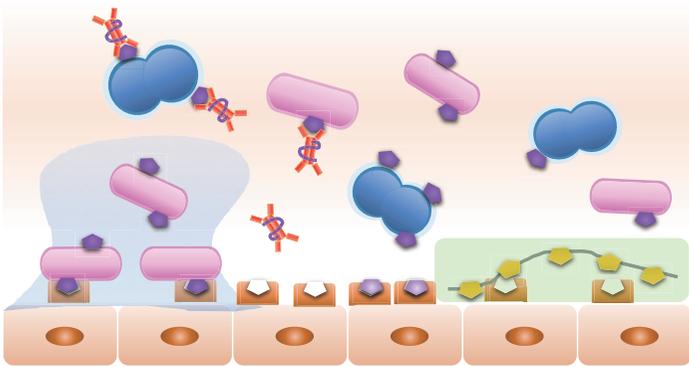


# 上気道炎症の 粘膜ワクチンによる 制御



## 序 文

「分泌型 IgA は上気道でどのように産生され、どんな免疫学的役割があるのだろうか？」この素朴な疑問が、私を粘膜免疫の研究へ導くきっかけになりました。

分泌型 IgA は血清型 IgA とは異なり、血清中には存在せず、気道や消化管の外分泌液中にのみ含まれるユニークな免疫グロブリンです。したがって、検体中に分泌型 IgA が確認されれば、その中には組織や血管からの浸出液のみではなく分泌腺由来の成分が含まれ、粘膜免疫の関与があることの証左になります。この分泌型 IgA が滲出性中耳炎の中耳貯留液中に存在することを種々の免疫化学的手法で1970年代に次々と実証し、中耳における抗体産生と中耳粘膜の分泌能を世界で最初に報告されたのが、私の恩師である大分大学耳鼻咽喉科学教室の故茂木五郎教授です。その茂木先生のもとに鹿児島大学から故大山勝教授のご指示で1982年6月に出向した私は、茂木先生に命じられるままに日々鼻汁を採取し、黙々と165検体の鼻汁中の分泌型 IgA を2層アガロースゲル電気泳動法で定量し、ELISA 法を用いて M 蛋白に対する特異的抗体活性を測定しました。そして、慢性副鼻腔炎の鼻汁には高濃度の分泌型 IgA が含まれているにもかかわらず、特異的抗体活性はむしろ低値であるという結果が得られました。しかし、免疫の「め」の字も知らない私はこの結果に戸惑いました。生体防御を果たすはずの分泌型 IgA が副鼻腔炎で多いのは矛盾している、何かの間違ひではないのか、分泌型 IgA の産生が亢進しているのになぜ特異的抗体活性は低いのか等々、次から次に疑問が沸いてきました。「そんなバカなことがあるものか」と言われることを覚悟して茂木先生に相談すると、「面白い結果だ」と意外な返事が返ってきました。しかし、私の疑問には一切答えてくれず、「どう解釈するかは自分で考えなさい」と冷たく突き放されました。そこで、分泌型 IgA に関する論文を片っ端から読んで自分なりの理論を構築し、悪戦苦闘して論文にまとめ Ann Otol Rhinol Laryngol に投稿したら、Editor の判断で査読を受けることなく受理されました。

その後、滲出性中耳炎患者の鼻咽腔粘膜上皮では肺炎球菌やインフルエンザ菌の接着性が亢進し、分泌型 IgA がこれら細菌の上皮細胞への接着を阻止することを証明し、1989年5月に大阪で開催された日本耳鼻咽喉科学会学術講演会における茂木先生の宿題報告でも紹介していただくことができました。また、その研究を通じてオハイオ州立大学の David Lim 教授の研究室に留学する機会を与えられ、茂木先生の宿題報告のキーワードであった経口ワクチンの開発を目的とした研究に取りかかりました。

私が留学したその当時の粘膜免疫の研究は腸管で精力的に進められ、分泌型

IgA の誘導には消化管関連リンパ装置 (gut-associated lymphoid tissue: GALT) が重要であり、抗原を経口的に投与することで全身の粘膜や分泌腺から抗原特異的分泌型 IgA の産生が誘導されると考えられていました。しかし、実験動物に細菌抗原をいくら経口投与しても唾液中に期待するほどの分泌型 IgA 産生は誘導されず、留学中そして帰国後もなかなか良い結果を得ることができませんでした。そんな折、1993年の第32回日本鼻科学会で、会長の茂木先生がアラバマ大学バーミングハム校ワクチンセンター教授の清野宏先生を招聘され、その清野先生による粘膜免疫応答の誘導機構に関する最先端のご講演を拝聴したとき、一筋の光明を見出した思いがしました。そこで、茂木先生にお願いして、1995年そして1997年の二度、いずれも短期間でしたが清野先生の研究室に留学させていただき、経鼻免疫応答に関する実験を行いました。その結果、上気道に抗原特異的分泌型 IgA を産生させるためには、抗原を経口的ではなく経鼻的に投与して鼻咽腔関連リンパ組織 (nasopharyngeal-associated lymphoid tissue: NALT) を介した免疫応答を誘導するほうがより効率的であること、さらに、経口免疫では消化管に、経気管免疫では下気道に優位な免疫応答が誘導され、粘膜免疫応答には区域性 (compartmentalization) があることも自らの実験で明らかにすることができました。

その後、1997年に大山先生の後任として鹿児島大学へ移動した後も、上気道における分泌型 IgA の産生そしてその制御機構に関する研究を継続するとともに、NALT の発生や新たな粘膜アジュバントの開発に関する研究を、東京大学医科学研究所へ赴任された清野先生やアラバマ大学の藤橋浩太郎先生の協力を得ながら行ってきました。これらの研究の最終的な目標は肺炎球菌やインフルエンザ菌による上気道細菌感染症に対する粘膜ワクチンの開発ですが、本邦でもすでに2013年から肺炎球菌ワクチンやヒブワクチンが定期接種化され、これらの細菌に対するワクチン開発の必要性は低下したかに思われます。しかし、非ワクチン株による急性中耳炎の増加や血清型置換が問題となっており、スペクトラムの広いワクチンの開発が望まれています。そこで、私共の教室では、グラム陽性菌や陰性菌すべての細菌の細胞壁に含まれるホスホリルコリン (PC) に着目し、これが広域スペクトラムを持つ新たな粘膜ワクチンになるのではないかと期待して研究を進めています。そして興味深いことに、PCを経鼻あるいは舌下投与すると血清中の IgE 産生が抑制されます。また、PCは通年性アレルギー性鼻炎の原因となるダニ抗原にも含まれ、PCに対する免疫応答を誘導することによって喘息の発症を予防できることが知られています。その他にも、PC 特異的 IgM が高脂血症の発症を阻止することが報告されています。このように PC は多機能性を有しており、PC を用いた粘膜ワクチンは、上気道細菌感染症による炎症のみならず I 型アレルギー性炎症、さら

には高脂血症も予防できると期待されます。

また、PCはそれ自体の作用でも感染症を予防できることが指摘されています。たとえば、PCは血小板活性化因子（platelet-activating factor: PAF）の受容体（PAF receptor: PAF-R）のリガンドであり、上皮細胞表面に存在するPAF-Rの発現が亢進すると肺炎球菌の上皮への接着性が増強し、これをPCで処理すると細菌の上皮への接着さらには細胞内侵入が抑制されます。すなわち、PCには二重の作用（dual action）があり、PCを含む含嗽薬やネブライザー用薬剤を開発できれば、PCに対する粘膜免疫応答の誘導と同時に、PC自体の作用によっても感染症の発症を阻止することが可能になるかもしれません。そこで、本宿題報告では「上気道炎症の粘膜ワクチンによる制御」と題して、粘膜免疫応答の誘導によって上気道細菌感染症そしてアレルギー性の炎症を抑制できるかをテーマに、多機能性と二重作用を持つPCを中心にまとめました。

宿題報告を担当させていただくことが決まり、これまで教室員とともに全力で取り組んできましたが、私が粘膜免疫の研究を始めた当初の疑問には未だ十分な答えを得ることはできておらず、本研究の成果が臨床応用されるとしても遠い未来の話かもしれません。ところが、WHOで薬剤耐性（AMR）に関するグローバル・アクションプランが採択され、米国FDAが家畜への抗菌薬の使用を廃止する指針を発表したことを受けて、家畜用ワクチンの開発が急務となっています。その候補の一つとして、PC粘膜ワクチンが米国のベンチャー企業の目に留まり、現在、その実用性を検討しています。また、PCの重合体であるリピジュアはコンタクトレンズ保存液の添加材としてすでに使用されており、実験用のPCの代わりに含嗽薬やネブライザー薬へ応用することが可能です。そこで、その特許を取得し、本年4月に臨床研究を開始しました。

小さな教室で行われたささやかな基礎研究ではありますが、我々の研究成果が、少しでも臨床に役立てば、望外の喜びです。

2018年5月吉日

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科  
耳鼻咽喉科・頭頸部外科学

黒野祐一

# 上気道炎症の 粘膜ワクチンによる制御

## 序文（黒野）

---

### 第Ⅰ章：粘膜免疫と粘膜ワクチン（黒野）

---

|                    |    |
|--------------------|----|
| 1. 粘膜免疫とは          | 2  |
| 1) 粘膜免疫による生体防御機構   | 2  |
| 2) 粘膜免疫応答の誘導機序     | 3  |
| 3) 分泌型 IgA の役割     | 6  |
| 2. 上気道感染症予防ワクチンの現状 | 11 |
| 1) 肺炎球菌ワクチン        | 11 |
| 2) インフルエンザ菌ワクチン    | 13 |
| 3. 粘膜ワクチンの現状       | 15 |
| 1) 経口ワクチン          | 15 |
| 2) 経鼻ワクチン          | 16 |
| 3) 舌下ワクチン          | 17 |
| 4) 経皮ワクチン          | 17 |

---

### 第Ⅱ章：ホスホリルコリン

---

|                           |    |
|---------------------------|----|
| 1. ホスホリルコリン（PC）とは（黒野）     | 22 |
| 1) PC の機能と役割              | 23 |
| 2) PC の宿主に対する作用           | 24 |
| 3) PC に対する宿主の反応           | 25 |
| 4) PC のワクチンとしての応用         | 26 |
| 2. ホスホリルコリンと疾患            | 30 |
| 1) 急性上気道感染症（黒野）           | 30 |
| 2) 滲出性中耳炎（平野）             | 37 |
| 3) IgA 腎症（黒野）             | 45 |
| 4) アレルギー性鼻炎（宮之原）          | 56 |
| 3. ホスホリルコリン重合体（リピジュア）（黒野） | 65 |
| 1) 眼科領域への応用               | 66 |
| 2) 口腔ケア用品への応用             | 66 |
| 3) 外用剤への応用                | 67 |

---

### 第Ⅲ章：経鼻免疫とワクチン

---

|                                     |     |
|-------------------------------------|-----|
| 1. 鼻咽腔関連リンパ組織（NALT）の発生とその特異性（福山）    | 70  |
| 2. 経鼻ワクチンによる免疫応答（田中）                | 79  |
| 3. 粘膜アジュバントによる PC 経鼻免疫応答の相違（地村）     | 87  |
| 4. 複合 DNA アジュバントを用いた長期経鼻免疫応答の誘導（福岩） | 95  |
| 5. 経鼻ワクチンの将来展望                      | 111 |
| 1) 新たな経鼻インフルエンザワクチン（大堀）             | 111 |
| 2) 高齢者に対する複合 DNA アジュバント経鼻ワクチン（川島）   | 116 |
| 3) ホスホリルコリン経鼻ワクチンによるブースター効果の誘導（大堀）  | 123 |

---

### 第Ⅳ章：舌下免疫とワクチン

---

|                                |     |
|--------------------------------|-----|
| 1. 舌下ワクチンと経鼻ワクチンによる免疫応答の比較（大堀） | 134 |
| 2. ホスホリルコリン舌下ワクチンによる免疫応答（牧瀬）   | 143 |

---

### 第Ⅴ章：経皮免疫とワクチン（永野）

---

|                          |     |
|--------------------------|-----|
| 1. 経皮免疫とは                | 152 |
| 2. PspA 経皮ワクチンによる免疫応答の誘導 | 155 |
| 3. PC 経皮ワクチンによる免疫応答の誘導   | 163 |

---

### 第Ⅵ章：粘膜ワクチンによるアレルギー性炎症の制御

---

|   |     |
|---|-----|
| 1. ホスホリルコリン経鼻ワクチンによるアレルギー性鼻炎の感作・発症の抑制（宮下） | 172 |
| 2. ホスホリルコリン舌下ワクチンによるアレルギー性鼻炎の感作・発症の抑制（牧瀬） | 182 |

---

### 第Ⅶ章：ホスホリルコリンとその重合体（リピジュア）による感染制御

---

|                             |     |
|-----------------------------|-----|
| 1. ホスホリルコリン（PC）による細菌感染の制御   | 190 |
| 1) PC による細菌接着・侵入の阻止（井内）     | 190 |
| 2) PC によるバイオフィーム形成の抑制（川島）   | 200 |
| 2. リピジュアによる細菌感染の制御          | 207 |
| 1) リピジュアによる細菌接着・侵入の阻止（井内）   | 207 |
| 2) リピジュアによるバイオフィーム形成の抑制（川島） | 217 |

|    |     |
|----|-----|
| 総括 | 222 |
|----|-----|

謝辞

研究費リスト

共同研究者・研究協力者・後援





# 第 I 章

# 粘膜免疫と粘膜ワクチン

## I-1 粘膜免疫とは

# I

### 1. 粘膜免疫とは

生体防御機構を司る免疫は全身免疫と粘膜免疫に分類され、かつては全身免疫が主たる働きをしていると考えられていた。ところが、粘膜免疫の研究が進むにつれて、粘膜免疫には全身免疫とは全く異なる機能と機構があり、全身免疫とともに生体の恒常性の維持に重要な役割を担っていることが明らかにされてきた。その事例の一つとして、粘膜免疫の場となる気道や消化管の総表面積は皮膚面の約200倍、テニスコートの1.5倍にも及び、そこには全身のリンパ球の6~7割が存在する<sup>1)</sup>。

そこで、粘膜免疫、とくに上気道における粘膜免疫の役割と誘導機序について概説してみたい。

#### 1) 粘膜免疫による生体防御機構

気道や消化管には、呼吸や食事に伴い絶え間なく外界の微生物やアレルゲンそして食物が入ってくる。これに対して生体は、微生物やアレルゲンの侵入を阻止する一方で、栄養素となる食物は体内へ積極的に吸収するという全く相反する反応をしている。

ウイルスや細菌などの微生物が体内へ侵入すると、血清中の抗体や免疫担当細胞がこれを攻撃する。しかし、気道へ侵入する多くの微生物は体内へ侵入することなく粘膜表面で分泌型IgAによってその侵入が阻止され、粘膜表層の粘液中に留まって常在菌叢となるか、粘液線毛輸送能によって粘膜面から排除される。このように、粘膜には微生物を攻撃することなく、共存あるいは排除するシステムが存在する。

一方、全免疫担当細胞の半数以上が存在するといわれる消化管では、生命を維持するために、食物抗原を異物であるにも関わらず積極的に体内に吸収している。しかし、粘膜面でこれを排除しようとする免疫反応は何ら生じない。これは食物が胃や小腸で消化され、抗原性を失うからではない。その証拠に、大量の牛乳や牛肉を摂取すれば、かなりの量のウシアルブミンや蛋白質が血液中に検出され、これを血液から分離して注射するとアナフィラキシー反応が起きる。すなわち、正常の状態では、食物抗原が消化管を通じて体内へ吸収される際に、こうしたアレルギー反応を抑制するシステムが作動していることが示唆される。気道粘膜でも同様の現象がみられ、ダニや花粉をアレルギー性鼻炎や喘息の患者が吸入するとアレルギー性の炎症が生じるが、健康人ではこれらの抗原に対するアレルギー反応が抑制されているため症状が起きない。これが免疫寛容という粘膜免疫応答のもう一つの重要なシステムである。したがって、粘膜面における微生物の排除や共存するシステムが障害されることで感染症が発症し、粘膜免疫寛容というシステムの障害によって

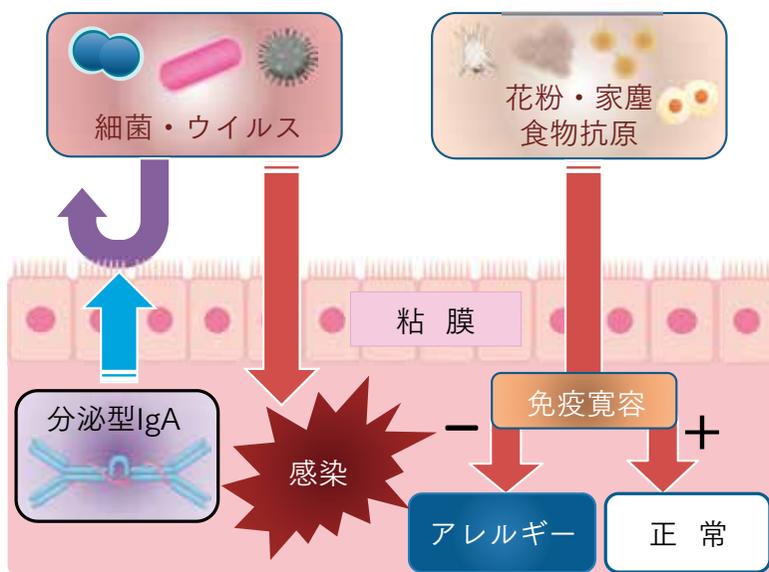


図1：粘膜免疫の役割

生体に弊害をもたらす微生物は分泌型 IgA などによって体内への侵入が阻止される。一方、食物は積極的に体内へ吸収され、生体に弊害をもたらさない花粉や家塵なども体内へ入るが、免疫寛容によってアレルギーの発症が抑制される。

アレルギーがもたらされると理解することができる。(図1)

このような粘膜免疫応答の2つのシステムは、多種多様な微生物やアレルゲンそして食物抗原の最初の侵入門戸となる上気道や口腔・咽頭ではとくに重要である。それゆえ、上気道は粘膜免疫応答に関わる抗体や免疫担当細胞が多数存在する扁桃などの二次リンパ組織を備え、病原菌やアレルゲンの侵入を阻止し、感染症やアレルギー反応から生体を防御するとともにその恒常性を維持している。したがって、この粘膜免疫応答を正常の状態に持っていくことが感染症やアレルギーの治療となり、粘膜免疫応答をさらに強化することで感染症やアレルギーの発症を予防できると考えられる。

## 2) 粘膜免疫応答の誘導機序

粘膜免疫応答は、抗原を経鼻、経口、経気管、舌下など経粘膜的に投与することによって誘導され、抗原を認識・処理する誘導組織と分泌型 IgA を産生する実効組織で構成される<sup>2)</sup>。誘導組織は抗原を積極的に体内へ取り込む役割を担い、所在する臓器によって若干の相違はあるが一定の共通性が認められ、そこにはリンパ球やマクロファージ、樹状細胞などの免疫担当細胞が集積し、粘膜関連リンパ組織 (mucosa-associated lymphoid tissue: MALT) と総称される<sup>1)</sup>。

上気道の MALT としては、マウスなどのげっ歯類では鼻腔底に鼻咽腔関連リンパ組織 (nasopharynx-associated lymphoid tissue: NALT) が存在することが明らかにされている。ヒトでは口蓋扁桃やアデノイド、舌扁桃がこれに相当すると考えられており、事実、

口蓋扁桃摘出術やアデノイド切除術を受けた小児では、経口ポリオワクチンを投与しても鼻咽腔液中の抗原特異的分泌型IgA抗体価が上昇しないことが報告されている<sup>3)</sup>。同様に、消化管には腸管関連リンパ組織 (gut-associated lymphoid tissue: GALT) としてパイエル板やクリプトパッチなどが存在し、下気道では、ヒトでその存在は証明されていないが、気管関連リンパ組織 (bronchus-associated lymphoid tissue: BALT) の働きによって抗原特異的IgA産生前駆細胞が誘導される。

このMALTで抗原に感作されたIgA産生前駆細胞は、すぐには抗原特異的IgAを産生することができない。そこで、IgA産生形質細胞へと成長するためMALTをいったん離れ、リンパ管を介して頸部リンパ節や腸間膜リンパ節、縦郭リンパ節を經由して胸管へと移行する。その後さらに血流を介して全身を循環したのちに、実効組織となる上・下気道や腸管、唾液腺や乳腺、泌尿・生殖器などの粘膜固有層にホーミングして形質細胞となる。そして、この形質細胞がJ鎖で連結された多量体IgAを産生し、これが漿液性腺上皮内でpolymeric immunoglobulin receptor (pIgR)の細胞外ドメインである分泌因子 (secretory component: SC) と結合して分泌型IgAとなり、外分泌液中に分泌される。(図2)

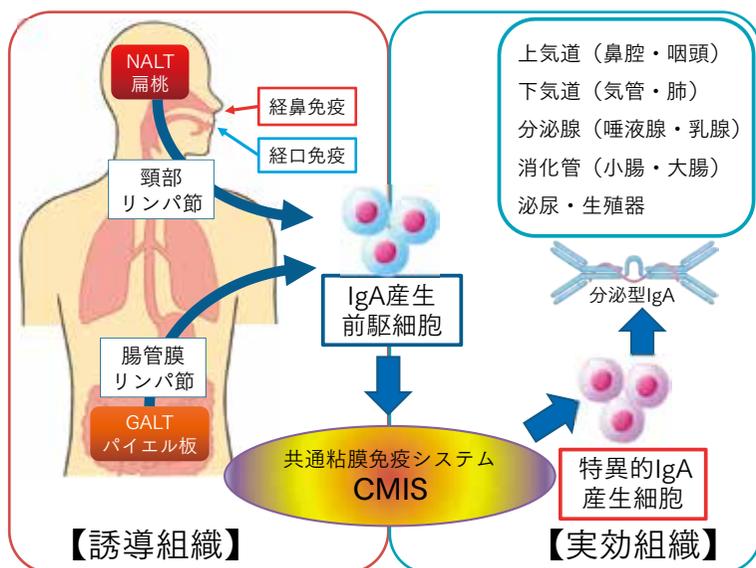


図2：粘膜免疫における誘導組織と実効組織

NALTやGALTで産生されたIgA産生前駆細胞は、CMISを經由して全身の実効組織にホーミングして形質細胞となり、分泌型IgAを産生する。

分泌型IgAは、MALTが存在しない口腔底粘膜や生殖器粘膜表面に抗原を舌下あるいは経腔投与しても誘導することができる。その際、IgA産生前駆細胞の誘導組織として働くのは隣接する所属リンパ節であり、粘膜直下に存在する樹状細胞が抗原の取り込みやリンパ球への提示を行う。そして、感作されたIgA産生前駆細胞は、MALTで誘導されたIgA産生前駆細胞と同様に胸管を経て全身の血流へと移行する<sup>4)</sup>。

こうした粘膜免疫が有するユニークなリンパ球の循環経路は共通粘膜免疫システム

(common mucosal immune system: CMIS) と呼ばれ、粘膜を介して抗原を投与すれば、その投与経路に関わらず、全身のすべての実効組織に一樣に粘膜免疫応答を誘導することができると考えられていた。ところが、その後の研究で、粘膜免疫応答には区域性 (compartmentalization) があり、抗原が認識された誘導組織に近接する実効組織により強い免疫応答が誘導されることが知られるようになってきた<sup>5)</sup>。そこで、そのことを確認するため、インフルエンザ菌外膜抗原をマウスに経鼻、経口、経気管、そして腹腔内投与し、血清および鼻腔洗浄液、唾液、糞便、気管支肺胞洗浄液の抗原特異的免疫グロブリン抗体価を測定した<sup>6)</sup>。その結果、血清の免疫グロブリン抗体価は何れの投与経路でもほぼ同等であったが、鼻腔洗浄液と唾液の抗原特異的 IgA 抗体価は経鼻免疫で、糞便の抗体価は経口免疫で、気管支肺胞洗浄液の抗体価は経気管免疫でもっとも高値であった。(図 3A)

さらに、鼻粘膜中の抗原特異的 IgA 産生細胞数は経鼻免疫で著しく増加し、腸管粘膜固有層のそれは経口免疫で、肺組織では経気管免疫によって最も増加した。(図 3B) これらの結果から、粘膜免疫応答には区域性があり、上気道に粘膜免疫応答を誘導するには経鼻免疫が他の投与経路よりも優れることが示された。

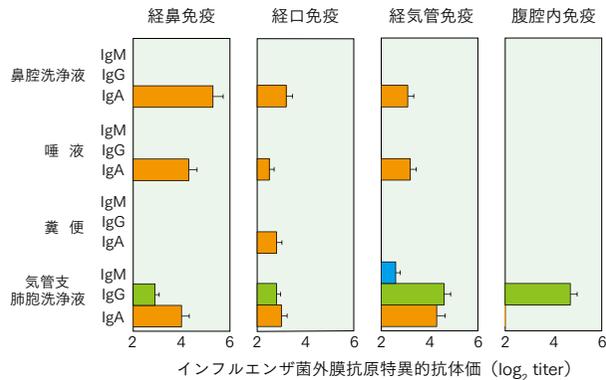


図 3A：抗原投与経路別の粘膜免疫応答

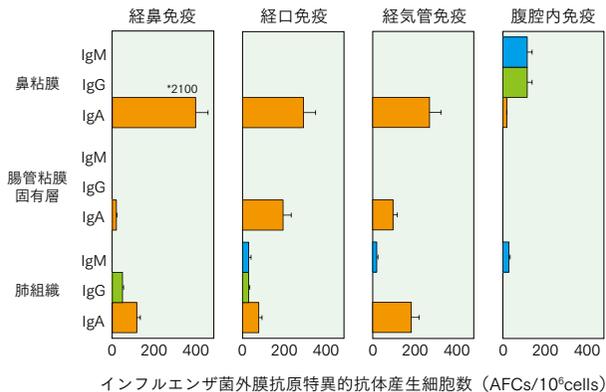


図 3B：抗原投与経路別の粘膜免疫応答

### 3) 分泌型 IgA の役割

粘膜免疫の主役となるのが分泌型 IgA で、粘膜下に局在する形質細胞で産生され、鼻汁や唾液、消化管分泌液などの外分泌液中に豊富に含まれるが、血液中には存在しない。血液中の血清型 IgA は主として骨髄や脾臓の形質細胞に由来し、分泌型 IgA とは全く異なる系で産生される。成人におけるこれらの IgA の産生量は約 66mg/kg/日で、IgG (34mg/kg/日) や IgM (7.9mg/kg/日) よりはるかに多く、この IgA の 2/3 以上が分泌型 IgA となって外分泌液中に分泌される<sup>7,8)</sup>。(図 4)

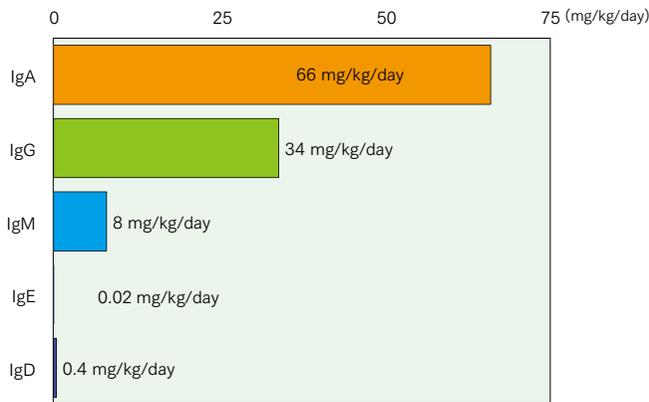


図 4：ヒト成人における免疫グロブリンの1日産生量

IgA 系免疫グロブリンは免疫グロブリンの中で最も多く産生され、その 2/3 以上が分泌型 IgA となって、鼻汁や唾液、消化管分泌液中に分泌される。

分泌型 IgA は単量体である血清型 IgA とは異なり、IgA 分子が形質細胞で産生される J 鎖と連結した 2 量体もしくは多量体 IgA から成る。そして、2 量体あるいは多量体 IgA は漿液性腺上皮内で産生される糖蛋白質である SC と結合して分泌型 IgA となり、外分泌液中に分泌される。(図 5) この SC は前述したように pIgR の細胞外ドメインと同一であり、粘膜や細菌との結合に重要な役割を担い、分泌型 IgA の交差反応性に関与する。

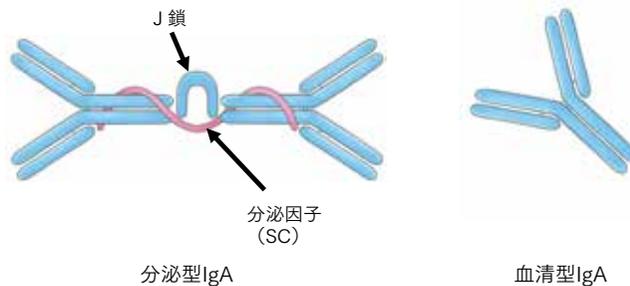


図 5：分泌型 IgA と血清型 IgA の違い

分泌型 IgA は 2 量体で J 鎖と分泌因子 (secretory component: SC) を持つ。

表1：各免疫グロブリンの作用

|         | IgA | IgG | IgM | IgE |
|---------|-----|-----|-----|-----|
| 凝集反応    | ○   | ○   | ○   | ×   |
| 中和反応    | ○   | ○   | ○   | ×   |
| 溶菌反応    | ×   | ○   | ○   | ×   |
| オプソニン作用 | ×   | ○   | ○   | ×   |
| 補体活性作用  | ×   | ○   | ○   | ×   |
| アレルギー反応 | ×   | ○   | ○   | ○   |

分泌型 IgA は IgG や IgM のような溶菌作用やオプソニン作用、補体活性作用を持たないため、ウイルスや細菌を直接破壊することはできない。(表1)しかし、分泌型 IgA は凝集作用や中和作用によってこれらの微生物を排除し、唾液腺分泌液中の分泌型 IgA は口腔内細菌の表面にある接着因子などと結合して上皮細胞との接着を阻止することが知られている<sup>9)</sup>。上気道の粘膜面においても分泌型 IgA は細菌の上皮への接着を阻止し、肺炎球菌やインフルエンザ菌に対して抗体活性がある分泌型 IgA を含む鼻咽腔分泌液は、両細菌の鼻咽腔上皮への接着を有意に抑制する<sup>10)</sup>。(図6)さらに、この作用は鼻咽腔分泌液中の IgG を除去しても変化がなく、上皮への細菌接着の抑制に IgG の関与はなく、分泌型 IgA によってもたらされると考えられる。

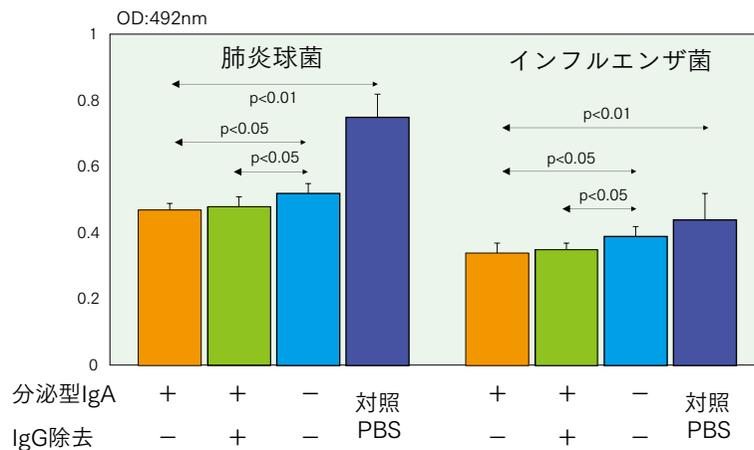


図6：鼻咽腔分泌液による細菌接着の抑制

これらの結果から、肺炎球菌やインフルエンザ菌に対して抗体活性を持つ分泌型 IgA をより多く上気道に誘導できれば、それによってこれらの細菌の上気道粘膜への接着を阻止し感染を予防できると推測される。そこで、ホルマリン処理したインフルエンザ菌をリポゾーム化しアジュバントとして GM-53 とともに 14 日間マウスに経口投与し、そのマウスから採取された唾液によるインフルエンザ菌の接着阻止効果を観察した<sup>11)</sup>。その結果、経口免疫群では全身免疫群よりも有意に多くのインフルエンザ菌特異的 IgA が唾液中に

検出され、その唾液はインフルエンザ菌に対して強い凝集作用があり、上皮への接着を抑制した。(図7)

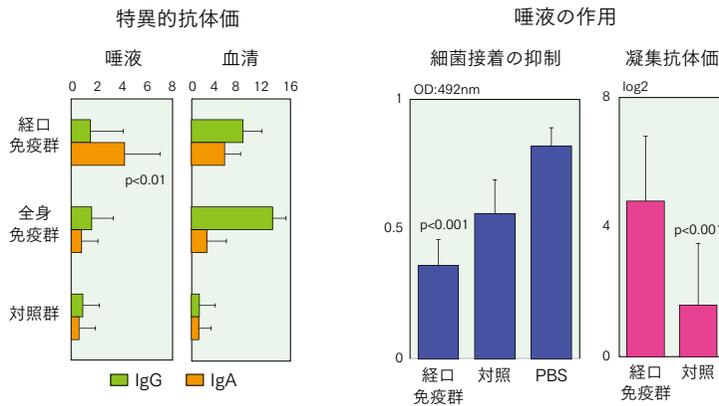


図7：インフルエンザ菌経口/全身免疫による免疫応答と免疫後に採取した唾液の作用

さらに、より高濃度の抗原に対する免疫応答を観察するため、インフルエンザ菌外膜蛋白 (OMPs) を抽出し、これを先の実験と同様に GM-53 とともに 14 日間マウスに経口投与した。すると、腸管粘膜とともに鼻粘膜にも OMPs 特異的 IgA 産生細胞が誘導され、鼻腔洗浄液中の OMPs 特異的 IgA 抗体価も上昇した<sup>12)</sup>。そこで、経口免疫終了後に鼻腔内へインフルエンザ生菌を接種し、12 時間後の鼻腔洗浄液中の細菌数と OMPs 特異的 IgA 抗体価とを比較すると、両者には有意な負の相関が認められた。(図8) すなわち、鼻腔で産生される OMPs 特異的 IgA によって鼻粘膜へのインフルエンザ菌の接着が阻止され、細菌のクリアランスが亢進したと考えられた。

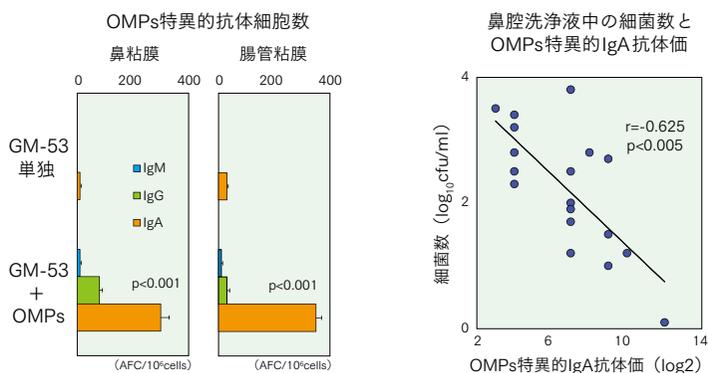


図8：インフルエンザ菌外膜蛋白 (OMPs) 経口免疫による免疫応答と鼻腔細菌クリアランスへの作用

細菌に対する粘膜免疫応答は上気道の免疫組織であるヒト扁桃内の細菌叢にも影響を及ぼす。たとえば、口蓋扁桃には化膿連鎖球菌の M 蛋白特異的 IgA 産生細胞が存在し、慢性扁桃炎の口蓋扁桃には扁桃肥大の口蓋扁桃よりもこの細胞が多く認められる<sup>13)</sup>。しかし、

扁桃組織から化膿連鎖球菌が検出される群と検出されない群とで比較すると、細菌が検出されない慢性扁桃炎で有意に M 蛋白特異的 IgA 産生細胞が多い。(図 9)

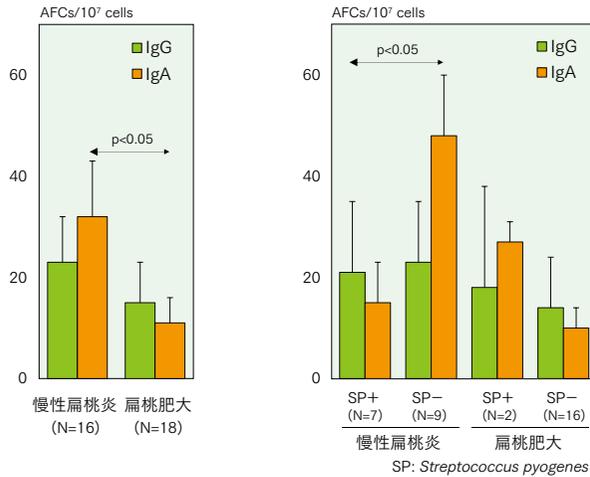


図 9：口蓋扁桃における化膿連鎖球菌と M 蛋白特異的免疫グロブリン産生細胞数

M 蛋白特異的 IgA 産生細胞 (AFC) 数は慢性扁桃炎で増加し、化膿連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes* : SP) が扁桃から検出されなかった群 (SP-) では検出された群 (SP+) より多い。

同様に、アデノイド組織内にもインフルエンザ菌外膜蛋白 P6 に対する特異的 IgA 産生細胞が存在し、インフルエンザ菌が検出されないアデノイドではこれが検出されるものより有意に多くの P6 特異的 IgA 産生細胞が認められる<sup>14)</sup>。また、鼻咽腔にインフルエンザ菌が検出されない群では、これが検出される群よりも鼻咽腔液中の P6 特異的 IgA 抗体価が有意に高い。さらに、アデノイド組織内の P6 特異的 IgA 産生細胞数と鼻咽腔液中の P6 特異的 IgA 抗体価は有意な正の相関を示す。(図 10) すなわち、扁桃組織において誘導される粘膜免疫応答が、上気道粘膜や扁桃組織内の細菌叢を制御していると推測される。

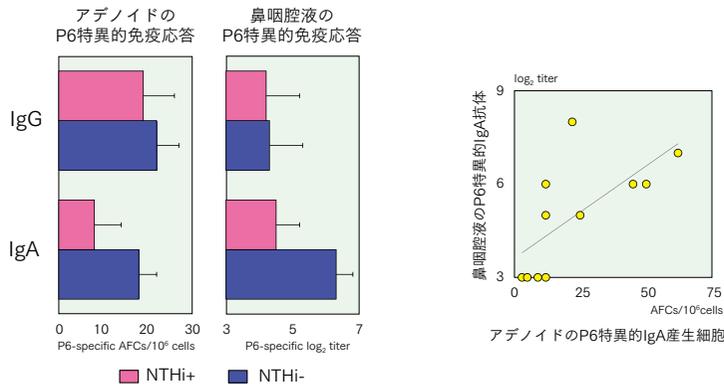


図 10：アデノイド、鼻咽腔液におけるインフルエンザ菌の存在と P6 特異的免疫応答

アデノイドおよび鼻咽腔液からインフルエンザ菌が検出されない群では、P6 特異的 IgA 産生細胞数ならびに P6 特異的抗体価が高く、両者には正の相関がある。

以上の成績から、上気道の粘膜免疫応答の誘導によって産生される分泌型 IgA は、上気道粘膜への細菌の接着さらには組織内への侵入を阻止し、感染の発症を防止していると考えられる。

#### 参考文献

- 1) 清野 宏, 岡田和也. 粘膜免疫システム—生体防御の最前線. 日耳鼻 2011;114: 843-850.
- 2) McGhee JR, Mestecky J, Elson CO, et al. Regulation of IgA synthesis and immune response by T cells and interleukins. J Clin Immunol 1989;9:175-199.
- 3) Ogra PL. See comment in PubMed Commons below Effect of tonsillectomy and adenoidectomy on nasopharyngeal antibody response to poliovirus. N Engl J Med 1971;284:59-64.
- 4) Iwasaki A. Mucosal dendritic cells. Annu Rev Immunol 2007;25:381-418.
- 5) Moldoveanu Z, Russell MW, Wu HY, et al. Compartmentalization within the common mucosal immune system. Adv Exp Med Biol 1995;371:97-101.
- 6) Kurono Y, Yamamoto M, Fujihashi K, et al. Nasal immunization induces *Haemophilus influenzae*-specific Th1 and Th2 responses with mucosal IgA and systemic IgG antibodies for protective immunity. J Infect Dis 1999;180:122-132.
- 7) Mestecky J, Leu C, Tarkowski A, et al. Comparative studies of the biological properties of human IgA subclasses. Protides Biol Fluids 1989;36:173-182.
- 8) 小林邦彦. SIgA と粘膜免疫. 免疫薬理 1993;11:253-258.
- 9) Williams RC, Gibbons RJ. Inhibition of bacterial adherence by secretory immunoglobulin A: a mechanism of antigen disposal. Science 1972;177:697-699.
- 10) Kurono Y, Shimamura K, Shigemi H, et al. Inhibition of bacterial adherence by nasopharyngeal secretions. Ann Otol Rhinol Laryngol 1991;100:455-458.
- 11) Kurono Y, Shigemi H, Kodama S, et al. Effects of oral and systemic immunization on nasopharyngeal clearance of nontypeable *Haemophilus influenzae* in BALB/c mice. Laryngoscope 1996;106:614-618.
- 12) Suzuki M, Kurono Y, Kodama S, et al. Enhancement of nasal clearance of nontypeable *Haemophilus influenzae* by oral immunization with outer membrane proteins. Acta Otolaryngol 1998;118:864-869.
- 13) Kerakawauchi H, Kurono Y, Mogi G. Immune responses against *Streptococcus pyogenes* in human palatine tonsils. Laryngoscope 1997;107:634-639.
- 14) Sakamoto N, Kurono Y, Suzuki M, et al. Immune responses of adenoidal lymphocytes specific to *Haemophilus influenzae* in the nasopharynx. Laryngoscope 1998;108:1036-1041.

## 2. 上気道感染症予防ワクチンの現状

現在、上気道感染症予防を目的として本邦で使用されているワクチンは、急性喉頭蓋炎に対するb型インフルエンザ菌ワクチンのみである。海外では肺炎球菌ワクチンが急性中耳炎の予防に用いられているが、本邦では侵襲性肺炎球菌感染症のみが適応で、急性中耳炎は対象とされていない。このインフルエンザ菌や肺炎球菌は上気道感染症の主要な病原菌であり、細菌が粘膜上皮表面へ接着し、組織内さらには流血中へ侵入することによって発症する。そのため、これを予防するワクチンには病原菌の表面抗原が含まれることが必須となる。菌体内にある抗原では、たとえ特異抗体が誘導されても病原菌に直接作用することができない。また、たとえ細菌表面にある抗原であっても、phase variationによってそれが消失することがあり、これもワクチンの開発において留意しなければならない。また、急性中耳炎が好発する2歳以下の乳幼児は、肺炎球菌やインフルエンザ菌の莢膜を構成する多糖体を認識するIgG2抗体の産生機能が未熟なため、より免疫原性が強く、IgG2抗体の産生を活性化させる工夫が必要となる。すでに臨床で用いられているワクチン、そして現在開発中の代表的な肺炎球菌およびインフルエンザ菌に対するワクチンを表1に示す。

表1：急性中耳炎予防ワクチンの開発状況

|          | 抗原    | ワクチン           | 臨床研究 |
|----------|-------|----------------|------|
| 肺炎球菌     | 莢膜多糖体 | PCV7, PCV13    | 市販化  |
|          |       | Synflorix      | 市販化  |
|          | 表面蛋白  | PspA           | 第I相  |
| インフルエンザ菌 | 表面蛋白  | P6             | 第I相  |
|          | 脂質多糖体 | dLOS           | 第I相  |
|          | 接着因子  | HMW, Hap, pili | なし   |

### 1) 肺炎球菌ワクチン

#### ① 23価肺炎球菌ワクチン

65歳以上の高齢者や脾臓摘出者などのハイリスク患者における肺炎球菌感染症（侵襲性感染症と肺炎）の予防目的で、23価の莢膜多糖体多価ワクチン（ニューモバックス<sup>®</sup> NP）が1988年に本邦でも承認され、そのすぐれた有効性が確認されている。しかし、莢膜多糖体それ自体は免疫原性が弱く、T細胞非依存性であるため免疫学的記憶が誘導され

ない。また、莢膜多糖体に対する免疫反応が未熟な乳幼児にこのワクチンを用いても十分な効果は得られない。

## ② 蛋白結合型肺炎球菌ワクチン

蛋白結合型肺炎球菌ワクチンとして、非病原性ジフテリア蛋白を肺炎球菌4、6B、9V、14、18C、19F、23F型の7種の莢膜多糖体と結合させた7価肺炎球菌結合型ワクチン(PCV7：プレベナー7<sup>®</sup>)が本邦でも2010年2月に上市され、侵襲性肺炎球菌感染症の予防を目的として2013年4月から定期接種化された。さらに、2013年11月に1、3、5、6A、7F、19A型の6種を追加した13価のPCV13（プレベナー13<sup>®</sup>）へと変更され、2014年6月には65歳以上の高齢者にも適応が拡大された。PCV13も急性中耳炎は適応となっていないが、本邦における小児急性中耳炎患者から分離される肺炎球菌のカバー率は、PCV7の62.9%から84.2%に上昇すると推定されている<sup>1)</sup>。

その他にも、無莢膜型インフルエンザ菌由来プロテインDを結合させた10価の肺炎球菌ワクチンとして、シンフロリックス<sup>®</sup>がある。肺炎球菌による急性中耳炎のカバー率は63.9%とそれほど高くはないが、急性中耳炎の起炎菌となる無莢膜型インフルエンザ菌に対する予防効果が期待され、本邦でも2015年3月にその製造販売が承認されたが、定期接種化については見送られた。

肺炎球菌ワクチンの予防効果については、米国とフィンランドでPCV7に関する大規模臨床研究が行われ、敗血症や肺炎などの侵襲性肺炎球菌感染症に対するすぐれた成績が実証されている<sup>2,3)</sup>。本邦でも、PCV7導入後に1歳児の急性中耳炎に対する鼓膜切開の頻度が著しく減少したことが報告されている<sup>4)</sup>。しかし、実際の急性中耳炎の発症予防効果は6~8%と極めて低い<sup>1-3)</sup>。(表2)非ワクチン株や無莢膜型インフルエンザ菌による急性中耳炎の増加がその原因と考えられている。さらに、ワクチン接種による血清型置換(serotype replacement)も問題点として指摘されている。そこで、注目されているのが、肺炎球菌に共通する表面蛋白抗原である。

表2：PCV7の急性中耳炎に対する効果

| 臨床研究       | Black S, et al. <sup>2)</sup><br>(USA) | Eskola J, et al. <sup>3)</sup><br>(フィンランド) |
|------------|--|--|
| 期 間        | 1995-1998                              | 1995-1999                                  |
| 症例数        | 37,868                                 | 1,662                                      |
| 年 齢        | 2-30ヶ月                                 | 6-24ヶ月                                     |
| 急性中耳炎の予防効果 | 5.8%                                   | 6%   |
| ワクチン株の予防効果 | 67%                                    | 57%  |

## ③ 肺炎球菌表面蛋白抗原ワクチン

肺炎球菌の病原性に関わる表面蛋白抗原には、pneumococcal surface protein A (PspA)、pneumococcal surface adhesion A (PsaA)、pneumococcal surface protein C

(PspC) などがある。これらの蛋白抗原のうち PspA は急性中耳炎に対する直接的な予防効果が確認されており、PspA でラットを全身免疫することで有意に肺炎球菌 6A の中耳腔内接種による急性中耳炎の発症が抑制された<sup>5)</sup>。さらに、リコンビナント PspA を用いた第1相臨床試験がすでに行われ、ヒトにおいても PspA が免疫原性を持つことが実証されている<sup>6)</sup>。

## 2) インフルエンザ菌ワクチン

インフルエンザ菌ワクチンとしては、前述したように、すでに本邦でも b 型インフルエンザ菌莢膜多糖体ワクチンが定期接種化されている。しかし、急性中耳炎の起炎菌となるインフルエンザ菌は莢膜を持たないため、このワクチンは急性中耳炎には無効である。そこで、外膜蛋白や lipooligosaccharide (LOS) がインフルエンザ菌による急性中耳炎に対するワクチンとして有望視されている。

### ① インフルエンザ菌外膜蛋白

インフルエンザ菌の外膜蛋白である P4、P5、P6、OMP26 はほとんどのインフルエンザ菌に存在し、鼻咽腔の細菌接着に関与することが動物実験で証明されており、ワクチンとしての応用が期待されている。なかでも P6 は、その免疫応答について詳細な研究がなされており、これをワクチンとして用いることで鼻咽腔のみならず中耳腔におけるインフルエンザ菌クリアランスが亢進することが知られている。たとえば、Kodama ら<sup>7)</sup> は、P6 をコレラトキシン (CT) とともにマウスに経鼻投与すると IgA 系の粘膜免疫そして IgG 系の全身免疫応答が誘導されると報告している。さらに、Sabirov ら<sup>8)</sup> は、P6 で経鼻免疫を行ったマウスは対照群と比較して中耳腔に注入されたインフルエンザ菌数が有意に減少し、中耳貯留液中の TNF- $\alpha$  値も低値となることを証明している。

### ② LOS

LOS はインフルエンザ菌の病原性に関わる因子のひとつであり、多くのインフルエンザ菌に共通な抗原性を有している。しかし、毒性が強すぎるため、これを無毒化した dLOS が開発された。そして、その効果を増強させるため dLOS と破傷風菌毒素と結合させたワクチン (dLOS-TT) が製造され、健常成人を対象とした第1相臨床試験では、ワクチン接種後にすべての被験者で LOS 特異的 IgG 抗体が有意に上昇したことが報告されている<sup>9)</sup>。

その他にも、インフルエンザ菌外膜の高分子量抗原や Hap、pili など動物実験では優れた予防効果が示され、ワクチンの候補に挙がっている。しかし、まだいずれも臨床研究には至っていない。

## 参考文献

- 1) 保富宗城、山中 昇. 肺炎球菌ワクチン、インフルエンザ菌ワクチンの現状. JOHNS 2008;24:25-30.
- 2) Black S, Shinefield H, Fireman B, et al. Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. Northern California Kaiser Permanente Vaccine Study Center Group. *Pediatr Infect Dis J* 2000;19:187-195.
- 3) Eskola J, Kilpi T, Palmu A, et al. Efficacy of a pneumococcal conjugate vaccine against acute otitis media. *N Engl J Med* 2001;344:403-409.
- 4) Sugino H, Tsumura S, Kunimoto M, et al. Influence of Pneumococcal Conjugate Vaccine on Acute Otitis Media with Severe Middle Ear Inflammation: A Retrospective Multicenter Study. *PLoS One*. 2015;10:e0137546.doi:10.1371/journal.pone.0137546.
- 5) White P, Hermansson A, Svanborg C, et al. Effects of active immunization with a pneumococcal surface protein (PspA) and of locally applied antibodies in experimental otitis media. *ORL* 1999;61:206-211.
- 6) Briles DE, Hollingshead SK, King J, et al. Immunization of humans with recombinant pneumococcal surface protein A (rPspA) elicits antibodies that passively protect mice from fatal infection with *Streptococcus pneumoniae* bearing heterologous PspA. *J Infect Dis* 2000;182:1694-1701.
- 7) Kodama S, Suenaga S, Hirano T, et al. Induction of specific immunoglobulin A and Th2 immune responses to P6 outer membrane protein of nontypeable *Haemophilus influenzae* in middle ear mucosa by intranasal immunization. *Infect Immun* 2000;68:2294-2300.
- 8) Sabirov A, Kodama S, Hirano T, et al. Intranasal immunization enhances clearance of nontypeable *Haemophilus influenzae* and reduces stimulation of tumor necrosis factor alpha production in the murine model of otitis media. *Infect Immun* 2001;69:2964-2971.
- 9) Gu XX, Rudy SF, Chu C, et al. Phase I study of a lipooligosaccharide-based conjugate vaccine against nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Vaccine* 2003;21:2107-2114.

## I-3 粘膜ワクチンの現状

### 3. 粘膜ワクチンの現状

現行のワクチンのほとんどは皮下もしくは筋肉内へ注射によって投与され、全身免疫を誘導することで予防効果が発揮される。しかし、粘膜免疫を誘導することができないため、肺炎球菌やインフルエンザ菌など上気道細菌感染症の起炎菌そしてインフルエンザウイルスなど、粘膜面から侵入する微生物をその入口で防御することができない。したがって、注射によるワクチンでは、たとえ感染が顕性化しなくても、生体内では何らかの炎症反応が生じ、ときに病原微生物のキャリアとなる可能性がある。一方、粘膜ワクチンは粘膜免疫と全身免疫を誘導し、病原微生物の粘膜面からの侵入と生体内での感染の発症をともに予防できる。

粘膜ワクチンは投与経路によって、経口、経鼻、舌下、さらに経皮ワクチンに分類され、すでに経口ポリオワクチンや経口コレラワクチン、経鼻インフルエンザワクチンが市販され実地臨床で用いられている。これ以外にも臨床試験が行われているワクチンがあり、本稿ではそれらを紹介し、粘膜ワクチンの現状について述べてみたい。

#### 1) 経口ワクチン

すでに上市されている経口ワクチンとして、Sabin 博士によって開発された弱毒経口ポリオワクチン、不活化コレラワクチン (Dukoral<sup>®</sup>)、弱毒腸チフスワクチン (Vivotif<sup>®</sup>)、弱毒ロタウイルスワクチン (Rotarix<sup>®</sup>) などがある。(表 1) これらの経口ワクチンは開発途上国で広く使用され、優れた予防効果が確認されている。しかし、例えば弱毒経口ポリオワクチンは極めて稀ではあるがワクチン株による麻痺性ポリオを発症することが報告され<sup>1)</sup>、そのため多くの先進国では注射型の不活化ポリオワクチンが使用されている。2000年にポリオ根絶を WHO に報告した本邦でも、2012年からポリオの定期接種は経口ワクチンからこの注射型不活化ワクチンに切り替えられている。

表 1：市販化された経口ワクチン

| 病原微生物  | ワクチン             | 商品名                  |
|--------|------------------|----------------------|
| ポリオ    | 弱毒ポリオワクチン        | OPV                  |
| コレラ    | 不活化コレラワクチン       | Dukoral <sup>®</sup> |
|        | 弱毒コレラワクチン        | Orochol <sup>®</sup> |
| ロタウイルス | 弱毒 1 価ロタウイルスワクチン | Rotarix <sup>®</sup> |
|        | 弱毒 5 価ロタウイルスワクチン | RotaTeq <sup>®</sup> |

不活化経口ワクチンは安全性に優れるが、経口など経粘膜投与で感染予防に有効な免疫応答を誘導するには、何らかの粘膜アジュバントを加えることが必須となる。そのため、コレラに対する不活化ワクチンである Dukoral<sup>®</sup> では、無毒のコレラ毒素受容体結合ドメインである B サブユニット (CTB) がアジュバントに用いられている<sup>2)</sup>。今後、経口ワクチンを普及させるには、それぞれのワクチンに適した粘膜アジュバントの開発が必要となる。

## 2) 経鼻ワクチン

インフルエンザに対する経鼻ワクチンとして、2003年に3価の低温馴化弱毒生ワクチン (FluMist<sup>®</sup>) が米国で市販化され、現在は4価となり、本邦への導入も計画されている。(図1) このワクチンの奏効率は単回投与で89%、2回投与では94%と従来の注射によるワクチンよりもはるかに高く<sup>3)</sup>、交差反応性を持つ分泌型 IgA を誘導できるためワクチン株以外にも予防効果があることが報告されている<sup>4)</sup>。また、インフルエンザに続発し抗菌薬投与を必要とする上下気道細菌感染症の発症をプラセボと比較して29%減少させ、急性中耳炎の発症も33%抑制するなど、インフルエンザのみならず上下気道の細菌感染症に対する予防効果も期待されている<sup>3,4)</sup>。しかし、遺伝子組み換え生ワクチンであるため突然変異などの安全性が危惧され、適応は2歳から49歳となっている。



図1：経鼻インフルエンザワクチン (FluMist<sup>®</sup>)

FluMist<sup>®</sup> と同時期に、スイスで不活化インフルエンザ経鼻ワクチンである Nasalflu<sup>®</sup> が市販化された。ところが、このワクチンの接種によって高頻度にベル麻痺が発症したため、その製造が中止された<sup>5)</sup>。ワクチンに含まれていた大腸菌由来のアジュバントが嗅粘膜を介して中枢に吸収されたことが原因とされ、アジュバントならびにワクチンの経鼻投与の安全性が一層問題視されるようになった。そこで、現在、中枢への移行がないアジュバン

トおよび中枢の障害がない不活化ワクチンや VLP (virus-like particles) ワクチンが開発され、その臨床研究がすすめられている。

### 3) 舌下ワクチン

抗原の舌下投与による免疫療法は、アレルギー性鼻炎や花粉症の治療としてすでに臨床で用いられている。口腔底粘膜下には特有の樹状細胞が存在し、Type II 粘膜を介した粘膜免疫応答が誘導される<sup>6)</sup>。これを応用して、インフルエンザやヒトパピローマウイルス (HPV) ワクチンの研究がすすめられている。

Song ら<sup>7)</sup>は、生インフルエンザウイルス (A/PR/8) あるいはホルマリンで不活化した同インフルエンザウイルスを粘膜アジュバント (mCTA/LTB) とともにマウスに舌下投与し、その効果を観察している。それによると、いずれのワクチンでもインフルエンザウイルスに対する粘膜ならびに全身免疫応答が誘導され、インフルエンザウイルス呼吸器感染による死亡が予防されている。さらに生インフルエンザウイルスの舌下免疫では、そのウイルスとは異なるインフルエンザウイルスに対しても、感染予防に十分な交差免疫が得られている。また、舌下投与されたウイルスの中核そして下気道への移行は全く見られず、経鼻ワクチンで懸念される中枢障害やワクチン株による下気道感染発症の危険性がないことも実証している。こうした背景をもとに、本邦でも 2016 年 10 月からインフルエンザ HA ワクチン舌下錠の第 I 相臨床試験が開始されている<sup>8)</sup>。

HPV 感染に対する舌下ワクチンの研究として、Cuburu らは<sup>9)</sup>、HPV16 様の粒子 (VLP) を舌下および筋肉内投与し、それぞれの免疫応答を比較している。その結果、HPV16-VLP 単独の舌下投与でも、コレラトキシンをアジュバントとして用いたときより若干低いものの、筋肉内投与とほぼ同等の血清および膣洗浄機液中の HPV16 ウイルス特異的中和抗体活性が得られ、それによって HPV16 ウイルス感染が防御されている。最近、本邦でも注射による HPV ワクチンの副反応が問題視されており<sup>10)</sup>、安全性が高い舌下 HPV ワクチンの早急な開発が期待される。

このように舌下ワクチンは経鼻ワクチンよりも安全で、経鼻ワクチンと同等の免疫応答を誘導できる。しかし、舌下ワクチンでは口腔内に一定の時間ワクチンを保持することが必要なため、これが困難な乳幼児へは使用できない。そこで、最近注目されているのが経皮ワクチンである。

### 4) 経皮ワクチン

皮膚も粘膜と同様に生体を守る重要なバリアーであるとともに免疫防御機能を有し、抗原を注射ではなく皮膚表面に塗布することで全身免疫と粘膜免疫の両者を誘導できることが明らかにされ、新たなワクチンの投与経路として注目されている<sup>11)</sup>。たとえば、Novotny ら<sup>12,13)</sup>は、無莢膜インフルエンザ菌 (NTHi) の外膜蛋白をアジュバントとともにチンチラの耳介に塗布すると、血清および中耳貯留液中に抗原特異的免疫応答が誘導さ

れ、中耳あるいは鼻腔に接種したNTHiのクリアランスが有意に増強されることを報告している。さらに、NTHiによる中耳炎モデル作成後にこの経皮ワクチンを投与すると、バイオフィルムの消失とともに中耳炎が早期に改善したことから、このワクチンが中耳炎の予防のみならず治療としても有効であると述べている。

しかし、経皮ワクチンは皮膚の角質層が抗原の吸収を妨げるため、その免疫応答が他の粘膜ワクチンと比較して弱く、その効果を高める方法としてマイクロニードルや皮膚パッチの応用が検討されている<sup>13-16)</sup>。マイクロニードルに関しては、Peartonら<sup>14)</sup>が、インフルエンザウイルス抗原でコーティングしたマイクロニードルを用いることで、皮膚の抗原認識細胞であるランゲルハンス細胞がより活性化することを証明している。また、Matsuoら<sup>15)</sup>は可溶性のマイクロニードルを開発し、これによって破傷風やジフテリア、インフルエンザウイルスに対する非常に強力な免疫応答が誘導され、安全性も高く、臨床応用が可能であると述べている。皮膚パッチを用いた経皮ワクチンについてはすでに第Ⅱ相臨床試験が実施され、大腸菌感染に対する有効性が検討されている<sup>16)</sup>。この臨床試験では、メキシコもしくはグアテマラへの旅行者178名を対象として大腸菌の易熱性エンテロトキシンもしくはプラセボを皮膚パッチに含ませ経皮投与し、旅行中の大腸菌感染による下痢の発症頻度を比較している。その結果、実薬群ではプラセボ群と比較して有意に下痢の発症頻度と重症度が低く、罹病期間も短く、このワクチンが有効であると報告している。

経皮ワクチンでは免疫応答の誘導に経鼻や舌下ワクチンより多くの抗原が必要となるが、経口ワクチンよりも少なく、経鼻ワクチンのような中枢障害がなく、舌下ワクチンよりも投与方法が容易で乳幼児にも使用が可能であるなど、様々な利点がある。今後、皮膚への吸収を促進するより優れたデバイスやアジュバントが開発されれば、臨床への応用がさらに広がると予想される。

#### 参考文献

- 1) Prevots DR, Sutter RW, Strebel PM, et al. Completeness of reporting for paralytic poliomyelitis, United States, 1980 through 1991. Implications for estimating the risk of vaccine-associated disease. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1994;148:479-485.
- 2) Hill DR, Ford L, Laloo DG. Oral cholera vaccines: use in clinical practice. *Lancet Infect Dis* 2006;6:361-373.
- 3) Belshe RB, Mendelman PM, Treanor J, et al. The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine in children. *N Engl J Med* 1998;338:1405-1412.
- 4) Belshe RB. Current status of live attenuated influenza virus vaccine in the US. *Virus Res* 103:177-185,2004.
- 5) Mutsch M, Zhou W, Rhodes P, et al. Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland. *N Engl J Med* 2004;350:896-903.
- 6) Iwasaki A. Mucosal dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2007;25:381-418.
- 7) Song JH, Nguyen HH, Cuburu N, et al. Sublingual vaccination with influenza virus protects mice against lethal viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:1644-1649.
- 8) <http://www.nitto.com/jp/ja/press/2016/1102.jsp>

- 9) Cuburu N, Kweon MN, Hervouet C, et al. Sublingual immunization with nonreplicating antigens induces antibody-forming cells and cytotoxic T cells in the female genital tract mucosa and protects against genital papillomavirus infection. *J Immunol* 2009;183:7851-7859.
- 10) 宮城 悦子, 今野 良, 井篁 一彦. HPV ワクチン接種後の有害事象とその対策. *医学のあゆみ* 2015;258:159-163.
- 11) Lawson LB, Clements JD, Freytag LC. Mucosal immune responses induced by transcutaneous vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol* 2012;354:19-37.
- 12) Novotny LA, Clements JD, Bakaletz LO. Transcutaneous immunization as preventative and therapeutic regimens to protect against experimental otitis media due to nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Mucosal Immunol* 2011;4:456-467.
- 13) Novotny LA, Clements JD, Bakaletz LO. Therapeutic Transcutaneous Immunization with a Band-Aid Vaccine Resolves Experimental Otitis Media. *Clin Vaccine Immunol* 2015;22:867-874.
- 14) Pearton M, Kang SM, Song JM, et al. Influenza virus-like particles coated onto microneedles can elicit stimulatory effects on Langerhans cells in human skin. *Vaccine* 2010;28:6104-6113.
- 15) Matsuo K, Hirobe S, Yokota Y, et al. Transcutaneous immunization using a dissolving microneedle array protects against tetanus, diphtheria, malaria, and influenza. *J Control Release* 2012;160:495-501.
- 16) Frech SA, Dupont HL, Bourgeois AL, et al. Use of a patch containing heat-labile toxin from *Escherichia coli* against travellers' diarrhoea: a phase II, randomised, double-blind, placebo-controlled field trial. *Lancet* 2008;371:2019-2025.





## 第 II 章

# ホスホリルコリン

## II-1 ホスホリルコリン (PC) とは

### II

#### ホスホリルコリン

### 1. ホスホリルコリンとは

ホスホリルコリン (phosphorylcholine: PC) は  $C_5H_{15}NO_4P$  と表される小さな分子で、コリンから合成され肺炎球菌の細胞壁の構成成分となることが1967年に初めて報告された<sup>1)</sup>。その後、肺炎球菌以外のグラム陽性連鎖球菌や嫌気性菌、インフルエンザ菌や淋菌などのグラム陰性菌、細胞内寄生菌であるレジオネラ菌、さらには線虫や原虫の細胞壁にも PC が存在することが明らかになり、ヒトに感染する細菌などの原核生物から真菌などの真核生物に至るまで、ほとんどすべての病原菌が PC を有していると考えられている<sup>2)</sup>。(表1)

表1：各種病原菌のホスホリルコリン結合部位（文献2から引用改変）

| 病原菌                             | PCの結合部位  |
|---------------------------------|----------|
| グラム陽性菌                          |          |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | TA, LTA  |
| <i>Streptococcus oralis</i>     | TA       |
| <i>Streptococcus mitis</i>      | TA       |
| グラム陰性菌                          |          |
| <i>Haemophilus influenzae</i>   | LPS, LOS |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>   | 延長因子 Tu  |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i>    | 線毛       |
| <i>Legionella pneumophila</i>   | GTPase   |
| <i>Treponema pallidum</i>       | 細胞膜脂質    |
| 線虫                              |          |
| <i>Acanthocheilonema viteae</i> | ES-62    |
| 原虫                              |          |
| <i>Plasmodium falciparum</i>    | 菌体表面     |

PC: phosphorylcholine TA: teichoic acid LTA: lipoteichoic acid  
LPS: lipopolysaccharide LOS: lipooligosaccharide

PCの役割については未だ不明な点も多いが、様々な感染症の発症に関与し、多くの細菌に含まれていることから、PCをターゲットとした感染症の治療や予防法の開発が進められている。そこで、本項では、PCの機能と感染症や免疫応答における役割について述べてみたい。

## 1) PC の機能と役割

PCは細菌の構成成分の一つとして、その構造や増殖に重要な役割を担っている。たとえば肺炎球菌では、細胞壁を構成する多糖体であるタイコ酸 (TA) やリポタイコ酸 (LTA) にPCが含まれ、細胞壁の合成や形態維持に関与する<sup>3)</sup>。(図1)肺炎球菌に共通抗原性をもつため新規ワクチン抗原として注目されている pneumococcal surface protein A (PspA) や自己融解酵素などのコリン結合性蛋白の細胞壁への結合にもPCは必要で、その結合を強固にする<sup>3,4)</sup>。そのため、PCを欠損する肺炎球菌は細菌の連鎖を離断することができず、いつまでも延長しながら増殖し、形体も変化する<sup>5)</sup>。インフルエンザ菌においても、PCが菌体外膜の lipopolysaccharide (LPS) や lipooligosaccharide (LOS) に結合することで外膜の物理的性状が強固になり、それによって膜透過性が低下し、融解温度が上昇する<sup>6)</sup>。さらに、抗菌ペプチドに対する抵抗性が増すこと、免疫グロブリンの結合が阻止されることなどが報告されており<sup>6,7)</sup>、これらの細菌にとってPCがその菌体を守るために重要であることが示唆される。

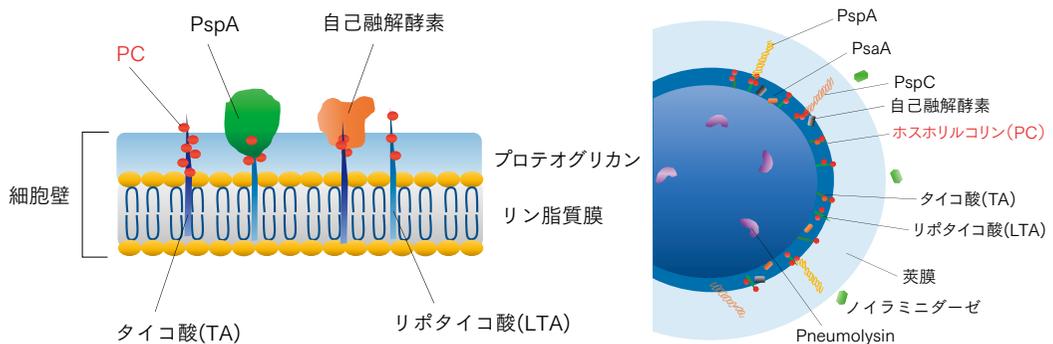


図1：肺炎球菌の細胞壁の構造とPCの結合部位（文献3, 4から引用改変）

PCはタイコ酸 (TA)、リポタイコ酸 (LTA) に含まれ、コリン結合蛋白 (CBP) の細胞壁への結合に関与している。

Phase variation は細菌が宿主による排除機構から逃れるため環境に応じてその性状を変化させる現象で、ここにもPCの発現が影響する。肺炎球菌はその形状から transparent 型と opaque 型の2つの phenotype に分類され、transparent 型は荚膜が少ないが細胞壁のTAとそれに結合するPCが多く、opaque 型は荚膜が厚くTAやPCの発現が少ない。そのため、transparent 型は細菌の粘膜面への定着性が強く、opaque 型は組織中で貪食細胞による排除に抵抗性を持つ<sup>8)</sup>。この肺炎球菌の荚膜そしてPCの取り込みは *licA-D* 遺伝子領域の変化によって制御され、これにより細胞壁の phase variation そして phenotype の変化が生じる<sup>9)</sup>。インフルエンザ菌でも *lic-1*、*lic-2*、*lic-3* および *IgtC* の4つの遺伝子の働きによって phase variation が誘導され、これらの遺伝子のうち *lic-1* がPCのLOSへの取り込みを制御し、その構造を変化させることが知られている<sup>10)</sup>。

バイオフィルムの形成は慢性副鼻腔炎や慢性中耳炎、滲出性中耳炎などで観察され、炎

症の遷延化や抗菌薬への抵抗性をもたらす。PCはこのバイオフィルムの産生にも関与し、PCを高発現するインフルエンザ菌はバイオフィルムの産生能が強く、バイオフィルム中に長期間生存することができる<sup>11)</sup>。それゆえ、病悩期間が長い滲出性中耳炎患者の中耳貯留液から検出されるインフルエンザ菌はPCの発現が強い<sup>12)</sup>。

## 2) PCの宿主に対する作用

PCは細菌の気道におけるコロニー形成に関与し、PCを高発現する肺炎球菌やインフルエンザ菌はPCを発現しない細菌よりも上咽頭や気道に定着しやすい<sup>8,13)</sup>。その一つの要因として、PCが血小板活性化因子(PAF)の構成分子でもあることから、PCを発現する細菌はPCを介して上皮細胞表面に存在するその受容体(PAF receptor: PAF-R)と結合し上皮細胞に接着するためと考えられている<sup>13,14)</sup>。PAF-Rを介した接着は、肺炎球菌やインフルエンザ菌のほか、緑膿菌やナイセリア菌でも確認されている。(図2)

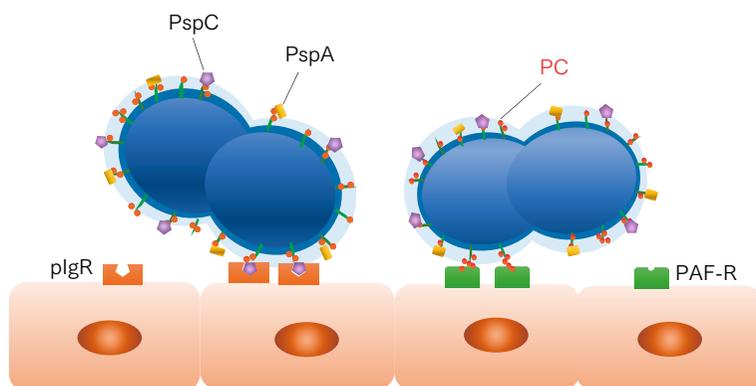


図2：肺炎球菌の細胞表面への接着にはPCとPAF-Rの結合が関与する

PCとPAF-Rとの結合は細菌の細胞や組織内さらには流血中への侵入をもたらし、中耳炎や肺炎さらには他臓器の感染を発症する要因となる。それゆえ、PCを高発現する肺炎球菌やインフルエンザ菌ほどこれらの感染症を発症しやすく、その発症がPAF-Rの拮抗薬の投与やPAF-R欠損マウスで有意に抑制される<sup>14,15)</sup>。しかし、PCはPAF-Rとのみ特異的に結合するのではなく、肺炎球菌のPCはasialo ganglio-N-tetraosylceramide (asialo-GM1)などの上皮細胞表面にある多糖体とも接着し<sup>16)</sup>、PCを発現するインフルエンザ菌がPAF-R欠損マウスでも感染を起こすことも知られている<sup>17)</sup>。すなわち、PCはPAF-R以外の様々な受容体とも結合して、細菌の接着そして侵入を誘導し感染を起こすと考えられる。

PCがPAFの構成分子であることで、PCとPAF-Rを介した細菌接着以外にも細菌にとって有利な点がある。肺炎球菌やインフルエンザ菌は宿主のコリンを取り込むためにPC加水分解酵素を分泌し、これがPAFを不活化して好中球の遊走を阻止する。そのため、

この酵素を持つ細菌はこれを欠く細菌よりも好中球による排除を受けにくい<sup>18)</sup>。また、細胞内寄生菌のレジオネラ菌はPC変換酵素を分泌し、マクロファージの食胞膜の形成に必要なGTPaseのPCの性質を変化させる。そのため食胞膜とリソソームとの結合性が失われて殺菌が阻止され、レジオネラ菌はマクロファージの殺菌機構を逃れて食胞内で分解されることなく細胞内に寄生することができる<sup>2)</sup>。

線虫の *Acanthocheilonema viteae* はPCを構成成分とする糖タンパク質ES-62を分泌し、マクロファージや樹状細胞からのIL-12やTNF- $\alpha$ の産生を抑制する。さらに、T細胞によるIL-4の産生を亢進するとともにIFN- $\gamma$ の産生を抑制してTh2型の反応を誘導する。同じく線虫のフィラリアもPCを含む抗原物質を産生し、PC依存性にB細胞やT細胞のTh1型反応を抑制する<sup>2)</sup>。また、B細胞やT細胞そしてマクロファージの表面にもPAF-Rが発現していることが知られており、PCとの結合がその免疫応答に何らかの影響を及ぼしていると推測されるが、その詳細は不明である<sup>2)</sup>。(図3)

このように細菌の細胞壁を構成するPCそして細菌が産生するPC変換酵素は宿主に対して様々な作用を有し、感染症の発症における重要な要因となっている。

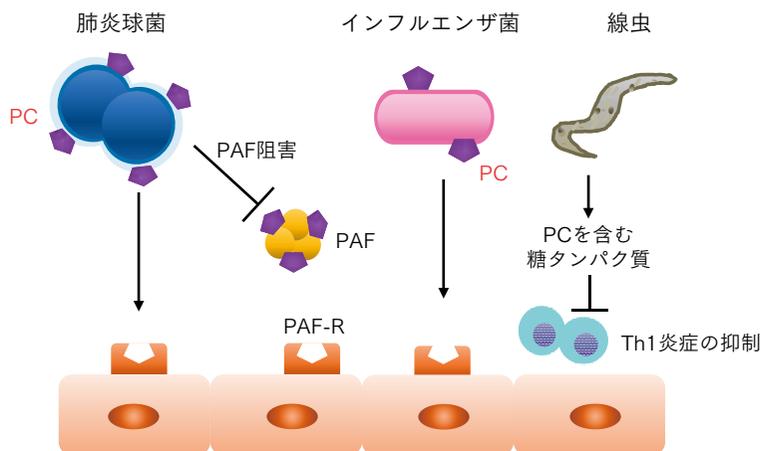


図3：各種微生物におけるホスホリルコリンの免疫学的役割

### 3) PC に対する宿主の反応

細菌感染症や関節リウマチ、悪性リンパ腫、心筋梗塞の重症度の指標となり急性期反応タンパクとして知られるC反応性蛋白(C-reactive protein: CRP)は、肺炎球菌のC多糖体と沈降反応を示す血漿蛋白として最初に発見された。その後、CRPがPCを認識することが明らかになり、それゆえCRP値は肺炎球菌に限らず多くの細菌感染症で上昇する。CRPとPCの結合は古典的補体経路を活性化し、オプソニン作用や細胞膜障害性複合体の活性化、好中球やマクロファージなどの貪食細胞の走化性亢進をもたらし、自然免疫系の一つとして生体防御に働く<sup>19)</sup>。このことは、ヒトCRPを遺伝子導入したマウスでは肺炎球菌感染症による死亡や菌血症を発症する頻度が低く、それが補体依存性であることか

ら理解できる<sup>20)</sup>。インフルエンザ菌でも同じく、PCを発現する菌株はこれを発現しない菌株よりもCRPと補体を介した殺菌作用を受けやすい<sup>21)</sup>。

PCを認識する代表的な免疫グロブリンとしてPC特異的IgMがあり、腸管の常在菌などの刺激を受けて自然免疫系の細胞であるB1細胞によって産生されることから自然抗体として位置づけられている<sup>22)</sup>。このPC特異的IgMの血清中の濃度は乳幼児の鼻咽腔における肺炎球菌の動態とよく相関し、肺炎球菌の集落形成や感染によって年齢とともに増加し、ほとんどすべての乳幼児で認められるようになる<sup>23)</sup>。PC特異的IgGも小児そして成人の血清中に検出され、サブクラスによって異なるものの経年的な変化が見られる。しかし、反復性中耳炎児と健常児とでその抗体価に有意な差はなく、急性中耳炎に対する防御効果は低いと考えられている<sup>24)</sup>。その他のアイソタイプとしてPC特異的IgA抗体であるTEPC-15がマウスで同定されているが、興味深いことにTEPC-15は宿主の正常細胞を構成するPCは認識せず、細菌や細菌の分解産物とのみ反応する<sup>25)</sup>。

自然抗体として産生されるPC特異的IgMは感染症のみでなく、高脂血症や全身性エリテマトーデス(SLE)の病態にも関与する。たとえば、PC特異的IgMは動脈硬化の危険因子となる酸化低密度リポタンパク質(oxLDL)と交差反応し、PC特異的IgM抗体価が高い高血圧症患者は動脈硬化の進行が抑制される<sup>26)</sup>。また、SLEにおいても同様に、軽症例や腎障害が少ない症例で有意にPC特異的IgM抗体価が高いことが報告されている<sup>27)</sup>。(図4)

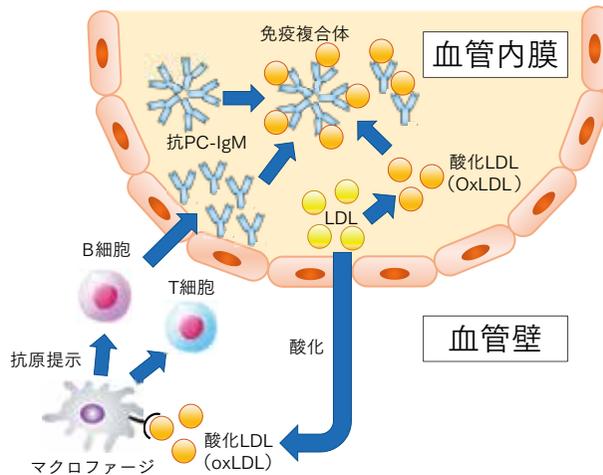


図4：PC特異的IgMはox-LDLと結合しその血管壁への付着を阻止する

#### 4) PCのワクチンとしての応用

自然抗体としてのPC特異的IgMは親和性が低く、ヒト鼻咽腔の肺炎球菌や急性中耳炎の発症に及ぼす影響は少ないことが指摘されている<sup>22,24)</sup>。しかし、PCが細菌の細胞壁の構成成分であることから、PCワクチンによってPC特異的免疫応答を誘導し感染症を

予防できる可能性がある。その証左として、ヒト血漿から精製されたPC特異的抗体は *in vitro* で肺炎球菌やインフルエンザ菌を殺菌し、マウスにこれを受動免疫すると肺炎球菌のクリアランスが亢進し感染症を予防できる<sup>28,29)</sup>。また、PCの経鼻投与によって肺炎球菌やインフルエンザ菌感染症を予防できることが、動物実験で実証されている<sup>30,31)</sup>。

PC特異的IgMが動脈硬化に抑制的に働くことから、肺炎球菌ワクチンやPCワクチンによる本症の予防効果が動物モデルで検討され、これらのワクチンの投与によってPCおよびoxLDL特異的抗体が誘導され、その抗体価と相関して動脈硬化症の発症が阻止されることが報告されている<sup>32,33)</sup>。また、ダニの虫体にもPCが含まれ、新生児マウスにPCを保有する肺炎球菌ワクチンを投与しておく、成長後にダニで感作しても喘息の発症が抑制されることも知られている<sup>34)</sup>。

すなわち、PCをターゲットとしたワクチンの開発によって、感染症のみならず、喘息などのアレルギー疾患、動脈硬化症、SLEなど様々な疾患を同時に予防できる可能性がある」と推測される。

#### 参考文献

- 1) Tomasz A. Choline in the cell wall of a bacterium: novel type of polymer-linked choline in *Pneumococcus*. *Science* 1967;157:694-697.
- 2) Clark SE, Weiser JN. Microbial modulation of host immunity with the small molecule phosphorylcholine. *Infect Immun* 2013;81:392-401.
- 3) Bergmann S, Hammerschmidt S. Versatility of pneumococcal surface proteins. *Microbiology* 2006;152:295-303.
- 4) Briles DE, Tart RC, Swiatlo E, et al. Pneumococcal diversity: considerations for new vaccine strategies with emphasis on pneumococcal surface protein A (PspA). *Clin Microbiol Rev* 1998;11:645-657.
- 5) Tomasz A. Biological consequences of the replacement of choline by ethanolamine in the cell wall of *Pneumococcus*: choline formation, loss of transformability, and loss of autolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1968;59:86-93.
- 6) Clark SE, Snow J, Li J, et al. Phosphorylcholine allows for evasion of bactericidal antibody by *Haemophilus influenzae*. *PLoS Pathog* 2012;8:e1002521.doi:10.1371/journal.ppat.1002521.
- 7) Lysenko ES, Gould J, Bals R, et al. Bacterial phosphorylcholine decreases susceptibility to the antimicrobial peptide LL-37/hCAP18 expressed in the upper respiratory tract. *Infect Immun* 2000;68:1664-1671.
- 8) Weiser JN, Markiewicz Z, Tuomanen EI, et al. Relationship between phase variation in colony morphology, intrastrain variation in cell wall physiology, and nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 1996;64:2240-2245.
- 9) Zhang JR, Idanpaan-Heikkila I, Fischer W, et al. Pneumococcal *licD2* gene is involved in phosphorylcholine metabolism. *Mol Microbiol* 1999;31:1477-1488.
- 10) Weiser, JN, Shchepetov M, Chong ST. Decoration of lipopolysaccharide with phosphorylcholine: a phase-variable characteristic of *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 1997;65:943-950.
- 11) Hong W, Pang B, West-Barnette S, et al. Phosphorylcholine expression by nontypeable *Haemophilus influenzae* correlates with maturation of biofilm communities *in vitro* and *in*

- vivo. J Bacteriol 2007;189:8300–8307.
- 12) Fujita K, Hirano T, Kodama S, et al. Prognostic impact of phosphorylcholine expression in nontypeable *Haemophilus influenzae* in otitis media with effusion. Acta Otolaryngol 2009;129:832–838.
  - 13) Swords WE, Buscher BA, Ver Steeg Ii K, et al. Non-typeable *Haemophilus influenzae* adhere to and invade human bronchial epithelial cells via an interaction of lipooligosaccharide with the PAF receptor. Mol Microbiol 2000;3:13–27.
  - 14) Cundell DR, Gerard NP, Gerard C, et al. *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. Nature 1995;377:435–438.
  - 15) Rijneveld AW, Weijer S, Florquin S, et al. Improved host defense against pneumococcal pneumonia in platelet-activating factor receptor-deficient mice. J Infect Dis 2004;189:711–716.
  - 16) Sundberg-Kövamees M, Holme T, Sjögren A. Interaction of the C-polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* with the receptor asialo-GM1. Microb Pathog 1996;21:223–234.
  - 17) Branger J, Wieland CW, Florquin S, et al. Platelet-activating factor receptor-deficient mice show an unaltered clearance of nontypeable *Haemophilus influenzae* from their respiratory tract. Shock 2004;22:543–547.
  - 18) Hergott CB, Roche AM, Naidu NA, et al. Bacterial exploitation of phosphorylcholine mimicry suppresses inflammation to promote airway infection. J Clin Invest 2015;125:3878–3890.
  - 19) Kaplan MH, Volanakis JE. Interaction of C-reactive protein complexes with the complement system. I. Consumption of human complement associated with the reaction of C-reactive protein with pneumococcal C-polysaccharide and with the choline phosphatides, lecithin and sphingomyelin. J Immunol 1974;112:2135–2147.
  - 20) Szalai AJ, Briles DE, Volanakis JE. Human C-reactive protein is protective against fatal *Streptococcus pneumoniae* infection in transgenic mice. J Immunol 1995;155:2557–2563.
  - 21) Weiser JN, Pan N, McGowan KL, et al. Phosphorylcholine on the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae* contributes to persistence in the respiratory tract and sensitivity to serum killing mediated by C-reactive protein. J Exp Med 1998;187:631–640.
  - 22) Grönwall C, Vas J, Silverman GJ. Protective roles of natural IgM antibodies. Front Immunol 2012;3:66.doi:10.3389/fimmu.2012.00066.eCollection2012.
  - 23) Gray BM, Dillon HC Jr, Briles DE. Epidemiological studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: development of antibody to phosphocholine. J Clin Microbiol 1983;18:1102–1107.
  - 24) Freijd A, Jonsson A, Rynnel-Dagöö B. Age-dependent IgG subclass distribution of phosphocholine antibodies in humans. APMIS 1988;96:901–905.
  - 25) Urbaneja MA, Chapman D. The binding of phosphorylcholine-carrying antigens to the anti-phosphorylcholine monoclonal antibody TEPC 15. A fluorescence spectroscopic study. Biochim Biophys Acta 1989;998:85–90.
  - 26) Su J, Georgiades A, Wu R, et al. Antibodies of IgM subclass to phosphorylcholine and oxidized LDL are protective factors for atherosclerosis in patients with hypertension. Atherosclerosis 2006;188:160–166.
  - 27) Grönwall C, Akhter E, Oh C, et al. IgM autoantibodies to distinct apoptosis-associated antigens correlate with protection from cardiovascular events and renal disease in patients with SLE. Clin Immunol 2012;142:390–398.
  - 28) Goldenberg HB, McCool TL, Weiser JN. Cross-reactivity of human immunoglobulin G2

recognizing phosphorylcholine and evidence for protection against major bacterial pathogens of the human respiratory tract. *J Infect Dis* 2004;190:1254–1263.

