

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：82406

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16703

研究課題名（和文）レーザーによる近赤外光照射の免疫賦活化効果を用いた舌下粘膜ワクチンへの応用

研究課題名（英文）Application of Near-Infrared Laser into Mucosal Vaccine Using Photobiomodulation

研究代表者

君塚 善文（Kimizuka, Yoshifumi）

防衛医科大学校（医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・内科学・講師

研究者番号：40445268

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：マウスの舌下粘膜へ温度計測と組織学的な評価から非侵襲的な照度を照射する系を確立した。既報を元に、全粒子インフルエンザワクチンを舌下に滴下して免疫するマウスモデルにおいて、免疫直前に近赤外光を照射すると舌下投与単独に比較して、免疫増強効果があること、その効果は近赤外光の波長特異的である可能性を示した。マウス粘膜中のRNAの動きから、近赤外光への曝露が特定のサイトカインの発現に作用し、下流の免疫応答へ寄与している傾向を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、光を「皮膚」へ照射して免疫賦活化を誘導する技術が報告されてきたが、本研究では「粘膜」に対して非接触・非傷害性の光を照射し免疫賦活化を試みており、この概念は世界的にも独自性および挑戦的価値が高い。経鼻および舌下による粘膜ワクチンは近年注目されており、弱毒化生ワクチンを用いて臨床応用されてきている。これらの粘膜ワクチンの特徴は針を不要とすること、および感染防御に重要な粘膜面の抗体を産生するIgA産生性B細胞を含む粘膜免疫までも誘導し感染防御に有効なことが挙げられる。一方、粘膜ワクチンには確立したアジュバントが存在しないことから、今回の発見は予防医学的意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：We have established a system for noninvasive irradiation onto the sublingual mucosa of mice with noninvasive irradiation based on temperature measurement and histological evaluation. We have shown that irradiation with near-infrared light immediately before immunization had an immunopotentiating effect compared to sublingual administration alone in a mouse model in which whole-particle influenza vaccine administered sublingually, and that this effect is wavelength-specific. The change of RNA in mouse mucosa indicates that exposure to near-infrared light acts on the expression of specific cytokines and contributes to downstream immune responses.

研究分野：ワクチン、感染免疫、呼吸器感染症、photobiomodulation、抗酸菌感染症

キーワード：ワクチン インフルエンザ アジュバント レーザー photobiomodulation

1. 研究開始当初の背景

集団予防接種に使用されるワクチンの多くは、病原生物の構成成分の一部をワクチン抗原として使用するリコンビナントワクチンが主流である。しかし、病原生物の成分を多く残すほど副反応が大きいため、近年のワクチン製剤の抗原はより選択的なものとなってきた。一方、免疫作用の標的が絞られるためにワクチンの免疫原性が低くなり、十分な免疫応答を誘導しないという課題が浮上した。その効果を補うために、ワクチン製剤へ鉍酸塩など化合物による免疫賦活化剤（アジュバント）の混合が必要となる。ただし、既存のアジュバントそのものにも、投与部位の疼痛・炎症などの局所反応に加え、疲労・筋肉痛といった全身反応がみられ、安全で効果的なアジュバントの開発が世界的に喫緊の課題となっている。

近年、申請者らは、インフルエンザマウスモデルを用いて皮内ワクチン接種部位への近赤外光照射が免疫アジュバント効果を示すことに着目し、1) 皮膚毛細リンパ管の拡張とリンパ管表面のCCL21の発現、2) 皮内のマスト細胞を介したCCL20、CCL2など特定のサイトカインの産生、3) 特定の樹状細胞集団の皮膚所属リンパ節への遊走の促進、といった機序があることを解明している（図1. Kimizuka et al. *J Immunol* 2018, Morse et al. *J Immunol* 2017, Kimizuka et al. *Vaccine* 2017）。しかし、この技術は皮膚を対象としており、実用化されている経皮投与型ワクチンの製剤が極めて限定的であるため、社会実装の大きな壁となっていた。一方、経鼻あるいは舌下による粘膜ワクチンは近年注目されており、一部は弱毒化生ワクチンを用いて臨床応用されている。これらの粘膜ワクチンの特徴は針を不要とすること、および感染防御に重要な粘膜面の抗体を産生するIgA産生性B細胞を含む粘膜免疫までも誘導し感染防御に有効なことが挙げられる。

