

# 論 文 要 旨

## Intranasal immunization with phosphorylcholine induces antigen specific mucosal and systemic immune responses in mice

(マウスにおける phosphorylcholine 経鼻投与に対する粘膜および全身免疫応答)

田中紀充

### 【はじめに】

中耳炎、上気道炎において、近年、耐性菌の出現が問題となり、発症予防のためのワクチン、特に粘膜ワクチンの開発が注目されている。既に肺炎球菌に対するワクチンは実用化されているものもあるが、その効果は十分ではない。投与した血清型の菌種、菌株には効果を示すが他の血清型の菌株には全く効果を示さない。したがって、ワクチン接種した菌を起炎菌とする中耳炎は減少しても急性中耳炎の減少にはつながっていない。また、小児、高齢者といった免疫反応の弱い層への効果が期待できない点も問題点である。今後、このような問題点を克服できる新たな粘膜ワクチンの開発が期待されている。

phosphorylcholine (以下、PCとする)は、1967年、グラム陽性菌である肺炎球菌の細胞壁を構成するペプチドグリカン、および、リボタイコ酸の構成成分、特に免疫学的優勢抗原決定基であると認識された。その後、グラム陽性菌の他の細菌、グラム陰性菌にもPCが表出していることがわかってきた。最近の研究では、肺炎球菌の上皮への浸潤には、細胞表面のPCとPAFレセプターとの結合がかかわっているといわれ、PCの発現がその細菌の病原性に関与することが示唆されている。また、肺炎球菌、インフルエンザ菌といった病原菌に対する防御にPCに対する自然免疫が重要な役割を担っているともいわれている。

以上の知見から、PC特異的な免疫が誘導されれば、より広域の細菌感染に効果のある粘膜ワクチン開発の可能性につながるのではないかと考えられる。今回、我々は多種、多様な細菌種の表面に表現し、免疫学的活性部位とされるPCを抗原として用いて、マウスに経鼻投与を行い、特異的免疫応答の誘導を観察した。

### 【材料および方法】

生後6週のBALB/cマウスにPC-KLH 50  $\mu$ gを粘膜アジュバントとしてコレラトキシン(CT, 1  $\mu$ g)を加えて経鼻投与した。免疫は週1回3週にわたって行い、最後の免疫から7日後にサンプル(血清、唾液、鼻腔洗浄液、鼻粘膜、脾臓)を採取した。①ELISA法にて、唾液、鼻腔洗浄液、血清中のPC特異的抗体価を測定した。②ELISPOT法にて、脾臓、鼻腔粘膜中のPC特異的抗体産生細胞数を測定した。③また、誘導された唾液、血清中の抗体がPC特異的であることを、PCによる阻害実験(ELISA法)にて観察した。④免疫後の脾臓CD4<sup>+</sup>T細胞をin vitroにてPCで刺激し、その上清中のサイトカイン(IL-4, IFN- $\gamma$ )をELISA法にて調べた。⑤患者から採取

した複数の肺炎球菌、インフルエンザ菌と誘導された唾液中のPC特異的抗体の反応をELISA法にて観察した。また、TEPC15（PC特異的IgA）に対する反応との相関を検討した。⑥PCにて免疫したマウスを用いて、鼻腔内に肺炎球菌、インフルエンザ菌の生菌をチャレンジして、12時間後の鼻腔洗浄液中、鼻粘膜中の細菌数を観察した。

#### 【結果】

①、②PC-KLHの経鼻免疫によって、唾液、鼻腔洗浄液中のPC特異的IgAの抗体価が上昇し、鼻粘膜中のPC特異的IgA産生細胞数の有意な増加が観察された。また、血清中のPC特異的抗体（IgM、IgG、IgA）の抗体価の上昇が観察され、脾臓のPC特異的抗体産生細胞数の増加が観察された。③誘導された唾液中のIgAは、PC-BSAでコーティングされたプレートへの結合をハプテンPCにより阻害された。また、血清中のIgMも同様にハプテンPCにより阻害されたが、IgGは阻害されなかった。④免疫後の脾臓CD4<sup>+</sup>T細胞をPCで刺激し、その上清中のIL-4はコントロール群と比較して有意に上昇した。また、IFN- $\gamma$ も有意ではなかったが上昇した。⑤PC免疫により誘導された唾液中のIgAは、肺炎球菌、インフルエンザ菌の様々な菌株に対して反応し、その反応は、細菌のTEPC15との反応に有意に相関した。⑥PCにて免疫されたマウスにおいて、肺炎球菌、インフルエンザ菌の感染12時間後、鼻腔洗浄液中、鼻粘膜中細菌数が有意に減少していた。

