

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：17701  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2017～2019  
課題番号：17K11335  
研究課題名(和文)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

研究課題名(英文)Development of nasal boost immunization with phosphorylcholine as a novel pneumococcal vaccination program

研究代表者  
間世田 佳子(MASEDA, Yoshiko)  
鹿児島大学・鹿児島大学病院・医員

研究者番号：70535666  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：13価肺炎球菌結合型ワクチン(PCV13)の全身免疫後にホスホリルコリン(PC)を経鼻投与することで、肺炎球菌に対する免疫応答のブースター効果が得られるかを検討した。その結果、PC経鼻追加免疫は、ワクチン株の肺炎球菌に対する血清IgG抗体価およびPC特異的抗体価を上昇させることが明らかとなった。さらに、鼻洗浄中のPC特異的IgA抗体価も誘導した。したがって、現在定期接種となっているPCV13予防接種後にPCの経鼻免疫を行うことで、肺炎球菌に対する全身免疫応答と粘膜免疫応答を誘導できることが示唆された。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

肺炎球菌ワクチンは、乳児期や幼少期に複数回の接種が必要である。本研究の目的は、これらの定期接種に経鼻ワクチンを追加することにより定期接種の回数を減少させたり、分泌型IgAを誘導させたりするワクチンプログラムを開発することであった。本研究により全身免疫後に粘膜ワクチンを投与することで、効率的な抗体誘導が可能になることが示唆された。今後この現象のメカニズムを解明することによりより効率的なワクチン投与方法の開発につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify the booster effect of the immune response against pneumococci by intranasal administration of phosphorylcholine (PC) after systemic immunization with a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13). As a result, it was revealed that PC nasal booster increased the vaccine strain specific serum IgG antibody titer and PC-specific antibody titer. Furthermore, PC-specific IgA antibody titers in nasal washes were also induced. Therefore, it was suggested that nasal immunization with PC after PCV13 vaccination, which is now routinely vaccinated, could induce systemic and mucosal immune responses against pneumococcus.

研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科

キーワード：肺炎球菌 経鼻ワクチン 注射ワクチン 投与方法

## 1. 研究開始当初の背景

2013年11月から小児の肺炎球菌ワクチンは PCV7 から PCV13 に切り替わった。PCV7 による細菌性髄膜炎の予防効果は非常によく、PCV13 でもさらなる効果が期待できる。しかしながら、肺炎球菌のタイプは多種にわたり、今後も 13 価の莢膜タイプ以外の肺炎球菌感染症が出現する場合には、さらに多数の莢膜タイプに対するワクチンを開発する必要が出てくる。さらに、PCV は血清の特異的 IgG を誘導して感染防御に働くが、分泌型 IgA(SIgA)の誘導は弱い。実際に PCV ワクチンにより重症肺炎球菌感染症は罹患に抑制がかかっているが、急性中耳炎にはその効果はすくない。

その一因として、SIgA が良好に誘導されていないためと考えられる。SIgA を誘導するためには、common mucosal immune system を利用した粘膜免疫の誘導が重要である。SIgA は、上気道において細菌の体内侵入前に働くことにより感染阻止が可能であり、交差反応も持っている点で、肺炎球菌や、インフルエンザ菌などのように多種の病原体が存在する場合に有効であると考えられる。我々はこれまでに肺炎球菌や、インフルエンザ菌の外膜に存在する phosphorylcholine (PC) に注目し、ワクチン開発の研究を行ってきた。

さらに、我々がこれまで報告した GpG-ODN と plasmid Flat 3 ligand(pFL)を組み合わせたアジュバントは、既存の抗体価をアジュバントのみで再賦活化し、SIgA を誘導することが可能である。

本研究では、PCV13 にて得られた全身免疫応答に加えて PC による粘膜免疫応答を付加し、より広域の肺炎球菌、インフルエンザ菌に対する防御を誘導する。さらにアジュバントとして CpG-ODN と pFL を用いることにより、全身免疫で作られたメモリー細胞を再賦活化させて、PCV13 特異的な SIgA を誘導できるのではないかと仮説をたてた。これらを明らかにすることにより、より広域な細菌にたいする感染防御を可能とするワクチン開発を目的とする。