- 29) McDaniel LS, Benjamin WH Jr, Forman C, et al. Blood clearance by anti-phosphocholine antibodies as a mechanism of protection in experimental pneumococcal bacteremia. *J Immunol* 1984;133:3308–3312.
- 30) Trolle S, Chachaty E, Kassis-Chikhani N, et al. Intranasal immunization with protein-linked phosphorylcholine protects mice against a lethal intranasal challenge with *Streptococcus pneumoniae*. *Vaccine* 2000;18:2991–2998.
- 31) Tanaka N, Fukuyama S, Fukuiwa T, et al. Intranasal immunization with phosphorylcholine induces antigen specific mucosal and systemic immune responses in mice. *Vaccine* 2007;25:2680–2687.
- 32) Binder CJ, Hörkkö S, Dewan A, et al. Pneumococcal vaccination decreases atherosclerotic lesion formation: molecular mimicry between *Streptococcus pneumoniae* and oxidized LDL. *Nat Med* 2003;9:736–743.
- 33) Caligiuri G, Khallou-Laschet J, Vandaele M, et al. Phosphorylcholine-targeting immunization reduces atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:540–546.
- 34) Patel PS, Kearney JF. Neonatal exposure to pneumococcal phosphorylcholine modulates the development of house dust mite allergy during adult life. *J Immunol* 2015;194:5838–5850.

## II-2 ホスホリルコリンと疾患

### II

### 1) 急性上気道感染症

#### 〈Summary〉

自然抗体として血清中に存在するホスホリルコリン (PC) 特異的 IgM の感染症に対する役割を明らかにするため、急性喉頭蓋炎および扁桃周囲膿瘍患者の血清中 PC 特異的 IgM 濃度と CRP 値および白血球数を比較した。その結果、PC 特異的 IgM 濃度は CRP 値および白血球数と有意な負の相関を示した。さらに、女性は男性よりも CRP 値と白血球数が低値であり、その一方で PC 特異的 IgM は高値であった。これらの結果から、PC 特異的 IgM は CRP より迅速に反応して感染や炎症反応の重症化を抑制し、女性に急性喉頭蓋炎や扁桃周囲膿瘍の発症が少ないことの要因の一つになっていると推測された。

#### はじめに

炎症の強さと相関し細菌感染症の重症度の指標に用いられる C 反応性蛋白 (C-reactive protein: CRP) は、肺炎球菌の細胞壁を構成するタイコ酸やリポタイコ酸、インフルエンザ菌の細胞外膜の lipopolysaccharide (LPS) や lipooligosaccharide (LOS) などに含まれるホスホリルコリン (PC)<sup>1,2)</sup>と結合し、さらに補体を活性化することでこれらの細菌を殺菌する<sup>3,4)</sup>。CRP の反応は比較的早期に起こるが、白血球数の増加や左方移動よりも遅く、炎症発生から6時間ほどしてから上昇する。

PC 特異的免疫グロブリンも PC に対する生理活性を有し、特に PC 特異的 IgM の作用に関しては、動脈硬化や自己免疫疾患ですでに多くの報告がなされている。たとえば、全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus: SLE) の患者で心筋梗塞の既往がない症例や臓器障害が軽度の症例では、心筋梗塞合併例や臓器障害が高度の症例と比較して PC 特異的 IgM が有意に高値であることが知られている<sup>5)</sup>。心筋梗塞そして SLE などの自己免疫疾患では細菌感染症と同様に CRP が上昇することから、これらの疾患では PC に起因する炎症が心血管系や様々な臓器に生じ、PC 特異的 IgM はその炎症の重症化を抑制していると推測される。しかし、PC 特異的 IgM の細菌感染によってもたらされる炎症に対する役割についてはほとんど知られていない。

PC 特異的 IgM は肺炎球菌やインフルエンザ菌による感染時に IgG や IgA に先駆けて上昇するが、急性炎症時のみでなく上気道の常在菌や腸内細菌などによる恒常的な刺激を受けて B1 細胞で産生され、自然抗体として常に血液中に存在する<sup>6)</sup>。また、PC 特異的

IgMはCRPと同じく補体活性による殺菌作用を持っている<sup>6)</sup>。したがって、細菌感染症に対してCRPよりも早く反応し炎症の制御に関与すると推測される。

そこで、上気道の重症感染症である急性喉頭蓋炎および扁桃周囲膿瘍における血清中のPC特異的IgMとCRP値を比較し、PC特異的IgMの細菌感染症における役割について検討した。

### 対象と方法

平成28年5月から平成29年4月までに当科で治療を行った急性喉頭蓋炎および扁桃周囲膿瘍患者26例を対象とし、初診時に採取した血清中のCRP値とPC特異的免疫グロブリン濃度を測定した。

CRPは院内の検査部で免疫比濁法により定量した。血清中PC特異的免疫グロブリンは前章と同様にELISA法で測定し、マウスPC特異的IgA（TEPC-15）で作成した標準曲線を用いてそれぞれのアイソタイプの濃度を算出した。

### 結果

#### ① 対象症例の背景

26症例中女性が9例、男性が17例で、両者の年齢（平均±標準偏差）はそれぞれ40.1±19.2歳、40.1±16.8歳とほぼ同じであった。発症から受診までの病悩日数（平均±標準偏差）は、女性4.4±2.8日、男性2.9±2.5日と女性のほうが長いが有意差はなかった。（表）

表：急性上気道炎症例の背景因子

|                    | 女性              | 男性              | p 値    |
|--------------------|-----------------|-----------------|--------|
| 年齢（歳）              | 40.1 ± 19.2     | 40.1 ± 16.8     | 0.8928 |
| 病悩日数（日）            | 4.4 ± 2.8       | 2.9 ± 2.5       | 0.1778 |
| CRP 値（mg/dL）       | 3.7 ± 2.1       | 8.6 ± 4.2       | 0.0039 |
| 白血球（個/μl）          | 10,063 ± 1,933  | 15,960 ± 3,828  | 0.0001 |
| Anti-PC IgM（ng/ml） | 21.950 ± 10.520 | 16.890 ± 11.115 | 0.2053 |
| Anti-PC IgG（ng/ml） | 40.164 ± 10.676 | 43.637 ± 11.871 | 0.3738 |
| Anti-PC IgA（ng/ml） | 1.978 ± 0.579   | 2.039 ± 0.927   | 0.9356 |

② CRP 値と白血球数

全症例の CRP 値と白血球数（平均±標準偏差）は、それぞれ  $6.9 \pm 4.4\text{mg/dl}$ 、 $13,919 \pm 4,415$  個/ $\mu\text{l}$  といずれも高値であり、両者間には有意な正の相関を認めた。（図 1）

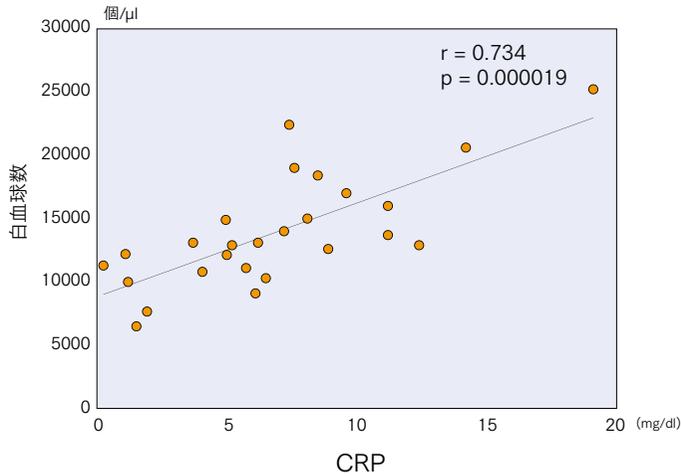


図 1：扁桃周囲膿瘍・急性喉頭蓋炎における CRP 値と白血球数の比較

③ CRP 値、白血球数と PC 特異的免疫グロブリン濃度

CRP 値と PC 特異的免疫グロブリン濃度を比較すると、PC 特異的 IgM は CRP 値と有意な負の相関を示し、PC 特異的 IgM が高値なほど炎症反応が弱いことが示された。一方、PC 特異的 IgG と IgA は、有意ではないが CRP 値と正の相関がみられた。（図 2）

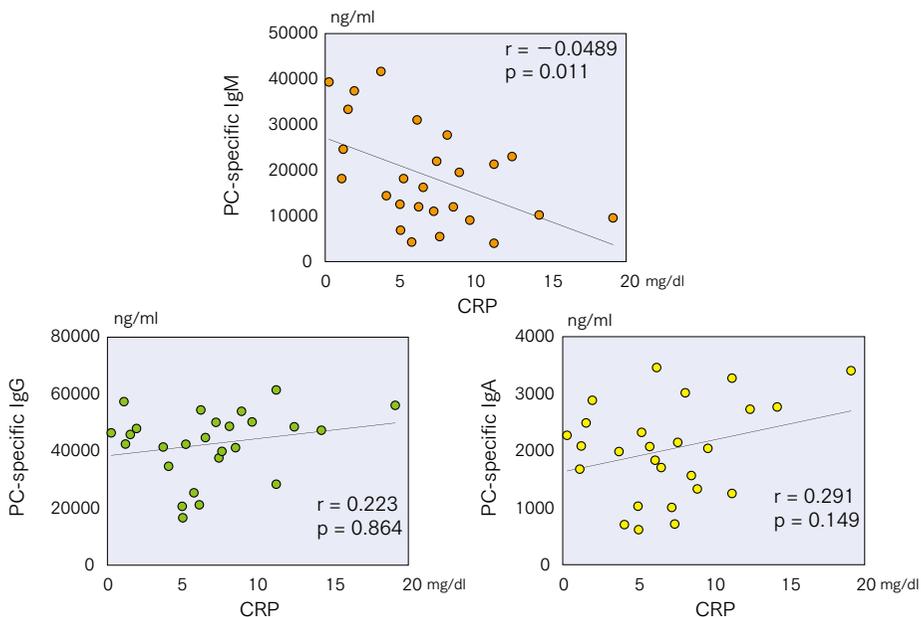


図 2：CRP 値と PC 特異的免疫グロブリン値の相関

白血球数も CRP 値と同様に、PC 特異的 IgM と有意な負の相関を示した。しかし、その相関係数は CRP 値よりもやや低値であり、有意性もやや低かった。(図3) また、白血球数と PC 特異的 IgG、IgA も CRP 値と同様に正の相関を示したが、統計学的な有意性は認められなかった。

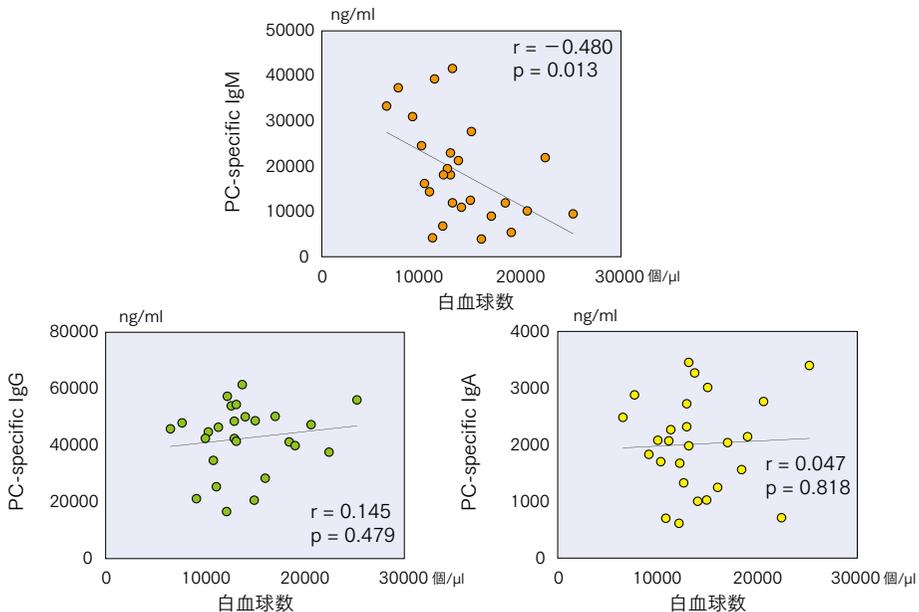


図3：白血球数と PC 特異的免疫グロブリン値の相関

#### ④ CRP 値、白血球数の性差

急性喉頭蓋炎、扁桃周囲膿瘍はともに女性の発症が少ないことから、炎症反応の性差を比較した。その結果、CRP 値 (平均±標準偏差) は女性で  $3.7 \pm 2.1$  mg/dl、男性で  $8.6 \pm 4.2$  mg/dl、白血球数 (平均±標準偏差) は女性で  $10,063 \pm 1,933$  個/μl、男性で  $15,960 \pm 3,828$  個/μl であり、ともに有意に女性で低値であった。(図4)

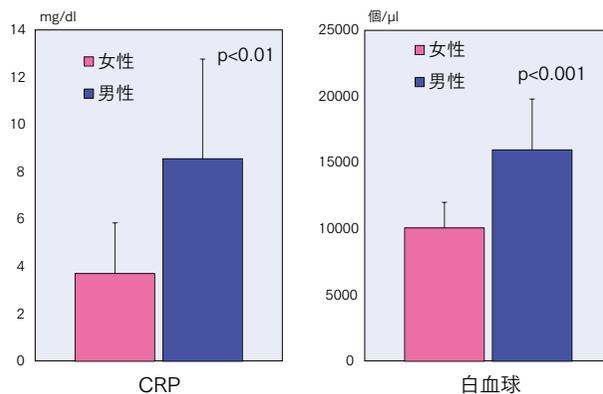


図4：CRP 値および白血球数の男女での比較

### ⑤ PC 特異的免疫グロブリン濃度の性差

PC 特異的 IgM が炎症反応と負の相関を示すことから、PC 特異的 IgM の性差を比較した。その結果、有意差はないが、PC 特異的 IgM は女性が高値で、IgG と IgA は男性で高い傾向がみられた。(図5)

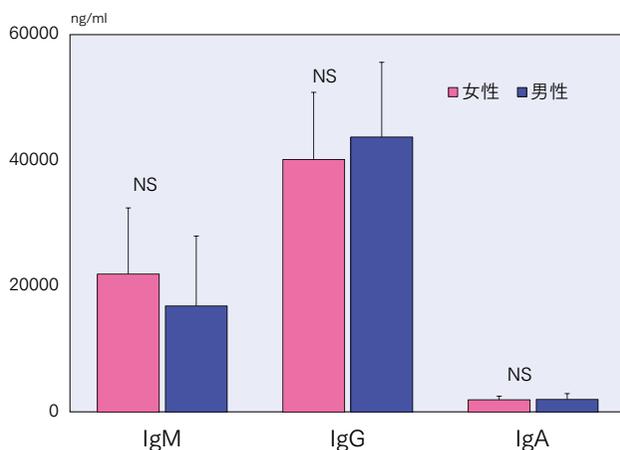


図5：PC 特異的免疫グロブリン値の男女での比較

NS: not significant

### 考 察

急性喉頭蓋炎および扁桃周囲膿瘍は重症上気道感染症の範疇に含まれる疾患であり、前者では気道確保、後者では膿瘍の切開排膿あるいは即時膿瘍扁桃摘出術などの外科的処置を必要とする。その手術適応を決める際に参考となるのが、CRP 値や白血球数などの炎症反応である。これらの反応は自然免疫系による感染防御作用の表れであり、とくに CRP は PC を発現する起炎菌に対して殺菌的に作用する。その証左として、マウスにヒト CRP を投与あるいはヒト CRP 遺伝子を導入すると、肺炎球菌感染症による死亡や菌血症を発症する頻度が有意に低下する<sup>3,7)</sup>。また、鼻咽腔に PC を発現するインフルエンザ菌と PC を欠損するインフルエンザ菌を接種すると、PC を発現するインフルエンザ菌は鼻咽腔から早期に排除され、CRP の阻害薬を添加するとその効果がみられなくなる<sup>4)</sup>。

T 細胞非依存性に B1 細胞で産生される PC 特異的 IgM も自然免疫系の抗体として働き、感染の発症を予防する<sup>6)</sup>。たとえば PC 特異的 IgM は健常な乳幼児でも認められ、肺炎球菌の集落形成や感染によって経年的に増加し、それに伴って乳幼児は肺炎球菌さらには他の病原菌による感染症を発症しなくなる<sup>8)</sup>。これには IgM 以外の IgG や IgA など他のアイソタイプ抗体も作用し、実際、肺炎球菌感染症に対して、マウスの PC 特異的 IgG3 は PC 特異的 IgM の 10 倍の防御効果があることが知られている<sup>9)</sup>。しかし、PC 特異的 IgG や IgA は T 細胞依存性に感染発症後数日して産生されるため、初感染では早期に病原菌を排除し感染の発症を予防する作用はない。

そこで、急性上気道感染症における自然抗体としての PC 特異的 IgM の作用を知るため、

PC 特異的免疫グロブリン濃度と CRP 値を比較したところ、PC 特異的 IgG と IgA は CRP 値と正の相関を示したが、PC 特異的 IgM と CRP 値には有意な負の相関が認められた。すなわち、CRP が誘導される前に PC 特異的 IgM が自然抗体として起炎菌に働き、感染や炎症反応の重症化を抑制したと推測される。事実、PC 特異的 IgA (TEPC-15) と同様の生理活性を有する EO6 抗体が、CRP と競合的に PC-KLH と結合することが報告されている<sup>10)</sup>。なお、CRP と同じく白血球数も PC 特異的 IgM 濃度と有意な負の相関を示したが、CRP 値との相関係数よりもやや低く、PC 特異的 IgM は白血球よりも CRP の誘導により強い影響を及ぼしていると考えられる。

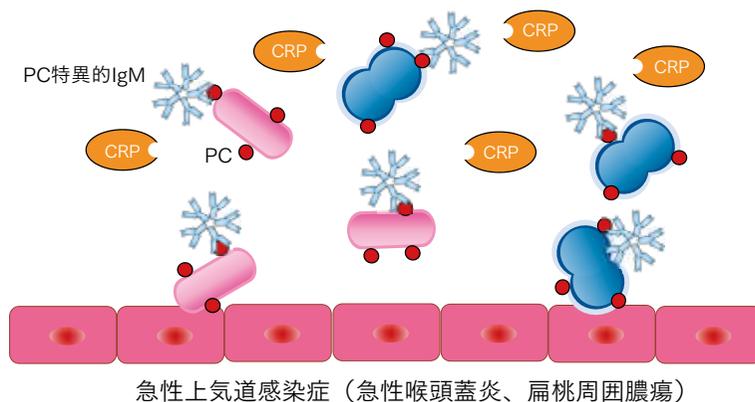
動脈硬化症に関する研究で、男性よりも女性に PC 特異的 IgM が高値であることが報告され、それが女性に本疾患が少ない要因の一つと考えられている<sup>11,12)</sup>。同様に、今回の研究の対象となった急性喉頭蓋炎および扁桃周囲膿瘍も女性の発症頻度が少なく<sup>13,14)</sup>、その病態に何らかの性差があると予想される。そこで、CRP 値と白血球数を男女で比較したところ、これらの値は女性で有意に低かった。男性と女性とで年齢および病日数に有意な差はなく、女性に PC 特異的 IgM が高いことが女性における炎症反応が弱いこと、そして、急性喉頭蓋炎および扁桃周囲膿瘍の発症が女性に少ないことの要因になっていると推測される。

現在、PC をワクチンとして接種し、血清中 PC 特異的 IgM をより強く誘導することによって動脈硬化症や喘息の発症を予防しようとする研究が進められている<sup>15,16)</sup>。今回の研究結果は、PC ワクチンがこれらの疾患のみならず広く上気道感染症に対しても予防あるいは炎症の抑制効果を発揮しうるとを示唆すると考えられる。

## 結 語

血清中 PC 特異的 IgM は早期に起炎菌に作用して炎症反応の重症化を抑制する。また、PC 特異的 IgM は男性よりも女性に高値であり、これが女性に急性上気道感染症の発症頻度や炎症反応が低いことの要因の一つと考えられる。(図 6)

PC特異的IgM：女性>男性



急性上気道感染症（急性喉頭蓋炎、扁桃周囲膿瘍）

図 6：PC 特異的 IgM による CRP 反応の阻止

## 参考文献

- 1) Bergmann S, Hammerschmidt S. Versatility of pneumococcal surface proteins. *Microbiology* 2006;152:295–303.
- 2) Clark SE, Snow J, Li J, et al. Phosphorylcholine allows for evasion of bactericidal antibody by *Haemophilus influenzae*. *PLoS Pathog* 2012;8:e1002521.doi:10.1371/journal.ppat.1002521.
- 3) Szalai AJ, Briles DE, Volanakis JE. Human C-reactive protein is protective against fatal *Streptococcus pneumoniae* infection in transgenic mice. *J Immunol* 1995;155:2557–2563.
- 4) Weiser JN, Pan N, McGowan KL, et al. Phosphorylcholine on the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae* contributes to persistence in the respiratory tract and sensitivity to serum killing mediated by C-reactive protein. *J Exp Med* 1998;187:631–640.
- 5) Grönwall C, Akhter E, Oh C, et al. IgM autoantibodies to distinct apoptosis-associated antigens correlate with protection from cardiovascular events and renal disease in patients with SLE. *Clin Immunol* 2012;142:390–398.
- 6) Grönwall C, Vas J, Silverman GJ. Protective roles of natural IgM antibodies. *Front Immunol* 2012;3:66.doi:10.3389/fimmu.2012.00066.eCollection2012.
- 7) Yother J, Volanakis JE, Briles DE. Human C-reactive protein is protective against fatal *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *J Immunol* 1982;128:2374–2376.
- 8) Gray BM, Dillon HC Jr, Briles DE. Epidemiological studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: development of antibody to phosphocholine. *J Clin Microbiol* 1983;18:1102–1107.
- 9) Briles DE, Clafin JL, Schroer K, et al. Mouse IgG3 antibodies are highly protective against infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Nature* 1981;294:88–90.
- 10) Chang MK, Binder CJ, Torzewski M, et al. C-reactive protein binds to both oxidized LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand: Phosphorylcholine of oxidized phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:13043–13048.
- 11) Su J, Georgiades A, Wu R, et al. Antibodies of IgM subclass to phosphorylcholine and oxidized LDL are protective factors for atherosclerosis in patients with hypertension. *Atherosclerosis* 2006;188:160–166.
- 12) Gigante B, Leander K, Vikström M, et al. Low levels of IgM antibodies against phosphorylcholine are associated with fast carotid intima media thickness progression and cardiovascular risk in men. *Atherosclerosis* 2014;236:394–399.
- 13) 黒野祐一. 急性喉頭蓋炎. *呼吸と循環* 2011;1:77–82.
- 14) 大堀 純一郎, 馬越 瑞夫, 宮下 圭一, ほか. 扁桃周囲膿瘍の CT 所見とその臨床的特徴. *日耳鼻* 2013;116:947–952.
- 15) Caligiuri G, Khallou-Laschet J, Vandaele M, et al. Phosphorylcholine-targeting immunization reduces atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:540–546.
- 16) Patel PS, Kearney JF. Neonatal exposure to pneumococcal phosphorylcholine modulates the development of house dust mite allergy during adult life. *J Immunol* 2015;194:5838–5850.

## 2) 滲出性中耳炎

### 〈Summary〉

滲出性中耳炎に罹患した小児の鼻咽腔より無莢膜型インフルエンザ菌（NTHi）を分離し、ホスホリルコリン（PC）発現による phase variation と滲出性中耳炎の臨床経過について検討した。また、NTHi の phase variation とヒト結膜上皮細胞への接着を *in vitro* で観察した。その結果、鼻咽腔から分離された NTHi の 62.5% に PC の発現を認め、PC の発現が強い NTHi が検出された症例は滲出性中耳炎の罹病期間が有意に長かった。また、PC の発現が強い NTHi はヒト結膜上皮への接着性が強かった。これらの所見から、NTHi における PC の発現が本菌の鼻咽腔上皮への接着性、そして滲出性中耳炎の遷延化や難治化に関与すると考えられた。

### はじめに

無莢膜型インフルエンザ菌（NHTi）は肺炎球菌と並び小児の急性中耳炎や滲出性中耳炎の主要な起炎菌である。また、急性中耳炎及び反復中耳炎患児の鼻咽腔からは NTHi が高頻度に検出され、滲出性中耳炎や反復性耳炎では NTHi の鼻咽腔上皮への定着性が亢進していることから<sup>1,2)</sup>、鼻咽腔細菌叢を形成する NTHi が滲出性中耳炎や急性中耳炎の発症に大きく関与していると考えられている。

NTHi の菌体外膜の主要な成分の1つであるリポオリゴ糖（LOS）は、同じくグラム陰性菌である腸内細菌由来のリポ多糖（LPS）と同様に多様な生理活性があり、好中球の局所への遊走やマクロファージからの TNF- $\alpha$  の産生を誘導することにより炎症反応を惹起し、呼吸上皮の線毛運動を障害することが知られている<sup>3)</sup>。また、NTHi の LOS がホスホリルコリン（PC）を epitope に表出することで phase variation がもたらされ、この phase variation が細菌の気道粘膜上皮への定着や組織浸潤、宿主のリンパ球などの免疫応答の抑制や調整、さらにはバイオフィルムの形成にも関与していることが報告されている<sup>4-7)</sup>。したがって、NTHi の phase variation が本菌による鼻咽腔細菌叢の形成、そして滲出性中耳炎や反復性中耳炎の病態に何らかの影響を及ぼしていると推測される。

そこで、鼻咽腔から NTHi が検出された小児滲出性中耳炎症例を対象として、NTHi の phase variation と臨床経過の関連性、さらに *in vitro* の実験系を用いて NTHi の phase variation とヒト結膜上皮細胞への接着性の関連性について検討した<sup>8)</sup>。

### 対象と方法

1992年4月から2003年5月までの期間に、大分大学附属病院耳鼻咽喉科外来を受診し、臨床症状と鼓膜所見、各種聴覚検査で滲出性中耳炎と診断された小児を対象とした。

細菌検査用スワブを用いて鼻咽腔の細菌学的検査を行い、インフルエンザ菌が検出された場合は各種抗血清を用いて莢膜の型別を検査し、NTHi であることを判定した。そして、

その細菌における PC 表出の有無を colony blotting 法を用いて同定した<sup>9)</sup>。その方法を簡単に記すと、NTHi をチョコレート寒天培地にて培養後、コロニーをニトロセルロース膜に転写して、PC に対するモノクローナル抗体である TEPC-15 を反応させ、さらに HRP 標識抗マウス IgA 抗体を添加した後に発色させた。その染色性を比較し、50% 以上のコロニーが強度に染色されるものを強陽性 (+)、50% 以上のコロニーが軽度～中等度に染色されるものを中等度陽性 (±)、染色される NTHi が 50% 未満のものを弱陽性 (-) と分類した。(図 1) そして、NTHi が検出された症例を PC の発現強度によってこの 3 群に分け、病悩期間、慢性副鼻腔炎や鼻アレルギー合併の有無、治療法、中耳貯留液の性状について比較検討した。

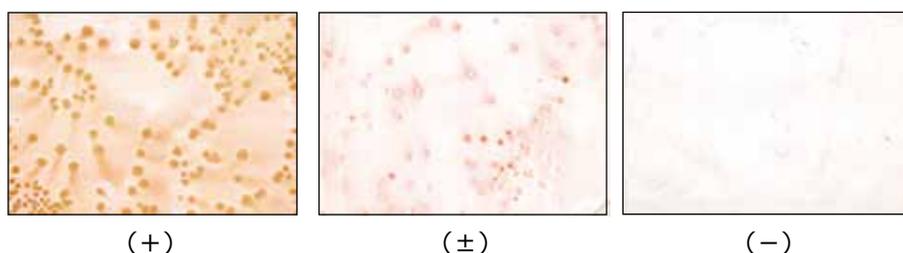


図 1：NTHi コロニーの PC 発現強度による分類

(+)：50% 以上のコロニーが強度に染色されるもの、(±)：50% 以上のコロニーが軽度～中等度に染色されるもの、(-)：染色される NTHi が 50% 未満のもの。

次に、Sun ら<sup>10)</sup>の方法に準じて NTHi の上皮細胞への接着性を観察し、PC の発現強度と比較した。その方法は、まずヒト結膜上皮細胞 (Human conjunctiva epithelial cells: CCL-20.2) を 24 穴プレート内で 24 時間培養し、培養液を吸引・洗浄後に、NTHi 浮遊液 0.1ml ( $10^5$  CFU) を各ウェルに添加した。そして、1 時間培養後に洗浄し、トリプシン処理をして回収された上皮細胞をチョコレート寒天培地上に塗抹し、24 時間後の NTHi コロニー数を上皮細胞に接着した細菌数とした。また、PC の表出が強陽性 (+) と弱陽性 (-) の NTHi の定着性を測定する際、プレート内にスリットを挿入し、スリットに付着した培養細胞とそれに接着する NTHi の形態を走査型電子顕微鏡下に観察した。統計学的解析には unpaired Student's t-test と Chi-squared test を用い、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。

## 結 果

### ① 対象症例の背景

鼻咽腔の細菌学的検査を行った滲出性中耳炎患児は 89 例で、その内 40 例 (45%) から NTHi が検出された。男児 16 例、女児 24 例で、年齢は 2～11 歳 (平均年齢 4.9 歳) であった。また、PC の発現強度が (+) 群は 20 例、(±) 群は 5 例、(-) 群は 15 例であった。各群の平均年齢、性別、上咽頭からインフルエンザ菌が分離採取された月を表 1 に示す。年齢、採取した月、性別に各群間で有意差は認めなかった。

表1：PCの発現強度と年齢・性別・採取時期の比較

| PC発現 | 症例数(数) | 年齢(歳)     | 性別(男:女) | 採取時期(月)   |
|------|--------|-----------|---------|-----------|
| (+)  | 20     | 4.5 ± 1.5 | 7:13    | 4.5 ± 2.9 |
| (±)  | 5      | 6.4 ± 3.0 | 3:2     | 2.6 ± 1.9 |
| (-)  | 15     | 5.3 ± 1.3 | 5:10    | 5.9 ± 3.1 |

3群間に背景因子の有意な差はみられなかった。

## ② PC発現と臨床経過

上咽頭細菌検査までの月数を滲出性中耳炎の病悩期間としてPCの発現強度と比較すると(+)群の平均病悩期間は5.3ヶ月であるのに対して、(±)群は1.2ヶ月、(-)群では1.5ヶ月であり、(+)群は他の群と比較して有意に病悩期間が延長していた。(図2)中耳炎の反復回数については、(+)群の平均中耳炎罹患回数は3.6回であるのに対して、(±)群では1.5回、(-)群では3.3回であり、有意差を認めなかった。PCの発現強度と慢性副鼻腔炎や鼻アレルギーの合併に関しては、(±)群で比較的高い合併率を認めるものの、3群間で明らかな差を認めなかった。(表2)

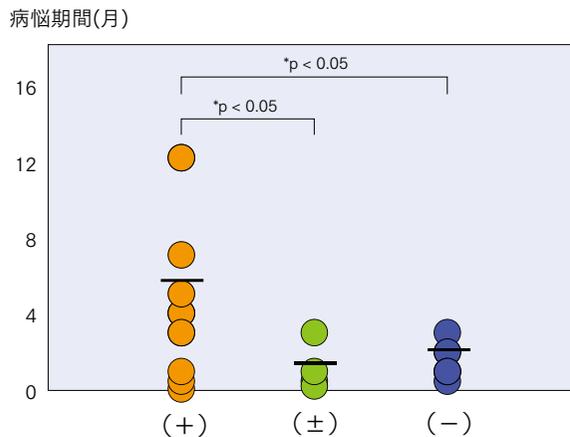


図2：PCの発現強度と滲出性中耳炎の病悩期間の比較

菌検査施行時の滲出性中耳炎の病悩期間については、PC発現の(+)群では平均5.3ヶ月、(±)群では1.2ヶ月、(-)群では1.5ヶ月であり、(+)群では明らかな病悩期間の遷延化が認められた。

表2：PCの発現強度と慢性副鼻腔炎と鼻アレルギーの合併頻度の比較

| PC発現 | 慢性副鼻腔炎     | 鼻アレルギー     |
|------|------------|------------|
| (+)  | 5/20 (25%) | 8/20 (40%) |
| (±)  | 2/ 5 (40%) | 4/ 5 (80%) |
| (-)  | 3/15 (20%) | 8/15 (53%) |

PCの発現強度と合併症の頻度とに有意な関連は認められなかった。

大分大学耳鼻咽喉科では滲出性中耳炎に対してマクロライド少量療法やカルボシステインの投与を4週～12ヶ月間行なったのちに、中耳所見に改善がみられなければ鼓膜切開を施行し、鼓膜切開時にニカワ状の中耳貯留液を認めた場合は鼓膜換気チューブ留置術を行なっている。表3にPCの発現強度と治療内容を示すが、保存的治療に反応せず、鼓膜切開あるいは鼓膜チューブ留置術を行なった症例は、(+)群においては12例(60%)あり、(-)群でも8例(53%)と有意な差は認められなかった。しかし、鼓膜換気チューブ留置術を行なった症例は(+)群に多く、(+)群ではニカワ状の中耳貯留液を認める頻度が高いと思われた。そこで、PCの発現強度と鼓膜切開時の中耳貯留液の性状を比較したところ、(+)および(±)群では粘液性貯留液を多く認めたが、(-)群では漿液性貯留液を多く認めた。(表4)しかし、各群間に統計学的な有意差は認めなかった。

表3：PCの発現強度と治療法の比較

| PC 発現 | 保存的治療のみ    | 鼓膜切開+チューブ   | 鼓膜切開のみ     |
|-------|------------|-------------|------------|
| (+)   | 8/20 (40%) | 12/20 (60%) | 0/20 (0%)  |
| (±)   | 1/5 (20%)  | 2/5 (40%)   | 2/5 (40%)  |
| (-)   | 7/15 (47%) | 6/15 (40%)  | 2/15 (13%) |

保存的治療に反応せず鼓膜切開を行なった症例は、(+)群では12例(60%)、(-)群でも8例(53%)で有意な差を認めなかった。しかし、鼓膜換気チューブ留置術を行なった症例は(+)群に多かった。

表4：PCの発現強度と中耳貯留液の性状の比較

| PC 発現 | 漿液性        | 粘液性        | 膿性        |
|-------|------------|------------|-----------|
| (+)   | 4/12 (33%) | 7/12 (58%) | 1/12 (8%) |
| (±)   | 1/4 (25%)  | 3/4 (75%)  | 0/4 (0%)  |
| (-)   | 5/8 (62%)  | 3/8 (38%)  | 0/8 (0%)  |

(+)および(±)群では粘液性貯留液が多く、(-)群では漿液性貯留液が多かった。

### ③ PCの発現強度と培養ヒト結膜上皮へのNTHiの接着性の関連性

PCの発現強度別の培養ヒト結膜上皮細胞へのNTHiの接着数、そして、投与前のNTHi浮遊液中の細菌数と細菌接着実験後の洗浄液中の細菌数から算出した細菌接着率の成績を図3に示す。(+)群におけるNTHiの上皮細胞接着数は $2.3 \pm 0.4 \log_{10} \text{ cfu/ml}$ であり、(-)群の $1.8 \pm 0.5 \log_{10} \text{ cfu/ml}$ と比較して有意に高値であった。平均細菌接着率も、(+)群では $17.6 \pm 18.5 \%$ であるのに対して、(-)群で $5.3 \pm 4.2 \%$ であり、有意に(-)群と比較して高値であった。

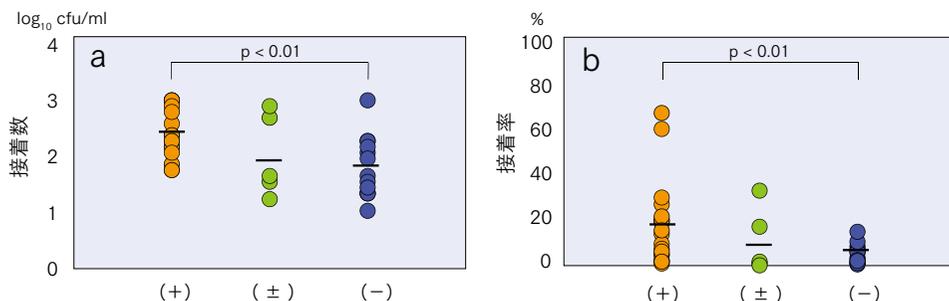


図3：PCの発現と培養ヒト結膜上皮細胞へのNTHi接着数と接着率の比較

NTHiの平均接着数は、PC発現が(+)群では $2.3 \log_{10}$  cfu/ml、(±)群では $1.9 \log_{10}$  cfu/ml、(-)群では $1.8 \log_{10}$  cfu/mlであり、(+)群では(-)群と比較して有意なNTHi接着数の増加を認めた。(図3a) NTHi浮遊液中の細菌数を100%とした場合の洗浄後の平均細菌接着率は、PC発現が(+)の群では18.0%、(±)群では7.7%、(-)群では5.3%であり、(+)群では(-)群と比較して有意なNTHi接着率の増加を認めた。(図3b)

走査型顕微鏡下にヒト結膜上皮細胞に接着したNTHiを観察したところ、(+)群では細胞表面に集簇し接着した多数のNTHiを認めたが、(-)群ではNTHiの接着は全くみられなかった。(図4)

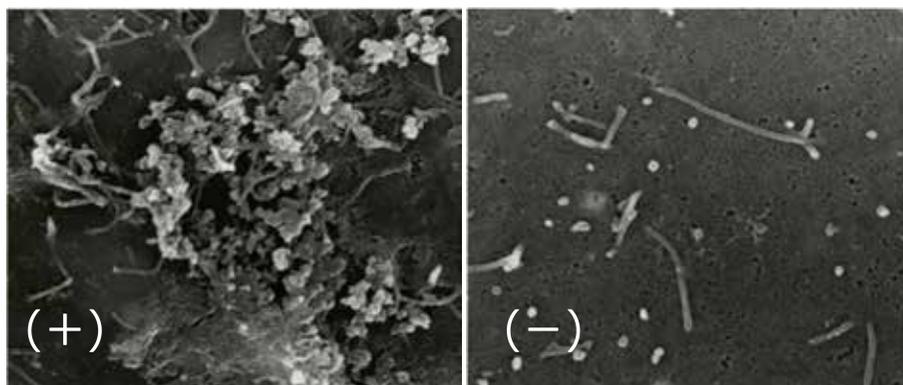


図4：ヒト結膜上皮細胞に接着したNTHiの走査型顕微鏡所見

PCの発現が(+)群では上皮細胞表面に多数のNTHiの接着を認めたが、(-)群ではNTHiの接着はみられなかった。

## 考 察

PCは肺炎球菌を代表とするグラム陽性菌のリポタイコ酸や糖脂質といった細胞壁の構成成分の1つであり、細菌の気道粘膜上皮への定着や浸潤に関与しており、敗血症や髄膜炎などの全身感染症を来す因子と考えられている。しかし、グラム陰性菌であるインフルエンザ菌が有するLPSにもPCが存在することが報告され<sup>11)</sup>、Weiserら<sup>12)</sup>は、インフルエンザ菌のLic1遺伝子が真核生物のcholine kinaseと相同性を有し、CAATのタンデムリピートによる分子スイッチがLPSにおけるPCの発現を調整しphase variationを誘導すること発見した。このPCの発現の強度によってインフルエンザ菌の培地上のコロニー像が変化し、opaque型とtransparent型に形態が分けられ、PCを強発現するtransparent

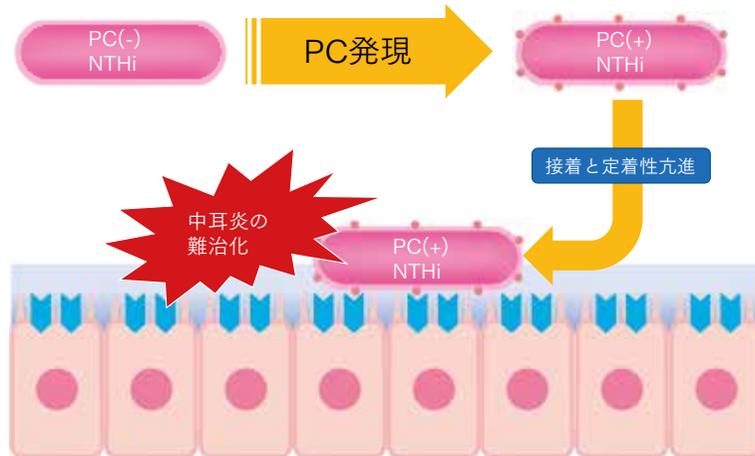
型は高分子量のLPSを有し、ラットの鼻咽腔などの粘膜表面への定着に参与し、血清中のCRPと補体による殺菌感受性が高い。一方、opaque型は低分子量のLPSを有し、血清中のCRPや補体活性に対して抵抗性を持つが粘膜への定着性が消失する<sup>13)</sup>。さらにSwordら<sup>5)</sup>は、NTHiのLOSにおいてもPCの発現によるphase variationが存在することを証明し、NTHiはPCを発現したLOSを介してヒト気道上皮細胞表面のPAF受容体と結合し、本菌の上皮細胞へ接着と細胞内侵入を誘導することを明らかにした<sup>5)</sup>。PCを発現したNTHiが疾患に与える影響について動物モデルを用いた解析も行われており、Tongら<sup>14)</sup>はチンチラにNTHiを経鼻投与し、PCを発現するNTHiはPC発現の無いNTHiと比較して鼻咽腔のクリアランスが低下し中耳炎が遷延化することを実証し、PCの発現がNTHiによる中耳炎の遷延化に参与すると述べている。また、NTHiは慢性閉塞性呼吸器疾患の急性増悪を来すことも知られており、Pangら<sup>15)</sup>は、マウスにNTHiを経気管的に投与し、PCを発現するNTHiはこれを発現しないNTHiと比較して肺からのクリアランスが遅延する事を報告している。以上の所見から、PCの発現がNTHiの上皮細胞への接着そして鼻咽腔への定着の関与することが示唆される。

今回の我々の研究では、小児滲出性中耳炎患児の鼻咽腔から分離したNTHiのうちPCの発現が中等度以上であった症例は62.5%であり、PCの発現が90%以上であったとするヒト気道上皮におけるNTHiに関する報告<sup>16)</sup>と比較するとPCの発現率は若干低かった。しかし、PC強陽性群ではPC弱陽性群と比較して有意に中耳炎の病期期間が遷延化し、鼓膜切開時にニカワ状の貯留液を多く認め、それゆえ鼓膜換気チューブ留置術の施行率が高かったことから、PCの発現が滲出性中耳炎の遷延化や難治化に関与していると考えられる。また、*in vitro*での検討においても、PC強陽性群ではヒト結膜上皮細胞へのNTHiの接着数がPC弱陽性群よりも有意に高かったことから、PCが発現することによってNTHiの鼻咽腔上皮への定着が亢進すると推測される。それを支持する所見として、Pooleら<sup>17)</sup>のNTHiのphase variationとヒト鼻咽腔における定着性について検討した報告がある。彼らは、ヒト健常者に、NTHi 2019を遺伝学的に改変しPCの発現を阻止したNTHi 2019Str<sup>R1</sup>を経鼻投与し、その後6日間経鼻的に鼻咽腔から検出されたNTHi 2019Str<sup>R1</sup>のphase variationに関わる13部位の遺伝子の変化を検討し、phosphorylcholine kinaseとIgA proteaseをエンコードする*licA*および*igaB*領域の分子スイッチが経鼻投与後にoffからonへと変化してPCを発現するようになることを証明した。

これらの結果から、NTHiにおけるPCの発現が鼻咽腔への本菌の定着を亢進し、このPC発現によってもたらされるphase variationがNTHiによる滲出性中耳炎の遷延化や難治化に影響を与えていると考えられた。

## 結 語

NTHiにおけるPCの発現は鼻咽腔への本菌の定着に関与し、PCの発現強度が小児滲出性中耳炎の遷延化・難治化に影響を及ぼす。



## 参考文献

- 1) Shimamura K, Shigemi H, Kurono Y, et al. The role of bacterial adherence in otitis media with effusion. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1990;116:114-1146.
- 2) Freijd A, Bygdeman S, B Rynnel-Dagoo. The nasopharyngeal microflora of otitis-prone children, with emphasis on *H. influenzae*. Acta Otolaryngol 1984;97:117-126.
- 3) Foxwell AR, Kyd JM, Cripps AW. Nontypeable *Haemophilus Influenzae*: pathogenesis and prevention. Microbiol Mol Rev 1998;62:294-308.
- 4) Weiser JN, Love JM, Moxon ER. The molecular mechanism of phase variation of *H. influenzae* lipopolysaccharide. Cell 1989;59:657-665.
- 5) Swords WE, Buscher BA, Ver Steeg Ii K, et al. Non-typeable *Haemophilus influenzae* adhere to and invade human bronchial epithelial cells via an interaction of lipooligosaccharide with the PAF receptor. Mol Microbiol 2000;37:13-27.
- 6) Harnett W, Harnett MM. Phosphorylcholine: friend or foe of the immune system? Immunol Today 1999;20:125-129.
- 7) Langereis JD, Hermans PW. Novel concepts in non-typeable *Haemophilus influenzae* biofilm formation. FEMS Microbiol Lett 2013;346:81-89.
- 8) Fujita K, Hirano T, Kodama S, et al. Prognostic impact of phosphorylcholine expression in nontypeable *Haemophilus influenzae* in otitis media with effusion. Acta Oto-Laryngol 2009;129:832-838.
- 9) Weiser JN, Shchepetov M, Chong STH. Decoration of lipopolysaccharide with phosphorylcholine: a phase-variable characteristic of *Haemophilus influenzae*. Infect Immun 1997;65:943-950.
- 10) Sun J, Chen J, Cheng Z, et al. Biological activities of antibodies elicited by lipooligosaccharide based-conjugate vaccines of nontypeable *Haemophilus influenzae* in an otitis media model. Vaccine 2000;18:1264-1272.

- 11) Kolberg J, Høiby EA, Jantzen E. Detection of the phosphorylcholine epitope in *streptococci*, *Haemophilus* and pathogenic Neisseriae by immunoblotting. *Microb Pathog* 1997;22:321-329.
- 12) Weiser JN, Pan N. Adaptation of *Haemophilus influenzae* to acquired and innate humoral immunity based on phase variation of lipopolysaccharide. *Mol Microbiol* 1998;30:767-775.
- 13) Weiser JN. Relationship between colony morphology and the life cycle of *Haemophilus influenzae*: the contribution of lipopolysaccharide phase variation to pathogenesis. *J Infect Dis* 1993;168:672-680.
- 14) Tong HH, Blue LE, James MA, et al. Evaluation of phase variation of nontypeable *Haemophilus influenzae* lipooligosaccharide during nasopharyngeal colonization and development of otitis media in the chinchilla model. *Infect Immun* 2000;68:4593-4597.
- 15) Pang B, Winn D, Johnson R, et al. Lipooligosaccharides containing phosphorylcholine delay pulmonary clearance of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 2008;76:2037-2043.
- 16) Weiser JN, Pan N, McGowan KL, et al. Phosphorylcholine on the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae* contributes to persistence in the respiratory tract and sensitivity to serum killing mediated by C-reactive protein. *J Exp Med* 1998;187:631-640.
- 17) Poole J, Foster E, Chaloner K, et al. Analysis of nontypeable *Haemophilus influenzae*-variable genes during experimental human nasopharyngeal colonization. *J Infect Dis* 2013;208:720-727.

### 3) IgA 腎症

#### 〈Summary〉

IgA 腎症におけるホスホリルコリン (PC) 特異的免疫応答の関与を検討するため、扁桃リンパ球を分離し、PC 特異的免疫グロブリン産生細胞数を測定した。また、血清中の PC 特異的免疫グロブリン濃度を定量し、臨床検査所見と比較した。その結果、IgA 腎症では扁桃における PC 特異的 IgA 産生細胞数が増加し、透析導入リスクが高い群で有意に多かった。一方、血清中の PC 特異的 IgM 濃度は透析導入リスクが低い群で有意に高値を示した。以上の結果から、扁桃および末梢血中の PC 特異的免疫応答が、IgA 腎症の病態や重症化に関与していることが示唆された。

#### はじめに

IgA 腎症は1968年に Berger ら<sup>1)</sup>が最初に報告し、慢性糸球体腎炎の約30%を占め、発症からおよそ20年の経過中に30~40%の症例が末期腎不全に陥る予後不良な疾患である<sup>2)</sup>。本症では、腎糸球体メサンギウム領域に口蓋扁桃(扁桃)などの粘膜系の免疫臓器で産生されるIgAと同じくJ鎖を有する多量体IgA1の沈着を認める<sup>3)</sup>。また、扁桃摘出術とステロイドパルス療法の併用が有効であることから<sup>4)</sup>、扁桃における免疫応答がその病態に関与していると考えられている。

扁桃のIgA腎症における免疫学的関与を示唆する報告として、IgA腎症患者の腎糸球体メサンギウム領域にはパラインフルエンザ菌の外膜抗原が高頻度に沈着し、さらにIgA腎症患者の扁桃リンパ球をこの抗原で刺激すると、慢性扁桃炎と比較して抗原特異的IgAの産生が有意に亢進していることが示されている<sup>5,6)</sup>。こうした獲得免疫系を介したT細胞依存性のIgA産生に加えて、自然免疫系による免疫応答も関与し、TLR9のリガンドであるCpG ODN刺激によってもIgA腎症患者の扁桃リンパ球はIgAを過剰産生する<sup>7)</sup>。また、IgA腎症の扁桃胚中心では、T細胞非依存性に免疫グロブリンを産生し自然免疫系の細胞と考えられているB1細胞が有意に増加している<sup>8)</sup>。

IgA腎症の病態を解明するため、動物モデルを用いた研究も進められ、その一つとして、ホスホリルコリン(PC)特異的IgAとPCを構成成分とする肺炎球菌のC多糖体を連日投与することで本症のモデルが作成できることが報告されている<sup>9)</sup>。PCはグラム陽性および陰性菌など様々な微生物の細胞膜上に存在する因子であり、炎症反応の指標であるC反応性蛋白(C-reactive protein: CRP)の標的因子としても知られている<sup>10)</sup>。また、B1細胞によって産生されるPC特異的IgMは自然抗体として生体防御に働き、全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus: SLE)患者の中でPC特異的IgMが高値な症例は臓器障害が少なく<sup>11)</sup>、腎透析患者でPC特異的IgMが低値な症例は予後が不良なことが報告されている<sup>12)</sup>。しかし、IgA腎症におけるPC特異的免疫グロブリンの関与については未だ検討がなされていない。

そこで、本研究では、扁桃におけるPC特異的免疫グロブリン産生細胞数ならびに血清中PC特異的免疫グロブリン濃度を測定し、IgA腎症の重症度や腎機能と比較し、PCに対する免疫応答とIgA腎症の病態との関連性について検討した。

## 対象と方法

当科で扁桃摘出術を行ったIgA腎症および慢性扁桃炎症例それぞれ26例、計52例を対象とした。

摘出された扁桃および末梢血から比重遠心法でリンパ球を分離し、PC特異的免疫グロブリン産生細胞数をELISPOT法により測定した<sup>13)</sup>。簡単に記すと、リンパ球をPC結合牛血清アルブミン(PC-BSA)でコーティングした96穴ニトロセルロース膜プレート(Millipore)上に細胞を分注し、HRP標識抗ヒトIgM、IgG、IgAを添加し、基質を加えて発色した細胞数を実体顕微鏡下に算定した。

PC特異的免疫グロブリンはELISA法で測定した<sup>14)</sup>。まず、PC-BSAでコーティングしたプレートに段階希釈した患者血清を添加し、HRP標識抗ヒト血清IgM、IgG、IgAを加えた後に発色させた。対照として段階希釈したマウスPC特異的IgA(TEPC-15)を添加して反応させ、その吸光度で標準曲線を作成し、これに血清の吸光度を対比させて血清中PC特異的免疫グロブリンそれぞれの濃度を算出した。

IgA腎症患者の臨床所見として、CRP、白血球数、血清中クレアチニンを鹿児島大学病院臨床検査部で測定した。また、IgA腎症診療指針(第3版)に基づき、透析導入リスクを低リスク群、中等リスク群、高リスク群、超高リスク群の4群に分類した<sup>15)</sup>。

## 結果

### ① 対象症例の背景

IgA腎症26例中男性は15例、女性11例で、平均年齢は30.6歳であった。対照とした慢性扁桃炎26例は男女とも13例で、平均年齢は24歳とIgA腎症よりも若干若かったが、性別、年齢に有意差はなかった。(表1) IgA腎症の透析導入リスクは、低リスク群6例、中等リスク群2例、高リスク群8例、超高リスク群10例で、超高リスク群は男性が多く、平均年齢も他の群と比較して有意に高かった(低リスク群 vs 超高リスク群:  $p < 0.01$ 、中等リスク群 vs 超高リスク群:  $p < 0.05$ )。

表1：対象の年齢・性別

|        | 症例数 | 平均年齢 | 性別(男/女) |
|--------|-----|------|---------|
| IgA腎症  |     |      |         |
| 低リスク群  | 6   | 23.3 | 2/4     |
| 中等リスク群 | 2   | 28.5 | 2/0     |
| 高リスク群  | 8   | 26.5 | 4/4     |
| 超高リスク群 | 10  | 39.2 | 7/3     |
| 合計     | 26  | 30.6 | 15/11   |
| 慢性扁桃炎  | 26  | 24.0 | 13/13   |

## ② 扁桃および末梢血中の PC 特異的免疫グロブリン産生細胞数

扁桃における PC 特異的免疫グロブリン産生細胞数は慢性扁桃炎と比較して IgA 腎症で高値を示し、IgA 産生細胞数は有意に高かった。末梢血中の PC 特異的免疫グロブリン産生細胞数は扁桃と比較して著しく少なく、有意差はみられなかったが、IgA 腎症よりも慢性扁桃炎で高値であった。(図1)

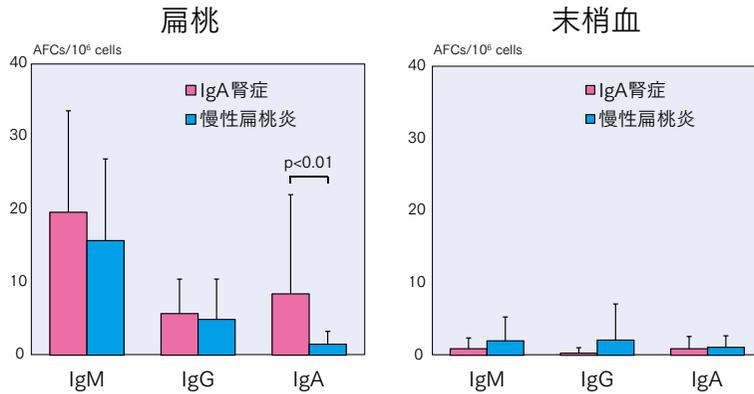


図1：扁桃および末梢血中の PC 特異的免疫グロブリン産生細胞数

IgA 腎症の透析導入リスクの低リスク群と中等リスク群をまとめ、高リスク群、超高リスク群の3群で PC 特異的免疫グロブリン産生細胞数を比較すると、超高リスク群では、低・中等リスク群、高リスク群よりも扁桃における PC 特異的 IgG および IgA 産生細胞数が有意に高値であった。一方、末梢血中の PC 特異的免疫グロブリン産生細胞数には有意な差はみられなかった。(図2)

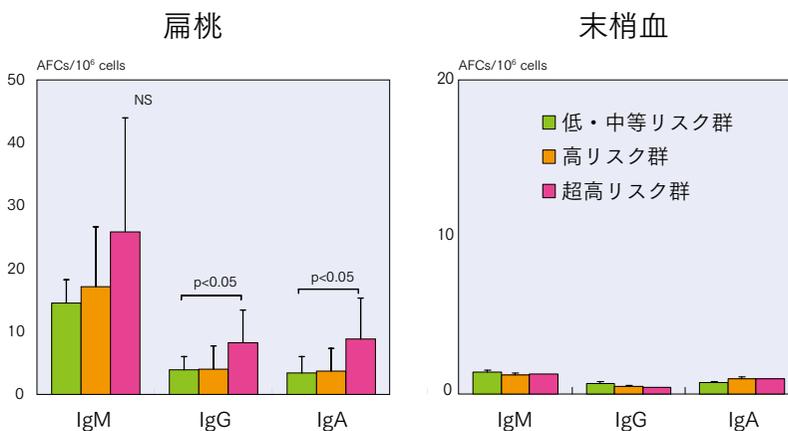


図2：扁桃および末梢血中の PC 特異的免疫グロブリン産生細胞数と予後

③ IgA 腎症の臨床所見と PC 特異的免疫グロブリン産生細胞数の比較

IgA 腎症の透析導入リスクと血液生化学的検査成績を比較すると、超高リスク群では他の群と比較して、血清クレアチニン値が有意に高値であった。CRP 値もリスクが増すにつれて高値を示したが有意差はなかった。(図3)

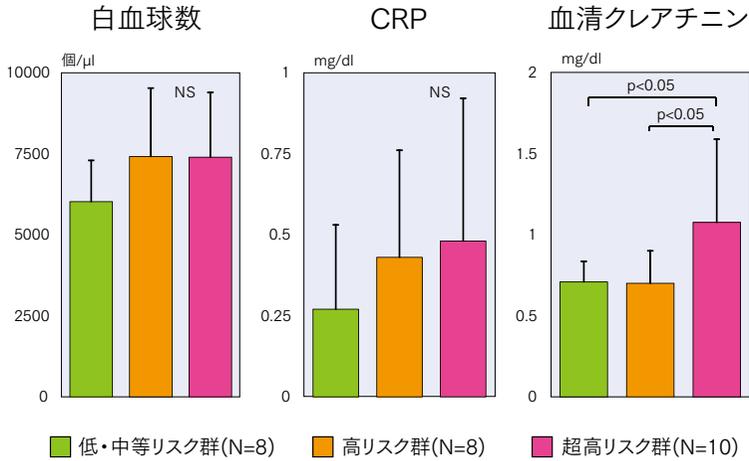


図3：IgA 腎症の予後と血液生化学検査成績

そこで、血清クレアチニン値を扁桃における PC 特異的免疫グロブリン産生細胞数と比較したところ、PC 特異的 IgA 産生細胞数との間に有意な正の相関が認められた。(図4)

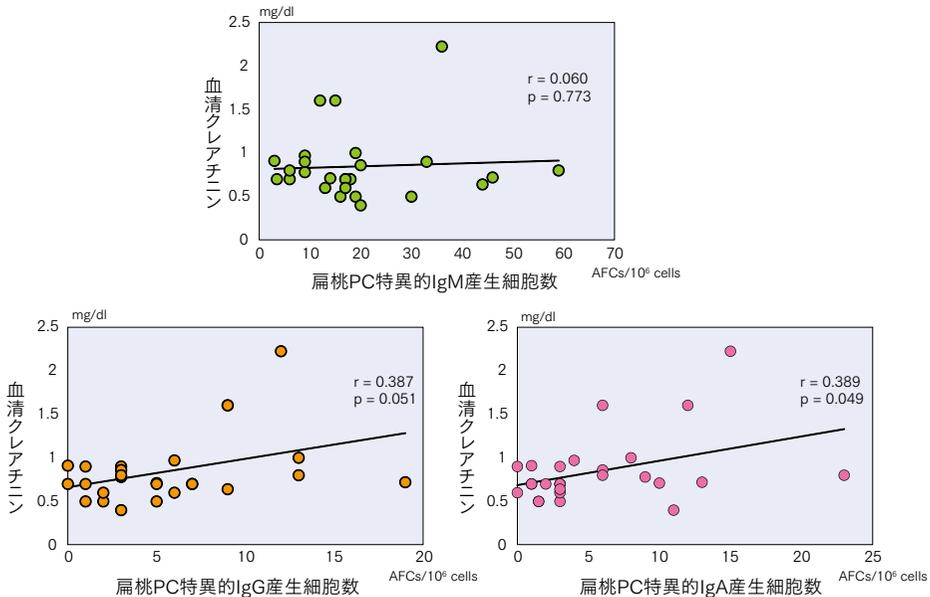


図4：扁桃における PC 特異的抗体産生細胞数と血清クレアチニン値

④ 血清中 PC 特異的免疫グロブリンと臨床所見

血清中の PC 特異的免疫グロブリン濃度を IgA 腎症と慢性扁桃炎で比較すると、PC 特異的 IgG は慢性扁桃炎で有意に高く、IgM と IgA には有意な差はみられなかった。(図 5)

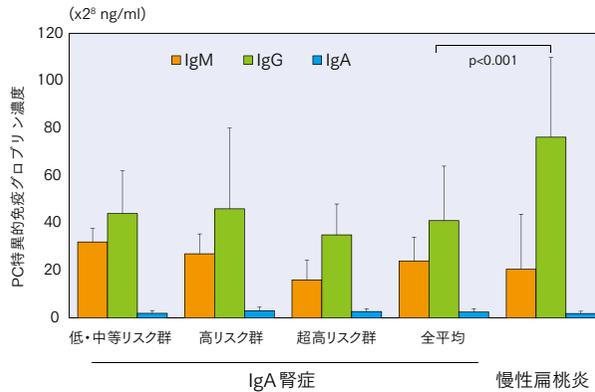


図 5 : IgA 腎症と慢性扁桃炎の血清中 PC 特異的免疫グロブリン

しかし、IgA 腎症における血清中 PC 特異的免疫グロブリン濃度を透析導入リスク群別に比較したところ、PC 特異的 IgM は低・中等リスク群と比較して超高リスク群で有意に低値であった。(図 6)

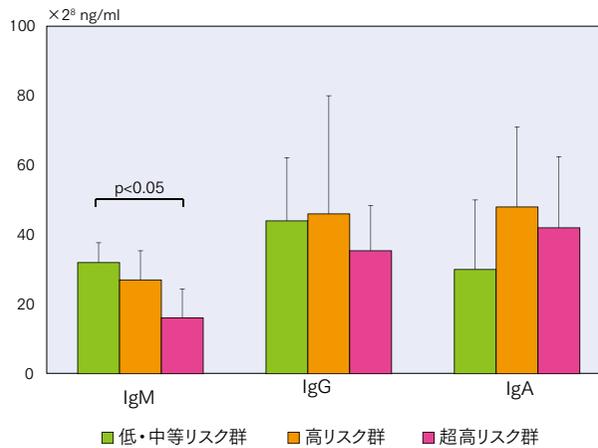


図 6 : 血清中 PC 特異的免疫グロブリンと透析導入リスク

超高リスク群では血清クレアチニンが有意に上昇していたため、血清クレアチニン値と血清中のPC特異的免疫グロブリン濃度との相関を検討した。その結果、いずれの免疫グロブリンにおいても有意な相関は認められなかったが、PC特異的IgGとIgAは血清クレアチニンと正の相関を示すのに対して、PC特異的IgMとは負の相関を示した。(図7)

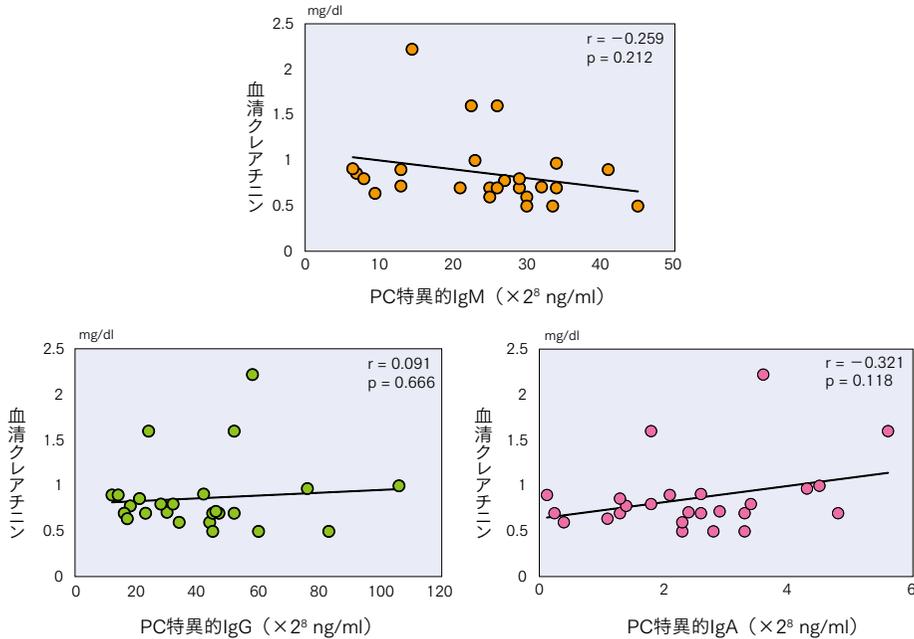


図7：血清中PC特異的免疫グロブリンと血清クレアチニンの相関

血清CRP値もリスクが増すにつれて上昇していること、PC特異的IgMがCRPと同様に自然免疫系の因子として作用することから、PC特異的IgMとCRPの相関を観察した。その結果、有意な相関はなかったが、血清クレアチニンと同様にPC特異的IgM濃度はCRP値と負の相関を示した。(図8)

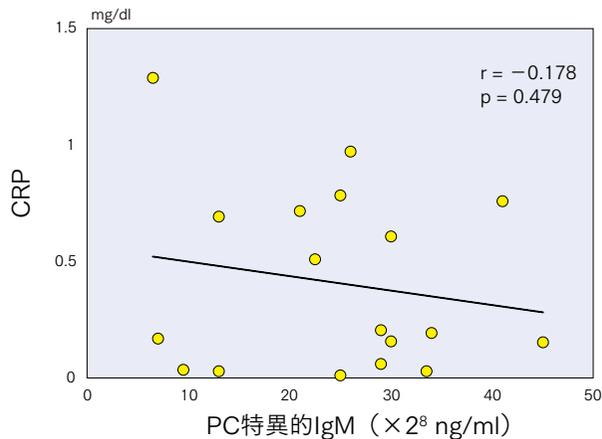


図8：血清中PC特異的IgMとCRPの相関

### ⑤ 血清中 PC 特異的免疫グロブリンの男女差

透析導入リスクの超高リスク群に男性が多かったことから、CRP 値と血清クレアチニン値を男女で比較すると、両者とも男性が高値で、血清クレアチニンは男女間で有意差がみられた。(図9) そこでさらに、血清中 PC 特異的免疫グロブリン濃度を男女で比較すると、有意差はないが、PC 特異的 IgM そして IgG も女性がやや高値であった。(図10)

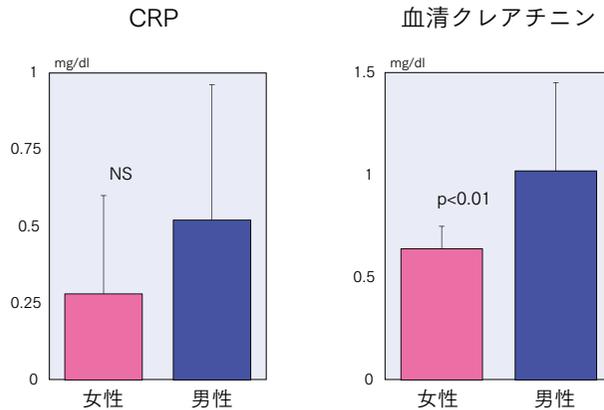


図9：CRP、血清クレアチニンの男女での比較

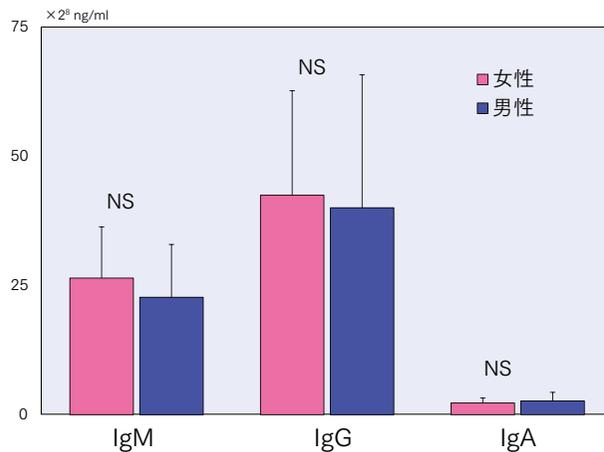


図10：血清中 PC 特異的免疫グロブリンの男女での比較

### 考 察

IgA 腎症患者の扁桃では対照群と比較して IgA 産生形質細胞の割合と数が増加していること<sup>16)</sup>、さらに in situ hybridization 法を用いた研究によって、扁桃の胚中心や濾胞間に J 鎖 mRNA 陽性の多量体 IgA を産生する形質細胞が有意に多く認められることが報告され<sup>17)</sup>、本症における腎糸球体メサンギウム領域に沈着する多量体 IgA の産生部位が扁桃であることが指摘されている。また、IgA 腎症の扁桃リンパ球を細菌由来の抗原で刺激すると抗原特異的な IgA の産生が増強することが知られ<sup>6)</sup>、IgA 腎症の扁桃では何らかの

細菌抗原に特異的な IgA 応答が亢進していると考えられる。しかし、IgA 腎症患者の扁桃における抗原特異的免疫グロブリン産生細胞の数については、未だ報告がなされていない。そこで、今回、扁桃および末梢血中の PC 特異的免疫グロブリン産生細胞数を ELISPOT 法で測定したところ、IgA 腎症患者の扁桃では慢性扁桃炎患者と比較して有意に PC 特異的 IgA 産生細胞数が増加していた。また、透析導入リスク群別に PC 特異的免疫グロブリン産生細胞数を比較すると、PC 特異的 IgG と IgA は超高リスク群で低・中等リスク群より有意に高値であった。さらに、超高リスク群では他の群と比較して血清クレアチニンが高値であったため、血清クレアチニンと扁桃の PC 特異的免疫グロブリン産生細胞数との相関をみたところ、PC 特異的 IgA 産生細胞数は有意の、PC 特異的 IgG も有意ではないが強い正の相関を示した。これらの結果そして IgA 腎症では多量体 IgA のみならず IgG の付着も認められることから<sup>1)</sup>、PC 特異的 IgA および IgG 産生細胞数の増加が IgA 腎症の重症度に関与していると推測される。

PC は肺炎球菌の C 多糖体の構成因子であり、PC 特異的 IgA である TEPC-15 とともに投与することで免疫複合体が形成され、これが腎糸球体に沈着して実験的 IgA 腎症が発症する<sup>9)</sup>。一方、PC は様々な正常細胞にも発現するが、興味深いことに TEPC-15 は宿主の正常細胞を構成する PC は認識せず、炎症などによってアポトーシスを起こした細胞とのみ反応してこれを除去し、生体防御と恒常性の維持に重要な役割を担っている<sup>18,19)</sup>。したがって、今回の実験で観察された扁桃における PC 特異的 IgA および IgG 産生細胞の増加は IgA 腎症発症の原因ではなく、CRP 値の上昇から推測されるように、超高リスク群の扁桃では炎症によって種々の細胞のアポトーシスが生じ、その処理のために扁桃で PC 特異的免疫応答がより強く誘導された結果とも考えることができる。それを支持する所見として、IgA 腎症では腎糸球体メサンギウム領域に沈着するパラインフルエンザ菌の外膜抗原に対する血清中 IgA および IgG 抗体価が対照と比較して有意に高値であることが報告されているが<sup>5,20)</sup>、末梢血中の PC 特異的免疫グロブリン産生細胞数そして血清中の PC 特異的免疫グロブリン濃度は慢性扁桃炎と比較してむしろ低値であった。したがって、扁桃における PC 特異的免疫応答の腎臓や全身への直接的な影響は少ないと思われる。

血清中 PC 特異的 IgM が低・中等リスク群と比較して超高リスク群で有意に低値であったことから、これが自然抗体として IgA 腎症の進行を防御している可能性がある。PC 特異的 IgM の抗炎症作用や生体防御作用については動脈硬化症や SLE ですでに多くの研究がなされ、PC 特異的 IgM は動脈硬化の危険因子となる酸化低密度リポタンパク質 (oxLDL) と交差反応し、PC 特異的 IgM 抗体価が高い高血圧症患者は動脈硬化の進行が抑制されることが知られている<sup>21)</sup>。また、SLE 患者で心筋梗塞の既往がない症例や臓器障害が軽度の症例では、心筋梗塞合併例や臓器障害が高度な症例と比較して血清中の PC 特異的 IgM が有意に高値であることが報告されている<sup>11)</sup>。さらに、PC 特異的 IgM が低い腎透析患者では死亡のリスクが高いことなどから<sup>12)</sup>、PC 特異的 IgM と腎機能とに何らかの関連性があると推測される。しかし、SLE 症例における腎障害の有無でみると、カルジオリピンあるいは二本鎖 DNA 特異的 IgM とは有意な負の相関がみられたが、PC 特異的 IgM との相関は認められていない<sup>11)</sup>。本研究でも、PC 特異的 IgM は IgG や IgA と異

なり血清クレアチニンと負の相関を示したが、統計学的に有意ではなく、腎障害の重症度にはPC特異的IgM以外の他の様々な要因が関与していると考えられる。

CRPもPC特異的免疫グロブリンと同じくPCを標的とし、両者が競合的に作用する<sup>22)</sup>。そこで、両者の相関を検討したところ、有意ではないが、血清クレアチニンと同様に負の相関がみられた。また、CRPと血清クレアチニンを男女で比較すると、ともに女性が男性よりも低値で、PC特異的IgMは女性に高い傾向がみられた。動脈硬化症に関する研究では、PC特異的IgMは男性よりも女性で高く、それが女性に本疾患が少ない要因の一つと考えられている<sup>21,23)</sup>。IgA腎症に関しては、本邦では性差はないとされるが、海外では男性の発症頻度が高く<sup>15)</sup>、本研究の対象となった症例でも男性が多かった。自然抗体として産生されるPC特異的IgMが炎症や自己免疫疾患の重症化を抑制することが指摘されており<sup>24)</sup>、IgA腎症においてもPC特異的IgMがその発症や重症化に何らかの関与をしていると予想され、今後さらに症例を積み重ねて検討する必要がある。そして、そのことが実証されれば、動脈硬化症などに対して進められているPCをターゲットとするワクチンが、本症の予防にも応用できるかもしれない<sup>24,25)</sup>。

## 結 語

IgA腎症の扁桃ではPC特異的IgA産生細胞数が増加しており、本症の病態への関与が示唆された。一方、血清中のPC特異的IgMは本症の重症化に対して防御的な作用をしていると考えられた。(図11)

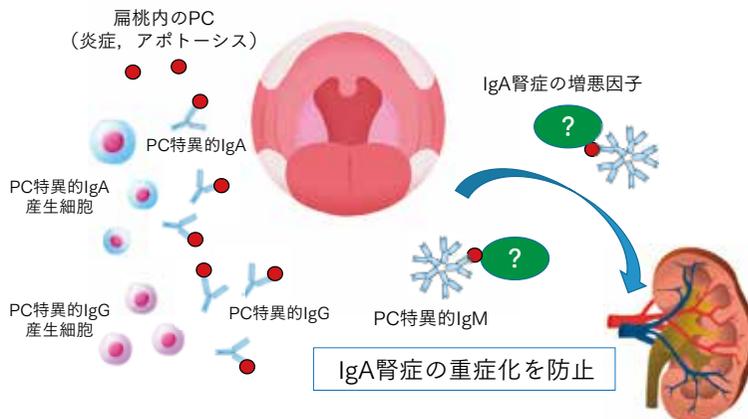


図11：IgA腎症におけるPC特異的免疫応答

## 参考文献

- 1) Berger J, Hinglais N. Intercapillary deposits of IgA-IgG. *J Urol Nephrol* 1968;74:694-695.
- 2) Chauveau D, Droz D. Follow-up evaluation of the first patients with IgA nephropathy described at Necker Hospital. *Contrib Nephrol* 1993;104:1-5.
- 3) Suzuki H, Kiryluk K, Novak J, et al. The pathophysiology of IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2011;22:1795-1803.
- 4) Wang Y, Chen J, Wang Y, et al. A meta-analysis of the clinical remission rate and long-term efficacy of tonsillectomy in patients with IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26:1923-1931.
- 5) Suzuki S, Nakatomi Y, Sato H, et al. *Haemophilus parainfluenzae* antigen and antibody in renal biopsy samples and serum of patients with IgA nephropathy. *Lancet* 1994;343:12-16.
- 6) Suzuki S, Fujieda S, Sunaga H, et al. Immune response of tonsillar lymphocytes to *Haemophilus parainfluenzae* in patients with IgA nephropathy. *Clin Exp Immunol* 2000;119:328-332.
- 7) Goto T, Bandoh N, Yoshizaki T, et. Increase in B-cell-activation factor (BAFF) and IFN-gamma productions by tonsillar mononuclear cells stimulated with deoxycytidyl-deoxyguanosine oligodeoxynucleotides (CpG-ODN) in patients with IgA nephropathy. *Clin Immunol* 2008;126:260-269.
- 8) Kodama S, Suzuki M, Arita M, et al. Increase in tonsillar germinal centre B-1 cell numbers in IgA nephropathy (IgAN) patients and reduced susceptibility to Fas-mediated apoptosis. *Clin Exp Immunol* 2001;123:301-308.
- 9) Chao TK, Rifai A, Ka SM, et al. The endogenous immune response modulates the course of IgA-immune complex mediated nephropathy. *Kidney Int* 2006;70:283-297.
- 10) Volanakis JE, Wirtz KW. Interaction of C-reactive protein with artificial phosphatidylcholine bilayers. *Nature* 1979;281:155-157.
- 11) Grönwall C, Akhter E, Oh C, et al. IgM autoantibodies to distinct apoptosis-associated antigens correlate with protection from cardiovascular events and renal disease in patients with SLE. *Clin Immunol* 2012;142:390-398.
- 12) Carrero JJ, Hua X, Stenvinkel P, et al. Low levels of IgM antibodies against phosphorylcholine-A increase mortality risk in patients undergoing haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:3454-3460.
- 13) Tanimoto Y, Fukuyama S, Tanaka N, et al. Presence of keratin-specific antibody-forming cells in palatine tonsils of patients with pustulosis palmaris et plantaris (PPP) and its correlation with prognosis after tonsillectomy. *Acta Otolaryngol* 2014;134:79-87.
- 14) Tanaka N, Fukuyama S, Fukuiwa T, et al. Intranasal immunization with phosphorylcholine induces antigen specific mucosal and systemic immune responses in mice. *Vaccine* 2007;25:2680-2687.
- 15) 進行性腎障害に関する調査研究班：IgA 腎症診療指針—第3版—。日腎会誌 2011;53:123-135.
- 16) Béné MC, Hurault De Ligny B, Kessler M, et al. Confirmation of tonsillar anomalies in IgA nephropathy: a multicenter study. *Nephron* 1991;58:425-428.
- 17) Harper SJ, Allen AC, Béné MC, et al. Increased dimeric IgA-producing B cells in tonsils in IgA nephropathy determined by in situ hybridization for J chain mRNA. *Clin Exp Immunol* 1995;101:442-448.
- 18) Urbaneja MA, Chapman D. The binding of phosphorylcholine-carrying antigens to the anti-phosphorylcholine monoclonal antibody TEPC-15. A fluorescence spectroscopic study.

