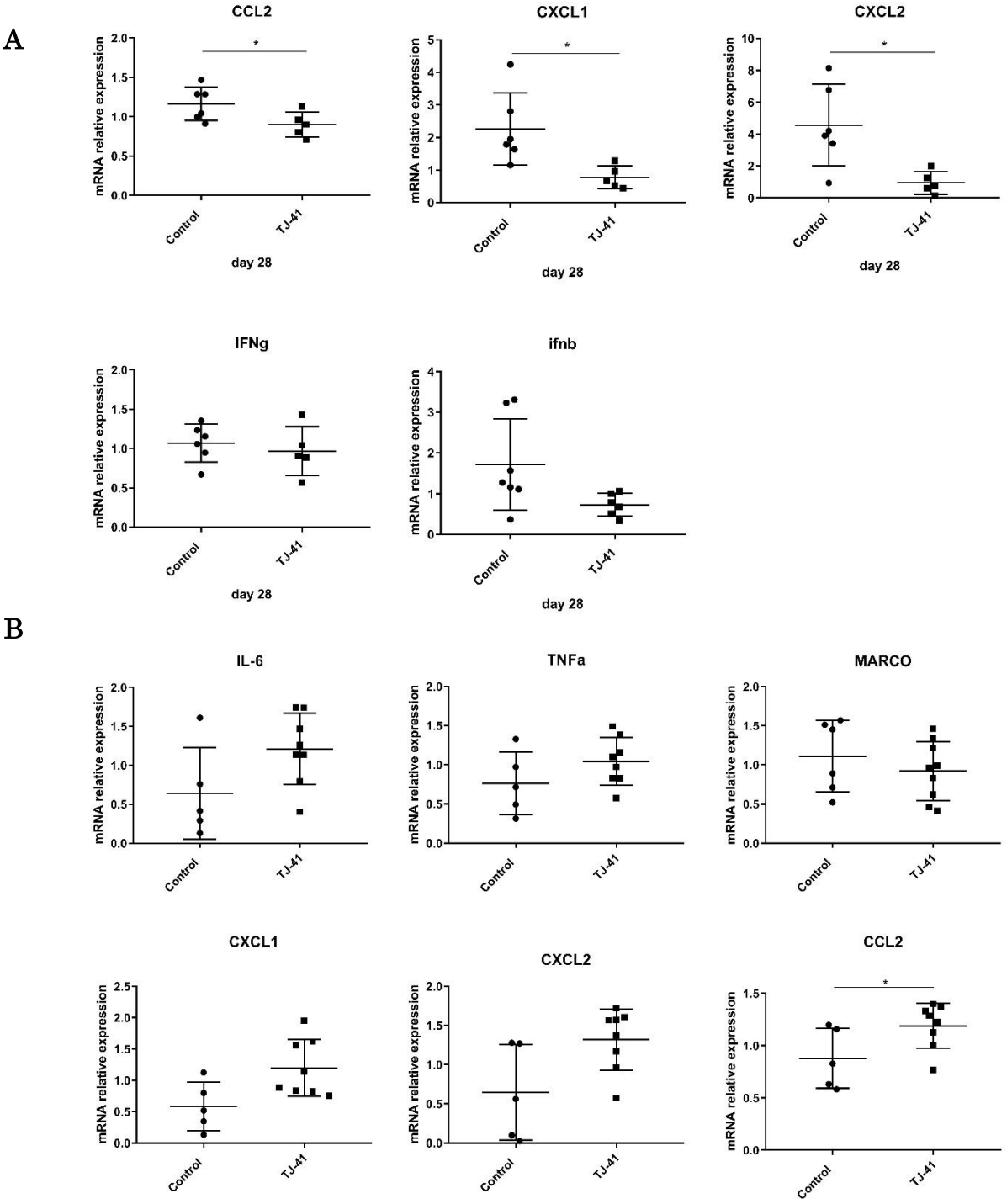

図 10. Nasal tissue 内の各サイトカイン、ケモカイン等の保菌後 day28 における mRNA 発現測定結果. A, B とも、時期をずらして同条件で TJ-41 投与を行った。各群の line はデータの mean と SD を示している. *p<0.05.

・IL-17A knockout マウスにおける TJ-41 の効果

これまでのマウス実験で TJ-41 による保菌量減少効果と、IL-17A の産生が亢進している現象を確認した。「緒言」でも述べた通り、IL-17 は保菌の後期クリアランスに必須の要素であり、IL-17A が上昇することで、マクロファージのさらなる活性化、集積が生じ、菌の除去をもたらすことがわかっている(Zhang et al., 2009)。TJ-41 による保菌量減少にも、IL-17A の産生亢進が関与している可能性が考えられた。東邦大学微生物学教室では、BALB/c ベースの IL-17A knockout (KO)マウスを保有し、継代飼育している。そこで、IL-17A KO マウスにおける TJ-41 の効果を見ることで、IL-17A の関与を検討することができると考えた。

まず予備実験として行った IL-17A KO 保菌モデルの鼻腔内菌量の経時的推移の結果を示すが、IL-17A KO マウスでは保菌が長期間遷延することがわかった(図 11A)。次に TJ-41 の効果を検証したが、IL-17A KO マウスへの肺炎球菌保菌手順、TJ-41 の投与スケジュールは Wild Type (WT)のものと全く同様に行った。結果、図 11B に示す通り、day 14, 28 のいずれの時点でも control 群と TJ-41 群の間で有意差は見られなかった。

同じ実験系で、WT と同様 flow cytometry による nasal tissue の細胞解析を行った。結果、マクロファージ、好中球、樹状細胞いずれも、両群で細胞数に有意差はなかった（図 12)。

これらの結果から、TJ-41 肺炎球菌保菌モデルで保菌クリアランスを促進させる現象には、IL-17A の存在が必須であることがわかった。また、IL-17A が存在しないと、TJ-41 群におけるマクロファージの増加も観察されなくなることがわかった。

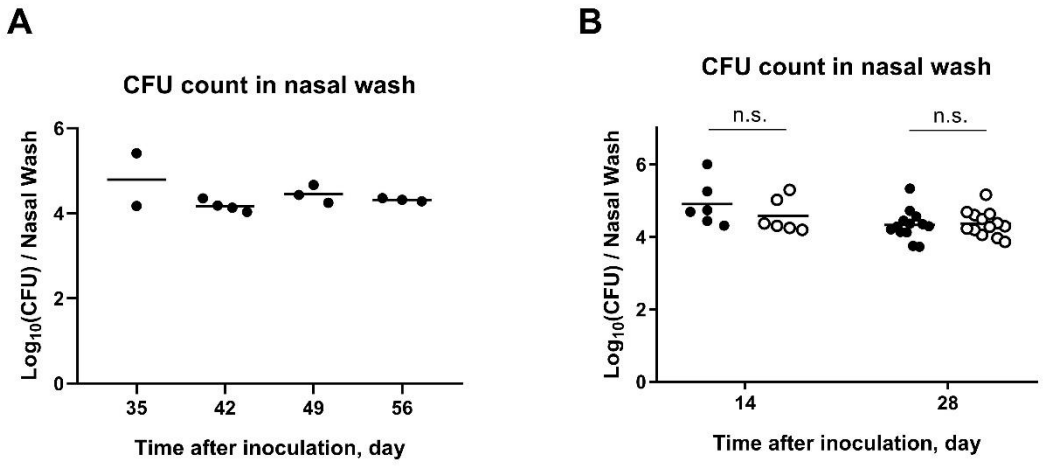

図 11. IL-17A KO マウスにおける TJ-41 の効果. A. IL-17A KO マウスに肺炎球菌 serotype 19F を保菌させた後の、鼻腔内保菌量の自然経過. B. IL-17A KO マウス保菌モデルへの TJ-41 の効果. 黒丸が control 群, 白丸が TJ-41 投与群. 一つの plot がマウス一個体の結果を示す. n.s., not significant.

・IL-17A 産生亢進がもたらす保菌クリアランス促進への影響

これまでの結果から、TJ-41 が IL-17A の存在を通じて最終的に保菌のクリアランスを早めていることが示唆された。ここで新たな疑問として、①IL-17A が TJ-41 群で亢進することが、果たして菌のクリアランスの向上と直接関係があるのか、②IL-17A 産生が亢進されるに至るための前段階の免疫学的な機序はなにか、が生じた。まずは①を検証することとした。

先述した in vivo の研究実験では、保菌後 28 日と長い期間を経て IL-17A の産生亢進が確認されており、宿主反応の個体差の変動が大きいことが予想され、疑問①を検証する適切な時期と方法を見出すのは困難と思われた。そこで、細胞実験で鼻腔内の宿主反応を疑似的に再現し、比較的短時間で効率よく検証できるような実験系を考案した。鼻腔内の免疫細胞の全体的な作用が欠かせないと考えられたため、鼻腔内の細胞を「方法」に記載した通りに白血球のみ分離し、細胞培養の well に接種した。肺炎球菌を生菌のまま曝露させると、培養液の中で増殖することが予想されたため、抗原性が保たれ、宿主免疫を惹起させる方法として、既報に倣い whole cell antigen (WCA) を作成し投与することとした。また、TJ-41 は RPMI によく溶けるため、溶液を作成し、投与することとした。

