

# 論文要旨

## 〔ホスホリルコリン経鼻免疫によるアレルギー性鼻炎発症の抑制〕

宮下 圭一

### 【序論及び目的】

急性中耳炎など上気道細菌感染症の発生率は依然として高く、さらに薬剤耐性菌が増加している。1990年代半ば以降、多くの国々で蛋白結合型肺炎球菌ワクチンが使用され、侵襲性肺炎球菌感染症の発生率は劇的に減少したが、非ワクチン肺炎球菌株やインフルエンザ菌などによる急性中耳炎が増加し、上気道感染症に有効な広域スペクトラムワクチンの開発が必要とされている。その一つとして一般的な病原体関連分子パターンを持ち、グラム陽性菌と陰性菌の両方の細胞外膜に存在するホスホリルコリン (PC) が注目されている。そこで我々は PC に Keyhole limpet hemocyanin (KLH) を結合させた PC-KLH をマウスに経鼻投与し、それによって PC 特異的 IgA ならびに全身免疫答が誘導され、肺炎球菌およびインフルエンザ菌のクリアランスが亢進することを証明した。さらに PC-KLH による経鼻免疫では、IgE 産生が上昇しなかったことから、PC は特異的 IgA 粘膜免疫応答の誘導と同時に、IgE 産生を抑制する可能性も示唆された。これを支持する研究として、PC を保有する肺炎球菌ワクチンが急性喘息発作の頻度を低下させ、喘息の動物モデルにおけるアレルギー性炎症を抑制させることが報告されており、アレルゲン特異的 IgE 産生およびアレルギー性炎症の抑制に関連していると推測される。最近の研究では、PC を高発現する肺炎球菌に幼齢マウスを暴露させると、成長後にハウスダスト・ダニ特異的 IgE 産生および気道の過敏性が有意に低下することが示されている。しかし、PC が直接アレルゲン特異的 IgE 産生を低下させ、アレルギー性炎症を抑制させるか否かについては、これまで知られていない。PC がアレルギー性炎症を抑制することが示されれば、PC は上気道細菌感染症とアレルギー性疾患の両方の予防に応用できる可能性がある。

そこで、本研究では、PC 経鼻ワクチンが I 型アレルギー疾患であるアレルギー性鼻炎の発症に及ぼす影響を明らかにすることを目的として、卵白アルブミン (OVA) アレルギー性鼻炎モデルに対して、OVA 感作前に PC 経鼻免疫を行い、OVA 経鼻誘発後のアレルギー性鼻炎症状ならびにアレルギー性炎症に対する抑制効果を検討した。

### 【材料及び方法】

#### ①アレルギー性鼻炎モデルの作成と PC 経鼻免疫の方法

実験には生後 6 週齢の雌性 BALB/c マウスを使用し、PC-KLH 経鼻投与後 OVA 感作群 (PC-KLH+OVA 群)、PBS (Phosphate buffered saline) 経鼻投与後 OVA 感作群 (PBS+OVA 群)、PBS 経鼻投与後 OVA 感作なし群 (対照) の 3 群に分け、アレルギー性鼻炎に対する PC 経鼻免疫の影響を検討した。PC-KLH もしくは PBS の経鼻投与は 1 週毎に 3 回、OVA 腹腔内投与による全身感作も 1 週毎に 3 回行った。

#### ②アレルギー性鼻炎症状の評価と免疫学的観察

OVA 全身感作を 3 回行った後 7 日目 (42 日目) から OVA を連日経鼻投与し、8 回目 (49 日目) の OVA 経鼻投与直後から 5 分間の鼻かき、くしゃみの回数をそれぞれ計測した。また同日に採血し、血清中の総 IgE および OVA 特異的 IgE 値を ELISA 法で測定した。さらに鼻腔粘膜を採取し、ホルマリン固定後に HE 染色を行い、鼻粘膜に浸潤した好酸球数および鼻粘膜浮腫の程度を評価した。脾臓お

よび NALT (Naso-Associated Lymphoid Tissue : 鼻咽腔関連リンパ組織) も同様に採取し、単核球を分離したのちに CD4+T 細胞を分離し、これを抗原呈示細胞、OVA とともに培養し、上清中の IL-4, IFN- $\gamma$  を ELISA 法で測定した。また、脾臓から樹状細胞 (Dendritic Cell : DC) を分離し、これを LPS または PC-KLH で刺激し、培養上清中の IL-12p40 の濃度を ELISA 法で測定した。

## 【結 果】

### ①アレルギー性鼻炎症状

49 日目の OVA 経鼻投与後 5 分間アレルギー症状を観察した。鼻かき・くしゃみの回数は、いずれも PC-KLH+OVA 群で PBS+OVA 群と比較して有意に減少したが、対照と比較すると有意に高かった。

### ②血清中の総 IgE および OVA 特異的 IgE

血清中総 IgE および OVA 特異的 IgE 値は、OVA による全身感作および OVA 経鼻投与後に著明に上昇した。PC-KLH+OVA 群では対照より有意に高いが PBS+OVA 群と比較して有意に低値であった。

### ③鼻粘膜組織中の好酸球浸潤と鼻粘膜の肥厚

組織中の好酸球数は PC-KLH+OVA 群の方が PBS+OVA 群より有意に少なく、対照と同程度であった。鼻粘膜の厚さも PC-KLH+OVA 群の方が PBA+OVA 群より低値であり、対照と同程度であった。

### ④CD4+ T 細胞による IL-4 の産生

NALT および脾臓から分離された CD4+ T 細胞による IL-4 産生は、PC-KLH+OVA 群が PBA+OVA 群と比較して有意に低値であった。なお IFN- $\gamma$  の産生は、いずれの群でも認められなかった。

### ⑤LPS および PC-KLH 刺激による脾臓 DC からの IL-12p40 産生

ナイーブマウスの脾臓から DC (CD11c+ 細胞) を分離し、LPS および PC-KLH でこれを刺激すると、用量依存性に IL-12p40 産生が増加した。

## 【考察・結語】

I 型アレルギー性炎症の発症に必須の IgE 産生は、Th2 型の免疫応答によって亢進し、アレルギー性鼻炎では NALT における Th2 サイトカインである IL-4 や IL-13 の産生がその発症に関与する。本研究で NALT から分離された CD4+T 細胞における IL-4 産生を測定したところ、PC 前投与群では PC 非投与群と比較して、その産生が有意に抑制され、対照とほぼ同程度であった。一方、脾臓の CD4+ T 細胞からの IL-4 産生も PC 前投与群で抑制されたが、対照と比較してやや高値であった。以上の結果から、アレルギー性鼻炎の発症には脾臓よりも NALT における Th2 型の免疫応答が重要であり、これにより IgE 産生や局所の好酸球浸潤が抑制されたと考えられた。また DC は免疫応答の誘導に重要な役割を担う細胞であり、脾臓から分離した DC を PC および LPS で刺激したところ、DC から Th1 型細胞の分化に関与する IL-12p40 の産生が用量依存性に増加した。LPS は DC の TLR-4 と結合し、MyD88 シグナル伝達経路を介して IL-12 の産生を誘導することが知られており、PC を含む糖タンパクである ES-62 も TLR-4 と結合することから、PC 刺激においても LPS と同様の機序で IL-12p40 の産生が亢進したと考えられた。以上の結果から、アレルゲン感作前の PC 経鼻免疫が、アレルゲンによる Th2 型免疫応答の誘導を阻止し、鼻粘膜におけるアレルギー性炎症およびアレルギー性鼻炎症状の発症を抑制することが示唆された。