Biochim Biophys Acta 1989;998:85-90.

- 19) Shaw PX, Hörkkö S, Chang MK, et al. Natural antibodies with the T15 idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance, and protective immunity. *J Clin Invest* 2000;105:1731-1740.
- 20) Suzuki S, Gejyo F, Nakatomi Y, et al. Role of IgA, IgG, and IgM antibodies against *Haemophilus parainfluenzae* antigens in IgA nephropathy. *Clin Nephrol* 1996;46:287-295.
- 21) Su J, Georgiades A, Wu R, et al. Antibodies of IgM subclass to phosphorylcholine and oxidized LDL are protective factors for atherosclerosis in patients with hypertension. *Atherosclerosis* 2006;188:160-166.
- 22) Chang MK, Binder CJ, Torzewski M, et al. C-reactive protein binds to both oxidized LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand: Phosphorylcholine of oxidized phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:13043-13048.
- 23) Gigante B, Leander K, Vikström M, et al. Low levels of IgM antibodies against phosphorylcholine are associated with fast carotid intima media thickness progression and cardiovascular risk in men. *Atherosclerosis* 2014;236:394-399.
- 24) Grönwall C, Silverman GJ. Natural IgM: beneficial autoantibodies for the control of inflammatory and autoimmune disease. *J Clin Immunol* 2014;34:S12-S21.
- 25) Caligiuri G, Khallou-Laschet J, Vandaele M, et al. Phosphorylcholine-targeting immunization reduces atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:540-546.

## 4) アレルギー性鼻炎

### 〈Summary〉

ホスホリルコリン (PC) を保有する肺炎球菌を新生児マウスに腹腔内投与すると PC 特異的 IgM が誘導され、それによってその後の家ダニによるアレルギー性炎症の発症が抑制されることが知られている。そこで、アレルギー性鼻炎患者と健常者をハウスダスト (HD) への感作の有無によって HD 未感作・アレルギー性鼻炎未発症群 (未感作群)、HD 感作陽性・アレルギー性鼻炎未発症群 (未発症群)、HD アレルギー性鼻炎発症群 (発症群) の3群に分け、それぞれの PC に対する免疫応答を比較した。その結果、PC 特異的 IgG および IgA は女性のほうが男性よりも高値であり、女性の未感作群における PC 特異的 IgM および IgA 抗体価は未発症群のそれと比べて高値であった。一方、男性では未発症群におけるすべての PC 特異的免疫グロブリンが発症群と比べて高値であった。さらに、スギ花粉症患者を対象に同様の検討をおこなったところ、男女ともに未発症群の PC 特異的免疫グロブリンが発症群と比較して高値を示した。したがって、PC に対する免疫応答は男女で異なり、ハウスダストのみならず PC の含有量が少ないスギ抗原に対する感作、そしてアレルギー性鼻炎の発症に何らかの影響を及ぼしていると考えられた。

### はじめに

我々はこれまでに、ホスホリルコリン (PC) をマウスに経鼻および舌下投与することによって血清総 IgE の上昇が抑制され<sup>1)</sup>、さらに PC を経鼻投与することで卵白アルブミン (OVA) 感作アレルギー性鼻炎モデルの鼻症状や鼻粘膜への好酸球浸潤が減少し、血清中の OVA 特異的 IgE の上昇が抑制されることを報告した<sup>2)</sup>。これらの結果から、PC に対する粘膜免疫応答の誘導によってアレルギー性鼻炎の発症を予防できると推測される。また最近、家ダニ (HDM) の体表面にも PC が発現しており、新生児マウスに PC を持つ肺炎球菌死菌を腹腔内投与すると PC 特異的 IgM が産生され、それによってその後 HDM の経気管感作によってもたらされる下気道のアレルギー性炎症が抑制されることが報告されている<sup>3)</sup>。PC はヒトにおいても自然抗体として働き、PC 特異的 IgM が動脈硬化や自己免疫疾患の発症や重症化を抑えることが知られている<sup>4)</sup>。したがって、PC に対する免疫応答が、HDM をアレルゲンとするハウスダスト (HD) アレルギー性鼻炎の発症に何らかの影響を与える可能性があるかと推測される。

そこで、本研究では、ヒト血清中の PC 特異的抗体活性を測定し、HD およびスギへの感作ならびに HD アレルギー性鼻炎やスギ花粉症の発症との関連性について検討をおこなった。

## 対象と方法

2014～2016年に同意を得て研究に参加した20-30代の男女174名を対象とした。アレルギー症状について問診ならびアンケートを行い、皮膚テスト、鼻誘発テストを行った。さらに血液を採取し、血清中のHD2特異的IgE抗体（クラス）、総IgE値を蛍光酵素免疫測定法にて測定し、症状と検査所見から鼻アレルギー診療ガイドラインに沿ってアレルギー性鼻炎の診断を行った。そして、HDならびにスギへの感作の状況によって、未感作・アレルギー性鼻炎未発症群（未感作群）、感作陽性・アレルギー性鼻炎未発症群（未発症群）、アレルギー性鼻炎発症群（発症群）の3群に分類した。

さらに、血清中のPC特異的IgM、IgG、IgAそれぞれの抗体価（PC-IgM、PC-IgG、PC-IgA）をELISA法で測定し、PC特異的IgAの吸光度からその免疫グロブリン量を換算し算出した。また、コナヒョウヒダニ、ヤケヒョウヒダニ、スギ花粉それぞれの粗抽出物（株式会社LSL）、そしてアスペルギルスおよびアルテルナリア抽出物（ITEA株式会社）に含有されるPC量を、マウスPC特異的IgA（TEPC-15）を用いてELISA法で測定した。

## 結果

### ① 患者背景

174例中女性が74例、男性が100例で、それぞれ平均年齢は24.1歳、24.6歳であった。HDに対して未感作・アレルギー性鼻炎未発症群（未感作群）が75例（女性32例、男性43例）、HDに対して感作陽性・アレルギー性鼻炎未発症群（未発症群）が37例（女性15例、男性22例）、HDアレルギー性鼻炎発症群（発症群）62例（女性27例、男性35例）であった。スギに対しても同様に、未感作群が90例（女性34例、男性56例）、スギに対して感作陽性・未発症群が42例（女性21例、男性21例）、スギ花粉症発症例が42例（女性19例、男性23例）であった。（表1）

表1：患者背景

| 通年性アレルギー性鼻炎  |       | 女性          | 男性          |
|--------------|-------|-------------|-------------|
| 症例数          |       | 74          | 100         |
| 平均年齢（SE）     |       | 24.1 (0.29) | 24.6 (0.25) |
| 未感作群（%）      |       | 32 (43)     | 43 (43)     |
| 未発症群（%）      |       | 15 (20)     | 22 (22)     |
| 発症群（%）       |       | 27 (37)     | 35 (35)     |
| HD2特異的IgE抗体価 | クラス≤1 | 34          | 47          |
|              | クラス≥2 | 40          | 53          |

| スギ花粉症       |       | 女性          | 男性          |
|-------------|-------|-------------|-------------|
| 症例数         |       | 74          | 100         |
| 平均年齢（SE）    |       | 24.1 (0.29) | 24.6 (0.25) |
| 未感作群（%）     |       | 34 (46)     | 56 (56)     |
| 未発症群（%）     |       | 21 (28)     | 21 (21)     |
| 発症群（%）      |       | 19 (26)     | 23 (23)     |
| スギ特異的IgE抗体価 | クラス≤1 | 41          | 60          |
|             | クラス≥2 | 33          | 40          |

## ② ダニ、スギ花粉、アスペルギルス、アルテルナリア中の PC 含有の有無

ダニでは、コナヒョウヒダニ、ヤケヒョウヒダニはいずれも高濃度の PC を含有することが確認できた。一方、真菌では、アスペルギルスはダニと同程度の PC を含有するものの、アルテルナリアにはごく少量の PC しか認められなかった。また、スギ花粉に含まれる PC はアルテルナリアよりさらに少なかった。(図 1)

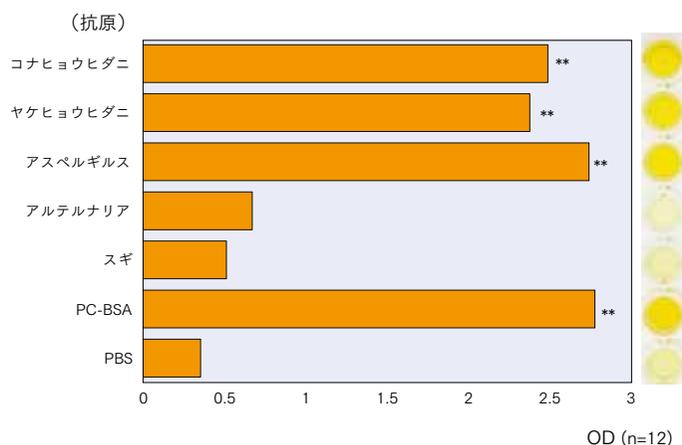


図 1：各種抗原における PC 含有量の比較と ELISA の所見（右写真）

コナヒョウヒダニ、ヤケヒョウヒダニ、アスペルギルスはいずれも高濃度の PC を含有することが確認できた。一方、アルテルナリアにはごく少量の PC しか認められず、スギ花粉に含まれる PC はアルテルナリアよりさらに少なかった。\* $p < 0.01$  (PBS との比較)。

## ③ 男女別の PC 特異的抗体価

PC 特異的 IgG (PC-IgG)、PC 特異的 IgA (PC-IgA) は女性において男性より有意に高かった。しかし、PC 特異的 IgM (PC-IgM) は男女でほぼ同レベルで、有意な差は認めなかった。(図 2)

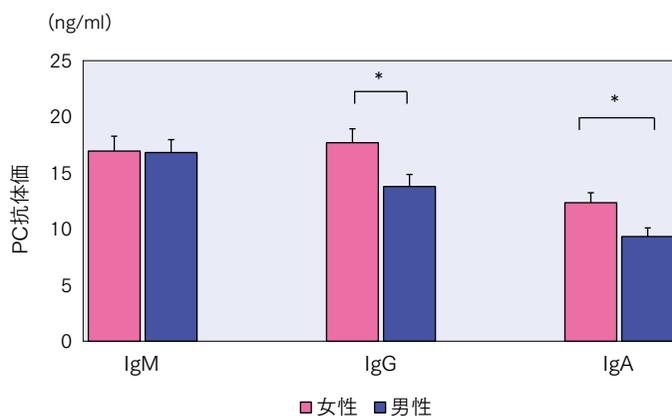


図 2：PC 抗体価の男女別比較

PC 特異的 IgG、IgA は女性において男性より有意に高かった。一方、PC 特異的 IgM は有意な差は認めなかった。\* $p < 0.05$ 。

## ④ PC 特異的抗体価と血清総 IgE 値の相関

PC に対する免疫応答が IgE 産生に及ぼす影響を知るため、PC 特異的抗体価と総 IgE 値の相関を検討した。その結果、IgM (相関係数： $r = 0.053$ 、 $p = 0.49$ )、IgG (相関係数： $r = 0.054$ 、 $p = 0.49$ )、IgA (相関係数： $r = 0.043$ 、 $p = 0.58$ ) のいずれのアイソタイプも血清総 IgE 値と有意な相関は認められなかった。

## ⑤ PC 特異的抗体価と HD への感作および HD アレルギー発症の関連性

女性の未感作群における PC-IgM および PC-IgA 抗体価は、有意差はないものの未発症群のそれと比べて高値であったが、未発症群と発症群の比較においては同様な傾向は見られなかった。一方、男性では、未発症群における PC-IgM および PC-IgA 抗体価は発症群のそれと比べて高値であり、PC-IgA は有意に高かった。(図 3)

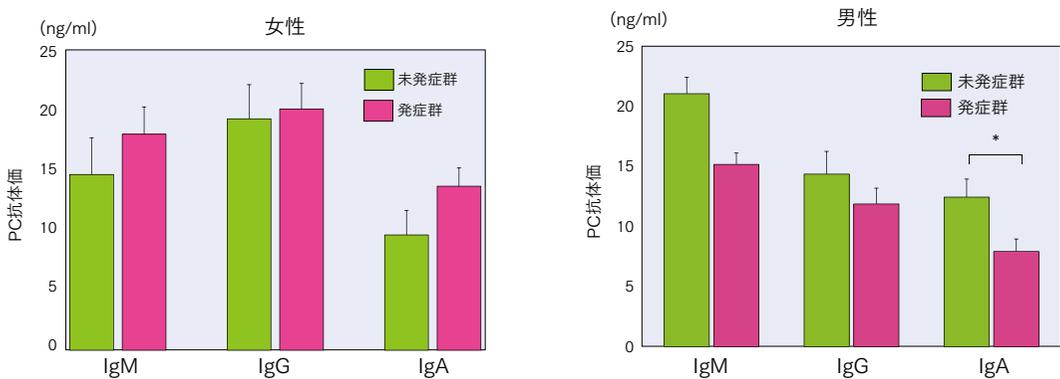


図 3：PC 特異的抗体価と HD への感作・発症の関連性

男性では、未発症群における PC-IgM および PC-IgA 抗体価は発症群のそれと比べて高値であり、PC-IgA は有意に高かった。女性では同様の傾向は見られなかった。

## ⑥ PC 特異的抗体価と HD2 に対する IgE 抗体価 (クラス)

HD2 に対する IgE 抗体価 (クラス) を 1 以下の群と 2 以上の群に分けて PC 特異的抗体価を比較したところ、有意差はなかったが女性では、PC-IgM、PC-IgG は 1 以下の群に比べ、2 以上の群で高かった。一方、男性では、1 以下の群の PC-IgM、PC-IgG が 2 以上の群に比べ高く、PC-IgG は有意に高値であった。(図 4)

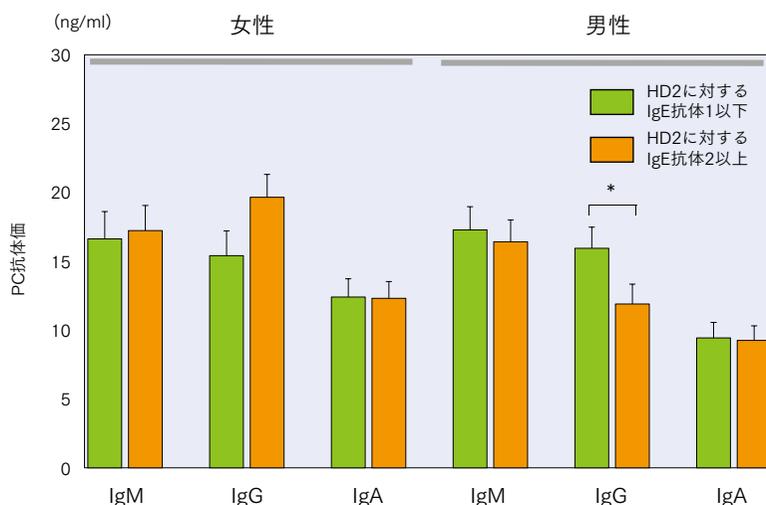


図 4：PC 特異的抗体価と HD2 に対する特異的 IgE 抗体価 (クラス)

男性では、HD2 に対する IgE 抗体価 1 以下の群の PC-IgM、PC-IgG が 2 以上の群に比べ高く、PC-IgG は有意に高値であった。\* $p < 0.05$ .

## ⑦ PC 特異的抗体価とスギ花粉への感作およびスギ花粉症発症の関連性

男女ともに未発症群の PC-IgM、PC-IgG、PC-IgA はいずれも発症群に比べ高値を示し、女性では未発症群の PC-IgG が発症群と比較して有意に高かった。(図 5)

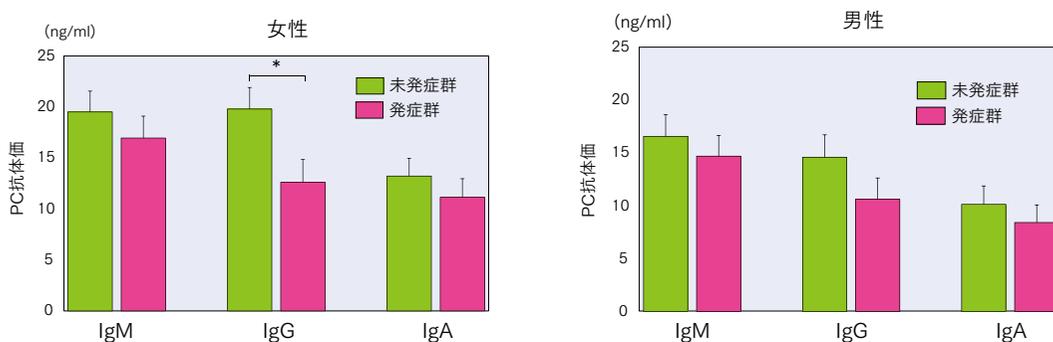


図 5：PC 特異的抗体価とスギの感作・発症の関連性

女性では、未発症群では PC-IgM、PC-IgG、PC-IgA のいずれも発症群に比べ高値で、このうち、PC-IgG は有意に高かった。男性では、有意差はなかったが、スギ花粉症未発症群では PC-IgM、PC-IgG、PC-IgA のいずれも発症群に比べて高値であった。\* $p < 0.05$ .

### ⑧ PC 特異的抗体価とスギに対する IgE 抗体価 (クラス)

スギに対する IgE 抗体価 (クラス) も HD2 と同様に 1 以下の群と 2 以上の 2 群に分類し、PC 特異的抗体価を比較すると、有意差はないものも女性では、1 以下の群で 2 以上の群より PC-IgG、PC-IgA が高く、男性では、PC-IgM、PC-IgG、PC-IgA のいずれもが 1 以下の群では 2 以上の群より高値であった。(図 6)

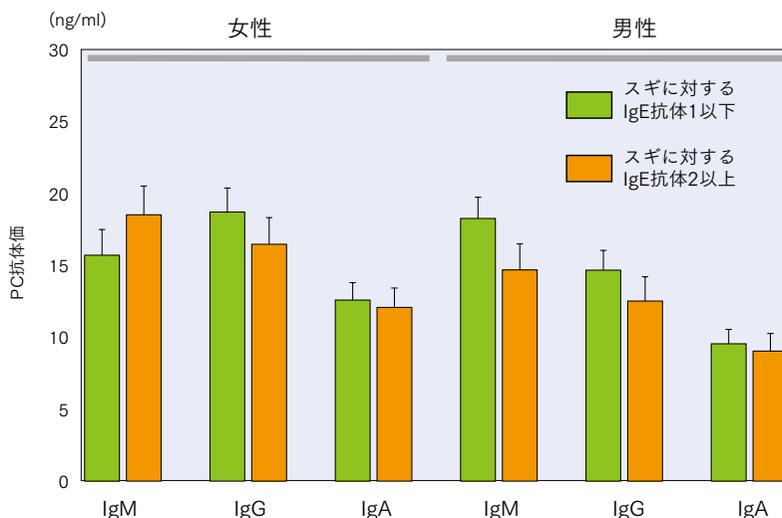


図 6：PC 特異的抗体価とスギ花粉に対する特異的 IgE 抗体価 (クラス)

スギ花粉に対する特異的 IgE 抗体価 (クラス) 1 以下の群で 2 以上の群より、有意差はないものも、女性では PC-IgG、PC-IgA が高く、男性では、PC-IgM、PC-IgG、PC-IgA のいずれもが高値であった。

### 考察

近年の有病率調査では、日本人の 40% がアレルギー性鼻炎を発症し、アレルギー性鼻炎患者の 40%、喘息患者の 89% で HD やその主要抗原であるダニ (HDM) に対して感作が成立していると言われている。また、この HDM のエピトープには、すべてのグラム陽性および陰性菌の細胞壁の構成成分である PC が含有され、PC に対する免疫応答が HDM への感作やアレルギーの発症に関与することが動物実験で証明されている<sup>3)</sup>。細菌抗原をワクチンとして投与するとアレルギー性炎症が抑制されることに関しては、たとえば 12 歳以上の小児と成人を対象にしたコホート研究で、肺炎球菌莢膜多糖体ワクチン (PPSV23) の接種によって喘息発作が予防できたこと<sup>5)</sup>、蛋白結合型肺炎球菌ワクチン (PCV7) や PPSV23 のマウスへの経鼻投与によって制御性 T 細胞が増加し、Th2 型の反応が抑制されて鼻腔や下気道におけるアレルギー性炎症が軽減することが報告されている<sup>6,7)</sup>。したがって、細菌抗原の一つである PC に対する免疫応答とアレルゲンへの感作や発症に何らかの関連性があると予想される。

そこで、本研究では、ヒトにおける HD に対する感作ならびに HD アレルギー性鼻炎の発症と血清中の PC 特異的抗体価を比較した。その結果、PC 特異的抗体価と総 IgE 値と

の有意な関連は見られなかったが、HD2特異的 IgE 抗体価（クラス）が1以下の群では2以上の群に比べ、男性ではPC-IgMとPC-IgGが高く、このうちPC-IgGは有意に高値であった。また、女性のHD未感作群におけるPC-IgMおよびPC-IgAは、有意差はないもののHD未発症群のそれと比べて高値であった。一方、男性のHD未発症群におけるPC-IgMおよびPC-IgAは発症群のそれと比べて高値で、このうちPC-IgAは有意に高かった。したがって、PCに対する免疫応答は男女で異なり、PC特異的免疫応答がHDによる感作そしてアレルギー性鼻炎の発症に何らかの影響を及ぼしていると考えられる。

HDMの抗原コンポーネントであるDer f、Der pはいずれもPCを含有し、PC-IgMはHDMと抗原提示細胞との相互作用を抑制し、所属リンパ節へのトラフィッキングを抑制することが報告されている<sup>3)</sup>。また、アトピー素因のないヒトでは血清のDer p 1に対するIgEならびにIgG1は検出されないが、TGF- $\beta$ およびIL-10の上昇とともにDer p 1特異的IgAやIgG4が認められることから、制御性T細胞の関与が指摘されている<sup>8)</sup>。したがって、今回我々の検討で観察されたPC特異的抗体価の上昇も制御性T細胞により調節され、これらの抗体がアレルゲンの侵入、あるいはアレルゲンと抗原提示細胞やIgEとの結合を阻止することによって、アレルギー性鼻炎の発症を制御していると考えられる。

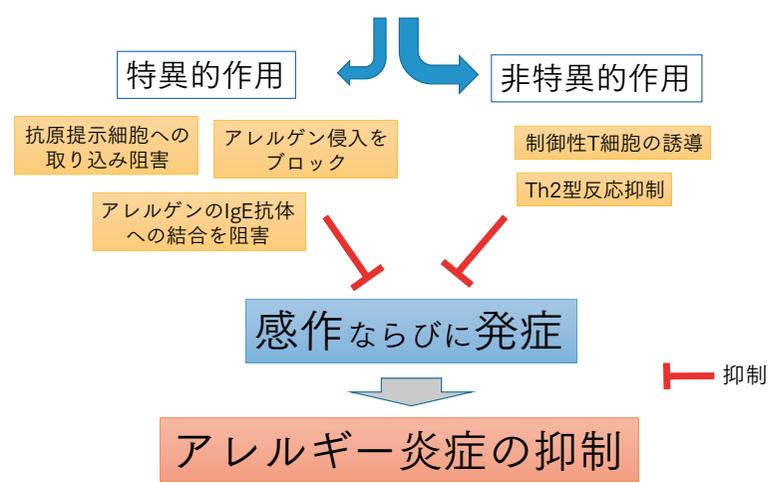
PC-IgMは自然抗体として働き、アレルギー性炎症以外にも動脈硬化や自己免疫疾患の発症や重症化を抑えることが知られている<sup>4)</sup>。PC特異的抗体は3歳頃までに、成人と同レベルになり、年齢、性別、生活スタイルなどの影響を受けるとされる<sup>9,10)</sup>。また、PC-IgMは、41歳以上の成人のほうが40歳以下の成人より低く、40~86歳（平均年齢59.9歳）を対象にしたグループでは、有意に女性の方が男性より高いことが報告されている<sup>10)</sup>。今回我々の症例では、PC-IgMに男女差が見られなかったが、これが20~30代という若年層を対象にしていたことが影響しているのか、あるいはサンプルサイズによるものなのかは不明である。しかしながら、PC-IgGおよびPC-IgAは女性が男性より有意に高値であり、動脈硬化や自己免疫疾患と同様に、アレルギー性鼻炎の感作や発症率における男女差にPCに対する免疫応答が関与していることが示唆される。

スギ花粉症とPC特異的抗体の関連性をみたところ、スギに対するIgE抗体価（クラス）が1以下の群では2以上の群に比べ、女性ではPC-IgGが、男性ではPC-IgMおよびPC-IgGが高い傾向にあった。また、男女ともにスギ花粉症未発症群のPC-IgM、PC-IgG、PC-IgAはいずれも発症群と比べ高かった。したがって、HDと同様、スギ花粉症の感作・発症にもPCが何らかの影響を与えている可能性がある。しかし、スギ花粉のPC含有量は極めて微量であるため、PCに対する免疫応答はアレルゲンのPCに直接作用するのではなく、制御性T細胞の誘導やTh2型反応の抑制などによって、非特異的にアレルギー性炎症を抑制していると推測される。先のOVAによるアレルギー性鼻炎モデルを用いた実験で、PC経鼻免疫によってOVA特異的アレルギー性炎症が抑制された結果もこのことを支持すると考えられる<sup>2)</sup>。

結語

PCはHDMそして微量ながらスギ抗原にも発現しており、PCに対する免疫応答が特異的あるいは非特異的にこれらの抗原への感作ならびにアレルギー性鼻炎や花粉症の発症に関与していると推測される。

ホスホリルコリン(PC)に対する免疫応答



参考文献

- 1) Maseda Y, Ohori J, Tanaka N, et al. Mucosal and systemic immune response to sublingual or intranasal immunization with phosphorylcholine. *Auris Nasus Larynx* 2018;45:273-280.
- 2) Miyashita K, Ohori J, Nagano H, et al. Intranasal Immunization with Phosphorylcholine Suppresses Allergic Rhinitis in Mice. *Laryngoscope* 2017 (in press)
- 3) Patel PS, Kearney JF. Neonatal exposure to pneumococcal phosphorylcholine modulates the development of house dust mite allergy during adult life. *J Immunol* 2015;194:5838-5850.
- 4) Grönwall C, Akhter E, Oh C, et al. IgM autoantibodies to distinct apoptosis-associated antigens correlate with protection from cardiovascular events and renal disease in patients with SLE. *Clin Immunol* 2012;142:390-398.
- 5) Ansaldi F, Turello V, Lai P, et al. Effectiveness of a 23-valent polysaccharide vaccine in preventing pneumonia and non-invasive pneumococcal infection in elderly people: a large-scale retrospective cohort study. *J Int Med Res* 2005;33:490-500
- 6) Kim BY, Shin JH, Park HR, et al. Comparison of antiallergic effects of pneumococcal conjugate vaccine and pneumococcal polysaccharide vaccine in a murine model of allergic rhinitis. *Laryngoscope* 2013;123:2371-2377.
- 7) Thorburn AN, O'Sullivan BJ, Thomas R et al. Pneumococcal conjugate vaccine-induced regulatory T cells suppress the development of allergic airways disease. *Thorax* 2010;65:1053-1060.
- 8) Jutel M, Akdis M, Budak F, et al. IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell

response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J Immunol* 2003;33:1205–1214.

- 9) Freijd A1, Jonsson A, Rynnel-Dagöö B. Age-dependent IgG subclass distribution of phosphocholine antibodies in humans. *APMIS* 1988;96:901–5.
- 10) Frostegård J, Tao W, Georgiades A, et al. Atheroprotective natural anti-phosphorylcholine antibodies of IgM subclass are decreased in Swedish controls as compared to non-westernized individuals from New Guinea. *Nutr Metab* 2007;4:7.

## II

## II-3

# ホスホリルコリン重合体（リピジュア）

### 〈Summary〉

ホスホリルコリン（PC）にメタクリルを化合させると、メタクリルが他のモノマーと結合する鎖の役目を果たすため、重合が可能な2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンモノマー（MPCモノマー）となる。（図1）そのMPCモノマーの特性を応用して作成された重合体制剤（MPCポリマー）がリピジュアである。（図2）

この製剤は細胞膜と同じリン脂質類似構造を持つため、生体への親和性が極めて高く、拒絶反応を起こす危険性が少ない。またリピジュアには親水性、刺激緩和、抗血栓性の3つの機能があることが知られている。こうした特徴を応用して、すでに医療への応用が検討されている。

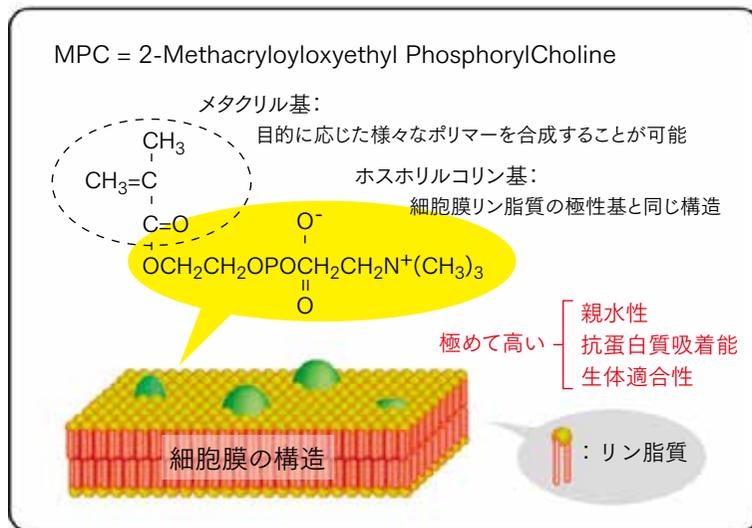


図1：MPCモノマー  
日油（株）より供与

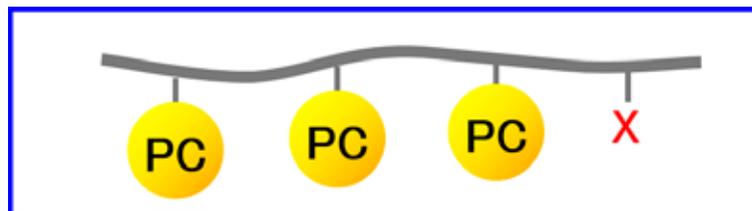


図2：MPCポリマー（リピジュア）  
日油（株）より供与  
\*リピジュアは日油（株）の登録商標

## 1) 眼科領域への応用

リピジユアを含むソフトコンタクトレンズは生体適合性と保湿性が高く、細菌付着の抑制効果があるため、米国食品医薬品局より、コンタクトレンズ装用時に乾燥感がある場合でもその装用が認められている。(図3) その他、ソフトコンタクトレンズのパッキング液として、あるいはドライアイ用の点眼液の添加剤としても用いられている。

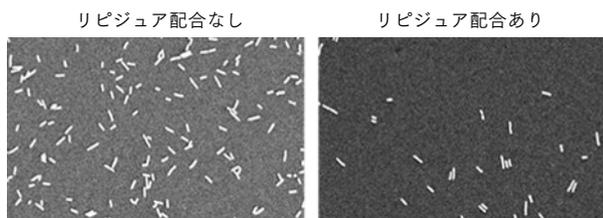


図3：リピジユアによるソフトコンタクトレンズへの緑膿菌付着の抑制（×2000）  
日油（株）より供与

## 2) 口腔ケア用品への応用

リピジユアで歯肉上皮細胞やハイドロキシアパタイトプレートにコーティングしておくと、齲歯の原因となる *Streptococcus mutans* の付着やバイオフィーム形成が抑制される。(図4) さらに、少人数での臨床研究ではあるが、歯磨き後にリピジユアで30秒間口を漱ぐと、その5時間後に口腔内から検出される *S. mutans* の菌量が対照と比較して有意に少ないことが報告されている<sup>1)</sup>。また、リピジユアで歯肉上皮細胞を処理すると、歯周病の起炎菌である *Porphyromonas gingivalis* の上皮細胞への付着が阻止され、本菌が有するLPS刺激による歯肉上皮細胞からのIL-8産生も抑制される<sup>2)</sup>。これらの研究成果から、口腔ケア用品への応用が検討されている。

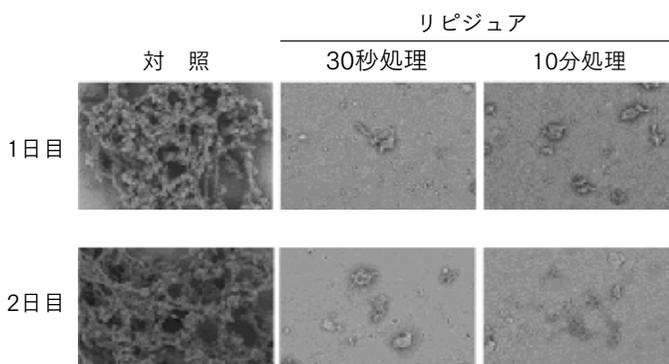


図4：リピジユアによるバイオフィーム形成の抑制

ハイドロキシアパタイトプレートをリピジユアで30秒および10分間処理すると、バイオフィームの形成が約40%まで抑制される。

日油（株）より供与

### 3) 外用剤への応用

リピジュアは皮膚への吸着性に優れ、刺激性物質から皮膚を保護する効果がある。たとえば、三次元培養皮膚モデルを用いた実験で、リピジュアが角質層に吸着することが示されている。(図5) さらにリピジュアには保湿効果があり、皮膚に吸着することで保湿作用をもたらし、その効果はヒアルロン酸の約2倍であることが証明されている。このようなリピジュアの特性を生かして、本製剤が添加された多くの化粧品が実用化されている。

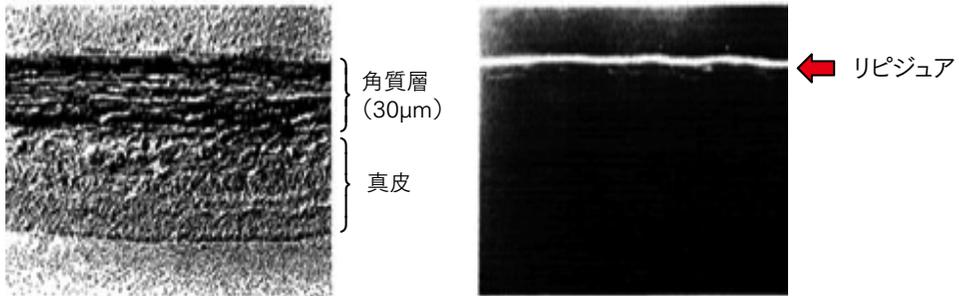


図5：三次元培養皮膚モデルにおけるリピジュアの皮膚吸収  
日油（株）より供与

#### 参考文献

- 1) Hirota K, Yumoto H, Miyamoto K, et al. MPC-polymer reduces adherence and biofilm formation by oral bacteria. J Dent Res 2011;90:900-905.
- 2) Yumoto H, Hirota K, Hirao K, et al. Anti-inflammatory and protective effects of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer on oral epithelial cells. J Biomed Mater Res A 2015;103:555-563.





## 第 III 章

# 経鼻免疫とワクチン

## 〈Summary〉

鼻咽腔関連リンパ組織 (nasopharynx-associated lymphoid tissue: NALT) の組織形成メカニズムを明らかにするため、マウスを用いて NALT の発達を組織学的に解析した。さらに、様々な遺伝子改変マウスにおける NALT 形成を解析し、その他の二次リンパ組織の組織形成と比較検討した。その結果、野生型マウスでは NALT の発生は出生後から認められた。また、パイエル板やリンパ節が欠損している lymphotoxin 欠損マウスや *aly/aly* マウスに NALT が存在することが明らかとなった。一方で、*Id2* 欠損マウスを用いた解析では、*Id2* が NALT の形成に必須であることが分かった。以上の結果から、NALT は、その他の二次リンパ組織の発生に必要な遺伝子に依存しない全く異なる形成メカニズムによって発達することが示唆された。

## はじめに

ワルダイエル咽頭輪と称される口蓋扁桃や咽頭扁桃は、気道及び消化管の入り口に位置し、粘膜面に露出した粘膜関連リンパ組織である。扁桃組織は、常に経気道及び経口的に侵入する異物に暴露されているため、外来抗原や病原体が最初に取り込まれる二次リンパ組織として、抗原認識や抗原特異的免疫誘導システムにおける重要な免疫組織の一つと考えられる<sup>1)</sup>。ところが、免疫学的な研究や感染実験などで動物モデルとして重用されているマウスやラットなどげっ歯類には、咽頭部位に明確な二次リンパ組織は認められない。その一方で、げっ歯類の左右の鼻腔底にはリンパ組織が存在し、これらは一般に鼻咽腔関連リンパ組織 (nasopharynx-associated lymphoid tissue もしくは nasal-associated lymphoid tissue: NALT) と呼ばれている。(図 1) マウスの NALT がヒトワルダイエル咽頭輪に相当するリンパ器官であるかは未だ明らかになっていないが、その解剖学的及び機能的な特徴に類似点が多いことから、しばしば扁桃のアナログとして NALT が研究対象にされている<sup>2)</sup>。NALT の他に呼吸器には粘膜関連リンパ組織として気管支関連リンパ組織 (bronchus-associated lymphoid tissue: BALT) が知られているが、NALT と異なり一般的に正常なヒトの肺では発達しない。(表) 経鼻的に抗原に感作されると NALT には胚中心が形成され、抗原特異的な  $IgA^+B$  細胞が分化誘導される。全身の二次リンパ組織に比べて、NALT の組織形成メカニズムは、これまでほとんど明らかにされていない。

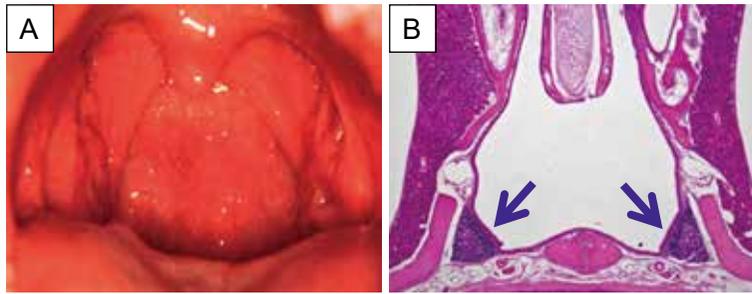


図1：ヒト扁桃とマウスNALTの比較  
A. ヒト口蓋扁桃 B. マウス鼻腔（矢印：NALT）

表：NALT, BALT, GALT の比較（文献2より引用改変）

|                      | NALT | BALT | GALT |
|----------------------|------|------|------|
| 発生                   | 出生時  | 出生後  | 出生前  |
| 胚中心                  | ±    | ±    | ++   |
| T/B                  | T=B  | T=B  | T<B  |
| CD4/CD8              | 2.4  | 2.6  | 5.0  |
| IgA <sup>+</sup> B細胞 | +    | +    | ++   |
| ヒト                   | +    | -    | +    |

腸管に存在するパイエル板は腸管関連リンパ組織（gut-associated lymphoid tissue: GALT）と呼ばれ、粘膜関連リンパ組織の中で、最も代表的な二次リンパ組織の一つとして組織形成メカニズムの解明が比較的進んでいる。（図2）マウスのパイエル板の発生は

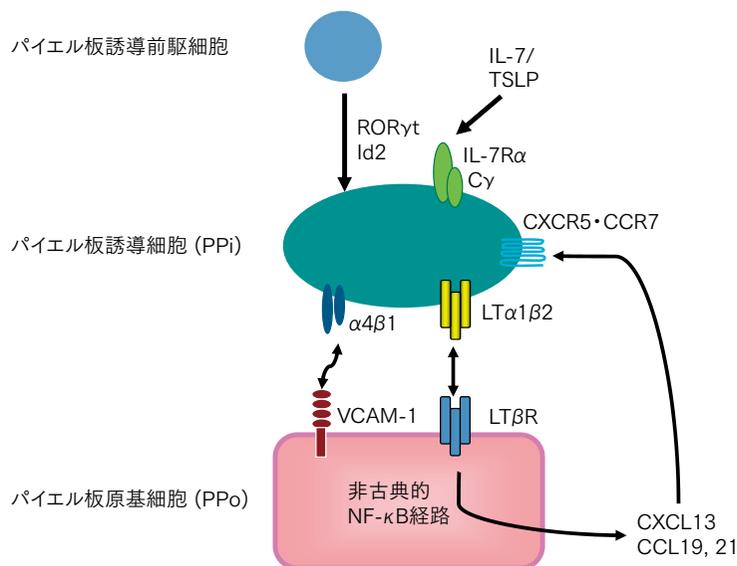


図2：パイエル板の組織形成モデル

パイエル板誘導前駆細胞はId2, ROR $\gamma$ tなどの制御を受けてパイエル板誘導細胞（PPi）へ分化する。リンフォイドケモカインCXCL13, CCL19, CCL21によってパイエル板原基細胞（PPo）に遊走したPPiは、VCAM-1を介して接着する。PPiはIL-7受容体を介した刺激を受けて膜型LT $\alpha$ 1 $\beta$ 2を発現し、LT $\beta$ Rを介してPPoの非古典的NF- $\kappa$ B経路を活性化す。活性化した非古典的NF- $\kappa$ B経路によってリンフォイドケモカインの産生が亢進する。

胎生期に開始される。パイエル板の原基内で起きる最初のステップは、VCAM-1陽性ストローマ細胞 (Peyer's patch organizer cell: PPO) と胎生肝臓由来の CD3IL-7受容体陽性血球系細胞 (Peyer's patch inducer cell: PPI) の細胞間相互作用である<sup>3)</sup>。PPIは二次リンパ組織形成誘導細胞 (lymphoid tissue inducer cell: LTI) の一つであり、その細胞分化には転写抑制因子 inhibitor of DNA binding/differentiation 2 (Id2) や核内受容体 retinoid-like orphan receptor  $\gamma$ t (ROR $\gamma$ t) が必須である<sup>4)</sup>。興味深いことに、LTIは近年新たに発見された自然リンパ球と共通の前駆細胞から分化すると考えられている<sup>5)</sup>。PPIがPPOに遊走するためには、PPOがケモカイン CXCL13を産生し、その受容体 CXCR5をPPIが発現していることが必須である。パイエル板原基に集積し、PPOに接着したPPIは、IL-7受容体を介したシグナルによって活性化され、TNFスーパーファミリーのひとつであるリンフォトキシン (LT) の膜型3量体 (LT $\alpha$ 1 $\beta$ 2) を細胞表面に発現する。LT $\alpha$ 1 $\beta$ 2はPPO細胞膜上のLT $\beta$ 受容体 (LT $\beta$ R) に結合し、PPO細胞内シグナルを誘導する。LT $\beta$ RによってPPO細胞内の非古典的NF- $\kappa$ Bシグナル伝達経路が活性化され、様々な遺伝子発現が誘導される。特にパイエル板原基から産生されるCXCL13, CXCL12, CCL19, CCL21などのリンフォイドケモカインはパイエル板組織形成プロセスの進行に重要である。これらのケモカインによってT細胞、B細胞、樹状細胞などの免疫担当細胞がパイエル板原基へ遊走し、T細胞領域、B細胞領域が形成され、成熟した二次リンパ組織へと発達する<sup>6)</sup>。

このように、パイエル板の組織形成には様々な分子と細胞群が時空間的に関与していることが知られている。ところが、気道の粘膜関連リンパ組織であるNALTに関してはその組織形成メカニズムはほとんど明らかになっていない。

そこで、本研究ではパイエル板の組織形成に必須な分子のNALT形成への関与を明らかにするために、様々な遺伝子欠損マウスのNALT形成を解析し、NALT組織形成メカニズムの解明を試みた。

## 材料と方法

### ① マウス

野生型マウス (C57BL/6J, BALB/c: 日本クレア、日本SLC)、*aly/aly* マウス (日本クレア)、LT $\alpha$ <sup>-/-</sup> マウス (Jackson laboratory)、Id2<sup>-/-</sup> マウス<sup>7)</sup>、CXCL13<sup>-/-</sup> マウス<sup>8)</sup>、*plt/plt* マウス<sup>9)</sup>は大阪大学微生物病研究所もしくは東京大学医科学研究所にて飼育した。

### ② 組織学的解析

マウスから鼻腔組織を摘出し、4%パラホルムアルデヒド溶液で固定し、凍結切片もしくはパラフィン切片を作製した。ヘマトキシリン&エオジン (HE) 染色や抗体組織染色をした後、組織学的解析を行った。PNAd (peripheral node addressin) 陽性血管内皮を解析するために、抗PNAd抗体 (MECA-79; BD PharMingen) を用いて染色を行った<sup>10)</sup>。NALTのT細胞領域、B細胞領域、濾胞中心、濾胞樹状細胞 (follicular dendritic cell: FDC) ネットワークの形成を検討するために、コレラトキシンを経鼻投与したマウスの鼻腔組織を採取し、抗CD3 $\epsilon$ 抗体 (145-2C11; BD Pharmingen)、抗B220抗体 (RA3-

6B2; BD Pharmingen)、peanut agglutinin (PNA) (Vector Laboratories)、anti-FDC-M1 (BD Pharmingen) をそれぞれ用いて染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡 (Leica Microsystems) で観察した<sup>11)</sup>。

## 結 果

### ① 野生型マウスの NALT 組織過程

各週齢の野生型マウスから鼻腔組織を摘出し、NALT の組織形成過程を組織学的に解析した。NALT は生後1週までは認められなかった。免疫組織化学的解析により生後1週目に NALT の形成部位の血管に接着分子 (PNAd) の発現を認めた。その後、NALT 形成部位にリンパ球の集簇が見られ、生後8週目の NALT には PNAd 陽性高内皮細静脈の発達が認められた。(図3)

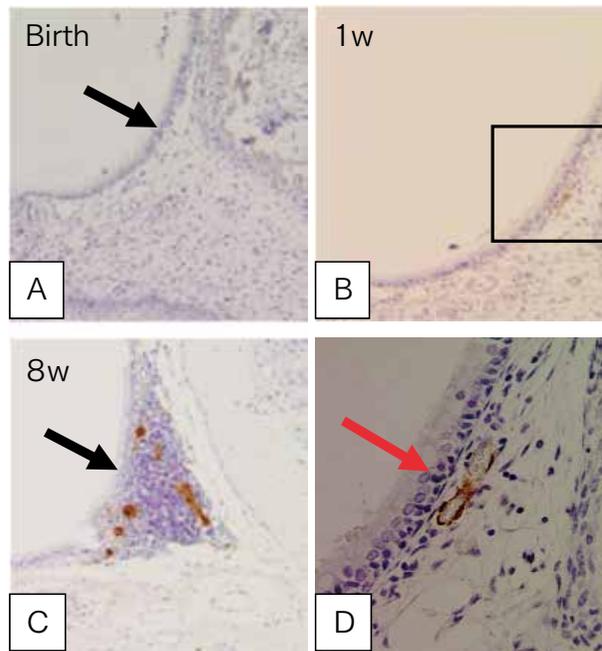


図3：野生型マウスの NALT の組織形成

野生型マウスから鼻腔組織を採取し PNAd 抗体を用いた免疫組織化学的解析を行った。A. 出生仔のマウス鼻腔組織 (黒矢印; NALT 形成部位), B. 出生1週後のマウス鼻腔組織 (四角; NALT 形成部位), C. 出生8週後のマウス鼻腔組織 (黒矢印; NALT), D. B の四角領域の拡大 (赤矢印; PNAd 陽性細胞) (文献10より引用改変)

## ② リンパ組織欠損マウスの NALT 形成

パイエル板の組織形成の障害を認める各種遺伝子欠損マウスから鼻腔組織を摘出し、組織学的に NALT の形成を解析した。HE 染色の結果、 $LT\alpha^{-/-}$  マウスと NF- $\kappa$ B-inducing kinase (NIK) の点突然変異を持つ *aly/aly* マウスの鼻腔組織には野生型マウスよりも小さいものの NALT が存在することが判明した。(図 4)

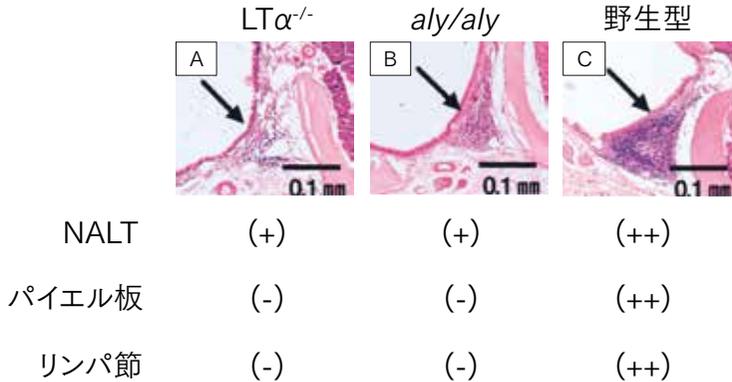


図 4：遺伝子欠損マウスの NALT 組織形成とその他のリンパ組織形成との比較

$LT\alpha^{-/-}$  マウス, *aly/aly* マウス及び野生型マウスから鼻腔組織を採取し HE 染色を行った。

A.  $LT\alpha^{-/-}$  マウス, B. *aly/aly* マウス, C. 野生型マウス (矢印; NALT) (文献 10 より引用改変)

次に、PNAd 抗体を用いた免疫組織化学を行った。 $LT\alpha^{-/-}$  マウスと *aly/aly* マウスの NALT の PNAd 陽性細胞は野生型マウスの NALT と比較してやや少なかったが、高内皮細静脈の発達が認められた。

## ③ Id2欠損マウスの NALT 形成

パイエル板やリンパ節が欠損している  $Id2^{-/-}$  マウスの鼻腔組織を組織学的に解析した。HE 染色の結果、 $Id2^{-/-}$  マウスの鼻腔内には、NALT の形成が認められなかった。(図 5)

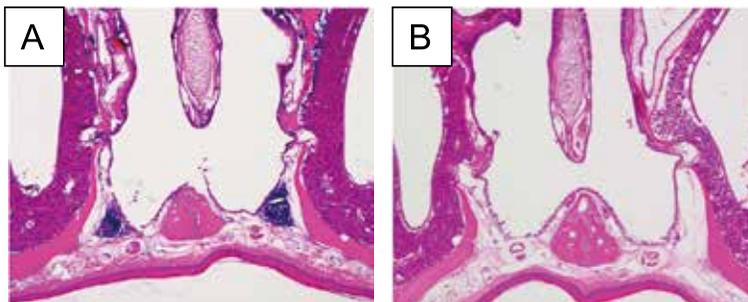


図 5： $Id2$  欠損マウスの NALT 組織形成

$Id2^{+/+}$  マウス及び  $Id2^{-/-}$  マウスから鼻腔組織を採取し HE 染色を行った。

A.  $Id2^{+/+}$  マウス, B.  $Id2^{-/-}$  マウス (文献 10 より引用改変)

#### ④ リンフォイドケモカイン欠損マウスの NALT 形成

NALT の組織形成におけるリンフォイドケモカイン (CXCL13, CCL19, CCL21) の役割について検討するために、コレラトキシンを経鼻投与した野生型マウス、CXCL13<sup>-/-</sup> マウス、*plt/plt* マウスの NALT の組織構築を解析した。共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析では、CXCL13<sup>-/-</sup> マウスの B 細胞領域は小さく、胚中心と FDC ネットワークの形成は認められなかった。リンフォイドケモカインの CCL19 と CCL21 機能不全マウスとして知られている *plt/plt* マウスでは NALT の胚中心や FDC ネットワークは正常であったが、T 細胞領域は低形成であった。(図 6)

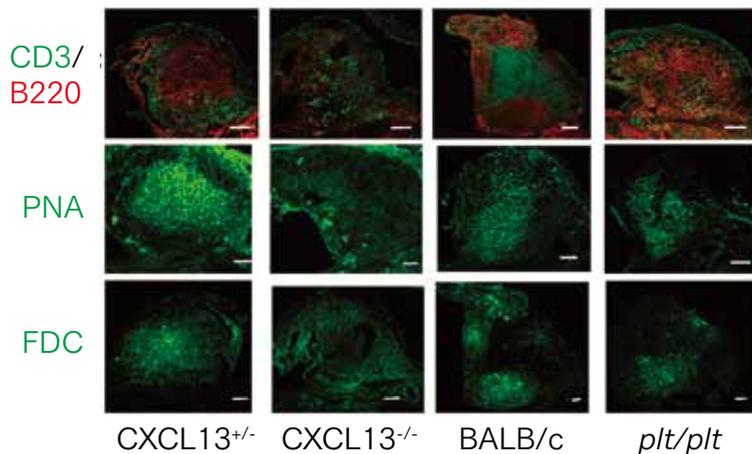


図 6: リンフォイドケモカイン欠損マウスの NALT 組織構築

コレラトキシンを点鼻投与した CXCL13<sup>+/+</sup> マウス, CXCL13<sup>-/-</sup> マウス, BALB/c マウス (*plt/plt* マウスの対照群), *plt/plt* マウスから鼻腔組織を摘出し凍結切片を作製した。蛍光ラベルした抗体や PNA レクチンを用いて染色し, 共焦点レーザー顕微鏡で T 細胞領域 (CD3) / B 細胞領域 (B220) (上段), 胚中心 (PNA) (中段), 濾胞樹状細胞ネットワーク (FDC) (下段) を観察した。スケールバー: 80μm. (文献 11 より引用改変)

#### 考 察

パイエル板や末梢リンパ節の組織形成は胎生期に開始する。我々の研究で、マウスの NALT は出生後にならないと観察されないことが明らかとなった。その理由として、NALT 発生の誘導には外界からの刺激が必要ではないかと推測できる。ところが、無菌マウスの鼻腔内にもほぼ正常に NALT が形成されるため (未発表)、少なくとも気道細菌を介したシグナルは NALT 形成に必須ではないと考えられる。パイエル板の場合、腸管神経ネットワーク形成に重要な分子として知られていた受容体型チロシンリン酸化酵素が、PPi と PPo による初期形成に深く関与している事が明らかとなった<sup>12)</sup>。このように神経系と免疫系のクロストークがリンパ組織形成誘導に重要であることは興味深い。今後、NALT の形成についても神経系の関与について検討が望まれる。

野生型マウスの NALT は 1 週齢頃に PNAd 陽性血管の発達と共に開始される。同部位には CD3 陰性 CD4 陽性の NALT 形成誘導細胞 (NALT inducer cell: NALTi) の集簇も

認められる<sup>10)</sup>。NALTiはパイエル板やリンパ節といった二次リンパ組織形成を誘導する細胞 (lymphoid tissue inducer cell: LTi) の一サブセットと考えられるが、Harmsen, A. らや我々の解析からリンパ節やパイエル板のLTiと比較して非常にユニークな特性を持っていると考えられる<sup>13)</sup>。LTiは、胎生期の造血組織の一つである肝臓に存在する前駆細胞に由来すると考えられているが、ノックアウトマウスを用いた解析によって転写抑制因子Id2と核内受容体 ROR $\gamma$ tがLTiのマスター遺伝子であることが明らかとなった<sup>11)</sup>。本研究によってId2<sup>-/-</sup>マウスではパイエル板やリンパ節と同じくNALT形成も阻害されていることが分かった。ところが、ROR $\gamma$ t<sup>-/-</sup>マウスでは正常なNALTの発生が認められることから、NALTiの分化にはROR $\gamma$ tは必須でないことが示唆される<sup>1)</sup>。

パイエル板やリンパ節などの二次リンパ組織形成で中心的な役割を担っている分子はLTiの細胞膜に発現しているLT3の膜型量体 (LT $\alpha$ 1 $\beta$ 2) である。そして、LT $\alpha$ 1 $\beta$ 2の受容体 (LT $\beta$ R) は、リンパ節原基ストローマ細胞に発現しており、細胞内の非古典的NF- $\kappa$ Bシグナル経路の活性化をもたらす。したがって、LT $\alpha$ <sup>-/-</sup>マウスや非古典的NF- $\kappa$ Bシグナル経路に必須のNIK機能不全マウスである*aly/aly*マウスの腸管にはパイエル板が欠損している。ところが、本研究によって、LT $\alpha$ <sup>-/-</sup>マウスと*aly/aly*マウスの鼻腔組織にNALTが認められた。この結果から、NALTの初期形成にはLT $\alpha$ 1 $\beta$ 2やLT $\beta$ Rを介した非古典的NF- $\kappa$ Bシグナルは必要としないことが明らかとなった。さらに、リンパ節の組織形成に必須なreceptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL)にもNALT形成が依存しないことが報告されたことからNALT組織形成の特異性が一層際立っている<sup>13)</sup>。Id2依存性のNALTiは出生後NALT原基に遊走した後、未知のシグナル伝達経路を用いてNALT原基のストローマ細胞に接着分子やケモカインの発現を誘導していると考えられる。(図7)

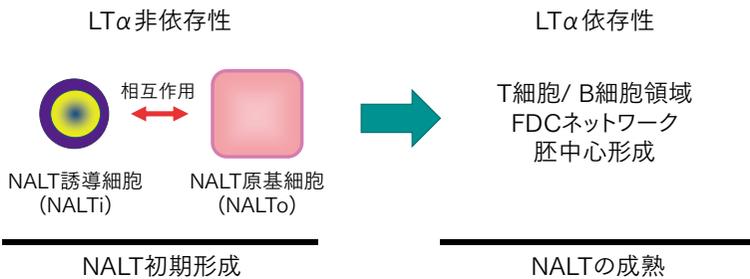


図7：NALT形成メカニズムの特異性

NALTの初期組織形成は、NALT誘導細胞 (NALTi) とNALT原基細胞 (NALTo) との相互作用によって始まると考えられる。NALTiはId2依存性・ROR $\gamma$ t非依存性で前駆細胞から分化し、NALToを活性化する。しかし、NALToの活性化には、LT $\alpha$ による非古典的NF- $\kappa$ Bシグナルは必須ではない。その一方で、NALTの組織構築の発達・成熟にはLT $\alpha$ によって制御されるリンフォイドケモカイン (CXCL13, CCL19, CCL21) の産生が重要である。

成熟した二次リンパ組織は、T細胞領域やB細胞領域が発達し、効率的な抗原特異的な免疫応答が誘導される場が形成される。B細胞領域 (濾胞) に分布する特殊な間質細胞の一種であるFDCは、ネットワークを形成しB細胞の分化・増殖や抗体産生に重要であ

ることが知られている<sup>14)</sup>。活性化したB細胞は、B細胞領域に形成された胚中心に移動し高親和性抗体の産生細胞へ分化する<sup>15)</sup>。これらのリンパ組織の発達や恒常性維持には、CXCL13, CCL19, CCL21などのリンフォイドケモカインに分類されるケモカインが主に関与する。CCL19とCCL21はT細胞領域、CXCL13はB細胞領域の形成に重要である。また、脾臓ではB細胞領域のFDCネットワークや胚中心の形成にはB細胞領域内でのCXCL13の産生が必須である<sup>16)</sup>。本研究では、CXCL13<sup>-/-</sup>マウスのNALTで、B細胞領域とFDCネットワーク、胚中心の著しい形成不全が認められた。またCCL21とCCL19の発現を欠く突然変異マウス *plt/plt* マウスのNALTでは、T細胞領域の形成がほとんど認められなかった。これらの結果から、NALTにおいてもリンフォイドケモカインはT細胞領域やB細胞領域、FDCネットワーク、胚中心の形成に重要であることが明らかとなった。リンパ組織におけるリンフォイドケモカインの産生はLT $\alpha$ によるFDCなどの間質細胞や血管内皮細胞の活性化が必要である。LT $\alpha$ <sup>-/-</sup>マウスではNALTは存在するものの低形成であったことは、NALTの組織発達には、LT $\alpha$ やそれに発現制御されているリンフォイドケモカインが必要であることが示唆される。

このように、NALTの形成過程においてLT $\alpha$ の依存性が変化することは興味深い。特にNALTの初期形成はLT $\alpha$ に非依存性であり、パイエル板やリンパ節の形成メカニズムとは明らかに異なる。今後、NALT形成に特異的なメカニズムを解明する取り組みが求められる。

## 結 語

NALT組織形成メカニズムは、その他の二次リンパ組織と比較して特異的であることが明らかとなり、lymphotoxin (LT) に非依存的な組織形成シグナルの存在が示唆された。

## 参考文献

- 1) Kiyono H, Fukuyama S. NALT- versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. *Nat Rev Immunol* 2004;4:699-710.
- 2) Kuper CF, Koomstra PF, Hameleers DM, et al. The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol Today* 1992;13:219-224.
- 3) Yoshida H, Honda K, Shinkura R, et al. IL-7 receptor alpha<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> cells in the embryonic intestine induces the organizing center of Peyer's patches. *Int Immunol* 1999;11:643-655.
- 4) Boos MD, Yokota Y, Eberl G, et al. Mature natural killer cell and lymphoid tissue-inducing cell development requires Id2-mediated suppression of E protein activity. *J Exp Med* 2007;204:1119-1130.
- 5) Sawa S, Cherrier M, Lochner M, et al. Lineage relationship analysis of ROR $\gamma$ mat<sup>+</sup> innate lymphoid cells. *Science* 2010;330:665-669.
- 6) Mebius RE. Organogenesis of lymphoid tissues. *Nat Rev Immunol* 2003;3:292-303.
- 7) Yokota Y, Moris S, Nishikawa SI, et al. The helix-loop-helix inhibitor Id2 and cell differentiation control. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000;251:35-41.
- 8) Ebisuno Y, Tanaka T, Kanemitsu N, et al. Cutting edge: the B cell chemokine CXC chemokine ligand 13/B lymphocyte chemoattractant is expressed in the high endothelial

- venules of lymph nodes and Peyer's patches and affects B cell trafficking across high endothelial venules. *J Immunol* 2003;171:1642-1646.
- 9) Nakano H, Moris S, Yonekawa H, et al. A novel mutant gene involved in T-lymphocyte-specific homing into peripheral lymphoid organs on mouse chromosome 4. *Blood* 1998;91:2886-2895.
  - 10) Fukuyama S, Hiroi T, Yokota Y, et al. Initiation of NALT organogenesis is independent of the IL-7R, LTbetaR, and NIK signaling pathways but requires the Id2 gene and CD3(-)CD4(+)CD45(+) cells. *Immunity* 2002;17:31-40.
  - 11) Fukuyama S, Nagatake T, Kim DY, et al. Cutting edge: Uniqueness of lymphoid chemokine requirement for the initiation and maturation of nasopharynx-associated lymphoid tissue organogenesis. *J Immunol* 2006;177:4276-4280.
  - 12) Veiga-Fernandes H, Coles MC, Foster KE, et al. Tyrosine kinase receptor RET is a key regulator of Peyer's patch organogenesis. *Nature* 2007;446:547-551.
  - 13) Harmsen A, Kasser K, Hartson L, et al. Cutting edge: organogenesis of nasal-associated lymphoid tissue (NALT) occurs independently of lymphotoxin-alpha (LT alpha) and retinoic acid receptor-related orphan receptor-gamma, but the organization of NALT is LT alpha dependent. *J Immunol* 2002;168:986-990.
  - 14) Allen CD, Cyster JG. Follicular dendritic cell networks of primary follicles and germinal centers: phenotype and function. *Semin Immunol* 2008;20:14-25.
  - 15) Bannard O, Cyster JG. Germinal centers: programmed for affinity maturation and antibody diversification. *Curr Opin Immunol* 2017;45:21-30.
  - 16) Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* 2005;5:606-616.

### 謝 辞

本研究では、東京大学医科学研究所炎症免疫学分野教授清野宏先生のご指導、研究実施の機会を与えていただき、ここに深謝の意を表す。並びに、同研究所長竹貴広博士（現、医薬基盤・健康・栄養研究所）には実験へのご協力、ご助言をいただいたことに深謝の意を表す。（福山 聡）

## III-2 経鼻ワクチンによる免疫応答

### 〈Summary〉

ホスホリルコリン (PC) は肺炎球菌などのグラム陽性菌そしてインフルエンザ菌などのグラム陰性菌の細胞壁にも発現していることから、上気道感染症の予防に有効な広域スペクトラムを持つワクチンとして期待される。そこで、PC を粘膜アジュバントであるコレラトキシン (CT) とともにマウスに経鼻投与し、PC の免疫原性を観察するとともに肺炎球菌およびインフルエンザ菌感染症に対する予防効果を検討した。その結果、PC 経鼻投与によって唾液および鼻腔洗浄液中の PC 特異的 IgA 抗体価そして血清中の PC 特異的 IgG 抗体価が上昇し、粘膜および全身免疫の誘導が確認された。さらに、その唾液は複数の肺炎球菌やインフルエンザ菌と交差反応し、PC の表出が多い菌株とより強く結合した。また、鼻腔に接種した細菌のクリアランスも PC 経鼻免疫によって亢進した。以上の結果から、PC が免疫原性を有し、上気道感染予防のための粘膜ワクチンとして有用であることが示唆された。

### はじめに

近年、薬剤耐性菌の出現が問題となり、急性中耳炎や急性鼻副鼻腔炎などの上気道細菌感染症に対するワクチンの開発に期待が寄せられている。本邦でも侵襲性肺炎球菌感染症に対するワクチンがすでに定期接種化され、鼓膜切開を必要とする急性中耳炎の頻度が減少したことが報告されている<sup>1)</sup>。しかし、非ワクチン株の肺炎球菌やインフルエンザ菌によっても急性中耳炎が発症するため、急性中耳炎の発症頻度にはほとんど影響がみられない<sup>2)</sup>。したがって、このような問題点を克服するため、広域スペクトラムを持ち、多くの肺炎球菌やインフルエンザ菌に対しても有効な新たなワクチンの開発が必要とされている。

ホスホリルコリン (PC) は、1967 年に、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ポタイコ酸の構成成分であり、免疫優勢抗原決定基となることが報告された<sup>3)</sup>。そしてその後、PC が肺炎球菌以外のグラム陽性菌やグラム陰性菌にも表出していること、細菌の上皮への接着や浸潤がこの PC と上皮細胞表面の血小板活性化因子 (PAF) 受容体との結合によってもたらされることが明らかになり、PC の発現が細菌の病原性に関与すると考えられている<sup>4,5)</sup>。さらに、肺炎球菌やインフルエンザ菌などの病原菌に対する生体防御に、PC に対する自然免疫が重要な役割を担っていることが指摘されている<sup>6)</sup>。

したがって、PC に対する免疫応答、とくに細菌接着の阻止に働く分泌型 IgA を主役とする粘膜免疫応答を誘導することで、多くの肺炎球菌さらにはインフルエンザ菌による急

性中耳炎を予防できると推測される。そこで、PCを広域スペクトラムワクチンとして応用することの可能性を検討するため、PCをマウスに経鼻投与し、その免疫原性ならびに肺炎球菌やインフルエンザ菌の鼻腔クリアランスに対する効果を観察した。

## 方法

### ① 経鼻免疫と検体採取

PCは分子量が小さくそのままでは抗原性を示さないハプテンであり、phosphate buffered saline (PBS) 中に溶解しない。そのため、キャリアー蛋白として keyhole limpet hemocyanin (KLH) を結合させた PC-KLH (50  $\mu\text{g}$ ) をアジュバントとしてコレラトキシン (CT) 1  $\mu\text{g}$  とともに6週齢の雌性 BALB/c マウスに経鼻投与した (PC-KLH+CT 群)。一方、対照群のマウスには CT のみを経鼻投与した (CT 群)。免疫は週1回連続3週にわたって行い、最後の免疫から7日後に唾液、血清、鼻粘膜、脾臓を採取した。

### ② PC 特異的免疫応答の観察

PC-KLH+CT 群および CT 群から採取された唾液、血清、鼻粘膜洗浄液中の PC 特異的抗体を ELISA 法で測定した。また、鼻粘膜と脾臓から単核細胞を分離し、PC 特異的抗体産生細胞数を ELISPOT 法で測定した。さらに PC-KLH+CT 群そして対照として PBS を経鼻投与したマウスの脾臓から CD4<sup>+</sup>T 細胞を分離し、抗原提示細胞を加え、PC に牛血清アルブミン (BSA) 結合させた PC-BSA とともに72時間培養し、培養上清中の IFN- $\gamma$ 、IL-4 の濃度を ELISA 法で測定した。

### ③ 阻害実験による PC 特異性の確認

PC-KLH の経鼻投与によって誘導される免疫応答が PC 特異であることを証明するため、PC、phosphorylethanolamine (PE)、acetylcholine (Ach)、およびマウスの PC 特異的 IgA である TEPC-15 を用いて阻害実験を行った。具体的には、経鼻免疫後の唾液、血清、そして対照として TEPC-15 を PC、PE、Ach と反応させたのちに PC-BSA でコーティングしたプレートに添加した。そして、PC、PE、Ach と結合せず残存した PC 特異的免疫グロブリン量を ELISA 法で測定し、PC、PE、Ach と反応させなかった検体の PC 特異的抗体価で除してその比率を百分率で算出し、この数値が小さいほど阻害効果が高いとした。

### ④ 唾液中 IgA の肺炎球菌およびインフルエンザ菌に対する反応性

滲出性中耳炎患者から分離された肺炎球菌とインフルエンザ菌それぞれ10株から、細胞壁成分を抽出した。そして、これを抗原として、経鼻免疫後に採取した唾液中 IgA および対照として TEPC を反応させ、その吸光度を計測した。

### ⑤ PC 経鼻免疫の細菌クリアランスへの影響

PC-KLH+CT 群および CT 群のマウスに3回の経鼻免疫終了後7日目に、肺炎球菌、イ

ンフルエンザ菌生菌を経鼻的に接種した。そして、その12時間後に鼻腔洗浄液と鼻粘膜を採取し、検体中に含まれるこれらの細菌数を測定した。

## 結果

### ① PC 経鼻投与により誘導される免疫応答

経鼻免疫後の唾液および鼻腔洗浄液中の PC 特異的 IgA 抗体価は、ともに PC-KLH+CT 群で CT 群と比較して有意に上昇した。また、血清中の PC 特異的 IgM、IgG、IgA 抗体も PC-KLH+CT 群が CT 群よりも有意に高値であった。(図1) 鼻粘膜および脾臓における PC 特異的抗体産生細胞数を比較すると、IgM、IgG、IgA のいずれも PC-KLH+CT 群のほうが CT 群よりも高値であり、とくに鼻粘膜では PC 特異的 IgA 産生細胞が、脾臓では PC 特異的 IgM 産生細胞が著しく多かった。(図2) 脾臓から分離された CD4<sup>+</sup>T 細胞 PC 刺激によるサイトカイン産生も、PC-KLH+CT 群で IFN- $\gamma$ 、IL-4 がともに上昇し、

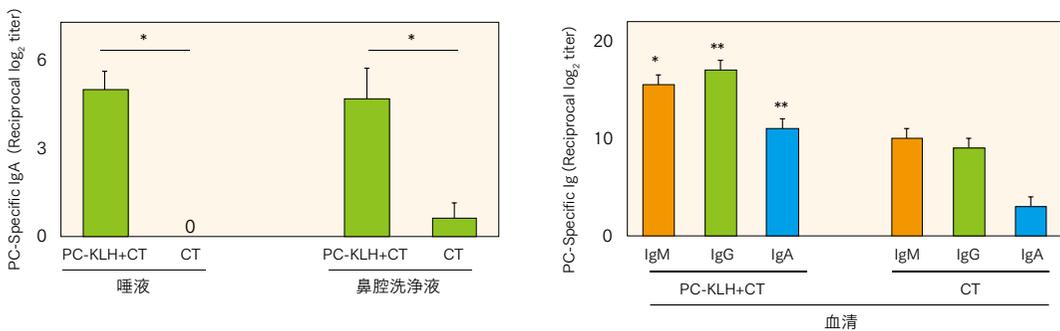


図1：経鼻免疫後の外分泌液および血清中の PC 特異的抗体活性

唾液および鼻腔洗浄液中の PC 特異的 IgA 抗体価、血清中の PC 特異的 IgM、IgG、IgA のすべての抗体価が、PC-KLH 群で CT 群より有意に高値を示した。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

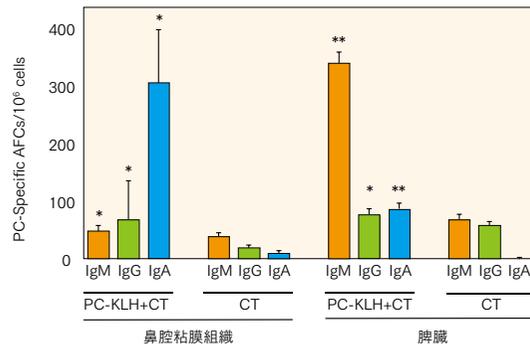


図2：経鼻免疫後の鼻粘膜および脾臓における PC 特異的抗体産生細胞数

PC 特異的抗体産生細胞数はいずれも PC-KLH+CT 群のほうが CT 群よりも高値であり、鼻粘膜では PC 特異的 IgA 産生細胞が、脾臓では PC 特異的 IgM 産生細胞が著しく増加した。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

IL-4の産生はPBSを経鼻投与した対照群よりも有意に高値であった。(図3)

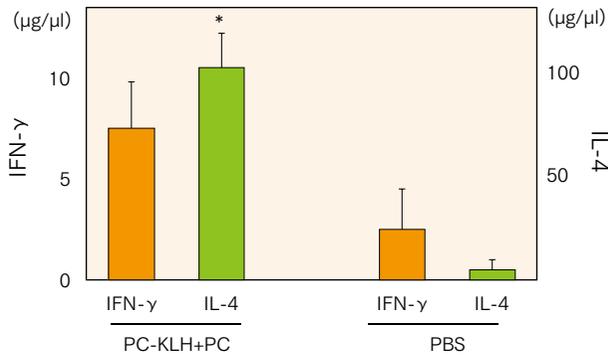


図3：CD4<sup>+</sup>T細胞からのサイトカイン産生

PC-KLH+CT群ではIFN-γとIL-4の産生がともに上昇し、IL-4の産生はPBSを経鼻投与した対照群よりも有意に高値であった。\* $p < 0.05$ .