#### 【考察及び結語】

PC-KLH+CTの経鼻投与により、粘膜局所及び全身性にPC特異的免疫の誘導が観察された。PCによる阻害実験の結果から、PC-KLH経鼻投与により誘導された唾液中IgA、および血清中IgMはPC特異的に反応することが確認された。血清中IgGは、PC特異的ではなく、ハプテンPCと蛋白の結合部に特異的である可能性が考えられた。

また、PC-KLH+CT経鼻免疫による免疫応答は、Th2型およびTh1型両方の反応を誘導していると推測され、Th2型は主に粘膜アジュバントに用いたCTによる反応と考えられた。Th2型を誘導することで、アナフィラキシーが危惧されるが、CT単独投与と比較して、PC-KLH+CT投与群においては血清中のIgEが抑制される結果を得ており、危険性は高いものではないと考えられた。

PC-KLH経鼻免疫により誘導されたマウス唾液IgAは、種々の肺炎球菌、インフルエンザ菌に反応を示し、PCの発現の強い菌により強く反応すると考えられた。したがって、浸潤能力の強い病原性の高い病原菌に対して、効果的に作用すると考えられた。さらに、PC-KLH経鼻免疫により、鼻腔内の細菌に対するクリアランスが上昇したことから、生体内において誘導された抗体が効果的に作用することが期待できる。

以上より、PCは、肺炎球菌、インフルエンザ菌といった起炎菌による上気道炎症を予防する、より広域に働く粘膜ワクチンとして有用であることが示唆された。

(Vaccine 掲載予定)

# 論文審査の要旨

報告番号	医研第 640 号	氏名	田中 紀充
審査委員	主査	松山 隆美	
	副査	河野 嘉文	小田 紘

## **Intranasal immunization with phosphorylcholine induces antigen specific mucosal and systemic immune responses in mice**

(マウスにおける phosphorylcholine 経鼻投与に対する粘膜および全身免疫応答)

(Vaccine・2007 掲載予定)

中耳炎を含む上気道炎において、近年、耐性菌の出現が問題となり、発症予防のためのワクチン開発が期待されている。既に肺炎球菌に対するワクチンは実用化されているものもあるが、その効果は十分ではない。投与した血清型の菌種、菌株には効果を示すが他の血清型の菌株には全く効果を示さない。したがって、ワクチン接種した菌を起炎菌とする中耳炎は減少しても急性中耳炎の減少にはつながっていない。また、小児、高齢者といった免疫反応の弱い層への効果が期待できない点も問題点である。そこで本研究では、多種、多様な細菌種に発現し免疫学的活性部位とされる Phosphorylcholine (以下、PCとする) を抗原として経鼻投与を行い、マウスにおけるPC特異的免疫応答の誘導を観察した。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

1. PC-KLH経鼻投与により、粘膜局所及び全身性にPC特異的免疫が誘導された。
2. PC-KLH経鼻免疫により誘導されたマウス唾液IgAは、種々の肺炎球菌、インフルエンザ菌に反応を示した。
3. PC-KLH経鼻免疫により、鼻腔内の細菌に対するクリアランスが上昇した。

