

平成30年6月29日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10758

研究課題名(和文) 母体免疫による母乳を介した免疫再構築による乳幼児期感染予防の新戦略の研究

研究課題名(英文) Immunological reconstruction of neonate immunity by breast milk of maternal immunization

研究代表者

保富 宗城 (Muneki, Hotomi)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：90336892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：肺炎球菌の表面蛋白抗原PspAを用いて母体経鼻免疫後の母乳栄養による乳幼児期の免疫システムの構築について検討した。母体経鼻免疫母マウスより生まれた仔マウスでは血清中の特異的抗体価は高値を示した。また、免疫母マウスによる母乳哺育を受けた仔マウスでは、生後6週齢においても抗原再刺激により特異的抗体の再活性が認められた。これらの結果から、母体経鼻免疫では母乳を介して新生児マウスに免疫応答が移行し、仔マウスでの免疫学的な記憶が誘導されることが判明した。母体免疫では、IgG抗体を主体とする胎盤移行抗体が新生児期の未熟な免疫能を補うのみでなく、母乳栄養が乳幼児期の免疫応答に重要な役割を果たすと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated infantile immune system by breast milk feeding after maternal nasal immunization using pneumococcal surface protein antigen PspA. Anti-PspA specific IgG in sera was high in pups born from maternal nasal immunized mother mice. In addition, in pups who received breast-feeding by immunized mother, reactivation of anti-PspA specific IgG was recognized by PspA stimulation even at the age of 6 weeks of age. These results revealed that immune responses in maternal immunity were transferred to neonatal mice via breast milk and immunological memory was induced in their pups. In maternal immunization, not only placental transfer of specific antibody but breast milk feeding also play the important role in the supplemented immature immunity at neonatal period.

研究分野：医師薬学

キーワード：母体免疫 肺炎球菌 母乳栄養 免疫学的記憶

### 1. 研究開始当初の背景

急性中耳炎は、乳幼児期に頻回に罹患する細菌感染症であり、近年の起炎菌の薬剤耐性化の急増に伴い、反復例・遷延例が増加し、ワクチンによる予防が注目されている。一方、急性中耳炎の難治化には、宿主免疫能の影響、とりわけ2歳以下の乳幼児期における免疫学的未成熟による低免疫応答も深く関与することが知られている。また、母乳栄養は、乳幼児期における鼻咽腔への病原微生物の定着保菌を抑制し、急性中耳炎の罹患率を下げる事が知られている。そのため、母乳栄養は乳幼児期における免疫応答の構築に大きく関与すると考えられている。

肺炎球菌は、生後3ヶ月頃より鼻咽腔にコロニーを形成するとともに鼻咽腔常在細菌の一部を形成する。同時に、肺炎球菌は鼻咽腔からの経耳管感染により急性中耳炎を発症すると考えられている。現在、肺炎球菌ワクチンとしては、莢膜多糖体抗原を用いた23価莢膜多糖体多価ワクチンと7価蛋白接合型ワクチンが臨床使用されている。しかし、23価莢膜多糖体多価ワクチンでは、T細胞非依存性の抗原のためメモリーT細胞が形成されず、産生される抗体がIgMであるためブースター効果が認められない、乳幼児に対する反応は短期間であるなどの問題点がある。一方、蛋白結合型ワクチンではワクチン血清型に含まれる肺炎球菌に対しては有効性が期待されるが、非ワクチン血清型に対しては有効性が期待できず、血清型の交代現象が起こる点が今後の課題とされている。そのため、免疫学低未成熟な乳幼児期に長期間の特異的免疫応答の誘導が可能となる広く共通した肺炎球菌蛋白抗原ワクチンの開発が望まれている。

### 2. 研究の目的

本研究では、妊娠前の母親にワクチン接種を行なうことで乳幼児期における特異的免疫応答の誘導が可能となる母体免疫に着目し、母体免疫に伴う母乳栄養が、新生児期の肺炎球菌に対する免疫応答にどのように影響するかを解明することで、乳幼児期に効果的な感染予防法の確立に貢献することを目的とする。