## ② 唾液および血清中抗体のPC特異性

TEPC-15そしてPC-KLH+CT群から採取された唾液中IgAのPC-BSAとの結合は、PCで濃度依存性に阻害され、AchでもPCより弱いが同様の効果が認められた。しかし、PEによる阻害効果はみられなかった。(図4A、B) 血清でも、IgMはPCの添加によって濃度依存性にPC-BSAとの結合が阻害された。一方、IgGではPCによる阻害作用が認められず、唾液中IgAや血清IgMとはPC-KLHの認識部位が異なることが示された。(図4C)

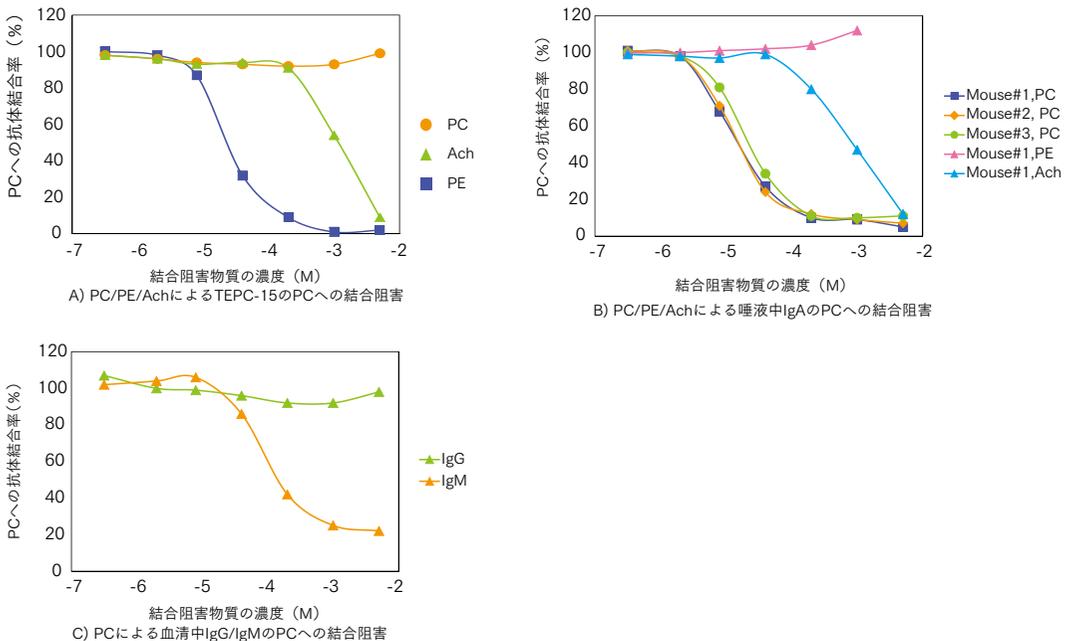


図4：唾液および血清中抗体のPC特異性

TEPC-15そしてPC-KLH+CT群の唾液中IgAとPCとの結合は、PCおよびAchで濃度依存性に阻害された。(図4A、B) 血清IgMもPCの添加によって濃度依存性にPCとの結合が阻害されたが、血清IgGではその作用が認められなかった。(図4C)

### ③ 唾液中 IgA の肺炎球菌およびインフルエンザ菌に対する交差反応

PC-KLH+CT 群のマウスから採取された唾液中の IgA は、その反応性は異なるものの、すべての肺炎球菌そして約半数のインフルエンザ菌と、血清 IgG はすべての肺炎球菌とインフルエンザ菌と交差反応した。(図5) また、唾液中 IgA の肺炎球菌およびインフルエンザ菌との反応性は、TEPC-15のこれら細菌に対する反応とよく相関した。(図6)

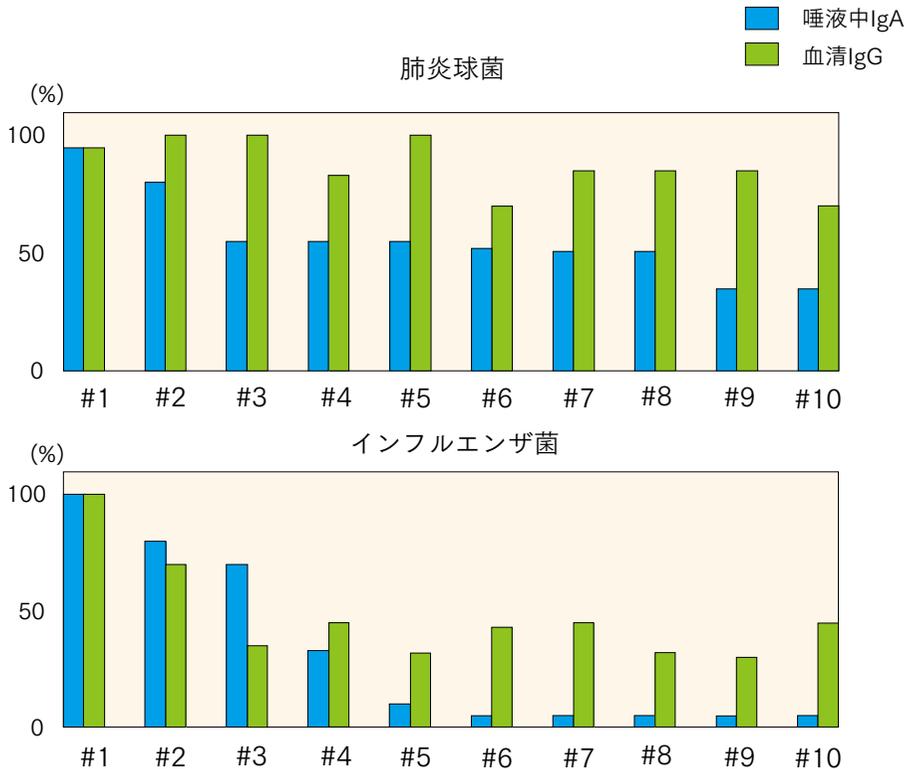


図5：唾液中 IgA および血清 IgG の肺炎球菌、インフルエンザ菌に対する交差反応

PC-KLH+CT 群の唾液中 IgA は、反応性は異なるが、すべての肺炎球菌および半数のインフルエンザ菌と血清 IgG はすべての肺炎球菌とインフルエンザ菌に交差反応した。

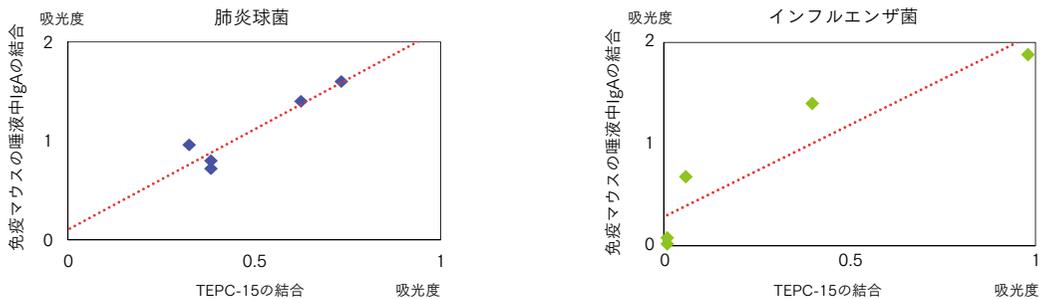


図6：唾液中 IgA の肺炎球菌およびインフルエンザ菌に対する反応

PC-KLH+CT 群の唾液中 IgA の肺炎球菌、インフルエンザ菌に対する反応性は、TEPC-15の反応と相関した。

#### ④ PC 経鼻免疫による鼻腔細菌クリアランスの亢進

PC-KLH+CT 群では、肺炎球菌、インフルエンザ菌ともに、それぞれの生菌接種 12 時間後に鼻腔洗浄液および鼻粘膜から検出される細菌数が、CT 群と比較して有意に少なかった。(図 7) すなわち、PC 経鼻免疫によって鼻腔における細菌クリアランスが亢進することが示された。

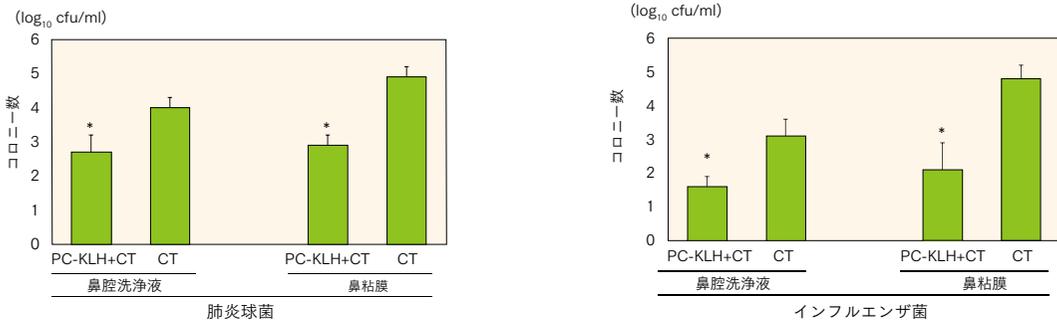


図 7: PC 経鼻免疫後の鼻腔における細菌クリアランス

PC-KLH+CT 群では CT 群と比較して有意に、鼻腔からの細菌クリアランスが亢進した。\* $p < 0.05$ 。

#### 考 察

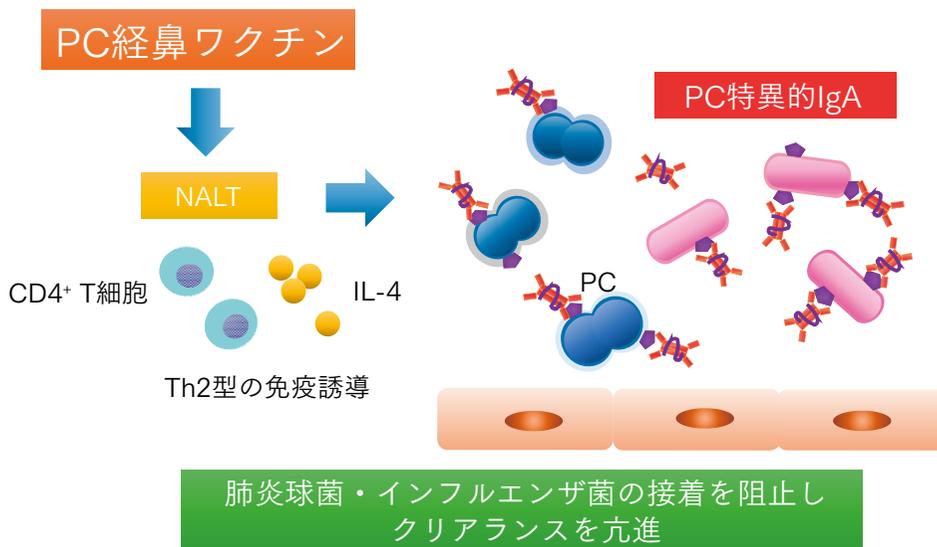
PC-KLH を CT とともに経鼻免疫することで、唾液および鼻腔洗浄液中に PC 特異的 IgA が産生され、鼻粘膜中には PC 特異的 IgA 産生細胞の著しい増加が見られた。PC 特異的 IgM、IgG 産生細胞も有意に増加したが、PC 特異的 IgA 産生細胞と比較するとその上昇はわずかであった。血清中の PC 特異的抗体そして脾臓の PC 特異的抗体産生細胞数も PC-KLH 群で有意に高値を示し、脾臓の PC 特異的 IgG 産生細胞、IgA 産生細胞は、CT 群と比較してその差は軽微であった。これらの結果から、PC-KLH の経鼻免疫では、粘膜および全身免疫応答がともに誘導されるが、鼻粘膜における粘膜免疫応答とくに PC 特異的 IgA 産生が優位になることが示唆される。分泌液中の IgA すなわち分泌型 IgA の誘導には Th2 型の免疫応答が必要であり、今回の実験で CD4<sup>+</sup>T 細胞から Th2 型サイトカインである IL-4 の産生が有意に亢進したことは、これを支持する所見と考えられる。なお、PC 特異的 IgM に関しては、これが自然免疫系の抗体として感染防御において重要な役割を担い、T 細胞非依存性に B1 細胞で産生されることが知られている<sup>6)</sup>。したがって、脾臓における PC 特異的 IgM の産生が著明なのは、B1 細胞の活性化が要因となっているのかもしれない。

今回の研究では、PC にキャリアー蛋白として KLH を結合させた PC-KLH を用いた。そのため、PC-KLH による経鼻免疫で誘導された抗体が PC と KLH との結合部位などに反応し、PC に特異的でない可能性がある。そこで、PC および PC と同じくコリンを含む Ach、コリンを含まない PE を用いて、唾液中 IgA よび血清 IgM、IgG と PC との結合阻害実験を行った。その結果、唾液中 IgA と血清 IgM は PC 特異的 IgA である TEPC-15 と同様の阻害効果が認められ、その PC 特異性が証明された。

唾液などの外分泌液中に含まれるIgAは分泌型IgAで、細菌の接着因子と結合して細菌の上皮への接着や侵入を阻止する<sup>7)</sup>。PCはこの接着因子の一つであり、肺炎球菌やインフルエンザ菌は、細菌表面のPCと上皮表面のPAF受容体との結合によって上皮へ接着することが知られている<sup>4,5)</sup>。そこで、肺炎球菌とインフルエンザ菌の臨床分離株から細胞壁を抽出し、唾液中のIgAとTEPC-15との反応を比較したところ、両者は多くの肺炎球菌およびインフルエンザ菌と反応し、正の相関を示した。すなわち、唾液中のPC特異的IgAが複数の細菌と交差反応することが示された。さらに、PC-KLH群では鼻腔の細菌クリアランスが亢進しており、これは経鼻免疫によって誘導された鼻汁中の分泌型IgAが細菌の接着を阻止した結果であると推測される。PCを高発現する細菌は病原性が高く、上・下気道感染症の遷延化に関与すると考えられている<sup>8,9)</sup>。したがって、PC-KLHの経鼻投与によって誘導される粘膜免疫応答は、PCの発現が強く病原性が高い細菌のみを排除し、病原性が弱い常在菌などには影響を及ぼさず、細菌叢の恒常性を乱す危険性も少ないと考えられる。

### 結 語

PCの経鼻免疫によってPC特異的な粘膜および全身免疫応答が誘導され、PC特異的IgAは複数の肺炎球菌およびインフルエンザ菌と反応し、そのクリアランスを亢進する。これらの結果から、PCは免疫原性を有し、広域スペクトラムを持つ経鼻粘膜ワクチンとして有効であると考えられる。



## 参考文献

- 1) Sugino H, Tsumura S, Kunimoto M, et al. Influence of Pneumococcal Conjugate Vaccine on Acute Otitis Media with Severe Middle Ear Inflammation: A Retrospective Multicenter Study. PLoS One 2015;10:e0137546.doi:10.1371/journal.pone.0137546.
- 2) Eskola J, Kilpi T, Palmu A, et al. Efficacy of a pneumococcal conjugate vaccine against acute otitis media. N Engl J Med 2001;344:403-409.
- 3) Tomasz A. Choline in the cell wall of a bacterium: novel type of polymer-linked choline in *Pneumococcus*. Science 1967;157:694-697.
- 4) Cundell DR, Gerard NP, Gerard C, et al. *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. Nature 1995;377:435-438.
- 5) Swords WE, Buscher BA, Ver Steeg Ii K, et al. Non-typeable *Haemophilus influenzae* adhere to and invade human bronchial epithelial cells via an interaction of lipooligosaccharide with the PAF receptor. Mol Microbiol 2000;37:13-27.
- 6) Grönwall C, Vas J, Silverman GJ. Protective roles of natural IgM antibodies. Front Immunol 2012;3:66.doi:10.3389/fimmu.2012.00066.
- 7) Kurono Y, Shimamura K, Shigemi H, et al. Inhibition of bacterial adherence by nasopharyngeal secretions. Ann Otol Rhinol Laryngol 1991;100:455-458.
- 8) Fujita K, Hirano T, Kodama S, et al. Prognostic impact of phosphorylcholine expression in nontypeable *Haemophilus influenzae* in otitis media with effusion. Acta Oto-Laryngol 2009;129:832-838.
- 9) Weiser JN, Pan N, McGowan KL, et al. Phosphorylcholine on the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae* contributes to persistence in the respiratory tract and sensitivity to serum killing mediated by C-reactive protein. J Exp Med 1998;187:631-640.

## 〈Summary〉

経鼻ワクチンなどの粘膜ワクチンの実用化には、ターゲットとなる抗原の探索とともに有効で安全な粘膜アジュバントの開発が必須である。動物実験ではコレラトキシン (CT) が用いられ、その粘膜アジュバントとしての効果はよく知られているが、ヒトでは毒性が高いため臨床応用はできない。現在ヒトへの応用が期待されているアジュバントとして polyriboinosinic-polyribocytidylic acid (poly (I:C)) がある。そこで、poly(I:C) をホスホリルコリン (PC) とともにマウスに経鼻投与し、その粘膜アジュバントとしての効果を CT と比較した。その結果、鼻腔洗浄液中の PC 特異的 IgA 抗体は poly(I:C) 群においても CT 群と同等の上昇がみられ、血清中の PC 特異的 IgM、IgG、IgA 抗体はいずれも、poly(I:C) 群と CT 群とでは有意な差は認められなかった。また、PC 特異的血清 IgG サブクラスは、poly(I:C) 群では CT 群と比較して IgG1 抗体価が有意に低く、IgG2a 抗体価は両群間で差がなかった。さらに、血清総 IgE 値は、CT 群では対照群と比較して有意に上昇したのに対して、poly(I:C) 群では有意差はみられなかった。以上の結果から、poly(I:C) は CT とほぼ同等の粘膜アジュバントとしての効果を示し、CT よりも Th2 型へのシフトが緩やかで I 型アレルギー反応を誘導する危険性が少ないことが示された。

## はじめに

上気道感染症の予防には粘膜免疫応答の賦活が有効であり、その誘導には粘膜アジュバントを用いることが必要とされる<sup>1,2)</sup>。粘膜アジュバントとしてコレラトキシン (CT) などの細菌毒素由来のアジュバントが用いられてきたが、I 章 3-2) で述べたように、大腸菌易熱性毒素をアジュバントとする経鼻インフルエンザワクチンの臨床試験において Bell 麻痺が高頻度に生じたため、臨床では、細菌毒素由来のアジュバントを用いたワクチンの開発は中止された<sup>3)</sup>。我々はこれまでホスホリルコリン (PC) の粘膜アジュバントとして CT を用いてきたが、今後 PC ワクチンをヒトに応用するためには CT 以外のアジュバントを用いて研究を行う必要がある。そこで、すでに内因性 IFN 誘導薬である dsRNA 製剤 Ampligen (poly I: polyC12U) として上市され臨床研究がすすめられている<sup>2)</sup> polyriboinosinic-polyribocytidylic acid (poly(I:C)) に着目し、これを粘膜アジュバントとして用い、その粘膜免疫応答を CT と比較した。

## 材料と方法

### ① 免疫の方法

6週齢の雌性 BALB/c マウスを用いた。PC に keyhole limpet hemocyanin (KLH) を結合させた PC-KLH (200 $\mu$ g) とともにアジュバントとして CT (2 $\mu$ g) または poly(I:C) (50 $\mu$ g) を使用し、1週毎に3回、マウスの鼻腔にピペットを用いて経鼻投与した。そして、マウスを1) PBSのみ投与した群 (対照群)、2) PC-KLH +CT を投与した群 (CT 群)、3) PC-KLH+poly(I:C) を投与した群 (poly (I:C) 群) の3群に分け、経鼻免疫を行い最終免疫の1週間後に唾液、鼻腔洗浄液、血清を採取した。

### ② 粘膜における PC 特異的 IgA 抗体価および血清中 PC 特異的抗体価の測定

鼻腔洗浄液および唾液中の PC 特異的 IgA 抗体価、血清中の PC 特異的 IgM、IgG、IgA および IgG サブクラス抗体価を ELISA 法で測定した。

### ③ PC 特異的抗体産生細胞数の測定

マウスの鼻粘膜、脾臓から単核細胞を分離し、その  $1 \times 10^6$  細胞あたりの PC 特異的 IgM、IgG、IgA 細胞数を ELISpot 法で測定した。

### ④ CD4<sup>+</sup> T 細胞からのサイトカイン産生

マウスの脾臓から CD4<sup>+</sup> T 細胞を自動磁気細胞分離装置 (AutoMACS<sup>®</sup>) を用いて分離し、PC および抗原提示細胞とともに CO<sub>2</sub> インキュベーター内で72時間培養し、その培養上清中の IFN- $\gamma$  と IL-4 濃度をそれぞれ ELISA 法で測定した。

### ⑤ 血清総 IgE の定量

血清中の総 IgE を他の免疫グロブリンと同様に ELISA 法を用いて定量した。

## 結 果

## ① 外分泌液中のPC特異的IgA抗体価

鼻腔洗浄液および唾液中のPC特異的IgA抗体価は、Poly(I:C)群およびCT群ともに対照群と比較して有意に上昇した。Poly(I:C)群とCT群の比較では、鼻腔洗浄液では有意差はみとめられず、唾液ではCT群がPoly(I:C)群より有意に高値であった。(図1)

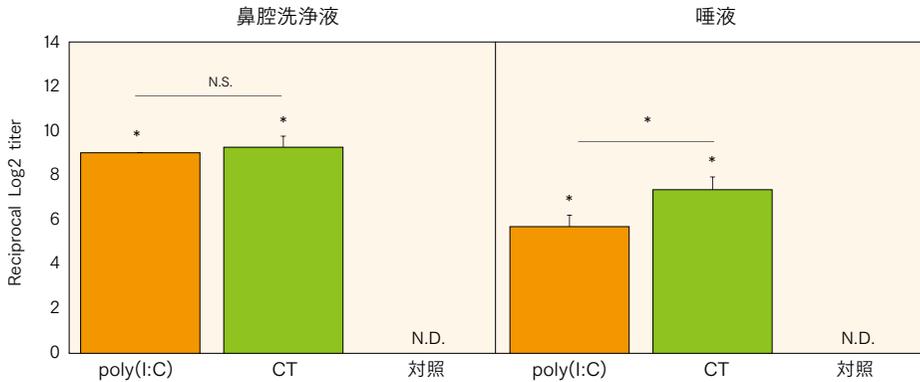


図1：外分泌液中におけるPC特異的IgA抗体価

鼻腔洗浄液のPC特異的IgA抗体価はpoly(I:C)群とCT群とで有意差はみとめられなかったが、唾液ではCT群のほうが有意に高かった。N.S.：not significant N.D.：not detected \* $p < 0.05$ .

## ② 血清中のPC特異的抗体

血清中のPC特異的IgM、IgG、IgA抗体はいずれも対照群と比較してpoly(I:C)群およびCT群で有意に上昇した。Poly(I:C)群とCT群とでは有意な差は認められなかった。(図2-A) 血清中のPC特異的IgG1、IgG2a抗体もpoly(I:C)群およびCT群が対照群と比較して有意に高値を示した。poly(I:C)群とCT群を比較すると、PC特異的IgG1抗体はpoly(I:C)群がCT群よりも有意に低く、PC特異的IgG2a抗体価は両群で有意な差はなかった。(図2-B)

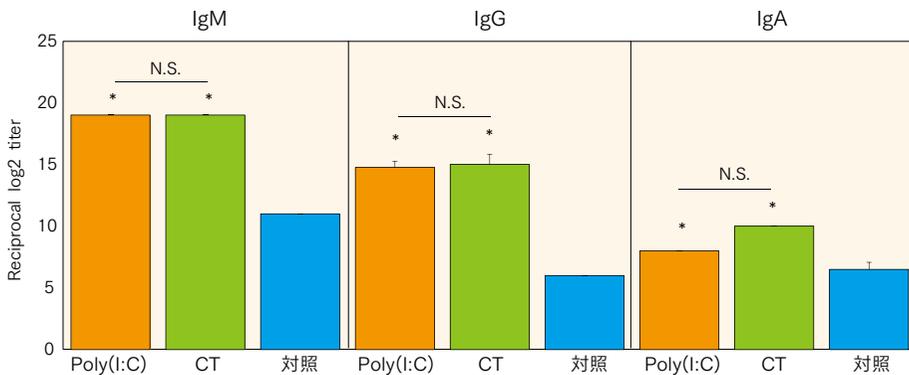


図2-A：血清中PC特異的抗体価

血清中のPC特異的IgM、IgG、IgA抗体価はいずれもpoly(I:C)群およびCT群で対照群と比較して有意に上昇した。しかし、poly(I:C)群とCT群とでは有意差はみとめられなかった。N.S.：not significant \* $p < 0.05$ .

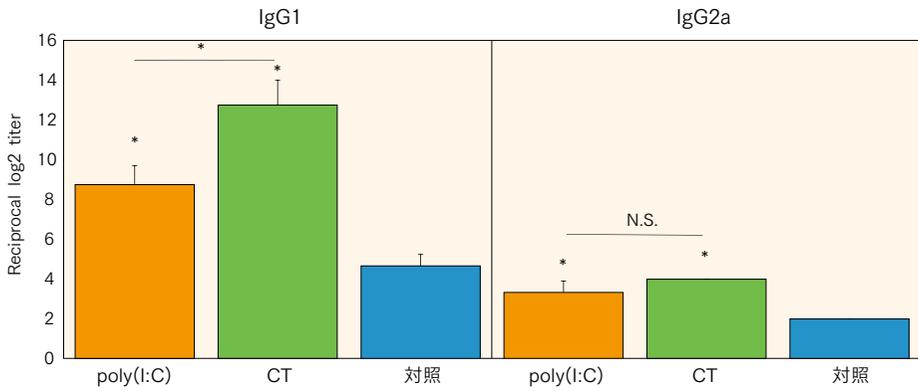


図2-B : 血清中 PC 特異的 IgG サブクラス抗体価

血清中 PC 特異的 IgG1 および IgG2a 抗体価は poly(I:C) 群と CT 群で有意に上昇し、IgG1 抗体価は poly(I:C) 群が CT 群より有意に低値であった。N.S. : not significant. \* $p < 0.05$ .

### ③ PC 特異的抗体産生細胞数の測定

#### 1) 鼻粘膜における PC 特異的抗体産生細胞数

鼻粘膜の PC 特異的 IgA 産生細胞は poly(I:C) 群と CT 群で著明に増加し、poly(I:C) 群のほうが CT 群と比較して有意に多かった。PC 特異的 IgG 産生細胞も PC 特異的 IgA 産生細胞より少ないものの poly(I:C) 群と CT 群で増加し、poly(I:C) 群のほうが多かった。一方、PC 特異的 IgM 産生細胞はほとんど変化が認められなかった。(図3-A)

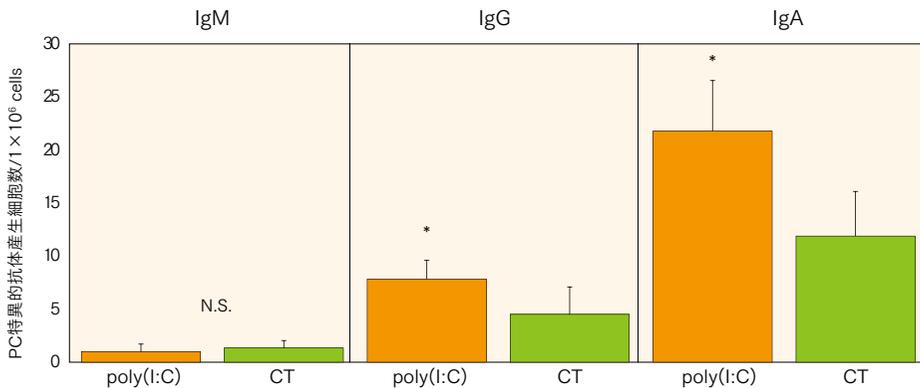


図3-A : 鼻粘膜における PC 特異的抗体産生細胞数

鼻粘膜における PC 特異的 IgA および IgG 産生細胞数は poly(I:C) 群と CT 群で著明に増加し、poly(I:C) 群のほうが高値を示した。N.S. : not significant \* $p < 0.05$ .

## 2) 脾臓におけるPC特異的抗体産生細胞数

脾臓ではPC特異的IgM産生細胞の増加が著明で、poly(I:C)群よりもCT群のほうが高値を示した。PC特異的IgA産生細胞もPC特異的IgM産生細胞より少ないものの同様の傾向を示し、その細胞数はpoly(I:C)群よりもCT群のほうが多かった。PC特異的IgG産生細胞は他のアイソタイプと比較して細胞数が少なく、poly(I:C)群とCT群とで差がみられなかった。(図3-B)

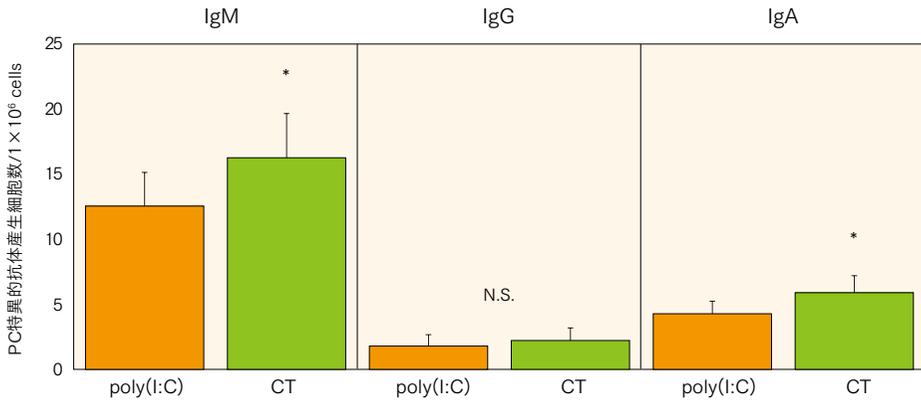


図3-B: 脾臓におけるPC特異的抗体産生細胞数

脾臓ではPC特異的IgM産生細胞数の増加が著明で、poly(I:C)群よりCT群のほうが高値であった。PC特異的IgA産生細胞も同様の傾向を示したが、PC特異的IgG産生細胞は両群で差がなかった。N.S.: not significant \* $p < 0.05$ .

## ④ CD4<sup>+</sup>T細胞からのサイトカイン産生

PC刺激によってCD4<sup>+</sup>T細胞からIL-4とIFN- $\gamma$ がともに産生されたが、Poly(I:C)群とCT群で有意な差は認められなかった。(図4)

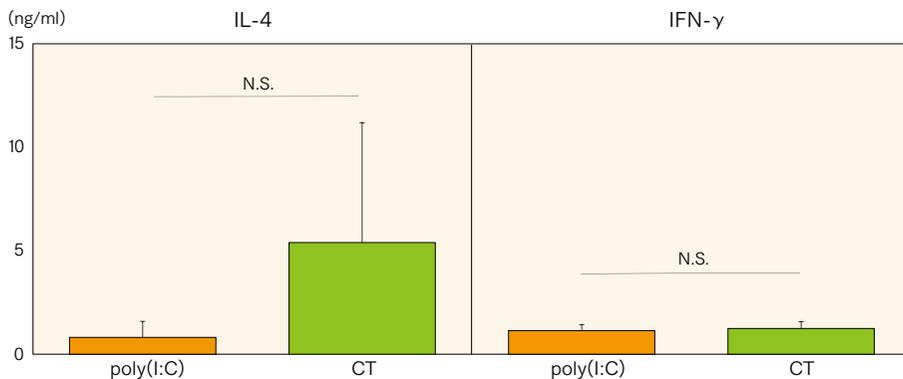


図4: PC刺激によるCD4<sup>+</sup>T細胞からのサイトカイン産生

IL-4およびIFN- $\gamma$ の産生が認められたが、poly(I:C)群とCT群で有意な差はなかった。N.S.: not significant.

## ⑤ 血清総 IgE 値

血清総 IgE 値は何れの群も低値であったが、CT 群は対照群と比較して有意に高かった。それに対して、poly(I:C) 群の血清総 IgE 値は CT 群より有意に低値で、対照群と有意差がなかった。(図 5)

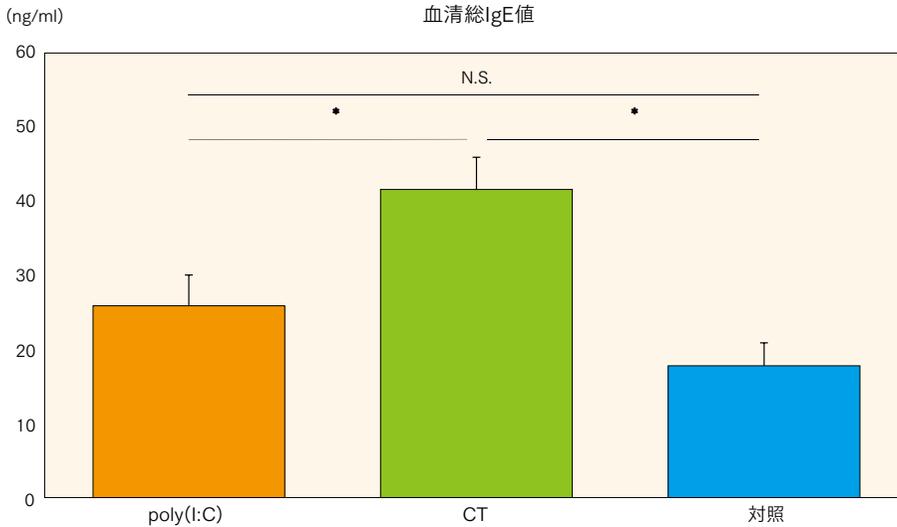


図 5 : 血清総 IgE 値

poly(I:C) 群の血清総 IgE 値は CT 群より有意に低く、対照群と有意差がなかった。N.S. : not significant \* $p < 0.05$ .

## 考 察

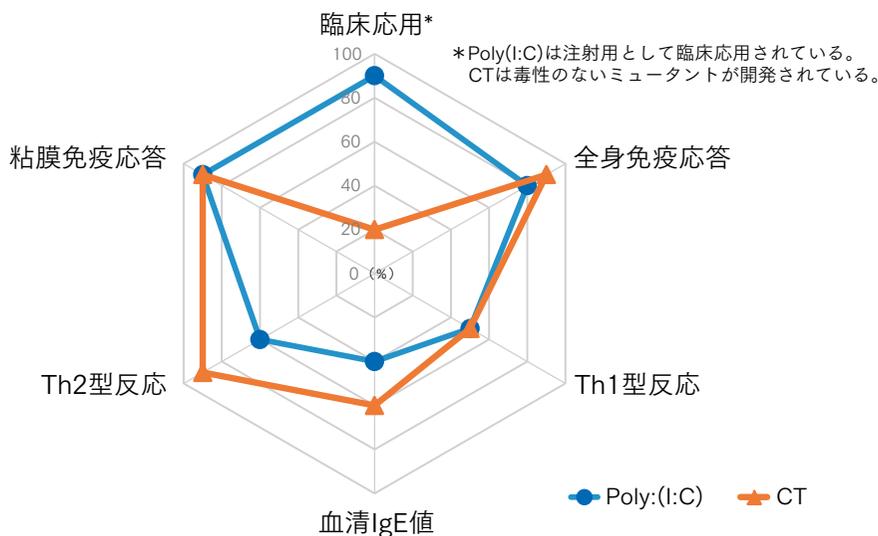
経鼻免疫による粘膜および全身免疫応答の誘導には粘膜アジュバントの併用が必要であり、今回抗原として用いた PC を経鼻投与した場合も、粘膜アジュバントとして CT を用いることで鼻腔洗浄液および唾液中に PC 特異的 IgA が誘導され、それによって細菌のクリアランスが亢進された<sup>5)</sup>。しかし、CT はヒトに対する毒性が強いため無毒化したミュータント CT などが開発されている<sup>6)</sup>が、未だ臨床応用には至っていない。一方、本研究で用いた poly(I:C) はマウスの実験で経鼻インフルエンザワクチンのアジュバントとしての有効性が報告され、臨床応用も可能になっている<sup>7-12)</sup>。そこで今回、PC 経鼻免疫における poly(I:C) のアジュバント効果を CT と比較したところ、鼻腔洗浄液および唾液中の PC 特異的 IgA 抗体は poly(I:C) 群でも CT 群と同様に上昇し、両群で有意差はなかった。さらに、鼻粘膜の PC 特異的 IgA 産生細胞数そして IgG 産生細胞数も両群でともに増加し、poly(I:C) 群のほうが CT 群よりも有意に多かった。また、血清中の PC 特異的抗体価ならびに脾臓の PC 特異的抗体産生細胞数も両群でともに上昇し、血清中の PC 特異的抗体価は両群で差はなかったが、脾臓における PC 特異的 IgM および IgA 産生細胞数は CT 群のほうが有意に多かった。すなわち、poly(I:C) を経鼻投与しても CT と同等の粘膜および全身免疫応答が誘導されることが示された。なお、PC 特異的抗体産生細胞数は鼻粘膜では poly(I:C) 群が、脾臓では CT 群のほうが有意に多く、両アジュバントの鼻粘

膜そして血液中への組織移行性の差によるものと推測されるが、今後の詳細な解析が必要と考える。

poly(I:C)はウイルス由来 dsRNA のアナログであり、樹状細胞上に存在するその受容体である TLR-3 と結合してウイルス感染に似た様式で Th1 型優位の免疫応答を誘導することが<sup>13)</sup>、それに対して CT は Th2 型優位の免疫応答を誘導することが報告されている<sup>5,14,15)</sup>。本研究においても、PC 特異的 IgG1 抗体価は CT 群が poly(I:C) 群より有意に高く、CD4<sup>+</sup> T 細胞からの IL-4 の産生においても、有意差はなかったが、CT 群のほうが poly(I:C) 群よりも多く、CT がより強い Th2 型の免疫応答を誘導することが確認された。一方、PC 特異的 IgG2a 抗体価および CD4<sup>+</sup> T 細胞からの IFN- $\gamma$  の産生は poly(I:C) 群と CT 群で差はなく、poly(I:C) が Th1 型の免疫応答を誘導することの証左は得られなかった。PC が IL-12 の産生を亢進し Th1 型の免疫応答を誘導する<sup>16)</sup>ため、poly(I:C) による Th1 型の反応が明確に現れなかったのかもしれない。しかし、Th2 型の免疫応答によって誘導される IgE の産生は poly(I:C) 群で CT 群より有意に少なく、対照群とは有意差がない程度に抑えられており、poly(I:C) による Th1 型優位の反応が誘導された結果と推測される。

### 結語

poly(I:C) は PC 経鼻免疫において CT とほぼ同等の粘膜および全身免疫応答を誘導し、I 型アレルギー反応を起こす危険性は CT よりも少なく、有効かつ安全な粘膜アジュバントである。



### 参考文献

- 1) 清野 宏, 岡田和也: 粘膜免疫システム—生体防御の最前線. 日耳鼻 2011;114:843-850.
- 2) 長谷川秀樹: 新しいワクチン開発 経鼻インフルエンザワクチンの開発. 臨床と微生物 2015;37:213-217.
- 3) Mutsch M, Zhou W, Rhodes P, et al. Use of the Inactivated, Intranasal Influenza Vaccine and the Risk of Bell's Palsy in Switzerland. *N Engl J Med* 2004;350:896-903.
- 4) Jasani B, Navabi H, Adams M, et al. Ampligen: a potential toll-like 3 receptor adjuvant for immunotherapy of cancer. *Vaccine* 2009;27:3401-3404.
- 5) Tanaka N, Fukuyama S, Fukuiwa T, et al. Intranasal immunization with phosphorylcholine induces antigen specific mucosal and systemic immune responses in mice. *Vaccine* 2007; 25: 2680-2687.
- 6) Yuki Y, Tokuhara D, Nochi T, et al. Oral MucoRice expressing double-mutant cholera toxin A and B subunits induces toxin-specific neutralising immunity. *Vaccine* 2009;27:5982-5988.
- 7) Ichinohe T, Watanabe I, Ito S, et al. Synthetic double-stranded RNA poly(I:C) combined with mucosal vaccine protects against influenza virus infection. *J Virol* 2005;79:2910-2919.
- 8) Thomas M, Wang Z, Sreenivasan CC, et al. Poly I:C adjuvanted inactivated swine influenza vaccine induces heterologous protective immunity in pigs. *Vaccine* 2015; 33:542-548.
- 9) Kim ED, Han SJ, Byun YH, et al. Inactivated Eyedrop Influenza Vaccine Adjuvanted with Poly (I:C) Is Safe and Effective for Inducing Protective Systemic and Mucosal Immunity. *PLoS One* 2015;10:e0137608.
- 10) Ichinohe T, Kawaguchi A, Tamura S, et al. Intranasal immunization with H5N1 vaccine plus Poly I:Poly C12U, a Toll-like receptor agonist, protects mice against homologous and heterologous virus challenge. *Microbes Infect* 2007;9:1333-1340.
- 11) Ichinohe T, Ainai A, Tashiro M, et al. PolyI: polyC12U adjuvant-combined intranasal vaccine protects mice against highly pathogenic H5N1 influenza virus variants. *Vaccine* 2009;2327:6276-6279.
- 12) Ichinohe I, Tamura S, Kawaguchi A, et al. Cross-Protection against H5N1 Influenza Virus Infection Is Afforded by Intranasal Inoculation with Seasonal Trivalent Inactivated Influenza Vaccine. *J Infect Dis* 2007;196:1313-1320.
- 13) Adams M, Navabi H, Jasani B, et al. MasonDendritic cell (DC) based therapy for cervical cancer: use of DC pulsed with tumour lysate and matured with a novel synthetic clinically non-toxic double stranded RNA analogue poly [I]:poly [C(12)U] (Ampligen®). *Vaccine* 2003; 21:787-790.
- 14) Freytag LC, Clements JD. Mucosal adjuvants. *Vaccine* 2005;23:1804.
- 15) Maseda Y, Ohori J, Tanaka N, et al. Mucosal and systemic immune response to sublingual or intranasal immunization with phosphorylcholine. *Auris Nasus Larynx* 2017;45:273-280.
- 16) Miyashita K, Ohori J, Nagano H, et al. Intranasal immunization with phosphorylcholine suppresses allergic rhinitis in mice. *Laryngoscope* 2018 (in press).

### 〈Summary〉

経鼻ワクチンによる免疫応答の誘導には粘膜アジュバントが必要であり、その開発が急務となっている。今回我々は、樹状細胞 (DC) の増殖因子である Flt3 ligand の cDNA を組み込んだプラスミド (pFL) ならびに CpG 配列を含んだオリゴデオキシ核酸 (CpG ODN) を併用する複合 DNA アジュバントを用いて、マウスに対する経鼻免疫実験を行った。その結果、複合 DNA アジュバントは最終免疫から 25 週間以上の長期にわたって持続する抗原特異的粘膜および全身免疫応を誘導することがわかった。この免疫反応では Th1 および Th2 型サイトカインがバランスよく産生されており、また粘膜免疫の誘導組織である鼻咽腔関連リンパ組織 (NALT) における形質細胞様 DC (plasmacytoid DC; pDC) と CD8<sup>+</sup> DC の選択的増加が認められた。さらに重要なことに、複合 DNA アジュバントによる経鼻免疫は 2 年齢の老齢マウスでも有意な粘膜免疫応答を誘導した。以上の結果より、複合 DNA アジュバントは有効な粘膜アジュバントであることが明らかとなった。

### はじめに

粘膜免疫は生体防御の第一線で働き、ウイルスや細菌から生体を守る。粘膜面での働きとして重要なものとして、分泌型 IgA の産生及び上皮を通しての IgA の輸送などが挙げられる<sup>1,2)</sup>。粘膜免疫ワクチンの投与経路では経鼻投与が重要かつ有効であるが<sup>3)</sup>、不活化粘膜ワクチンによる免疫応答を確立させるためには粘膜アジュバントが必要である。

代表的な粘膜アジュバントとしてコレラトキシン (CT) があり、その有効性が数多く報告されてきた<sup>4)</sup>。CT は Th2 型優位な免疫応答を介して全身性及び局所粘膜免疫応答を確立することができる。しかし CT は、その病原性によりヒトでは重篤な下痢などの副作用を併発するため、臨床応用することができない<sup>5)</sup>。そのため粘膜ワクチンの臨床応用には、CT と同等あるいはそれを上回る効果があり、かつ副作用のない安全な粘膜アジュバントの研究が必須とされてきた。

これまで我々は、樹状細胞 (DC) をターゲットとする DNA アジュバントに関する研究を行ってきた。DC は免疫機構の中でも自然免疫と獲得免疫との間の橋渡しをし、獲得免疫を調節する細胞として知られている<sup>6)</sup>。DC は、外来微生物に含まれる病原体関連分子パターン (pathogen-associated molecular patterns; PAMPs) を認識して炎症性サイトカイン産生を行い、炎症反応を誘導するとともに、取り込んだ抗原を T 細胞へ提示することにより抗原特異的 T 細胞の活性化・増殖を誘導して獲得免疫を活性化する。DC は、単一の細胞集団ではなく、その生理的活性や細胞表面分子の発現の違いによっていくつか

のサブセットに分類できる<sup>7)</sup>。その中の一つである形質細胞様 DC (plasmacytoid DC; pDC) は、ウイルスゲノムや細菌ゲノムを含めた核酸を認識する Toll-like receptor (TLR) -7 や 9 の活性化により、大量の I 型インターフェロン (IFN) を産生する<sup>8,9)</sup>。この pDC は、上記特性からウイルス感染防御において重要な働きをしていると考えられている<sup>9)</sup>。pDC 以外の DC は、マウスでは通常型 DC (conventional DC; cDC) と呼ばれ、さらにいくつかのサブセットに細分化される。マウス脾臓では CD8 陽性 (+) と陰性 (-) とに分類され、CD8<sup>+</sup> DC はアポトーシスに陥った細胞を取り込む能力が高く、また、取り込んだ抗原を MHC class I 上に提示するクロスプレゼンテーションを行う。また、二本鎖 RNA を認識する TLR3 を、DC サブセット間では特異的に発現しており、その活性化により炎症性サイトカインの産生と共に抗原提示能の増強が誘導される<sup>8)</sup>。

過去の研究で我々は、DC の増殖因子である Flt3 ligand の cDNA をコードしたプラスミド (pFL) を経鼻粘膜アジュバントとして用いると、強い全身性及び粘膜免疫応答が誘導されることを明らかにした。さらに、このアジュバントは鼻咽腔関連リンパ組織 (NALT) での CD8<sup>+</sup> DC を選択的に増加させ、CD4<sup>+</sup> T 細胞からの Th2 型サイトカインである IL-4 の産生を増強することから、これらが本アジュバントの作用機序であることが示唆された<sup>10)</sup>。

また、近年注目されている DNA 粘膜アジュバントとして CpG ODN がある。細菌やウイルスなどの病原体 DNA には、高頻度で CpG モチーフと呼ばれる特定の 6 塩基配列が現れる。この配列を化学合成した非メチル化 CpG オリゴ核酸が CpG ODN であり、PAMPs の 1 種である<sup>9,11)</sup>。CpG ODN は TLR-9 を介して pDC を活性化することで、粘膜アジュバントとして働く<sup>12)</sup>。CpG ODN は抗原と共に経鼻免疫することで全身性及び局所粘膜免疫応答を誘導することが報告されており、さらに CD4<sup>+</sup> T 細胞より Th1 型サイトカイン産生を促すといわれている<sup>13)</sup>。

そこで我々は、pFL と CpG ODN からなる複合 DNA アジュバントを用いて、経鼻免疫における粘膜アジュバントとして有効か、本アジュバントが Th1 および Th2 型サイトカインをバランスよく産生できるかを検討した。また、本アジュバントが NALT の DC へ及ぼす影響を解析し、DC をターゲットとした粘膜アジュバントの作用機序を検討した。さらに、若齢マウスと老齢マウスを対象とすることで、本アジュバントの高齢者における有用性を検討した<sup>14)</sup>。

## 材料と方法

### ① マウス

若齢マウスとして 6-8 週齢の雌性 BALB/C マウスを、老齢マウスとして 2 年齢の雌性 BALB/C マウスをそれぞれ用いた。一部の実験では卵白アルブミン (OVA) 特異的 TCR 遺伝子を導入したトランスジェニックマウス (DO11.10 マウス) を用いた<sup>15)</sup>。

### ② 粘膜アジュバントと経鼻免疫

マウスへの経鼻免疫は 1 週間おきに計 3 回行った。抗原として OVA 100 $\mu$ g、粘膜アジュ

バントとして pFL 50 $\mu$ g、CpG ODN 10 $\mu$ g を用いて、6.5ul の PBS に溶解したものを1回あたりの経鼻投与量とした<sup>10,16)</sup>。pFL、CpG ODN については、各々単独で使用、或いは複合DNAアジュバントとして同時使用した。(図1) なお一部の実験ではCTを粘膜アジュバントとして、1回当たり0.5 $\mu$ gをOVA 100 $\mu$ gと共に計3回経鼻投与した<sup>14)</sup>。

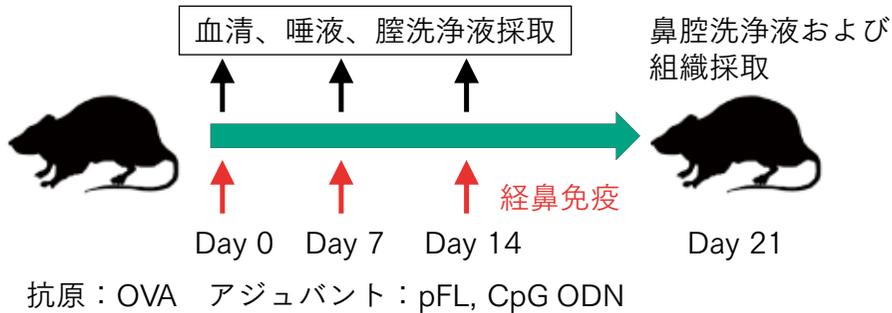


図1：経鼻免疫の方法

### ③ サンプル採取とOVA特異的抗体価の測定

初回の経鼻免疫を行った日を0日目として、0、7、14、21日目にそれぞれ血清、唾液、腔洗浄液(VW)を採取した。長期観察実験では、最終免疫日(14日目)から27週間まで毎週上記サンプルを採取した。鼻腔洗浄液(NW)は上咽頭から1mlのPBSにて洗浄を行い採取した<sup>3)</sup>。これらのサンプルにおけるOVA特異的抗体価測定はELISA法にて行った。脾臓、頸部リンパ節、NALT、鼻粘膜、顎下腺をそれぞれ採取し、各組織から単核球の分離精製を行った<sup>2)</sup>。これら単核球を用いてELISPOT法によるOVA特異的抗体産生細胞数(AFCs)の測定を行った<sup>2,3,10,14)</sup>。

### ④ CD4<sup>+</sup>T細胞のサイトカイン産生能の測定

経鼻免疫後のマウスより採取した脾臓、頸部リンパ節を用いて、CD4<sup>+</sup>T細胞を分離精製した。細胞分離には自動磁気細胞分離装置(AutoMACS<sup>®</sup>)を使用した<sup>3,17)</sup>。フィーダー細胞としてナイーブマウスの脾臓から放射線照射により分離した抗原提示細胞を用意した。これら2種の細胞に抗原としてOVA 1mg/mlを加え、CD4<sup>+</sup>T細胞のOVA特異的な反応を調べるために5日間培養した。培養液は回収後、遠心分離により上清と細胞ペレットにわけられた。培養液の上清を用いてELISA法によりサイトカイン量を測定した<sup>3,15)</sup>。また培養細胞ペレットはTRIZOL<sup>®</sup>処理を行いRNAを抽出した。さらにLightCycler<sup>®</sup>を用いてサイトカイン特異的mRNAの定量解析を行った<sup>14)</sup>。

### ⑤ フローサイトメトリーによるDCの解析

NALT、鼻粘膜、頸部リンパ節、脾臓の各々から分離された単核球を用いて、FITC、PE、ビオチンの各種蛍光標識抗体で染色処理を行い、フローサイトメトリー(FACS)によるDCの分布およびそのサブセットの解析を行った<sup>14)</sup>。

## ⑥ 免疫組織化学的染色法による NALT における DC の解析

頸椎脱臼にてマウスを安楽死させた後、心臓に4%パラホルムアルデヒドを注射して全身を還流固定した。皮膚剥離後に頭部を分離し上顎組織を採取し、1%パラホルムアルデヒドにて24時間固定後、10%EDTAにて7日間の脱灰処理を行った。ショ糖処理にて組織分離を防止した後OCTコンパウンドで包埋し、 $-160^{\circ}\text{C}$ で凍結処理して $4\mu\text{m}$ の凍結切片を切り出した。PE蛍光標識抗B220抗体、ビオチン標識抗CD11c抗体、ビオチン標識抗CD3抗体にてそれぞれ染色を行い、ビオチン標識抗体についてはAlexa Fluor 488抗体にて蛍光染色処理を行った。染色後の切片は蛍光顕微鏡にて観察しデジタルイメージを保存した<sup>14)</sup>。

## ⑦ DC の抗原提示活性能の解析

経鼻免疫後のマウスにおけるDCの抗原提示活性を解析するために、培養実験を行った。抗原としてOVA、粘膜アジュバントとしてpFLおよびCpG ODNを用いて経鼻免疫したマウスから、NALT、鼻粘膜、頸部リンパ節を採取した後、それぞれ単核球を分離した。NALT、鼻粘膜由来の単核球はPE蛍光標識抗CD11c (HL3)抗体にて染色され、セルソーター (FACSAria)にてDCを分離精製した。頸部リンパ節由来の単核球からはCD11cマイクロビーズおよびAutoMACSにてDCを分離精製した。DO11.10マウスの脾臓からセルソーターを用いてOVA特異的ナイーブ $\text{CD4}^+$ T細胞を分離精製した。NALTのDC( $1 \times 10^4$ 個)、鼻粘膜のDC( $2 \times 10^4$ 個)、頸部リンパ節のDC( $2 \times 10^4$ 個)はそれぞれ同数のOVA特異的ナイーブ $\text{CD4}^+$ T細胞と共に5日間培養された。終了18時間前にトリチウムチミジン $0.5\text{mCi}$ を添加し、シンチレーションカウンターでの測定値からstimulation index (S.I.)を算出して、OVA特異的ナイーブ $\text{CD4}^+$ T細胞の増殖反応を比較検討した<sup>14)</sup>。

## 結 果

### ① 複合 DNA アジュバントは抗原特異的粘膜及び全身免疫応答を誘導する

若齢マウスを用いて複合DNAアジュバントのアジュバント活性を検討した。抗原であるOVAと共にpFLおよびCpG ODNからなる複合DNAアジュバントを経鼻免疫したところ、鼻腔洗浄液および唾液中のOVA特異的分泌型IgAが有意に上昇した。一方、OVA単独免疫群ではIgA産生がなかったことより、複合DNAアジュバントの粘膜アジュバントとしての効果が確認された。なおOVA+pFL、およびOVA+CpG ODNの2群でもそれぞれOVA特異的分泌型IgAの有意な上昇を認めしたが、pFL+CPG ODNの複合アジュバントを使用した場合、これら2群よりも有意に高い抗体産生が得られることが分かった。(図2)

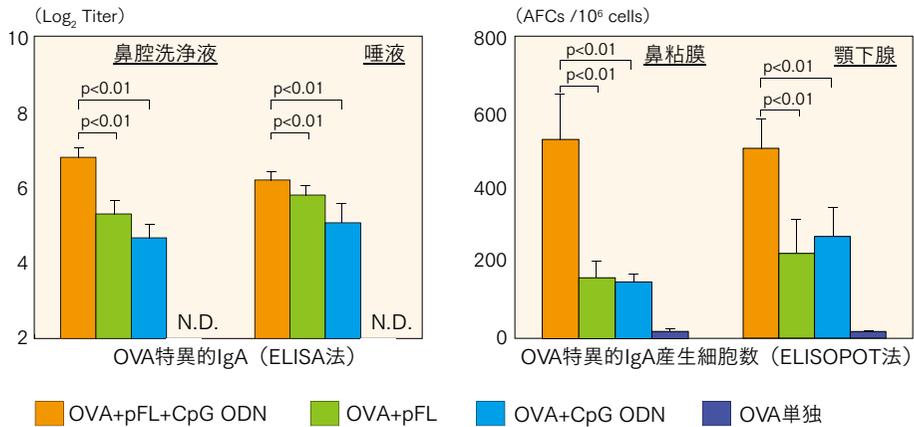


図2：経鼻免疫後のOVA特異的分泌型IgA抗体価とIgA産生細胞数の比較

これらの結果をさらに裏付けるため、鼻粘膜及び顎下腺におけるOVA特異IgA抗体産生細胞数をELISOT法にて測定した。その結果、OVAと複合DNAアジュバントを経鼻免疫した群では、OVA単独免疫群と比較してAFCsの有意な上昇を認めた。これはOVA+pFL、或いはOVA+CpG ODNによる経鼻免疫群と比較しても有意に高いAFCsの上昇であり、ELISA法による分泌型IgAの測定結果と一致した。(図2)一方、血清中のOVA特異的抗体価については、OVA+pFL+CpG ODN群、OVA+pFL群、OVA+CpG ODN群の3群いずれでも同等の抗体価上昇を認めた(図3)。OVA特異的IgGに関してIgGサブクラスを解析したところ、OVA+pFL群ではIgG1及びIgG2bが増加しIgG2aは低値であり、OVA+CpG ODN群ではIgG1及びIgG2aが増加しIgG2bは低値だった。これに対してOVA+pFL+CpG ODN群では、IgG1、IgG2aおよびIgG2bのいずれも有意に増加していた(図3)。以上の結果より、pFLとCpG ODNによる複合DNAアジュバントはTh1型およびTh2型サイトカインを介したOVA特異的免疫応答を誘導することが分かった。さらに、複合DNAアジュバントを粘膜アジュバントとして経鼻免疫

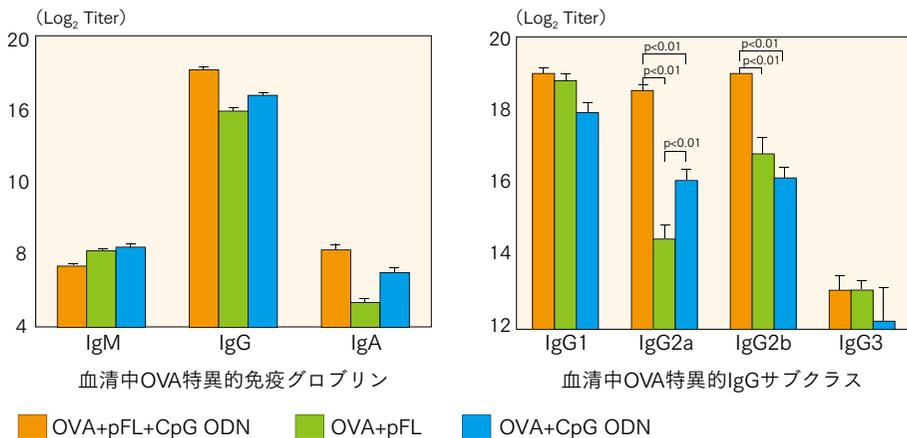


図3：経鼻免疫後の血清中OVA特異的免疫グロブリン

を行うと、DNA アジュバントを個別に使用した場合よりも有意に高いアジュバント活性をもつことが分かった。

## ② 複合 DNA アジュバントは長期持続性の粘膜免疫応答を誘導する

次に我々は、複合 DNA アジュバントが生み出す抗原特異的免疫応答の持続期間を測定した。若齢マウスを OVA+pFL+CpG ODN にて経鼻免疫すると、唾液及び膀胱洗浄液中の OVA 特異的 IgA は、最終免疫から少なくとも 25 週間以上、抗体産生が維持された (図 4)。一方、pFL あるいは CpG ODN のいずれかを単独 DNA アジュバントとして OVA と共に経鼻免疫した場合、上記分泌液中の OVA 特異的 IgA は複合 DNA アジュバント群よりも有意に低下した ( $p < 0.01$ )。これに対して血清中の OVA 特異的 IgG および IgA については、複合 DNA アジュバント群および単独 DNA アジュバント群 (pFL あるいは CpG ODN) のいずれも 25 週間以上高値のまま維持された。(図 4)

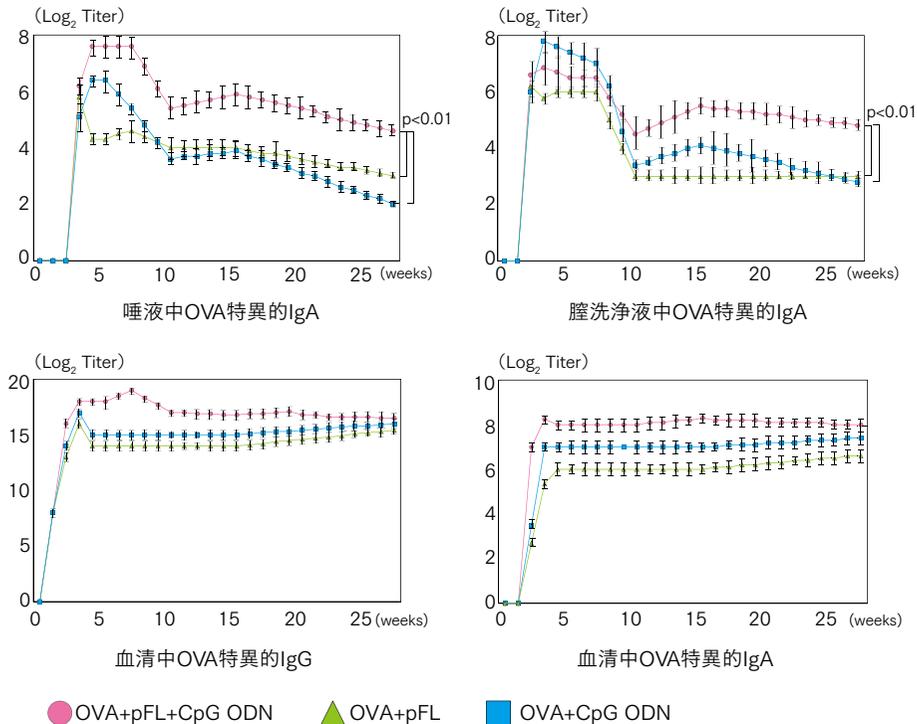


図 4：長期間観察における経鼻免疫後の OVA 特異的免疫グロブリン産生

## ③ 複合 DNA アジュバントは Th1 型および Th2 型サイトカインを同時に産生する

図 3 に示した IgG サブクラスの結果を踏まえて、複合 DNA アジュバントを使用した群と DNA アジュバントをそれぞれ単独で使用した群における、Th1・Th2 型サイトカイン産生を検討した。経鼻免疫後マウスの頸部リンパ節から CD4<sup>+</sup> T 細胞を分離し OVA 抗原にて刺激すると、OVA+pFL 群では OVA+CpG ODN と比較して IL-2 および IL-4 の有意

な上昇を認めた。一方、OVA+CpG ODN 群では OVA+pFL 群と比較して IFN- $\gamma$  の有意な上昇を認めた。興味深いことに、OVA+pFL+CpG ODN の複合 DNA アジュバント使用群では、OVA+pFL と比較して IFN- $\gamma$  が、また OVA+CpG ODN 群と比較して IL-4 が、それぞれ有意に上昇していた (表 1)。これらの結果を裏付けるため、リアルタイム定量 PCR 法にて mRNA 濃度を測定した。その結果 OVA+pFL+CpG ODN 群では、DNA アジュバントを単独使用した群と比較して IFN- $\gamma$  および IL-4 の mRNA レベルがいずれも有意に上昇していた。(表 1) 以上の結果より、複合 DNA アジュバントによる経鼻免疫では、Th1 (IFN- $\gamma$ ) および Th2 (IL-4) の免疫応答がどちらもバランスよく誘導されることが明らかとなった。

表 1: 頸部リンパ節由来 OVA 特異的 CD4<sup>+</sup> T 細胞のサイトカイン産生

| DNA アジュバント      | Th1-Th2- 型サイトカイン (pg/ml)       |                             |                             | サイトカイン特異的 cDNA 濃度 (Attomol/1 $\mu$ g total cDNA) |                                 |
|-----------------|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--|---------------------------------|
|                 | IFN- $\gamma$                  | IL-2                        | IL-4                        | IFN- $\gamma$                                    | IL-4                            |
| pFL and CpG ODN | 2881 <sup>a</sup> ( $\pm$ 141) | 26 ( $\pm$ 8)               | 19 <sup>b</sup> ( $\pm$ 2)  | 0.11 ( $\pm$ 0.08)                               | 0.17 ( $\pm$ 0.06)              |
| pFL             | 37 ( $\pm$ 9)                  | 206 <sup>b</sup> ( $\pm$ 6) | 42 <sup>b</sup> ( $\pm$ 12) | 0.00 ( $\pm$ 0.00)                               | 0.35 <sup>b</sup> ( $\pm$ 0.08) |
| CpG ODN         | 4609 <sup>a</sup> ( $\pm$ 197) | 6 ( $\pm$ 1)                | 0 ( $\pm$ 0)                | 0.64 <sup>a</sup> ( $\pm$ 0.02)                  | 0.08 ( $\pm$ 0.03)              |

<sup>a</sup>p<0.05 (Mann-Whitney U test にて OVA+pFL 群と比較検定)

<sup>b</sup>p<0.05 (Mann-Whitney U test にて OVA+CpG ODN 群と比較検定)

#### ④ 複合 DNA アジュバントは NALT の pDC と CD8<sup>+</sup> DC を選択的に増加させる

経鼻免疫後のマウスにおける CD11c<sup>+</sup> DC の分布と変化を FACS にて解析した。OVA 抗原に加えて粘膜アジュバントとして、pFL+CpG あるいは pFL を単独で使用した 2 群では、いずれも、ナイーブマウスと比較して NALT および鼻粘膜における CD11c<sup>+</sup> DC が有意に増加していた。一方、CpG ODN を単独で使用した群では DC 増加は認めなかった。NALT の DC 分布に注目してさらに詳しく解析すると、複合 DNA アジュバントあるいは pFL の単独使用によって増加した CD11c<sup>+</sup> DC では、CD8<sup>+</sup> B220<sup>+</sup> pDC および CD8<sup>+</sup> B220<sup>-</sup> non-pDC (CD8<sup>+</sup> DC) が選択的に増加していた。さらに、共刺激分子 (CD40、CD80、CD86 および MHC class II) の発現も有意に増加していたことより、経鼻免疫にて増加した DC はその活性も亢進していることがわかった<sup>14)</sup>(表 2)。なお鼻粘膜を用いた解析でも

表 2: FACS による NALT の DC 分布と DC サブセットの解析

| DNA アジュバント      | %リンパ球                         |                                | 総細胞数 ( $\times 10^3$ )               |                  |                    | 総細胞数 ( $\times 10^3$ )              |                                |
|-----------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|------------------|--------------------|-------------------------------------|--------------------------------|
|                 | CD11c <sup>+</sup>            | B220 <sup>+</sup>              | B220 <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup> |                  | CD11c <sup>+</sup> |                                     |                                |
|                 |                               |                                | CD11c <sup>+</sup>                   | CD8 <sup>+</sup> | CD11b <sup>+</sup> | CD8 <sup>+</sup> CD11b <sup>-</sup> | CD40 <sup>+</sup>              |
| pFL and CpG ODN | 5.5 <sup>a</sup> ( $\pm$ 0.7) | 21.8 <sup>a</sup> ( $\pm$ 2.6) | 1.3 <sup>a</sup> ( $\pm$ 0.1)        | 1.1 ( $\pm$ 0.4) | 2.9 ( $\pm$ 0.0)   | 24.8 <sup>a</sup> ( $\pm$ 2.6)      | 9.7 <sup>a</sup> ( $\pm$ 0.7)  |
| pFL             | 5.9 <sup>a</sup> ( $\pm$ 0.4) | 21.6 <sup>a</sup> ( $\pm$ 3.4) | 1.9 <sup>a</sup> ( $\pm$ 0.4)        | 1.4 ( $\pm$ 0.3) | 7.1 ( $\pm$ 2.7)   | 25.3 ( $\pm$ 3.7)                   | 11.6 <sup>a</sup> ( $\pm$ 2.2) |
| CpG ODN         | 2.7 ( $\pm$ 0.2)              | 7.8 ( $\pm$ 1.9)               | 0.9 ( $\pm$ 0.1)                     | 0.7 ( $\pm$ 0.2) | 2.5 ( $\pm$ 0.9)   | 10.6 ( $\pm$ 1.7)                   | 2.8 ( $\pm$ 1.6)               |
| ナイーブマウス         | 1.7 ( $\pm$ 0.3)              | 5.8 ( $\pm$ 1.9)               | 0.5 ( $\pm$ 0.1)                     | 0.6 ( $\pm$ 0.2) | 1.4 ( $\pm$ 0.4)   | 3.4 ( $\pm$ 1.2)                    | 1.4 ( $\pm$ 0.7)               |

<sup>a</sup>p<0.01 (ナイーブマウスとの比較検定)

NALT と同様の結果が得られた<sup>14)</sup>。以上より、経鼻免疫において重要な pDC および CD8<sup>+</sup> DC の増殖と活性化には、pFL の存在が不可欠であることが分かった。さらにこれまでの結果より、pFL に CpG ODN を加えることで、単独アジュバント群とは異なる、Th1 と Th2 型サイトカインのバランスが取れた免疫応答を生み出し、その反応は長期持続することが示された。

### ⑤ 経鼻免疫後の NALT では DC が T 細胞領域にて特異的に増殖する

FACS の結果を組織学的に裏付けるため、免疫組織化学的染色法により NALT の DC 分布を解析した。pFL+CpG ODN の複合 DNA アジュバントと OVA 抗原にて経鼻免疫を施行した若齢マウスではナイーブマウスと比較して、NALT における CD11c<sup>+</sup> DC の発現が著明に増加していた。これは pFL による単独 DNA アジュバント使用群でも同様の結果だった。これに対して CpG ODN による単独 DNA アジュバント群では CD11c<sup>+</sup> DC の増加は認められなかった。(図 5) 以上の結果は表 2 の FACS での解析結果と一致した。さらに NALT における DC の局在を蛍光免疫染色法にて調べたところ、ナイーブマウスの NALT では CD11c<sup>+</sup> DC は主に上皮下に存在していたが、(図 6E、6G) B220<sup>+</sup> B 細胞領域 (図 6F) 及び CD3<sup>+</sup> T 細胞領域 (図 6H) には DC はわずかししか認められなかった。これに対して pFL+CpG ODN の複合 DNA アジュバントを経鼻投与した場合、NALT の上皮下で DC が増加し、(図 6A) さらに CD3<sup>+</sup> T 細胞領域においても DC が著明に増加していることが観察された (図 6C、6D)。しかし、B220<sup>+</sup> B 細胞領域では DNA アジュバント投与後も DC の増加は認められなかった。(図 6B、6C) 以上の結果は、経鼻免疫にて増殖・活性化された CD11c<sup>+</sup> DC が、NALT 内で T 細胞とクロストークを行い、抗原特異的免疫応答を誘導していることを示唆している。

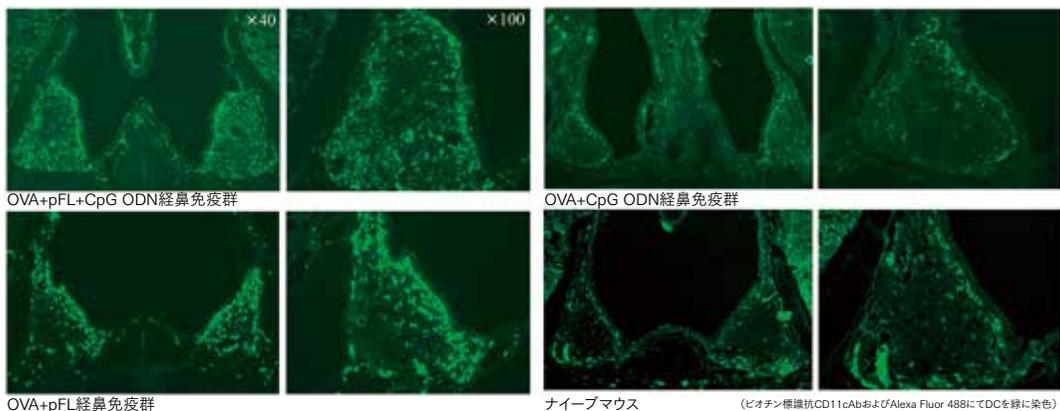
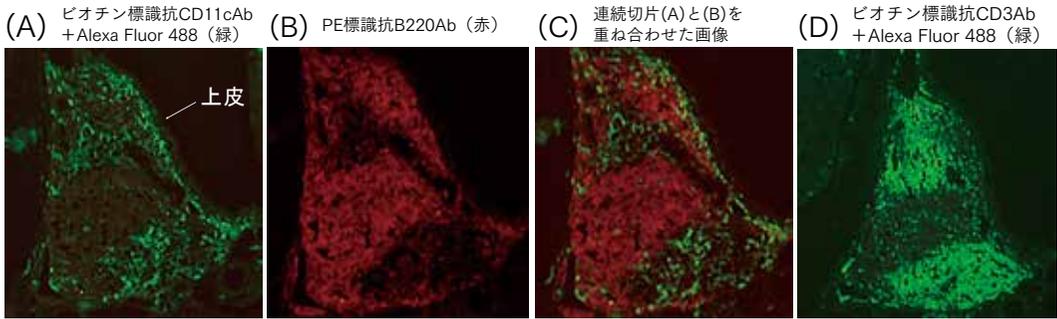
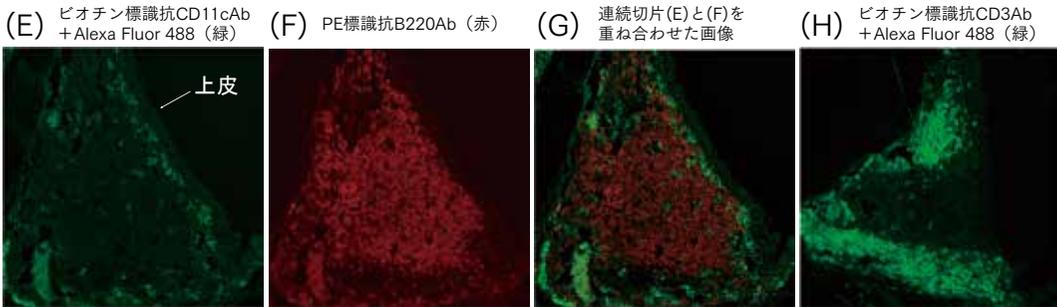


図 5：マウス NALT における DC 分布の比較 (蛍光抗体免疫染色法)



OVA+pFL+CpG ODNにて経鼻免疫したマウスのNALT (蛍光抗体免疫染色法)



naïブマウスのNALT (蛍光抗体免疫染色法)

図6：経鼻免疫後のマウス NALT における DC 局在の解析

### ⑥ NALTのDCは抗原特異的免疫応答の誘導に重要な役割を持つ

pFL+CpG ODNの複合DNAアジュバントとOVA抗原による経鼻粘膜免疫応答の誘導において、NALTに存在するDCの役割を解明するため、経鼻免疫後のマウスDCによるCD4<sup>+</sup>T細胞の活性化実験を行った。まずOVA+pFL+CpG ODNにて3回経鼻免疫を行い2週間後にNALTのDCを分離精製した。また未免疫のOVA特異的TCR-Tgマウス(DO11.10マウス)脾臓からナイーブなOVA特異的CD4<sup>+</sup>T細胞を分離精製し、これら2種の細胞を混合しOVA抗原がない状態で5日間培養した。なおコントロール群としてナイーブマウス脾臓から分離精製したDCをOVA特異的CD4<sup>+</sup>T細胞と共に培養した。その結果、NALTのDCと共に培養したCD4<sup>+</sup>T細胞は、コントロール群と比較して有意に高い増殖反応を示した。(図7)これに対して、同様の経鼻免疫を行ったマウスの鼻粘膜あるいは頸部リンパ節からDCを分離精製して使用した場合、OVA特異的CD4<sup>+</sup>T細胞の増殖反応は得られなかった。(図7)このようにNALT由来のDCは、抗原がない環境でもT細胞を活性化して抗原特異的免疫応答を誘導することが示された。すなわち複合DNAアジュバントを用いた経鼻免疫では、NALTのDCが抗原提示細胞として中心的役割を果たすことが明らかとなった。

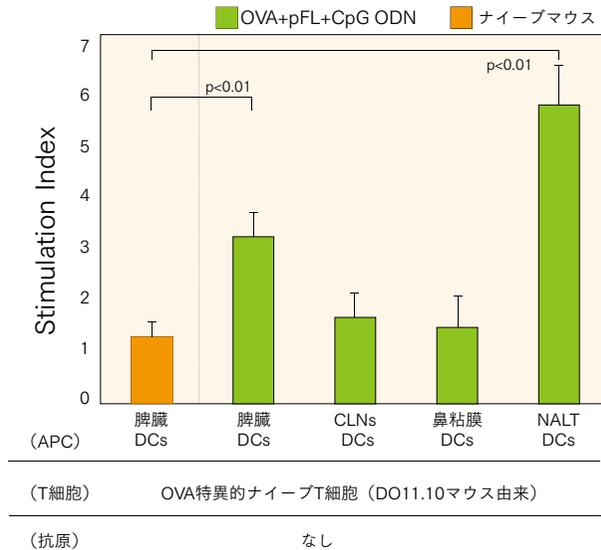


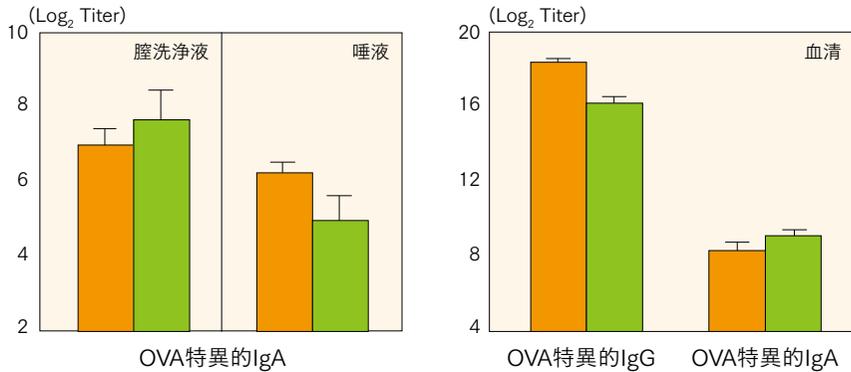
図7：経鼻免疫後マウスのNALT DCにおける抗原提示能の解析

### ⑦ 複合DNAアジュバントは老齢マウスでも全身及び粘膜免疫応答を誘導する

CTを粘膜アジュバントとしてOVA抗原と共に経鼻免疫した場合、若齢マウスでは強力な全身及び粘膜免疫応答を誘導するが、2年齢の老齢マウスでは抗原特異的分泌型IgAを誘導出来ないことが過去の検討にて明らかとなっている。そこで我々は、pFL+CpG ODNの複合DNAアジュバントが老齢マウスに有効であるか否かを検討した。2年齢の老齢マウスをOVA抗原及びpFL+CpG ODNにて経鼻免疫した結果、膣洗浄液および唾液

中の抗原特異的分泌型 IgA は若齢マウスを使用した場合と同レベルまで上昇した。さらに血清中の抗原特異的 IgG および IgA も若齢マウスと同様に上昇していた。(図 8A) 一方、CT を粘膜アジュバントとして OVA 抗原と共に経鼻免疫した場合、老齢マウスでは腔洗浄液および唾液中の OVA 特異的分泌型 IgA の産生がみられず、血清中の OVA 特異的 IgG そしてわずかに IgA が上昇していた。(図 8B) 以上の結果より、pFL+CpG ODN の複合 DNA アジュバントは、老齢マウスにおいても経鼻粘膜免疫応答を誘導することが可能であり、CT よりも有用性が高いと考えられた。

(A) OVA+pFL+CpG ODNによる経鼻免疫群



(B) OVA+CTによる経鼻免疫群

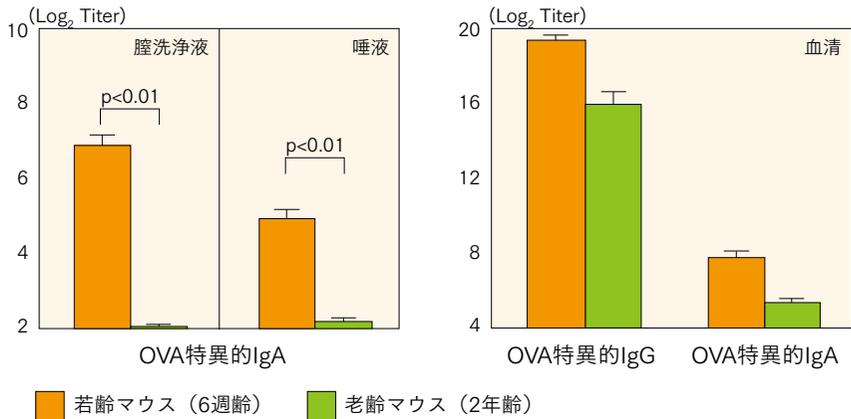


図 8：若齢マウスと老齢マウスにおける経鼻免疫応答の比較

## 考 察

今回の研究で、pFL と CpG ODN の複合 DNA アジュバントを粘膜アジュバントとして抗原と共に経鼻投与すると抗原特異的な全身及び粘膜免疫応答が誘導され、この反応は pFL あるいは CpG ODN を単独の粘膜アジュバントとして使用した時よりも有意に高く、さらに最終免疫から 25 週以上もの長期間持続することが明らかとなった。また複合 DNA アジュバントによる経鼻免疫では、CD4<sup>+</sup> T 細胞から Th1 および Th2 型サイトカインが

同時に誘導された。そして長期粘膜免疫応答の誘導には、NALTにおける pDC および CD8<sup>+</sup> DC の増殖と活性化が影響していることが示された。さらに、複合 DNA アジュバントを用いた経鼻免疫は、2年齢の老齢マウスにおいても抗原特異的な全身及び粘膜免疫応答を強く誘導した。老齢マウスにて抗原特異的な分泌型 IgA が誘導されたことはこれまで報告がなく、今回我々が用いた DNA アジュバントによる経鼻免疫が初めての報告となる<sup>14)</sup>。

pFL を単独の DNA アジュバントとして経鼻免疫した際の反応を観察すると、CD4<sup>+</sup> T 細胞により IL-2 及び IL-4 が産生され、過去の報告と同様に<sup>10)</sup>、Th2 型サイトカインが誘導されることが示された。IFN- $\gamma$  産生が低下していたことも Th2 型優位であることを裏付けている。これに対して CpG ODN を DNA アジュバントとして用いた場合、CD4<sup>+</sup> T 細胞による IFN- $\gamma$  及び IL-6 産生が増加し、IL-2 及び IL-4 産生は低下していた。CpG ODN が Th1 型優位の全身免疫応答を誘導することは、血清中の IgG サブクラスの解析によって既に報告されている<sup>16,19)</sup>。しかし、経鼻免疫において CD4<sup>+</sup> T 細胞のサイトカイン産生を解析したのは本研究が初めてであり、CpG ODN が Th1 型優位の免疫応答を誘導することの新たな証左と考えられる。一方、pFL と CpG ODN を複合 DNA アジュバントとして OVA 抗原と共に経鼻免疫した場合、CD4<sup>+</sup> T 細胞から IFN- $\gamma$  及び IL-4 がともに産生された。さらに血清中の IgG サブクラス解析では、IgG1、IgG2a および IgG2b がいずれも有意に増加していた。以上の結果から、複合 DNA アジュバントの経鼻投与によって、Th1 及び Th2 型サイトカインのバランスがとれた抗原特異的免疫応答を誘導できることが明らかとなった<sup>14)</sup>。

pFL と CpG ODN の複合 DNA アジュバントで Th1 と Th2 サイトカインがともに産生されることは、ウイルスおよび細菌感染に対する免疫防御能が同時に得られることを示唆する。さらに若齢マウスだけでなく、老齢マウスでも粘膜免疫応答を誘導できることは、高齢者における感染防御という点で大きな利点となる。たとえば、老齢マウスに CT をアジュバントとして経鼻免疫を行った場合、血清中の抗原特異的 IgG 上昇などの全身免疫応答は十分得られるものの、粘膜面における抗原特異的分泌型 IgA は産生されず粘膜免疫応答は誘導されない<sup>20)</sup>。さらに老化現象による免疫低下は、全身免疫応答に先駆けて粘膜免疫応答で顕著に表れることを、我々は既に報告している<sup>21)</sup>。一方、複合 DNA アジュバントによる経鼻免疫では2年齢の老齢マウスにおいて老化現象に打ち勝って粘膜免疫応答が誘導され、そのメカニズムとして、複合 DNA アジュバントが DC に作用し、NALT における pDC および CD8<sup>+</sup> DC の増加を誘導したことによると思われる。以上のことから、高齢者における全身および粘膜免疫応答の誘導には、NALT の DC を標的とした粘膜アジュバントが必要と考えられる。

ナイーブマウスにおける NALT の DC 分布を調べると、DC は主に上皮下に存在していた。複合 DNA アジュバントあるいは pFL 単独 DNA アジュバントを OVA と共に経鼻免疫した場合、DC は上皮下および T 細胞領域で増加しており、B 細胞領域では増加していなかった。この DC 増加と局在のパターンは、小腸パイエル板における DC 局在と一致している<sup>22)</sup>。パイエル板では円蓋部 (subepithelial dome; SED) に CD11b<sup>+</sup> 骨髄系 DC が

多く存在し、SEDのDCがCD4<sup>+</sup>T細胞への抗原提示において重要な役割を果たすことが知られている<sup>23)</sup>。したがって、NALTのDCもパイエル板と同様に、T細胞領域で増加するとともにT細胞へ抗原提示を行い、全身及び粘膜免疫応答を誘導していると推測される。

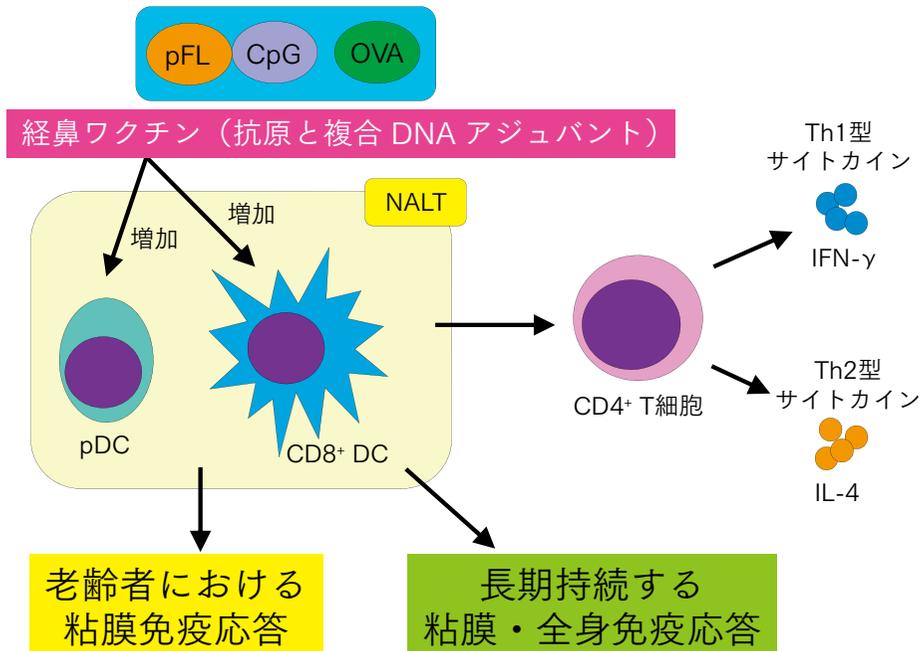
Flt3-ligandは、幹細胞からpDCを分化させるために主要なサイトカインである<sup>24,25)</sup>。そしてpDCは更に非活性型pDCと活性型pDCに分けられる。非活性型pDCはMHCおよび共刺激分子の発現が低く、ナイーブT細胞を活性化する能力が低い。しかし外来病原因子のPAMPSを即時認識する能力が高く、I型IFNを大量に産生することで自然免疫を誘導する<sup>8,9,18)</sup>。一方、活性型pDCはCD4<sup>+</sup>T細胞を活性化することで獲得免疫を誘導する<sup>26)</sup>。このようにpDCはその活性状態により、自然免疫および獲得免疫の誘導において重要な役割を果たす。そしてCpG ODNはpDCを活性化する因子であることが知られており、非活性型pDCにCpG ODNを投与すると刺激で樹状突起が形成され、その結果T細胞の増殖能を発現することが報告されている<sup>18,26,27)</sup>。

今回我々の研究では、pFL+CpG ODNによる複合DNAアジュバントの経鼻投与によりCD40<sup>+</sup>pDCがNALTで増殖していたが<sup>14)</sup>、これは共刺激分子が発現していることから活性化型pDCと考えられ、CpG ODNによる刺激で活性化したと考えられる。一方CD8<sup>+</sup>DCもNALTで増殖していたが、既に我々はpFLの経鼻投与がNALTにおけるCD8<sup>+</sup>DCを増加させることを報告しており<sup>10)</sup>、今回の研究でも同様の結果が得られたと考えられる<sup>14)</sup>。またpDCは長期生存する細胞であり、さらに細菌感染によりCD8<sup>+</sup>DCへ分化する細胞であることが報告されている<sup>18)</sup>。これを踏まえると、NALTにおけるCD8<sup>+</sup>DCの増殖は、pFLにより増殖したpDCがCD8<sup>+</sup>DCへ分化した結果であるとも推測される。

以上より、pFLとCpG ODNによる複合DNAアジュバントで誘導される長期持続性の獲得免疫は、pFLによるNALTのpDC増殖とCD8<sup>+</sup>DCへの分化促進、CpG ODNによるpDCの活性化、さらにpDCが長期生存する細胞であること、これらの要素が相互に作用した結果誘導されるものであることが示唆される。

## 結語

本研究により、複合 DNA アジュバントは NALT の DC による Th1 (IFN- $\gamma$  産生) および Th2 (IL-4 産生) 型 CD4<sup>+</sup> T 細胞を誘導し、さらに、NALT における pDC および CD8<sup>+</sup> DC を増加させ、長期持続性の抗原特異的の全身及び粘膜免疫応答をもたらすことが示された。また、複合 DNA アジュバントによる経鼻免疫は、老齢マウスでも粘膜免疫応答を誘導することが可能であり、NALT の DC を活性化させることで免疫老化に打ち勝つ粘膜免疫応答を誘導することが示された。このことは、高齢者における粘膜ワクチンの開発に大きく寄与する証左になると期待される。



## 参考文献

- 1) McGhee JR, Kiyono H. The mucosal immune system. In: Paul WE, ed. Fundamental immunology. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven 1999:909-930.
- 2) Fujihashi K, McGhee JR, Kweon MN, et al.  $\gamma\delta$  T-cell deficient mice have impaired mucosal IgA responses. J Exp Med 1996;183:1929-1935.
- 3) Kurono Y, Yamamoto M, Fujihashi K, et al. Nasal immunization induces *Haemophilus influenzae*-specific Th1 and Th2 responses with mucosal IgA and systemic IgG antibodies for protective immunity. J Infect Dis 1999;180:122-132.
- 4) Boyaka PN, Ohmura M, Fujihashi K, et al. Chimeras of labile toxin one and cholera toxin retain mucosal adjuvanticity and direct Th cell subsets via their B subunit. J Immunol 2003;170:454-462.
- 5) Simecka JW, Jackson RJ, Kiyono H, et al. Mucosally induced immunoglobulin E-associated inflammation in the respiratory tract. Infect Immun 2000;68:672-679.