まずは鼻腔由来の白血球の well に、WCA と TJ-41 をそれぞれ投与する群としな

い群に分け、投与後 3 日目の時点で各種測定、解析をすることとした。今後の実験を想定した際に、well の中で IL-17A の発現、産生が確認できる系でなければ、上記の疑問①も②も検証できないため、まずは IL-17A の評価を行った。IL-17A を直接 ELISA で測定することも考えたが、過去の文献で鼻腔内の IL-17A を ELISA で測定しているものは存在せず、well 中の細胞数も 1×10^5 個と少ないため、検出感度以下になることが予想された。そのため、IL-17A mRNA の発現を測定することとした。図 12 は、細胞中の IL-17A mRNA の発現を、real time PCR technique を用いて相対的に測定したものである。左半分のグラフは WCA の曝露がないものであるが、それに比して右半分の WCA を投与した群では有意に IL-17A mRNA の発現が上昇していた。また、WCA を投与した 2 群間で比較すると、TJ-41 を投与した群の方が、control 群よりもさらに IL-17A mRNA の発現が上昇していた。この実験により、細胞実験で鼻腔由来細胞に肺炎球菌抗原を感作させることで IL-17A の発現が促される現象と、TJ-41 が存在することでその発現がさらに高まる現象が確認できた。これは前述の in vivo の実験結果と同様の結果であり、in vivo 実験で生じた疑問を検証するのに適した実験系であると考えた。

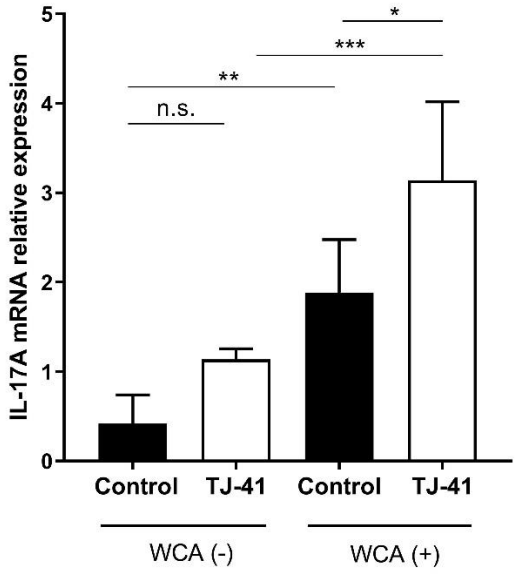

図 12. 細胞実験における鼻腔由来細胞の IL-17A mRNA の相対的発現量. データは独立した 3 回の実験の代表的なものを示す. 各実験の n=6-8. 各群の Bar はデータの mean と SD を示している. *p<0.05, **p<0.01, *** p<0.001. n.s., not significant.

直接的な IL-17A の測定ではないものの、WCA に曝露された環境で TJ-41 が作用すると、IL-17A mRNA の発現が相対的に増えることが確認された。この実験系を用いれば、TJ-41 が相対的に IL-17A の産生を高めている状態の、マクロファージの状態を評価するのに適していると考えた。TJ-41 による作用が、IL-17A の産生亢進以外にも存在する可能性があるので、同時に IL-17A KO マウスの細胞で同様の実験を行い、結果を比較した。

図 13 に、上記の IL-17A mRNA を測定した実験系と同時点の day3 で細胞を取り出し、フローサイトメトリーで測定したマクロファージの解析結果を示す。A と B はそれぞれ、Wild type（WT）と IL-17A KO マウスから採取した鼻腔由来細胞の、CD86 陽性マクロファージ（活性型マクロファージ）のカウント数である。WT 細胞では、WCA に曝露された群で、TJ-41 投与群のカウント数が有意に高かった。一方で、IL-17A KO マウス細胞では、WCA 曝露群間でその差は見られなかった。C,D は、マクロファージ全体のカウント数を示しているが、WT、IL-17A KO マウスいずれでも、WCA 曝露群間でカウント数に差は見られなかった。これらの結果から、WCA 曝露された鼻腔内細胞が、TJ-41 の作用で活性型マクロファージの数を増やすが、その現象は IL-17A が欠如している状態では生じないことが判明した。

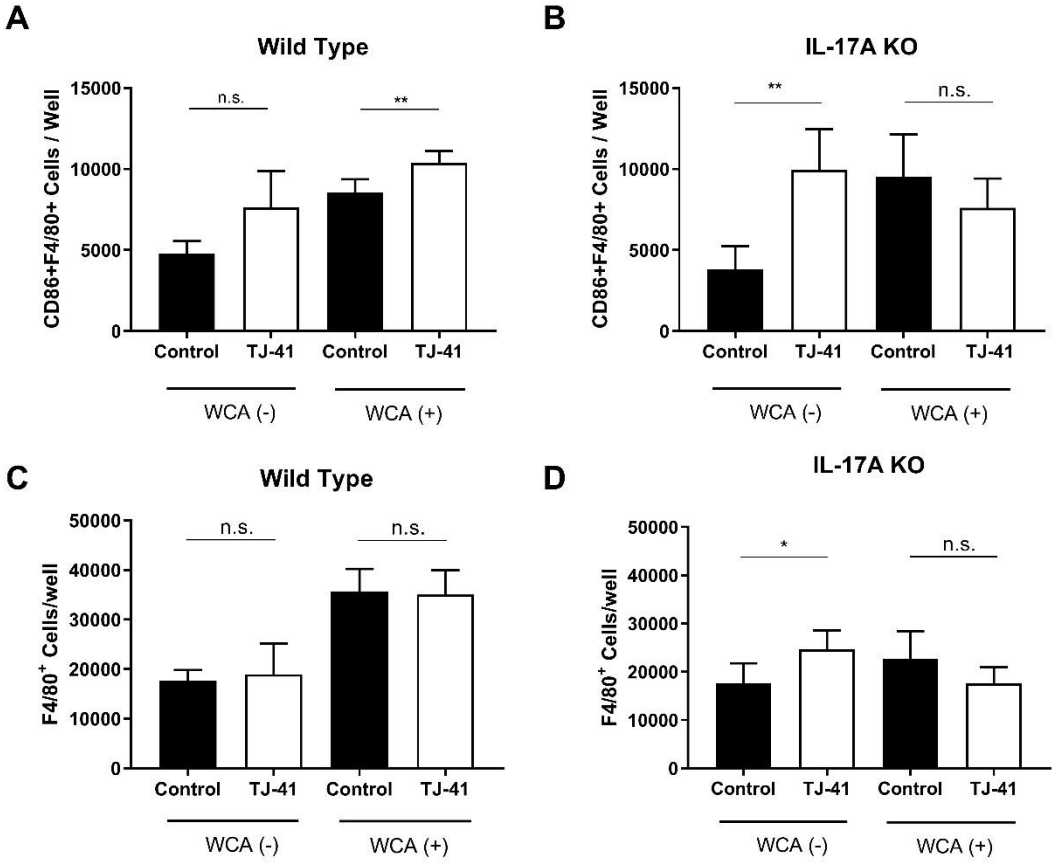

図 13. 鼻腔由来細胞中のマクロファージ数の測定. A, B は CD86 陽性の活性型マクロファージ, C と D はマクロファージの総数.独立した 2 回の実験の代表的な結果を示す. 各実験の n=6-8. 各群の Bar はデータの mean と SD を示している.*p<0.05, **p<0.01. n.s., not significant.

この結果のみでは、活性型マクロファージが増えたことが肺炎球菌のクリアランスに直接関係があるのかを示せていなかったので、次に、マクロファージの肺炎球菌貪食能を測定することとした。同じ実験系を用いて、WCA 曝露と TJ-41 投与後 3 日の時点で浮遊細胞を洗浄して除去し、付着細胞のみを残した。付着細胞はフローサイトメトリーで確認したところ、75%がマクロファージであり、残りは除去しきれなかった好中球やリンパ球であった。図 13　C,D で示した通り、WCA 曝露群間でマクロファージ総数は差がなかったため、control と TJ-41 群の肺炎球菌貪食数は、貪食能の差と見なせると判断した。図 14 に、その結果を示す。結果、WCA 曝露ありで control と TJ-41 を比較したところ、WT マウス細胞では TJ-41 群の方で有意に肺炎球菌貪

食数が有意に高くなっており、一方 IL-17A KO マウス細胞では、両群で差が見られなかった。

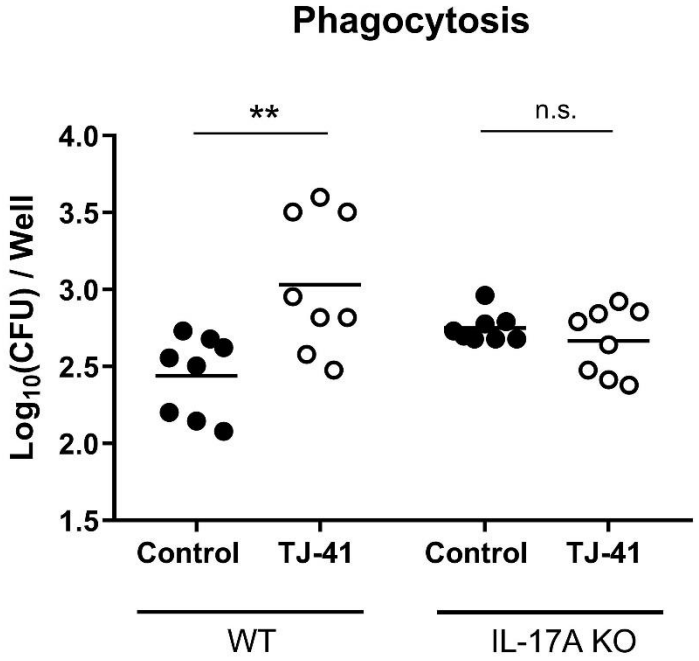

図 14. 鼻腔由来マクロファージの肺炎球菌貪食能. データは肺炎球菌を接種後 1 時間の時点の細胞内に取り込まれた菌数で,菌数が多いほど, 貪食能が高いことを表わす. 独立した 2 回の実験結果のうち代表的なものを示した.