乳幼児期は免疫能が未成熟であるため、母親からの母乳による免疫移行を受けることが可能である環境にあり、これを利用することで抗菌薬あるいは免疫グロブリン治療といった従来の方法とは異なる新たな細菌感染治療・予防の道が開かれると考える

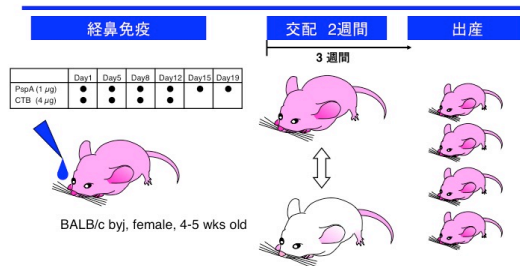
### 3. 研究の方法

#### (1) 母乳栄養を介した新生児マウスへの肺炎球菌特異的免疫応答の誘導

肺炎球菌表面蛋白抗原 PspA (10 $\mu$ g) にて雌マウス (BALB/c, 4週齢) を1週間に2回、3週間、計6回の経鼻免疫を行う。最初の2週間 (第1~4免疫) については、コレラトキ

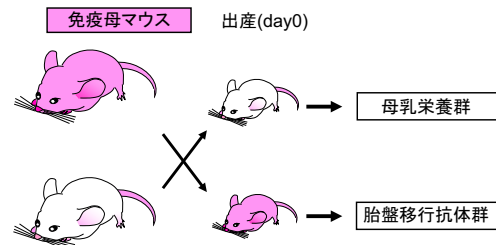
シン B (4 $\mu$ g) をアジュバントとして用い、3週間目 (第5~6免疫) は、PspAのみで行う。免疫後雄マウスと交配し、約3週間後に新生児マウスを得る。

母体経鼻免疫の方法



同時期に出産するように非免疫雌マウスを設定し、仔マウスを交換することで、以下の2群を作成する。

母体免疫由来母マウスの母乳栄養による新生児マウス免疫応答の検討



- 母乳栄養群: PspA 経鼻免疫母マウスが非免疫母マウスが出産した仔マウスを育てる群
- 胎盤移行抗体群: 非免疫母マウスが PspA 経鼻免疫母マウスが出産した仔マウスを育てる群

この各群における抗 PspA 特異的 IgG 抗体価の継時的変化を検討した。

#### (2) 母乳栄養を介した新生児マウスの肺炎球菌特異的免疫応答の免疫学的記憶の存在

(1) で作成した母体免疫仔マウスをさらに生後6週齢まで哺乳飼育する。6週齢目に、PspA 単独の皮下注射により再度抗原刺激を行なう。PspA 再刺激後3日後、7日後、14日後に仔マウスの抗 PspA 特異的免疫応答の変化について、血清中抗 PspA 特異的 IgG 抗体価を ELISA 法を用いて検討する。

#### (3) 母乳栄養を介した新生児マウスの肺炎球菌特異的免疫応答の免疫応答の移行

(1) で確立した母体免疫母マウス母乳哺育仔マウスモデルを C57BL/6-Tg (AG-EGFP) (グリーンマウス) に応用する。すなわち、PspA (10 $\mu$ g) にて雌グリーンマウスを1週間に2回、3週間、計6回の経鼻免疫を行う。最初の2週間 (第1~4免疫) については、コレラトキシン B (4 $\mu$ g) をアジュバントとして用い、3週間目 (第5~6免疫) は、PspAのみで行う。免疫後雄マウスと交配し、約3週間後に新生児マウスを得たの地、非免疫母マウス (C57BL/6) 由来の仔マウスと交換し母

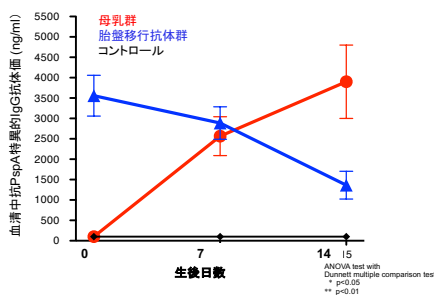
乳哺育させる。このモデルにより PspA 免疫母マウス（グリーンマウス）が、非免疫母マウス（C57BL/6）由来の仔マウスを母乳哺育する系を作成し、仔マウスへのグリーンマウス由来の免疫担当細胞の移行を検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 母乳栄養を介した新生児マウスへの肺炎球菌特異的免疫応答の誘導