- 6) Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 2007;449:419–426.
- 7) Shortman K, Heath WR. The CD8+ dendritic cell subset. *Immunol Rev* 2010;34:18–31.
- 8) Hoshino K, Kaisho T: Nucleic acid sensing Toll-like receptors in dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 2008;20:408–413.
- 9) Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001;2:675–680.
- 10) Kataoka K, McGhee JR, Kobayashi R, et al.: Nasal Flt3 ligand cDNA elicits CD11c(+)CD8(+) dendritic cells for enhanced mucosal immunity. *J. Immunol* 2004;172:3612–3619.
- 11) Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Rev Immunol* 2004;5:987–995.
- 12) Krieg AM, Yi AK, Matson S, et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995;374:546–549.
- 13) Chu RS, Targoni OS, Kreig AM, et al. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity *J Exp Med* 1997;186:1623–1631.
- 14) Fukuiwa T1, Sekine S, Kobayashi R, et al. A combination of Flt3 ligand cDNA and CpG ODN as nasal adjuvant elicits NALT dendritic cells for prolonged mucosal immunity. *Vaccine* 2008;26:4849–4859.
- 15) Murphy KM, Heimberger AB, Loh DY. Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCRlo thymocytes in vivo. *Science* 1990;250:1720–1723.
- 16) Boyaka PN, Tafaro A, Fischer R, et al. Effective mucosal immunity to anthrax: Neutralizing antibodies and Th cell responses following nasal immunization with protective antigen. *J Immunol* 2003;170:5636–5643.
- 17) Yamamoto S, Kiyono H, Yamamoto M, et al. A nontoxic mutant of cholera toxin elicits Th2-type responses for enhanced mucosal immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:5267–5272.
- 18) O’Keefe M, Hochrein H, Vremec D, et al. Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous in surface phenotype and function, that differentiate into CD8+ dendritic cells only after microbial stimulus. *J Exp Med* 2002;196:1307–1319.
- 19) McCluskie MJ, Davis HL. CpG DNA as mucosal adjuvant. *Vaccine* 1999;18(3–4):231–237.
- 20) Hagiwara Y, McGhee JR, Fujihashi K, et al. Protective mucosal immunity in aging is associated with functional CD4+ T cells in nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissue. *J Immunol* 2003;170:1754–1762.
- 21) Koga T, McGhee JR, Kato H, et al. Evidence for early aging in the mucosal immune system. *J Immunol* 2000;165:5352–5359.
- 22) Harmsen A, Kusser K, Hartson L, et al. Cutting edge: organogenesis of nasal-associated lymphoid tissue (NALT) occurs independently of lymphotoxin-alpha (LT- $\alpha$ ) and retinoic acid receptor-related orphan receptor-gamma, but the organization of NALT is LT- $\alpha$  dependent. *J Immunol* 2002;168:986–990.
- 23) Iwasaki A, Kelsall BL. Localization of distinct Peyer’s patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3 $\alpha$ , MIP-3 $\beta$  and secondary lymphoid organ chemokine. *J Exp Med* 2000;191:1381–1393.
- 24) Gilliet M, Boonstra A, Paturol C, et al. The development of murine plasmacytoid dendritic cell precursors is differentially regulated by Flt3-ligand and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 2002;195:953–958.

- 25) Brawand P, Fitzpatrick DR, Greenfield BW, et al. Murine plasmacytoid pre-dendritic cells generated from Flt3 ligand-supplemented bone marrow cultures are immature APCs. *J Immunol* 2002;169:6711-6719.
- 26) Asselin-Paturel C, Boonstra A, Dalod M, et al. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol* 2001;2:1144-1150.
- 27) Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 2004;5:1219-1226.

## Ⅲ-5 経鼻ワクチンの将来展望

### 1) 新たな経鼻インフルエンザワクチン

#### 〈Summary〉

現在本邦で使用されているインフルエンザワクチンは不活化スプリットワクチンであり、その目的は感染の防御ではなく重症化の予防である。そのためインフルエンザの感染防御にはたらくワクチンの開発が望まれる。インフルエンザの感染防御効果があり、さらに粘膜免疫応答の誘導による交差防御効果が期待できるワクチンとして、経鼻インフルエンザワクチンが注目されている。しかし、すでに臨床で使用されている経鼻ワクチンは完全にインフルエンザを抑制することはできず、さらなる改良が必要である。季節性インフルエンザワクチンとして開発された不活化全粒子ワクチンは、臨床研究がすすみ有望な経鼻ワクチンの一つである。さらに、遺伝子組み換え技術を応用したウイルス様粒子ワクチンも臨床研究が実施されている。今後、インフルエンザを完全に制御できるワクチンを開発するには、インフルエンザ感染および経鼻免疫のメカニズムの解明が必須であり、更なる研究が望まれる。

#### インフルエンザ

インフルエンザは、インフルエンザウイルスを病原とする気道感染症である。毎年世界各地で流行がみられ、本邦でも11月下旬から12月上旬頃に発症しはじめ、翌年の1~3月頃に患者数が増加し、4~5月にかけて減少していく。インフルエンザが大流行する年には、インフルエンザ死亡者数および肺炎死亡者数が顕著に増加し、特に高齢者や基礎疾患を有する者の死亡率が高い。そのため、わが国では65歳以上の高齢者および基礎疾患を有する60歳以上の者に対してインフルエンザワクチンの定期接種を行っている。そのインフルエンザワクチンは、ウイルス粒子をエーテルで処理して発熱物質などとなる脂質成分を除き、免疫に必要な粒子表面の赤血球凝集素（HA）を含む分画を密度勾配遠沈法により回収して主成分とした不活化HAワクチンであり、感染や発症そのものを完全には防御できない。しかし、重症化や合併症の発生を予防する効果は証明されており、高齢者に対してこのワクチンを接種すると、接種しなかった場合に比べて、死亡の危険が1/5に、入院の危険は約1/3~1/2にまで減少する。感染や発症を防御できない理由として、現在行われているインフルエンザワクチンの皮下注射では血清の抗体価を上昇させることはできるが、分泌型IgAを誘導することができないためと考えられている。分泌型IgAはワクチンの経粘膜投与によって産生され、中和反応によってウイルスの活性を弱め、凝集反

応によってウイルスの気道上皮への接着を阻止する。そのため現在、インフルエンザに対する粘膜免疫誘導型ワクチンの開発が進められている。

### 経鼻インフルエンザワクチンの現状

現在、実地臨床での使用が可能な経鼻インフルエンザワクチンは、FluMist<sup>®</sup>のみである。このワクチンは、低温馴化培養されたインフルエンザウイルスワクチンで、25℃という低温で増殖するため、人体内の37℃の温度環境では活性が大きく低下する。この弱毒化インフルエンザウイルスを鼻腔内に噴霧することでインフルエンザ疑似感染状態をつくり、免疫を誘導する。2003年に米国食品医薬品局で認可を受け、現在は4種類のインフルエンザウイルスを用いる4価ワクチンが製造され、欧州でも使用されている。その有効性は不活化インフルエンザワクチンより優れ、ワクチン株に対する効果は6歳以下では80%、成人では40%と報告がされている<sup>12)</sup>。

経鼻弱毒生ワクチンの作用機序は次のように考えられている。まず、経鼻投与された弱毒生ウイルスが局所粘膜で複製される。次に樹状細胞がそのウイルス抗原を取り込み、扁桃やアデノイド、頸部リンパ節でリンパ球が活性化され、全身および粘膜面で抗原特異的抗体を産生する。弱毒生ウイルスは局所で複製されるが発症することはなく、疑似感染によって、血清中の抗HA抗体価の上昇、特異的IgGの上昇、中和抗体やノイラミニダーゼ抗体、粘膜局所での分泌型IgA産生、細胞障害性T細胞の誘導など、感染時と同様の反応が起きる。

しかしこのワクチンの問題点として、すべてのインフルエンザウイルスに効果があるわけではないこと、生ワクチンを使用するため接種禁忌の症例があること、免疫応答が弱い高齢者には効果がないことなどがある。そのため適応年齢が若い人に限られており、米国では2歳から49歳、欧州では2歳から18歳が適応となっている。当初非常に高い有効性があるとされていたこのワクチンであるが、米国のCDCは効果がないとして2016～2017シーズンには使用すべきでないとされた。一方、英国では、小児に効果があったとして、同シーズンにこのワクチンの使用を推奨している。米国で効果が下がった理由については明らかとはなっていないが、弱毒ワクチンのため、すでにインフルエンザに罹患し抗体をもっている場合は、生ワクチンが複製される前に排除されて、十分なワクチンとしての免疫応答が得られないと推測されている。本邦への輸入が現在検討中であることから、本ワクチンの今後の動向に注意が必要である。

### 現在開発中の経鼻インフルエンザワクチン

#### ① 不活化全粒子ワクチン

FluMist<sup>®</sup>の問題点を解決すべく、現在経鼻インフルエンザワクチンの開発が行われている。不活化全粒子ワクチンは、ウイルスのゲノムRNAが一本鎖RNAとして含まれており、Toll様受容体7 (TLR7) を刺激し内因性のアジュバントとして働くと考えられ、アジュバント不要の経鼻ワクチンとして期待されている。長谷川ら<sup>3)</sup>は、不活化全粒子ワクチンを健康成人に経鼻免疫し、血清のIgGと鼻腔洗浄液中の分泌型IgAを測定した。

その結果、これらの抗体価は European Medicines Agency のワクチン有効性評価の基準をすべて満たし、交差免疫反応を示したことを報告している。さらに、これらの鼻洗浄液中の分泌型 IgA が2量体、3量体、4量体で存在し、これらの多量体 IgA は、優れた交差免疫性を有することを明らかにした<sup>4)</sup>。

## ② VLP 経鼻ワクチン

### 〈VLP ワクチンとは〉

現行のインフルエンザワクチンの欠点として、流行が予測されたあるいはパンデミックがおこった際に、ワクチンを供給するまでに時間がかかる点があげられる。ウイルス培養に鶏卵を用いているためである。現在は遺伝子組み換えにより、HA、M2等特定のウイルス蛋白を大量に発現させ精製できるようになった。また、ウイルス蛋白質だけでなく、昆虫細胞や植物細胞、ヒト培養細胞を用いるなど様々な方法によって、ウイルス様粒子 (VLP: virus-like particle) が作成されている。VLP はウイルスと同様の構造を持ち、樹状細胞に取り込まれやすいため高い抗原性が期待されるとともに、体内でウイルス増殖することがないため安全性に優れるという特徴がある。さらに、インフルエンザウイルスの VLP は複数の異なったウイルス亜型に対し交差防御性も示すことが報告されている<sup>5,6)</sup>。VLP を用いたインフルエンザワクチンとしてすでに Flublok<sup>®</sup> が開発され、これまでの3価のインフルエンザワクチン<sup>7)</sup>に加えて、4価のワクチンが米国 FDA に認可された。なお、このワクチンは18歳以上を対象とする筋注ワクチンである。

### 〈VLPの経鼻ワクチンへの応用〉

我々は、国立感染症研究所の浅沼らと共に、三菱田辺製薬から提供を受けたVLPを用いて経鼻ワクチンの研究を行っている。現在まで、C57BL/6にVLP(H1N1)とともにアジュバントとしてCpG配列を含んだoligodeoxy核酸(CpG ODN)を混合して3週間隔で2回経鼻投与すると、VLPに対する抗体価が血清中および鼻洗浄液中で上昇することを確認している。また、誘導された血清中の特異的IgG抗体価および鼻腔洗浄液中のIgA抗体価は、不活化全粒子(A/California/07/2009 H1N1)を抗原として用いた場合の抗体価と比較すると、血清中のIgGはVLPを抗原とした場合が高値であった。しかし、鼻腔洗浄液中のIgAは不活化全粒子のほうが高かった。(図1)この免疫応答の差に関しては、ウイルスゲノムRNAはそれ自身がアジュバントとしてTLR7に認識されるため、不活化全粒子+CpG ODNではTLR7とTLR9の同時刺激、VLP+CpG ODNではアジュバントとして用いたCpGによるTLR9のみの刺激となることが原因と考えている。

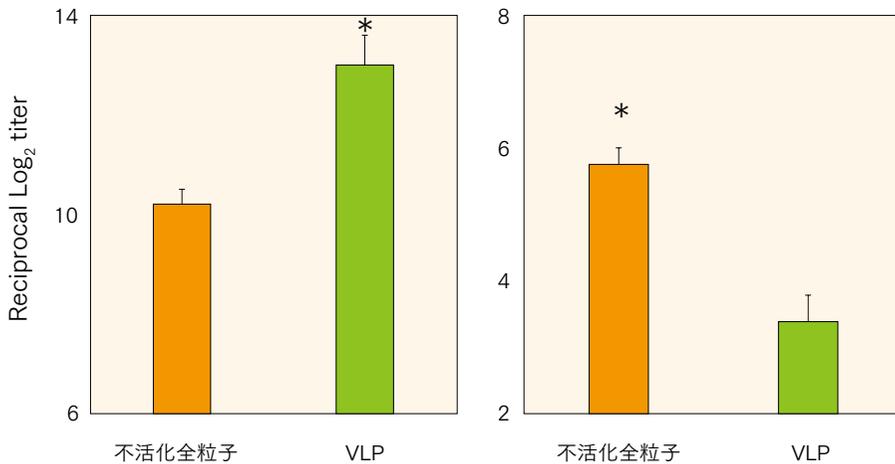


図1：VLPを抗原とした経鼻ワクチンの免疫応答

左図：VLP特異的血清中IgG、右図：鼻腔洗浄液中IgA。VLPあるいは不活化全粒子ワクチンを3週間隔で2回経鼻投与した後の血清および鼻腔洗浄液中のVLPに対する抗体価をELISA法にて測定した。\*： $p < 0.05$ 。

### ③ インフルエンザ経鼻ワクチンの展望

現行のインフルエンザワクチンは発症を予防することができず、さらにインフルエンザウイルスの抗原性が変化するため、毎年それを予測して複数のウイルス株のワクチンを製造する必要がある。したがって、次世代のインフルエンザワクチンには、感染防御効果が高く、変異株に対しても対応できるように交差防御効果を有することが求められる。さらには、インフルエンザウイルスに共通な蛋白抗原を用いて、複数の異なるウイルス株やウイルス亜型に対しても有効な免疫を誘導できるユニバーサルワクチンを開発することも期待されている。また、感染防御や交差防御効果が優れ、粘膜免疫応答を誘導できる経鼻ワクチンの開発も直近の重要な課題の一つである。

インフルエンザに感染すると全身と粘膜面の免疫系の両者が誘導され、さらには自然免疫系も働くことでウイルスが除去される。その経験を記憶免疫細胞が記憶し、次にインフルエンザウイルスに暴露されても、これに対して記憶免疫細胞が有効に働き、とくに粘膜免疫によって誘導される分泌型 IgA は交差防御効果があるため、ウイルス株が異なるインフルエンザに対しても防御効果が維持される。インフルエンザ経鼻ワクチンはまさにこの現象を応用した戦略である。したがって、今後の経鼻インフルエンザワクチンの開発においては、インフルエンザの自然感染時におこる生体内での現象を明らかにするとともに、経鼻ワクチンによる全身および粘膜免疫応答、そして自然免疫応答の誘導機序を詳細に解明する必要がある。

### 結 語

現状の経鼻インフルエンザワクチンの効果は限定的であり、更なる改良が求められている。本邦でも経鼻インフルエンザワクチンそして粘膜アジュバントの開発が進められており、実地臨床で使用される日はさほど遠くないと予想される。遺伝子組み換え技術によって作成されたインフルエンザワクチンの経鼻ワクチンへの臨床応用も研究されている。こうした経鼻インフルエンザワクチンを効果的かつ安全に使用するためには、その作用機序とともに粘膜免疫についての理解が必要と考えられる。

### 参考文献

- 1) Jefferson T, di Pietrantonj C, Rivetti A, et. Al. Vaccines for preventing influenza in healthy adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2010.
- 2) Jefferson T, Rivetti A, di Pietrantonj C, et. Al. Vaccines for preventing influenza in healthy children. *Cochrane Database Syst Rev* 2012.
- 3) Aina A, Tamura S, Suzuki T, et al. Intranasal vaccination with an inactivated whole influenza virus vaccine induces strong antibody responses in serum and nasal mucus of healthy adults. *Hum Vaccin. Immunother* 2013;9:1962-1970.
- 4) Suzuki T, Kawaguchi A, Aina A, et al. Relationship of the quaternary structure of human secretory IgA to neutralization of influenza virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112:7809-7814.
- 5) Bright RA, Carter DM, Crevar CJ, et al. Cross-clade protective immune responses to influenza viruses with H5N1 HA and NA elicited by an influenza virus-like particle. *PLoS One* 2008;30:e1501.
- 6) Khurana S, Wu J, Verma N, et al. H5N1 virus-like particle vaccine elicits cross-reactive neutralizing antibodies that preferentially bind to the oligomeric form of influenza virus hemagglutinin in humans. *J Virol* 2011;85:10945-10954.
- 7) Baxter R, Patriarca PA, Ensor K, et al. Evaluation of the safety, reactogenicity and immunogenicity of FluBlok® trivalent recombinant baculovirus-expressed hemagglutinin influenza vaccine administered intramuscularly to healthy adults 50-64 years of age. *Vaccine* 2011;29:2272-2278.

## 2) 高齢者に対する複合 DNA アジュバント経鼻ワクチン

### III

#### 〈Summary〉

肺炎は日本人の死因の第3位であり、しかも肺炎による死亡者の約95%が65歳以上という疫学調査を受けて、本邦でも高齢者に対する肺炎球菌ワクチンが定期接種化された。しかし、超高齢社会となりワクチン接種の対象者がさらに増加するためその費用が膨らむこと、また、現状のワクチン接種方法では免疫能が低下した高齢者に十分な感染防御抗体活性を誘導するのが困難なことが懸念されている。一方、高齢者はこれまでに様々な感染症やワクチン接種を経験しており、感染症に対する抗体をわずかながらも保有していることから、これらの抗体活性を例えば安価なアジュバントのみで再上昇させることができれば、高齢者に対して低コストで有効なワクチン療法になりうると考えられる。そこで、高齢者を対象とした新たなワクチン療法を開発することを目的として、若齢時にインフルエンザウイルスのヘマグルチニン (HA) をワクチンとして接種した高齢マウスに、樹状細胞の増殖因子である Flt3 ligand の cDNA を組み込んだプラスミドならびに CpG 配列を含んだオリゴデオキシ核酸を経鼻投与し、これらのアジュバントのみで HA に対する特異的抗体を再上昇させることができるかを検討した。その結果、アジュバントのみの投与でも血清中の HA 特異的 IgG そして唾液中の HA 特異的 IgA 抗体活性の再上昇を認めた。さらに、経鼻的に接種したインフルエンザウイルスは鼻腔および肺胞洗浄液中から検出されなかった。以上の結果から、既感染あるいはワクチン接種後の高齢者に対しては、必ずしもワクチンの再接種ではなく、粘膜アジュバントの経鼻投与のみでも十分に感染症の発症を予防できることが示唆された。

#### はじめに

高齢者の特徴として、これまでに様々な感染症やワクチン接種を経験しており、これらの感染症に対する抗体をわずかながらも保有していることが挙げられる。これらの抗体活性を、ワクチン抗原を用いることなく、例えば安価なアジュバントのみで再上昇させることができれば、高齢者に対して有効で、かつ低コストの新たなワクチン療法になりうると考えられる。そこで、我々はアジュバントのみの投与でも、わずかながら保有しているインフルエンザウイルスに対する特異的抗体活性を再上昇させることができるかを、高齢マウスを用いて検討した。さらに、それによって鼻腔内および肺胞内のインフルエンザウイルスのクリアランスが促進されるかについても検討した。なお、アジュバントとしては、樹状細胞 (DC) の増殖因子である Flt3 ligand の cDNA を組み込んだプラスミド (pFL) と、同じく樹状細胞の活性化因子である CpG 配列を含んだオリゴデオキシ核酸 (CpG ODN) の複合 DNA アジュバントを用いた。これらのアジュバントは、すでに経鼻投与によって高齢マウスでも粘膜免疫応答を誘導できることが報告されている<sup>6)</sup>。

## 材料と方法

## ① 経鼻免疫

インフルエンザウイルス A/Puerto Rico/8/34 (PR8, H1N1) の HA スプリットワクチン (国立感染症研究所 浅沼秀樹先生より供与) を用いた。8週齢の C57BL/6 マウスを PR8 HA 2 $\mu$ g とコレラトキシン (CT) 2 $\mu$ g で経鼻免疫を1週ごとに計3回行った。初回免疫から3週後に HA 特異的抗体を ELISA で測定した。14ヵ月後、これらのマウスに pFL 50 $\mu$ g と CpG ODN 10 $\mu$ g のみで追加免疫を行った。その1週後に、血清と唾液を採取し、ELISA で HA 特異的抗体を測定した。(図1)

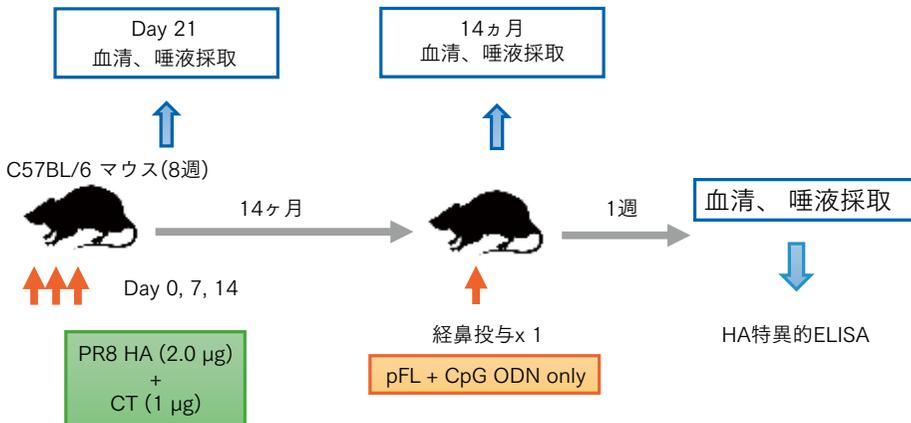


図1：経鼻免疫の方法

## ② ウイルス感染

8週齢で免疫したマウスに14ヵ月後に pFL 50 $\mu$ g と CpG ODN 10 $\mu$ g のみで追加免疫を行い、HA 特異的抗体が再増加したことを確認し、その10日後に PR8 (40LD<sub>50</sub> dose) を 20 $\mu$ l 経鼻接種し感染実験を行った<sup>6,7)</sup>。そして、その3日後に鼻腔洗浄液 (NWs) と肺胞洗浄液 (LWs) を回収し、Madin-Darby canine kidney cells を用いたプラークアッセイによりウイルス力価を測定した<sup>8)</sup>。(図2)

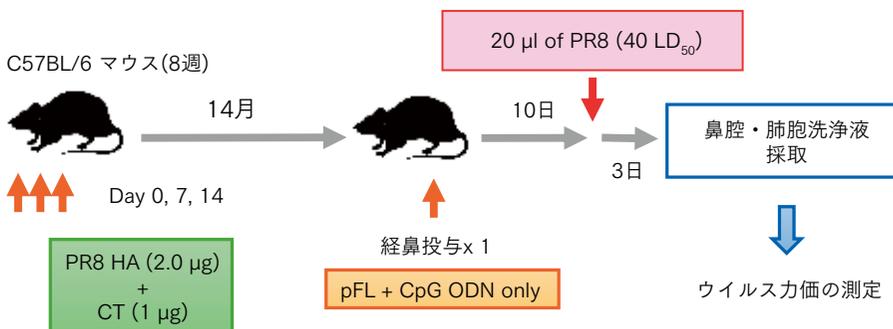


図2：ウイルス感染

### ③ ELISA

96穴マイクロプレートにPR8 HA (1.0 $\mu$ g/ml) でコーティングし、1% BSA-PBSでブロッキングを行った後、段階的に2倍希釈した血清と唾液を投与し、4 $^{\circ}$ Cで一晩置いた。HRPで標識されたヤギ抗マウス Ig 特異的抗体を37 $^{\circ}$ C、1時間で反応させたのち、1.1mM 2,2'-azinobis(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid) を100 $\mu$ l 投与し、室温で15分間置いた。吸光度415nm を測定し、バックグラウンドより0.1以上の値を陽性とした。

## 結果

### ① ELISA

免疫を開始して28日目に、血清中の特異的抗 HA-IgG の上昇が確認され、免疫から14ヵ月の時点でもその有意な低下は認めなかった。そこで pFL と CpG ODN のみで追加免疫したところ、有意差はないものの、血清中の HA 特異的 IgG はさらに上昇した。唾液中においては、免疫開始後28日目に HA 特異的 IgA が確認されたが、免疫後14ヵ月には HA 特異的 IgA は検出されなくなった。しかし、pFL と CpG ODN による追加免疫を行った1週間後には、有意差をもって唾液中の HA 特異的 IgA が再上昇した。(図3)

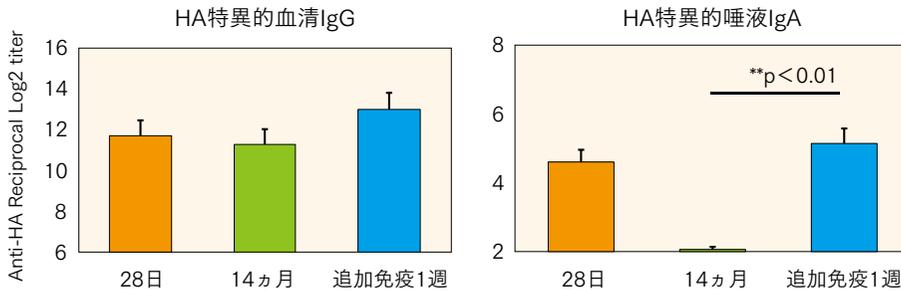


図3：追加免疫による免疫応答

初回免疫から14ヵ月後には唾液中の HA 特異的 IgA は検出されなくなった。しかし、pFL と CpG ODN のみの経鼻投与を1回行った1週間後には、HA 特異的 IgA の再上昇が確認された。

## ② ウイルス感染

初回免疫から14ヵ月後にpFLとCpG ODNのみで追加免疫を行ったマウスでは、インフルエンザウイルス感染3日後の鼻腔洗浄液および肺胞洗浄液中にインフルエンザウイルスは検出されなかった。一方、pFLとCpG ODNによる追加免疫を行わなかったマウスでは、インフルエンザウイルス感染3日後の鼻腔洗浄液中および肺胞洗浄液中に高力価のインフルエンザウイルスが検出された。(図4)

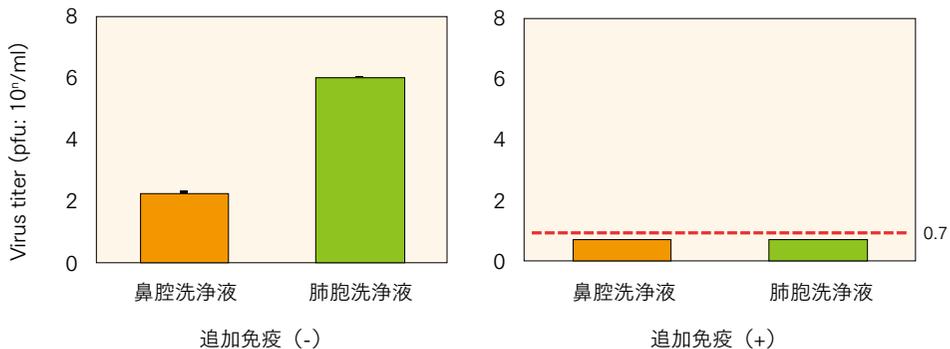


図4：鼻腔洗浄液および肺胞洗浄液中のウイルス力価

初回免疫から14ヵ月後にpFLとCpG ODNのみで追加免疫を行ったマウスでは、鼻腔洗浄液および肺胞洗浄液中にインフルエンザウイルスが検出されなかった。

## 考 察

マウスは加齢によって、Peyer板に代表されるGALTの抗原特異的免疫応答が12ヵ月齢から低下することが知られている<sup>6)</sup>。しかし、12ヵ月齢マウスにおいても、鼻咽腔関連リンパ組織(NALT)における免疫応答は6~8週齢のマウスと比して遜色ないことが報告されている<sup>7,8)</sup>。このことから、高齢者をターゲットとした感染症予防のための粘膜ワクチン開発においては、経口ではなく経鼻ワクチンが有望と考えられる。その証左として、pFLとCpG ODNの複合DNAアジュバントを用いた経鼻免疫により、高齢マウスにおいても粘膜免疫応答を誘導できることが確認されている<sup>7)</sup>。pFLはDCの増殖因子であるFlt3 ligandのcDNAをコードしたプラスミドであり、これを経鼻粘膜アジュバントとして用いると、NALTでのCD8<sup>+</sup> DCを選択的に増加させることができる。また、CD4<sup>+</sup> T細胞からTh2型サイトカインであるIL-4が産生されることも知られている<sup>9)</sup>。一方CpG ODNは、細菌やウイルスなどの病原体DNAに高頻度に現れるCpGモチーフと呼ばれる特定の6塩基配列を化学合成した非メチル化CpGオリゴ核酸であり、DC表面のToll-like receptor 9 (TLR9)を介してplasmacytoid-DCを活性化し、粘膜アジュバントとして働く。また、CD4<sup>+</sup> T細胞のTh1型サイトカイン産生を促す<sup>10)</sup>。

こうしたpFLとCpG ODNの複合DNAアジュバントの利点を背景として、HAワクチンを接種した高齢マウスにこの複合DNAアジュバントのみを経鼻投与したところ、血清中のHA特異的IgG、そして唾液中のHA特異的IgAの再上昇を認めた。このことから、高齢者で過去に受けたワクチンや感染した病原体に対する免疫応答がわずかでも残ってい

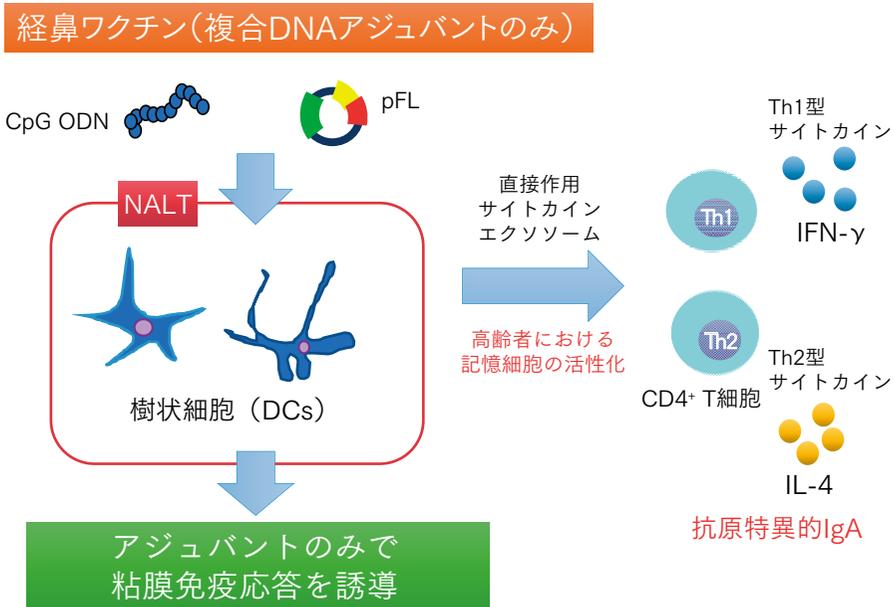
れば、pFL と CpG ODN のアジュバントの投与だけでもその免疫応答を再活性化できると考えられる。また、現行の皮下注射ワクチンでは IgG 抗体のみが誘導され、分泌液中の IgA が誘導されないため、重症化予防には有効であっても感染そのものを阻止することはできない。しかし、pFL と CpG ODN の経鼻投与によって唾液中の HA 特異的 IgA も再上昇したことから、この複合 DNA アジュバントを用いることで、より感染予防効果の高い免疫応答を誘導できると推測される。

そこで、この再活性化された免疫応答によって実際に感染を阻止できるのかどうかを確認するため、インフルエンザウイルスの感染実験を行った。その結果、pFL と CpG ODN による追加免疫を行っていないマウスでは、感染3日後に鼻腔および肺胞洗浄液中に高力価のインフルエンザウイルスが検出されたが、追加免疫を行ったマウスでは、鼻腔および肺胞洗浄液中のインフルエンザウイルス力価は検出限界以下であった。このことから、複合 DNA アジュバントのみの経鼻投与でも十分に感染症の発症を予防できることが示唆された。今回の実験では、鼻腔洗浄液中の HA 特異的 IgA の測定は行っていないが、唾液中の HA 特異的 IgA が有意に上昇していることが確認されており、鼻腔内においても同様に HA 特異的 IgA が誘導され、インフルエンザウイルスのクリアランスが増強したと考えられる。また、分泌液中の IgA はサブタイプの異なるインフルエンザウイルスに対しても交差防御能を有することが報告されており<sup>11)</sup>、アジュバントの経鼻投与で誘導される分泌液中の IgA は、複数の異なるインフルエンザ株にも効果を示すと予想される。また、本研究ではインフルエンザワクチンの再活性化のみを検討したが、ヒトにおいては種々のワクチン接種や様々な気道感染症の既往があり、複合 DNA アジュバントの経鼻投与によって、多くのウイルスや細菌に対する免疫応答を再活性化させることが可能かもしれない。したがって、この新たなワクチン療法を実現するためには、高齢者で問題となる主要な病原菌を用いた実験が必要と思われる。

また、pFL と CpG ODN の経鼻投与による HA 特異的抗体の再活性化についての詳細な細胞および分子メカニズムは不明である。しかし、これまでの研究の成果から、pFL と CpG ODN による複合 DNA アジュバントが PC を介して粘膜の記憶 T 細胞を活性化し、細胞同士の作用やサイトカイン、ケモカイン、あるいはエクソソームを介した反応によって IFN- $\gamma$  や IL-4 の産生といった Th1 型と Th2 型のバランスのとれた反応を誘導し、抗原特異的 IgA の産生をもたらすと想定される。今後、複合 DNA アジュバントの臨床応用を目指すには、さらに多くの基礎研究によってこの機序を明らかにする必要があることは言うまでもない。

## 結 語

ワクチン接種後あるいは感染の既往がある高齢者では、複合 DNA アジュバントのみの経鼻投与で抗原特異的抗体産生を再活性化することが可能であり、高齢者に対する新たな感染症予防の戦略になり得ると期待される。



## 参考文献

- 1) Janssens JP, Krause KH. Pneumonia in the very old. *Lancet Infect Dis* 2004;4:112-124.
- 2) Gray BM, Converse III GM, Dillon Jr HC. Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: acquisition, carriage, and infection during the first 24 months of life. *J Infect Dis* 1980;142:923-933.
- 3) Pawelec G. Immunity and aging in man. *Exp Gerontol*. 2006;41:1239-1242.
- 4) Pawelec G, Koch S, Francesch C, et al. Human immunosenescence: does it have an infectious component? *Ann N Y Acad Sci* 2006;1067:56-65.
- 5) John F Brundage, Interactions between influenza and bacterial respiratory pathogens: implications for pandemic preparedness. *Lancet Infect Dis* 2006;6:303-312.
- 6) Koga T, McGhee JR, Kato H, et al. Evidence for early aging in the mucosal immune system. *J Immunol* 2000;165:5352-5359.
- 7) Fukuiwa T, Sekine S, Kobayashi R, et al. A combination of Flt3 ligand cDNA and CpG ODN as nasal adjuvant elicits NALT dendritic cells for prolonged mucosal immunity. *Vaccine* 2008;26:4849-4859.
- 8) Kadowaki S, Chen Z, Asanuma H, et al. Superior cross-protective effect of nasal vaccination to subcutaneous inoculation with influenza hemagglutinin vaccine. *Eur J Immunol* 1992;22:477-481.
- 9) Kataoka K, McGhee JR, Kobayashi R, et al. Nasal Flt3 ligand cDNA elicits CD11c+CD8+

dendritic cells for enhanced mucosal immunity. *J Immunol* 2004;172:3612-3619.

- 10) Boyaka PN, Tafaro A, Fischer R, et al. Effective mucosal immunity to anthrax: neutralizing antibodies and Th cell responses following nasal immunization with protective antigen. *J Immunol* 2003;170:5636-5643.
- 11) Tamura S, Tanimoto T, Kurata T. Mechanisms of broad cross-protection provided by influenza virus infection and their application to vaccines. *Jpn J Infect Dis* 2005;58:195-207.

### III

### 3) ホスホリルコリン経鼻ワクチンによるブースター効果の誘導

#### 〈Summary〉

ホスホリルコリン（PC）経鼻ワクチンのブースター効果を検討することを目的として、13価蛋白結合型肺炎球菌ワクチン（PCV13）の腹腔内投与後にPCを経鼻投与し、その免疫応答を観察した。その結果、ワクチン株の肺炎球菌に対する血清IgG抗体価は、PCV13の腹腔内投与後に再度PCV13を腹腔内投与した群（PCV13全身免疫群）とPCV13の代わりにPC-KLHとコレラトキシンを経鼻投与した群（PC経鼻免疫群）は同等で、PCに対する血清IgG抗体価はPC経鼻免疫群のほうがPCV13全身免疫群よりも有意に高値であった。また、鼻腔洗浄液中のPC特異的IgA抗体価および鼻粘膜内のPC特異的IgA産生細胞数も、PC経鼻免疫群のほうがPCV13全身免疫群よりも有意に高かった。以上の結果から、PCV13の全身免疫後にPCの経鼻免疫を行うことで、PCV13の2回全身投与と同等の肺炎球菌に対する免疫応答が得られ、さらにPCに対する全身および粘膜免疫応答も誘導できることが証明された。したがって、現在定期接種になっているPCV13投与後にPCワクチンを経鼻接種することで全身追加免疫と同等の効果が得られること、さらにPC特異的粘膜免疫応答の誘導によってPCV13に含まれない血清型の肺炎球菌に対しても感染防御効果が得られることが示唆された。

#### はじめに

肺炎球菌は、急性中耳炎や急性副鼻腔炎などの急性上気道感染症、さらに髄膜炎や侵襲性肺炎の主要な起炎菌である。乳幼児期の髄膜炎や侵襲性肺炎球菌感染症（IPD）は生命予後が不良で、たとえ治療しても重篤な後遺症をもたらすことがある。そこで乳幼児を対象とする蛋白結合型肺炎球菌ワクチンの開発が進められ、まず7価肺炎球菌結合型ワクチン（PCV7）が上市され、続いて13価肺炎球菌結合型ワクチン（PCV13）、さらに無莢膜型インフルエンザ菌由来プロテインDを結合させた10価の肺炎球菌ワクチン（シンフロリックス®）が発売され、世界各国で使用されている。本邦でも、2013年4月からPCV7が定期接種化され、同年11月にPCV13へと切り替わった。

これらの肺炎球菌ワクチンの効果には目をみはるものがあり、IPDの発症は著明に減少した<sup>1)</sup>。急性中耳炎に対しても、PCV7導入後に1歳児の急性中耳炎に対する鼓膜切開の頻度が著しく減少したことが報告されている<sup>2)</sup>。しかし、ワクチン株以外の肺炎球菌やインフルエンザ菌による急性中耳炎の発症がみられ、肺炎球菌ワクチンの急性中耳炎の発症予防効果は極めて限定的であった。さらに、PCV7接種後に肺炎球菌の血清型置換が起こることが知られている<sup>1,3)</sup>。また、現行の皮下注射によるワクチンの接種は全身免疫応答を誘導し、血清中の抗原特異的IgGとオプソニン活性を上昇させるが、粘膜免疫応答による分泌型IgAの産生を誘導することはできない。

これらの問題点を克服するには、広域スペクトラムを有し、分泌型 IgA を誘導できるワクチンの開発が必要になる。そこで我々は、すべてのグラム陽性および陰性菌に含まれるホスホリルコリン (PC) に注目し、PC の経粘膜投与によって全身および粘膜免疫応答が誘導されることを明らかにした<sup>4,5)</sup>。さらに、外分泌液中の PC 特異的 IgA そして血清中の PC 特異的 IgG は複数の肺炎球菌およびインフルエンザ菌と反応し、鼻腔に接種した両細菌のクリアランスを亢進させる<sup>4)</sup>。したがって、PC は広域スペクトラムを有し、分泌型 IgA を誘導できるワクチンとなり得ると考えられる。

また、PC が肺炎球菌の細胞壁の構成成分であることを考えると、PCV13 の製造過程で PC が含有される可能性がある。そこで我々は、PCV13 に PC が含まれているのか、もし PC が含まれていれば、PCV13 の全身免疫後に PC 経鼻ワクチンを追加投与することで PCV13 の莢膜抗原そして PC に対してもブースター効果が得られるのではないかと推測し、マウスを用いて以下の検討をおこなった。

## 材料と方法

### ① PCV13中の PC 濃度の測定

PCV13 の溶解液で ELISA プレートをコーティングし、PC 特異的マウス IgA (TEPC15) を反応させた後、マウス IgA-HRP (Horseradish peroxidase) を二次抗体として添加し、TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) で発色させることにより PCV13 中の PC を検出した。そして、PC-BSA (Bovine serum albumin) を2段階希釈することで標準曲線を作成し、PCV13 の OD (optical density) 値から、PCV13 に含まれる PC の濃度を測定した。

### ② マウスの PCV13 腹腔免疫と PC 経鼻免疫

7週齢の雌性 BALB/c マウスに PCV13 の7倍希釈液 200 $\mu$ l を腹腔内投与し、全身免疫を行った。免疫2週間後のマウスを、再度 PCV13 腹腔内追加免疫する群 (PCV13 全身免疫群: IP  $\times$  2) と PC-KLH (Keyhole limpet hemocyanin) 50 $\mu$ g とともにコレラトキシン (CT) 1 $\mu$ g をアジュバントとして経鼻免疫を行う群 (PC 経鼻免疫群: IP+IN) の2群に分けた。(図1) また、その免疫応答を PC-KLH+CT の経鼻免疫を7日間隔で3回施行した群 (IN  $\times$  3)、1回施行した群 (N  $\times$  1) および無処置の対照群と比較した。

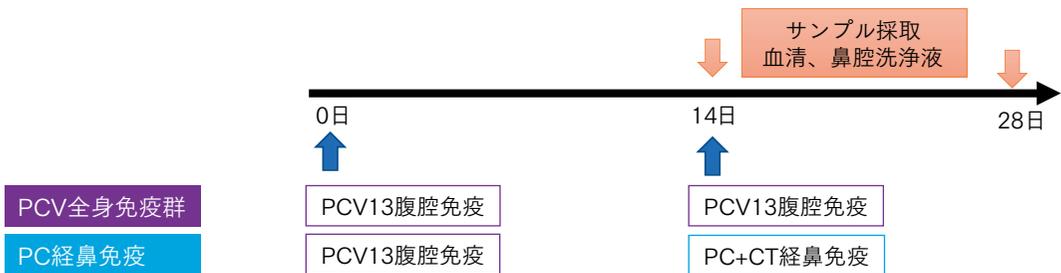


図1：実験のプロトコール

マウスに PCV13 (200 $\mu$ l) を腹腔内投与し、その2週間後に腹腔内投与を追加する群 (PCV13 全身免疫群: IP  $\times$  2) と、PC-KLH と CT を経鼻免疫する群 (PC 経鼻免疫群: IP + IN) の2群に分けた。

### ③ PCV13およびPCに対する免疫応答

追加免疫から2週間後に血清および鼻腔洗浄液を採取し、PCV13に含まれる莢膜型 Pneumococcal Polysaccharide Serotype (PPS) 3、19F、23F に対する抗体価とPCに対する抗体価をELISA法を用いて測定した。

### ④ PC特異的IgA産生細胞

#### i) 脾臓のリンパ球分離

脾臓組織をナイロンメッシュで濾過した後、ACK lysis buffer で赤血球を除去し、リンパ球浮遊液を作成した。

#### ii) 鼻粘膜のリンパ球分離

マウスの鼻腔を正中で左右に分離し、鼻腔の粘膜をメディウム内で搔爬したのちにメディウムの中で細かく切断した。そして、それをよく攪拌したのち静置し、上清中の浮遊リンパ球を回収した。

#### iii) ELISpot

ELISpot用の96穴プレートをPC-BSAでコーティングした後、コンプリートメディウム100ml中に、脾臓リンパ球は $1 \times 10^6$ 個、鼻粘膜リンパ球は $1 \times 10^5$ 個になるように調整し、各ウェルに添加した。そして、37℃ 5% CO<sub>2</sub> インキュベータで4時間培養後、各ウェルをPBS-Tween(0.1%)で洗浄し、抗マウスIgAを加え4℃で一晩培養した。その後各ウェルを洗浄し、AEC(3-Amino-9-ethylcarbazole) bufferで発色させ、各ウェルのIgA産生細胞数を測定した。

## 結果

### ① PCV13中のPC濃度

PCV13溶解液の吸光度とPC-BSAの希釈系列で作成した標準曲線(図2)から、PCV13中のPC濃度を測定した。その結果、今回マウスに投与したPCV13溶解液中のPC濃度は153.926 ng/mlであった。(図2)

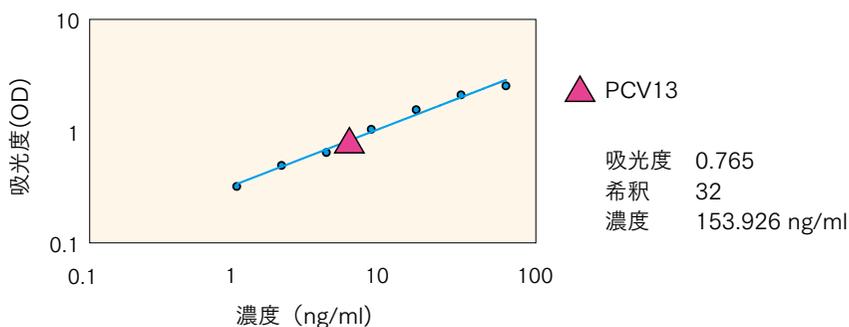


図2：PC-BSA濃度標準曲線とマウスに投与したPCV13濃度

PCV13の溶解液中に含まれるPC濃度を、PC-BSAで作成した標準曲線(青線)を用いて測定した。

## ② PC および PPS 特異的血清 IgG

PCV13腹腔内投与時のPPSに対するブースター効果を調べるため、IP×2群の1回腹腔内投与後と2回腹腔内投与後のそれぞれ2週間後のPPS特異的IgGを測定した。その結果、PCV13の1回投与後(14日目)にPCおよびPPS3に対する抗体価の上昇を認めたが、PPS19F、PPS23Fに対する抗体価の上昇は認められなかった。しかし、2回投与後(28日目)には、PPS19F、PPS23Fに対する抗体価も上昇した。(図3)

次にPC経鼻投与によるブースター効果を調べるため、IP×2群とIP+IN群の血清中の肺炎球菌の莢膜に対する特異的IgGおよびPC特異的IgGを比較した。その結果、IP+IN群は免疫後28日目に血清中のPPS3、PPS19F、PPS23F特異的IgGがPCV13全身免疫群と同レベルまで上昇していた。一方、IP+IN群の28日目の血清中PC特異的IgGはIP×2群よりも有意に上昇した。なお、PCVワクチン株に含まれていないPPS12に対する特異的IgGは検出されなかった。

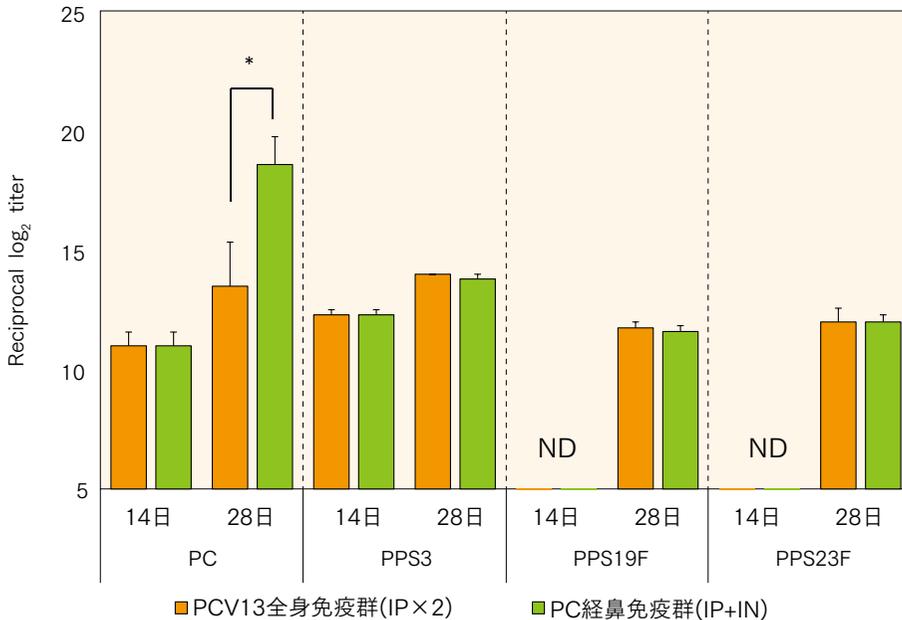


図3：各群のPCおよびPPS特異的血清IgGの推移

IP×2群では免疫後14日目でPCとPPS3特異的IgGの上昇がみられ、28日目でPPS19F、PPS23F特異的IgGの上昇も認められた。IP+IN群ではIP×2群と同様に、14日目そして28日目にPPS特異的IgGが上昇し、28日目のPC特異的IgGはIP×2群と比較して有意に高かった。ND: Not detected \* : p<0.05.

さらに、IP+IN群のPC特異的IgG抗体価の上昇がPCV全身免疫後のブースター効果であることを確認するため、IN×3群およびIN×1群のPC特異的IgG抗体価と比較した。その結果、IP+IN群で誘導されたPC特異的IgGの上昇はIN×3群と同程度で、IN×1と比較して有意に高かった。(図4)

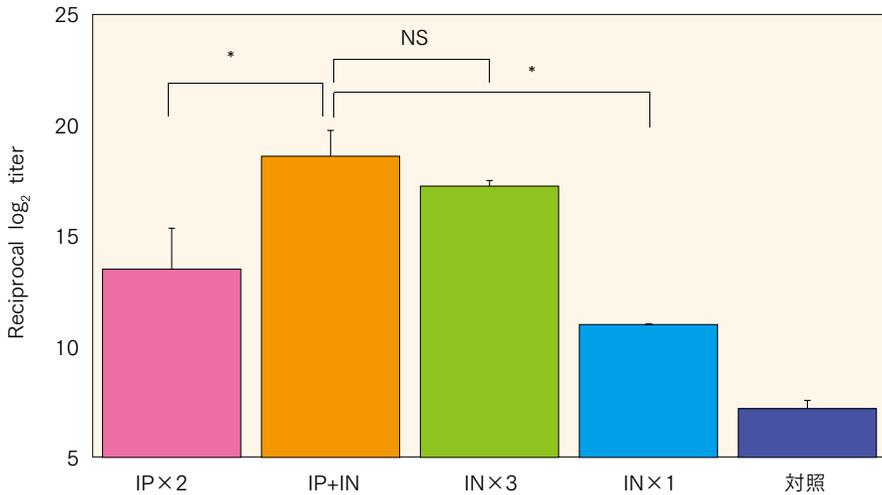


図4：各種免疫法による血清中 PC 特異的 IgG の比較

IP+IN 群の PC 特異的 IgG は、IP × 2 群と比較して有意に高値を示した。そして、この抗体価の上昇は IN × 3 群と同等で、IN × 1 群と比較して有意に高かった。\*:  $p < 0.05$  NS: not significant.

### ③ 血清中 PC 特異的 IgG サブクラス

IP+IN 群で血清中 PC 特異的 IgG が有意に上昇したことから、PC 特異的 IgG サブクラスの解析を行った。その結果、IP × 2 群では PC 特異的 IgG1、IgG2b、IgG3 が誘導されたが、PC 特異的 IgG2a は検出されなかった。一方、IP+IN 群では PC 特異的 IgG2a が検出され、IP × 2 群と有意な差を認めた。(図5)

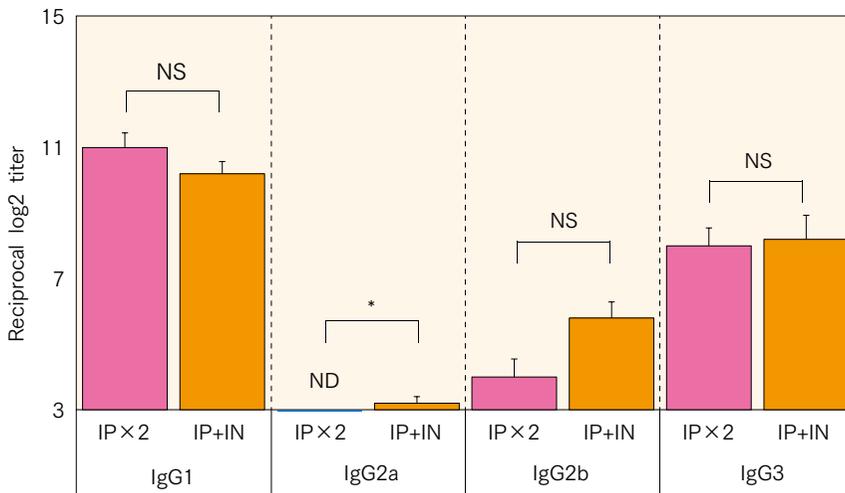


図5：PC 特異的 IgG のサブクラスの解析

IP × 2 群では IgG1、IgG2b、IgG3 の上昇がみられたが IgG2a は上昇しなかった。一方、IP+IN 群では、IP × 2 群と同等の IgG1、IgG2b、IgG3 の上昇を認め、少ないながらも IgG2a も上昇した。NS: not significant ND: not detected \*:  $p < 0.05$ .

## ④ 鼻腔洗浄液中 PC 特異的 IgA

鼻腔洗浄液中の PC 特異的 IgA は、IP × 2 群、IN × 1 群、対照群ともに低値であった。一方、IP+IN 群では、他の群と比較して PC 特異的 IgA が有意に上昇した。(図 6) なお、PPS3, 19F, 23F に対する特異的 IgA はいずれの群においても検出されなかった。

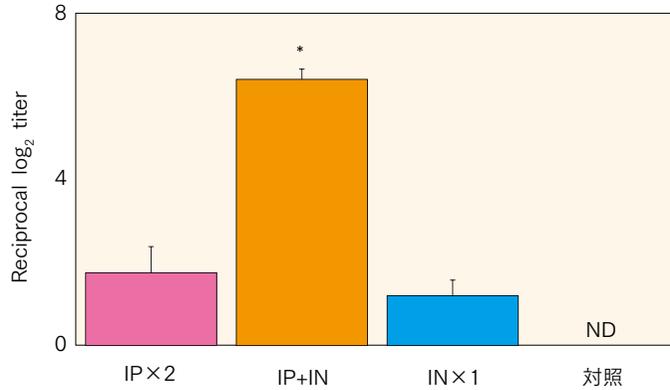


図 6: 各群の鼻腔洗浄液中の PC 特異的 IgA

IP+IN 群では IP × 2 群と比較して鼻腔洗浄液中の PC 特異的 IgA が有意に上昇した。ND: not detected \*:  $p < 0.05$ .

## ⑤ PC 特異的 IgA 産生細胞

IP × 2 群と IP+IN 群の最終免疫から 2 週間後に脾臓および鼻粘膜からリンパ球を採取し、PC 特異的 IgA 産生細胞数を測定した。その結果、IP+IN 群では、鼻粘膜に PC 特異的 IgA 抗体産生細胞を認めただのに対して、IP × 2 群ではそれが検出されなかった。脾臓においても PC 特異的 IgA 抗体産生細胞がわずかながらも検出されたが、両群間に有意な差はなかった。(図 7)

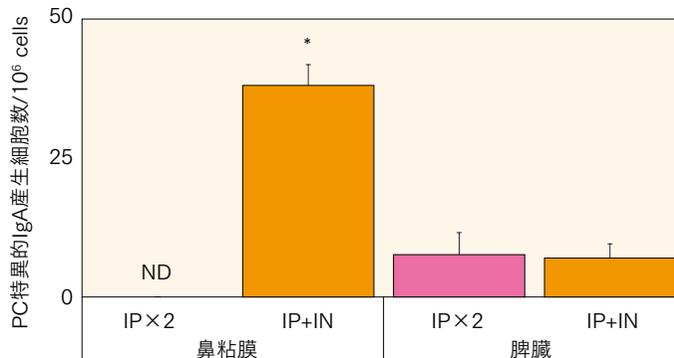


図 7: 鼻粘膜内の各群の PC 特異的 IgA 産生細胞

IP+IN 群では鼻粘膜中に多数の PC 特異的 IgA 産生細胞が認められたが、IP × 2 群では全く検出されなかった。一方、脾臓では、両群でわずかながらもほぼ同数の PC 特異的 IgA 産生細胞が検出された。ND: not detected \*:  $p < 0.05$ .

## 考 察

今回の検討で、PCV13にはPCが含まれており、そのためPCV13の全身免疫でPCに対する免疫応答が誘導できることが示された。また、単回のPCV13全身免疫後にPC経鼻免疫を追加することによっても、PCV13の全身免疫を2回行った場合と同等のPPSに対する免疫応答が誘導され、PCに対してはより強い全身および粘膜免疫が誘導された。これらのことから、PCV13接種後のPC経鼻免疫によるPPSおよびPCに対するブースター効果が実証された。

PCV13中にPCが含まれていることについては、その製造過程による混入と考えられる。PCV13の精製には、まず13種類の血清型の肺炎球菌を型別に培養して増殖させ、殺菌後に各々の型から肺炎球菌莢膜多糖体を抽出する。これらの肺炎球菌莢膜多糖体を型別に、ジフテリア菌変異株 (*Corynebacterium diphtheriae* C7 ( $\beta$ 197)/pPX3520) から精製した無毒性変異ジフテリア毒素 (CRM<sub>197</sub>) と還元的アミノ化反応により結合させる。さらに、免疫原性を高めるため、肺炎球菌莢膜多糖体と無毒性変異ジフテリア毒素 (CRM<sub>197</sub>) 結合体をアジュバントであるリン酸アルミニウムに吸着させて不溶性とする。このようにして精製されたPCV13に混入する可能性のある夾雑物は、多糖体 CRM<sub>197</sub> 結合体の分解により生じる遊離蛋白質および多糖体の分解物であることが報告されている<sup>7)</sup>。しかし、ワクチン株に含まれる莢膜多糖体はPCを含まないため<sup>6)</sup>、今回我々が検出したPCはPCV13に混入した夾雑物の一部である可能性が高いと思われる。また、PCV13をマウスに腹腔内投与するとPC特異的血清IgGが上昇したことから、このPCV13に含まれるPCはPC-KLHと同様に抗原性を持つと考えられる。

PCV13の腹腔内投与を2回繰り返すと、PCV13に抗原として含まれるPPS3、PPS19F、PPS23Fに対する特異的血清IgGが誘導された。また、その抗体価はPCV13を1回腹腔内投与した後にPC経鼻免疫を行った群と同等であった。さらに、血清中のPC特異的IgGはPCV全身免疫群よりもPC経鼻追加免疫群のほうが高く、PC経鼻免疫のみを3回行った群と有意差がなかった。すなわち、PCV13を1回腹腔内投与したのちにPCの経鼻免疫を行うことで、PCV13腹腔内投与を2回行ったときと同等のワクチン株のPPSに対する免疫応答が得られ、PCに対しても経鼻免疫のみを繰り返し行うよりも強い免疫応答が誘導された。このような抗原を異なるルートから投与すると同じルートから複数回投与するよりも強い免疫応答が誘導される現象はheterologous prime boost strategyと呼ばれ、抗原を異なるベクターを用いて投与した時にもみられる<sup>8,9)</sup>。しかし、今回の実験で経鼻免疫に使用したPC-KLHにはPPSが含有されていないにもかかわらず、PC経鼻追加免疫でもPPSに対するブースター効果が得られたことは興味深い。PC-KLH経鼻免疫では、それによって誘導されるPC特異的抗体がPC分子のKLHとの結合部の分子構造を認識し、さらにIgMとIgGでその抗原認識部位が異なることが知られている<sup>4)</sup>。したがって、PPSとPC-KLHの抗原性に類似する分子があり、そのためPC-KLH経鼻免疫においてもPCV13を2回腹腔内投与した時と同等のPPSに対する抗体価の上昇が認められたのかもしれない。

鼻腔洗浄液および鼻粘膜中のPC特異的IgA産生細胞数は、PCV13腹腔内投与を2回

### III

## 経鼻免疫とワクチン

行った群よりも PC 経鼻免疫を追加した群のほうが有意に高値であった。さらに、IgG サブクラスの解析において、PC 経鼻免疫群では PC 特異的 IgG1 とともに IgG2a も上昇しており、この IgA 応答が Th2 ならびに Th1 型の免疫応答によってもたらされたことが示唆される。また、PCV 全身免疫群でも、鼻粘膜中に PC 特異的 IgA 産生細胞は認められなかったが、鼻腔洗浄液中にはわずかながらに PC 特異的 IgA が認められ、PC 経鼻免疫群と同等の PC 特異的 IgG1 の上昇がみられた。一般的に細菌抗原は Th1 型の免疫応答を誘導すると考えられているが、PC はその結合する分子の性状によっては Th2 型の免疫応答を誘導することが報告されており<sup>10)</sup>、PCV に含まれる PC がこの Th2 型の免疫応答を誘導したと推測される。

以上の結果から、PC 経鼻ワクチンは PPS そして PC に対しても PCV13 全身免疫後のブースター効果を有していることが示された。したがって、現行の PCV13 接種後に PC 経鼻ワクチンを投与することで、ワクチン株以外の肺炎球菌さらに肺炎球菌以外の細菌に対しても予防効果を持つ全身および粘膜免疫応答が誘導され、これによって PCV13 で問題視されている血清型置換のリスクも減少すると予想される。今後、PC 経鼻ワクチンの追加免疫による感染予防効果、そして 23 価肺炎球菌莢膜多糖体ワクチン（ニューモバックス NP）に対するブースター効果、さらに高齢マウスにおける有効性が明らかにされれば、PC 経鼻ワクチンを乳幼児や高齢者に対するより有効で安価なワクチンとして応用できる可能性があると考えられる。（図 8）

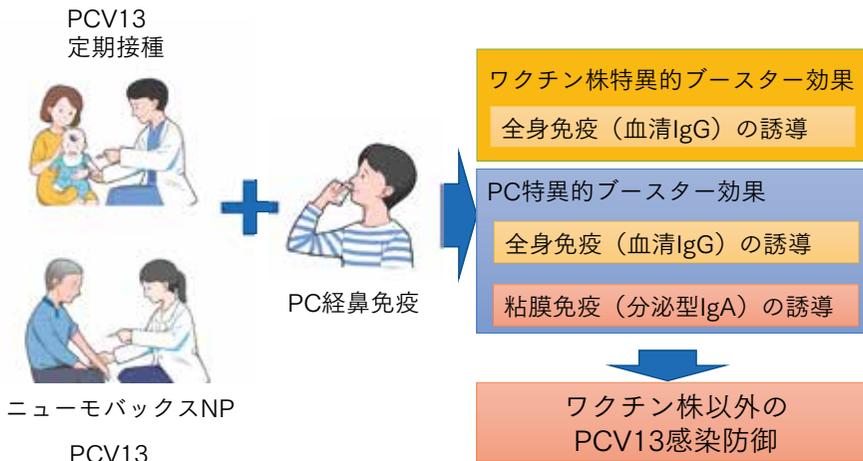


図 8：PCV13 全身免疫後の PC 経鼻追加免疫によるブースター効果

PC 経鼻免疫は PCV13 全身免疫に対するブースター効果を有し、PC および PPS に対する免疫応答を増強し、さらに PC に対する粘膜免疫応答を誘導した。したがって、現行の肺炎球菌ワクチン接種後の新たな追加ワクチンとして応用することが可能と考えられる。

### 結 語

PC 経鼻ワクチンは PCV13 接種後の PPS に対する免疫応答のブースター効果を有し、さらに PC 特異的全身および粘膜免疫応答を誘導した。したがって、PC 経鼻ワクチンを新たな追加免疫の手段として使用することで、より多くの肺炎球菌そしてその他の細菌に

対する予防が可能と考えられる。

#### 参考文献

- 1) Weinberger DM, Malley R, Lipsitch M. Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination. *Lancet* 2011;378:1962–1973.
- 2) Sugino H, Tsumura S, Kunimoto M, et al. Influence of Pneumococcal Conjugate Vaccine on Acute Otitis Media with Severe Middle Ear Inflammation: A Retrospective Multicenter Study. *PLoS One* 2015;10:e0137546.
- 3) Miller E, Andrews NJ, Waight PA, et al. Herd immunity and serotype replacement 4 years after seven-valent pneumococcal conjugate vaccination in England and Wales: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis* 2011;11:760–768.
- 4) Tanaka N, Fukuyama S, Fukuiwa T, et al. Intranasal immunization with phosphorylcholine induces antigen specific mucosal and systemic immune responses in mice. *Vaccine* 2007;30:2680–2687.
- 5) Maseda Y, Ohori J, Tanaka N, et al. Mucosal and systemic immune response to sublingual or intranasal immunization with phosphorylcholine. *Auris Nasus Larynx* 2018;45:273–280.
- 6) Young NM, Foote SJ, Wakarchuk WW. Review of phosphocholine substituents on bacterial pathogen glycans: synthesis, structures and interactions with host proteins. *Mol Immunol* 2013;56:563–573.
- 7) 医薬品医療機器総合機構：沈降13価肺炎球菌結合型ワクチンインタビューフォーム [http://www.info.pmda.go.jp/go/interview/1/671450\\_631140EC1022\\_1\\_1F](http://www.info.pmda.go.jp/go/interview/1/671450_631140EC1022_1_1F) 参照 (2017-11-12)。
- 8) Lu S. Heterologous Prime-Boost Vaccination. *Curr Opin Immunol*. 2009;21:346–51.
- 9) Hu SL, Abrams K, Barber GN, Moran P, Zarling JM, Langlois AJ, Kuller L, Morton WR, Benveniste RE: Protection of macaques against SIV infection by subunit vaccines of SIV envelope glycoprotein gp160. *Science* 1992;255:456–459.
- 10) Goodridge HS, McGuinness S, Houston KM, et al. Phosphorylcholine mimics the effects of ES-62 on macrophages and dendritic cells. *Parasite Immunol* 2007;29:127–137.





## 第 IV 章

# 舌下免疫とワクチン

## 〈Summary〉

経鼻免疫と舌下免疫の免疫応答の違いを明らかにするため、ホスホリルコリン (PC) とアジュバントとしてコレラトキシシン (CT) を経鼻あるいは舌下投与し、その両者の粘膜および全身免疫応答を比較した。その結果、経鼻そして舌下免疫によって、ほぼ同等の唾液および鼻腔洗浄液中の PC 特異的 IgA、そして血清中の PC 特異的 IgG の産生が認められた。しかし、PC 特異的 IgG サブクラスおよび CD4<sup>+</sup> T 細胞から産生されるサイトカインを測定すると、経鼻免疫では Th2 型の免疫応答が強く誘導されるのに対して、舌下免疫では、Th2 型とともに Th1 型の免疫応答も誘導されることが示された。さらに、経鼻免疫と比較して舌下免疫では、総 IgE および抗原特異的 IgE の産生が有意に抑制された。以上の結果から、舌下免疫でも経鼻免疫と同様の粘膜ならびに全身免疫応答が誘導されるが、その誘導機序は舌下免疫と経鼻免疫とは異なり、舌下免疫は経鼻免疫よりもアレルギー性鼻炎などの I 型アレルギー疾患を発症する危険性が少ない、より安全な免疫経路であると考えられた。また、PC そのものも IgE の産生を抑制し、細菌感染とともに I 型アレルギー性炎症も抑制できるワクチンとなり得ることが示唆された。

## はじめに

第 1 章 2 で詳細に述べたように、肺炎球菌に対する肺炎球菌結合型ワクチン (PCV) は、肺炎球菌による髄膜炎、肺炎、敗血症に対して有効である。しかし、急性中耳炎に対しては中等度の効果を認めるに過ぎない<sup>1)</sup>。その理由は PCV に含まれない莢膜型の肺炎球菌や、インフルエンザ菌による急性中耳炎が発症するためと考えられている。したがって、急性中耳炎も含めた上気道細菌感染症を予防するためには、肺炎球菌のみならず、インフルエンザ菌、さらには多くの菌株に有効な広域スペクトラムを持つワクチンの開発が必要となる。そこで、我々は肺炎球菌やインフルエンザ菌を含むすべての細菌の細胞壁の構成成分であるホスホリルコリン (PC) に着目し、これをワクチンとして経鼻投与することを報告した<sup>2)</sup>。詳細については III 章 2 に述べたが、PC ワクチンの経鼻投与により、複数の肺炎球菌とインフルエンザ菌に対する粘膜免疫応答が誘導され、これら細菌の鼻腔からのクリアランスが亢進することが明らかとなった。

経鼻ワクチンはインフルエンザに対してすでに臨床で使用され、弱毒生インフルエンザ経鼻ワクチンの優れた有効性が実証されている<sup>3)</sup>。ところが、不活化インフルエンザウイルス経鼻ワクチンの開発中に、副作用としてベル麻痺が報告された<sup>4)</sup>ことは I 章 3 で述べたとおりである。そのため安全なワクチンの開発とともに経鼻以外のワクチンの投与経路

が検討されている。舌下投与はその一つであり、インフルエンザウイルスの舌下ワクチンは全身性のIgG免疫応答と粘膜面の分泌型IgA免疫応答を誘導し、感染防御に働くことがすでに報告されている<sup>5)</sup>。さらに、舌下投与では経鼻投与でみられたワクチンの中枢神経系への侵入が認められず、経鼻投与に代わる安全性の高い免疫経路として有望視されている<sup>6)</sup>。しかし、経鼻投与と舌下投与による免疫応答の誘導機序、そして両者の違いについてはいまだ十分に解明されていない。そこで我々は、その相違点を明らかにすることを目的として、ホスホリルコリン(PC)をマウスに経鼻および舌下投与し、その免疫応答を比較した<sup>7)</sup>。

## 材料と方法

### ① 免疫と検体採取とPC特異的免疫応答の測定

6週齢の雌性BALB/cマウスを経鼻免疫群と舌下免疫群、さらにそれぞれをコレラトキシシン(CT)単独投与群(CT群)とPC-keyhole limpet hemocyanin(KLH)とCT投与群(PC-KLH+CT群)に分け、これら4群で比較した。ケタミンとキシラジンの麻酔を行ったのち、舌下投与群では50 µgのPC-KLHと1 µgのCT、あるいは1 µgのCTのみを5 µlのPhosphate buffered saline(PBS)に溶解し舌下投与した。その際、ワクチンを舌下に保持させるため頸部を屈曲させ30分間伏臥位に保った。経鼻免疫群では同様の抗原とアジュバントを10 µlのPBSに溶解し、左右それぞれの鼻腔へ5 µlずつ投与した。

舌下および経鼻免疫は1週間の間隔をあけて3回投与し、唾液、鼻腔洗浄液、膣洗浄液、血清を最終免疫から1週間後に採取した。唾液は100 µlのピロカルピン(1mg/ml)を腹腔に注射したのちに採取した。鼻腔洗浄液は断頭後に鼻腔を後鼻孔から200 µlのPBSで洗浄して採取した。膣洗浄液は膣内を200 µlのPBSで洗浄して採取した。血清は麻酔下に眼窩静脈より採取した血液から遠心分離した。唾液、鼻腔洗浄液、膣洗浄液、血清のPC特異的抗体価はELISA法にて測定した。96穴マイクロプレートにPC-bovine serum albumin(BSA)(5µg/ml)でコーティングしたのち、1%BSAを含有するPBSでブロッキングし、2倍希釈系列でサンプル100 µlを各wellに加えた。HRPで標識された抗マウスIgM、IgG、IgA抗体を加えたのちにTMBで発色させ、0.5N塩酸にて発色を停止した。吸光度が0.2以上を陽性として、エンドポイント法にて抗体価を測定した。

IgGサブクラス抗体価は、1次抗体としてbiotinを結合させたIgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3を、2次抗体としてHRP標識抗biotin抗体を用い、同様にエンドポイントELISA法で測定した。

### ② PC特異的CD4<sup>+</sup>T細胞産生サイトカイン測定

屠殺したマウスから脾臓を摘出し、それをナイロンメッシュで濾過して細胞浮遊液を作成した。そして、ACK lysing buffer処理にて赤血球を除去し単核球を分離した。各免疫群の脾臓から分離された単核球からCD4<sup>+</sup>T細胞を分離し、抗原提示細胞としてナイーブマウスの脾臓からB細胞を分離した。CD4<sup>+</sup>T細胞とnaïve B細胞をそれぞれ1×10<sup>6</sup>/wellの濃度で培養プレートに加え、刺激抗原として10 µg/mlのPC-BSAを添加した。

37°C、5% CO<sub>2</sub>の培養器で72時間培養後に培養上清を回収し、Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、interleukin-4 (IL-4) の濃度をELISA法で測定した。

### ③ 血清総IgE、CTおよびPC特異的IgEの測定

血清の総IgEはマウスIgE測定キットを用いて測定した。CTおよびPC特異的IgEの測定には、マウス抗IgE抗体、HRP標識CT、biotin標識PC-BSAとHRP標識streptavidinを用いた。それぞれをTMBで発色させたのち、その吸光度をマウスIgEで作成した標準曲線と対比し、CTおよびPC特異的IgEの値を算出した。

## 結果

### ① PC特異的粘膜および全身免疫応答

唾液、鼻腔洗浄液、膣洗浄液中のPC特異的IgA抗体価は、舌下および経鼻免疫群ともにCT群よりもPC-KLH+CT群で有意に高値を示した。これを舌下免疫群と経鼻免疫群とで比較すると、統計学的な有意差は認めなかった。唾液中のPC特異的IgA抗体価は舌下免疫群よりも経鼻免疫群のほうが高く、鼻腔洗浄液中のそれは舌下免疫群のほうが経鼻免疫群よりも高かった。一方、膣洗浄液中のPC特異的IgA抗体価は、舌下免疫群のほうが経鼻免疫群と比較して有意に高かった。(図1)

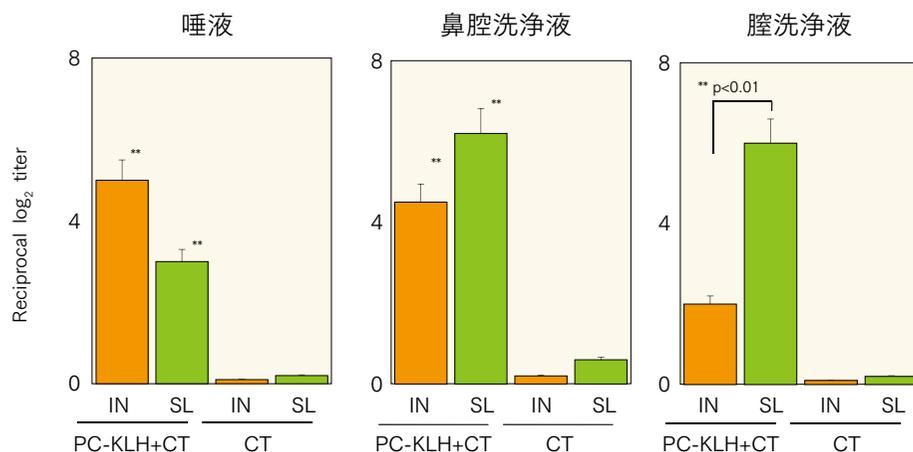


図1：外分泌液中のPC特異的IgA応答

PC-KLH+CTを経鼻および舌下投与すると唾液、鼻腔洗浄液、膣洗浄液中のPC特異的IgA抗体価が有意に上昇した。唾液中のIgA抗体価は経鼻免疫群のほうが、鼻腔洗浄液では舌下免疫群のほうがやや高かった。膣洗浄液中のIgA抗体価は、舌下免疫群のほうが経鼻免疫群より有意に高値を示した。SL: 舌下投与群, IN: 経鼻投与群, \*\*: p<0.01.