**p<0.01. n.s., not significant.

図 13,14 で示した結果をまとめると、WT 細胞では WCA 曝露と TJ-41 の作用があることで活性化マクロファージが増加し、かつ肺炎球菌の貪食能も上昇した。IL-17A KO マウス細胞ではそれらの現象は見られないことから、IL-17A の存在が TJ-41 の効果発現にために必須であることがわかり、in vivo の実験結果に矛盾しないものであった。同じ実験系で、相対的に TJ-41 投与群の方で IL-17A mRNA の発現が上昇していたことから、相対的な IL-17A 産生亢進がマクロファージの活性化と貪食能をさらに高めていることが示唆された。

・TJ-41 による IL-17A 産生亢進におけるマクロファージの関わり

前述の実験では、TJ-41 によって産生が高まった IL-17A が結果的にマクロファージにどう影響し、肺炎球菌の貪食能を変化させるかを検証した。

次に、前項で挙げた疑問②「IL-17A 産生が亢進されるに至るための前段階の免疫学的な機序はなにか」を解明していくこととした。その方法として、前項の実験系で、鼻腔由来細胞に肺炎球菌抗原と TJ-41 を投与して IL-17A mRNA の発現が亢進することが確認できたため、この実験系に特定の介入をして、TJ-41 による効果が打ち消されるかどうかを検証することとした。

これまでの報告では、マクロファージが保菌を直接クリアランスするための主要な effector cell であると同時に、肺炎球菌が侵入した際の抗原認識、かつ抗原提示からの獲得免疫の誘導を担う主要な細胞であることも示唆されている(Davis et al., 2011; Dorrington et al., 2013; Zhang et al., 2009)。我々は、疑問②に対する仮説として、「TJ-41 がマクロファージに直接作用することで、そのあとに続く獲得免疫の誘導を増強している」を上げた。

この仮説を検証する第一段階として、前項の実験系に、マクロファージを除去する処置を加えることを考えた。マクロファージの除去方法として、既報にならいリポソーム化ビスホスホネート製剤を用いた。ただし、ビスホスホネート製剤の実験は vivo で行われているものがほとんどであり、鼻腔由来細胞を用いた細胞実験での使用報告は見当たらなかった。そこで、clodronate liposome を購入し、予備実験として鼻腔由来細胞への効果を見ることとした。10^5 cells/well の細胞に、3μl の clodronate liposome を投与し、24 時間後にフローサイトメトリーによる細胞解析を行った。結果、control 群に比して、薬剤投与した depletion 群では有意差をもってマクロファージ数が減少しており、約 35%の減少になった。また他に好中球、樹状細胞、リンパ球数を比較したが、両群で有意差は見られなかった。マクロファージを有意に減少させることができる薬剤であることを確認した。

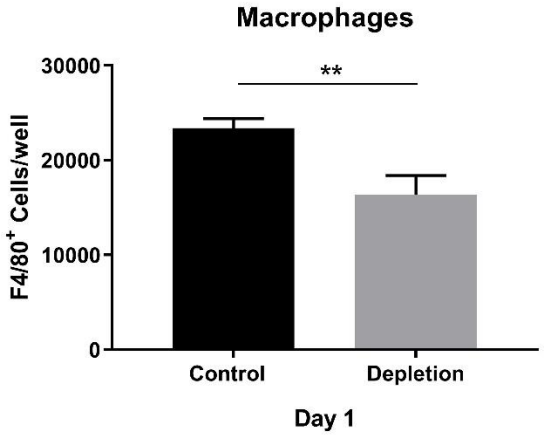

図 15. 鼻腔由来細胞への clodronate liposome 投与後 1 日でのマクロファージ数の変化. 各群とも n=3 で検証した. 各群の Bar はデータの mean と SD を示している. **p<0.01.

上記の予備実験をふまえて、「方法」に記述した通り、clodronate liposome によるマクロファージ除去をあらかじめ行った鼻腔由来細胞に WCA、TJ-41 をそれぞれ投与する群としない群の 4 群に分け、3 日目の IL-17A mRNA の発現を解析した。結果を図 16 に示す。A は、liposome 単独製剤の control、B は clodronate liposome 処理後の細胞だが、B に示す通り、WCA 曝露あり、TJ-41 投与群の IL-17A mRNA 発現量は control と有意な差は見られなかった。ただし、liposome 単独製剤処理群の方でも、この時は WCA 曝露あり、TJ-41 投与群の IL-17A mRNA 発現量が control に比して高い傾向にはあったものの、有意差としては検出されなかった。Liposome 製剤はマクロファージに取り込まれるので、clodronate が含まれていないにしても、ある程度の機能修飾を生じてしまっている可能性も考えられた。また、clodronate liposome 投与の方の、WCA 曝露群間で、TJ-41 投与群の方が IL-17A mRNA 発現量が相対的に低い傾向に出ていたが、その理由は考察しても不明であった。

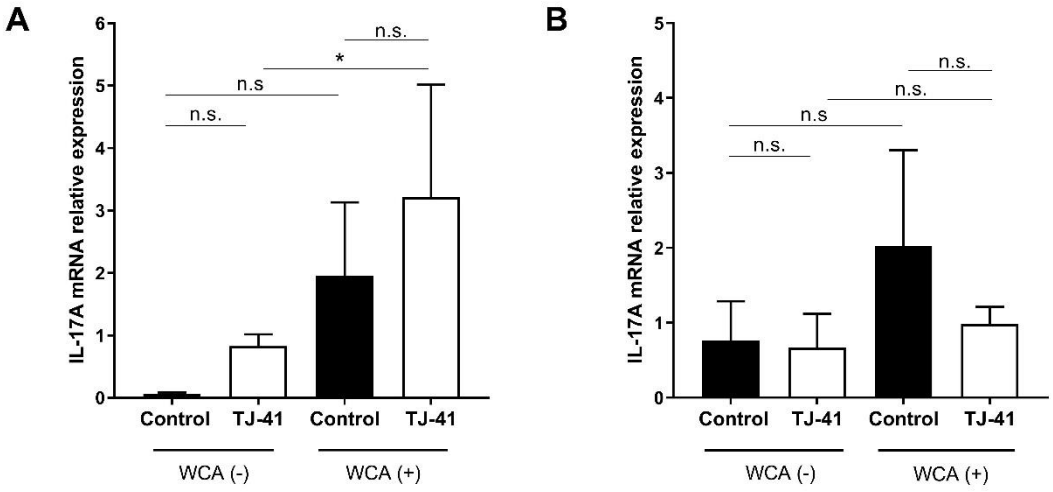

図 16. Clodronate liposome によるマクロファージ除去の IL-17A mRNA 発現への影響. A は liposome 単独製剤, B は clodronate liposome 製剤処理後. 2 回の独立した実験の代表的な結果を示す. n=6-8. 各群の Bar はデータの mean と SD を示している. *p<0.05. n.s., not significant.

マクロファージ除去群とコントロール群の間で、明確に結果の差を出せたわけではなかったが、予想通り、マクロファージ除去を行うと、WCA 曝露を受けた鼻腔由来細胞に TJ-41 が投与されても IL-17A mRNA の発現が上昇しなかった。このことから、TJ-41 による IL-17A 産生亢進には、前段階としてマクロファージの働きが重要であることが示唆された。

マウスモデルでも同様に clodronate liposome を用いてマクロファージの役割を解明できないかを検証した。生体に直接静注などで投与すると毒性が強い薬剤であるため、既報(Iwanaga et al., 2015; Zhang et al., 2009)にならって、マウスの肺炎球菌鼻腔内保菌後、day1, 8, 15, 22 にマウスの各鼻腔に clodronate liposome 10μl を注入し、鼻腔内マクロファージを除去する方法を試みた。結果は図 17 に示すが、day28 の時点での鼻腔内マクロファージ数は、depletion をするしない群の間で control マウスの間に有意差が見られず、そもそものマクロファージ除去自体が失敗に終わっていたことがわかった。また、同時点での鼻腔内 IL-17A 産生 T 細胞の割合も測定したが、control 群と depletion 群いずれでも、TJ-41 投与マウスの方が IL-17A 産生が高まっている結果となっていた。In vitro の実験で示したマクロファージの役割は、マウスを用いた実験ではモデル確立ができず、同様の現象をはっきりと示すことができなかった。

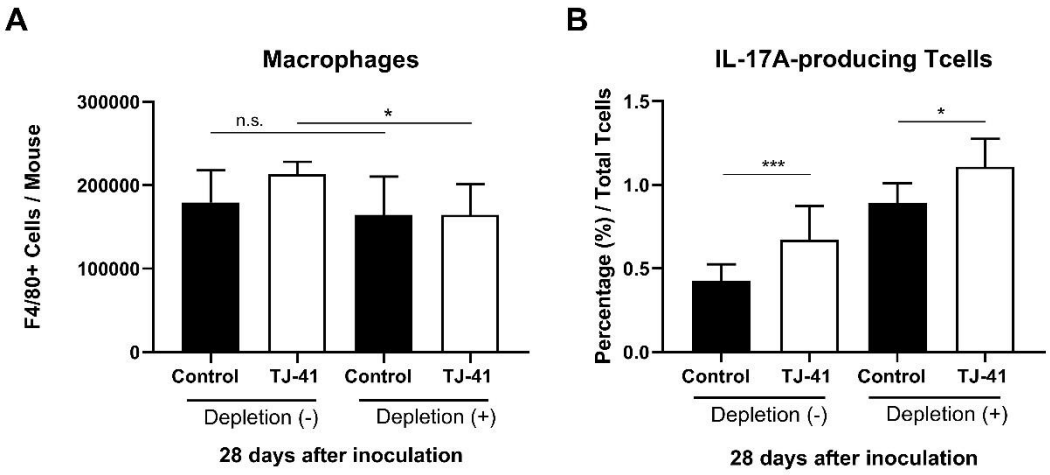

図 17. 肺炎球菌保菌マウスへの clodronate liposome 鼻腔内注入の影響. A はマクロファージ数, B は IL-17A 産生 T 細胞の T 細胞に占める割合を示す. 1 回の独立した実験結果を示す. n=5-7. 各群の Bar はデータの mean と SD を示している. *p<0.05, *** p<0.001. n.s., not significant.