そこで申請者は、光を用いた物理的ワクチンアジュバント技術を粘膜投与型ワクチンへ応用することに着目した。

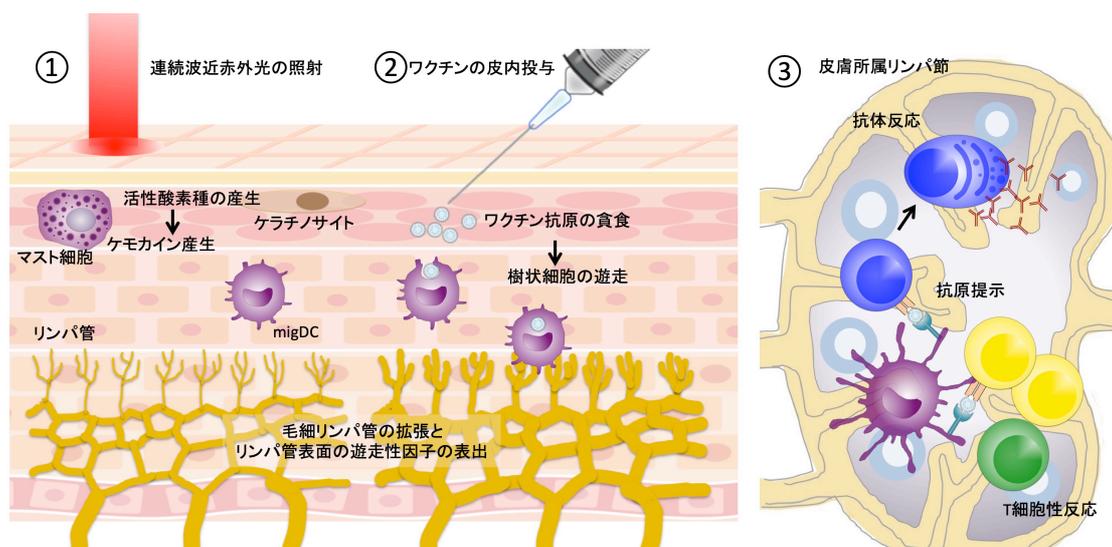


図1 申請者らによりこれまでに明らかにされてきた皮内投与型ワクチンにおける近赤外光によるアジュバント作用の機序（Maki et al.より改変）皮内投与型ワクチンのモデルとして、最も解明の進んだ1064nm波長における検証では、①皮膚に照射された近赤外光はマスト細胞やケラチノサイトなど皮膚構成細胞における活性酸素種の産生を誘導し、樹状細胞の活性化や遊走を亢進させる選択的なケモカインの産生に寄与する。②一方、毛細リンパ管の拡張とリンパ管表面に樹状細胞の遊走因子を発現することによる遊走促進を起こす。この結果、③皮膚所属リンパ節へ遊走する特定の樹状細胞集団が増加し、ワクチンの効果を増強する。