血清中のPC特異的IgM, IgG, IgA抗体価は、経鼻免疫および舌下免疫群ともにPC-KLH+CTの投与によって同程度の抗体価の上昇を認めた。(図2)さらに、PC特異的IgGサブクラスの抗体価を比較すると、舌下免疫群、経鼻免疫群のいずれもPC-KLH+CT群ですべてのIgGサブクラス抗体価が上昇し、PC特異的IgG1抗体価が最も高値であり、経鼻免疫群が舌下免疫群よりやや高かった。しかし、その他のIgG2a, IgG2b, IgG3抗体

価はいずれも舌下免疫群のほうが経鼻免疫群よりも高く、IgG2a 抗体価は両者に有意差を認めた。(図3)

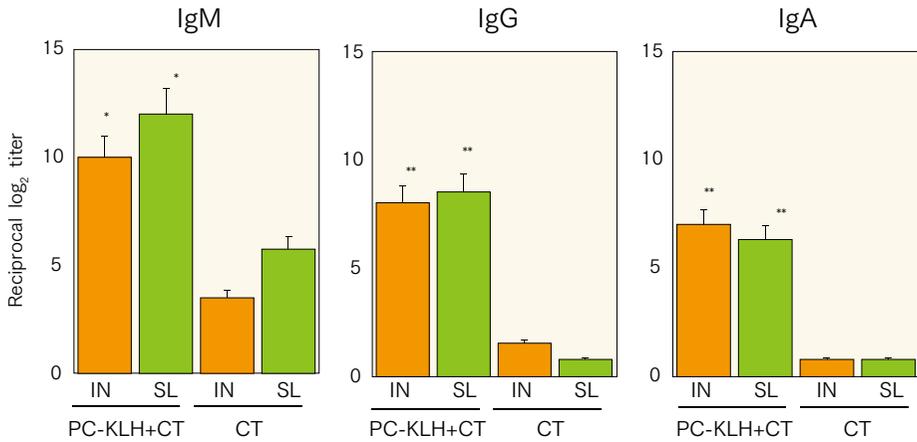


図2：血清中の PC 特異的免疫応答

血清中の PC 特異的 IgM, IgG, IgA 抗体価は、舌下および経鼻免疫でほぼ同程度に上昇した。SL: 舌下投与群, IN: 経鼻投与群, \*\*: p<0.01. \*: p<0.05.

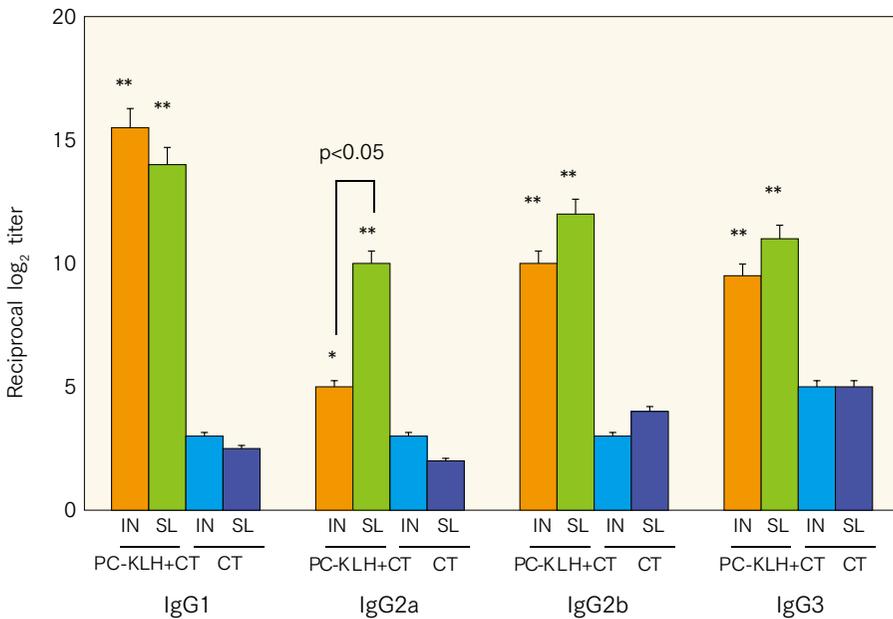


図3：血清中の PC 特異的 IgG サブクラス抗体価

PC-KLH+CT の経鼻および舌下投与ですべての IgG サブクラス抗体価が上昇し、PC 特異的 IgG1 抗体価が最も高値で、経鼻免疫群が舌下免疫群よりやや高かった。しかし、その他の IgG2a, IgG2b, IgG3 抗体価はいずれも舌下免疫群のほうが経鼻免疫群よりも高く、IgG2a 抗体価は両者に有意差を認めた。SL: 舌下投与群, IN: 経鼻投与群, \*\*: p<0.01.

## ② PC-KLH 刺激による CD4<sup>+</sup> T 細胞からのサイトカイン産生

PC 特異的な T 細胞の反応を比較するために、PC-KLH 刺激による CD4<sup>+</sup> T 細胞からの

IFN- $\gamma$  と IL-4 産生を観察したところ、PC-KLH+CT 群では CT 群と比較して IFN- $\gamma$  と IL-4 の産生が有意に上昇した。その濃度を比較すると IFN- $\gamma$  よりも IL-4 のほうがはるかに高値であったが、それぞれのサイトカイン別に比較すると、IFN- $\gamma$  の産生は舌下免疫群が経鼻免疫群よりも、IL-4 の産生は経鼻免疫群が舌下免疫群よりも有意に高かった。(図 4)

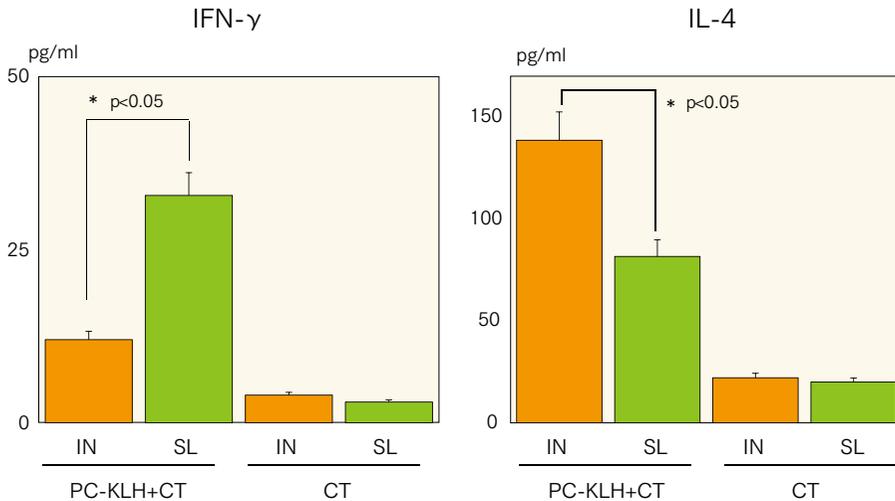


図 4: CD4<sup>+</sup> T 細胞のサイトカイン産生

PC-KLH 刺激によって PC-KLH+CT 群では IFN- $\gamma$  と IL-4 の産生が上昇し、その濃度は IFN- $\gamma$  よりも IL-4 のほうがはるかに高値であった。しかし、IFN- $\gamma$  の産生は舌下免疫群のほうが、IL-4 の産生は経鼻免疫群のほうが有意に高かった。SL: 舌下投与群, IN: 経鼻投与群。

### ③ 血清総 IgE および CT 特異的 IgE

粘膜アジュバントとして実験に用いられる CT は、免疫応答を Th2 型にシフトすることが知られているため、I 型アレルギー反応をもたらすことが危惧される。そこで、CT 群および PC-KLH+CT 群の血清中総 IgE、CT 特異的 IgE、PC-KLH 特異的 IgE を測定した。その結果、総 IgE は、CT のみ投与した場合、経鼻免疫群で著しく上昇した。しかし、舌下免疫群では、CT のみ投与しても総 IgE の上昇はみられなかった。一方、PC-KLH+CT 群では、経鼻免疫群、舌下免疫群ともに総 IgE の上昇は認められなかった。特異的 IgE に関しては、総 IgE と同様に、CT を単独投与した経鼻免疫群で CT 特異的 IgE の上昇を認めたが、舌下免疫群ではその上昇はみられなかった。また、PC-KLH+CT 群では、経鼻免疫群、舌下免疫群ともに CT 特異的 IgE の上昇は認められなかった。なお、いずれの群においても PC-KLH 特異的 IgE は検出限界以下であった。(図 5)

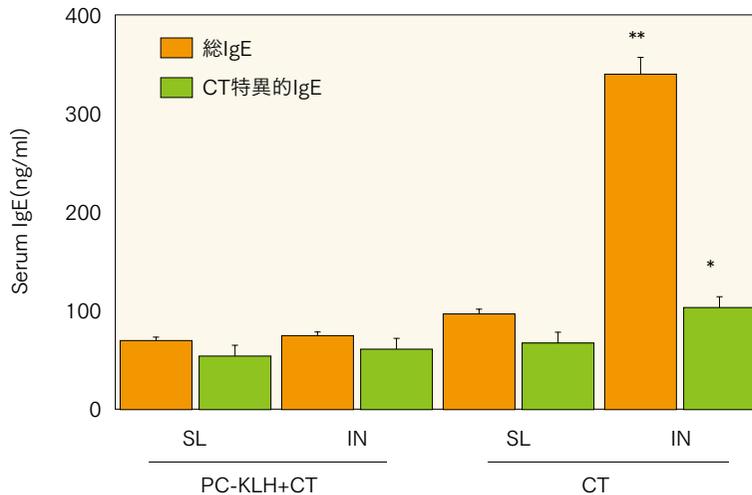


図5：血清総 IgE と CT 特異的 IgE

血清総 IgE および CT 特異的 IgE は、CT 単独の経鼻免疫群でのみ有意に上昇した。CT の舌下投与群、PC-KLH を CT とともに投与した群ではこれら IgE は上昇しなかった。SL: 舌下投与群, IN: 経鼻投与群。

## 考察

今回の研究で、PC-KLH を粘膜アジュバントである CT とともに舌下投与することで、これを経鼻投与した時と同等の PC 特異的粘膜および全身免疫応答が誘導されることが実証され、舌下免疫が経鼻免疫に代わりうる免疫の手法であると考えられた。しかし、粘膜免疫の実効組織における反応には経鼻免疫と舌下免疫で若干の相違があり、たとえば、膺洗浄液中の PC 特異的 IgA 抗体価は、舌下免疫群が経鼻免疫群よりも有意に高値であった。これまでの研究においても、泌尿生殖器における粘膜免疫応答の誘導には舌下免疫のほうが経鼻免疫や経口免疫よりも優れていることが報告されており<sup>6,8)</sup>、今回の我々の結果もそれと矛盾しない。また、有意差はなかったが、唾液中の PC 特異的 IgA 抗体価は経鼻免疫のほうが、鼻腔洗浄液中のそれは舌下免疫のほうが高値であった。したがって、上気道粘膜や唾液腺における粘膜免疫応答においても、経鼻免疫と舌下免疫とでその誘導機序や区域性が異なることが示唆される。

全身免疫応答として、PC-KLH+CT の投与によって誘導される血清中 PC 特異的 IgM、IgG、IgA 抗体価を舌下免疫と経鼻免疫とで比較したところ、いずれも両者で有意な差は認められなかった。そこで、IgG サブクラス抗体価を測定したところ、PC 特異的 IgG1 抗体価が最も高値であった。また、IgG2a 抗体価は舌下免疫群のほうが経鼻免疫群よりも有意に高かった。IgG1 抗体価の産生が強かったのは、アジュバントとして用いた CT が Th2 型の免疫応答を誘導し、IL-4 産生を介して IgG1 の産生を亢進したためと考えられる<sup>9)</sup>。一方、IgG2a 抗体価は Th1 型免疫応答によって上昇することから、PC-KLH+CT による舌下免疫は、Th2 型免疫応答が優位でありながらも、経鼻免疫よりも強い Th1 型の免疫応答を誘導することが示唆される。免疫したマウスの脾臓 CD4<sup>+</sup> T 細胞のサイトカイ

ン産生を観察すると、舌下免疫では経鼻免疫よりも IFN- $\gamma$  の産生が高く、IL-4 の産生は低かったことは、このことを支持する結果と考えられる。

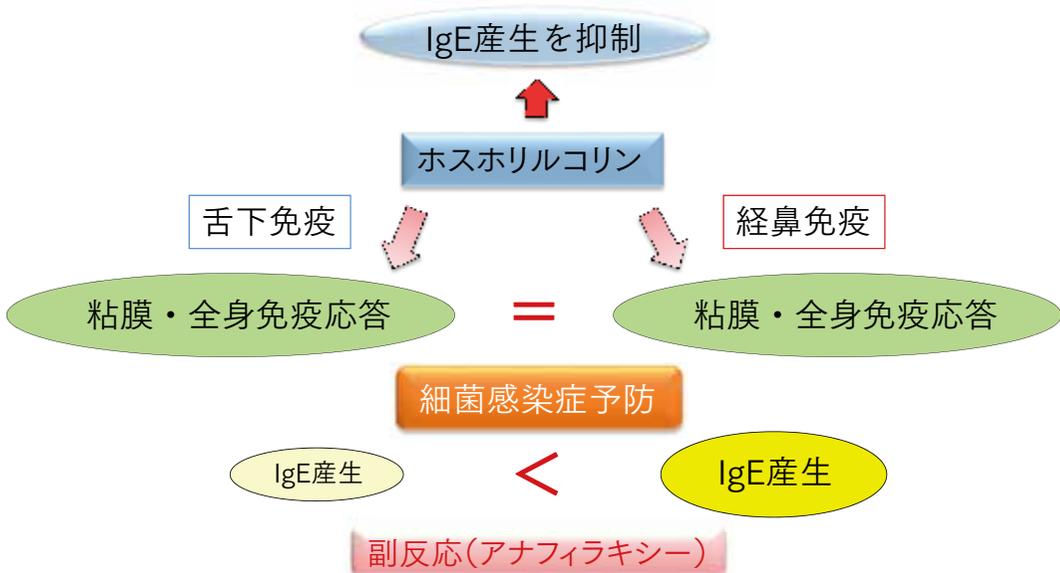
Th2型優位の免疫応答では IgG1 とともに IgE の産生も亢進することが知られており<sup>10)</sup>、本研究でも CT 単独の経鼻免疫で、総 IgE および CT 特異的 IgE が有意に上昇した。また、総 IgE と CT 特異的 IgE の比率から、非特異的 IgE の産生が強いと推測された。ところが興味深いことに、CT 単独でも、これを舌下投与すると、総 IgE も CT 特異的 IgE も上昇しなかった。さらに、CT とともに PC-KLH を投与すると、舌下免疫群そして経鼻免疫群でも、総 IgE および CT 特異的 IgE の有意な産生はみられなかった。これらの結果から、舌下免疫ではたとえ Th2型免疫応答を強く誘導する CT を用いても特異的および非特異的 IgE の産生が起りにくく、さらに、PC-KLH は CT によって誘導される IgE 産生を抑制すると推測される。舌下免疫はすでにアレルギー性鼻炎や喘息の治療に応用されており、その機序として制御性 T 細胞 (Treg) の誘導が関与することが知られている<sup>11,12)</sup>。また、PC-KLH は樹状細胞からの IL-12 の産生を濃度依存性に亢進することを我々は報告しており<sup>13)</sup>、これによって CT による IgE 産生を抑制したと考えられる。

以上のことから、舌下免疫は経鼻免疫と同様に上気道の粘膜免疫ならび全身免疫応答を誘導することが可能であり、アレルギー性鼻炎などの I 型アレルギー疾患を発症する危険性が少なく、経鼻免疫よりも安全な免疫経路であると考えられる。また、PC-KLH は経鼻のみならず舌下ワクチンとしても有効であり、さらに IgE の産生を抑制する作用も有しており、細菌感染症に加えて I 型アレルギー性炎症も抑制できるワクチンとなり得ることが示唆された。

## 結語

舌下免疫は経鼻免疫と同等の粘膜および全身免疫応答を誘導することができ、IgEの産生は経鼻免疫よりも少なく、安全性に優れる。また、PCはCTによって誘導されるIgE産生を抑制する作用があり、細菌感染症のみならずアレルギー性炎症も抑制できるワクチンとして期待される。

## アレルギー性炎症の予防？



## 参考文献

- 1) Eskola J, Kilpi T, Palmu A, et al. Efficacy of a pneumococcal conjugate vaccine against acute otitis media. *N Engl J Med* 2001;344:403-409.
- 2) Tanaka N, Fukuyama S, Fukuiwa T, et al. Intranasal immunization with phosphorylcholine induces antigen specific mucosal and systemic immune responses in mice. *Vaccine* 2007;30:2680-2687.
- 3) Belshe RB, Mendelman PM, Treanor J, et al. The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine in children. *N Engl J Med* 1998;338:1405-1412.
- 4) Mutsch M, Zhou W, Rhodes P, et al. Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland. *N Engl J Med* 2004;350:896-903.
- 5) Song JH, Nguyen HH, Cuburu N, et al. Sublingual vaccination with influenza virus protects mice against lethal viral infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:1644-1649.
- 6) Cuburu N, Kweon MN, Hervouet C, et al. Sublingual immunization with nonreplicating antigens induces antibody-forming cells and cytotoxic T cells in the female genital tract mucosa and protects against genital papillomavirus infection. *J Immunol* 2009;183:7851-7859.
- 7) Maseda Y, Ohori J, Tanaka N, et al. Mucosal and systemic immune response to sublingual

or intranasal immunization with phosphorylcholine. *Auris Nasus Larynx* 2017; in press.

- 8) Cuburu N, Kweon MN, Song JH, et al. Sublingual immunization induces broad-based systemic and mucosal immune responses in mice. *Vaccine* 2007;25:8598–8610.
- 9) Lycke N, Severinson E, Strober W. Cholera toxin acts synergistically with IL-4 to promote IgG1 switch differentiation. *J Immunol* 1990;145:3316–3324.
- 10) Simecka JW, Jackson RJ, Kiyono H, et al. Mucosally induced immunoglobulin E-associated inflammation in the respiratory tract. *Infect Immun* 2000;68:672–679.
- 11) Shamji MH, Durham SR. Mechanisms of immunotherapy to aeroallergens. *Clin Exp Allergy* 2011;41:1235–1246.
- 12) Scadding GW, Shamji MH, Jacobson MR, et al: Sublingual grass pollen immunotherapy is associated with increases in sublingual Foxp3-expressing cells and elevated allergen-specific immunoglobulin G4, immunoglobulin A and serum inhibitory activity for immunoglobulin E-facilitated allergen binding to B cells. *Clin Exp Allergy* 2010;40:598–606.
- 13) Miyashita K, Ohori J, Nagano H, Fukuyama, S, Kurono Y. Intranasal immunization with phosphorylcholine suppresses allergic rhinitis in mice. *Laryngoscope* 2017, in press.

## 〈Summary〉

ホスホリルコリン (PC) を粘膜アジュバントであるコレラトキシン (CT) とともに舌下投与すると、経鼻投与と同等の粘膜および全身免疫応答が誘導される。また、舌下投与では、経鼻投与よりも脾臓 CD4<sup>+</sup> T 細胞からの IFN- $\gamma$  の産生が亢進し IL-4 の産生が抑制される。さらに、CT の単独経鼻投与では総 IgE の上昇を認めるが、CT を PC とともに経鼻投与すると総 IgE の産生が抑制され、さらに CT のみを単独で舌下投与しても CT の単独経鼻投与ほどの IgE 値の上昇はみられない。したがって、PC の舌下投与では、PC そして舌下免疫応答によって IgE の産生が抑えられていると推測される。

そこで、PC に対する舌下免疫応答を明らかにするために、PC と CT (PC+CT 群)、PC のみ (PC 群)、phosphate buffered saline (PBS) のみ (対照群) を舌下投与し、それぞれの免疫応答を比較検討した。その結果、PC 群では、PC+CT 群よりも低値ではあるが、PC 特異的抗体が血清中及び鼻腔洗浄液中に検出された。また、いずれの群でも血清総 IgE 値は低値で、対照群と比較して有意な差はみられなかった。以上の結果から、PC 単独の舌下投与は、PC 特異的粘膜および全身免疫応答を誘導することが可能であり、IgE の産生を抑制することが示された。したがって、PC 舌下ワクチンはアジュバントなしでも免疫応答を活性化し、I 型アレルギーの発症を予防できると考えられる。

## はじめに

我々は、ホスホリルコリン (PC) と keyhole limpet hemocyanin (KLH) を結合させた PC-KLH とコレラトキシン (CT) を舌下投与することで、経鼻投与と同等の PC 特異的粘膜および全身免疫応答が誘導できることを報告した<sup>1)</sup>。また、PC-KLH+CT の舌下投与では Th2 型免疫応答を誘導する CT を併用したにもかかわらず、脾臓 CD4<sup>+</sup> T 細胞からの IL-4 の産生が経鼻投与と比較して有意に抑制され、血清総 IgE も低値であった。さらに、CT のみを単独で舌下投与しても経鼻投与のような総 IgE 値の上昇がみられなかった<sup>1)</sup>。一方、I 型アレルギー疾患であるアレルギー性鼻炎や喘息に対して舌下免疫療法が有効なことが知られており<sup>2)</sup>、舌下投与は総 IgE の産生を抑制することが示唆される。また、PC は様々な細菌の細胞壁構成成分であり、肺炎球菌ワクチンや肺炎球菌死菌の経鼻投与によって IgE 産生が抑制されることが報告されており<sup>3,4)</sup>、PC 自体が IgE の産生を抑制した可能性も考えられる。そこで、PC 単独の舌下投与によって誘導される免疫応答および総 IgE 値の変動を観察した。

## 対象と方法

## ① 舌下免疫と検体採取

6週齢の雌性BALB/cマウスにPC-KLHとCT（PC + CT群）、PC-KLHのみ（PC群）、phosphate buffered saline（PBS）のみ（対照群）を舌下投与し、3群間における免疫応答を比較した。舌下免疫は週1回、計3回行い、3回目の舌下投与7日後に血清、鼻腔洗浄液を採取した。（図1）

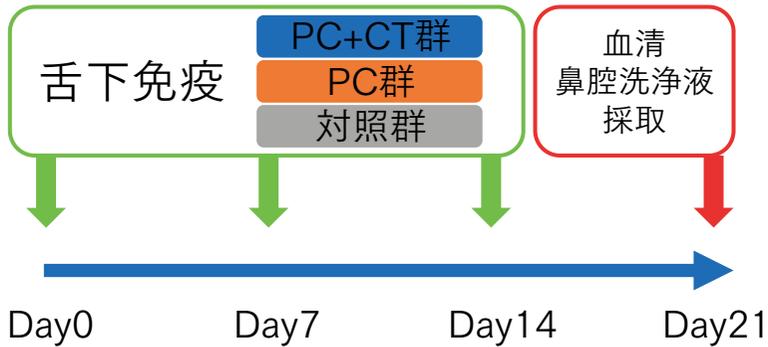


図1：実験のプロトコール

## ② 血清および鼻腔洗浄液中 PC 特異的抗体の測定

血清 PC 特異的抗体価（IgM, IgG, IgA, IgG サブクラス）、鼻腔洗浄液 PC 特異的 IgA 抗体価を ELISA 法で測定した。

## ③ 血清総 IgE 値

血清中の総 IgE 値を ELISA 法で測定した。

## 結 果

## ① 血清 PC 特異的抗体

血清 PC 特異的 IgM、IgG、IgA 抗体価を対照群と PC 群とで比較すると、PC 群の PC 特異的 IgG 抗体価が有意に高かった。PC 特異的 IgM および IgA 抗体価も軽度上昇したが、有意差はなかった。PC+CT 群と PC 群の比較では、PC 特異的 IgG 及び IgA 抗体価は PC+CT 群で有意に高値を示した。PC 特異的 IgM も PC+CT 群のほうが高かったが、有意差は認められなかった。(図 2)

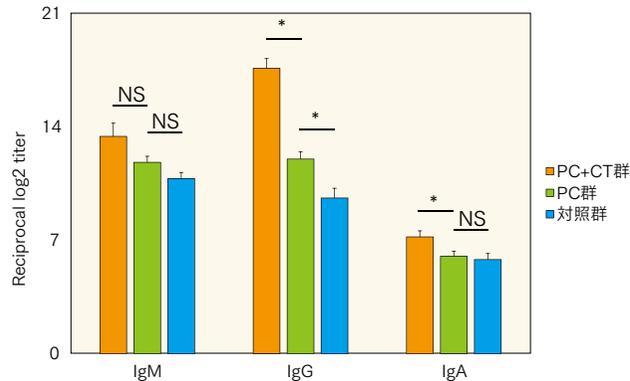


図 2：血清中の PC 特異的 IgM、IgG、IgA 抗体

血清 PC 特異的抗体価は PC+CT 群，PC 群，対照群の順に高値を示した。\* $p < 0.05$ . NS: not significant.

## ② 鼻腔洗浄液中の PC 特異的 IgA

鼻腔洗浄液中の PC 特異的 IgA 抗体価は PC+CT 群でもっとも高値で、PC 群そして対照群との間に有意差を認めた。PC 群においても対照群と比較して有意な PC 特異的 IgA 抗体価の上昇を認めた。(図 3)

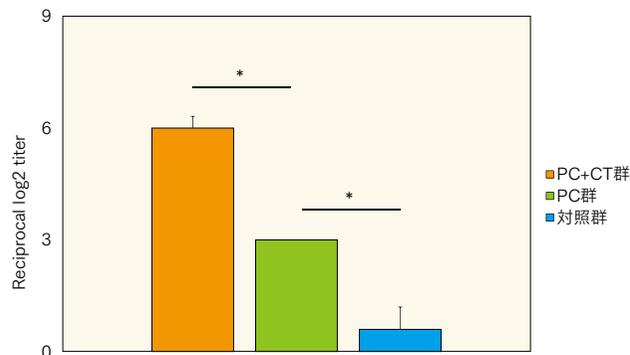


図 3：鼻腔洗浄液中の PC 特異的 IgA

鼻腔洗浄液中の PC 特異的 IgA 抗体価も PC+CT 群，PC 群，対照群の順に高値を示した。\* $p < 0.05$ .

### ③ 血清 PC 特異的 IgG サブクラス抗体

血清中の PC 特異的 IgG サブクラス抗体価は、すべてのサブクラスが PC+CT 群で著しく上昇し、IgG1、IgG2a、IgG2b 抗体価は PC 群よりも有意に高かった。PC 群も対照群と比較するとすべてのサブクラス抗体価が高値を示し、IgG1 で有意差を認めた。(図 4)

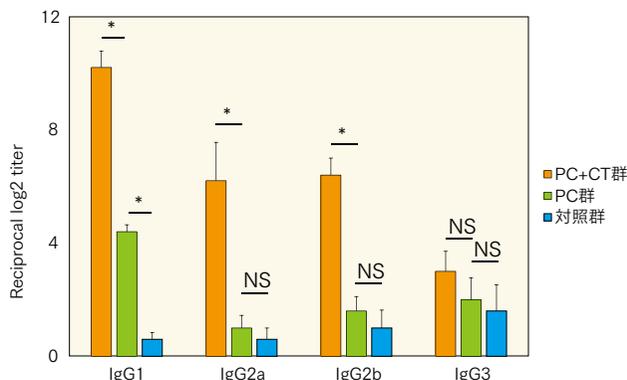


図 4：血清中の PC 特異的 IgG サブクラス抗体

血清 PC 特異的 IgG サブクラス抗体価も PC+CT 群、PC 群、対照群の順に高値となり、IgG1、IgG2a、IgG2b 抗体価は PC+CT 群で PC 群よりも有意に高かった。PC 群も対照群と比較してすべてのサブクラスで高値を示し、IgG1 では有意差を認めた。\* $p < 0.05$ . NS: not significant.

### ④ 血清総 IgE 値

血清中の総 IgE 値は PC+CT 群および PC 群で対照群より高値であったが、いずれも有意差はなかった。(図 5)

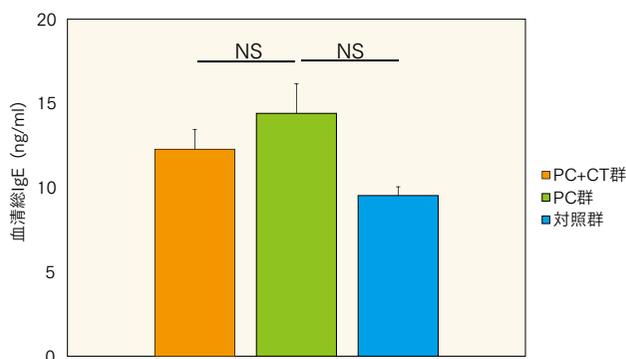


図 5：血清総 IgE

血清中の総 IgE の上昇は軽微で、PC+CT 群、PC 群、対照群間で有意差はなかった。

## 考 察

PC-KLH を CT とともにあるいは単独で舌下投与しても、血清 PC 特異的 IgG 抗体価そして鼻腔洗浄液 IgA 抗体価が対照群と比較して有意に上昇した。また、PC-KLH の単独舌下投与でも、CT を併用したときより低いものの、粘膜および全身免疫応答を誘導でき

た。これらの結果から PC-KLH に免疫原性があり、アジュバントを用いなくても免疫応答を誘導できることが示された。

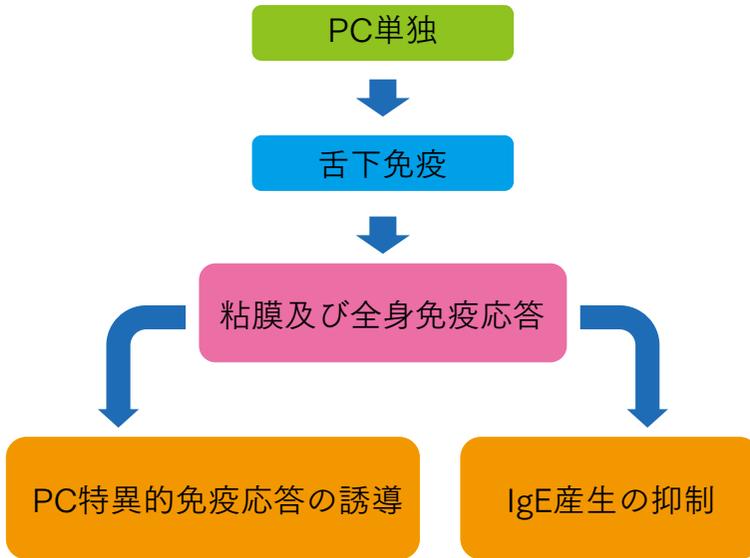
本研究では PC-KLH を抗原として舌下投与し、抗体価の測定には PC-bovine serum albumin (BSA) を使用しているため、PC と KLH あるいは BSA との結合部位に対する免疫応答をみている可能性が考えられる。しかし、先の PC-KLH の経鼻免疫に関する研究で、PC 特異的 IgA である TEPC-15 を用いて阻害実験を行い、PC-KLH によって誘導される抗体が PC 分子に特異的であることを確認している<sup>5)</sup>。したがって、PC-KLH は単独でも粘膜ワクチンとして用いることができると考えられる。

舌下免疫による免疫応答の誘導には舌下粘膜に存在する樹状細胞が重要な役割を担い、抗原を認識した樹状細胞は舌下粘膜の所属リンパ節である頸部リンパ節さらに脾臓へ移動し、それぞれの場所で抗原特異的 CD4<sup>+</sup> T 細胞へ抗原提示を行い、同細胞の分化増殖に関与し抗原特異的抗体産生に寄与する<sup>6)</sup>。また、舌下免疫応答はアジュバントを併用しなくとも誘導され、抗原の舌下投与によって顎下部および頸部リンパ節、そして脾臓に抗原特異的抗体産生細胞が認められ、血清中の抗原特異的 IgG が有意に上昇することが報告されている<sup>7)</sup>。本研究では各免疫臓器における PC 特異的抗体産生細胞は観察していないが、同様の機序で PC 特異的抗体が産生されたと考えられる。なお、PBS を投与した対照群でも PC 特異的抗体の産生が認められたが、これは PC がすべての細菌の構成成分であり、鼻腔や口腔あるいは消化管の常在菌由来の PC が刺激となって頸部リンパ節や脾臓で恒常的に PC 特異的免疫応答が生じているためと推測される。したがって、PC の単独舌下投与によっても有意な免疫応答が誘導されるのは、PC の舌下投与がこれら常在菌に対する免疫応答にブースター効果をもたらした結果とも考えられる。

PC+CT 群および PC 群の血清 PC 特異的 IgG サブクラスの解析ではいずれも IgG1 の産生が優位であり、Th2 型免疫応答の誘導が示唆された。しかし、血清中の総 IgE 値は PC+CT 群および PC 群で若干の上昇はみられたが、対照群と比較して有意差はなかった。舌下免疫応答では制御性 T 細胞が誘導されること<sup>8)</sup>、血清総 IgE 値は CT の経鼻投与では上昇するが舌下投与では上昇しないことなどが報告されており<sup>1)</sup>、舌下免疫では IgE の産生を抑制する何らかの機序が働くと推測される。また、PC は結合する蛋白成分によって免疫原性が変化し、脾臓由来の樹状細胞を PC-KLH で刺激すると IL-12p40 の産生が亢進して IgE の産生が抑制される<sup>9)</sup>。したがって、PC は単独でもその舌下投与によって Th2 型の免疫応答を誘導し IgA 系の粘膜免疫反応を維持しながら、その一方で同じ Th2 型の免疫応答である IgE の産生を抑制する作用を有していると考えられる。

## 結 語

PC 舌下ワクチンは、アジュバントがなくても PC 特異的粘膜および全身免疫応答を誘導し、IgE 依存性の I 型アレルギー性炎症の発症を抑制できる。



## 参考文献

- 1) Maseda Y, Ohori J, Tanaka N, et al. Mucosal and systemic immune response to sublingual or intranasal immunization with phosphorylcholine. *Auris Nasus Larynx* 2017;45:273-280.
- 2) Brimnes J, Kildsgaard J, Jacobi H, et al. Sublingual immunotherapy reduces allergic symptoms in a mouse model of rhinitis. *Clin Exp Allergy* 2007;37:488-497.
- 3) Kim BY, Shin JH, Park HR, et al. Comparison of antiallergic effects of pneumococcal conjugate vaccine and pneumococcal polysaccharide vaccine in a murine model of allergic rhinitis. *Laryngoscope* 2013;123:2371-2377.
- 4) Preston JA, Essilfie AT, Horvat JC, et al. Inhibition of allergic airways disease by immunomodulatory therapy with whole killed *Streptococcus pneumoniae*. *Vaccine* 2007;25:8154-8162.
- 5) Tanaka N, Fukuyama S, Fukuiwa T, et al. Intranasal immunization with phosphorylcholine induces antigen specific mucosal and systemic immune responses in mice. *Vaccine* 2007;25:2680-2687.
- 6) Song JH, Kim JI, Kwon HJ, et al. CCR7-CCL19/CCL21-regulated dendritic cells are responsible for effectiveness of sublingual vaccination. *J Immunol* 2009;182:6851-6860.
- 7) Cuburu N, Kweon MN, Song JH, et al. Sublingual immunization induces broad-based systemic and mucosal immune responses in mice. *Vaccine* 2007;25:8598-8610.
- 8) Scadding GW, Shamji MH, Jacobson MR, et al. Sublingual grass pollen immunotherapy is associated with increases in sublingual Foxp3-expressing cells and elevated allergen-specific immunoglobulin G4, immunoglobulin A and serum inhibitory activity for immunoglobulin E-facilitated allergen binding to B cells. *Clin Exp Allergy* 2010;40:598-606.
- 9) Miyashita K, Ohori J, Nagano H, et al. Intranasal immunization with phosphorylcholine suppresses allergic rhinitis in mice. *Laryngoscope* 2017; in press.





## 第 V 章

# 経皮免疫とワクチン

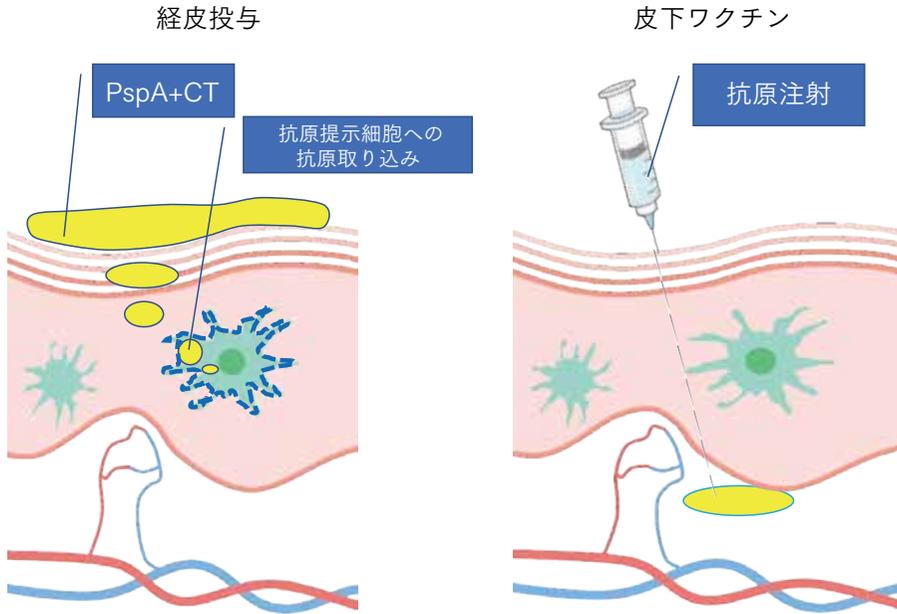
## V-1 経皮免疫とは

ワクチンの投与経路は皮下注射や筋肉注射による全身投与と経口、舌下などの経粘膜投与の二つに大別される。両者とも血清 IgG を主体とする全身免疫応答を誘導することは可能であるが、全身投与では粘膜面で微生物の侵入を阻止する粘膜免疫応答が誘導できないため、生体は微生物のキャリアとなる可能性がある。したがって、上気道および下気道感染症の予防を目的とした粘膜ワクチンの開発が進められている。しかし、経口ワクチンで有効な免疫応答を誘導するためには多量の抗原の投与が必要とされ、経鼻ワクチンでは顔面神経麻痺などの中枢神経の有害事象の発症が懸念される。舌下ワクチンは安全性が高く泌尿生殖器への粘膜免疫応答も誘導できるという利点があるが、ワクチンの対象となる乳幼児への投与は困難である。(表)

そこで注目されているのが抗原を経皮的に投与する経皮ワクチンである。これは抗原をアジュバントとともに皮膚に直接塗布し、抗原提示細胞となる Langerhans 細胞に抗原を認識させることで免疫を活性化させる方法で、Glenn ら<sup>12)</sup>が1990年代にはじめて報告した。皮下注射等によるワクチンの全身投与は、一定量の抗原を皮下に投与できるが、皮膚の抗原提示細胞を利用していない点から経皮ワクチンとは異なる。(図) 具体的な方法として、たとえばマウスでは、その皮膚を除毛し24時間後に抗原を浸み込ませたガーゼを一定時間塗布するのみで、注射器等は使用しない。この方法で抗原をコレラトキシンや易熱性腸毒素などの粘膜アジュバントとともに経皮投与すると、経粘膜投与と同様に抗原特異的な全身および粘膜免疫応答が誘導されることがマウスを用いた研究で証明されている<sup>12)</sup>。この方法は経皮免疫 (transcutaneous immunization : TCI) と呼ばれ、この方法を用いるワクチンが経皮ワクチンである。本ワクチンは他の粘膜ワクチンと同様に接種時に痛みを伴わず、血管が分布していない皮膚の表皮に局限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。また、皮下注射等によるワクチンと異なり、抗原を無菌に保つためのコールドチェーンを必要とせず、注射針や注射器などの医療廃棄物も生じないため地球環境にも優しい<sup>3)</sup>。(表)

しかし、経皮ワクチンの欠点として、皮膚を透過する抗原量が少なく、Langerhans 細胞に十分量の抗原を認識させるためには免疫回数を増やす必要がある。この問題を克服するため、ハイドロジェルパッチやマイクロニードルを応用することが報告<sup>4,5)</sup>されている。また、経皮投与では一般的に Th2 型の免疫応答が誘導されるため、I 型アレルギー反応を起こしやすいことも注意しなければならない。

そこで、本章では、肺炎球菌抗原やホスホリルコリン (PC) の経皮投与による免疫応答を解析し、経皮免疫が前述した経鼻免疫や舌下免疫と同様に上気道粘膜免疫応答を誘導するための新たな免疫ルートとなり得るか、経皮ワクチンが上気道感染症の予防に有効か、そして I 型アレルギー反応を発症するリスクについて検討した。



図：経皮ワクチンと皮下注射

表：各種免疫方法の利点と欠点

|      | 利点   | 欠点   |
|------|--|--|
| 経口免疫 | <ul style="list-style-type: none"> <li>腸管優位の免疫応答を誘導できる。</li> <li>免疫寛容を誘導できる。</li> </ul>                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>腸肝循環の影響を受ける。</li> <li>抗原やアジュバントが多く必要。</li> </ul>              |
| 経鼻免疫 | <ul style="list-style-type: none"> <li>上気道優位の免疫応答を誘導できる。</li> </ul>                                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>顔面神経麻痺が報告されている。</li> <li>鼻アレルギーのアレルゲンとなる抗原は投与できない。</li> </ul> |
| 舌下免疫 | <ul style="list-style-type: none"> <li>免疫寛容を誘導できる。</li> <li>泌尿生殖器の免疫応答を誘導できる。</li> </ul>                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>乳幼児には不向き。</li> <li>アナフィラキシーが稀ながら報告されている。</li> </ul>           |
| 経皮免疫 | <ul style="list-style-type: none"> <li>痛みがない。</li> <li>アナフィラキシーが起こらない。</li> <li>多様な粘膜免疫応答が可能。</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>抗原量が多く必要。</li> <li>塗布用のデバイスが必要。</li> </ul>                    |

## 参考文献

- 1) Glenn GM, Rao M, Matyas GR, et al. Skin immunization made possible by cholera toxin. *Nature* 1998;391:851.
- 2) Glenn GM, Kersten TS, Vassell R, et al. Cutting edge: transcutaneous immunization with cholera toxin protects mice against lethal mucosal toxin challenge. *J Immunol* 1998;161:3211-3214.
- 3) 永野広海. 耳鼻咽喉科医療最前線 ホスホリルコリンを用いたワクチン開発の展望. *耳鼻咽喉科臨床* 2016;109:820-821.
- 4) Hirobe S, Matsuo K, Quan YS, et al. Clinical study of transcutaneous vaccination using a hydrogel patch for tetanus and diphtheria. *Vaccine* 2012;30:1847-1854.
- 5) Matsuo K, Hirobe S, Yokota Y, et al. Transcutaneous immunization using a dissolving microneedle array protects against tetanus, diphtheria, malaria, and influenza. *J Control Release* 2012;160:495-501.

### 〈Summary〉

Pneumococcal surface protein A (PspA) は肺炎球菌に共通する蛋白質であり、現行の肺炎球菌ワクチンよりも広域なスペクトラムを持つワクチンの候補と考えられている。また、その肺炎球菌感染症に対する有効性については、動物への経鼻投与などの実験で証明されている。そこで、本研究では、PspA の経皮ワクチンとしての応用の可能性を検討するため、PspA をアジュバントとしてコレラトキシンとともにマウスの耳介皮膚に塗布し、その免疫応答と鼻腔細菌クリアランスへの効果を観察した。その結果、PspA の経皮投与によって、血清中の PspA 特異的 IgM、IgG、IgA 抗体価、鼻腔洗浄液および唾液中の PspA 特異的 IgA 抗体価、そして鼻粘膜と顎下腺組織中の PspA 特異的 IgA 産生細胞数が有意に上昇した。さらに、免疫後に鼻腔内に肺炎球菌 EF3030 の生菌を接種したところ、その鼻腔からのクリアランスが亢進した。以上の結果から、経皮投与が PspA に特異的な全身および粘膜免疫応答を誘導するための新たな投与経路になり得ること、そして、PspA 経皮ワクチンによる肺炎球菌感染症の予防が可能なが示唆された。

### はじめに

肺炎球菌は上下気道感染症の主要な起炎菌であり、髄膜炎などの侵襲性肺炎球菌感染症は時に致死的となることがある。そのため種々の肺炎球菌ワクチンが世界各国で使用され、侵襲性肺炎球菌感染症は激減している。しかし、ワクチン株以外の肺炎球菌やインフルエンザ菌を起炎菌とする急性中耳炎などの上気道感染症に対する効果は限定的である。そのためこれらの細菌に共通な抗原の探索が行われ、その一つとして、すべての肺炎球菌の表層タンパク質抗原で、血清型を超えて多様な肺炎球菌に対する感染防御能を誘導できる pneumococcal surface protein A (PspA) がワクチン候補として注目されている<sup>1)</sup>。

そこで本研究では、PspA の経皮ワクチンとしての免疫原性を確認し、その粘膜免疫応答さらに鼻腔に接種された肺炎球菌のクリアランスへの効果を C57BL/6 マウスを用いて検討した<sup>2)</sup>。

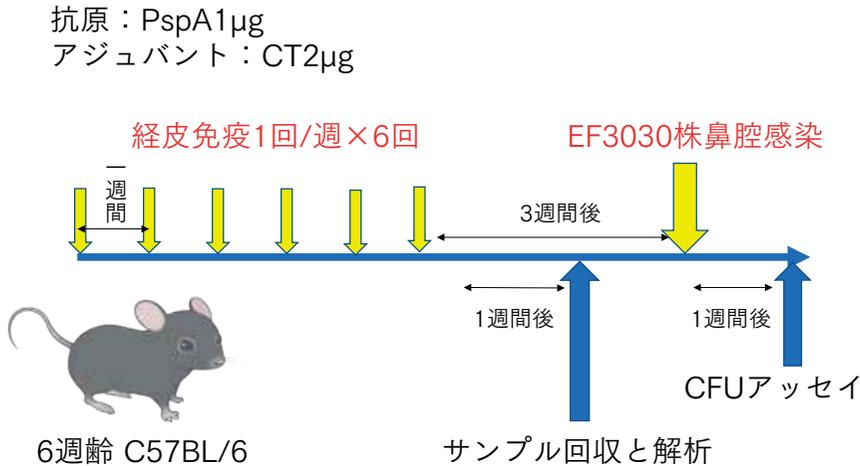
### 材料と方法

#### ① 経皮免疫の方法

6週齢の雌性 C57BL/6 マウスを用いた。マウスをケタミンで麻酔したのち、PspA (1 $\mu$ g) をアジュバントとしてコレラトキシン (CT、2 $\mu$ g) とともに、以前我々が報告した方法と同様に<sup>4)</sup>、1週ごとに6回、耳介皮膚にピペットを用いて経皮投与 (PspA+CT 群) し、

最終免疫の2週間後に血清、鼻腔洗浄液、唾液を採取した。そして、その免疫応答を、PBSを経皮投与した群（PBS群）、PspAのみ単独経皮投与した群（PspA群）、CTのみを単独経皮投与した群（CT群）と比較した。

## 実験のスケジュール



### ② PspA 特異的抗体価

血清中の PspA 特異的 IgM、IgG、IgA 抗体価、鼻腔洗浄液および唾液中の PspA 特異的 IgA 抗体価を ELISA 法で測定した。

### ③ PspA 特異的抗体産生細胞

マウスから脾臓、鼻粘膜、顎下腺を採取し、 $1 \times 10^6$  個細胞あたりの PspA 特異的 IgM、IgG、IgA 産生細胞数を PspA でコーティングした 96 穴の ELISPOT プレート（Millipore MultiScreen<sup>®</sup>）を用いて測定した。

### ④ CD4<sup>+</sup> T 細胞からの PspA 特異的サイトカインの産生

脾臓から磁気細胞分離装置（MACS<sup>®</sup>）を用いて CD4<sup>+</sup> T 細胞を分離し、PspA（1 $\mu$ g）を加えて CO<sub>2</sub> インキュベーター内で5日間培養した。そして、培養上清中の IFN- $\gamma$  と IL-4 濃度を ELISA 法で測定した。

### ⑤ 経皮免疫後の肺炎球菌の鼻腔からのクリアランス

PspA 経皮免疫の細菌クリアランスへの効果を検討するため、最終免疫の3週後に、 $1-2 \times 10^8$  CFU/ml の肺炎球菌 EF3030 株（血清型 19F）を 10 $\mu$ l 鼻腔に接種した。そして、その5日後にマウスの鼻腔を 1 ml の PBS で洗浄し、それを血液寒天培地上で12時間培養後、肺炎球菌のコロニー数を計測した。

## 結 果

## ① 血清中の PspA 特異的抗体

血清中の PspA 特異的 IgM、IgG、IgA は PspA+CT 群にのみ検出され、その抗体価は他の群と比較して有意に高かった。(図1)

## ② 脾臓中の PspA 特異的抗体産生細胞

脾臓の PspA 特異的 IgM、IgG、IgA 産生細胞は PspA+CT 群とわずかながら PBS 群で検出され、PspA 群と CT 群では検出されなかった。それぞれの細胞数はいずれのアイソタイプも PspA+CT 群で有意に高値であり、とくに PspA 特異的 IgM 産生細胞数が著しく上昇した。(図2)

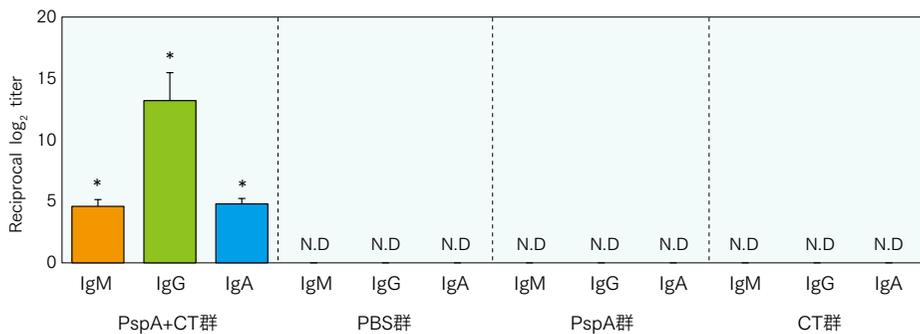


図1：血清中の PspA 特異的抗体

経皮投与群の血清中 PspA 特異的 IgM, IgG, IgA は、他の群と比較して有意に高かった。\* $p < 0.05$

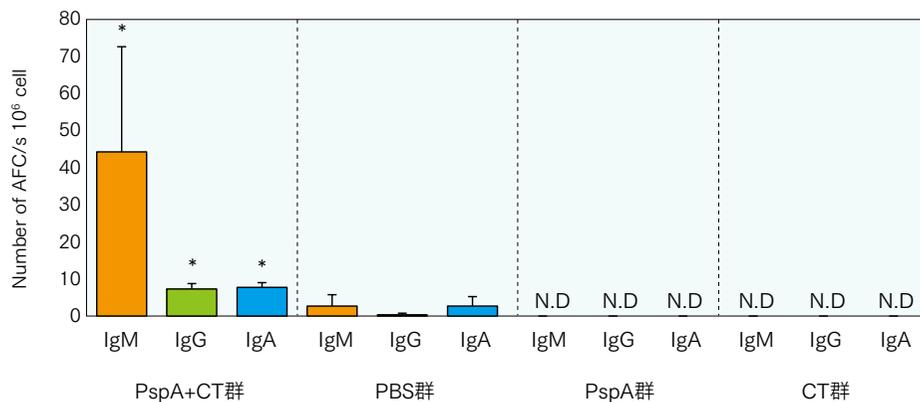


図2：脾臓中の PspA 特異的抗体産生細胞数

脾臓中の PspA 特異的抗体産生細胞は、PspA+CT 群で有意に多く認められた。\* $p < 0.05$

### ③ 鼻腔洗浄液および唾液中の PspA 特異的 IgA 抗体

鼻腔洗浄液および唾液中の PspA 特異的 IgA は、血清と同様に PspA+CT 群にのみ認められ、その抗体価は他の群と比較して有意に高かった。(図 3)

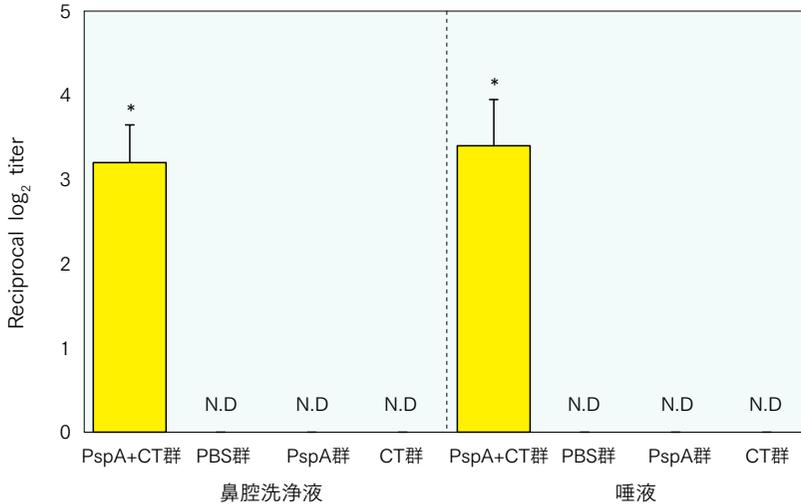


図 3：鼻腔洗浄液および唾液中の PspA 特異的 IgA 抗体

鼻腔洗浄液および唾液中の PspA 特異的 IgA は PspA+CT 群にのみ認められ、他の群と比較して有意に高値を示した。\* $p < 0.05$

### ④ 鼻粘膜と顎下腺における PspA 特異的 IgA 細胞数

鼻粘膜と顎下腺における PspA 特異的 IgA 産生細胞は、PspA 特異的 IgA と同様に、PspA+CT 群にのみ認められ、その細胞数は他の群と比較して有意に高かった。(図 4)

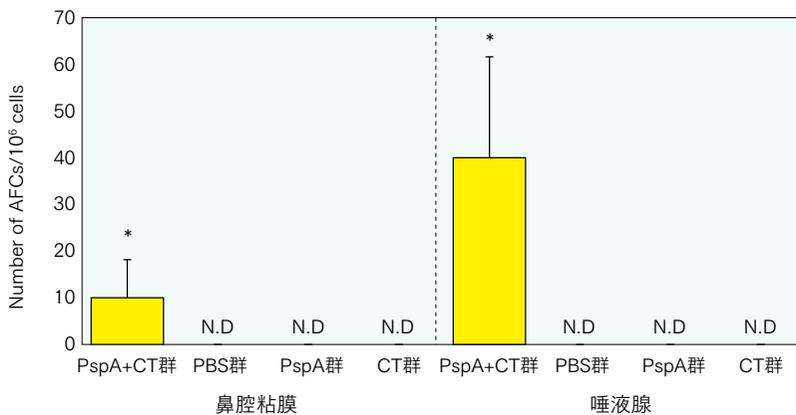


図 4：鼻粘膜と顎下腺における PspA 特異的 IgA 産生細胞

鼻粘膜と顎下腺における PspA 特異的 IgA 産生細胞は、PspA+CT 群で有意に高値を示した。\* $p < 0.05$

⑤ 血清中の PspA 特異的 IgG サブクラス

PspA 特異的 IgG サブクラスは PspA+CT 群でのみ検出され、IgG1 がもっとも高値であった。(図 5)

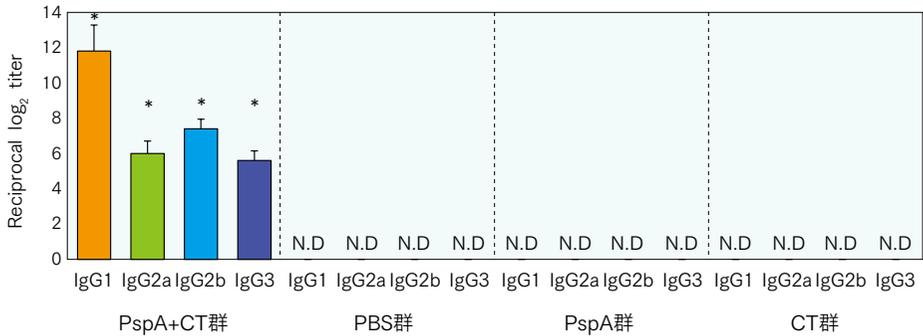


図 5：血清中の PspA 特異的 IgG サブクラス

IgG サブクラスはいずれも PspA+CT 群で有意に上昇し、IgG1 が最も高値であった。\*p<0.05

⑥ CD4<sup>+</sup> T 細胞からのサイトカイン産生

脾臓から分離した CD4<sup>+</sup> T 細胞からの IFN- $\gamma$  と IL-4 の産生は PspA+CT 群においてのみ認められ、IFN- $\gamma$  のほうが IL-4 よりも高値であった。(図 6)

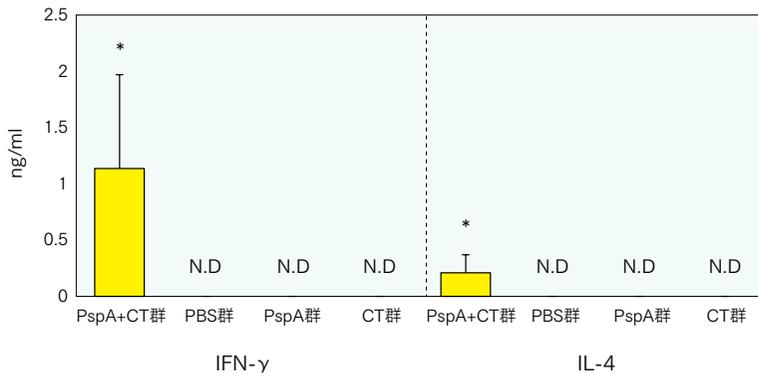


図 6：CD4<sup>+</sup> T 細胞からのサイトカイン産生値

PspA+CT 群で CD4<sup>+</sup> T 細胞からの IFN- $\gamma$ 、IL-4 の産生が認められた。\*p<0.05

### ⑦ 経皮免疫の鼻腔からの肺炎球菌クリアランスへの影響

経皮免疫後に鼻腔へ接種され鼻腔洗浄液から回収された肺炎球菌 EF3030 株の数は、PspA+CT 群で他の群と比較して有意に少なく、PspA 経皮免疫による鼻腔細菌クリアランスの亢進が示された。(図7)

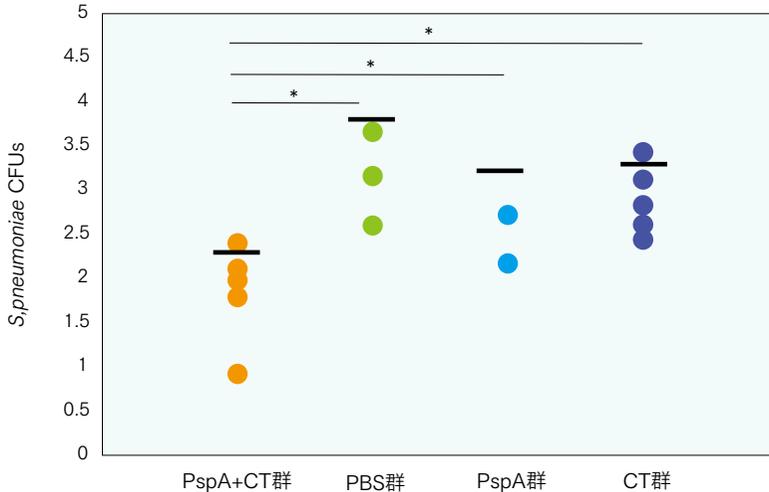


図7：経皮免疫後に接種された肺炎球菌 EF3030 株の鼻腔洗浄液中の菌数  
鼻腔洗浄液中の肺炎球菌 EF3030 株の菌数は、PspA+CT 群で有意に減少した。\* $p < 0.05$

### 考 察

抗原の経皮投与によって抗原特異的な全身免疫応答が誘導されることは、これまでに多くの報告がある。しかし、粘膜免疫応答誘導の程度や様式は、抗原が投与される部位や実験に用いる動物によって異なる。たとえば、Maebaら<sup>3)</sup>は歯周病の起炎菌である *Porphyromonas gingivalis* の外膜蛋白を CT とともにマウスの背部に経皮投与し、血清中の抗原特異的 IgA は上昇したが唾液中には IgG のみで IgA は誘導されなかったと報告している。一方、チンチラを用いた実験では<sup>4)</sup>、インフルエンザ菌の外膜蛋白をアジュバントとして大腸菌由来の内毒素とともに耳介に経皮投与することで、血清中の抗原特異的 IgA が上昇し、抗体のアイソタイプは不明だが鼻咽腔洗浄液中にも抗原特異的抗体が検出されている。今回の我々の実験では、両者の方法を参考にして肺炎球菌の外膜蛋白である PspA をマウスの耳介へ経皮投与したところ、CT とともに PspA を投与した群では血清および鼻腔洗浄液そして唾液中に抗原特異的 IgA の産生を認め、PspA 単独投与群ではこれらの免疫応答はみられなかった。耳介は背部の皮膚よりも薄く抗原の吸収が良好なこと、耳介への経皮投与では抗原を認識した樹状細胞の鼻咽腔関連リンパ組織 (NALT) への遊走がみられることから<sup>4)</sup>、経皮免疫によって上気道に粘膜免疫応答を誘導するには耳介への抗原投与が優れると考えられる。しかし、より効率的に粘膜免疫応答を誘導するには、他の粘膜ワクチンと同様に何らかのアジュバントを用いることが必要となる。

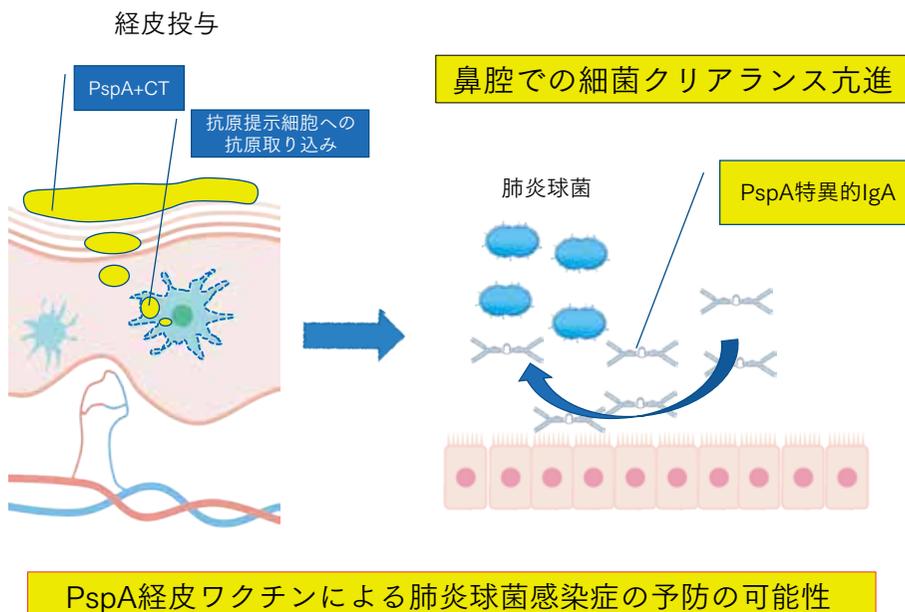
経皮ワクチンのアジュバントとしては、これまで CT や毒素原性大腸菌の易熱性下痢毒

素 (LT)、合成核酸 CpG オリゴデオキシヌクレオチド (CpG) などが使用されている<sup>5)</sup>。アジュバントは CD4<sup>+</sup> T 細胞の応答やサイトカイン産生に大きく関与し、今回の実験では CT によって Th2 型の免疫応答が誘導され、IgG1 や IL-4 の産生が認められた。その一方で、Th1 型の免疫応答として IgG2a や IFN- $\gamma$  の産生もみられ、経皮免疫では Th1 型の反応が優位とする報告<sup>5)</sup>を示唆する結果とも考えられる。

PspA を CT とともに経皮投与した群は、他の群と比較して鼻腔に接種された肺炎球菌のクリアランスが亢進した。Novotny ら<sup>4)</sup>も、チンチラの耳介にインフルエンザ菌外膜蛋白を経皮投与することでインフルエンザ菌の鼻腔および中耳からのクリアランスが亢進すること、さらに、インフルエンザ菌による中耳感染後にインフルエンザ菌外膜蛋白を経皮投与すると、バイオフィルムの消失とともに治癒が促進されることを証明している。ワクチンの経鼻投与でも鼻腔に接種された細菌のクリアランスが亢進し、我々はホスホリコリン (PC) の経鼻投与によって鼻腔洗浄液中の PC 特異的 IgA が誘導され、それによって肺炎球菌およびインフルエンザ菌が鼻腔から速やかに排除されることを報告した<sup>6)</sup>。一方 Fukuyama ら<sup>7)</sup>は、IgA ノックアウトマウスに PspA を経鼻投与しても粘膜面に PspA 特異的 IgA が検出されず、鼻腔の肺炎球菌クリアランスが上昇しなかったと述べている。これらの結果から、上気道における細菌クリアランスの亢進には粘膜面における IgA の産生が必要であり、今回の研究でも、経皮免疫によって鼻腔中に産生された PspA 特異的 IgA によって肺炎球菌のクリアランスが亢進したと考えられる。

## 結 語

経皮投与が PspA 特異的な全身および粘膜免疫応答を誘導するための新たな投与経路になり得ること、そして、PspA 経皮ワクチンによって肺炎球菌感染症の予防が可能なが示唆された。



## 参考文献

- 1) Briles DE, Ades E, Paton JC, et al. Intranasal immunization of mice with a mixture of the pneumococcal proteins PsaA and PspA is highly protective against nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 2000;68:796-800.
- 2) Nagano H, Kawabata MI, Sugita G, et al. Transcutaneous immunization with pneumococcal surface protein A in mice. *Laryngoscope* In press.
- 3) Maeba S, Otake S, Namikoshi J, et al. Transcutaneous immunization with a 40-kDa outer membrane protein of *Porphyromonas gingivalis* induces specific antibodies which inhibit coaggregation by *P. gingivalis*. *Vaccine* 2005;23:2513-2521.
- 4) Novotny LA, Clements JD, Bakaletz LO. Transcutaneous immunization as preventative and therapeutic regimens to protect against experimental otitis media due to nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Mucosal Immunol* 2011;4:456-467.
- 5) Bal SM, Ding Z, van Riet E, et al. Advances in transcutaneous vaccine delivery: do all ways lead to Rome? *J Control Release* 2010;148:266-282.
- 6) Tanaka N, Fukuyama S, Fukuiwa T, et al. Intranasal immunization with phosphorylcholine induces antigen specific mucosal and systemic immune responses in mice. *Vaccine* 2007;25:2680-2687.
- 7) Fukuyama Y, King JD, Kataoka K, et al. Secretory-IgA antibodies play an important role in the immunity to *Streptococcus pneumoniae*. *J Immunol* 2010;185:1755-1762.

### 〈Summary〉

抗原の経皮投与によって経口、経鼻、舌下投与と同様に粘膜免疫応答が誘導されることが知られているが、まだその報告は少ない。そこで、経皮投与がホスホリルコリン (PC) を用いた粘膜ワクチンの新たな投与経路になりうるかを検討するため、PC を粘膜アジュバントのコレラトキシンとともにマウスの耳介皮膚に経皮投与し、PBS のみを投与した群 (対照群) と比較した。その結果、PC の経皮投与により、血清中の PC 特異的 IgM、IgG、IgA 抗体価、鼻腔洗浄液、唾液、肺胞洗浄液、膣洗浄液、便中の PC 特異的 IgA 抗体価が対照群と比較して有意に上昇した。また、IgG2a より IgG1 抗体価が高く、総 IgE 抗体値が上昇し、IFN- $\gamma$  より IL-4 の上昇が優位であったことから、Th2 型優位の免疫反応が誘導されることが示された。なお、病理組織学的に有害事象となる皮膚炎は認めなかった。以上の結果から、経皮投与によっても PC 特異的粘膜および全身免疫応答が誘導され、経皮投与が PC ワクチンによる粘膜免疫応答を誘導するための新たな投与方法になり得ると考えられた。

### はじめに

これまでに我々は、コレラトキシン (CT) をマウスの背部に経皮投与することで血清のみならず粘膜面においても CT 特異的粘膜免疫応答が誘導されること、またホスホリルコリン (PC) を同様にマウス背部に経皮投与することによって血清中の PC 特異的 IgG を長期間維持できることを報告した<sup>1,2)</sup>。しかし、この方法は臨床応用を考えたときに実用的ではなく、背部皮膚は厚いため抗原の吸収効率が低い。

そこで今回、より実用性と効率が高い方法としてマウスの耳介皮膚に PC を経皮投与し、血清中と粘膜面での免疫応答を観察した<sup>3)</sup>。

## 材料と方法

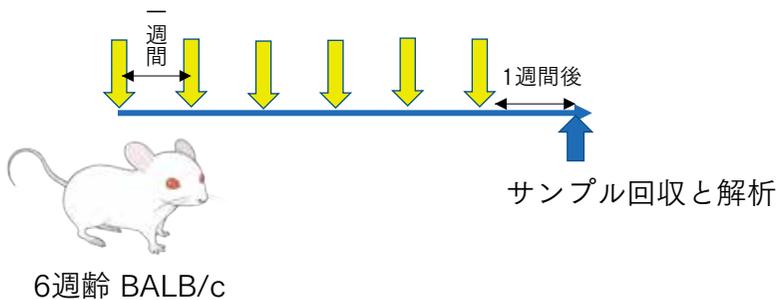
### ① 経皮免疫の方法

6週齢の雌性BALB/cマウスを用いた。マウスをケタミンで麻酔したのち、PC (200 $\mu$ g) を、CT (2 $\mu$ g) とともに、前述 (第V章-2) の方法と同様に1回/週の頻度で6回、マウスの耳介皮膚にピペットを用いて経皮投与 (以下 PC+CT 群) した。最終免疫の1週間後に血清、鼻腔洗浄液、肺胞洗浄液、膈洗浄液、糞便を採取した。唾液はピロカルピン100 $\mu$ g を腹腔投与してピペットを用いて採取した。鼻腔洗浄液、肺胞洗浄液、膈洗浄液は、ケタミンを用いて鎮静させた後に屠殺し、それぞれPBS100 $\mu$ l で洗浄してその洗浄液を回収した。

## 実験のスケジュール

抗原：PC200 $\mu$ g  
アジュバント：CT2 $\mu$ g

経皮免疫1回/週×6回



### ② PC 特異的抗体価

血清中の PC 特異的 IgM、IgG、IgA 抗体価および鼻腔洗浄液・唾液中の PC 特異的 IgA 抗体価を、ELISA 法を用いて測定した。

### ③ PC 特異的抗体産生細胞

マウスから脾臓を採取し、 $1 \times 10^6$  個細胞あたりの PC 特異的 IgM、IgG、IgA 産生細胞数を PC でコーティングした 96 穴の ELISPOT プレート (Millipore MultiScreen<sup>®</sup>) を用いて測定した。

### ④ CD4<sup>+</sup> 細胞からの PC 特異的サイトカイン産生

脾臓から磁気細胞分離装置 (MACS<sup>®</sup>) を用いて CD4<sup>+</sup> T 細胞を分離し、PC (1 $\mu$ g) を加えて CO<sup>2</sup> インキュベーター内で3日間培養した。そして、培養上清中の IFN- $\gamma$  と IL-4 濃度を ELISA 法で測定した。

## 結 果

## ① 血清中の PC 特異的抗体価

血清中の PC 特異的 IgM、IgG、IgA 抗体価は、PC+CT 群が対照群と比べて有意に高く、PC 特異的 IgG 抗体価が最も高値であった。(図 1)

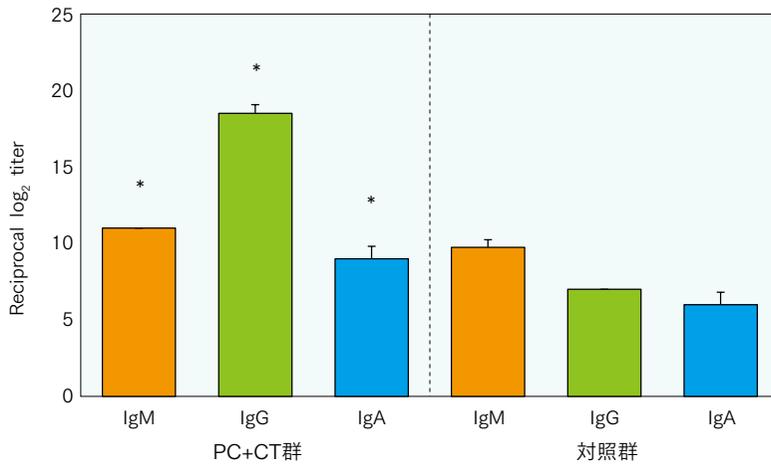


図 1：血清中の PC 特異的抗体価

PC+CT 群の PC 特異的 IgM、IgG、IgA 抗体価は、対照群と比べて有意に高値であった。\* $p < 0.05$

## ② PC 特異的免疫グロブリン産生細胞数

脾臓の PC 特異的 IgM、IgG、IgA 産生細胞数は、PC+CT 群が対照群と比べて有意に高値で、PC 特異的 IgM 産生細胞数が著しく上昇した。(図 2)

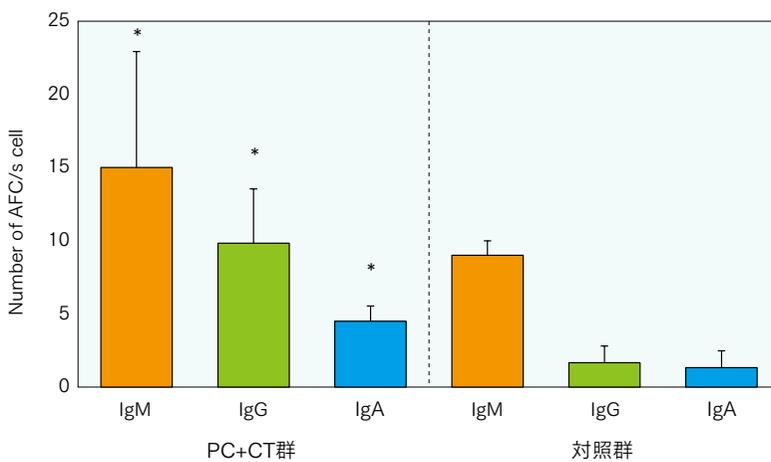


図 2：脾臓の PC 特異的免疫グロブリン産生細胞数

PC+CT 群の脾臓中 IgM、IgG、IgA 産生細胞数は、対照群と比べて有意に高値であった。\* $p < 0.05$

### ③ 粘膜面における PC 特異的 IgA 抗体価

粘膜面である鼻腔洗浄液・唾液・肺胞洗浄液・膣洗浄液・便中における PC 特異的 IgA 抗体価は、PC+CT 群が対照群と比較して有意に高かった。(図3)

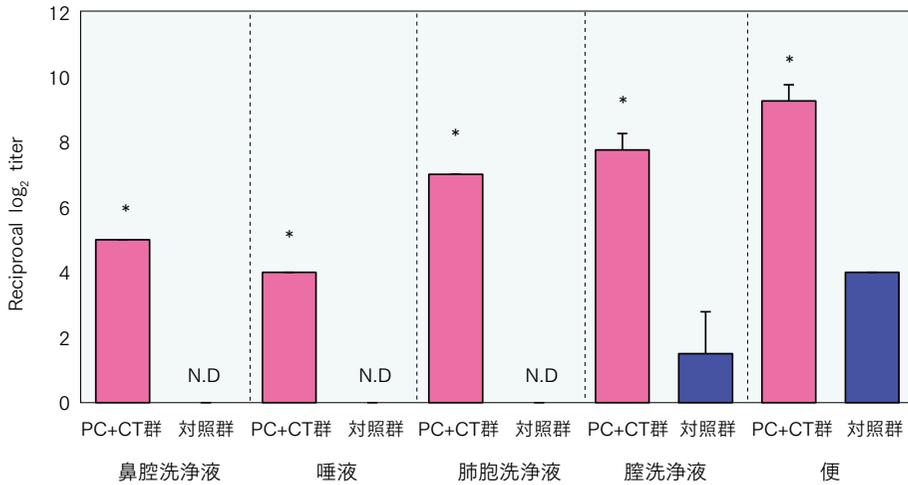


図3：粘膜面における PC 特異的 IgA 抗体価

PC+CT 群では、鼻腔洗浄液、唾液、肺胞洗浄液、膣洗浄液、便中に PC 特異的 IgA を認め、その抗体価はいずれも対照群と比較して有意に高かった。\* $p < 0.05$

### ④ 血清中の PC 特異的 IgG サブクラス抗体価

PC+CT 群では対照群と比較して PC 特異的 IgG1 および IgG2a 抗体価が有意に高値であった。(図4)

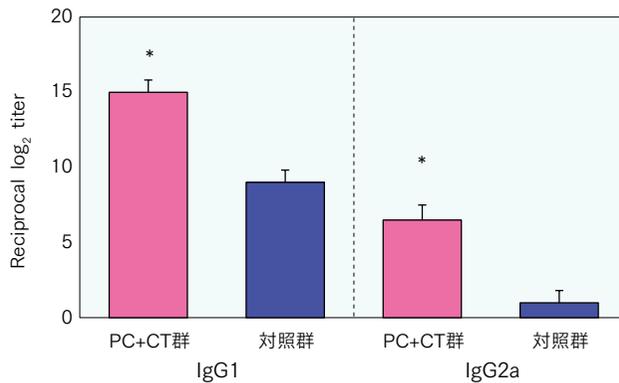


図4：血清中の PC 特異的 IgG サブクラス抗体価

PC+CT 群では対照群と比べて、血清中の PC 特異的 IgG1, IgG2a 抗体価が有意に高値を示した。\* $p < 0.05$

### ⑤ CD4+ 細胞からの PC 特異的サイトカイン産生

PC+CT 群では対照群と比較して IFN- $\gamma$  および IL-4 がともに有意に高値を示し、IFN- $\gamma$

よりも IL-4 の濃度が高かった。(図5)

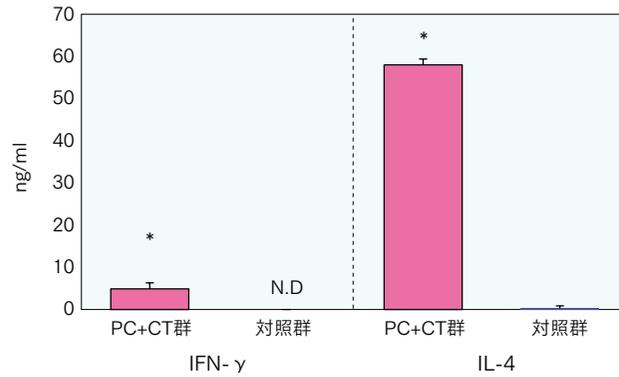


図5：PC 特異的サイトカイン産生

PC+CT 群は対照群と比較して IFN-γ と IL-4 が有意に高値を示した。\* $p < 0.05$

### ⑥ 血清中の総 IgE 値

血清中の総 IgE 値は PC+CT 群で著しく上昇し、対照群と比較して有意に高値を示した。

(図6)

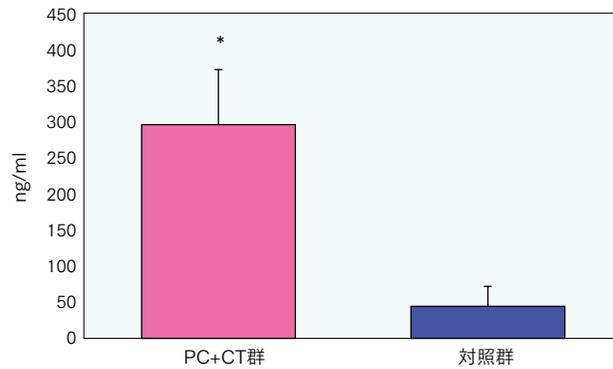


図6：血清中の総 IgE 値

血清中の総 IgE 値は、PC+CT 群が対照群と比較して有意に高値を示した。\* $p < 0.05$

### ⑦ 耳介皮膚の病理組織学検討

PC 投与部である耳介皮膚を病理組織学的に検討したところ、PC+CT 群と対照群とでその所見に何ら差はなく、炎症細胞浸潤等の有害事象は認められなかった。(図7)

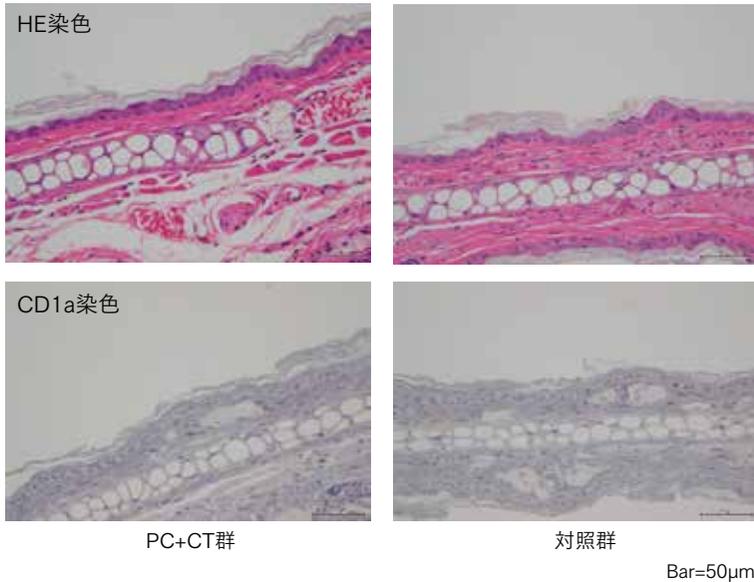


図7：耳介皮膚の病理組織学的所見

免疫組織学的に PC+CT 群と対照群に明らかな差はなかった。

### 考 察

PC をアジュバントである CT とともに耳介皮膚に経皮投与すると、血清中の PC 特異的免疫応答が対照群と比較して有意に上昇した。対照群でも PC 特異的抗体を認めたが、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ものと考えられる。これらは前述（第四章-1）の PC を経鼻あるいは舌下投与した際の免疫応答に遜色のないものである。しかし、経皮投与では一回あたりの抗原量が多く、投与回数も6回必要であったことは本投与方法の欠点といえる。

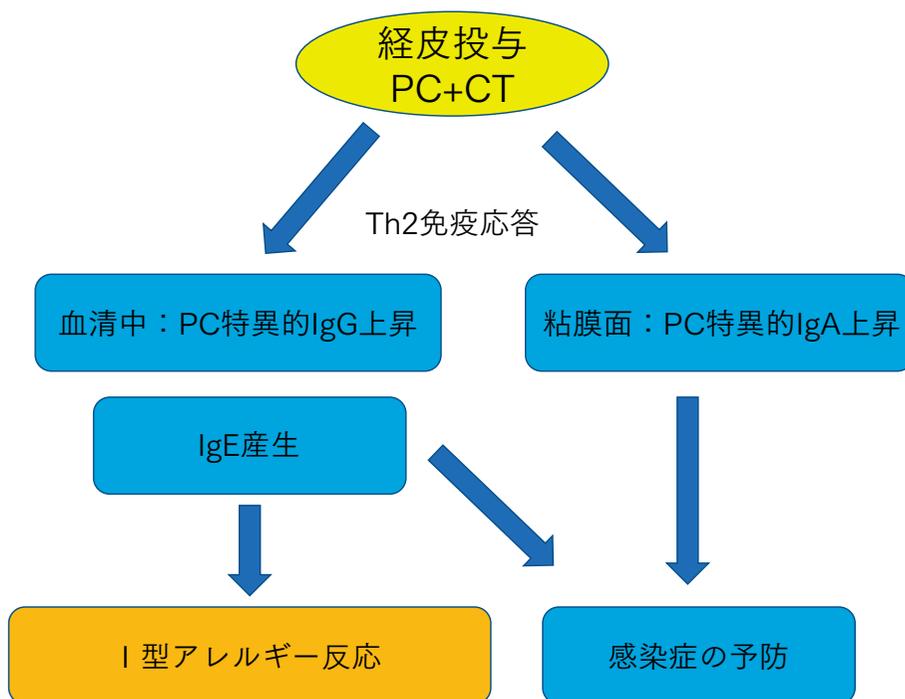
また、鼻腔洗浄液、唾液、胞洗浄液、膣洗浄液、糞便においても PC 特異的 IgA 抗体価の上昇を認め、PC の経皮投与でも経鼻や舌下投与と同様に、そして前章で述べた PspA の経皮投与と同じく粘膜免疫応答が誘導されることが示された。これらのことから、経皮投与が PC ワクチンによる粘膜免疫応答を誘導するための新たな投与方法になり得ると考えられた。

血清中の IgG サブクラスでは IgG1 抗体価が上昇し、脾臓 CD4<sup>+</sup> T 細胞からは IL-4 の産生がみられ、PC 経皮投与では Th2 型優位の免疫反応が誘導された。そしてその結果として血清中の総 IgE 値が上昇した。アジュバントとして用いた CT の影響とも考えられるが、Strid ら<sup>4)</sup>が述べているように、経皮免疫自体が Th2 型優位にシフトしやすいのかもしれない。したがって、PC 経皮ワクチンを臨床応答するためには、I 型アレルギー性炎症の

発症を抑制し、かつ皮膚毒性が低いアジュバントの開発が重要と考えられる<sup>5-7)</sup>。

### 結 語

PC の経皮投与によって PC 特異的粘膜および全身免疫応答が誘導され、経皮投与が PC に対する粘膜免疫応答を誘導するための新たなワクチン投与経路になり得ると期待される。



## 参考文献

- 1) 永野広海, 牧瀬 高穂, 馬越 端夫, 他: コレラトキシン経皮免疫による粘膜免疫応答. 口腔・咽喉科 2012;84:79-84.
- 2) Nagano H, Kurono Y: Transcutaneous immunization with phosphorylcholine induces antigen-specific mucosal and systemic immune responses in BALB/c mice. *Auris Nasus Larynx* 2015;42:478-482.
- 3) Nagano H, Jimura T, Nagano M, et al: Transcutaneous immunization in auricle skin induces antigen-specific mucosal and systemic immune responses in BALB/c mice. *Auris Nasus Larynx* 2017;44:411-416.
- 4) Strid J, Hourihane J, Kimber, et al. Disruption of the stratum corneum allows potent epicutaneous immunization with protein antigens resulting in a dominant systemic Th2 response. *Eur J Immunol* 2004;34:2100-2109.
- 5) Ferreira DM, Darrieux M, Oliveira ML, et al: Optimized immune response elicited by a DNA vaccine expressing pneumococcal surface protein a is characterized by a balanced immunoglobulin G1 (IgG1)/IgG2a ratio and proinflammatory cytokine production. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15:499-505.
- 6) Hanniffy SB, Carter AT, Hitchin E, et al: Mucosal delivery of a pneumococcal vaccine using *Lactococcus lactis* affords protection against respiratory infection. *J Infect Dis* 2007;195:185-193.
- 7) Oma K, Zhao J, Ezoe H, et al: Intranasal immunization with a mixture of PspA and a Toll-like receptor agonist induces specific antibodies and enhances bacterial clearance in the airways of mice. *Vaccine* 2009;27:3181-3188.