新生児マウスの血清中抗 PspA 特異的抗体は、胎盤移行抗体群（非免疫母マウスが PspA 経鼻免疫母マウスが出産した仔マウスを育てる群）では継時的に出生直後に高値を示した血清中の抗 PspA 特異的 IgG 抗体価は継時的に低下を示し、3 週目では非免疫マウスのレベルまで低下した。一方、母乳栄養群（PspA 経鼻免疫母マウスが非免疫母マウスが出産した仔マウスを育てる群）では、経鼻免疫母由来の母乳栄養に伴い、新生児マウスの抗 PspA 特異的 IgG 抗体価は継時的に上昇した。

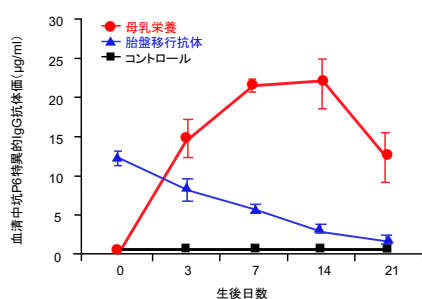
母乳栄養に伴う仔マウスへの母乳移行抗体の推移



\* コントロール群（非免疫群）では特異的抗体は認めず、陽性コントロール（胎盤移行抗体+母乳栄養）では高い特異的抗体価が維持された。

これらの母乳栄養による仔マウスの免疫応答の維持は、母乳栄養期間と関係す流と考えられる。インフルエンザ菌 P6 を用いた検討では、母乳を介した特異抗体の移行は、授

母乳移行抗体による免疫応答の持続

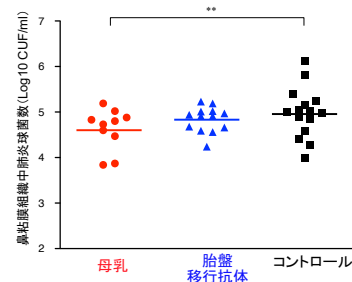


乳保育が終了する 14 日から 21 日齢にかけて徐々に低下すること、また、胎盤移行抗体も十にゅう期間である 14 日から 21 日目で非免疫コントロールと同様のレベルにまで低下した。このことは、急性中耳炎の反復性の獲

得すなわち、特異抗体を含む母乳栄養の期間が重要であるということとも一致する結果であった。

これらの仔マウスにおける特異的免疫応答の解析からさらに、母体免疫による感染予防の可能性の検討を行った。特異的免疫応答の維持には、胎盤移行抗体とともに母乳からの免疫移行が重要であり、両者を得た仔マウスへの肺炎球菌の腹腔内接種による敗血症モデルでは、母体免疫群（母乳栄養+胎盤移行抗体）での生存率の延長を認めた。また、母乳栄養によるマウス鼻咽腔への肺炎球菌の定着は、母乳栄養群では非免疫群に比べて

母乳栄養による仔マウス鼻咽腔における肺炎球菌定着の抑制



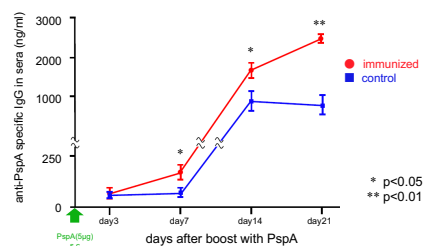
鼻咽腔における肺炎球菌数が減少した。同様に肺感染も同様に予防されることが確認されている。

##### (2) 母乳栄養を介した新生児マウスの肺炎球菌特異的免疫応答の免疫学的記憶の存在

新生児マウス血清中の抗 PspA 特異的 IgG 抗体価は、出生後より生後 3 週齢をピークに高値を示したのち緩やかに低下し、6 週齢では血清中 PspA 特異的 IgG 抗体価は測定感度