マウスモデルでは成功しなかったものの、in vitro の結果から、TJ-41 の IL-17A 産生亢進効果には、マクロファージの働きが重要であることが推測できた。IL-17A 産生は、自然免疫における抗原提示細胞から抗原提示を受けた T 細胞がサイトカイン分泌し、Th17 系への分化を誘導していくという流れを考慮すると、抗原提示細胞であるマクロファージが TJ-41 の効果を生み出すために重要であることは論理的に矛盾がなかった。

<u>・TJ-41 のマクロファージへの直接的効果</u>

しかしながら、前述の細胞実験のみでは、自然免疫から IL-17A を中心とした免疫応答の流れにおけるマクロファージの重要性を示したのみで、仮説である「TJ-41 が直接マクロファージに作用する」という点は不明のままである。そこで、我々は次に TJ-41 のマクロファージへの直接的な効果を検証することとした。

理想的には、鼻腔内のマクロファージを分離した細胞実験系で検討を進めることであるが、鼻腔内のマクロファージ数は肺など他の組織に比べると大幅に少なく、現実的ではなかった。これまで使用してきた BALB/c マウスを背景としたマクロファージ

cell line の MH-S を使用して検討を進めることとした。検証するものとして、肺炎球菌に対する①貪食能　②細胞内殺菌能　③抗原提示能を考えた。

① 貪食能

MH-S を用いた肺炎球菌貪食実験は、既報を参考にしながら、東邦大学の他研究者がすでに行っていた実験手法も取り入れながら行った。MH-S が 1×10^5 cells/well となるように培養し、TJ-41 投与群には肺炎球菌菌液（1×10^6 CFU/well。 Multiplicity of infection (MOI) =10）投与 2 時間前から作用させ、肺炎球菌菌液投与後も同濃度の TJ-41 と共に 1 時間培養した。その後洗浄し、ペニシリンで細胞外の肺炎球菌を 30 分殺菌処理し、再度洗浄後、MH-S 細胞内に取り込まれた肺炎球菌の菌数をカウントした。本実験は、予備実験の段階から同様の結果が再現性をもって得られており、その代表的なものを図 18 に示す。TJ-41 は濃度を 2 段階に分けて投与したが、いずれも control と比して有意に肺炎球菌取り込み数が増加しており、濃度依存性に上昇した。

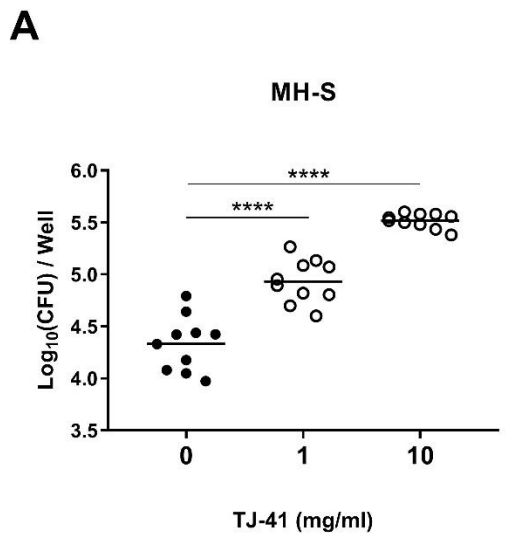

図 18. MH-S の肺炎球菌貪食能に対する TJ-41 の効果. 4 回の独立した実験結果のうち代表的なものを示す. MOI=10. 一つの plot はマウス一個体の結果を示す. **** $p<0.0001$.

この現象が MH-S と肺炎球菌 serotype 19F の特定の組み合わせ故の現象ではないことを確認するため、他の菌株、細胞での実験も行った。図 19A は MH-S に serotype

3 を、B は RAW 246.7 という同じく BALB/c ベースのマクロファージと serotype 19F をそれぞれ組み合わせて行った実験結果である。いずれも図 18 と同様の結果であった。鼻腔内のマクロファージでも同様の現象を確認したかったため、前々項で行っていた鼻腔内マクロファージ（付着細胞）に serotype 19F を組み合わせた実験も行い、図 19C にその結果を示すが、濃度依然性は見られなかったものの、TJ-41 投与により貪食能が高まることが確認された。

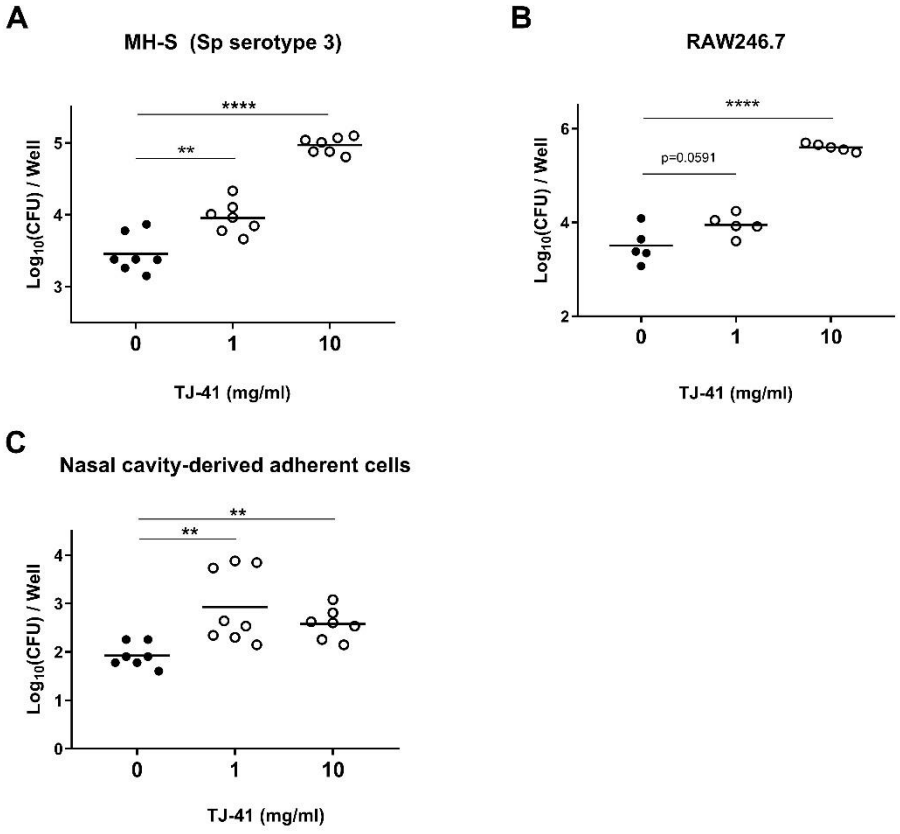

図 19. 各種細胞と菌株の組み合わせによる肺炎球菌貪食能. A, B は細胞数 1×10^5 cells/well, MOI=10 の条件で行った.それぞれ 1 回のみ行った実験結果を示す.C は細胞数が約 1×10^4 cells/well, MOI=100 の条件で行った. 独立した 2 回の実験結果のうち代表的なものを示す. 一つの plot はマウス一個体の結果を示す. **p<0.01,**** p<0.0001.

② 殺菌能

続いて殺菌能を評価した。殺菌能は肺炎球菌を取り込んだ後に、細胞でどれだけ菌

数を減らすことができるかを評価するが、文献をあたっても、最適な設定時間は曖昧であったため、上記の貪食実験系の手順に加えて 2 時間の培養時間（肺炎球菌曝露から 3.5 時間）を設定した。図 20 にその結果を示す。TJ-41 投与群では、肺炎球菌曝露後 3.5 時間時点での細胞内菌数が有意に低くなった。細胞数、MOI は各群同じで、2 時間の培養時間以外に TJ-41 群は作用していないため、同量の菌数を取り込んだ MH-S に TJ-41 を作用させると、細胞内での殺菌が促進されることを示している。

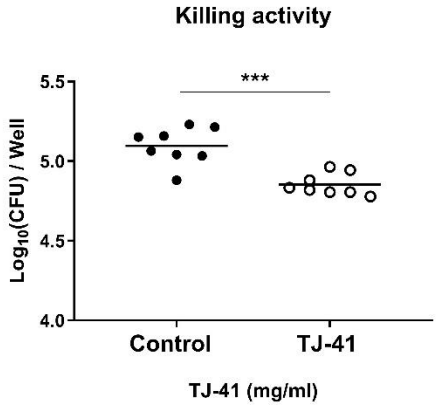

図 20. MH-S の肺炎球菌殺菌能に対する TJ-41 の効果. 細胞数 1×10^5 cells/well, MOI=10 の条件で行った. 2 回の独立した実験結果のうち、代表的なものを示す. 一つの plot はマウス一個体の結果を示す. *** $p<0.001$.

