

論 文 要 旨

Transcutaneous immunization with phosphorylcholine induces antigen-specific mucosal and systemic immune responses in BALB/c mice.

〔 ホスホリルコリン経皮投与における全身および粘膜面に
あたえる影響に関するマウスを用いた検討 〕

永野 広海

【序 論】

近年、抗菌剤の乱用から MRSA や多剤耐性緑膿菌などの薬剤耐性菌が蔓延し、臨床の現場では感染の遷延化・難治化がおり加療の難渋するケースは決して少なくない。われわれ耳鼻咽喉科でも例外はなく、小児の難知性中耳炎は、加療に難渋し、炎症の遷延化から聴力低下をきたすこともある。ワクチンの投与経路には皮下注射などの全身投与と経鼻ワクチンや舌下ワクチンなどの経粘膜投与の2つが代表的であるが、経粘膜投与の経鼻ワクチンでは顔面神経麻痺の有害事象が報告された。有害事象の少ない投与経路が模索されており、近年新たな投与方法として経皮投与が注目されている。その特徴として、他の粘膜ワクチンと同様に接種時に痛みを伴わないこと、また血管が分布していない皮膚の表皮に限局して抗原を投与するため発熱やアナフィラキシーのような副作用が起こらないなどの利点がある。

今回の研究テーマである粘膜免疫は、病原菌を含めた抗原の侵入門戸である粘膜における抗原特異的分泌型 IgA を誘導するとともに、血中の抗原特異的 IgG も誘導することによる二段構えの防御機構を有する免疫機構である。これまで我々は、中耳炎を含めた上気道感染防御粘膜ワクチン開発に向けて、基礎実験を行い、知見を蓄積してきた。現在は、ワクチン抗原としてグラム陽性菌や陰性菌の細胞膜の細胞膜の存在する多糖性構造物として知られるホスホリルコリン (以下:PC) に注目している。PC は、様々な細菌の細胞膜の表面に発現している共通の構成成分であり、これらに対する抗体の産生を安全に誘導できれば粘膜面において幅広い細菌制御の可能性がある。以前経鼻 PC 投与により肺炎球菌やインフルエンザ菌の鼻腔からのクリアランスが上昇することを報告してきた。PC の経皮投与によって誘導される粘膜および全身免疫応答の特徴やその誘導起序は未だに明らかにされていない。

【目 的】

ワクチン開発において、有害事象が少なく簡便な投与方法の模索が必要である。我々がこれまで報告してきた経鼻舌下以外の投与経路を探るべく、PC を用いた経皮免疫について検討する。

【材料及び方法】

6 週齢の BALB/c マウスを用いて無刺激コントロール群と背部の皮膚に PC200 μ g を塗布した群(アジュバンドとしてコレラトキシン CT1 μ g) とで比較検討を行った。刺激頻度は、1 週間に 1 度を 6 週間行い、合計 6 回の背部に経皮投与を行った。

血清中の PC 特異的 IgM、IgG、IgA、唾液中の PC 特異的 IgA を投与終了後から 1 ヶ月ごとに 6 ヶ月まで経時的の ELISA 法にて測定した。

投与終了 6 ヶ月後に血清、脾臓を採取した。血清からは PC 特異的 IgG サブクラスを、ELISA 法を用いて測定した。また脾臓からは、PC 特異的リンパ球を分離しサイトカイン (IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IFN- γ) を ELISA 法で測定した。

【結 果】

血清中 PC 特異的 IgM と IgG の経時的変化は、経皮投与群では 6 ヶ月間コントロールより有意の高値を示した。血清中 PC 特異的 IgA の経時的変化は、経皮投与群では 5 ヶ月間コントロールより有意の高値を示したが、次第に減少し 6 ヶ月目の有意差がなくなった。

唾液中の PC 特異的 IgA の経時的変化は、経皮投与群では 6 ヶ月間コントロールより有意の高値を示した。コントロール群では一度も検出されなかった。

血清を用いた IgG サブクラスの検討では、コントロール群、経皮投与群ともに PC 特異的 IgG1, IgG2a の産生を確認できた。IgG1, IgG2a とともに、経皮投与群の方が統計学的有意に高値で、IgG1 の方が IgG2a よりも統計学的有意に高値であった。

またサイトカインは IL-4 がコントロールと比べて有意の上昇していた。IFN- γ , IL-5, IL-12, IL-13 は検出されなかった。

【結 論】

PC は様々な細菌の細胞膜の構成成分であるため腸内細菌等によりコントロール群でも血清中では確認されるものの粘膜面では抗原特異的 IgA は確認されなかった。経皮投与群では、コントロール群と比較して、血清中の IgA、粘膜面（唾液）において統計学的有意に抗原特異的 IgA の産生を約 6 ヶ月間にわたり認めた。したがって PC を経皮免疫することで、血清中や粘膜面において抗原特異的抗体産生を認めた。

【考 察】

Glenn らは、抗原をアジュバンドともの皮膚に直接塗布することで免疫応答を誘導できると報告した。この方法は、注射するわけではないため痛みを伴わず、血管を介さないためアナフィラキシーは起こらないことが、注射器を用いる従来の皮下注射による方法とは異なる利点である。

今回 PC をアジュバンドである CT とともに背部の皮膚に経皮投与したが、血清中に PC 特異的免疫応答をコントロール群と比較して有意な上昇を確認することができた。コントロール群でも PC 特異的抗体価も認めているが、この理由は PC が種々の細菌の細胞壁に共通して発現しているため、腸内細菌などの常在菌への反応による影響と考える。

サブクラスと CD4 陽性細胞の産生したサイトカインを分析すると IL-4 の上昇を認め、Th2 へのシフトが確認された。これは、経皮免疫が Th2 へシフトしやすいことと、アジュバンドとして CT を用いた影響によるものと考えられる。今後実験動物からヒトへの投与を考慮すると Th1, Th2 のバランスのよいアジュバンドが必要であるため、CT に代わるアジュバンドの検索が必要である。

経皮投与の欠点としては、ただ単純に抗原を塗布すれば Langerhans 細胞や真皮の樹状細胞に到達するわけではなく、バリアである角質を安定して通過させる必要がある。そのため経皮投与において、経鼻投与・舌下投与と同等の血清中の抗体価を上昇させるためには、投与回数を増やすことと一回あたりの抗原量を増やすことが必要である。