2. 研究の目的

本研究では、より効果的かつ安全性の高いインフルエンザワクチンの開発を最終目標とし、近赤外光照射によるワクチンアジュバント効果が、不活化インフルエンザワクチンの粘膜投与（粘膜ワクチン）において感染防御効果を増強するかどうかを動物モデルで検討することを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 近赤外光の光源として連続波近赤外光の実験用 GaAs 半導体レーザー(ユニタック, 日本)を使用した. エネルギーコントロールとして別波長の連続波近赤外半導体レーザーを使用した. マウスを麻酔し, 照射台上に仰臥位にて保定・開口し, 照射野が舌下粘膜になるように設定した. 照射野は直径 1.5 mm² で照射中は赤外線画像解析で照射部位の温度を計測および記録した. 粘膜ワクチンとして, 不活化インフルエンザ全粒子ウイルスワクチン(A/PR/8/34)を使用し, レーザーを照射終了した直後にピペットを用いて舌下投与した.
- (2) 近赤外レーザーの舌下粘膜面での至適非侵襲的レーザー照射強度を検討する
段階的な照射強度にて3分間まで舌下レーザー照射を施行. 照射直後, 1, 2および4日目の粘膜の視認および粘膜生検検体の鏡検により組織傷害を経時的に評価し, 照射中の舌下粘膜温が43度以下で傷害のみられない最大の照射強度を至適照射強度として以下の実験で使用した.
- (3) 近赤外レーザー粘膜照射の液性/細胞性免疫応答に対する増強効果を検討する
雌性C57BL/6マウスを上記方法にてレーザー照射直後に舌下免疫した. 比較検討の目的で, ワクチン舌下投与のみ(レーザー照射なし), 既存の実験的粘膜アジュバントであるコレラ毒素Bサブユニット cholera toxin B subunit (CTB)をワクチンと共に投与した群を検討した. 陰性対照群として, ワクチン投与なしの群を設けた.

液性免疫応答を評価するため, 初回免疫から0, 2, 4, 6週目の血中抗インフルエンザ抗体価(IgG, IgG1, IgG2c), 中和抗体価をワクチン抗原を用いたELISA法で測定した.

- (4) 細胞および組織内におけるサイトカインの挙動を検討する
ヒト気道上皮培養細胞(BEAS-2B)およびマウス粘膜への近赤外光照射後, RNAを抽出し, 樹状細胞の遊走・活性化に関わる特定のサイトカインの経時的な挙動をrtPCRで確認した.

4. 研究成果

- (1) マウスの舌下粘膜へ段階的な照度の近赤外光を照射すると, 時間経過とともに舌下組織表面の温度が上昇し照射の中止とともに低下した. 組織表面の最大到達温度は, これまでの皮膚照射の系と比較して低値であり, 粘膜の熱容量の大きさが判明した. 照度依存性に表面温度は増加したが, 最大設定条件であっても組織表面温度は40℃を下回り, 組織学的な評価においても非侵襲的な条件であることが判明した(図2).