## 第VI章

# 粘膜ワクチンによる アレルギー性炎症の制御

### 〈Summary〉

ホスホリルコリン (PC) を経鼻あるいは舌下投与すると、PC 特異的粘膜および全身免疫応答が誘導されるとともに IgE の産生が抑制されることから、PC 粘膜ワクチンによって細菌感染症のみならずアレルギー性炎症も制御できる可能性がある。そこで、卵白アルブミン (OVA) を用いてアレルギー性鼻炎モデルマウスを作成し、PC による経鼻免疫がその発症に及ぼす影響を検討した。その結果、OVA 感作前に PC で経鼻免疫した群では PC 経鼻免疫を行わなかった群と比較して、アレルギー性鼻炎の症状、OVA 特異的 IgE、鼻粘膜組織の浮腫や好酸球浸潤が有意に抑制され、脾臓 CD4<sup>+</sup> T 細胞の IL-4 産生が低下した。また、OVA 感作後に PC 経鼻免疫を行った群でも、PC の投与によって OVA 特異的 IgE の産生およびアレルギー性鼻炎の症状が抑制された。以上の結果から、PC 経鼻ワクチンによって、その後のアレルゲン暴露による感作さらにアレルゲン感作後のアレルギー性鼻炎の発症を制御できることが示された。

### はじめに

アレルギー疾患の発症には遺伝的要因に加えて環境要因も重要な因子であり、家庭内での上気道感染によってアレルギー疾患の発症が抑えられることや、乳幼児期の上気道感染の回数がその後のアレルギー感作に逆相関することなどが報告されている。このように生活水準の向上によって衛生環境が改善したことで逆にアレルギー疾患が増えるという概念は、「衛生仮説」と呼ばれている<sup>1,2)</sup>。また、肺炎球菌ワクチンの接種によって喘息発作の頻度や喘息関連の症状に伴う入院のリスクが減少することが知られ<sup>3,4)</sup>、実験的にも、肺炎球菌ワクチンをマウスの気管内もしくは鼻腔に投与すると喘息が抑制されることが報告されている<sup>5,6)</sup>。アレルギー性鼻炎についても、肺炎球菌ワクチンの経鼻投与によってアレルゲン特異的 IgE の産生が抑制され、アレルギー性鼻炎症状が軽減されること、さらに、アレルゲン感作後に肺炎球菌ワクチンを投与してもアレルギー性鼻炎の発症が抑えられることが報告されている<sup>7,8)</sup>。

肺炎球菌は様々な抗原を含み、その細胞壁の構成成分であるホスホリルコリン (PC) もそのひとつであり、肺炎球菌以外の多くの細菌にも含まれ、病原性に関与することが知られている<sup>9)</sup>。そこで我々は、PC を上気道感染症に対するワクチンとして応用することの可能性を探るため、マウスに PC を粘膜アジュバントであるコレラトキシン (CT) とともに経鼻投与したところ、PC 特異的な粘膜および全身免疫応答が誘導され、PC の経鼻ワクチンとしての有用性が示された<sup>10)</sup>。また同時に、PC を経鼻投与することで、CT

によって亢進する総 IgE の産生が抑制されたことから、PC 経鼻ワクチンが感染症のみならずアレルギー性炎症も制御できることが示唆された。

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) を用いてアレルギー性鼻炎モデルを作成した。そして、OVA 感作前および OVA 感作後に PC 経鼻免疫を行い、そ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。

## 材料と方法

### 〈OVA 感作前 PC 経鼻免疫によるアレルギー性鼻炎の抑制〉

#### ① アレルギー性鼻炎モデルの作成と PC 経鼻免疫の方法

PC は非水溶性であるため、Keyhole limpet hemocyanin (KLH) が結合した水溶性の PC-KLH を用いた。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 (Intranasal : IN) 後 OVA 感作群 (PC-KLH+OVA 群)、PBS (Phosphate buffered saline) IN 後 OVA 感作群 (PBS+OVA 群)、PBS IN 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。(図1) PC-KLH もしくは PBS の経鼻投与は1週ごとに3回、OVA 腹腔内投与による全身感作も1週ごとに3回行った。

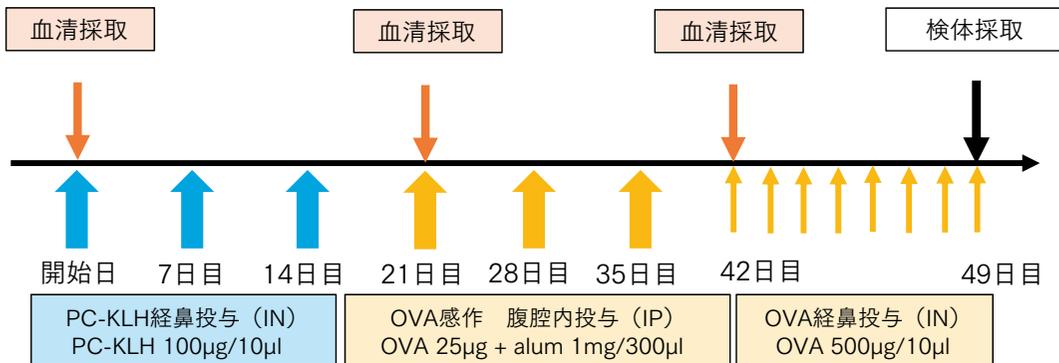


図1：実験のプロトコール (OVA 感作前 PC 経鼻免疫)

#### 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 も同様に採取し、単核球を分離した

のちに  $CD4^+$  T 細胞を精製し、これを抗原提示細胞、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。

### 〈OVA 感作後 PC 経鼻免疫によるアレルギー性鼻炎の抑制〉

#### ③ OVA 感作後 PC 経鼻免疫の方法

PC 経鼻免疫による OVA 感作後のアレルギー性鼻炎発症に対する抑制効果を検討するため、OVA で全身感作したのちに PC-KLH で経鼻免疫を行った (OVA+PC-KLH 群)。そして、そのアレルギー性鼻炎症状および血清中 IgE 値を、OVA 全身感作後に PC-KLH の代わりに PBS を投与した群 (OVA+PBS 群)、OVA 全身感作を行わず PBS を経鼻投与した群 (対照) と比較した。(図 2)

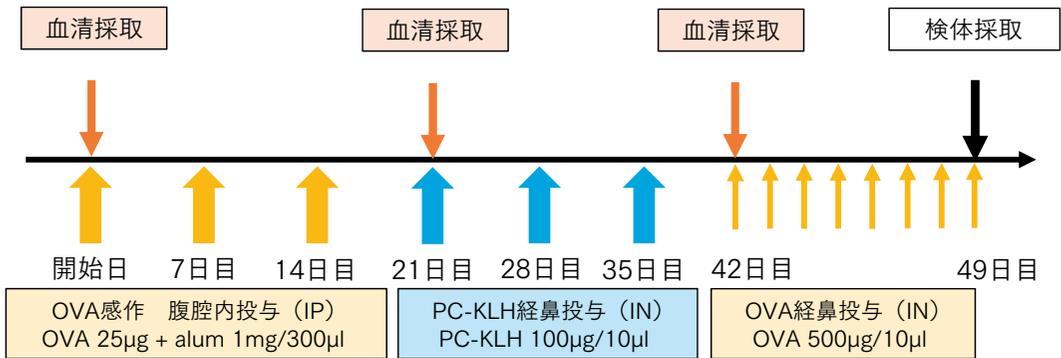


図 2 : 実験のプロトコール (OVA 感作後 PC 経鼻免疫)

#### ④ アレルギー性鼻炎症状の評価と血清中 OVA 特異的 IgE 値の測定

PC-KLH もしくは PBS 経鼻投与後 7 日目 (42 日目) から、先の実験と同様に 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 OVA 特異的 IgE 値を 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 分間のアレルギー症状を観察したところ、鼻かきおよびくしゃみの回数は、いずれも PC-KLH+OVA 群で PBS+OVA 群と比較して有意に減少した。しかし、対照と比較すると有意に高かった。(図 3)

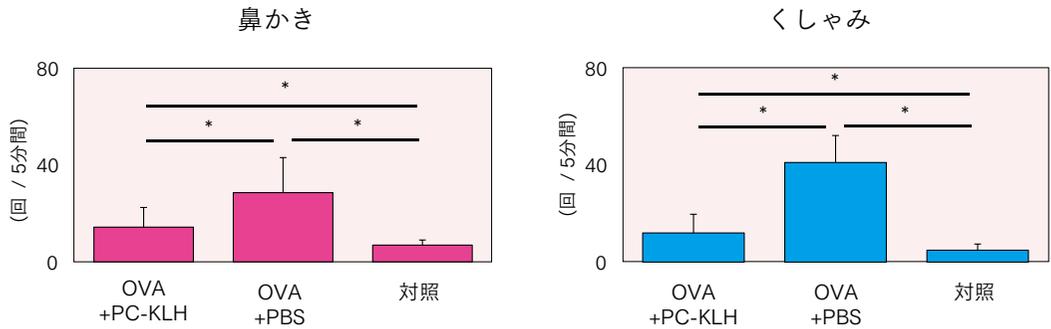


図3：OVA 経鼻投与後のアレルギー性鼻炎症状（OVA 感作前 PC 経鼻免疫）

49日目のOVA 経鼻投与後5分間に観察された鼻かきおよびくしゃみの回数は、いずれもPC-KLH+OVA 群のほうがPBS+OVA 群と比較して有意に減少した。\* $p<0.05$

## 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。しかし、PC-KLH+OVA 群では、対照より有意に高いものの、PBS+OVA 群と比較して有意に低値であった。（図4）

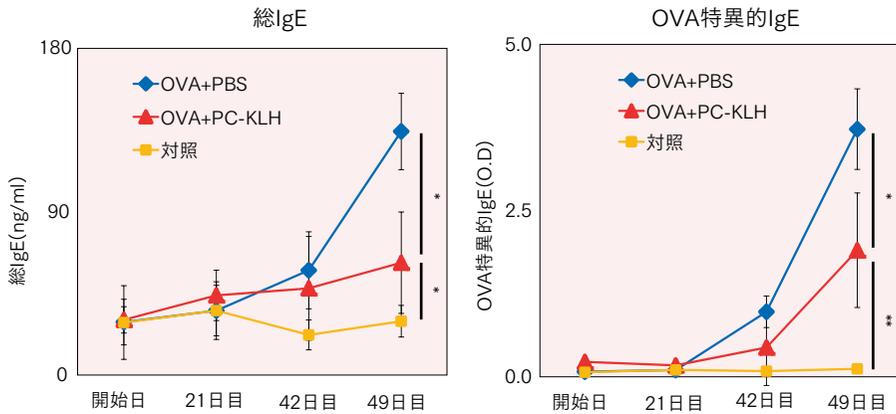


図4：血清総 IgE および OVA 特異的 IgE 値（OVA 感作前 PC 経鼻免疫）

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 経鼻投与後に上昇した。しかし、PC-KLH+OVA 群では、対照より高いものの、PBS+OVA 群と比較して有意に低値であった。\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$

### ③ 鼻粘膜組織中の好酸球浸潤と鼻粘膜の肥厚

鼻粘膜組織中の好酸球浸潤の評価は、すべて鼻中隔軟骨と骨の接合部の組織像を観察を行った。その結果、組織中の好酸球数はPC-KLH+OVA群のほうがPBS+OVA群より有意に少なく、対照と同程度であった。鼻粘膜の厚さは、鼻中隔軟骨と上顎骨の鼻隆起の間の距離を計測し比較した。その結果、鼻粘膜の厚さもPC-KLH+OVA群のほうがPBA+OVA群より低値であり、対照と同程度であった。(図5)

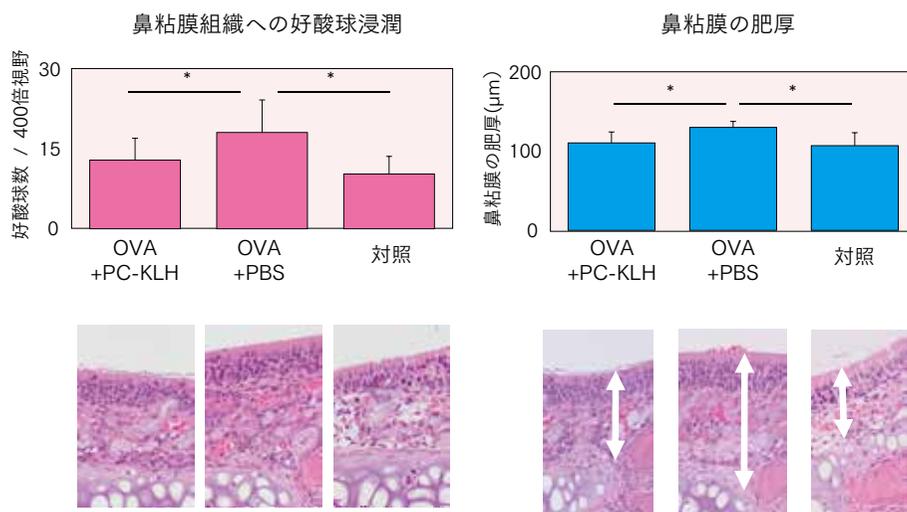


図5：鼻粘膜組織中の好酸球浸潤と鼻粘膜の肥厚

鼻粘膜組織中の好酸球数はPC-KLH+OVA群のほうが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群のほうがPBS+OVA群より低値であり、対照と同程度であった。\* $p < 0.05$

### ④ CD4<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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。(図6) なお、IFN- $\gamma$ の産生は、いずれの群でも認められなかった。

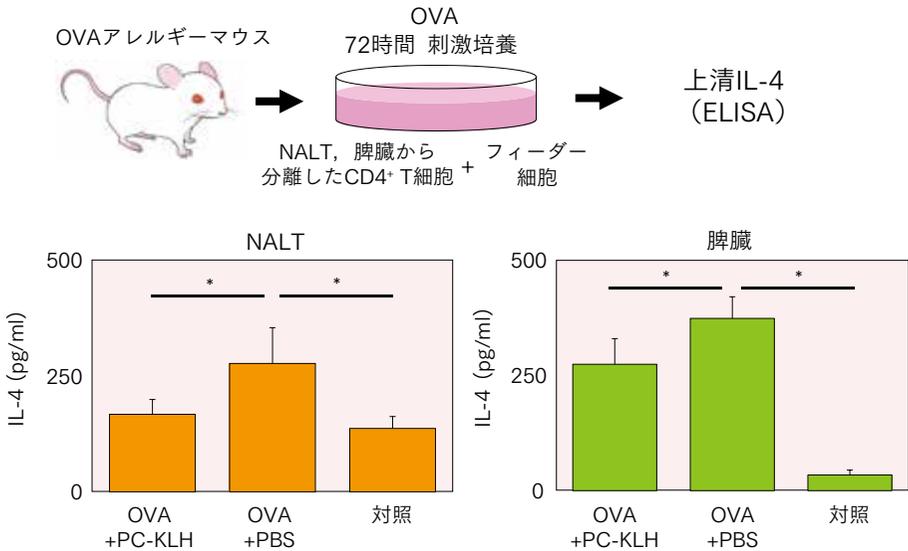


図6：CD4<sup>+</sup>T細胞によるL-4の産生

NALT および脾臓から分離された CD4<sup>+</sup>T 細胞による IL-4 産生は、PC-KLH+OVA 群が PBS+OVA 群と比較して有意に低値であった。\*p<0.05

⑤ LPS 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<sup>+</sup> 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。しかし、その産生量は LPS 刺激の方が多く、PC 刺激と比較してすべての濃度で有意に高値であった。(図7)

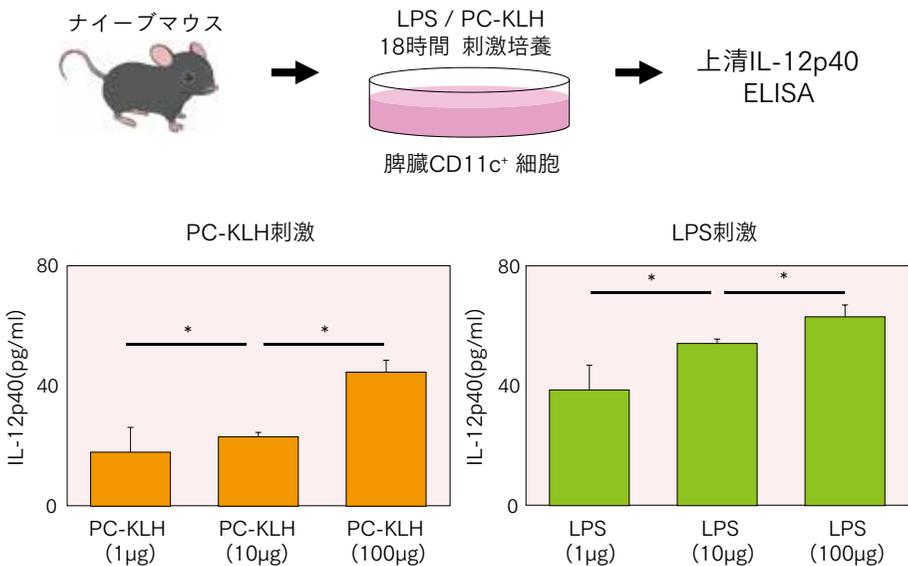


図7：LPS および PC-KLH 刺激による脾臓 DC からの IL-12p40 産生

LPS および PC-KLH 刺激によって、DC からの IL-12p40 産生は用量依存性に増加した。\*p<0.05

## ⑥ OVA 感作後 PC 経鼻免疫によるアレルギー性鼻炎症状と OVA 特異的 IgE の抑制

OVA 感作後の PC 経鼻免疫でもアレルギー性鼻炎症状が抑制され、OVA+PC-KLH 群では OVA+PBS 群と比較して、有意に鼻かきおよびくしゃみの回数が少なかった。また、対照と OVA+PC-KLH 群とを比較すると、鼻かきの回数には有意差はなかったが、くしゃみの回数は OVA+PC-KLH 群のほうが有意に多かった。

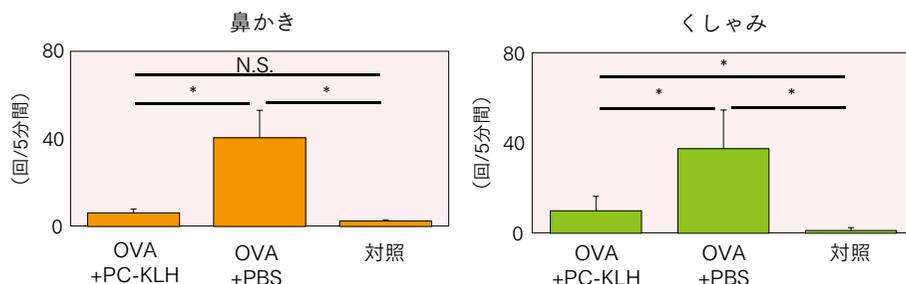


図8：OVA 経鼻投与後のアレルギー性鼻炎症状（OVA 感作後 PC 経鼻免疫）

OVA 感作前 PC 経鼻免疫と同様に、OVA 経鼻投与後に観察された鼻かきおよびくしゃみの回数は、いずれも OVA+PC-KLH 群が OVA+PBS 群と比較して有意に少なかった。\* $p<0.05$ , N.S.: not significant

血清中 OVA 特異的 IgE 値も、OVA 感作前 PC 経鼻免疫と同様に、OVA 全身感作後の上昇は軽微で、OVA 経鼻投与後に OVA+PBS 群そして OVA+PC-KLH 群においても著しく上昇した。しかし、OVA+PC-KLH 群の OVA 特異的 IgE 値は、対照より有意に高いものの、OVA+PBS 群と比較して有意に低値であった。（図9）

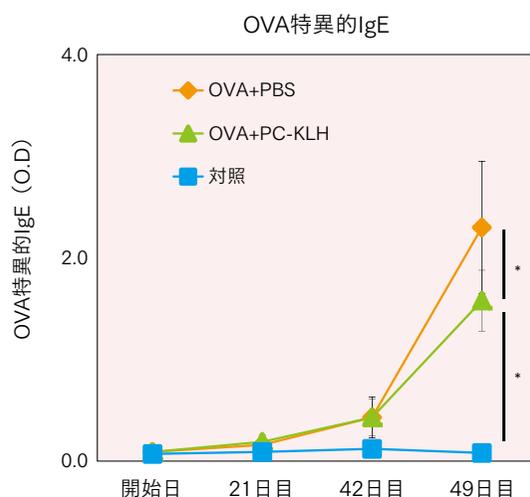


図9：血清 OVA 特異的 IgE 値（OVA 感作後 PC 経鼻免疫）

血清 OVA 特異的 IgE 値は、OVA 経鼻投与後に、OVA+PBS 群そして OVA+PC-KLH 群で著しく上昇した。しかし、OVA+PC-KLH 群では、対照より有意に高いが、OVA+PBS 群と比較すると有意に低値であった。\* $p<0.05$

## 考 察

本研究では、OVAによるアレルギー性鼻炎モデルマウスを作成し、OVA全身感作前にPCで経鼻免疫を行い、PC非投与群とで比較した。その結果、PC前投与によって有意にアレルギー性鼻炎症状が抑制され、鼻粘膜中の好酸球浸潤や鼻粘膜肥厚の程度、血清総IgE値およびOVA特異的IgE値の上昇も軽度であった。また、OVA全身投与後にPC経鼻免疫を行い、その後にOVAを経鼻投与してアレルギー性鼻炎を発症させた場合も同様に、アレルギー性鼻炎症状とOVA特異的IgEの産生が有意に抑制された。これらの所見は、ダニ抗原によるアレルギー性鼻炎モデルに対して肺炎球菌ワクチンを投与した場合にも認められ<sup>7)</sup>、PCが細菌の細胞壁の構成成分であること、先に報告した我々の研究で、PCがCTによって誘導されるIgE産生を抑制したことから<sup>10)</sup>、十分に予測できる結果である。

鼻症状ならびに鼻粘膜肥厚の抑制は、様々な炎症性サイトカインや化学伝達物質を遊離する好酸球の鼻粘膜への浸潤が抑えられたことによると思われる。しかし、PC前投与群で好酸球浸潤が少なかった正確な機序については不明である。PC経鼻免疫によって鼻粘膜における好酸球浸潤に関与するIL-5などのサイトカイン産生が抑えられたこと、あるいはPCが好酸球浸潤や血管透過性を亢進する作用を有する血小板活性化因子(PAF)の受容体(PAF-R)のリガンドであることから<sup>9)</sup>、PCが鼻粘膜のPAF-Rに直接作用したことなどが推測される。

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<sup>11)</sup>。そこで、NALTから分離されたCD4<sup>+</sup>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<sup>+</sup>T細胞からのIL-4産生もPC前投与群で抑制されたが、有意差はないものの、対照と比較して高値であった。したがって、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なことを支持する結果と考えられる。

IL-4産生の抑制はTh1型免疫応答が増強することで生じるが、本研究ではPC前投与群そしてPC非投与群においてもTh1サイトカインであるIFN- $\gamma$ は検出されなかった。PCをCTとともに経鼻投与した際もCD4<sup>+</sup>T細胞からのIFN- $\gamma$ の産生はごくわずかであり<sup>10)</sup>、今回の実験ではCTを投与しなかったためさらにその産生量が少なく、測定できなかった可能性がある。しかし、肺炎球菌ワクチンを投与した実験においてもIFN- $\gamma$ の有意な産生は認められておらず<sup>7)</sup>、本研究におけるIL-4産生の抑制にIFN- $\gamma$ の関与は少ないと思われる。IL-4産生抑制のその他の機序として、本研究では検討していないが、制御性T細胞(Treg)の関与も考えられる。その証左として、肺炎球菌ワクチンの経鼻投与によって脾臓においてTregが有意に増加し、IL-4と同じくTh2サイトカインであるIL-13の鼻腔洗浄液中の濃度が低下したことが報告されている<sup>7)</sup>。

DCはこのTregそしてTh1型免疫応答の誘導に重要な役割を担う細胞であることから、本研究では脾臓からDCを分離し、PCおよびLPS刺激時のTh1サイトカインであるIL-

IL-12p40の産生を観察した。その結果、DCからのIL-12p40の産生がPCそしてLPSの刺激によって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<sup>12)</sup>、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る。しかし、ES-62刺激ではTh2型免疫応答が誘導されIL-12の産生は軽度であることから<sup>13)</sup>、PCはその結合する蛋白成分によって免疫原性が変化し、異なる免疫応答を誘導するのかもしれない。したがって、今回の実験で観察されたCD4<sup>+</sup>T細胞からのIL-4産生の抑制や、DCからのIL-12p40産生の増加は、PC-KLHに特異的な免疫応答であると考えられる。

### 結語

アレルゲン感作前のPC経鼻免疫はアレルゲンによる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そしてアレルギー性鼻炎症状の発症を抑制した。このPC経鼻免疫によるアレルギー性鼻炎の抑制効果は、アレルゲンによる全身感作後のPC経鼻免疫でも同様に認められた。(図10) これらの結果から、PC経鼻ワクチンは、上気道細菌感染症の予防に加えて、アレルギー性鼻炎の感作そして感作後の発症の制御にも有効なことが示唆された。

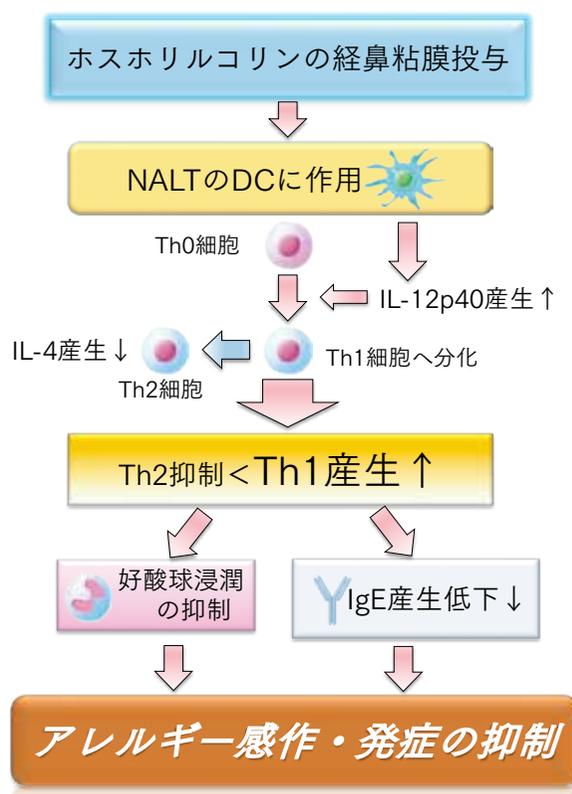


図10：PC経鼻投与によるアレルギー性鼻炎の抑制

## 参考文献

- 1) Strachan DP: Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 1989;299:1259-1260.
- 2) Illi S, von Mutius E, Lau S, et al: Early childhood infectious diseases and the development of asthma up to school age: a birth cohort study. *BMJ* 2001;322:390-395
- 3) Schuller DE. Adverse effects of brompheniramine on pulmonary function in a subset of asthmatic children. *J Allergy Clin Immunol.* 1983;72:175-179.
- 4) Ansaldi F, Turello V, Lai P, Bastone G, De Luca S, Rosselli R, et al. Effectiveness of a 23-valent polysaccharide vaccine in preventing pneumonia and non-invasive pneumococcal infection in elderly people: a large-scale retrospective cohort study. *J Int Med Res.* 2005;33:490-500.
- 5) Preston JA, Essilfie AT, Horvat JC, Wade MA, Beagley KW, Gibson PG, et al. Inhibition of allergic airways disease by immunomodulatory therapy with whole killed *Streptococcus pneumoniae*. *Vaccine.* 2007 Nov 23;25:8154-8162.
- 6) Thorburn AN, O'Sullivan BJ, Thomas R, Kumar RK, Foster PS, Gibson PG, et al. Pneumococcal conjugate vaccine-induced regulatory T cells suppress the development of allergic airways disease. *Thorax* 2010;65:1053-1060.
- 7) Kim BY, Shin JH, Park HR, Kim SW, Kim SW. Comparison of antiallergic effects of pneumococcal conjugate vaccine and pneumococcal polysaccharide vaccine in a murine model of allergic rhinitis. *Laryngoscope* 2013;123:2371-2377.
- 8) Shin JH, Kim BY, Park HR, Kim SW, Kim SW. The effect of pneumococcal polysaccharide vaccine in a mouse model of allergic rhinitis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2013;148:383-390.
- 9) Cundell DR, Gerard NP, Gerard C, et al. *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature* 1995;377:435-438.
- 10) Tanaka N, Fukuyama S, Fukuiwa T, et al. Intranasal immunization with phosphorylcholine induces antigen specific mucosal and systemic immune responses in mice. *Vaccine* 2007;25:2680-2687
- 11) Kim DY, Fukuyama S, Nagatake T, et al. Implications of nasopharynx-associated lymphoid tissue (NALT) in the development of allergic responses in an allergic rhinitis mouse model. *Allergy* 2012;67:502-509.
- 12) Goodridge HS, Marshall FA, Else KJ, et al. Immunomodulation via novel use of TLR4 by the filarial nematode phosphorylcholine-containing secreted product, ES-62. *J Immunol* 2005;174:284-293.
- 13) Goodridge HS, McGuinness S, Houston KM, et al. Phosphorylcholine mimics the effects of ES-62 on macrophages and dendritic cells. *Parasite Immunol* 2007;29:127-137.

### 〈Summary〉

ホスホリルコリン (PC) による舌下免疫がアレルギー性鼻炎の発症に与える影響を明らかにするため、マウスに PC を舌下投与したのちに卵白アルブミン (OVA) で感作し、OVA 経鼻刺激によって誘発されるアレルギー性鼻炎の症状および IgE 産生を観察した。その結果、PC 舌下免疫によってアレルギー性鼻炎症状そして OVA 特異的 IgE 産生が有意に抑制された。また、頸部リンパ節ならびに脾臓から分離した CD4<sup>+</sup> T 細胞からの TGF- $\beta$ 1 の産生が有意に亢進していた。これらの結果から、PC 舌下免疫は PC 経鼻免疫と同様にアレルギー性鼻炎の発症を抑制すること、しかしその作用機序は両者で異なることが示唆された。

### はじめに

抗原の経鼻投与は粘膜および全身免疫応答を誘導することが知られており、すべての細菌の細胞壁の構成成分であるホスホリルコリン (PC) に対しても、これを粘膜アジュバントとして知られるコレラトキシン (CT) とともに経鼻投与すると PC 特異的粘膜および全身免疫応答が誘導された<sup>1,2)</sup>。また、興味深いことに、PC を CT とともに投与した群では CT 単独投与群よりも血清総 IgE が低値であり、PC の経鼻投与が IgE 産生を抑制することが示唆された<sup>1,2)</sup>。そこで、PC 経鼻免疫のアレルギー性鼻炎発症に及ぼす影響を卵白アルブミン (OVA) で感作したモデルマウスで検討したところ、アレルギー性鼻炎症状と OVA 特異的 IgE の産生が有意に抑制された<sup>3)</sup>。

舌下免疫も経鼻免疫と同様に粘膜および全身免疫応答を誘導することができ、PC を舌下投与した場合も PC 経鼻投与と同等の免疫応答が観察された<sup>1)</sup>。血清 IgE の値も両者で差はみられなかったが、CT の単独投与群で検討すると、舌下免疫群のほうが経鼻免疫群と比較して有意に血清総 IgE が低値であった<sup>1)</sup>。また、PC を単独で舌下投与しても PC 特異的免疫応答が誘導され、血清総 IgE の上昇はみられなかった (第 IV 章 2)。したがって、PC の舌下投与によっても I 型アレルギー性炎症の発症を制御することが可能で、その効果は PC 経鼻投与より優れるかもしれない。

そこで、PC 舌下免疫が PC 経鼻免疫と同様にアレルギー性鼻炎の発症を抑制できるか、また、その作用機序が両者で異なるのかを明らかにするため、OVA 感作によるアレルギー性鼻炎モデルマウスを用いて検討した。

## 材料と方法

## ① PC 舌下免疫とアレルギー性鼻炎モデルの作成

6週齢雌性 BALB/c マウスを PC と CT で舌下免疫する群 (PC+CT 群)、PC を単独投与する群 (PC 群)、PBS を投与する群 (対照群) の3群に分け、抗原を1週ごとに3回舌下投与し、その1週後に OVA で全身感作し、さらに OVA で経鼻刺激し、アレルギー性鼻炎を発症させた。(図1)

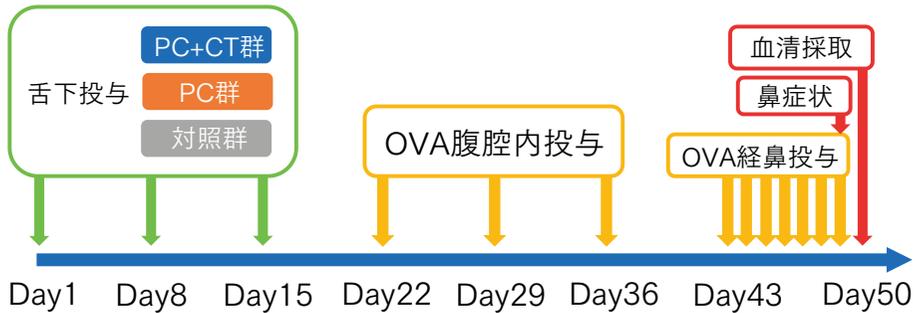


図1：PC 舌下免疫およびアレルギー性鼻炎モデルの作成方法

## ② アレルギー性鼻炎症状の評価と免疫学的観察

OVA 経鼻刺激後のそれぞれの群の鼻症状 (くしゃみ、鼻かきの回数) を比較し、血清中の総 IgE および OVA 特異的 IgE 値を ELISA 法で測定した。

## ③ PC 舌下免疫による頸部リンパ節および脾臓におけるサイトカイン産生

PC 舌下投与による免疫応答を明らかにするため、舌下免疫終了1週後に頸部リンパ節および脾臓から CD4<sup>+</sup> T 細胞を分離し、PC にウシ血清アルブミン (BSA) 結合させた PC-BSA および抗原提示細胞とともに72時間培養し、培養上清中の IFN- $\gamma$ 、IL-4、TGF- $\beta$ 1 を ELISA 法で測定した。(図2)

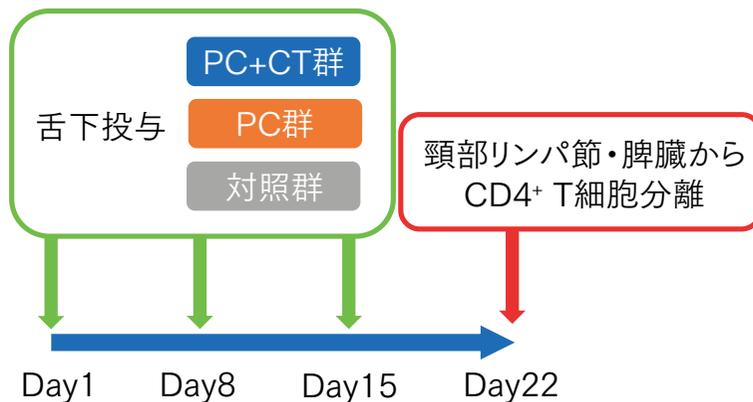


図2：PC 舌下投与による免疫応答の観察

## 結果

## ① PC 舌下免疫によるアレルギー性鼻炎症状の抑制

アレルギー性鼻炎の鼻症状（くしゃみ、鼻かき）は、PC+CT 群および PC 群において、対照群と比較して有意に抑制された。（図3）

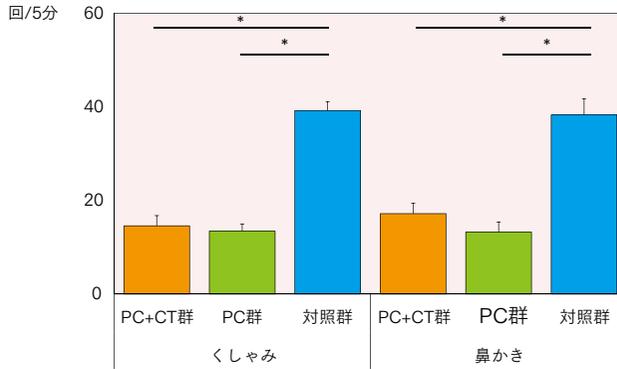


図3：アレルギー性鼻炎症状（くしゃみ、鼻かき）の比較

くしゃみ、鼻かきの回数はともに対照群と比較して PC+CT 群および PC 群で有意に少なかった。  
\* $p < 0.05$ .

## ② OVA 特異的 IgE 産生

血清中の OVA 特異的 IgE は、PC+CT 群および PC 群で対照群と比較して有意に低値であった。（図4）

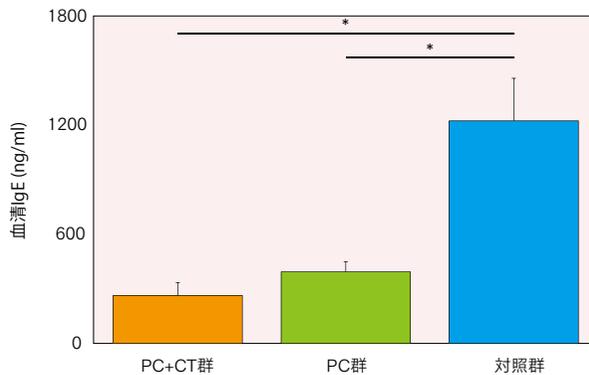


図4：OVA 特異的 IgE の比較

血清 OVA 特異的 IgE は、PC 舌下投与によって有意に低下した。\* $p < 0.05$ .

## ③ PC 刺激によるサイトカイン産生

頸部リンパ節  $CD4^+$  T 細胞の培養上清中の  $IFN-\gamma$  は、PC+CT 群と PC 群で対照群と比較して有意に高値を示した。しかし、脾臓においては3群間で差はみられなかった。（図5）  
IL-4の産生も頸部リンパ節では PC+CT 群と PC 群で有意に上昇し、脾臓では PC+CT 群

と PC 群で有意に低下した。(図6) 一方、TGF- $\beta$ 1 は、頸部リンパ節および脾臓の両者で PC+CT 群と PC 群で対照群と比較して有意にその産生が上昇した。(図7)

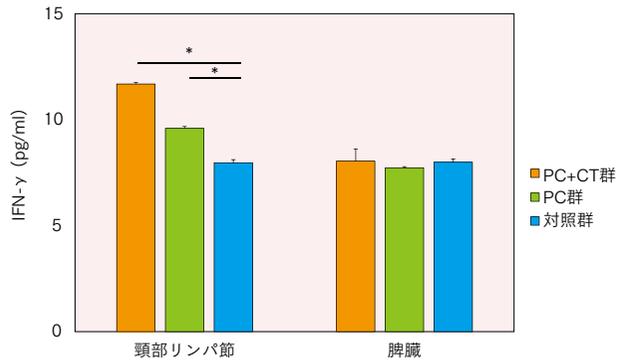


図5：PC刺激によるIFN- $\gamma$ の産生

頸部リンパ節ではPC+CT群とPC群でIFN- $\gamma$ の産生が有意に上昇したが、脾臓では3群間で差がみられなかった。\* $p$ <0.05.

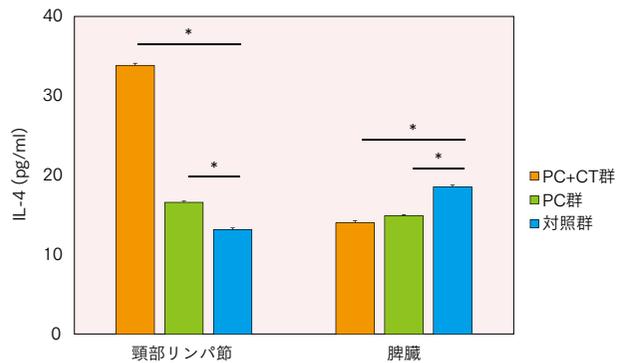


図6：PC刺激によるIL-4の産生

頸部リンパ節ではPC+CT群とPC群でIL-4の産生が有意に上昇したが、脾臓ではPC+CT群とPC群で有意に低下した。\* $p$ <0.05.

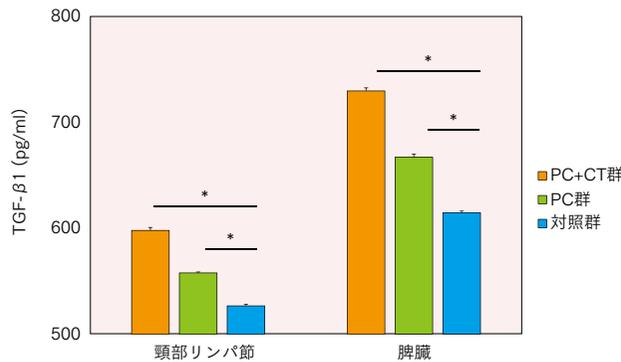


図7：PC刺激によるTGF- $\beta$ 1の産生

頸部リンパ節および脾臓においてPC+CT群とPC群でTGF- $\beta$ 1の産生が有意に上昇した。\* $p$ <0.05.

## 考 察

本研究によって、PCの舌下投与でもPC経鼻投与と同様に、OVA全身感作と経鼻刺激によってもたらされるアレルギー性鼻炎症状およびOVA特異的IgEの産生が抑えられることが示された。PC経鼻免疫によるIgE産生抑制の機序として、PCが樹状細胞からのIL-12p40産生を増加させ、これが鼻咽腔関連リンパ組織（NALT）および脾臓のCD4<sup>+</sup>T細胞からのIL-4産生を抑制するためと説明されている<sup>5)</sup>。舌下免疫における粘膜および全身免疫応答の誘導には、口腔底近くにNALTなどの粘膜関連リンパ組織（MALT）が存在しないため、頸部リンパ節が誘導組織として働くと考えられている。その証左として、口腔底粘膜に存在する樹状細胞は舌下投与された抗原を分解処理し抗原提示細胞へと変化し、頸部リンパ節に遊走し抗原特異的CD4<sup>+</sup>T細胞を活性化することが報告されている<sup>6)</sup>。また、アレルゲンの経鼻感作によってアレルギー性鼻炎モデルマウスを作成した実験では、経鼻感作後に頸部リンパ節にTh2型細胞が集積し、B細胞がIgE産生形質細胞となりアレルゲン特異的IgEを産生することが証明されている<sup>7)</sup>。したがって、PC舌下投与によるアレルギー性鼻炎の発症やIgE産生の制御には頸部リンパ節における免疫応答が関与していることが推測され、頸部リンパ節および脾臓におけるCD4<sup>+</sup>T細胞のPC刺激による各種サイトカインの産生を検討した。

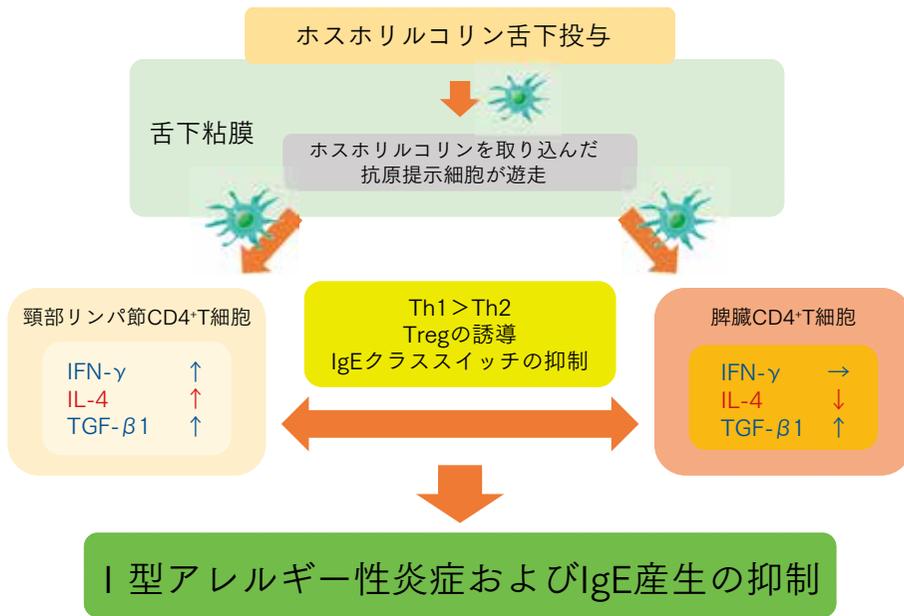
その結果、PC+CT群、PC群ではともに頸部リンパ節から分離されたCD4<sup>+</sup>T細胞のIFN- $\gamma$ とIL-4産生が亢進し、その濃度は対照群よりも有意に高く、PC+CT群のほうがPC群よりも高値であった。OVA感作前にPC経鼻免疫を行った実験では<sup>3)</sup>、NALTのCD4<sup>+</sup>T細胞からのIFN- $\gamma$ 産生は認められず、IL-4の産生は対照群と比較してPC経鼻投与群で有意に低値であり、今回の頸部リンパ節CD4<sup>+</sup>T細胞の反応とは大きく異なる。しかし、脾臓から分離したCD4<sup>+</sup>T細胞からのIL-4の産生は、PC+CT群、PC群ともに対照群よりも低下しており、PC経鼻免疫と同様の結果が示された。先に述べたごとくアレルゲンを経鼻投与すると頸部リンパ節でIgEの産生が生じることから、PCを舌下投与した場合においても頸部リンパ節でIL-4の産生が誘導され、PC+CT群ではTh2型免疫応答を誘導するCTによってその産生がさらに増強したと考えられる。その一方で、PCの舌下投与によって頸部リンパ節におけるTh1型サイトカインであるIFN- $\gamma$ の産生が亢進し、これがOVA特異的IgEの産生を抑制したと推測される。IgE産生には全身免疫も関与しており、脾臓CD4<sup>+</sup>T細胞からのIL-4産生がPC+CT群とPC群で対照群よりも少なかったことも、PC経鼻免疫と同じくPC舌下免疫におけるIgE産生の抑制に作用したと思われる。

TGF- $\beta$ 1は制御性T細胞を誘導するサイトカインとして知られているが、B細胞の分化に関与するIdタンパク質の一種であるId2の発現を亢進し、これがIgE産生細胞へのクラススイッチを抑制することも報告されている<sup>8)</sup>。そこで、頸部リンパ節および脾臓のCD4<sup>+</sup>T細胞におけるTGF- $\beta$ 1の産生を測定したところ、PC+CT群そしてPC群では対照群と比較して有意にその産生が低下していた。すなわちPCの舌下投与は頸部リンパ節においてIFN- $\gamma$ の産生を増強することでTh1型の免疫応答をもたらすのみならず、TGF- $\beta$ 1の産生を亢進することで制御性T細胞を誘導し、さらにIgE産生細胞へのクラススイッ

チを制御して、IgE の産生そして I 型アレルギー反応を抑制することが示唆される。しかし、その詳細な機序は不明であり、今後の検討課題と考える。

### 結 語

PC 舌下免疫は頸部リンパ節および脾臓の CD4<sup>+</sup> T 細胞からのサイトカイン産生を制御し、IgE 産生ならびにアレルギー性鼻炎の発症を抑制する。



## 参考文献

- 1) Tanaka N, Fukuyama S, Fukuiwa T, et al. Intranasal immunization with phosphorylcholine induces antigen specific mucosal and systemic immune responses in mice. *Vaccine* 2007;25:2680–2687.
- 2) Maseda Y, Ohori J, Tanaka N, et al. Mucosal and systemic immune response to sublingual or intranasal immunization with phosphorylcholine. *Auris Nasus Larynx*. 2017;45:273–280.
- 3) Miyashita K, Ohori J, Nagano H, et al. Intranasal immunization with phosphorylcholine suppresses allergic rhinitis in mice. *Laryngoscope* 2017; in press.
- 4) Kim BY, Shin JH, Park HR, et al. Comparison of antiallergic effects of pneumococcal conjugate vaccine and pneumococcal polysaccharide vaccine in a murine model of allergic rhinitis. *Laryngoscope* 2013;123:2371–2377.
- 5) Thorburn AN, O' Sullivan BJ, Thomas R, et al. Pneumococcal conjugate vaccine-induced regulatory T cells suppress the development of allergic airways disease. *Thorax* 2010;65:1053–1060.
- 6) Song JH, Kim JI, Kwon HJ, et al. CCR7-CCL19/CCL21-regulated dendritic cells are responsible for effectiveness of sublingual vaccination. *J Immunol* 2009;182:6851–6860.
- 7) Kato Y, Akasaki S, Muto-Haenuki Y, et al. Nasal sensitization with ragweed pollen induces local-allergic-rhinitis-like symptoms in mice. *PLoS One* 2014;9:e103540.
- 8) Sugai M, Gonda H, Kusunoki T, et al. Essential role of Id2 in negative regulation of IgE class switching. *Nat Immunol* 2003;4:25–30.



## 第 VII 章

# ホスホリルコリンと その重合体(リピジュア)による 感染制御

## VII-1 ホスホリルコリン(PC)による細菌感染の制御

### VII

### 1) PCによる細菌接着・侵入の阻止

#### 〈Summary〉

ホスホリルコリン(PC)はすべてのグラム陽性および陰性菌の細胞膜の構成成分であり、血小板活性化因子受容体(PAF-R)を介して細菌の上皮細胞への接着や細胞内侵入に関与する。また、細菌のPCの発現は肺炎球菌(Spn)、無莢膜インフルエンザ菌(NTHi)の病原性と相関することから、PCをターゲットとするワクチンは菌種に関わらず広範囲のこれらの高病原性細菌に対して有効と考えられる。しかし、SpnおよびNTHiの上皮細胞への接着や細胞内侵入におけるPCとPAF-Rの役割やPCワクチンによるその抑制効果については未だ明確にされていない。そこで、SpnおよびNTHiの上皮細胞への接着および細胞内侵入におけるPCとPAF-Rの役割、そしてPCをターゲットにしたワクチン療法の有効性を明確にするため本研究を行った。その結果、SpnとNTHiのPC発現は菌株で異なり、PCの発現が高い細菌では、PCの抗PC-IgA(TEPC-15)での処理、上皮細胞に発現するPAF-RのPAF-R拮抗薬(ABT-491)あるいはPC-KLHによる処理で、細菌の上皮細胞への接着さらに細胞内侵入が有意に抑制された。これらの結果から、PCをターゲットとしたワクチンは高病原性のSpnおよびNTHiによる感染症の予防に有効で、低病原性細菌いわゆる常在細菌叢には影響が少なく、安全性の高いワクチンであると考えられた。さらにPC自体にもSpnやNTHiの接着を直接阻止する作用があることから、PCが粘膜免疫応答を誘導するだけでなく、直接PAF-Rと結合して細菌感染を予防する二重の作用を有することが示唆された。

#### はじめに

ホスホリルコリン(PC)はすべてのグラム陽性菌および陰性菌に発現し、肺炎球菌(Spn)や無莢膜インフルエンザ菌(NTHi)の病原性と相関することが知られている<sup>1,2)</sup>。そこで、我々は、PCを粘膜ワクチンとして応用することの可能性を探るため、マウスに経鼻、舌下、さらに経皮投与し、その免疫応答を検討した。その結果、PCが免疫原性をもち、SpnやNTHiによる多くの感染症に有効な広域スペクトラムを持つワクチンとして期待できることを明らかにした<sup>3-5)</sup>。しかし、PCが病原菌以外の細菌にも発現していることから、PC粘膜ワクチンの投与によって上気道の常在菌叢の恒常性が乱され、それが易感染性を招くなどの副作用を起こすことが懸念される。

上気道細菌感染の発症には、まず細菌が上皮細胞に接着し侵入することが重要であり、PC 粘膜ワクチンは分泌型 IgA を産生することで、細菌接着を阻害する。また、Spn および NTHi の上皮細胞への接着は、細菌表面上に発現する PC と宿主粘膜細胞表面上の血小板活性化因子受容体 (PAF-R) との結合によって成立することが報告されている<sup>6,7)</sup>。したがって、PC 特異的抗体で PC の作用を阻止するだけでなく、PAF-R 拮抗薬や PC によって細胞表面の PAF-R の活性を抑制することで細菌の上皮細胞への接着を防ぐことができるかもしれない。また、PC や PAF-R の発現強度がこれら細菌の接着に関与すると推測される。

そこで、PC の発現が異なる Spn および NTHi の菌株そして培養咽頭上皮細胞を抗 PC-IgA、PAF-R 拮抗薬、ならびに PC で処理して細菌接着におけるその抑制効果を観察し、細菌接着および侵入における PC の役割、さらには PC ワクチンの効果と安全性について検討した。

## 材料および方法

### ① 細菌と培養細胞

Spn は和歌山県立医科大学の保富先生から提供していただいた5菌株 (BG7322, EF3030, TigR4, D39, L82016) と滲出性中耳炎患者の上咽頭由来の1菌株<sup>8)</sup>、NTHi は滲出性中耳炎患者の上咽頭由来の6菌株<sup>8)</sup>を使用した。血液寒天培地とチョコレート寒天培地で37°C、5% CO<sub>2</sub>下で一晩培養した Spn と NTHi を 0.5% BSA-PBS で洗浄後使用した。細菌数は吸光度計で調整した。

細菌を接着させる上皮細胞として、ヒト咽頭癌由来の Detroit 562 cells (ATCC CCL-138; American Type Culture Collection, Manassas, VA) を 96 穴マイクロプレートに播き、コンフルエントに培養したものを使用した。

### ② 細菌表面の PC の発現

Spn と NTHi をそれぞれ血液寒天培地、チョコレート培地で37°C、5% CO<sub>2</sub>下で一晩培養し、これとマウス抗 PC-IgA (TEPC-15: 1μg/ml) を4°C、1時間反応させ、洗浄後、FITC 標識抗マウス抗体で処理し、それぞれの細菌表面に発現する PC を FACS (CytoFLEX BECKMAN COULTER) で定量した。

### ③ 上皮細胞表面の PAF-R の発現

Detroit 562 cells をマウス抗ヒト PAF-R 抗体で処理したのちに FITC 標識抗マウス抗体を反応させ、マウス IgG2a を使用した細胞を対照とし、細胞表面の PAF-R 発現量を FACS で測定した。さらに、Detroit 562 cells をマウス抗ヒト PAF-R 抗体で処理したのちにビオチン標識抗マウス IgG 抗体を添加し、Alexa 488 streptavidin conjugate を細胞に添加し共焦点レーザー顕微鏡で PAF-R の発現を確認した。また、Detroit 562 cells を poly(I:C) で刺激し、PAF-R の発現の変化を同様の方法で確認した。

## ④ 細菌の接着および細胞内侵入

Detroit 562 cells を 96 穴マイクロプレートに播き、コンフルエントになるまで培養した。細菌 (Spn;  $10^7$  CFU/ml、NTHi  $10^6$  CFU/ml) を抗 PC-IgA : TEPC-15 ( $1\mu\text{g/ml}$ ) で  $4^\circ\text{C}$  30 分処理し、また細胞を PAF-R 拮抗薬 : ABT-491 ( $100\mu\text{M}$ )、PC-KLH ( $200\mu\text{g}$ ) で  $37^\circ\text{C}$  1 時間処理した。(図 1) Spn、NTHi の接着実験は  $37^\circ\text{C}$  1 時間、細胞内侵入実験は  $37^\circ\text{C}$  6 時間接着、侵入させた。PBS で洗浄し Detroit 562 cells を 1% サポニンで処理したものをそれぞれ血液寒天培地、チョコレート寒天培地に培養しコロニー数を測定した。

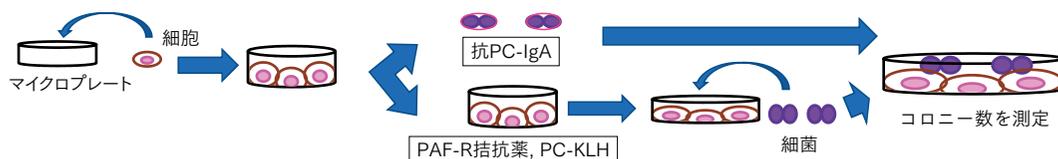


図 1：細菌接着および細胞内侵入の実験方法

細菌の PC を阻害するために抗 PC-IgA で、細胞の PAF-R を阻害するために PAF-R 拮抗薬、PC-KLH で処理し、その抑制効果を検討した。

## 結果

## ① PC の発現強度と細菌接着

Spn、NTHi の PC 発現は各菌株で異なっていた。さらに、Spn、NTHi それぞれの全菌株での MFI (mean fluorescence intensity) の中央値で PC 高発現株 (3 菌株) と PC 低発現株 (3 菌株) に分け、その接着細菌数を比較すると、Spn、NTHi とともに、PC 高発現株のほうが PC 低発現株よりも接着細菌数が有意に多く、PC 発現と接着細菌数は正の相関を認めた。(図 2A, B)

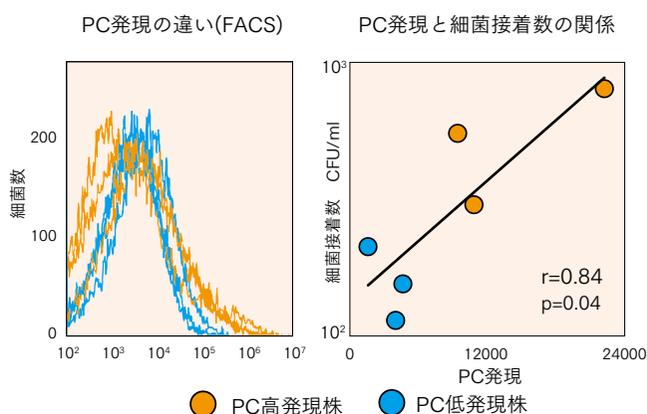


図 2A：Spn 菌株別の PC 発現と接着細菌数

Spn は各菌株で PC 発現が異なり、PC 発現と上皮細胞への接着数は正の相関を認めた。

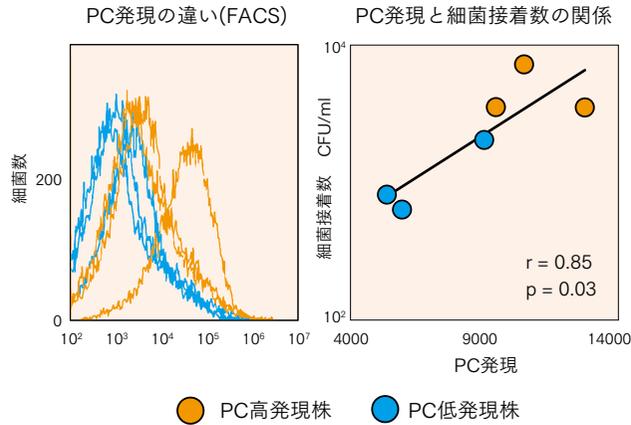


図 2B：NTHi 菌株別の PC 発現と接着細菌数

NTHi は各菌株で PC 発現が異なり、PC 発現と上皮細胞への接着細菌数は正の相関を認めた。

## ② PAF-R の発現強度と細菌接着

Detroit 562 cells の PAF-R の発現は isotype control と比較して有意に発現が高かった。さらに、Detroit 562 cells を poly(I:C) で刺激すると PAF-R の発現が増加した。(図 3A, B)

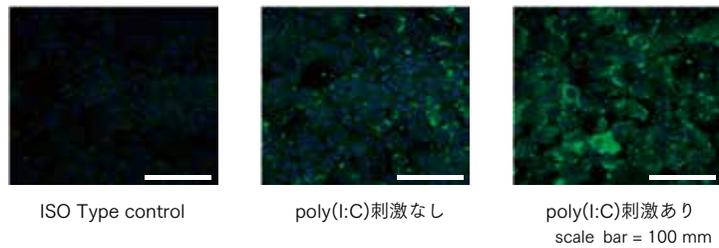


図 3A：PAF-R の発現と poly(I:C) 刺激の効果

Detroit 562 cells は PAF-R を発現し、poly(I:C) 刺激により PAF-R の発現が増加した。

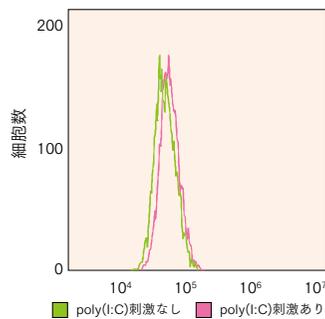


図 3B：PAF-R の発現と poly(I:C) 刺激の効果 (FACS)

さらに、poly(I:C) 刺激した時と刺激していない時の細菌接着を Spn および NTHi の各 PC 発現株で比較した。その結果、Spn では PC 高発現株のみ接着細菌数が増加したのに対して、NTHi では PC 低発現株、PC 高発現株ともに接着数が増加した。（図 3C）

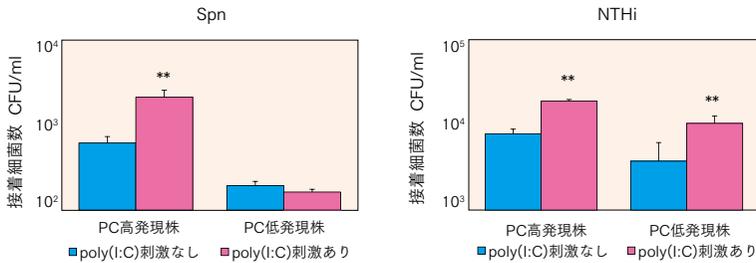


図 3C : poly(I:C) による接着細菌数の変化

Spn では PC 高発現株、NTHi では PC 低発現株および高発現株ともに、poly(I:C) 刺激による PAF-R 発現の増強に伴い接着細菌数が増加した。 \*\* $p < 0.01$ .

### ③ 細菌接着における抗 PC-IgA、PAF-R 拮抗薬、PC-KLH の作用

Spn と NTHi それぞれにおいて、細菌の PC を抗 PC-IgA で処理、上皮細胞の PAF-R を PAF-R 拮抗薬または PC-KLH で処理した時の接着細菌数を処理前と比較し、その抑制効果を検討した。接着細菌数は各群の 3 菌株の平均で算出した。その結果、Spn の PC 高発現株では、抗 PC-IgA、PAF-R 拮抗薬、PC-KLH で処理することで細菌接着が有意に抑制されたが、PC 低発現株では抑制されなかった。（図 4A）

同様に、NTHi の PC 高発現株でも、抗 PC-IgA、PAF-R 拮抗薬、PC-KLH で処理することで細菌接着が有意に抑制されたが、PC 低発現株では抑制されなかった。（図 4B）

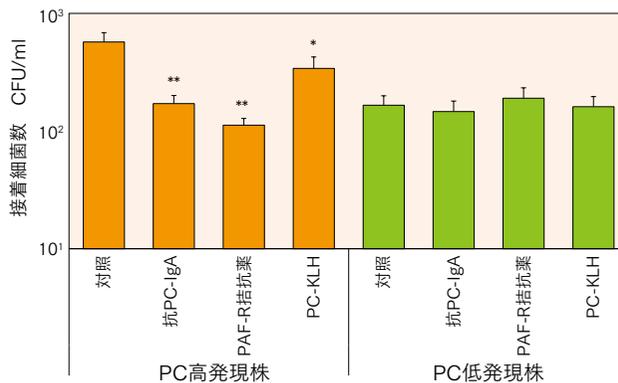


図 4A : Spn の細胞接着における抗 PC-IgA、PAF-R 拮抗薬、PC-KLH の抑制効果

PC 高発現株では、細菌を抗 PC-IgA で処理すること、細胞の PAF-R を PAF-R 拮抗薬、PC-KLH で処理することで細菌接着が有意に抑制された。しかし、PC 低発現株では抑制されなかった。 \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

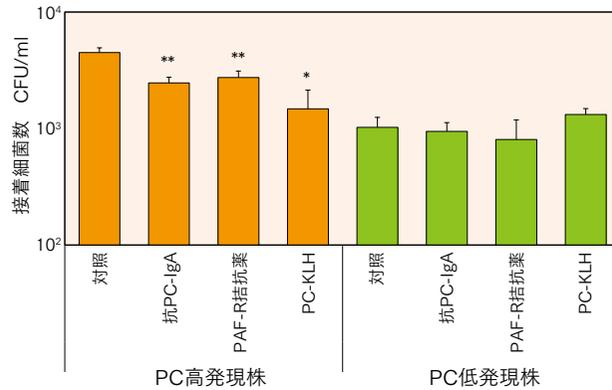


図4B：NTHiの細胞接着における抗PC-IgA、PAF-R拮抗薬、PC-KLHの抑制効果

PC高発現株では、細菌を抗PC-IgAで処理すること、細胞のPAF-RをPAF-R拮抗薬、PC-KLHで処理することで細菌接着が有意に抑制された。しかし、PC低発現株では抑制されなかった。  
\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ 。

#### ④ 細胞内侵入における抗PC-IgA、PAF-R拮抗薬、PC-KLHの作用

NTHiは6時間培養後に細胞内侵入を認め、細菌接着と同様に、PCを抗PC-IgAで処理、上皮細胞のPAF-RをPAF-R拮抗薬またはPC-KLHで処理することにより細胞内侵入の抑制効果がみられた。しかし、PC低発現株ではその抑制効果はみられなかった。(図5)

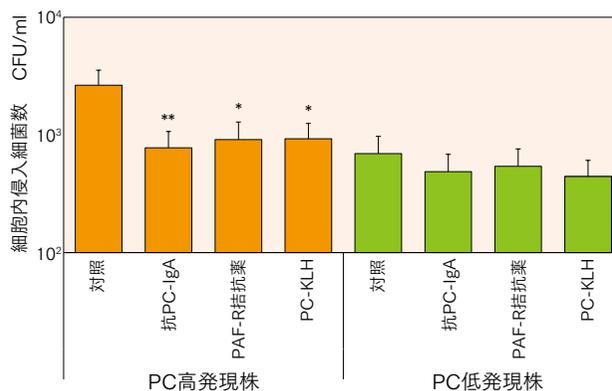


図5：NTHiの細胞内侵入における抗PC-IgA、PAF-R拮抗薬、PC-KLHによる抑制効果

PC高発現株では、細菌を抗PC-IgAで処理すること、細胞のPAF-RをPAF-R拮抗薬、PC-KLHで処理することで細胞内侵入が有意に抑制された。しかし、PC低発現株では抑制されなかった。  
\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ 。

## 考 察

Spn、NTHiのPC発現は各菌株で異なり、その発現強度によってこれらの細菌をPC高発現株とPC低発現株に分けて検討すると、SpnとNTHiの培養上皮細胞への接着性はともにPC高発現株がPC低発現株と比較して有意に高かった。SpnやNTHiの接着性が病原性と関連することはすでに知られており、たとえばAnderssonら<sup>9)</sup>は、急性中耳炎患

者由来の Spn を用いてその接着性を観察し、病原性が高い菌株ほど接着性が強いことを報告している。また、Shimamura ら<sup>10)</sup>は、Spn と NTHi の上皮細胞への接着性は成人より小児に高く、健常人より中耳炎患者で高いと述べている。PC の発現強度も Spn や NTHi の病原性に関与し、ヒトから分離した Spn のうち病原性が高い菌では、その PC を阻害することで感染を防ぐことができる<sup>11)</sup>。また、マウスに NTHi を経気管的に投与すると、PC を発現する NTHi は PC を発現しない NTHi と比較して肺からのクリアランスが遅延する<sup>12)</sup>。これらのことから、Spn と NTHi では病原性が高いものほど PC の発現が強く、上皮細胞への接着性も強いと考えられる。

細菌に発現している PC を抗 PC-IgA である TEPC-15 で処理すると、PC 高発現株の Spn と NTHi の接着性が有意に抑制された。IgA が細菌の接着を阻止することについては、すでに多くの報告があり、我々も、Spn や NTHi の細菌抗原を経鼻あるいは経口投与することで抗原特異的分泌型 IgA が産生され、これによりこれらの細菌の接着が阻害されることを報告した<sup>13)</sup>。さらに、PC をマウスに経鼻投与すると、鼻腔洗浄液や唾液中に PC 特異的 IgA 応答が誘導され、この免疫応答は菌株の異なる NTHi や Spn とも交差反応し、鼻腔へ接種した生菌のクリアランスが促進された<sup>3)</sup>。しかし、そのクリアランスの程度は一樣ではなく、外分泌液中の分泌型 IgA の細菌の細胞壁に対する抗体活性も菌株によって異なっていた。したがって、抗 PC-IgA によって細菌の接着が抑制されるが、細菌の PC の発現強度がこれに影響を及ぼすこと、すなわち、PC の発現が強く病原性が高い細菌のみが抗 PC-IgA によってその接着が阻害されると考えられる。なお、PC 低発現株では抗 PC-IgA で処理しても接着が抑制されず、PC 高発現株でも PC 特異的 IgA で完全に接着が阻止されないことから、細菌の接着には PC 以外の表面タンパクや線毛などの関与もあるが、病原性との関連性は少ないと推測される<sup>14,15)</sup>。

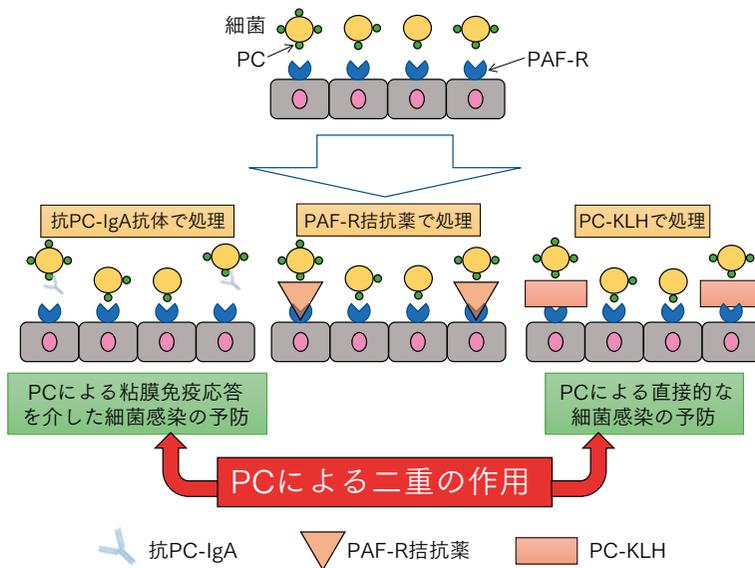
今回使用した Detroit 562 cells には PAF-R が発現し、これを PAF-R 拮抗薬である ABT-491 で処理すると、PC 高発現株では細菌接着が有意に抑制され、PC 低発現株では影響を受けなかった。PAF-R 拮抗薬による細菌接着の抑制について、Shukla ら<sup>16)</sup>は、気管上皮細胞をタバコの煙から抽出したエキスで刺激すると PAF-R の発現が亢進し、これを PAF-R 拮抗薬で処理すると Spn や NTHi の接着が刺激前と同程度まで抑えられることを証明している。我々も、Detroit 562 cells を poly(I:C) で刺激すると PAF-R の発現が亢進し、Spn の接着が強くなることを報告し<sup>17)</sup>、今回の研究でも poly(I:C) の刺激によって PAF-R の発現が亢進することが FACS および共焦点レーザー顕微鏡による観察で確認され、それに伴って PC 高発現株の Spn そして PC 高発現株と PC 低発現株の NTHi の接着性が増強した。さらに、Cundell ら<sup>6)</sup>は、PAF-R と PC との関連性を観察し、PAF-R と PC の結合によって Spn の接着が誘導され、高病原性の Spn のみが PAF-R と結合することを明らかにしている。今回使用した細菌の細胞接着性は Spn の低発現株で最も低く、高病原性の Spn のみが PAF-R と結合することを裏付ける結果となった。これらの結果から、Spn および NTHi の接着には PAF-R の存在が必要であり、その発現強度が気道感染症の病態に関与すること、そして、PC の発現が強く病原性が高い細菌では、PC と PAF-R との結合が細菌接着の重要な要因となると考えられる。

PCがPAF-Rのリガンドであることから、PC-KLHが細菌接着に及ぼす直接作用を検討したところ、抗PC-IgAやPAF-R拮抗薬で処理した時と同様に、PC高発現株のSpnおよびNTHiの接着がPC-KLH処理によって抑制された。したがって、PCは粘膜免疫応答を誘導することで産生されるPC特異的IgAを介して細菌の接着を抑制するとともに、PAF-Rとの結合によってもこれを阻害し、細菌接着において二重の作用を有すると考えられる。また、PC高発現株でのABT-491とPC-KLHによる細菌接着抑制効果を比較すると、SpnはPAF-R拮抗薬、NTHiはPC-KLHの方がその抑制効果は強かった。NTHiに発現しているPCはPAF-R以外の受容体にも結合し<sup>18)</sup>、PCはKLHなどのPCと結合したタンパク成分によって作用が変化することが知られていることから<sup>19)</sup>、PAF-Rに対するPCの結合能および特異性がSpnとNTHiとで異なるのかもしれない。

NTHiはしばしばヒト上皮細胞に侵入し慢性炎症や習慣性炎症をもたらし、これがPCとPAF-Rの相互作用によって促進されることが知られている<sup>6)</sup>。本研究でもPC高発現株のNTHiがDetroit 562 cells内へ侵入することが証明され、その細胞内侵入は細胞への接着と同様に、抗PC-IgA、PAF-R拮抗薬、PC-KLHで処理することで有意に抑制された。すなわち、NTHiの細胞内侵入の前段階として細胞への接着が必要であり、接着が阻害されたことによって細胞内侵入が抑制されたと思われる。なお、今回の検討ではSpnの細胞内侵入が観察できなかった。本研究に用いたDetroit 562 cellはhuman polymeric immunoglobulin receptor (hpIgR)を多く有し、SpnのR6x株のみがこれを受容体として細胞内侵入できることが報告されている<sup>20)</sup>。したがって、Spnの細胞内侵入には細胞特異性があり、NTHiと異なり、PCとPAF-Rの結合以外の機序がより重要と考えられる。

## 結語

Spn および NTHi における PC の発現は細菌の病原性と接着に関与し、PC の発現が強い細菌は抗 PC-IgA による処理で接着が抑制される。一方、PC の発現が弱い細菌は抗 PC-IgA の影響を受けない。したがって、PC をターゲットにする粘膜ワクチンは、PC を高発現する病原性が高い細菌のみに作用し、病原性が低い細菌から成る常在菌叢を乱す危険性は少ないと考えられる。また、PC はそれ自体が PAF-R と結合して細菌の接着を阻害し、粘膜免疫応答を介した細菌接着の抑制とともに二重の作用を有することが示された。



## 参考文献

- 1) Tong HH, Blue LE, James MA, et al. Evaluation of phase variation of nontypeable *Haemophilus influenzae* lipooligosaccharide during nasopharyngeal colonization and development of otitis media in the chinchilla model. *Infect Immun* 2000;68:4593–4597.
- 2) Fujita K, Hirano T, Kodama S, et al. Prognostic impact of phosphorylcholine expression in nontypeable *Haemophilus influenzae* in otitis media with effusion. *Acta Otolaryngol* 2009;129:832–838.
- 3) Tanaka N, Fukuyama S, Fukuiwa T, et al. Intranasal immunization with phosphorylcholine induces antigen specific mucosal and systemic immune responses in mice. *Vaccine* 2007;25:2680–2687.
- 4) Maseda Y, Ohori J, Tanaka N, et al. Mucosal and systemic immune response to sublingual or intranasal immunization with phosphorylcholine. *Auris Nasus Larynx* 2018;45:273–280.
- 5) Nagano H, Jimura T, Nagano M, et al. Transcutaneous immunization in auricle skin induces antigen-specific mucosal and systemic immune responses in BALB/c mice. *Auris Nasus Larynx* 2017;44:411–416.
- 6) Cundell DR, Gerard NP, Gerard C, et al. *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated

- human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature* 1995;377:435-438.
- 7) Swords WE, Buscher BA, Ver Steeg Ii K, et al. Non-typeable *Haemophilus influenzae* adhere to and invade human bronchial epithelial cells via an interaction of lipooligosaccharide with the PAF receptor. *Mol Microbiol* 2000;37:13-27.
  - 8) Kurono Y, Shimamura K, Shigemi H, et al. Inhibition of bacterial adherence by nasopharyngeal secretions. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1991;100:455-8.
  - 9) Andersson B, Nylén O, Peterson CM, et al. Attachment of *Streptococcus pneumoniae* to human pharyngeal epithelial cells in vitro. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 1980;89:115-116.
  - 10) Shimamura K, Shigemi H, Kurono Y, et al. The role of bacterial adherence in otitis media with effusion. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1990;116:1143-1146.
  - 11) Briles DE, Forman C, Crain M. Mouse antibody to phosphocholine can protect mice from infection with mouse-virulent human isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 1992;60:1957-1962.
  - 12) Pang B, Winn D, Johnson R, et al. Lipooligosaccharides containing phosphorylcholine delay pulmonary clearance of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 2008;76:2037-2043.
  - 13) Kurono Y, Shimamura K, Shigemi H, et al. Inhibition of bacterial adherence by nasopharyngeal secretions. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1991;100:455-8.
  - 14) Rosenow C, Ryan P, Weiser JN, et al. Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 1997;25:819-829.
  - 15) Kubiet M, Ramphal R, Weber A, et al. Pilus-mediated adherence of *Haemophilus influenzae* to human respiratory mucins. *Infect Immun* 2000;68:3362-3367.
  - 16) Shukla SD, Fairbairn RL, Gell DA, et al. An antagonist of the platelet-activating factor receptor inhibits adherence of both nontypeable *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* to cultured human bronchial epithelial cells exposed to cigarette smoke. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2016;11:1647-1655.
  - 17) Kawabata M, Kurono Y. polyinosine-polycytidylic acid enhances cellular adherence of *Streptococcus pneumoniae*. *Laryngoscope* 2011;121:2443-2448.
  - 18) Branger J, Wieland CW, Florquin S, et al. Platelet-activating factor receptor-deficient mice show an unaltered clearance of nontypeable *Haemophilus influenzae* from their respiratory tract. *Shock* 2004;22:543-547.
  - 19) Walton KA, Hsieh X, Gharavi N, et al. Receptors involved in the oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine-mediated synthesis of interleukin-8. A role for Toll-like receptor 4 and a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein. *J Biol Chem* 2003;278:29661-29666.
  - 20) Brock SC, McGraw PA, Wright PF, et al: The human polymeric immunoglobulin receptor facilitates invasion of epithelial cells by *Streptococcus pneumoniae* in a strain-specific and cell type-specific manner. *Infect Immun* 2002;70:5091-5095.