③ 抗原提示能

これまでの細胞実験で、MH-S に TJ-41 を作用させて、肺炎球菌の貪食能、殺菌能が上昇することが示された。これらの結果自体は、肺炎球菌マウスモデルで鼻腔内の菌量が低下した現象にある程度関わっているかもしれないが、これまでの実験で示されてきた、IL-17A 産生と関連した機序と、直接結びつかないものでもあった。TJ-41 がマクロファージを介して IL-17A 産生を亢進させていることを示すためには、自然免疫からの抗原提示能の上昇が示されるべきだと考え、その証明に取り組んだ。

マクロファージによる肺炎球菌抗原の抗原提示能を測定する実験系を記述した文献は探した限り見つからなかったため、独自の実験系を考える必要があった。前述の肺炎球菌殺菌能実験では、細胞内菌数をカウントすることで殺菌能を評価していたが、TJ-41 により殺菌が促進されているということは、菌体が破壊、溶解され、断片化さ

れた菌成分の抗原提示も促進されている可能性を考えた。同実験の同じ手順を利用することとした。抗原提示能を測定する方法として、マクロファージに接して抗原提示を受ける T 細胞が放出するサイトカインを測定する実験系を参考にした。マクロファージからのサイトカイン放出の影響を除外するために、マクロファージは T 細胞と接する前に予め固定処理を行うこととした。固定処理を行っても、提示されたペプチド片が細胞表面に維持されることは既報で確認した(Moreno and Lipsky, 1986)。

予備実験として行った結果を図 21 に示す。これは肺炎球菌曝露後 3.5 時間（うち 2 時間は TJ-41 を作用）経過したのち、固定したマクロファージと、T 細胞と CD3,CD28 抗体を投与して架橋形成を促し、3 日目に測定した結果である。IFN-γ, IL-17A いずれも、control と比してサイトカイン産生量が有意に上昇していた。本実験に向け有望な結果を得た。

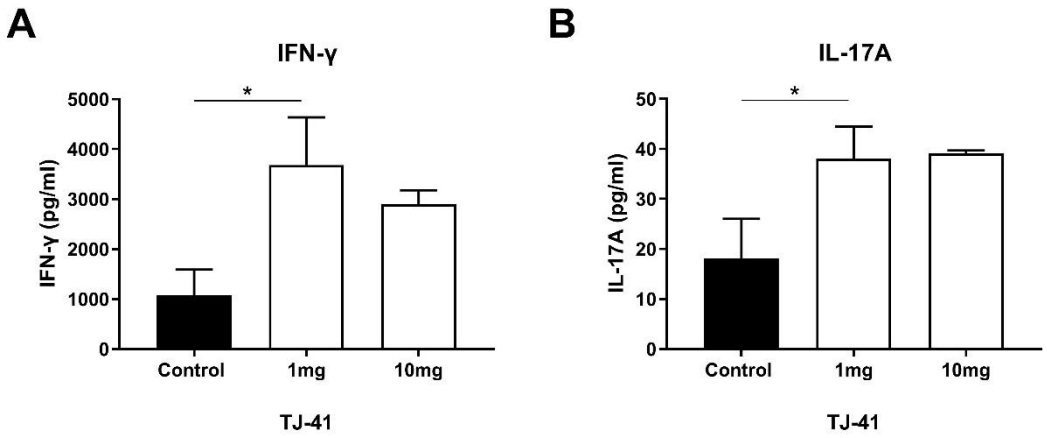

図 21. MH-S の肺炎球菌抗原提示能に対する TJ-41 の効果. A,B いずれも同じ実験で得られた結果. 各群 n=3 で行った. 各群の Bar はデータの mean と SD を示している. * $p<0.05$.

T 細胞から放出されるサイトカインとしては IFN-γ が主に測定される、がこれまでの我々の実験では、IL-17A を主軸において進めてきた。予備実験で IL-17A も有意差がついていたとはいえ、濃度としては IFN-γ よりはるかに小さな値になっていた。IFN-γ が主に上昇していたとしても、T 細胞がマクロファージから受けた抗原提示の量を反映していることに間違いはなかったが、これまで行ってきた TJ-41 の効果を検証するための実験であることを考慮すると、IL-17A が主に産生される環境における効果を示すことが望ましいと考えた。Th17 へ分化誘導する培養環境を設けて、T 細胞から

の IL-17A 産生を測定することとした。これらのことを踏まえて、最終的に「方法」に記した実験系を確立した。後述する結果に至るまでは、固定処理のタイミング、T 細胞と CD3 抗体の架橋形成が生じる濃度、Th17 分化誘導の最適濃度など、様々な失敗を重ねながら条件を調整した。

最終的に、再現性が得られた抗原提示能実験の結果を図 22 に示す。肺炎球菌曝露あり群間で、control 群に比して TJ-41 群は T 細胞からの IL-17A 産生が有意に上昇した。T 細胞とマクロファージ接触後の培養条件はすべての群で同じであり、TJ-41 はマクロファージが肺炎球菌を取り込んだ後の 2 時間作用させたのみであり T 細胞培養条件には存在しない。本結果は、すなわちマクロファージが提示した抗原量を反映していると解釈できる。

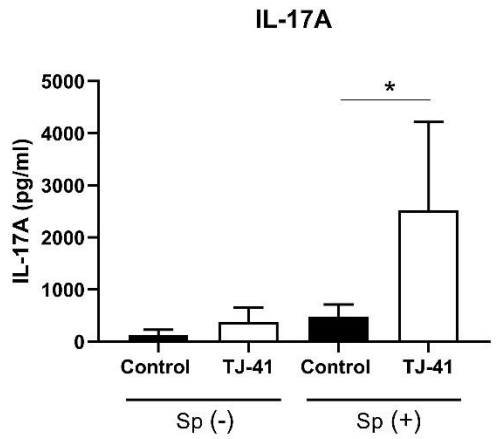

図 22. MH-S の肺炎球菌抗原提示能に対する TJ-41 の効果. MH-S の細胞数 1×10^5 cells/well, MOI=10, T 細胞数 1×10^6 cells/well. 独立した 2 回の実験結果のうち代表的なものを示す. 各群の Bar はデータの mean と SD を示している. *p<0.05. Sp: *Streptococcus pneumoniae.*

TJ-41 には、マクロファージの肺炎球菌貪食能、殺菌能、そして抗原提示能を上昇させる効果があることが示された。これらの結果、特に抗原提示能の上昇は、in vivo、in vitro の研究実験いずれでも示されてきた、IL-17A 産生亢進の現象の機序を説明しうる有力な結果と考えた。

考察

「結果」で述べた通り、本研究を通じて、我々は補中益気湯（TJ-41）がマウスモデルにもたらす効果と、細胞実験によるその機序の解明に取り組んだ。結果の要点を述べると、TJ-41 はマウスを用いた肺炎球菌鼻腔内保菌モデルにおいて、保菌のクリアランスを促進する現象をとらえた。同時に、鼻腔内のマクロファージ（活性型マクロファージ）が増加し、T 細胞からの IL-17A 産生が亢進していることがわかった。IL-17A KO マウスを用いた実験では、これらの現象が見られず、TJ-41 の効果は IL-17A に依存したものであることがわかった。In vitro 実験では、鼻腔由来細胞に肺炎球菌抗原と TJ-41 を曝露させると、活性型マクロファージの数が増加し、マクロファージの肺炎球菌貪食能が上昇した。またその現象は IL-17A KO マウスの細胞を用いると、観察されなかった。これらは保菌マウスモデルで見られた TJ-41 の効果と類似するものであった。同じく鼻腔由来細胞に肺炎球菌抗原と TJ-41 を作用させると、IL-17A mRNA の発現が増強させることがわかり、マクロファージがその働きに重要なかかわりがあることが示された。最後に、マクロファージへの TJ-41 の直接的な効果を検証した結果、TJ-41 はマクロファージの肺炎球菌貪食、殺菌、そして T 細胞への抗原提示を増強させた。

「緒言」でも述べた通り、肺炎球菌の鼻腔内保菌という状態は、その後の侵襲感染への移行や、周囲への伝播のリスクともなることがわかっている(Weiser et al., 2018)。過去の臨床研究で、鼻腔内の保菌頻度や保菌量が高いことは、侵襲感染のリスク因子であることが報告されている(Wolter et al., 2014)。また、マウスモデルを用いた実験では、インフルエンザ A ウイルスと共感染させた肺炎球菌保菌モデルで肺炎球菌の菌量が多いほど他個体への伝播が増加することが示されている(Short et al., 2012)。また Zafar らのマウスモデル研究によると、肺炎球菌の保菌期間が長いことも、周囲への伝播リスクが高まることがわかっている(Zafar et al., 2016)。通常の保菌量を低下させることや、保菌期間を短くすることが、リスクの低減につながることを証明した基礎実験や臨床研究は存在しないものの、これらの知見を踏まえると、肺炎球菌の保菌の鼻腔からのクリアランスが高まることは、続く侵襲感染や周囲への伝播のリスクを下げる可能性があるといえる。そういう観点から、肺炎球菌保菌モデルにおいて鼻腔内菌量を下げクリアランスを高める TJ-41 は、肺炎球菌感染症の予防戦略の一端を担う可能性がある。

補中益気湯は、いくつかの理由で、治療戦略として用いやすい。まず、非常に長い歴史があり、かつ現在でも臨床で幅広く使用されている薬剤である。原則、漢方は「証」に合わせて使用されるべきではあるが、今後新たな使用方法が見出された

場合、導入は容易である。証に合わせて使用している患者に、本研究で見られたような保護的効果を副次的にもたらす可能性もある。また一般的に副作用が少なく、長期投与が可能であり、現状は製薬会社からの供給も安定している。最後に、抗菌薬とは異なり、薬剤耐性株の出現や増加を来す心配がない。本研究では証明はしていないものの、ワクチンのように serotype replacement を生じず、様々な血清型に対応できる可能性がある。これらの点は、抗菌薬適正使用の観点からも、重要である。