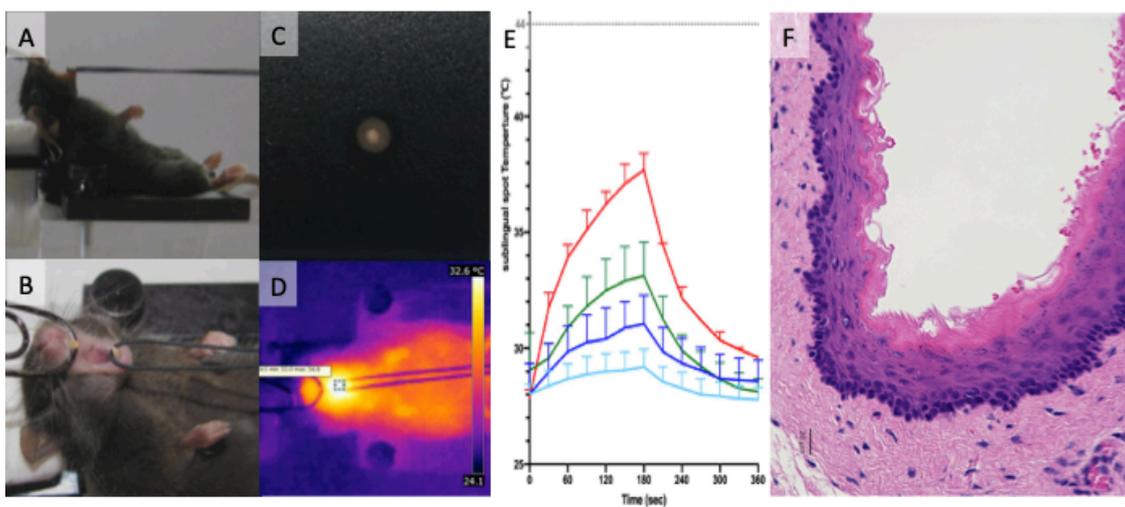


図2 近赤外光の舌下組織への照射系の確立 マウスを麻酔下に保定し(A,B), 舌下粘膜に合わせた1.5mm径のレーザー光を成形(C)した. 表面温度を測定して安全照度を確認するとともに(D,E), 舌下組織を病理学的に検証し, 非侵襲的であることを確認した(F).

- (2) 全粒子不活化インフルエンザワクチン液を舌下に滴下して免疫するマウスモデルにおいて近赤外光のアジュバント作用を検証した(図3). 血清中抗インフルエンザ特異的抗体価は, ワクチン舌下投与のみの群と比較して, 免疫直前に近赤外光を照射された群において照度

依存性に誘導されていることが示された。また、この効果は同等の熱・エネルギーを出力するコントロール用の別波長の光ではみられなかったことから、アジュバント効果には波長特異性があることを示唆した。

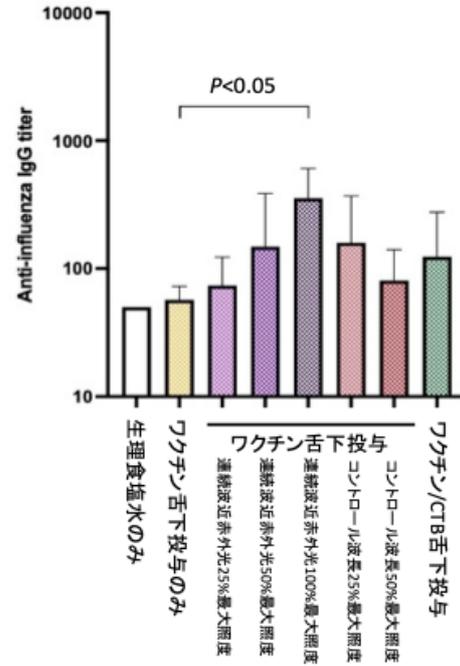


図3 マウスインフルエンザワクチンモデルにおける近赤外光のアジュバント効果 免疫2週間後の血清 IgG抗体価を示す。舌下粘膜投与型全粒子インフルエンザワクチンの投与により、ワクチン舌下投与のみ(黄)の群に比較して、近赤外光アジュバント群(紫)には照度依存性に抗体価の誘導がみられた。コントロール波長群(赤)ではこの反応はみられなかった。

- (3) 既知の報告では、皮膚組織における近赤外光の曝露は CCL20, CCL2 などのケモカイン発現を誘導し、樹状細胞を照射部位に遊走・活性化させて所属リンパ節への移動を促進し獲得免疫増強効果を発揮することが判明している (Kashiwagi et al., PLoS One, 2013, Kimizuka et al. J Immunol 2018). そこで、近赤外光への曝露後、経時的にマウス粘膜組織を採取し、RNA を抽出して評価したところ、近赤外光への曝露が特定のサイトカインの発現に作用し、下流の免疫応答へ寄与している可能性を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 0件）

