

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 463 号		学位申請者	永野広海
審査委員	主査	金蔵 拓郎	学位	博士 (医学)
	副査	西 順一郎	副査	原 博満
	副査	小松澤 均	副査	東 裕子
<p>主査および副査の5名は、平成30年3月8日、学位申請者 永野広海 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) ホスファチジルコリンとホスホリルコリン (以下PC) の関係は? (回答) ホスファチジルコリンはグリセロリン脂質の親水部としてコリンがリン酸エステル結合し、疎水部としてグリセロール骨格に2つの脂肪酸がエステル結合した構造をしているリン脂質の総称であり、ホスホリルコリンは組織内におけるホスファチジルコリン合成の中間体です。また、リン脂質の中に、スフィンゴミエリンがあり、ホスホリルコリンはその一部をなしており、細胞膜の外に存在します。</p> <p>質問2) PCに対する抗体に感染防御作用があるのか? (回答) 教室のTanakaらの報告 (Vaccine, 2007) で、PC-KLHの経鼻免疫によって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亢進することが示されており、PCに対する抗体に感染防御作用があると考えます。</p> <p>質問3) PC-KLHを10μl滴下しているが、その方法は? またそれがすべて吸収されるのか? (回答) ケタミンで麻酔したマウスの背部にピペットでPC-KLHを滴下し塗り込んでいますが、すべてが吸収されているわけではないと考えます。どの程度の量が吸収されるかについては検討していません。</p> <p>質問4) なぜ6回も免疫しなければならないか? (回答) 予備実験で十分な免疫応答が得られるには、PC-KLHを6回経皮投与する必要があることを確認しています。背部の皮膚が厚いことやその構造上、抗原の吸収量が少ないため、免疫応答が誘導されにくいと思われます。不活化ワクチンであれば追加免疫によってブースター効果が得られるが、それについて検討したか?</p> <p>質問5) 肺炎球菌ワクチン (プレベナー) 投与後にPC-KLHを経鼻的に投与し追加免疫することでブースター効果が得られることは確認しています。しかし、今回の経皮投与では検討していません。</p> <p>質問6) 唾液の採取方法は? (回答) 副交感神経刺激薬である塩酸ピロカルピン (1mg/ml) を100μl腹腔内投与して唾液の分泌を促し、それを採取しました。</p> <p>質問7) 何故コレラトキシン (CT) をアジュバントとして使用したのか? (回答) 予備実験では、Poly(I:C)や水酸化アルミニウムをアジュバントとして使用しましたが免疫応答が誘導できませんでした。</p> <p>質問8) アジュバントとしてコレラトキシン (CT) を使用しているが、その作用機序は? (回答) CTの粘膜アジュバントとしての作用機序は完全には解明されていません。現時点では、CTが細胞内に入るとGタンパク質に結合してアデニル酸シクラーゼを活性化し、それにより抗原の吸収が促進されると考えられています。</p> <p>質問9) PC-KLHを合成する際、どのようにしてPCとKLHを結合させたのか? (回答) 市販されているPC-KLHを使用しており、その方法には特許があって不明です。</p> <p>質問10) PC-BSAでリコールレスポンスがでるのはT細胞の抗原認識様式を考えると理論的には考えにくい。どうしてPC-BSAで再刺激したのか? 何故反応がでるのか? (回答) バプテンであるPCにKLHを結合させており、同部位の結合が特許で不明です。以前当教室の論文でも記載しておりますがPC-BSAの刺激でも反応が誘導されています。PCとBSAの結合部位に対する反応でもあるととらえることができます。</p> <p>質問11) PC-BSAでCD4陽性T細胞を刺激したのはなぜか。PC-KLHで刺激すればもっと強い反応が起きたのではないか? (回答) ご指摘のとおりです。しかし、PC-KLHで免疫しているため、PC-KLHで刺激すればKLHに対する反応も現れることとなります。したがって、PCに対する反応を観察するためPC-BSAで刺激しました。</p> <p>質問12) この程度のIgAの上昇で感染防御効果が得られるのか? (回答) PC-KLHの経鼻投与でも同程度のIgAの上昇を認め、それによって鼻腔からの細菌クリアランスが有意に亢進し、感染防御効果があることが示唆されました。また、塩酸ピロカルピンで刺激して採取した唾液や鼻腔洗浄液中のIgAは10-20倍に希釈されており、実際の抗体の濃度はもっと高いと思われます。</p> <p>質問13) 血清中のPC特異的IgAは生体防御に関与するのか? (回答) 血清型IgAはスカベンジャーとして働き、体内へ行った抗原を体外へ排出する作用を持つことが知られており、IgGやIgMほどではなくても感染防御に働くと考えられます。</p> <p>質問14) 血清PC特異的IgGは6ヵ月安定しているが、PC特異的IgAがそれよりも早く低下したのはなぜか? (回答) IgGは免疫グロブリンの中で最も半減期が長いことから、IgAやIgMよりも長期間高値のまま維持されたと考えられます。</p> <p>質問15) 1週ごとに6回免疫しているが、その後一定期間経たのちに追加免疫するとブースト効果が得られるか? (回答) 経皮免疫においても免疫学的記憶が起こることが知られているのでブースト効果が得られると思いますが、今回の研究では検討していません。</p>				