とはいえ、ヒトにおける、TJ-41 の肺炎球菌保菌に対する保護的効果は全くもって未知であり、これから研究が進むことが望まれる。

肺炎球菌保菌のクリアランスのメカニズムにおいて、マクロファージの重要性はこれまでも多数報告されている。肺炎球菌保菌マウスモデルにおいて、保菌後期に鼻腔内のマクロファージを除去すると、保菌のクリアランスが通常よりも大幅に遷延することが示されており、最終的な菌体の除去に主要に働く effector cell であることが推測される(Zhang et al., 2009)。Zhang らの報告にあるように、IL-17A が存在しないと、保菌後期にマクロファージ/単球の鼻腔内への集積が低下し、菌もクリアランスされないことも、マクロファージが最終的な保菌クリアランスに重要な存在であることを示している。Iwanaga らが、マクロライドを使用すると、肺炎球菌保菌モデルでマクロファージが C-C motif chemokine 2 (CCL2) 活性化を通じて肺炎球菌の除去能力を高めると報告しており、マクロファージの機能増強と菌のクリアランスは密接に結びついている(Iwanaga et al., 2015)。本研究では、細胞実験において TJ-41 がマクロファージの肺炎球菌貪食能、殺菌能を向上させることが示された。この点からは、TJ-41 が保菌モデルにおいて鼻腔内菌数を減らす機序として、直接的なマクロファージの活性化による肺炎球菌貪食の上昇と考えられなくもない。しかしながら、IL-17A KO マウスの保菌モデルや細胞を用いた実験の結果では、TJ-41 の保菌クリアランスを高める現象や鼻腔内マクロファージの活性化や肺炎球菌の貪食能の向上は認められなかった。TJ-41 の直接的な肺炎球菌除去能力の向上だけでは、これらの結果の説明はできない。TJ-41 は IL-17A 依存性の効果を発揮しており、IL-17A を中心とした宿主免疫の応答を考慮した考察が必要である。

肺炎球菌の保菌の際に生じる宿主免疫では、これまでの報告から、TLR を介した自然免疫の応答が保菌クリアランスに至るまでの機序に必要であることがわかっている(van Rossum et al., 2005)。また、Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2 (Nod2)もクリアランスに必須の要因であり、抗原提示細胞のサイトカイン産生を促しその後の T 細胞系の活性化に至る(Davis et al.,

2011)。T 細胞、特に CD4 陽性細胞の免疫応答が保菌の最終的なクリアランスには欠かせず、IL-17A は T 細胞系の働きで最も重要視されているサイトカインであり、この存在なくして保菌の正常なクリアランスは達成されない(Lu et al., 2008; Malley et al., 2005)。自然免疫による肺炎球菌の補足、そして抗原提示を経て、T 細胞系の IL-17A 産生を中心とした免疫応答が活性化されることが保菌クリアランスには必要である。

本研究で最も強調したい点は、TJ-41 が保菌マウスモデルにおいて IL-17A 産生を亢進させたということである。細胞実験でも同様の現象をとらえている。鼻腔由来細胞に肺炎球菌抗原と TJ-41 を作用させると、TJ-41 投与群で IL-17A mRNA の発現が一層高まっていた。また、この現象はマクロファージ依存性であることも判明した。このことから、TJ-41 の作用は、マクロファージを通じた IL-17A を中心とした免疫応答の活性化が主たる作用ではないかと考えられた。我々は、細胞実験を通じて、マクロファージに TJ-41 が作用すると、肺炎球菌の T 細胞への抗原提示量が上昇することを示した。これらの実験結果を合わせた結果推測されるのは、TJ-41 はマクロファージの機能を向上、特に抗原提示能を向上させることで、それに応答する T 細胞からの IL-17A 産生を促しているということである。この推測される機序は、これまでの研究で判明してきた肺炎球菌保菌に対する宿主免疫応答の流れによく整合しているものと考える。

これまでの研究では、保菌のクリアランスを達成するために必要な免疫学的背景の証明が主であり、外因的に免疫を賦活化することが、IL-17A 産生などの T 細胞系応答を高めるかどうかについては、報告がない。本研究の新規性として、肺炎球菌保菌において、マクロファージという自然免疫系の細胞を直接活性化させることが、その後に続く IL-17A 中心の免疫応答を高めることを示した初の研究であることを挙げたい。また、TJ-41 の肺炎球菌に対する効果、また微生物によらず、IL-17A に関連した免疫学的機序を解明した報告もこれまでになく、本研究で初めて示すことができた。

本研究では IL-17A KO マウスモデルを用いた実験を行ったが、そこから興味深いことがわかった。これまで述べてきた、TJ-41 の保菌量減少効果は IL-17A KO マウスでは消失した。また、通常のマウスを用いた細胞実験では、鼻腔由来細胞に肺炎球菌抗原と TJ-41 を作用させると活性型マクロファージの増加と肺炎球菌貪食能が向上したが、IL-17A KO マウスの細胞では認められなかった。TJ-41 は IL-17A の産生を高める効果があるが、一方で、TJ-41 の保菌量減少のためには IL-17A が必要であることを示している。つまりは、TJ-41 が保菌に対して保護的に作用する理由として in vitro、in vivo の実験によらず、TJ-41 投与群では IL-17A が相対的に高い

ことが重要で、それによってマクロファージのさらなる機能向上をもたらしより高いクリアランス効果を発揮していると考えられる。

IL-17A は IL-17 ファミリーの中で最も産生量が高く重要なサイトカインであり、主に活性化 T 細胞より産生される。線維芽細胞や上皮細胞、血管内皮細胞、マクロファージなど種々の細胞に作用して、炎症性サイトカイン、ケモカイン、細胞接着因子など、種々の因子を誘導して炎症性反応を引き起こすことがわかっている(Kolls and Linden, 2004)。IL-17A にマクロファージが作用すると、組織への集積と生存が向上することが報告されている(Sergejeva et al., 2005)。Higgins らによると、腹腔内由来のマクロファージに recombinant IL-17A を作用させると、百日咳菌に対する殺菌能が向上する(Higgins et al., 2006)。肺炎球菌における影響も報告されており、Wright らはヒト肺胞マクロファージに recombinant IL-17A を作用させると、肺炎球菌に対する殺菌能が濃度依存性に上昇することを示した(Wright et al., 2013)。

本研究は TJ-41 投与によって control 群に比して IL-17A 産生が高まると、マクロファージの活性化と肺炎球菌貪食が向上することが示されており、過去の知見と矛盾しないものである。特筆すべきは、これまでの研究はいずれも外因の IL-17A 投与によりマクロファージの機能向上を証明していたが、本研究では、内因性の IL-17A の高まりが、肺炎球菌への保護的効果を高めることを示している。これは本研究を通じて初めて証明されたことであり、新規性の一つである。

本研究にはいくつか問題点がある。まず、TJ-41 の効果を検証してきたが、この薬剤は 10 種類の生薬の煎じ液の粉末製剤であり、単一成分薬ではない。様々な効果を観察し、その背景を検証してきたが、TJ-41 に含まれるどの生薬が、もしくはどの有効成分が最も重要なのか、もしくはそれらのどの組み合わせが有効であるのかはわからない。元来、漢方薬は多種類の生薬を配合することで、生薬単体では得られない効果を引き出すという考えがある。東洋医学的には、そもそも単一の要因に原因を求めること自体、本質的ではないといえる。しかしながら、科学的検証の観点上、本研究で扱った薬剤は、有効成分という点で十分な掘り下げはできていないと言わざるを得ない。

第二に、マウスモデルを用いて得られた TJ-41 の保菌減少効果を、in vivo 実験で十分に検証できていない。鼻腔内細胞を分離して細胞実験を行うことで検証を進めたが、保菌マウスモデルは保菌後 28 日に及ぶ期間を見ているのに対し、細胞実験では肺炎球菌曝露、TJ-41 作用後 3 日の時点である。細胞実験で鼻腔内マクロファージを除去して TJ-41 の IL-17A mRNA 発現上昇効果が消失したことを確認したが、マウスモデルで鼻腔マクロファージの除去実験は失敗に終わっている。また、マク

ロファージの抗原提示能を高めることで IL-17A 産生の免疫応答が高まるという推定機序は cell line を用いた実験から導かれており、マウスの鼻腔内で起きていることを十分裏付けているとは限らない。結果的にマウスの実験結果と細胞実験の結果は類似し、そこから導かれた推測機序に矛盾がほとんどないと考えられるが、この点は本研究の限界として挙げられる。

第三に、TJ-41 の保菌クリアランス増強効果の免疫学的機序として、IL-17A 中心の機序以外に、他の要因があるかどうかは探れていない。多成分薬剤ゆえ、また過去の報告では実に様々な免疫反応が報告されているため、TJ-41 の肺炎球菌保菌に対して作用する機序はほかに存在する可能性は十分にある。本研究では鼻腔内の各種サイトカインなど mRNA の発現を測定はしたが、再現性のない結果が得られており、検証が進まなかった。

最後に、TJ-41 が肺炎球菌保菌クリアランスを高めることは示されたものの、それが果たして続発する侵襲感染や周囲への伝播に対する保護につながるのかどうかはわからない。IL-17A は肺炎球菌感染症で防御的に働くことや、鼻腔内保菌が事前に行われたマウスは、その後の肺炎に対する菌のクリアランスが高まる現象が報告されている(Wilson et al., 2015)。TJ-41 が T 細胞応答を高め IL-17A 産生を増強していることは、その後の侵襲感染への防御力も挙げている可能性はある。しかしながらその証明は肺炎モデルを用いた肺内菌数や生存率の変化など、別の実験系で検証しなければならず、今後の検討課題である。