1. 著者名 Maki Yohei, Kashiwagi Satoshi, Kimizuka Yoshifumi	4. 巻 39
2. 論文標題 Laser vaccine adjuvants: Light-augmented immune responses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 6805 ~ 6812
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vaccine.2021.09.042	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yokomizo Shinya, Katagiri Wataru, Maki Yohei, Sano Tomoya, Inoue Kazumasa, Fukushi Masahiro, Atochin Dmitriy N., Kushibiki Toshihiro, Kawana Akihiko, Kimizuka Yoshifumi, Kashiwagi Satoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Brief exposure of skin to near-infrared laser augments early vaccine responses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nanophotonics	6. 最初と最後の頁 3187 ~ 3197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1515/nanoph-2021-0133	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 君塚善文	4. 巻 470
2. 論文標題 近赤外光を用いたワクチン増強効果 / 特集 感染症対策と光技術	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 OPTRONICS	6. 最初と最後の頁 87-91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計22件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐野友哉、榎陽平、駒井映里、高橋秀幸、長岡良祐、芹沢悠介、北上悦子、小川卓範、横溝真哉、小野岳史、石原美弥、櫛引俊宏、川名明彦、君塚善文
2. 発表標題 インフルエンザマウスモデルにおける連続波1270nm近赤外光を用いたアジュバント効果の機序の解明
3. 学会等名 第63回日本呼吸器学会講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shinya Yokomizo, Yohei Maki, DmitryN. Atochin, Kawana Akihiko, Kimizuka Yoshifumi , Satoshi Kashiwagi
2. 発表標題 Brief exposure of skin to near-infrared laser augments early vaccine re- sponses
3. 学会等名 SPIE. Phonics west 2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 榎陽平, 君塚善文, 佐野友哉, 北上悦子, 駒井映里, 高橋秀幸, 小川卓範, 小野岳史, 石原美弥, 櫛 引俊宏, 川名明彦
2. 発表標題 連続波近赤外レーザーによる物理的アジュバントの細胞内光受容体の検索
3. 学会等名 第26 回日本ワクチン学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐野友哉, 君塚善文, 榎陽平, 北上悦子, 駒井映里, 高橋秀幸, 小川卓範, 小野岳史, 石原美弥, 櫛 引俊宏, 川名明彦
2. 発表標題 連続波1270nm近赤外光照射による皮内サイトカイン遺伝子の発現評価とレーザーアジュバントへの応用可能性
3. 学会等名 第26 回日本ワクチン学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐野友哉, 君塚善文, 榎陽平, 北上悦子, 駒井映里, 高橋秀幸, 小川卓範, 小野岳史, 石原美弥, 櫛引俊宏, 川名明彦
2. 発表標題 学会賞ノミネートセッション: ワクチンアジュバントとしての連続波近赤外光による皮内サイトカイン遺伝子の発現評価
3. 学会等名 第43回日本レーザー医学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名	榎陽平, 君塚善文, 佐野友哉, 北上悦子, 駒井映里, 高橋秀幸, 小川卓範, 小野岳史, 石原美弥, 櫛引俊宏, 川名明彦
2. 発表標題	若手アワード最優秀賞受賞: ワクチンアジュバントとしての連続波近赤外光が有する細胞生理活性の検討
3. 学会等名	第43回日本レーザー医学会総会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	榎陽平, 君塚善文, 佐野友哉, 北上悦子, 駒井映里, 芹沢悠介, 長岡良祐, 小野岳史, 石原美弥, 櫛引俊宏, 川名明彦
2. 発表標題	インフルエンザワクチンマウスモデルにおける連続波1064nm半導体レーザーを用いた早期増強効果
3. 学会等名	第62回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	榎陽平, 君塚善文, 小野岳史, 石原美弥, 櫛引俊宏, 川名明彦
2. 発表標題	インフルエンザワクチンマウスモデルにおける半導体レーザーによる早期アジュバント効果
3. 学会等名	第25回日本ワクチン学会学術集会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	君塚善文
2. 発表標題	近赤外光を用いた物理的 ワクチンアジュバントの研究
3. 学会等名	日本光学会年次学術講演会Optics & Photonics Japan 2021
4. 発表年	2021年