## 2) PC によるバイオフィーム形成の抑制

### 〈Summary〉

上気道感染症の主要な原因菌である無莢膜型インフルエンザ菌 (NTHi) は、感染局所粘膜上に接着したのちにバイオフィームを形成することで感染の遷延化に関わっている。そして、このバイオフィームの産生促進には NTHi の菌体外膜 lipooligosaccharide (LOS) に存在するホスホリルコリン (PC) が関与すると考えられている。そこで、PC 特異的 IgA および PC を用いて、その NTHi のバイオフィーム形成抑制効果について検討した。その結果、NTHi を PC 特異的 IgA で前処理することで、また、上皮細胞を PC で前処理することで、NTHi によるバイオフィーム形成が抑制されることが確認された。これらのことから、PC 粘膜ワクチンにより PC 特異的分泌型 IgA を誘導することで、あるいは PC の直接作用を応用して細菌のバイオフィーム形成を阻止し、感染の遷延化や難治化を予防しうることが示唆された。

### はじめに

中耳炎や副鼻腔炎の主要な原因菌である無莢膜型インフルエンザ菌 (NTHi) は、感染局所粘膜上でバイオフィームを形成し、感染の遷延化に関わっていることが報告されている<sup>1-3)</sup>。バイオフィームは食細胞による貪食作用を阻止し、気道に分泌される抗菌活性物質や分泌型 IgA、さらにはペニシリン系やセフェム系抗菌薬の細菌に対する作用を妨げる。臨床的にも、バイオフィームの形成が中耳炎の難治化に関連していることが報告されている<sup>4)</sup>。そのため、NTHi をはじめバイオフィームを産生する細菌による上気道感染症の遷延化を制御するには、このバイオフィーム産生の抑制が重要となる。バイオフィーム産生は、その前段階として細菌の宿主細胞への接着が必要であり、前項第七章 1-1) では、ホスホリルコリン (PC) で上皮細胞を処理することでこれが血小板活性化因子受容体 (PAF-R) と結合し、NTHi の接着が阻止されることを示した。また、NTHi の菌体外膜 lipooligosaccharide (LOS) に存在する PC は細菌の接着だけでなく、バイオフィームの産生促進にも関与すると考えられている。したがって、PC による処理あるいは細菌の PC を不活化させることでバイオフィームの形成も抑制されると推測される。

そこで、本項では頬粘膜上皮細胞を PC で処理して、NTHi のバイオフィーム産生が抑制されるかを検討した。さらに、PC 特異的 IgA により NTHi のバイオフィーム形成が抑制されるかについても検討した。

### 材料と方法

#### ① NTHi における PC 発現量の定量

本実験には、滲出性中耳炎患者の上咽頭から分離された 10 菌株の NTHi を用いた。これらの細菌を brain heart infusion (BHI: Difco Laboratories, Detroit, MI) 培養液で 6 時

間培養し log phase に達した時点で  $10^6$ CFU/ml に調整し、96 穴のマイクロプレートに  $100\mu\text{l}$  ずつ注入し、 $37^\circ\text{C}$  で 2 時間かけてコーティングした。Phosphate buffered saline (PBS) で洗浄後に 1% bovine serum albumin (BSA)-PBS  $200\mu\text{l}$  でブロッキングした後、PC 特異的 IgA である TEPC-15 (1:1000) で  $37^\circ\text{C}$ 、1 時間かけて処理した。洗浄後に、抗マウス IgA-HRP (1:5000) で  $37^\circ\text{C}$ 、1 時間かけて処理した。暗所にて 15 分間 TMB で発色させ、 $0.5\text{N}$  HCl で反応を止め、ELISA プレートリーダーで吸光度  $450\text{nm}$  を測定した。

## ② バイオフィームの定量

NTHi を BHI 培養液で  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  下で一晩培養した。これを遠心したのちに  $1.0 \times 10^6$ cfu/ml (吸光度  $590\text{nm}$ ) の菌数に調整し、96 穴マイクロプレートに  $200\mu\text{l}$  ずつ注入した。 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  下で 24 時間培養した後に洗浄し、0.5% クリスタルバイオレット (CV)  $100\mu\text{l}$  で 15 分間染色し、蒸留水で洗浄し風乾した。その後、95% エタノールで溶解し、ELISA プレートリーダーで吸光度 ( $595\text{nm}$ ) を測定した。なお、 $\text{OD}_{595}$  が 0.2 以上をバイオフィーム形成株とした。

## ③ ヒト頬粘膜上皮細胞における PAF-R の発現

ヒトの頬を綿棒で擦過し、PBS 内に攪拌して頬粘膜上皮細胞浮遊液を作成した。1%BSA で 10 分間ブロッキングをした後、マウス PAF-R monoclonal antibody (Cayman CHEMICAL) および対照としてマウス IgG2a (Dako Cytomation) を  $1.25\mu\text{g}/\text{well}$  となるように添加した。 $37^\circ\text{C}$  で一晩反応させた後、goat anti-mouse IgG2a-TexRed (SouthernBiotech) を  $37^\circ\text{C}$  で 30 分反応させた。PBS で洗浄後、サイトスピンを用いてスライドガラスに単層塗抹標本を作製し、蛍光顕微鏡で観察した。

## ④ 抗 PC-IgA によるバイオフィーム形成の抑制

BHI 培養液中で一晩培養した NTHi を  $1.0 \times 10^6$ CFU/ml (吸光度  $590\text{nm}$ ) に調整し、これを抗 PC-IgA (1:1000) で  $4^\circ\text{C}$ 、1 時間前処理した。その後、これを 96 穴マイクロプレート内の BHI 培養液中で更に 24 時間培養し、バイオフィーム形成量を前述の方法で測定した。(図 1)

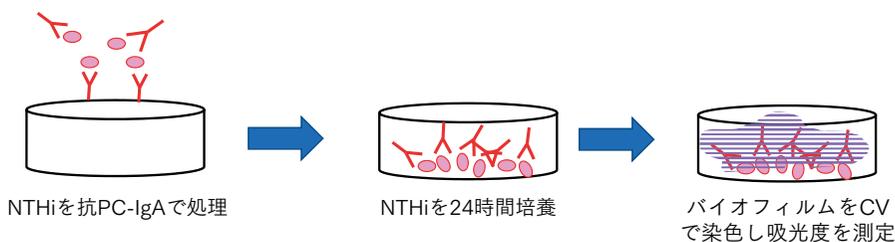


図 1：マイクロプレート上での NTHi によるバイオフィーム形成の実験方法

### ⑤ PC によるバイオフィーム形成の抑制

ヒト頬粘膜細胞浮遊液を96穴マイクロプレートに分注し、これにPC-KLH（以下、PC）を200 $\mu$ g添加し、37 $^{\circ}$ Cで1時間処理した。NTHiは最もバイオフィーム形成能が高かった菌株を用い、BHI培養液で37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>下に一晚培養した後に、 $1.0 \times 10^8$ CFU/ml（吸光度590nm）に調整した。これを10 $\mu$ lずつプレートに注入し、37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>下で1時間培養して細菌を上皮に接着させ、接着していない細胞を洗浄除去した後さらに24時間培養した。培養液を除去後、バイオフィームをAlexa 488で標識されたconcanavalin Aおよびlectin PNA（Thermo Fisher SCIENTIFIC）で30分間染色を行い、蛍光顕微鏡で観察した。（図2）

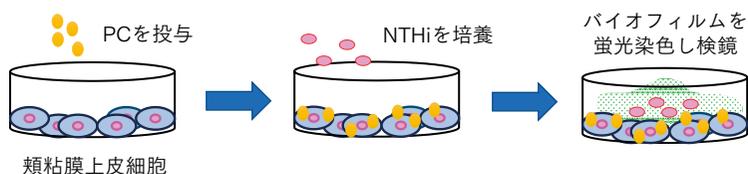


図2：ヒト頬粘膜上皮細胞表面でのNTHiによるバイオフィーム形成の実験方法

## 結果

### ① NTHiのPC発現量とバイオフィーム形成能

10菌株中4菌株がOD0.2以上で、バイオフィーム形成株であった。バイオフィーム形成株はPC発現量が多い傾向にあったが、両者間に有意な相関は認められなかった。しかし、バイオフィーム産生株はいずれもPC発現量が高かった。（図3）

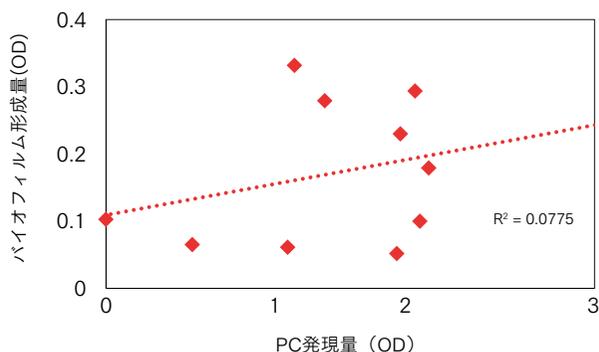
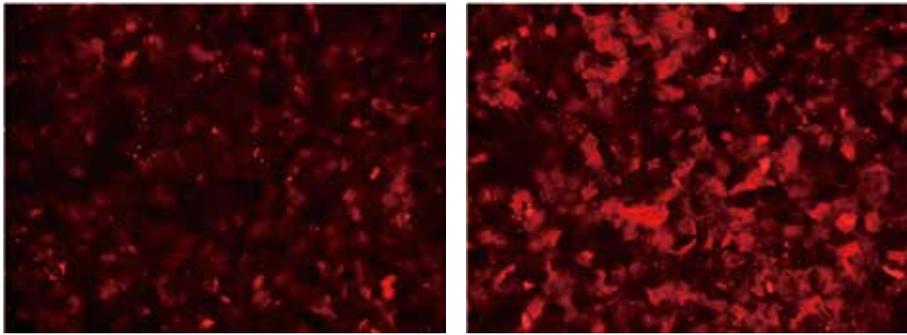


図3：PC発現とバイオフィーム形成の相関

バイオフィーム形成株はPC発現量が多い傾向にあったが、有意な相関は認められなかった。しかし、バイオフィーム形成株はいずれもPC発現量が高かった。

### ② ヒト頬粘膜細胞におけるPAF-Rの発現

ヒト頬粘膜上皮細胞にPAF-Rが発現していることが蛍光顕微鏡で観察された。（図4）



対照

PAF-R染色所見

図4：ヒト頬粘膜上皮細胞における PAF-R の発現  
ヒト頬粘膜上皮細胞に PAF-R の発現を認める。

### ③ 抗 PC-IgA 抗体によるバイオフィーム形成の抑制

バイオフィーム形成能が比較的高い2菌株において、抗 PC-IgA で前処理することでバイオフィーム形成が有意に抑制された。しかし、残りの2菌株については、抗 PC-IgA によるバイオフィーム形成の有意な抑制効果は認められなかった。(図5)

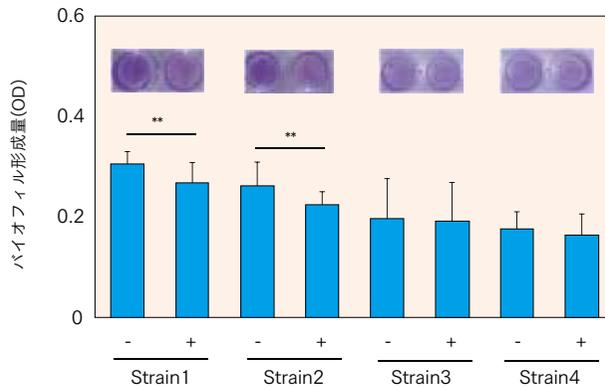


図5：PC 処理によるバイオフィーム産生の抑制

バイオフィーム形成能が高い2菌株では、抗 PC-IgA によるバイオフィーム形成の抑制が認められた。 \*\*p < 0.01.

#### ④ PC によるバイオフィーム形成の抑制

頬粘膜上皮細胞上で NTHi を培養したところ、バイオフィームの形成を認めた。そこで、この頬粘膜上皮細胞を PC で前処理するとその形成が著明に抑制された。（図 6）

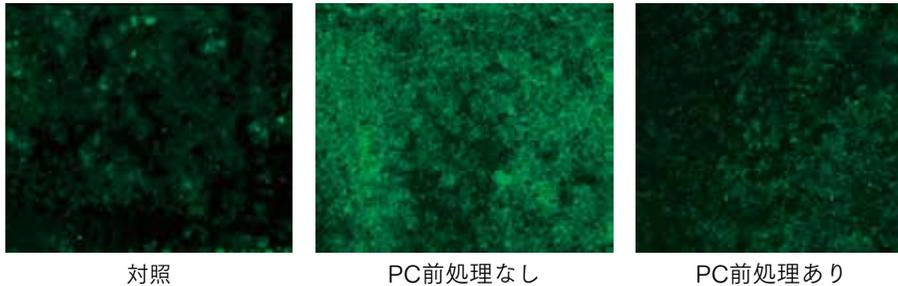


図 6：抗 PC-IgA によるバイオフィーム形成の抑制

PC 前処理により、頬粘膜上皮細胞上のバイオフィーム形成が抑制された。

#### 考 察

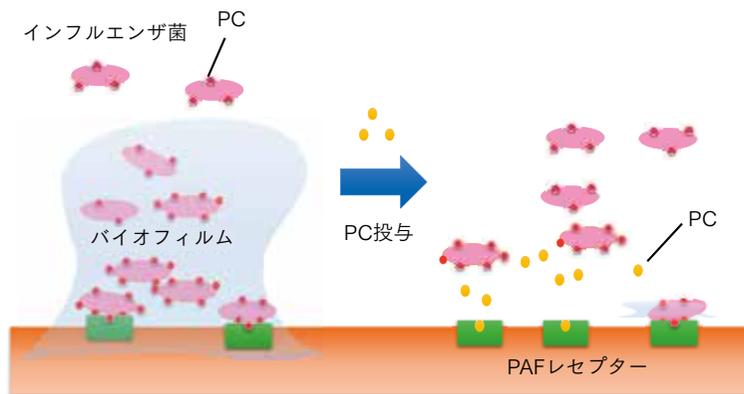
NTHi は LOS に存在する PC を介して宿主の上皮細胞表面に存在する PAF-R と結合し上皮細胞に接着する。さらに、PC はバイオフィームの産生を促進すると考えられている。その証左として PC を発現しない NTHi 変異株は浮遊菌として存在し続け、バイオフィームを形成しないことが確認されている<sup>5-7)</sup>。PC を高発現するインフルエンザ菌はバイオフィームの産生能が強く、バイオフィーム中に長期間生存することができる<sup>7)</sup>。そのため、病期期間が長い滲出性中耳炎患者の中耳貯留液から検出されるインフルエンザ菌は PC の発現が強い<sup>5)</sup>。一方で、中耳炎、慢性閉塞性呼吸障害（COPD）、市中肺炎、健常小児などから検出された NTHi の多数の菌株を用いた検討において、NTHi の LOS 内の PC のバイオフィーム形成への影響の程度は菌株により様々であることが報告されている<sup>8)</sup>。本研究で使用した NTHi10 菌株についても、PC の発現量とバイオフィーム形成能の間に相関性は認められなかった。しかしながら、バイオフィーム形成株は PC 発現量が比較的高く、また、PC の発現が高い細菌は病原性が強いことから<sup>9,10)</sup>、PC の発現が上気道感染症の病態に果たす役割は大きいことが示唆される。

前項では、咽頭上皮細胞への PC 前投与により、PC 高発現の NTHi の接着が有意に抑制されることを示した。そして本研究では、頬粘膜上皮細胞への PC 前処理によって、PC 高発現の NTHi のバイオフィーム形成も抑制された。したがって、PC 前処理によって NTHi の接着因子である PC と上皮細胞の PAF-R との結合が阻害され、上皮細胞に接着する細菌量が減少し、その結果バイオフィームの形成が抑えられたと考えられる。また、NTHi を PC 特異的 IgA である TEPC-15 で処理することでもバイオフィーム形成が抑制されたが、その NTHi はバイオフィーム産生能が強かつ PC の発現も強いことから、TEPC-15 が PC と結合し PC 前処理と同様に細菌の接着を阻害したためと考えられる。これらのことから、PC 粘膜ワクチンによって PC 特異的分泌型 IgA や、PC の鼻副鼻腔や咽頭への局所投与によって、細菌の接着そしてバイオフィーム形成を阻止することが可能

であり、PCをターゲットとするこれらの治療が上気道の難治性感染症の新たな治療戦略になり得ると期待される。

### 結 語

上皮細胞のPC処理によりこれが粘膜上皮細胞のPAF-Rと結合し、NTHiのPCとPAF-Rの結合を介した接着が阻害され、その結果としてバイオフィーム形成が抑制された。また、PC特異的IgAによる処理でも同様に、バイオフィーム形成能の高いNTHiのバイオフィーム形成が抑制された。したがって、PCは粘膜ワクチンとして投与された場合は粘膜免疫応答を介して、さらにその直接的な作用によっても細菌の接着を阻止し、その二重の作用によってバイオフィームの形成も抑制すると考えられる。



### 参考文献

- 1) Post JC. Direct evidence of bacterial biofilms in otitis media. *Laryngoscope* 2001;111:2083-2094.
- 2) Hall-Stoodley H, Hu FZ, Gieseke A et al. Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media. *JAMA* 2006;296:202-211.
- 3) Sanderson AR, Leid JG, Hunsaker D. Bacterial biofilms on the sinus mucosa of human subjects with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* 2006;116:1121-1126.
- 4) Moriyama S, Hotomi M, Shimada J, et al. Formation of biofilm by *Haemophilus influenzae* isolated from pediatric intractable otitis media. *Auris Nasus Larynx* 2009;36:525-531.
- 5) Hong W, Pang B, West-Barnette S, et al. Phosphorylcholine expression by nontypeable *Haemophilus influenzae* correlates with maturation of biofilm communities in vitro and in vivo. *J Bacteriol* 2007;189:8300-8307.
- 6) West-Barnette S, Rockel A, Swords WE. Biofilm growth increases phosphorylcholine content and decreases potency of nontypeable *Haemophilus influenzae* endotoxins. *Infect Immun* 2006;74:1823-1836.
- 7) Hong W, Mason K, Jurcisek J, et al. Phosphorylcholine decreases early inflammation and promotes the establishment of stable biofilm communities of nontypeable *Haemophilus influenzae* strain 86-028NP in a chinchilla model of otitis media. *Infect Immun* 2007;75:958-965.

- 8) Fujita K, Hirano T, Kodama S, et al. Prognostic impact of phosphorylcholine expression in nontypeable *Haemophilus influenzae* in otitis media with effusion. *Acta Otolaryngol* 2009;129:832-838.
- 9) Cundell DR, Gerard NP, Gerard C, et al. *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature* 1995;377:435-438.
- 10) Pang B, Winn D, Johnson R, et al. Lipooligosaccharides containing phosphorylcholine delay pulmonary clearance of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 2008;76:2037-2043.

## 1) リピジュアによる細菌接着・侵入の阻止

## 〈Summary〉

ホスホリルコリン重合体 (MPC polymer：リピジュア) による肺炎球菌 (Spn) および無莢膜インフルエンザ菌 (NTHi) の上皮細胞への接着および細胞内侵入に対する抑制効果を明らかにし、含嗽薬やネブライザー薬へ応用することを目指し、本研究をおこなった。リピジュアは歯周病の起炎菌である *Porphyromonas gingivalis* などが口腔粘膜上皮細胞へ接着を抑制することが知られている。しかし、リピジュアの上気道感染症の主たる起炎菌である Spn や NTHi の上皮細胞への接着や細胞内侵入に対する効果については未だ明らかにされていない。そこで、培養咽頭上皮細胞をリピジュアで処理した時の Spn および NTHi の上皮細胞への接着および細胞内侵入に対する抑制効果を検討した。その結果、咽頭上皮細胞をリピジュアで処理すると、Spn および NTHi の上皮細胞への接着そして細胞内侵入が有意に抑制されることが示された。このことから、リピジュアを含嗽薬や咽頭ネブライザー薬などの局所療法薬として使用することで、Spn や NTHi による上気道感染症を予防できる可能性があることが示唆された。さらに、リピジュアは保湿効果も優れることが報告されており、高齢者で問題となる口腔内乾燥を予防し、さらに誤嚥性肺炎の予防にもつながることが期待される。

## はじめに

肺炎球菌 (Spn) および無莢膜インフルエンザ菌 (NTHi) は、急性中耳炎や急性副鼻腔炎、そして急性喉頭蓋炎などの上気道感染症の主たる起炎菌であり、優れた抗菌薬が次々と開発されているにもかかわらず、これらの細菌による上気道感染症の発症頻度に変化は見られない<sup>1)</sup>。それどころか、多剤耐性菌が年々増加し、経口抗菌薬では制御できない重症例に遭遇することが少なくない。これらの感染症を予防するため、肺炎球菌ワクチンやインフルエンザ菌 b 型ワクチンが定期接種化されているが、これらのワクチンは非ワクチン株や NHTi に無効なため、上気道感染症に対する効果は乏しい。一方、本邦では含嗽やネブライザー療法が普及し、上気道感染症の予防そして治療法として強く勧められている。事実、ポピドンヨード含嗽水は口腔内細菌に対して殺菌作用を持ち、さらにセフメノキシム塩酸塩を用いたネブライザー療法の副鼻腔炎に対する有効性が報告されている<sup>2,3)</sup>。しかし、含嗽薬の効果は限定的であり、ネブライザー療法薬としてはセフメノキシ

ム塩酸塩の1剤しか適応がないのが現状である。また、本邦は超高齢社会となり、口腔乾燥症やそれを一つの要因とする誤嚥性肺炎が増加し、その対策として口腔ケアが重要視されている。したがって、より効果的で安全性の高い含嗽薬やネブライザー療法薬の開発によって、上気道感染症および誤嚥性肺炎の予防が可能になると考えられる。

そこで、抗菌作用と保湿作用を持つホスホリルコリン重合体（MPC polymer：リピジュア）に注目した。リピジュアは女性の尿路感染症の起炎菌である大腸菌や歯周病の起炎菌である *Porphyromonas gingivalis* などの上皮への接着を抑制することが知られている<sup>4,5)</sup>。リピジュアはリン脂質極性基を側鎖に結合したメタクリル酸エステルで<sup>6)</sup>、細胞膜と同じリン脂質類似構造を持つため生体への親和性が極めて高く、保湿効果も併せ持っている。また、拒絶反応を起こす危険性が少なく、人体に無害である<sup>7)</sup>。そこで、本研究では、リピジュアの含嗽薬や咽頭ネブライザー薬などの局所療法薬への応用を目指すことを目的として、リピジュアによる Spn および NTHi の上皮細胞への接着および細胞内侵入に対する抑制効果について検討した。

## 材料および方法

### ① 細菌と上皮細胞

和歌山県立医科大学の保富先生から供与された Spn の4菌株（BG7322, D39, L82016, EF3030）と滲出性中耳炎患者の上咽頭由来の NTHi 4菌株<sup>8)</sup>を使用した。それぞれの細菌を血液寒天培地あるいはチョコレート寒天培地で37℃、5% CO<sub>2</sub>下で一晩培養し、これを0.5% BSA-PBS で洗浄した後に実験に使用した。細菌数は吸光度計で調整した。

上皮細胞はヒト咽頭癌由来の Detroit 562 cells（ATCC CCL-138; American Type Culture Collection, Manassas, VA）を96穴マイクロプレートに播き、37℃、5% CO<sub>2</sub>下でコンフルエント状態まで培養し使用した。

### ② 細胞へのリピジュアの付着性

FACS の tube 内で、FITC で標識されたリピジュアと Detroit 562 cells を室温で1分間反応させ、Detroit 562 cells へのリピジュアの付着を FACS で確認した。さらに、培養プレート内の Detroit 562 cells の表層に FITC で標識されたリピジュアを添加し、5分後に細胞に付着したリピジュアを蛍光顕微鏡で観察した。

### ③ 細菌接着および細胞内侵入へのリピジュアの効果

Detroit 562 cells にリピジュアを添加し、室温で1分間処理した後に Spn、NTHi を添加し、37℃、5% CO<sub>2</sub>下で、接着実験は1時間、細胞内侵入実験では6時間培養した。（図1）その後、Detroit 562 cells をサポニンで処理し、その細菌浮遊液を血液寒天培地あるいはチョコレート培地上で培養し、それぞれのコロニー数を測定した。また、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、FITC で標識された Spn の接着細菌数を解析した。

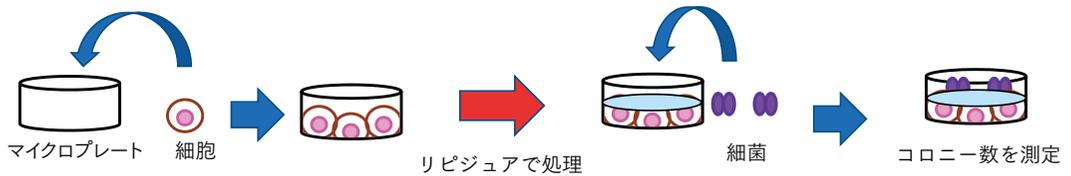


図1：細菌接着および細胞内侵入の実験方法

Detroit 562 cells をリピジュアで処理し，接着実験は1時間，細胞内侵入実験は6時間培養した。

## 結果

### ① リピジュアの細胞への接着性

FACS およびで蛍光顕微鏡による観察で，FITC で標識されたリピジュアが濃度依存性に Detroit 562 cells に接着することが確認された。(図2)

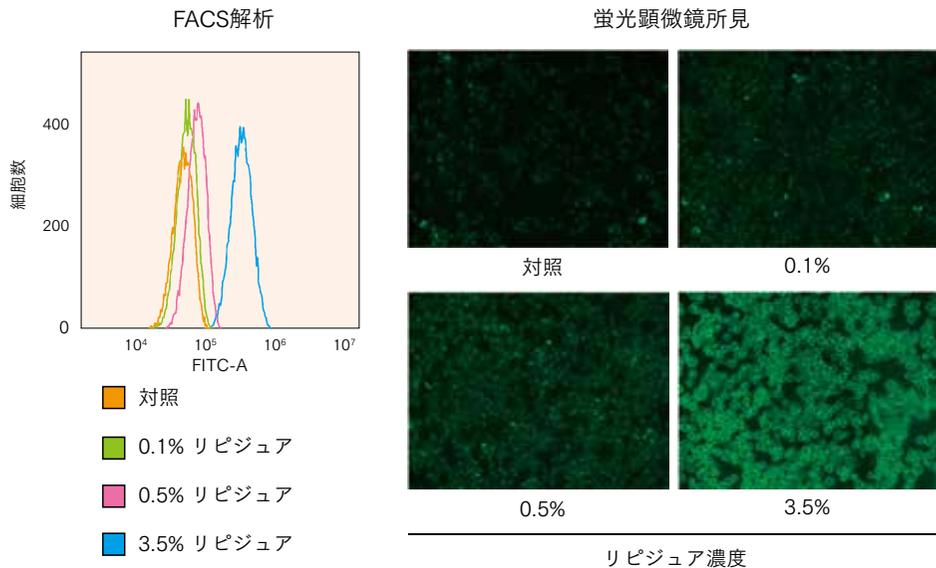


図2：リピジュアの細胞接着のFACS解析所見と蛍光顕微鏡所見

リピジュアが Detroit 562 cells に濃度依存性に接着することがFACS解析および蛍光顕微鏡による観察で確認された。

さらにリピジュアが Detroit 562 cells に付着することを実証するため、FITC で標識された4%のリピジュアを上皮細胞上に添加し、その付着の状態を共焦点レーザー顕微鏡で観察し、3D解析をおこなった。その結果、Detroit 562 cells の表層にリピジュアが付着している所見が確認された。(図3)

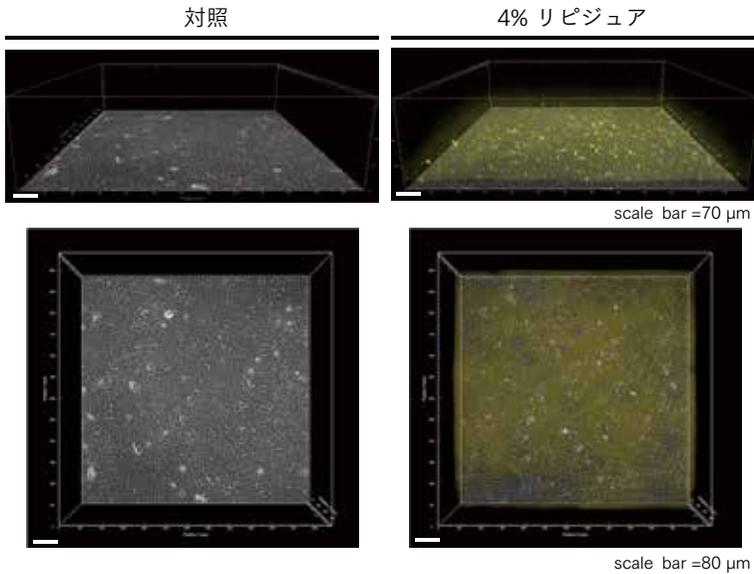


図3：リピジュアの細胞接着の3D解析所見

FITC で標識されたリピジュアが Detroit 562 cells の表層に付着している所見が、3D解析で確認された。

## ② 細菌接着実験における細菌とリピジュアの条件設定

Spn、NTHi はともに細菌の菌数依存性に Detroit 562 cells に接着した。(図4) この結果から、今回の実験では Spn は  $10^7$  CFU/ml、NTHi は  $10^6$  CFU/ml の濃度を用いることとした。

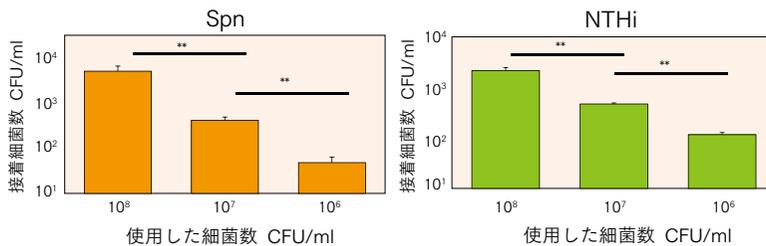


図4：細菌の Detroit 562 cells への接着数変化

Spn および NTHi は菌数依存性に上皮細胞に接着した。 \*\* $p < 0.01$ 。

そして、この濃度の細菌の接着に対するリピジュアの抑制効果を検討したところ、Spn は3.5%のリピジュアで、NTHi は0.5%と3.5%のリピジュアでその接着細菌数が有意に減

少した。(図5) これらの結果から、以下の実験では3.5%のリピジュアを使用することとした。

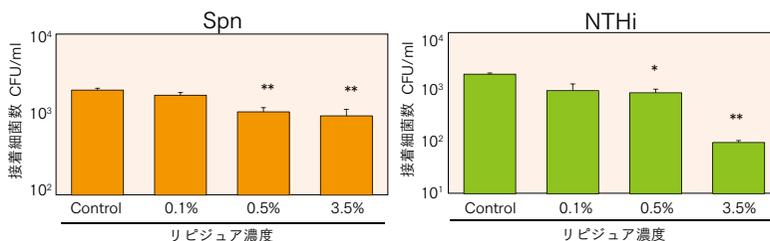


図5：リピジュア濃度による細菌接着抑制効果

Spn, NTHi ともに0.5%以上の濃度のリピジュアで細菌接着の有意な抑制効果が認められた。  
\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

### ③ 細菌接着に対するリピジュアの抑制効果

Spn および NTHi の4菌株すべてが、その程度に差はあるものの、上皮細胞を3.5%のリピジュアで処理することによってその接着が有意に抑制された。(図6)

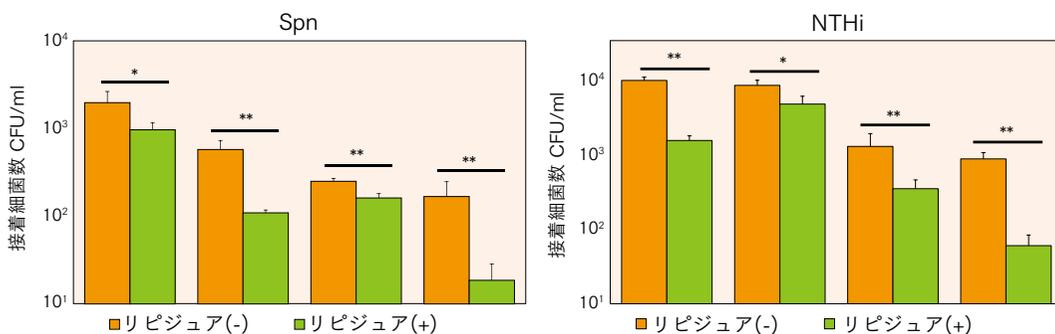


図6：細菌接着に対するリピジュアの抑制効果

上皮細胞をリピジュアで処理することで、Spn および NTHi ともに有意に細菌の接着が抑制された。  
\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

さらに、リピジュアによる細菌接着の抑制効果を蛍光顕微鏡下に確認するため、Spn の1株 (TIGR4) を FITC で標識し、これを4.5% リピジュアで前処理した上皮細胞と対照として無処理の上皮細胞上で培養した。上皮細胞に接着した細菌を共焦点レーザー顕微鏡で観察し、接着細菌数が多い箇所と少ない箇所、そしてその中間的な箇所の異なる6つの視野で比較すると、リピジュア前処理によって Spn の接着が明らかに抑制されていることが示された。(図7) さらに、全視野における Spn の蛍光輝度分布をリピジュア処理群と対照とで比較すると、リピジュア処理群では輝度が低いものが多く、輝度の平均値を比較すると、リピジュア処理群で有意に低値であった。(図8)

以上の結果から、リピジュアによる処理で細菌の接着を阻止できることが証明された。

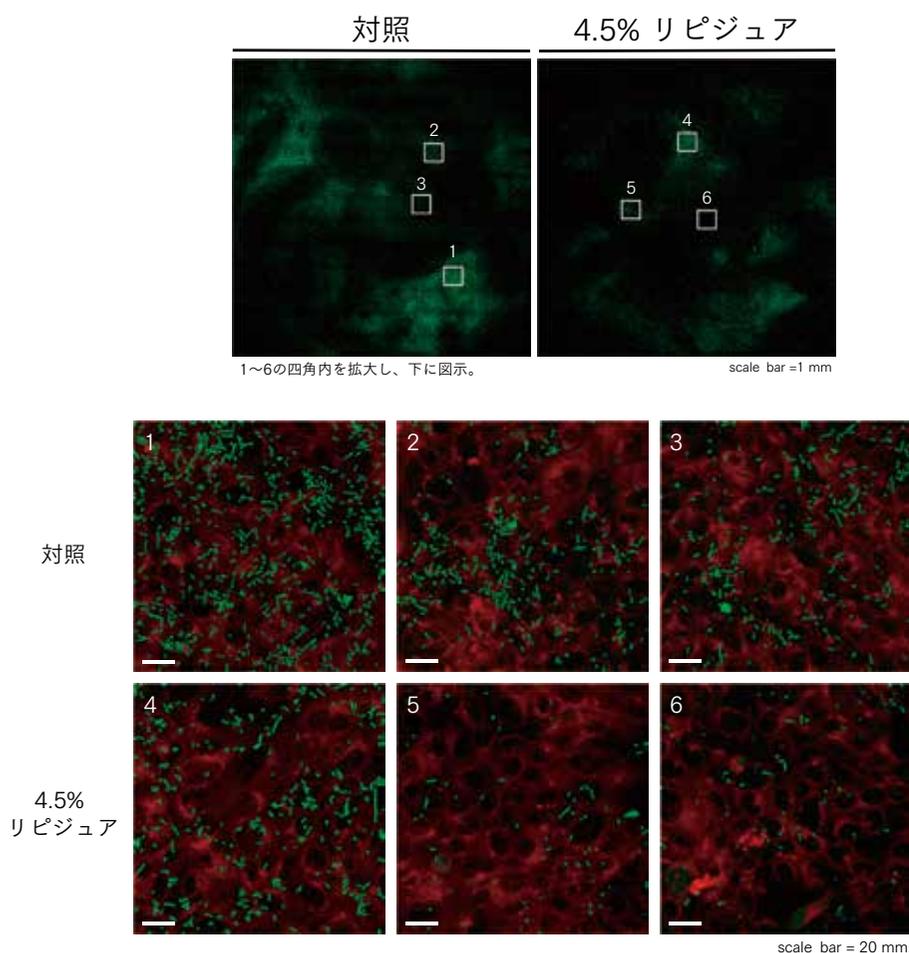


図7：細菌接着に対するリピジュアの抑制効果（共焦点レーザー顕微鏡所見）

Spn の接着数が多い箇所 (1, 4) と少ない箇所 (3, 4), その中間的な箇所 (2, 5) の異なる6つの視野で比較すると、リピジュア前処理群では対照と比較して Spn の接着が明らかに少ない。

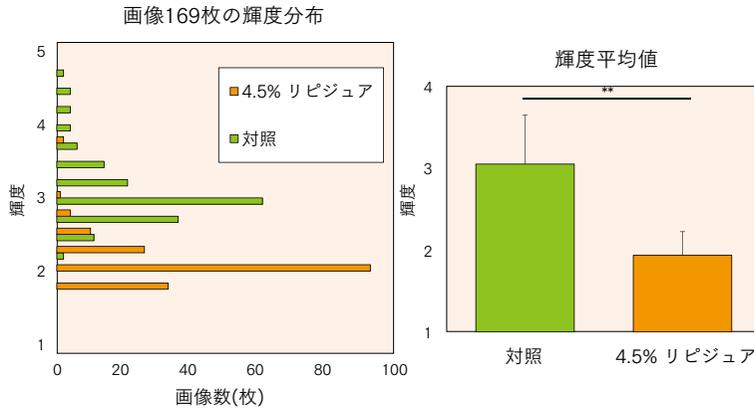


図8：共焦点レーザー顕微鏡画像の輝度の度数分布 (A) と輝度平均値 (B)

全視野における Spn の蛍光輝度分布をリピジュア処理群と対照とで比較すると、リピジュア処理群では輝度が低いものが多く (A)、輝度の平均値を比較すると、リピジュア処理群で有意に低値であった (B)。\*\* $p < 0.01$ 。

#### ④ NTHi の細胞内侵入に対するリピジュアの抑制効果

NTHi でリピジュアの細胞侵入に対する効果を検討した。その結果、細菌接着と同様に、上皮細胞のリピジュア処理により NTHi の細胞内侵入が無処理群と比較して有意に抑制された。(図9)

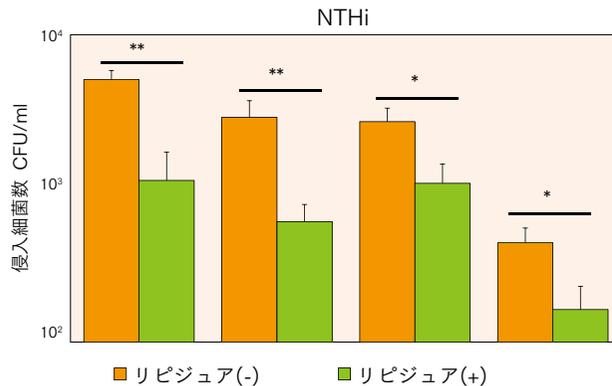


図9：NTHi の細胞内侵入に対するリピジュアの抑制効果

上皮細胞をリピジュアで処理することで細胞内侵入が有意に抑制された。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ 。

## 考 察

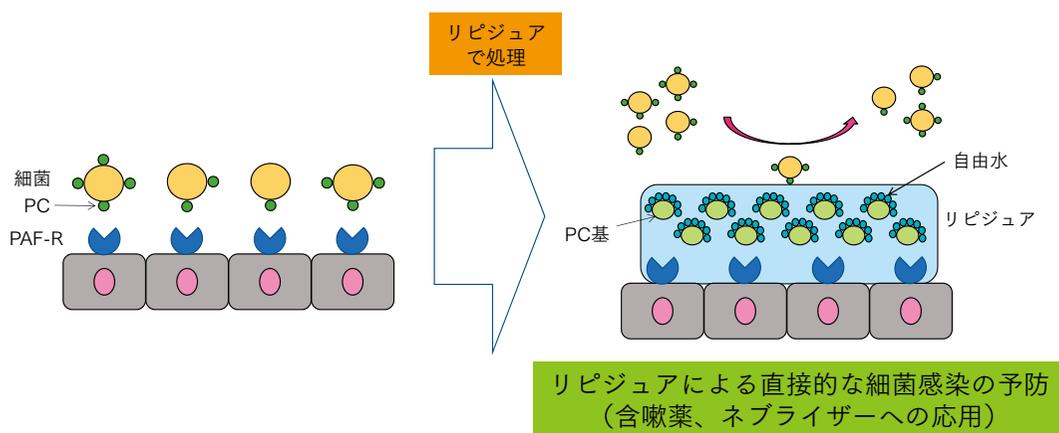
リピジュアは、PC 基と重合性に優れたメタクリル酸エステルを有する 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンをポリマー化した重合体制剤<sup>9)</sup>、ヒトの細胞膜の構造と類似しているため生体への親和性が極めて高く、血液凝固反応や免疫反応などの生体反応を回避する作用を有する。その利点を生かし、すでに補助人工心臓や血管内ステントのコーティング材料として応用されている<sup>10,11)</sup>。また、歯肉上皮細胞をリピジュアでコーティングすると、齲歯の原因となる *Streptococcus mutans* の付着が抑制されることが報告

されている<sup>5)</sup>。今回の実験では、リピジュアが濃度依存性に Detroit 562 cells に接着し、異なる2つの実験系において、リピジュアで Detroit 562 cells を処理すると Spn と NTHi の接着を抑制した。しかし、この作用はリピジュアの濃度が少なくとも 0.5% 以上と比較的高濃度でないと認められず、リピジュアの基材となる PC が血小板活性化因子受容体 (PAF-R) と結合するのではなく、3D 解析で確認したように、単に上皮細胞の表面をコーティングしていることで細菌の接着を阻止していると思われる。その根拠として、細菌の細胞壁を構成するタンパク質の吸着は、タンパク質が持つ結合水とリピジュア表面の自由水による疎水性相互作用が重要な役割を果たしていることが知られている<sup>9,12)</sup>。事実、リピジュアの自由水含量の増加に伴いタンパク質吸着量が低下する<sup>13)</sup>。したがって、0.5% 以上の濃度のリピジュアは PC 基周囲に多量の自由水が存在し、細菌の細胞壁を構成するタンパク質の吸着を阻害するため、細菌の接着が抑制されたと考えられ、Hirota ら<sup>14)</sup>はこれをリピジュアの superhydrophilicity (超親水性効果)と呼んでいる。

上気道感染症は Spn、NTHi が上皮細胞へ接着することから始まる。リピジュアの基材となっている PC はこれらの細菌の細胞壁の構成成分であり、前述したようにこれが上皮細胞表面に存在する PAF-R と結合して細菌の上皮細胞への接着をもたらす。Spn の接着因子としては PC 以外にも pneumococcal surface adhesion A (PsaA) や plasmin- and fibronectin-binding protein A (PfbA) などの役割が明らかになってきている<sup>15,16)</sup>。PsaA は Spn の表面に露出する 37KDa の多機能性リポタンパク質で、Spn のすべての血清型で検出される<sup>15)</sup>。また、PfbA は Spn の表面タンパク質であり、細胞外マトリックス (ECM) 分子のフィブロネクチンならびにプラスミノゲンおよびヒト血清アルブミンのような血液タンパク質を認識することによって、細菌の接着を促進する<sup>16)</sup>。一方、NTHi の接着においては、線毛 (hemagglutinating pili)、接着蛋白 High-molecular-weight (HMW) I、HMW2、Hia などにも関与する<sup>17,18)</sup>。したがって、リピジュアは PC に限らず様々なタンパク質からなる接着因子の細胞表面への結合を抑制することで Spn や NTHi の接着および細胞内侵入を阻止し、PC の局所投与以上の効果を有すると期待される。

## 結 語

リピジュアを上皮細胞に添加することでSpnやNTHiの接着および細胞内侵入が阻止された。したがって、リピジュアを含嗽薬やネブライザー薬などとして使用すれば、SpnやNTHiによる上気道感染症を予防できる可能性がある。さらに、リピジュアは保湿効果も有することが報告されており、高齢者で問題となる口腔内乾燥症そして嚥下性肺炎の予防薬としても応用できることが期待される。



## 参考文献

- 1) Eskola J, Kilpi T, Palmu A, et al: Efficacy of a pneumococcal conjugate vaccine against acute otitis media. *N Engl J Med* 2001;344:403-409.
- 2) Kunisada T, Tsukamoto M, Yashiro J. Antimicrobial Activity of PVP-I Preparations against Oral Cavity Bacteria and Yeast. *Clinical report* 1994;28:2797-2804.
- 3) Baba S, Kobayashi T, Unno T, et al. Evaluation of the efficacy of cefmenoxime (CMX) nebulization therapy in sinusitis. *Otologia Fukuoka* 1991;37:851-880.
- 4) Lewis AL, Cumming ZL, Goreish HH, et al. Crosslinkable coatings from phosphorylcholine-based polymers. *Biomaterials* 2001;22:99-111.
- 5) Hirota K, Yumoto H, Miyamoto K, et al. MPC-polymer Reduces adherence and biofilm formation by oral bacteria. *J Dent Res* 2011;90:900-905.
- 6) Ishihara K. Phospholipid polymers for Contributing to elderly persons medical care. *Oleoscience* 2013;13:3-9.
- 7) Ishihara K, Ueda T, Nakabayashi N. Preparation of phospholipid polymers and their properties as polymer hydrogel membranes. *polymer Journal* 1990;22:355-360.
- 8) Kurono Y, Shimamura K, Shigemi H, et al. Inhibition of bacterial adherence by nasopharyngeal secretions. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1991;100:455-458.
- 9) Ishihara K, Inoue Y, Matsusho R. Nanobiofunctions on cell membrane-inspired polymer materials. *MEMBRANE* 2010;35:217-223.
- 10) Kihara S, Yamazaki K, Litwak KN, et al. In vivo evaluation of a MPC polymer coated continuous flow left ventricular assist system. *Artif Organs* 2003;27:188-192.

- 11) Lewis AL, Tolhurst LA, Stratford PW: Analysis of a phosphorylcholine-based polymer coating on a coronary stent pre- and post-implantation. *Biomaterials* 2002;23:1697-1706.
- 12) Lu DR, Lee SJ, Park K. Calculation of solvation interaction energies for protein adsorption on polymer surface. *J Biomater Sci Polym Ed* 1991;3:127-147.
- 13) Ishihara K, Nomura H, Mihara T, et al. Why do phospholipid polymers reduce protein adsorption? *Journal of Biomedical Materials Research* 1998;39:323-330.
- 14) Hirota K, Murakami K, Nemoto K, et al: Coating of a surface with 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) co-polymer significantly reduces retention of human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 2005;248:37-45.
- 15) Rajam G, Anderton JM, Carlone GM, et al. Pneumococcal Surface adhesin A (PsaA): a review. *Crit Rev in Microbiol* 2008;34:131-142.
- 16) Yamaguchi M, Terao Y, Mori Y, et al. PfbA, a Novel Plasmin- and Fibronectin-binding Protein of *Streptococcus pneumoniae*, Contributes to Fibronectin-dependent Adhesion and Antiphagocytosis. *J Biol Chem* 2008;283:36272-36279.
- 17) Barenkamp S J, Leininger E. Cloning, expression, and DNA sequence analysis of genes encoding nontypeable *Haemophilus influenzae* high-molecular-weight surface-exposed proteins related to filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 1992;60:1302-1313.
- 18) Nishi J, Imuta N, Kamenosono A, et al. Prevalence of adhesin genes and biofilm formation among clinical isolates of nontypable *Haemophilus influenzae*. *Japanese journal of pediatric pulmonology* 2006;17:143-150.

## 2) リピジュアによるバイオフィルム形成の抑制

### 〈Summary〉

ホスホリルコリン重合体 (MPC polymer: リピジュア) は、肺炎球菌 (Spn) およびインフルエンザ菌 (NTHi) の上皮細胞への接着および細胞内侵入の抑制効果を有している。そこで、細菌接着のあとに生じるバイオフィルム形成に対するリピジュアの抑制効果を、バイオフィルム産生株である NTHi を用いて検討した。

その結果、ポリスチレンプレートをリピジュアで前処理することで、有意にインフルエンザ菌によるバイオフィルム形成量が抑制されることが確認された。また、頬粘膜上皮細胞における NTHi のバイオフィルム形成もリピジュアにより抑制された。これらのことから、リピジュアを含嗽薬やネブライザー薬などの局所療法薬として使用することで、NTHi による上気道感染症を予防できるだけでなく、細菌のバイオフィルム形成を阻止し、感染の遷延化や難治化を予防しうることが示唆された。

### はじめに

中耳炎や副鼻腔炎の主要な起炎菌である無莢膜型インフルエンザ菌 (NTHi) は、感染局所粘膜上でバイオフィルムを形成し、感染の遷延化や難治化と関連していることが報告されている<sup>1-3)</sup>。バイオフィルムは食細胞による貪食作用を阻止し、気道に分泌される抗菌活性物質や分泌型 IgA、さらにはペニシリン系やセフェム系抗菌薬の細菌に対する作用を妨げる。クラリスロマイシン (CAM) やシプロフロキサシン (CPFX) などの一部の抗菌薬がバイオフィルム形成を抑制することが知られている<sup>4,5)</sup>ものの、多剤耐性菌が年々増加している観点から、遷延化や難治化した症例に対しこれらの抗菌薬を長期間使用することは望ましいことではない。細菌がバイオフィルムを産生するには、その前段階として細菌の宿主細胞への接着が必要である。すなわち、細菌の接着を阻止することで、バイオフィルム形成が抑制されることが期待される。前項では、ホスホリルコリン重合体 (MPC polymer: リピジュア) を上皮細胞に添加することで NTHi の接着および細胞内侵入が阻止されることを証明した。そこで、本実験ではリピジュアにより NTHi の接着が阻止された結果として、バイオフィルムの形成が抑制されるか否かを検討した。

### 材料と方法

#### ① 細菌

本実験には、第Ⅶ章1-2) で用いた滲出性中耳炎患者の上咽頭から分離された NTHi のなかで、最もバイオフィルム形成能の高い菌株 (Strain1) を用いた。

#### ② バイオフィルム形成とリピジュアによる抑制効果

NTHi を brain heart infusion (BHI: Difco Laboratories, Detroit, MI) 培養液で6時間培

養し、log phase に達した時点で  $10^6$ CFU/ml に調整し、これを 96 穴マイクロプレートに 200 $\mu$ l ずつ添加した。37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 下で 24 時間培養した後に洗浄し、0.5% クリスタルバイオレット (CV) 100 $\mu$ l で 15 分間染色し、蒸留水で洗浄し風乾した。その後、95% エタノールで溶解し、ELISA プレートリーダーで吸光度 (595nm) を測定した。(図 1) さらにリピジュアによるバイオフィーム形成の抑制効果を観察するため、NTHi を添加する前にマイクロプレートを 5% リピジュアで処理し、室温で 1 分間処理した後、同様の方法でバイオフィーム形成量を定量した。

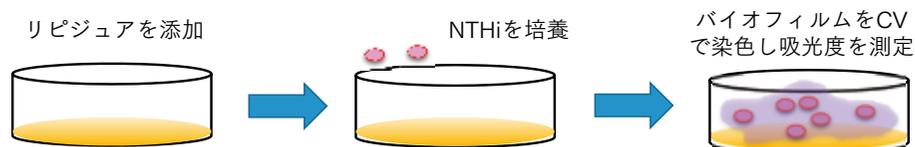


図 1: マイクロプレート上での NTHi によるバイオフィーム形成の実験方法

### ③ ヒト頬粘膜上皮細胞へのリピジュアの付着性

ヒトの頬粘膜を綿棒で擦過し、PBS 内に攪拌して頬粘膜上皮細胞浮遊液を作成した。チューブ内で、頬粘膜上皮細胞を FITC 標識の 5% リピジュアで 5 分間処理し、サイトスピンを用いてスライドガラスに単層塗抹標本を作製し、蛍光顕微鏡で観察した。

### ④ リピジュアによる頬粘膜上皮細胞上でのバイオフィーム形成の抑制

ヒト頬粘膜上皮細胞浮遊液を 96 穴マイクロプレートに分注し、これに 5% リピジュアを 200 $\mu$ l 添加し 5 分間処理した。そして、BHI 培養液で 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 下に一晚培養し、 $1.0 \times 10^8$ CFU/ml (吸光度 590nm) に調整した NTHi を 10 $\mu$ l ずつプレートに添加した。これを 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 下で 1 時間培養して細菌を上皮に接着させた後、上皮細胞に接着していない細菌を洗浄除去した。さらに 24 時間培養した後、培養液を除去し、バイオフィームを Alexa 488 で標識された concanavalin A および lectin PNA (Thermo Fisher SCIENTIFIC) で 30 分間染色を行い、蛍光顕微鏡で観察した。(図 2) なお対照として、リピジュアで前処理をしない頬粘膜上皮細胞でも同様の実験を行い、バイオフィームの形成を蛍光顕微鏡下に観察した。

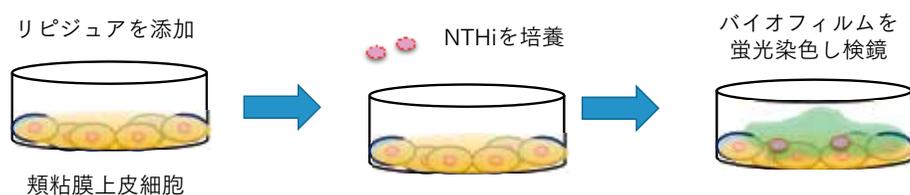


図 2: ヒト頬粘膜上皮細胞表面での NTHi によるバイオフィーム形成の実験方法

## 結 果

### ① リピジュアの細胞への付着性

頬粘膜上皮細胞に FITC で標識されたリピジュアが付着していることが蛍光顕微鏡にて観察された。(図3)

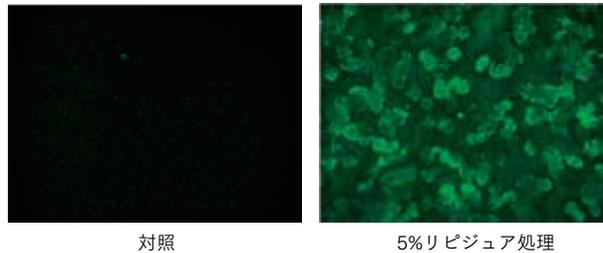


図3：リピジュアの細胞への付着

FITC で標識された5% リピジュアが頬粘膜上皮細胞に付着していることが観察される。

### ② リピジュアによるバイオフィーム形成抑制効果

96穴マイクロプレート内で NTHi を培養したところ、バイオフィームの形成を認めた。そこで、NTHi を添加する前にこのマイクロプレートをリピジュアで前処理すると、バイオフィームの形成が有意に抑制された。(図4) 頬粘膜細胞においても、NTHi の培を細胞上で培養することでバイオフィームの形成が認められた。そこで、この頬粘膜上皮細胞を

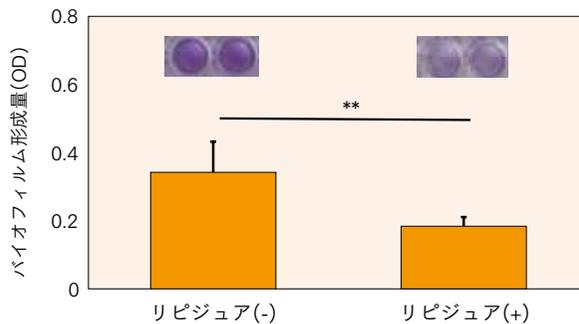


図4：リピジュア処理によるバイオフィーム形成の抑制

マイクロプレートを5% リピジュアで処理することで、NTHi によるバイオフィーム形成が有意に抑制された。 \*\*p < 0.01.

リピジュアで前処理すると、その形成が著明に抑制された。(図5)

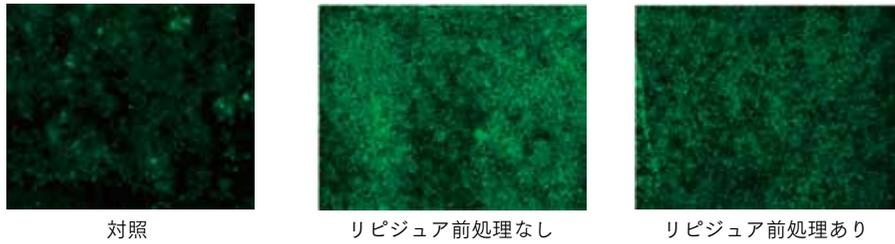


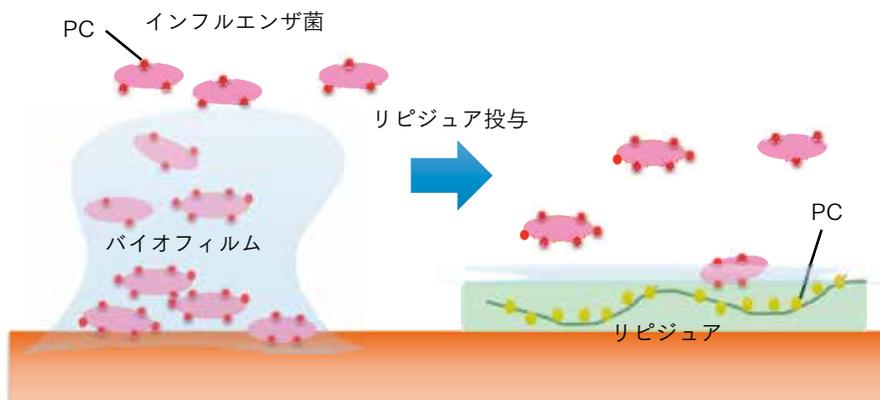
図5：ヒト頬粘膜上皮細胞上でのバイオフィーム形成とリピジュアによる抑制  
リピジュア前処理により、頬粘膜上皮細胞上の NTHi によるバイオフィーム形成が抑制された。

### 考 察

中耳炎や副鼻腔炎の主要な起炎菌である NTHi は、感染局所粘膜上でバイオフィームを形成し、感染の遷延化や難治化と関連していることが報告されている<sup>1-3)</sup>。また、バイオフィーム内に存在する菌が浮遊菌として放出されることで反復性感染症にも関与していると考えられている<sup>6,7)</sup>。細菌がバイオフィームを形成するためには、宿主細胞への接着が必要である。したがって、細胞への接着を阻害することがバイオフィーム形成の抑制につながることを期待される。細菌の接着には、線毛 (pili) や鞭毛 (flagella) の役割が明らかになっている。その他、ファンデルワールス力や静電気などの物理的な要因も考えられている<sup>7,8)</sup>。また、細菌は疎水性で非極性の表面により接着しやすい傾向がある<sup>9,10)</sup>。リピジュアは細胞膜と同じリン脂質類似構造を持つため、細胞への親和性が極めて高い。更に、リピジュアでコーティングされた表面は、非常に高い親水性を持つことで、蛋白質の吸着や細菌の接着が抑制されると考えられている<sup>11,12)</sup>。本検討においても、リピジュアによりマイクロプレートおよび頬粘膜上皮細胞上における NTHi の接着が阻止され、結果としてバイオフィーム形成が抑制されることが示された。最近になって、肺炎球菌 (Spn) が NTHi のバイオフィーム内に共存するだけでなく、NTHi のバイオフィーム形成を促進することが分かってきている<sup>13)</sup>。リピジュアは Spn と NTHi の両細菌の接着を抑制するため、NTHi のバイオフィーム形成を阻止するとともに、Spn による NTHi のバイオフィーム形成促進も阻止すると考えられる。これらのことからリピジュアを鼻副鼻腔にネブライザーとしてあるいは咽頭に含嗽水として局所投与することで、細菌のバイオフィーム形成を抑制し、感染の反復や遷延化、難治化を予防しうることが期待される。

### 結 語

リピジュアを上皮細胞に添加することで NTHi の接着が阻害され、その結果としてバイオフィーム形成が抑制された。したがって、リピジュアを含嗽薬やネブライザー薬などとして使用すれば、Spn や NTHi による上気道感染症を予防できるだけでなく、バイオフィーム形成も抑制することで、感染の遷延化や難治化を予防できると考えられる。



## 参考文献

- 1) Post JC. Direct evidence of bacterial biofilms in otitis media. *Laryngoscope* 2001;111:2083-2094.
- 2) Hall-Stoodley H, Hu FZ, Gieseke A et al. Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media. *JAMA* 2006;296:202-211.
- 3) Sanderson AR, Leid JG, Hunsaker D. Bacterial biofilms on the sinus mucosa of human subjects with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* 2006;116:1121-1126.
- 4) Kowikowska U, Andrzejczuk S, Plech T, et al. Inhibitory effect of 1, 2, 4-triazole-ciprofloxacin hybrids on *Haemophilus parainfluenzae* and *Haemophilus influenzae* biofilm formation in vitro under stationary conditions. *Res Microbiol* 2016;167:647-654.
- 5) Slinger R, Chan F, Ferris W, et al. Multiple combination antibiotic susceptibility testing of nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilms. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006;56:247-253.
- 6) Bauer TT, Torres A, Ferris W, et al. Biofilm formation in endotracheal tubes. Association between pneumonia and the persistence of pathogens. *Monaldi Arch Chest Dis* 2002;57:84-87.
- 7) Garrett TR, Bhakoo M, Zhang Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Prog Nat Sci* 2008;18:1049-1056.
- 8) Maric S, Vranes J. Characteristics and significance of microbial biofilm formation. *Period Bilogor* 2007;109:115-121.
- 9) Pringle JH, Fletcher M. Influence of substratum wettability on attachment of freshwater bacteria to solid surfaces. *Appl Environ Microbiol* 1983;45:811-817.
- 10) Bendinger B, Rijnaarts HH, Altendorf K, et al. Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Appl Environ Microbiol* 1993;59:3973-3977.
- 11) Iwasaki Y, Aiba Y, Morimoto N, et al. Semiinterpenetrating polymer networks composed of biocompatible phospholipid polymer and segmented polyurethane. *J Biomed Mater Res* 2000;52:701-708.
- 12) Hirota K, Fukumoto K, Iwasaki Y, et al. Coating of a surface with 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) co-polymer significantly reduces retention of human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 2005;248:37-45.
- 13) Krishnamurthy A, Kyd J. The roles of epithelial cell contact, respiratory bacterial interactions and phosphorylcholine in promoting biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae* and nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Microbes Infect* 2014;16:640-647.
- 14) Gracia-Rodriguez JA, Martinez MJF. Dynamics of nasopharyngeal colonization by potential respiratory pathogens. *J Antimicrob Chemother* 2002;50:59-73.

# 〈総括〉

## 1. ホスホリルコリン粘膜ワクチンによる粘膜免疫応答の誘導

ホスホリルコリン（PC）はすべてのグラム陽性および陰性菌の構成因子であり、細菌の接着や侵入に重要な役割を担っていることから、広域スペクトラムを持つワクチンとして期待される。そこで、PCを経鼻および舌下投与したところ、PC特異的粘膜および全身免疫応答が誘導された。さらに、このPC特異的粘膜免疫応答によって産生される分泌型IgAは、肺炎球菌やインフルエンザ菌の上気道粘膜上皮への接着を阻止し、上気道粘膜からのこれら細菌のクリアランスを亢進した。

## 2. PC粘膜ワクチンによるアレルギー性鼻炎の抑制

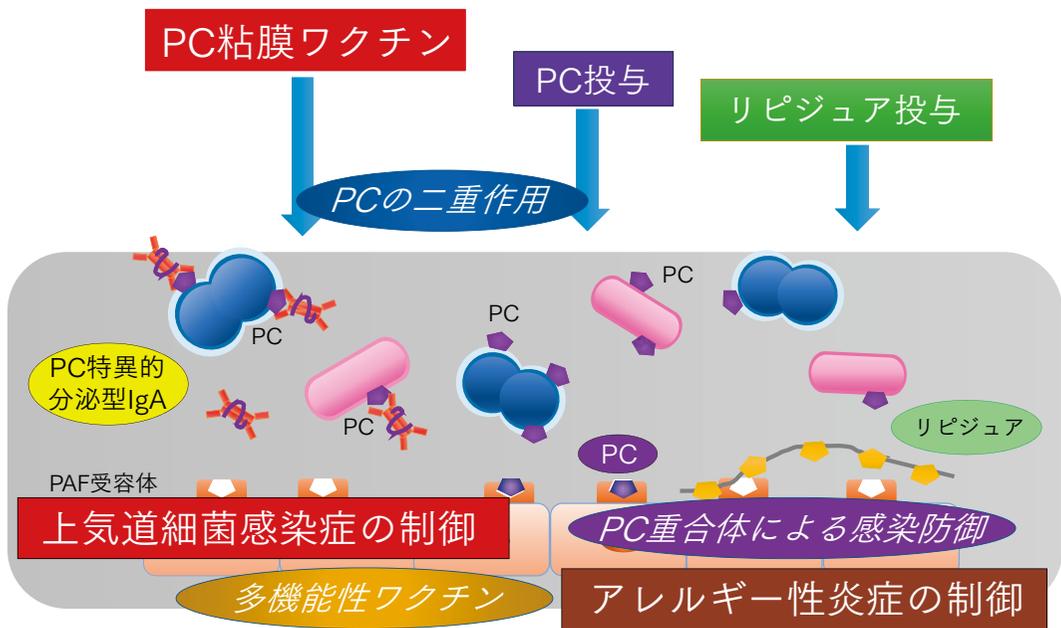
PCを経鼻あるいは舌下投与するとIgEの産生が抑制された。そこで、卵白アルブミン（OVA）感作前そして感作後にPC粘膜ワクチンを投与し、アレルギー性鼻炎に対する作用を観察したところ、PC粘膜ワクチン投与群では、アレルギー性鼻炎の症状、OVA特異的IgE、鼻粘膜組織局所の浮腫や好酸球浸潤が対照群と比較して有意に抑制された。したがって、PC粘膜ワクチンは、上気道細菌感染に加えてI型アレルギー性炎症の制御も可能な多機能性ワクチンとなりうることが示唆された。

## 3. PCの直接作用による細菌感染防御

細菌の上皮細胞へ接着そして細胞内侵入に、PCとPAF受容体との結合が関与することが知られている。そこで、上皮細胞をPCあるいはPAF受容体拮抗薬で、さらに細菌をPC特異的IgAで前処理したところ、肺炎球菌およびインフルエンザ菌の上皮細胞への接着ならびに細胞内への侵入、さらにインフルエンザ菌によるバイオフィルムの形成が有意に抑制された。これらの結果から、PCが粘膜免疫応答を誘導するだけでなく、PAF受容体と結合して直接細菌感染を予防する、二重の作用を有すると考えられた。

## 4. リピジュアによる感染防御

PC重合体のリピジュアは、細胞膜と同じリン脂質類似構造を持つため生体への親和性が極めて高く、高親水性を持つため様々な蛋白質の吸着を抑制し、その利点を活かして化粧品やコンタクトレンズ保存液などにすでに使用されている。そこで、リピジュアによる細菌接着の抑制作用を観察したところ、リピジュアで上皮細胞を処理することで、肺炎球菌およびインフルエンザ菌の上皮細胞への接着ならびに細胞内侵入、さらにインフルエンザ菌によるバイオフィルムの形成が著明に抑制された。したがって、リピジュアの局所投与によって細菌感染の防御が可能であり、リピジュアを含嗽薬やネブライザー薬などの局所療法薬として応用できることが示唆された。



## 謝 辞

.....

本宿題報告「上気道炎症の粘膜ワクチンによる制御」を発表する榮譽を与えていただいた第119回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会会長の山唄達也教授ならびに森山 寛理事長、そして日本耳鼻咽喉科学会の役員および会員各位に深謝いたします。また、司会の労をお取りいただいた山中 昇先生に厚く御礼を申し上げます。

今回、これまでの研究成果を宿題報告として発表し、またモノグラフとして発刊できたのは、すべて鹿児島大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学教室の全教室員の結集と弛まぬ努力の賜物であり、物心両面で多大なご支援をいただいた鹿児島県地方部会ならびに鹿児島大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学教室同門会各位のお陰です。また、アラバマ大学留学時代そして帰国後にご指導いただいた清野宏教授、Jerry R. McGhee 教授、藤橋浩太郎教授、故山本正文教授のご指導とご協力がなければ成しえなかったことです。そして、私を粘膜免疫の世界へと導き、育てていただいた故茂木五郎先生、故大山 勝先生、David Lim 先生との出会いが、このような素晴らしい機会を与えてくれました。そのほかにもたくさんの方々にお世話になりました。

言葉で到底言い尽くすことはできませんが、皆様一人一人に改めて感謝申し上げます。ありがとうございました。

2018年5月吉日  
黒野祐一

## 共同研究者

鹿児島大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学教室

宮之原郁代、西元謙吾、高木 実、森園健介、吉福孝介、積山幸祐、大堀純一郎、永野広海、間世田佳子、谷本洋一郎、宮下圭一、原田みずえ、川畠雅樹、牧瀬高穂、馬越瑞夫、田淵みな子、井内寛之、地村友宏、宮本佑美、久徳貴之、松元隼人、伊東小都子、松崎尚寛

片平聖子、大夫堀昌子、宮内愛奈

福岩達哉（ふくいわ耳鼻咽喉科クリニック）、福山 聡（東京大学医科学研究所）

田中紀充（かもいけ耳鼻咽喉科クリニック）、松根彰志（日本医科大学）

大分大学耳鼻咽喉科学講座

鈴木正志 先生（大分大学耳鼻咽喉科学講座 教授）

平野 隆 先生（大分大学耳鼻咽喉科学講座 講師）

## 研究協力者

清野 宏 先生（カリフォルニア大学サンディエゴ校）

Jerry R. McGhee 先生（アラバマ大学ワクチンセンター）

藤橋浩太郎 先生（東京大学医科学研究所）

浅沼秀樹 先生（国立感染症研究所）

日油（株）

タイムラプスビジョン（株）

## 後 援

日本耳鼻咽喉科学会 鹿児島県地方部会

鹿児島大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学教室同門会

大分大学耳鼻咽喉科学講座同門会

## ① 文部科学研究費、学術振興会研究費

| 研究種別     | 研究課題名                                       | 研究者名   | 年 度         |
|----------|---|--|-------------|
| 基盤研究 (B) | アデノイド・扁桃 (NALT) における粘膜免疫応答とその制御機構           | 黒野祐一 松根彰志<br>河野もと子 一宮一成                            | 平成 9～11 年度  |
| 基盤研究 (A) | 上気道粘膜免疫機構と経鼻粘膜ワクチン開発の研究                     | 茂木五郎 鈴木正志<br>清野 宏 川端五十鈴<br>岡本美孝 山中 昇<br>川内秀之 黒野祐一  | 平成 10～11 年度 |
| 基盤研究 (C) | 鼻アレルギーにおけるヘルパー T 細胞のサイトカイン産生能と治療効果に関する研究    | 黒野祐一 松根彰志<br>出口浩二 宮之原郁代<br>西元謙吾                    | 平成 11～12 年度 |
| 基盤研究 (B) | 上気道感染症予防ワクチンの開発とその粘膜免疫応答に関する基礎的研究           | 黒野祐一 松根彰志<br>牛飼雅人 宮之原郁代<br>出口浩二                    | 平成 11～13 年度 |
| 基盤研究 (C) | 組換え抗原を用いたインフルエンザ菌に対する経鼻粘膜ワクチンの開発・研究         | 福岩達哉 黒野祐一  | 平成 13～15 年度 |
| 基盤研究 (B) | 経鼻免疫応答の多様性と増幅機構に関する研究 - 粘膜ワクチンの実用化に向けて -    | 黒野祐一 松根彰志<br>牛飼雅人 宮之原郁代<br>福岩達哉 明石 満               | 平成 14～16 年度 |
| 基盤研究 (B) | 新世代広域スペクトラム経鼻ワクチンの開発とその有効性に関する研究            | 黒野祐一 松根彰志<br>西元謙吾 福岩達哉<br>小田 紘                     | 平成 17～19 年度 |
| 若手研究 (B) | IgA 腎症における口蓋扁桃 B 細胞の免疫学的作用 ～扁桃の適応基準設定をめざして～ | 田中紀充   | 平成 18～19 年度 |
| 若手研究 (B) | 長期持続型経鼻ワクチンの開発とその有効性に関する研究                  | 福岩達哉   | 平成 19～21 年度 |
| 基盤研究 (C) | 舌下免疫 - 粘膜ワクチンの新たな投与経路としての有用性に関する研究          | 黒野祐一 松根彰志<br>田中紀充 吉福孝介<br>大堀純一郎 福岩達哉               | 平成 20～22 年度 |
| 若手研究 (B) | 鼻アレルギーマウスモデルを用いた粘膜免疫の検討                     | 田中紀充   | 平成 20～21 年度 |
| 基盤研究 (C) | 経皮免疫による上気道粘膜免疫の誘導                           | 早水佳子 黒野祐一<br>宮下圭一 永野広海<br>牧瀬高穂 田中紀充                | 平成 22～24 年度 |
| 若手研究 (B) | 粘膜ワクチンによる I 型アレルギーの誘導機序とその制御に関する研究          | 宮下圭一   | 平成 23～24 年度 |
| 若手研究 (B) | Phosphorylcholine 経皮投与による粘膜免疫応答の誘導と制御機構の解明  | 永野広海   | 平成 24～25 年度 |
| 基盤研究 (C) | ホスホリルコリンを用いた多機能性粘膜ワクチンの開発                   | 黒野祐一 永野広海<br>間世田佳子 宮下圭一<br>川島雅樹 牧瀬高穂               | 平成 25～27 年度 |
| 基盤研究 (C) | ホスホリルコリンの二相作用を応用した新たな粘膜ワクチンの開発              | 黒野祐一 大堀純一郎<br>永野広海 宮下圭一<br>牧瀬高穂 原田みづえ<br>井内寛之 地村友宏 | 平成 28～30 年度 |
| 基盤研究 (C) | 粘膜免疫応答誘導型経皮ワクチンの開発                          | 永野広海 黒野祐一<br>宮下圭一 牧瀬高穂<br>地村友宏                     | 平成 28～30 年度 |

| 研究種別     | 研究課題名                                     | 研究者名  | 年 度         |
|----------|---|---|-------------|
| 若手研究 (B) | IgA 腎症における口蓋扁桃の免疫応答と新たなバイオマーカーの開発         | 地村友宏  | 平成 28～29 年度 |
| 基盤研究 (C) | 鼻咽腔関連リンパ組織 (NALT) の免疫記憶機能を応用した新規粘膜ワクチンの開発 | 大堀純一郎 黒野祐一<br>宮下圭一 井内寛之<br>地村友宏               | 平成 29～31 年度 |
| 基盤研究 (C) | ホスホリルコリン経鼻免疫追加によるあらたな肺炎球菌ワクチン接種プログラムの開発   | 間世田佳子 黒野祐一<br>大堀純一郎 永野広海<br>川島雅樹 井内寛之<br>地村友宏 | 平成 29～31 年度 |
| 若手研究 (B) | ホスホリルコリン舌下投与によるアレルギー性鼻炎の制御に関する研究          | 牧瀬高穂  | 平成 29～31 年度 |

## ② 厚生労働科学研究費

| 研究事業名               | 研究課題名   | 研究者名                                 | 年 度         |
|---------------------|---|--------------------------------------|-------------|
| 免疫アレルギー疾患予防・治療等研究事業 | アレルギーにおける粘膜免疫を基点とした全身・皮膚免疫クロスネットワークシステムの解明と予防へ向けた基礎研究 | 清野 宏<br>高津聖志<br>黒野祐一<br>高橋一郎<br>権 美那 | 平成 14～16 年度 |

## ③ 日本医療研究開発機構 (AMED)

| 研究課題名                       | 研究者名   | 年 度         |
|-----------------------------|--|-------------|
| 粘膜免疫誘導型インフルエンザワクチンの開発に向けた研究 | 長谷川秀樹 有木宏美<br>磯部正治 一戸猛志<br>五味康行 後藤希代子<br>浅沼秀樹 山本典生<br>氏家 誠 前山順一<br>関根伸一 黒野祐一 | 平成 28～30 年度 |

---

## 上気道炎症の粘膜ワクチンによる制御

宿題報告 2018

平成 30 年 5 月 発行

著 者 / 黒野 祐一  
発 行 / 鹿児島大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学教室  
鹿児島市桜ヶ丘 8-35-1  
電話 (099) 275-5410  
印刷・製本 / 斯文堂株式会社  
鹿児島市南栄 2-12-6  
電話 (099) 268-8211

---