母体経鼻免疫による仔マウスへの免疫学的記憶

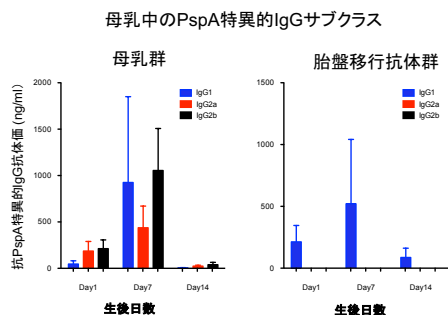
6週齢の子マウスにPspA(5 µg)を皮下接種



以下となった。その後、6 週齢において PspA 単独で再刺激を行なった結果、2 週例より抗 PspA 特異的 IgG 抗体の上昇を認め、3 週齢では有意に高い抗 PspA 特異的 IgG 抗体価を認めた。また、母体経鼻免疫母由来の仔マウスでは、追加免疫後での肺炎球菌の腹腔感染後の生存率が有意に延長した。

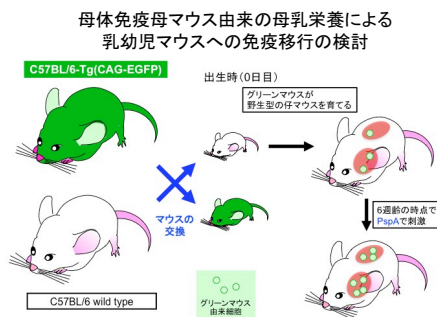
##### (3) 母乳栄養を介した新生児マウスの肺炎球菌特異的免疫応答の免疫応答の移行

母乳中の肺炎球菌特異的 IgG 抗体サブクラスの変化では、IgG1/IgG2a が優位であり、胎盤移行抗体では主に IgG1 が移行していると考えられた。



また、仔マウスの脾臓における免疫担当細胞の解析では、母乳栄養と胎盤移行抗体が得られた場合には、IL-17 賛成細胞が有意に増加していた。これらのことから、母体免疫では母乳及び胎盤移行を介して TH-17 系免疫応答が関与する可能性が示唆された。

さらに、(1)と同様に母体免疫を受けたグリーンマウス母親の母乳中に特異抗体の存在が示唆された。グリーンマウスとのペアリング及び個体の確保の調整が課題であり、非免疫母マウス (C57BL/6) 由来の仔マウス仔マウスへの移行が示唆されたが、免疫担当細胞及び母乳中免疫担当細胞の移行については移行する細胞数が少なく、免疫組織学的検討では、免疫担当細胞の移行を確認するに至る十分な知見が得られなかった。



以上の結果から、母体経鼻免疫では母乳を介して新生児マウスに免疫応答が移行し、仔マウスでの免疫学的な記憶が誘導されることが判明した。母体免疫は、IgG 抗体を主体とする胎盤移行抗体が新生児期の未熟な免疫能を補うのみでなく、母乳栄養が乳幼児期の免疫応答に最も重要な役割を果たすと考えられた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

Kyd JM, Hotomi M, Kono M, Kurabi A, Pichichero M, Ryan A, Swords WE, Thornton

R. Panel 5: Immunology. Otolaryngol Head Neck Surg. 2017 Apr;156(4\_suppl):S63-S75. doi: 10.1177/0194599816663886. Review.

Hotomi M, Yuasa J, Briles DE, Yamanaka N. Pneumolysin plays a key role at the initial step of establishing pneumococcal nasal colonization. Folia Microbiol (Praha). 2016 Sep;61(5):375-83. doi:

10.1007/s12223-016-0445-z.

Hotomi M, Nakajima K, Hiraoka M, Nahm MH, Yamanaka N. Molecular epidemiology of nonencapsulated Streptococcus pneumoniae among Japanese children with acute otitis media. J Infect Chemother. 2016 Feb;22(2):72-7. doi:

10.1016/j.jiac.2015.10.006.

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等 特になし。

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

保富 宗城 (HOTOMI, Muneki)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号: 90336892

(2) 研究分担者

平岡 政信 (HIROKA, Masanobu)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号: 80423945

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

河野 正充 (KONO, Masamitsu)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号: 20511570

杉田 玄 (SUGITA, Gen)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号: 20407274