1. 発表者名 榎陽平, 君塚善文, 小野岳史, 石原美弥, 榎引 俊宏, 川名明彦
2. 発表標題 連続波1064nm半導体レーザーを用いたインフルエンザワクチンの早期増強効果の検討
3. 学会等名 LASER WEEK IN TOKYO2 (第42回日本レーザー医学会総会など3学会合同開催)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 君塚善文, 榎陽平, 佐野 友哉, 松浦哲士, 北上悦子, 榎引俊宏, 柏木哲, 川名明彦
2. 発表標題 近赤外光による増強効果をもたらす携帯型半導体レーザー装置のインフルエンザワクチンマウスモデルを用いた検証
3. 学会等名 第61回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 榎陽平, 君塚善文, 佐野 友哉, 松浦哲士, 北上悦子, 榎引俊宏, 川名明彦
2. 発表標題 インフルエンザマウスモデルにおける連続波1270nm半導体レーザーのアジュバント効果の検討
3. 学会等名 第61回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 君塚善文, 榎引俊宏, 榎陽平, 佐野友哉, 川名明彦, Satoshi Kawashiwagi
2. 発表標題 近赤外レーザー光を用いたワクチン増強技術の研究
3. 学会等名 レーザー学会学術講演会第41回年次大会 シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 君塚善文
2. 発表標題 近赤外光を用いた物理的ワクチンアジュバントの研究
3. 学会等名 第24回 日本ワクチン学会学術集会 高橋奨励賞受賞記念講演（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 君塚善文, 片桐渉, 櫛引俊宏, 川名明彦, 柏木 哲
2. 発表標題 近赤外光によるワクチン増強効果における皮膚脈管と樹状細胞への影響
3. 学会等名 第60回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 君塚善文, 櫛引俊宏, 横陽平, 佐野友哉, 佐々木寿, 長盛親, 柏木哲, 川名明彦
2. 発表標題 レーザーアジュバントワクチン
3. 学会等名 第41回日本レーザー医学会総会 シンポジウム2 次世代のレーザー医療機器（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 君塚善文、柏木哲
2. 発表標題 インフルエンザマウスモデルを用いた近赤外光によるワクチン増強効果の研究
3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 君塚善文、川名明彦
2. 発表標題 近赤外光によるインフルエンザワクチンアジュバントの遊走性樹状細胞を介した機序の解明
3. 学会等名 第93回日本感染症学会総会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 君塚善文、櫛引俊宏、川名明彦、Satoshi Kashiwagi
2. 発表標題 近赤外光を用いた皮膚の遊走性樹状細胞の活性化とワクチン増強作用の研究
3. 学会等名 Photo Dynamic Medicine 2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 君塚善文、櫛引俊宏、槇陽平、佐野友哉、佐々木寿、長盛親、柏木哲、川名明彦
2. 発表標題 レーザーアジュバントワクチン
3. 学会等名 第40回日本レーザー医学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 君塚善文、片桐涉、櫛引俊宏、槇陽平、佐野友哉、佐々木寿、長盛親、柏木哲、川名明彦
2. 発表標題 近赤外光を用いた新規アジュバントの研究
3. 学会等名 第23回日本ワクチン学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 君塚善文、櫛引俊宏、榎陽平、佐野友哉、佐々木寿、長盛親、川名明彦、柏木哲
2. 発表標題 レーザーを用いた近赤外光の皮内ワクチン増強効果への応用
3. 学会等名 レーザー学会学術講演会第40回年次大会講演（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 君塚善文	4. 発行年 2021年
2. 出版社 日本工業出版	5. 総ページ数 5
3. 書名 光アライアンス「解説：近赤外光を用いたワクチン増強効果」	

1. 著者名 君塚善文	4. 発行年 2022年
2. 出版社 一般社団法人 レーザー学会	5. 総ページ数 5
3. 書名 レーザー研究「近赤外光を用いたワクチン増強効果の研究」	

1. 著者名 君塚善文	4. 発行年 2021年
2. 出版社 株式会社オプトロニクス社	5. 総ページ数 5
3. 書名 月刊オプトロニクス「感染症対策と光技術－近赤外光を用いたワクチン増強効果」	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	ハーバード医科大学マサチューセッツ総合病院			