結論

本研究から得られた知見を箇条書きにしてまとめる。
・補中益気湯(TJ-41)は肺炎球菌保菌モデルにおいて鼻腔内菌量を減少させクリアランスを高める。
・その効果は IL-17A 依存性であり、相対的に IL-17A の産生が高まることで、マクロファージが付加的に活性化し、肺炎球菌の除去が早まることが推測される。
・IL-17A 産生を高める機序として、マクロファージを活性化し、貪食能に加え殺菌能、そして T 細胞への抗原提示能を増強し、その後に続く T 細胞応答を活性化させていると考えられる。

また本研究の新規性は以下の通りである。
・TJ-41 の肺炎球菌保菌モデルに対する効果を示した。
・TJ-41 が IL-17A 産生を高める免疫応答を促すことを示した。
・TJ-41 がマクロファージの肺炎球菌に対する作用を修飾することを示した。
・肺炎球菌保菌における自然免疫系の外因的な賦活が、続く T 細胞系の免疫応答を増強させ、保菌に対して保護的に作用することを示した。
・TJ-41 により内因性の IL-17A 産生が増強されることで、保菌クリアランスにおけるマクロファージのさらなる機能向上をもたらすことを示した。

これらの知見は、肺炎球菌感染症の予防戦略と、TJ-41 の今後の臨床応用に一つの光明を照らしていると考える。今後の展望として、TJ-41 が肺炎球菌侵襲感染や周辺への伝播の防御に有用であるかどうかを研究していきたい。また、抗原提示能を高めるという本研究の結果を踏まえると、肺炎球菌結合型ワクチン（プレベナー）の接種後の防御効果を高める役割を担う可能性も考えており、検討していきたい。

また、TJ-41 の免疫学的な作用を基礎研究で一つ明らかにしたことで、漢方薬の科学的理解、発展に寄与できたと考えている。漢方薬は多成分薬剤ゆえに従来の科学的検証に不向きな側面があったが、近年は本研究のように、薬剤の総合的な作用ととらえて検証する研究は増えており、それに対する理解も徐々に広がっている。一方で、特定の有効成分を明らかにし、そこから新薬の創造につなげる研究もある。我々も今後の研究で、特定の生薬、有効成分を明らかにしていくことを検討している。

最後に、本研究は肺炎球菌保菌における宿主免疫の機序解明という観点でも貢献できた。あくまで TJ-41 という薬剤の効果を検証した研究ではあったが、結果的

に、自然免疫系と IL-17A 中心の免疫応答の関係に新たな知見をもたらしたと考えている。これまでの研究では、特定の因子が保菌クリアランスにおける関わりを検証するものが多かったが、TJ-41 のように免疫系に作用する薬剤を比較対象群として用いることで、相対的な免疫力の違いが、どのような影響をもたらすのかを検証できることがわかった。肺炎球菌保菌のメカニズムの研究は感染症免疫分野において現在でも注目されている領域であり、今後も新たな知見を見出せるように研究していきたい。

謝辞

本研究にあたって、実験の機会と場を提供してくださり、また深い経験と知識に基づいた貴重なご助言をくださった、東邦大学医学部微生物・感染症学教室の舘田一博教授・石井良和教授のご両名に深く感謝の意を表します。また、同教室の木村聡一郎准教授には、あらゆる実験において直接的なご指導をいただき、基礎論文投稿の corresponding author としてご尽力いただきました。梶原千晶助教には実験手技、結果の考察などで幅広い経験と知識に基づく数多くのご助言をいただきました。三村一行研究員には数多くの実験を手伝っていただき、度重なる議論をしていただきました。そのほか教室員の皆様方にも多くのご助言、お力添えをいただきました。2 年間の基礎実験生活を無事に送ることができたのは教室の皆様のおかげです。ありがとうございました。

北海道を離れ、東京で研究生活を送ることができたのは、北海道大学大学院医学研究院内科学分野呼吸器内科学教室　前教授の西村正治先生のご厚意によるものでした。また、現教授の今野哲先生に研究に関してご意見、ご助言をいただいたおかげで、基礎論文の投稿、学位論文の作成をすることができました。ありがとうございました。

学位審査では、お忙しい中にも関わらず、主査の安斉俊久教授、副査の西浦博教授、坂本直哉教授、大場雄介教授にご丁寧な審査をいただきました。今後の研究に向けて有益なご助言を多数いただくことができました。ありがとうございました。

最後に、補中益気湯のエキス製剤の無償提供を受けたツムラ株式会社（東京）に心から感謝いたします。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Abdullahi, O., Karani, A., Tigoi, C.C., Mugo, D., Kungu, S., Wanjiru, E., Jomo, J., Musyimi, R., Lipsitch, M., and Scott, J.A. (2012). The prevalence and risk factors for pneumococcal colonization of the nasopharynx among children in Kilifi District, Kenya. PLoS One *7*, e30787.

Abe, S., Tansho, S., Ishibashi, H., Akagawa, G., Komatsu, Y., and Yamaguchi, H. (1999). Protection of immunosuppressed mice from lethal Candida infection by oral administration of a kampo medicine, hochu-ekki-to. Immunopharmacology and immunotoxicology *21*, 331-342.

Asanuma, H., Thompson, A.H., Iwasaki, T., Sato, Y., Inaba, Y., Aizawa, C., Kurata, T., and Tamura, S. (1997). Isolation and characterization of mouse nasal-associated lymphoid tissue. Journal of immunological methods *202*, 123-131.

Balsells, E., Guillot, L., Nair, H., and Kyaw, M.H. (2017). Serotype distribution of Streptococcus pneumoniae causing invasive disease in children in the post-PCV era: A systematic review and meta-analysis. PLoS One *12*, e0177113.

Bogaert, D., De Groot, R., and Hermans, P.W. (2004). Streptococcus pneumoniae colonisation: the key to pneumococcal disease. The Lancet Infectious diseases *4*, 144-154.

Dan, K., Akiyoshi, H., Munakata, K., Hasegawa, H., and Watanabe, K. (2013). A Kampo (traditional Japanese herbal) medicine, Hochuekkito, pretreatment in mice prevented influenza virus replication accompanied with GM-CSF expression and increase in several defensin mRNA levels. Pharmacology *91*, 314-321.

Das, R., LaRose, M.I., Hergott, C.B., Leng, L., Bucala, R., and Weiser, J.N. (2014). Macrophage migration inhibitory factor promotes clearance of pneumococcal colonization. Journal of Immunology *193*, 764-772.

Davis, K.M., Nakamura, S., and Weiser, J.N. (2011). Nod2 sensing of lysozyme-digested peptidoglycan promotes macrophage recruitment and clearance of S.

pneumoniae colonization in mice. Journal of Clinical Investigation *121*, 3666-3676.

Dockrell, D.H., Whyte, M.K.B., and Mitchell, T.J. (2012). Pneumococcal pneumonia: mechanisms of infection and resolution. Chest *142*, 482-491.

Domon, H., Oda, M., Maekawa, T., Nagai, K., Takeda, W., and Terao, Y. (2016). Streptococcus pneumoniae disrupts pulmonary immune defence via elastase release following pneumolysin-dependent neutrophil lysis. Scientific Reports *6*, 38013.

Dorrington, M.G., Roche, A.M., Chauvin, S.E., Tu, Z., Mossman, K.L., Weiser, J.N., and Bowdish, D.M. (2013). MARCO is required for TLR2- and Nod2-mediated responses to Streptococcus pneumoniae and clearance of pneumococcal colonization in the murine nasopharynx. The Journal of Immunology *190*, 250-258.

Higgins, S.C., Jarnicki, A.G., Lavelle, E.C., and Mills, K.H.G. (2006). TLR4 Mediates Vaccine-Induced Protective Cellular Immunity to Bordetella pertussis: Role of IL-17-Producing T Cells. The Journal of Immunology *177*, 7980-7989.

Hossain, M.S., Takimoto, H., Hamano, S., Yoshida, H., Ninomiya, T., Minamishima, Y., Kimura, G., and Nomoto, K. (1999). Protective effects of hochu-ekki-to, a Chinese traditional herbal medicine against murine cytomegalovirus infection. Immunopharmacology *41*, 169-181.

Ishigame, H., Kakuta, S., Nagai, T., Kadoki, M., Nambu, A., Komiyama, Y., Fujikado, N., Tanahashi, Y., Akitsu, A., Kotaki, H.*, et al.* (2009). Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucoepithelial bacterial infection and allergic responses. Immunity *30*, 108-119.

Iwanaga, N., Nakamura, S., Oshima, K., Kajihara, T., Takazono, T., Miyazaki, T., Izumikawa, K., Yanagihara, K., Sugawara, A., Sunazuka, T.*, et al.* (2015). Macrolides Promote CCL2-Mediated Macrophage Recruitment and Clearance of Nasopharyngeal Pneumococcal Colonization in Mice. Journal of Infectious

Diseases *212*, 1150-1159.

Kiyohara, H., Nagai, T., Munakata, K., Nonaka, K., Hanawa, T., Kim, S.J., and Yamada, H. (2006). Stimulating effect of Japanese herbal (kampo) medicine, hochuekkito on upper respiratory mucosal immune system. Evidence Based Complementary and Alternative Medicine *3*, 459-467.

Kolls, J.K., and Linden, A. (2004). Interleukin-17 family members and inflammation. Immunity *21*, 467-476.

Kuroiwa, A., Liou, S., Yan, H., Eshita, A., Naitoh, S., and Nagayama, A. (2004). Effect of a traditional Japanese herbal medicine, hochu-ekki-to (Bu-Zhong-Yi-Qi Tang), on immunity in elderly persons. International Immunopharmacology *4*, 317-324.