## 2. 研究の目的

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免疫することで、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。

## 3. 研究の方法

### (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 を 2 次抗体として添加し、TMB で発色させることにより PCV13 中の PC を検出した。PC-BSA を 2 段階希釈することで標準曲線を作成し、PCV13 の OD 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。また、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 ( IN $\times$ 1 ) およびナイーブマウスと比較した。

## 4 . 研究成果

### ( 1 ) PCV13 中の PC 濃度

PCV13 溶解液の吸光度と PC-BSA の希釈系列にて作成した標準曲線( 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 153.926ng/ml であった。

### ( 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、PCV13 全身免疫群:IP $\times$ 2 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 一回投与後 ( 14 日 ) には、PC、PPS3 に対する抗体価の上昇を認めしたが、PPS19F、PPS23F に対する抗体価の上昇は認めなかった。しかし、2 回投与後 ( 28 日 ) には、PPS19F、PPS23F に対する抗体価も上昇した。

### ( 3 ) 鼻腔洗浄液中 PC 特異的 IgA

鼻腔洗浄液中の PC 特異的 IgA は、PCV13 全身免疫群 : IP $\times$ 2 群、IN $\times$ 1 群、ナイーブ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。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。

以上の結果より 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。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Maseda Y, Ohori J, Tanaka N, Nagano H, Miyashita K, Kurono Y	4. 巻 45(2)
2. 論文標題 Mucosal and systemic immune response to sublingual or intranasal immunization with phosphorylcholine	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx.	6. 最初と最後の頁 273-280
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.anl.2017.04.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ohori J, Iuchi H, Maseda Y, Kurono Y.	4. 巻 38(3)
2. 論文標題 Phosphorylcholine intranasal immunization with a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine can boost immune response against Streptococcus pneumoniae.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 699 ~ 704
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.vaccine.2019.10.043. Epub 2019 Oct 24	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 J Ohori , Y.Maseda , Y.Kurono
2. 発表標題 Phosphorylcholine intranasal immunization after 13-valent pneumococcal conjugate vaccine can boost immune response against Streptococcus pneumoniae
3. 学会等名 RHINOWORLD CHICAGO 2019 ISIAN・IRS・ARS 38th International Symposium of Inflammation and Allergy of Nose（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大堀純一郎
2. 発表標題 肺炎球菌ワクチン接種後のホスホリルコリン経鼻追加免疫の効果（第2報）
3. 学会等名 第119回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大堀純一郎
2. 発表標題 PCV13全身免疫後のホスホリルコリン経鼻追加免疫の効果
3. 学会等名 第28回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大堀純一郎
2. 発表標題 PCV13接種後のホスホリルコリン経鼻投与による免疫増強効果
3. 学会等名 第37回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井内寛之
2. 発表標題 肺炎球菌およびインフルエンザ菌の上皮細胞への接着・侵入に対するホスホリルコリン重合体の効果
3. 学会等名 第5回日本耳鼻咽喉科感染症・エアロゾル学会総会・学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大堀純一郎
2. 発表標題 13価肺炎球菌結合型ワクチン接種後のホスホリルコリン経鼻追加免疫のブースター効果
3. 学会等名 第36回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	地村 友宏 (JIMURA Tomohiro) (10709596)	鹿児島大学・鹿児島大学病院・医員  (17701)	
研究分担者	川畠 雅樹 (KAWABATA Masaki) (30585112)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・助教  (17701)	
研究分担者	永野 広海 (NAGANO Hiromi) (60613148)	鹿児島大学・医歯学域医学系・講師  (17701)	
研究分担者	黒野 祐一 (KURONO Yuichi) (80153427)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授  (17701)	
研究分担者	大堀 純一郎 (OHORI Junichiro) (90507162)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・講師  (17701)	
研究分担者	井内 寛之 (IUCHI Hiroyuki) (90645285)	鹿児島大学・医歯学域医学系・助教  (17701)	