

最終試験の結果の要旨

報告番号	総論第	34号	学位申請者	間世田 佳子
審査委員	主査	橋口 照人	学位	博士 (医学)
	副査	原 博満	副査	松口 徹也
	副査	西 順一郎	副査	小松澤 均

主査および副査の5名は、平成30年12月13日、学位申請者 間世田 佳子君に面接し、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。

質問1) BALB/c マウスを用いたのはなぜか。

(回答) 粘膜免疫の研究に頻用されているマウスであり、Th2型の免疫応答が誘導され易いといわれている。

質問2) アジュバントとしてCT (コレラトキシン) を用いた理由は何か。

(回答) 粘膜免疫に関する実験の多くでCTが用いられていること、そしてそれらの結果と比較することも目的として本研究でもCTを用いた。

質問3) CTによるアジュバント効果の誘導機序は何か。

(回答) 作用機序は完全に解明されていないが、CTが細胞内に入るとアデニル酸シクラーゼを活性化し、抗原の吸収が促進されると考えられている。

質問4) 舌下免疫で膣洗浄液のPC特異的IgAが上がる機序は何か。また、舌下免疫により膣での免疫応答が誘導されるのは一般的にいわれていることか。

(回答) 舌下免疫で誘導されるIgA産生前駆細胞のホーミングレセプターが膣上皮に発現するリガンドと親和性が高いためといわれており、舌下免疫で泌尿生殖器系の免疫応答が誘導されることは既に報告されている。

質問5) CT経鼻単独投与で非特異的IgEが上昇しているのはなぜか。

(回答) 経鼻免疫によるTh2型優位の免疫応答が誘導されたためと考える。

質問6) Fig 6の実験方法を説明しなさい。

(回答) 臨床分離株である肺炎球菌およびインフルエンザ菌10株を超音波破砕法で処理し、それをパウダー化したものを抗原としてELISAプレートにコーティングした。次に1次抗体としてTEPC15 (マウスPC特異的IgA抗体) と免疫後の鼻腔洗浄液を反応させ、2次抗体としてHRP標識マウス抗IgA抗体を反応させて発色させ、その両者を比較することで鼻腔洗浄液中のIgA抗体活性を観察し、各細菌との交差反応性を評価した。

質問7) TEPC15は市販されているか。

(回答) Sigma社からIgA Kappa from murine myeloma-clone TEPC15という商品名で市販されている。

質問8) 実際に感染実験をしたことがあるか。

(回答) 今回の実験では行っていない。しかし、それを間接的に評価する方法として、以前、当教室にて、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を証明した (Tanaka et al, Vaccine. 2007; 25: 2680-2687)。

質問9) 感染症を予防するというをどのように証明したのか。

(回答) 今回の実験では感染症を予防することの証明はしていない。

質問10) 肺炎球菌とインフルエンザ菌は、どこから入手したのか。

(回答) 滲出性中耳炎患者の鼻咽腔から検出されたものを保存して用いた。

質問11) 感染実験は、どれくらいの時間を置いて評価したのか。

(回答) 生菌接種後12時間で鼻腔洗浄液を採取し、それに含まれる細菌数を測定した。

最終試験の結果の要旨

- 質問 12) 舌下投与された抗原の一部は、経口的に飲み込まれているのではないか。
 (回答) ケタミンの腹腔内注射で鎮静し、さらに舌下に鑷子を置いて嚥下を防止した。
- 質問 13) 舌下免疫では、どのような経路を介して免疫応答が誘導されるのか。
 (回答) 舌下粘膜下に存在する樹状細胞が抗原を取り込み、それが頸部リンパ節に遊走し、そこで抗原特異的 T 細胞および B 細胞などが誘導され、それらが上気道や泌尿生殖粘膜などの全身の実効組織にホーミングして免疫応答が起こるといわれている。
- 質問 14) PC と KLH の結合はどのように結合しているのか。
 (回答) PC-KLH は市販されており、その結合法の詳細は公表されていない。
- 質問 15) PC-KLH は市販されているのか。
 (回答) Bioserch 社製の製品を入手し使用した。
- 質問 16) Fig 2 で、CT 単独で PC 特異的 IgM が誘導されている理由は何か。
 (回答) 自然抗体として恒常的に産生されている PC 特異的 IgM が CT による何らかのプライミング作用を受けたためと思われる。
- 質問 17) IgG2a は Th1 型の免疫応答か。
 (回答) IgG2a は IFN- γ によって誘導されることが知られており、Th1 型の免疫応答と考えられる。
- 質問 18) IgG2a の上昇は、ヒトではどのように解釈されるのか。
 (回答) マウスの IgG2a、IgG1 は、ヒトではそれぞれ IgG1、IgG4 に相当すると考えられている。
- 質問 19) 交差反応の実験で、肺炎球菌はきれいな正の相関を示すのに対して、インフルエンザ菌では偏りがみられるのはなぜか。
 (回答) 細菌表面の PC 発現の相違によると思われる。
- 質問 20) CT を併用しないと免疫反応は起きないのか。PC-KLH 単独では誘導されないのか。
 (回答) PC-KLH 単独でも免疫応答は起きる。しかし、CT を用いた時と比較すると著しく弱い。
- 質問 21) マウスの唾液を採取する方法は何か。
 (回答) 副交感神経刺激薬である塩酸ピロカルピンを注射し唾液分泌を促し、それを採取した。
- 質問 22) マウスによって唾液分泌量に個体差があると思うが、その影響はないのか。
 (回答) 唾液分泌量に個体差はあまりなかった。
- 質問 23) 舌下、経鼻免疫における抗原投与量は同じなのか。
 (回答) PC-KLH の投与量は舌下と経鼻のどちらも $50 \mu\text{g}$ とした。ただし、舌下免疫では $5 \mu\text{l}$ 、経鼻免疫では $10 \mu\text{l}$ の生理食塩水に溶解し、それを投与した。
- 質問 24) 抗原の至適投与量について検討したか。
 (回答) 過去の実験で至適濃度を検討し、その結果をもとにして今回の実験を行った。
- 質問 25) 舌下は Th1 型、経鼻は Th2 型の免疫応答を誘導するが、その弊害もあるのではないか。
 (回答) 自己免疫疾患や IgE 抗体産生によるアレルギーの発症など、その弊害があることは否定できない。したがって臨床応用には注意が必要である。
- 質問 26) 肺炎球菌の表層に PC は表出しているのか。
 (回答) 肺炎球菌の PC は主として細胞壁にあるため莢膜が厚いと PC は表出しない。しかし、粘膜に接着する肺炎球菌の多くは莢膜が薄いと言われているので、PC が表出していると思われる。
- 質問 27) PC による免疫の役割として、具体的には何が考えられるか。
 (回答) 肺炎球菌やインフルエンザ菌感染症、喘息、動脈硬化症の抑制作用が知られている。
- 質問 28) 常在菌にも PC があるため口腔内常在菌叢が乱れるのではないか。
 (回答) 常在菌の PC 発現は少なく、その一方で高病原性の細菌は PC の発現が多いことが知られている。したがって、PC 特異的免疫応答の常在菌への影響は少ないと考える。
- 質問 29) 舌下免疫と経鼻免疫で Th1 型と Th2 型の反応に違いがあることは、既知の現象か。
 (回答) このことについては既に報告されている。

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同等あるいはそれ以上の学力・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。