Kusaka, Y., Kajiwara, C., Shimada, S., Ishii, Y., Miyazaki, Y., Inase, N., Standiford, T.J., and Tateda, K. (2018). Potential Role of Gr-1+ CD8+ T Lymphocytes as a Source of Interferon-gamma and M1/M2 Polarization during the Acute Phase of Murine Legionella pneumophila Pneumonia. Journal of Innate Immununity *10*, 328-338.

Ladhani, S.N., Collins, S., Djennad, A., Sheppard, C.L., Borrow, R., Fry, N.K., Andrews, N.J., Miller, E., and Ramsay, M.E. (2018). Rapid increase in non-vaccine serotypes causing invasive pneumococcal disease in England and Wales, 2000–17: a prospective national observational cohort study. The Lancet Infectious Diseases *18*, 441-451.

Lu, Y.J., Gross, J., Bogaert, D., Finn, A., Bagrade, L., Zhang, Q., Kolls, J.K., Srivastava, A., Lundgren, A., Forte, S.*, et al.* (2008). Interleukin-17A mediates acquired immunity to pneumococcal colonization. PLoS Pathogen *4*, e1000159.

Malley, R., Trzcinski, K., Srivastava, A., Thompson, C.M., Anderson, P.W., and Lipsitch, M. (2005). CD4+ T cells mediate antibody-independent acquired immunity to pneumococcal colonization. Proceedings of the National Academy of Sciences USA *102*, 4848-4853.

Matthias, K.A., Roche, A.M., Standish, A.J., Shchepetov, M., and Weiser, J.N. (2008). Neutrophil-Toxin Interactions Promote Antigen Delivery and Mucosal Clearance of Streptococcus pneumoniae. The Journal of Immunology *180*, 6246-6254.

McCool, T.L., and Weiser, J.N. (2004). Limited role of antibody in clearance of Streptococcus pneumoniae in a murine model of colonization. Infection and Immunity *72*, 5807-5813.

Minami, M., Konishi, T., Takase, H., Jiang, Z., Arai, T., and Makino, T. (2017). Effect of Shin'iseihaito (Xinyiqingfeitang) on Acute Streptococcus pneumoniae Murine Sinusitis via Macrophage Activation. Evidence Based Complementary and Alternative Medicine *2017*, 4293291.

Moreno, J., and Lipsky, P.E. (1986). Differential ability of fixed antigen-presenting cells to stimulate nominal antigen-reactive and alloreactive T4 lymphocytes.The Journal of Immunology *136*, 3579-3587.

Mubarak, A., Ahmed, M.S., Upile, N., Vaughan, C., Xie, C., Sharma, R., Acar, P., McCormick, M.S., Paton, J.C., Mitchell, T.*, et al.* (2016). A dynamic relationship between mucosal T helper type 17 and regulatory T-cell populations in nasopharynx evolves with age and associates with the clearance of pneumococcal carriage in humans. Clinical Microbiology and Infecttion *22*, 736 e731-737.

Nagai, T., Kataoka, E., Aoki, Y., Hokari, R., Kiyohara, H., and Yamada, H. (2014). Alleviative Effects of a Kampo (a Japanese Herbal) Medicine "Maoto (Ma-Huang-Tang)" on the Early Phase of Influenza Virus Infection and Its Possible Mode of Action. Evidence Based Complementary and Alternative Medicine *2014*, 187036.

Ohgitani, E., Kita, M., Mazda, O., and Imanishi, J. (2014). Combined administration of oseltamivir and hochu-ekki-to (TJ-41) dramatically decreases the viral load in lungs of senescence-accelerated mice during influenza virus infection. Archives of Virology *159*, 267-275.

Pilishvili, T., Lexau, C., Farley, M.M., Hadler, J., Harrison, L.H., Bennett, N.M., Reingold, A., Thomas, A., Schaffner, W., Craig, A.S.*, et al.* (2010). Sustained reductions in invasive pneumococcal disease in the era of conjugate vaccine. Journal of Infectious Diseases *201*, 32-41.

Sando, E., Suzuki, M., Furumoto, A., Asoh, N., Yaegashi, M., Aoshima, M., Ishida, M., Hamaguchi, S., Otsuka, Y., and Morimoto, K. (2019). Impact of the pediatric 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on serotype distribution and clinical characteristics of pneumococcal pneumonia in adults: The Japan Pneumococcal Vaccine Effectiveness Study (J-PAVE). Vaccine *37*, 2687-2693.

Sergejeva, S., Ivanov, S., Lotvall, J., and Linden, A. (2005). Interleukin-17 as a recruitment and survival factor for airway macrophages in allergic airway inflammation. American Journal of Respiraroty Cell and Molucular Biology *33*, 248-253.

Short, K.R., Reading, P.C., Wang, N., Diavatopoulos, D.A., and Wijburg, O.L. (2012). Increased nasopharyngeal bacterial titers and local inflammation facilitate transmission of Streptococcus pneumoniae. MBio *3, e00255-12*.

Stockmann, C., Ampofo, K., Pavia, A.T., Blaschke, A.J., Mason, E.O., Presson, A.P., Forney, L.J., and Byington, C.L. (2016). Clinical and Epidemiological Evidence of the Red Queen Hypothesis in Pneumococcal Serotype Dynamics. Clinical Infectious Diseases *63*, 619-626.

Suga, S., Chang, B., Asada, K., Akeda, H., Nishi, J., Okada, K., Wakiguchi, H., Maeda, A., Oda, M., Ishiwada, N.*, et al.* (2015). Nationwide population-based surveillance of invasive pneumococcal disease in Japanese children: Effects of the seven-valent pneumococcal conjugate vaccine. Vaccine *33*, 6054-6060.

Utsuyama, M., Seidlar, H., Kitagawa, M., and Hirokawa, K. (2001). Immunological restoration and anti-tumor effect by Japanese herbal medicine in aged mice. Mechanisms of ageing and development *122*, 341-352.

van Rossum, A.M., Lysenko, E.S., and Weiser, J.N. (2005). Host and bacterial

factors contributing to the clearance of colonization by Streptococcus pneumoniae in a murine model. Infection and Immunity *73*, 7718-7726.

Weiser, J.N., Ferreira, D.M., and Paton, J.C. (2018). Streptococcus pneumoniae: transmission, colonization and invasion. Nature Review Microbiology *16*, 355-367.

Wilson, R., Cohen, J.M., Jose, R.J., de Vogel, C., Baxendale, H., and Brown, J.S. (2015). Protection against Streptococcus pneumoniae lung infection after nasopharyngeal colonization requires both humoral and cellular immune responses. Mucosal Immunology *8*, 627-639.

Wolter, N., Tempia, S., Cohen, C., Madhi, S.A., Venter, M., Moyes, J., Walaza, S., Malope-Kgokong, B., Groome, M., du Plessis, M.*, et al.* (2014). High nasopharyngeal pneumococcal density, increased by viral coinfection, is associated with invasive pneumococcal pneumonia. Journal of Infectious Diseases *210*, 1649-1657.

Wright, A.K., Bangert, M., Gritzfeld, J.F., Ferreira, D.M., Jambo, K.C., Wright, A.D., Collins, A.M., and Gordon, S.B. (2013). Experimental human pneumococcal carriage augments IL-17A-dependent T-cell defence of the lung. PLoS Pathogen *9*, e1003274.

Wu, H.Y., Nguyen, H.H., and Russell, M.W. (1997). Nasal lymphoid tissue (NALT) as a mucosal immune inductive site. Scandinavian journal of immunology *46*, 506-513.

Yahiaoui, R.Y., den Heijer, C., van Bijnen, E.M., Paget, W.J., Pringle, M., Goossens, H., Bruggeman, C.A., Schellevis, F.G., and Stobberingh, E.E. (2016). Prevalence and antibiotic resistance of commensal Streptococcus pneumoniae in nine European countries. Future microbiology *11*, 737-744.

Yamaoka, Y., Kawakita, T., and Nomoto, K. (2001). Protective effect of a traditional Japanese medicine Hochu-ekki-to (Chinese name: Bu-zhong-yi-qi-tang), on the susceptibility against Listeria monocytogenes in infant mice.

International Immunopharmacol *1*, 1669-1677.

Yan, X., Kita, M., Minami, M., Yamamoto, T., Kuriyama, H., Ohno, T., Iwakura, Y., and Imanishi, J. (2002). Antibacterial effect of Kampo herbal formulation Hochu-ekki-to (Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang) on Helicobacter pylori infection in mice. Microbiology and immunology *46*, 475-482.

Yoshino, T., Arita, R., Horiba, Y., and Watanabe, K. (2019). The use of maoto (Ma-Huang-Tang), a traditional Japanese Kampo medicine, to alleviate flu symptoms: a systematic review and meta-analysis. BMC Complementary and Alternative Medicne *19*, 68.

Yoshioka, D., Kajiwara, C., Ishii, Y., Umeki, K., Hiramatsu, K., Kadota, J., and Tateda, K. (2016). Efficacy of beta-Lactam-plus-Macrolide Combination Therapy in a Mouse Model of Lethal Pneumococcal Pneumonia. Antimicrobial Agents and Chemotherapy *60*, 6146-6154.

Zafar, M.A., Kono, M., Wang, Y., Zangari, T., and Weiser, J.N. (2016). Infant Mouse Model for the Study of Shedding and Transmission during Streptococcus pneumoniae Monoinfection. Infection and Immunity *84*, 2714-2722.

Zhang, Z., Clarke, T.B., and Weiser, J.N. (2009). Cellular effectors mediating Th17-dependent clearance of pneumococcal colonization in mice. Journal of Clincal Investigation *119*, 1899-1909.