以上の結果から、PCは、肺炎球菌、インフルエンザ菌等の起炎菌による上気道炎症を予防する、より広域に働く粘膜ワクチンとして有用であることが示唆された。

本研究は、有効な上気道感染予防粘膜ワクチンの開発、臨床応用への道を開く基礎研究である。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	医研第 640 号	氏名	田中 紀充
審査委員	主 査	松山 隆美	
	副 査	河野 嘉文	小田 紘
<p>主査および副査の3名は、平成18年12月18日、学位申請者 田中 紀充 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p>			
<p>質問1：経鼻免疫で誘導されたPC特異的IgAは、感染実験において細菌にどのように作用するのか。          回答：粘膜面の分泌型IgAは、細菌の粘膜への付着、侵入に対して阻害的に働くと考えている。</p>			
<p>質問2：感染実験において12時間後の鼻腔洗浄液を採取して細菌数を測定しているが、粘膜に吸着、侵入しなかった細菌を観ていることにならないか。また、細菌数が減ったことを感染防御に効果があると評価してよいのか。          回答：鼻腔洗浄液と同時に鼻粘膜内に侵入した細菌数も測定している。その結果、PC免疫群において粘膜内細菌数も有意に減少していた。したがって、鼻腔洗浄液中の細菌数の減少は、鼻腔からの細菌排除を示し、早期に鼻腔より細菌が排除されることは感染予防につながると考えている。</p>			
<p>質問3：感染実験において、どれくらいのクリアランス上昇が感染防御に対して有効と考えられるのか。          回答：経鼻免疫により下気道にPC特異的免疫を誘導し、肺へ細菌を感染させ、肺炎を起こして生存を検討した文献がある。しかし、われわれは下気道ではなく上気道感染に対するワクチン開発を目指しており、今回のクリアランスを検討する実験を行った。どの程度のクリアランス上昇が感染防御に有効なのかについては、上気道感染モデルの確立が必要であり、今後検討する予定である。</p>			
<p>質問4：感染実験において、経鼻投与した細菌数は、細菌感染のモデルとして妥当であるのか。          回答：上気道感染モデルが確立されていないので妥当な細菌数は不明である。今回用いた細菌数は、クリアランスを評価するために適切な菌数を設定する予備実験を行い、その結果にもとづいて決定した。</p>			
<p>質問5：論文中にあるPCに対する自然免疫について説明を求める。          回答：PCは、抗原提示細胞のTLR4を介して認識される。また、PC特異的免疫応答には自然免疫の範疇にあるB1細胞が関わっていると考えられている。</p>			
<p>質問6：PCの構造は、宿主側の生体構成成分には存在しないのか。PC特異的免疫応答が、自己免疫疾患やアナフィラキシーを誘導する危険性はないのか。          回答：PCは宿主の構成成分には存在しない。また、今回の研究でもPC特異的免疫応答がマウスの全身や局所に傷害を起こすことは観察されていない。むしろ、PC投与により血清中IgEの上昇が抑えられる実験結果を得ており、アナフィラキシーの起こる可能性は低いと考えられる。</p>			

質問7：PC特異的免疫応答の常在細菌叢に対する影響についてどう考えるか。

回答：病原性の高い細菌表面にPCが多く表出しているといわれており、今回のPC特異的免疫応答は、病原性の低い常在菌には大きな影響は及ぼさず、病原菌に対して効果的に働くと考えられる。また、感染実験において、経鼻投与した細菌以外の細菌数は、免疫した群と対照群で同様であったことも常在菌に対する影響は少ないことを支持する結果と考えている。

質問8：実験に使用したマウスの週齢（6Wから10W）には何か意味があるのか。

週齢の若いマウスにおける免疫応答についてはどう考えるか。

回答：免疫が成熟しているマウスとして6Wのマウスを実験に用いた。幼少マウスに対する免疫応答は観察していない。肺炎球菌に対する多価ワクチンの皮下注射は小児における有効性が低いことが知られており、小児における効果を検討する意味でも、幼少マウスを用いた免疫実験の必要性はあると考える。一方、粘膜面の分泌型IgAは、小児においても十分誘導されることが既にわかっており、粘膜ワクチンの有効性は十分期待できると考えている。

質問9：コレラトキシンはどのようなものを使ったのか。

回答：特に処理されていない天然のコレラトキシンを用いた。しかし、天然のコレラトキシンはヒトへの使用が不可能であり、現在、コレラトキシンの毒性を抑え、アジュバンシティーを保つようにサブセットを合成したものが検討されている。

質問10：PC特異的抗体が酸化LDL、あるいはPCがCRPと反応するとの報告があるが、どう考えるか。

回答：ヒト急性感染症罹患時の血清中PC特異的IgG抗体が上昇しており、こうした反応は大いに予測される。臨床応用にもっていくためには、このような点もさらに検討が必要と考える。

質問11：感染実験の結果が、実際に分泌型IgAによる作用なのか。IgAのノックアウトマウスを用いた検討が必要ではないか。

回答：指滴のとおりと考える。経鼻免疫では局所さらには血中のIgG、IgMも上昇しており、これらの関与もあると考える。

質問12：経鼻投与が腸管免疫に及ぼす影響についてどう考えるか。

回答：経鼻投与の利点として、免疫誘導に必要な抗原量が、腸管免疫応答と比較して、およそ1/100と少ないことがあげられる。また、近年、粘膜免疫の区域性も指摘されており、経鼻的抗原投与は、ほとんど腸管免疫に影響を及ぼさないと考えている。

質問13：Th1/Th2バランスを、脾臓の細胞を用いて全身的に検討しているが、粘膜局所におけるTh1/Th2バランスには影響を及ぼさないのか。

回答：すでに我々のグループはNALTのリンパ球を解析して、経鼻免疫によって脾臓の細胞と同様にTh1/Th2バランスが変化することを確認している。

以上の結果から、3名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士（医学）の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。