最終試験の結果の要旨

463

- 質問 16) 今回は BALB/c を用いているが、種が異なるマウスでも同様の結果が得られるのか？
 (回答) 別の実験で C57BL/6 マウスに肺炎球菌の外膜蛋白である PspA を経皮投与したところ PspA 特異的粘膜および全身免疫応答が得られたので、種が異なるマウスにおいても PC-KLH にする同様の免疫応答がみられると考えます。
- 質問 17) PC はヒトにも存在するのか？
 (回答) 赤血球や様々な細胞の構成成分としてヒトにも存在します。
- 質問 18) PC でヒトを免疫すると正常組織を攻撃することはないのか？
 (回答) 抗 PC 抗体はヒト血清中に自然抗体として存在し、正常細胞を構成する PC とは反応せず損傷を受け破壊された細胞の PC とのみ反応し、生体の恒常性を保つ役割を担っていることが知られています。したがって、PC で免疫しても正常組織への攻撃は生じないと思われまます。
- 質問 19) PC がすべての菌株に発現していることを確認したか？
 (回答) 複数の肺炎球菌とインフルエンザ菌で PC の発現を検討したところ、菌種によって差はありますが、すべての細菌で PC の発現が確認されました。
- 質問 20) PC で免疫したのちにブドウ球菌のクリアランスを調べたことはあるか？
 (回答) ブドウ球菌に関する検討は行っていません。
- 質問 21) すべての細菌に作用するワクチンは常在菌叢を乱すため危険ではないか？
 (回答) PC は高病原性の細菌に強く発現し、常在菌での発現は弱いことから、PC ワクチンの危険性は少ないと思われまます。
- 質問 22) PC はハプテンなので抗原性は弱いと思われるが、KLH や CT に対する反応を検討したか？
 (回答) KLH そして CT に対する免疫応答も誘導されることを確認しています。
- 質問 23) ヒトに経皮投与して同様の効果が期待できるか？
 (回答) ヒトでは検討しておりませんが、ヒトでも経皮感作が起こることが報告されており、同様の効果が得られると思われまます。
- 質問 24) ヒトでも PC 特異的免疫グロブリンが認められるのか？
 (回答) ヒトでも自然抗体として PC 特異的 IgM が存在し、急性感染症罹患時には他のアイソタイプの抗体価も上昇することを確認しています。
- 質問 25) 皮膚に炎症がなくても感作が成立するのか？
 (回答) 抗原の分子量が小さい場合 (500k ダルトン以下) や皮膚表面に常在するブドウ球菌などの菌体成分がアジュバントとして働き、炎症がなくても経皮感作が起こることが報告されています。
- 質問 26) 経皮免疫は具体的にどのように行ったのか？
 (回答) マウスの背部をバリカンで除毛し、その翌日、皮膚に明らかな傷がないことを確認したのちに PC-KLH をピペットで滴下し塗布しました。
- 質問 27) 皮膚の病理組織学的検討はいつ行ったのか？
 (回答) 最終免疫から一ヶ月後に免疫した部位の皮膚を採取し、観察しました。なお、それまでの期間でも免疫した背部皮膚に肉眼的には明らかな組織学的変化は認められませんでした。
- 質問 28) 経皮投与した部位を舐めたことによって免疫応答が誘導された可能性はないか？
 (回答) 経皮投与したと同量の抗原および CT を経口投与しても免疫応答は誘導されなかったため、グルーミングの影響はないと考えまます。
- 質問 29) 抗原特異的 IgE は測定しなかったのか？
 (回答) PC および KLH そして CT に特異的な IgE を測定する方法はまだ確立されておらず、これらに特異的な標準血清 IgE も市販されていないので行っていません。
- 質問 30) 経鼻投与による顔面神経麻痺の発症頻度は？どのような機序によって生じるのか？
 (回答) 不活化インフルエンザワクチンの臨床試験では 27.2% の頻度で顔面神経麻痺が発症したと報告されています。作用機序としては、嗅神経を介して抗原やアジュバントが中枢に移行するためと考えられています。
- 質問 31) ヒトへ応用するためにはどのような工夫が必要か？
 (回答) PC-KLH のヒトへの安全性を確認すること、あるいは安全性が高い他の PC 複合体を作成すること、さらにヒトへの使用が可能なアジュバントの開発も必要です。なお、海外では可溶性マイクロニードルや経皮ワクチン用の皮膚パッチの開発が進められています。
- 質問 32) テープストリッピングを検討したか？
 (回答) 文献的にそのような方法が報告されています。しかし、この方法で背部の皮膚を広範囲除毛するのは困難なため、今回はバリカンで除毛しました。
- 質問 33) 免疫前に PC 特異的抗体が検出されているが、それはなぜか？
 (回答) マウスでも様々な抗原刺激によって自然抗体として PC 特異的免疫グロブリンが産生されるためと思われまます。PC 特異的 IgM が高値なのは、そのことを示唆していると思われまます。
- 質問 34) IgG1 サブクラスが有意に高値を示したその意義はなにか？
 (回答) IgG1 は IL-4 と相関することが知られており、Th2 型優位の免疫応答が誘導されたことを示唆すると考えまます。
- 質問 35) IgG1 と IgG2a は何を認識するのか？
 (回答) マウス IgG1 はヒトでは IgG4 に相当し、アレルゲンと反応し遮断抗体として働きます。IgG2a はヒトでは IgG1 と同様の働きがあり、蛋白抗原やウイルスに対して作用すると言われています。
- 質問 36) ヒトはなぜ CT で下痢をおこすか？
 (回答) 細胞内の G 蛋白と結合してアデニル酸シクラーゼを活性化し、その結果 cAMP 濃度が上昇し、細胞や組織から電解質や水の漏出、塩化物および重炭酸イオンの過分泌が生じるため下痢を発症すると考えられています。
- 質問 37) CT による皮膚の変化はなかったか？
 (回答) 実験期間中に観察した限りでは、肉眼的変化はみられませんでした。

以上の結果から、5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。