

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月27日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009年～2011年

課題番号：21592164

研究課題名（和文）

母体免疫による乳幼児の易感染性の予防に関する研究

研究課題名（英文）

Protection against respiratory infection during neonate to infant periods by maternal intranasal immunization

研究代表者

保富 宗城 (Hotomi Muneki)

和歌山県立医科大学 医学部 講師

研究者番号：90336892

研究成果の概要（和文）：ワクチンによる乳幼児の肺炎球菌感染症に対する予防法は非常に重要であるが、乳幼児の免疫学的未成熟により、十分な免疫応答の誘導が困難なことが大きな問題となっている。本研究では妊娠前の成熟した雌マウスを肺炎球菌表面蛋白抗原(PspA)で免疫することで、仔マウスに抗肺炎球菌特異的抗体を誘導し、肺炎球菌感染症に対する予防効果を証明した。本研究成果は新しいワクチン戦略の基礎となりうるものである。

研究成果の概要（英文）：Pneumococcal vaccine plays an important role in protection against pneumococcal infections. However, infants exhibit impaired innate and adaptive immune responses, which result in insufficient induction of anti-pneumococcal antibody. The current study demonstrated the highly induction of anti-pneumococcal specific antibody among offspring delivered from mother mice immunized with pneumococcal surface protein A. This result would conduce a novel strategy of the development of pneumococcal vaccine.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成21年度	1,700,000	510,000	2,210,000
平成22年度	1,100,000	330,000	1,430,000
平成23年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 耳鼻咽喉科学

キーワード：耳科学

1. 研究開始当初の背景

現在臨床応用されている肺炎球菌ワクチンは、乳幼児に直接ワクチンを接種する方法で行われており、乳幼児期における免疫学的未成熟さゆえに、十分な免疫応答の誘導は困難であった。さらにワクチン抗原として莢膜多糖体が用いられており、免疫原性が低いことに加えて、T細胞非依存性抗原であることから、有効な免疫学的メモリーが得られないため、幼小児に対する有効性が低いことが問題とされる。一方、母乳中の起

炎菌特異的抗体価と急性中耳炎罹患頻度との間には逆相関の関係があることが知られている。乳幼児期では、自身のもつ能動免疫能は低いものの母親からの抗体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や免疫グロブリン投与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ものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、乳幼児における肺炎球菌性感染

症のワクチン予防に向け、肺炎球菌の表面蛋白抗原(pneumococcal surface protein A: PspA)を用いた経鼻免疫、とりわけ母親マウスに免疫を行う母体免疫により、経胎盤および経母乳的に新生児マウスへ効果的な抗肺炎球菌免疫応答を誘導することを検討する。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子組み換え PspA の作成

肺炎球菌 TIGR4 株 (血清型 4 型) より、PspA 遺伝子をクローニングし、遺伝子組み換え PspA を作成する。すなわち、pET vector を用いて PspA をトランスフォームした大腸菌を大量培養した後に蛋白発現をさせ、発現された PspA 蛋白をイオン交換クロマトグラフィーにて回収精製する。精製された PspA は SDS-PAGE にて確認した後に、LPS 濃度を測定し、経鼻免疫に用いる。

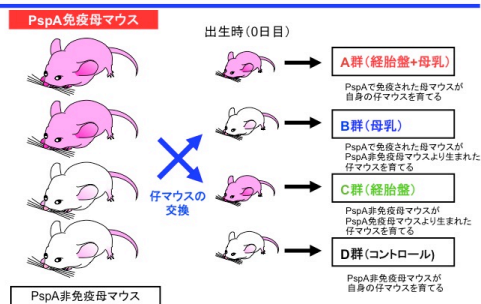
(2) 母体免疫による母マウスおよび新生児マウスへの肺炎球菌特異的免疫応答の誘導

PspA にて雌マウス (BALB/c, 4 週齢) を 3 週間、計 6 回の経鼻免疫を行う。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。新生児マウス出産後に母親マウスの母乳中の抗 PspA 特異的抗体、血清中抗 PspA 特異的抗体および新生児マウスの血清中抗 PspA 特異的抗体の誘導を ELISA 法にて検討する。

(3) 母体免疫の新生児マウスにおける肺炎球菌感染予防の検討

(2) と同様に新生児マウスを作成する。同時期に出産するように非免疫雌マウスを設定し、(A 群) PspA 経鼻免疫母マウスが自分の出産した仔マウスを育てる群、(B 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、(C 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、(D 群) 非免疫母マウスが自分の出産した仔マウスを育てる群 (コントロール) の 4 群に分類する。(図 1)

図1. 母体免疫モデルの作成



① 鼻咽腔コロニー形成の予防

新生児マウスに生後 7 日目に経鼻的に肺炎球菌 TIGR4 株を接種したのちに、5 日目における鼻咽腔における肺炎球菌コロニーの形成について検討する。

② 肺炎の予防

新生児マウスに生後 10 日目に肺炎球菌 TIGR4 株を経鼻的にマウス肺に感染させたの

ち、新生児マウスの肺組織にける肺炎球菌コロニー数を検討する。

③ 全身感染の予防

新生児マウスに生後 10 日目に肺炎球菌 TIGR4 株をマウス腹腔内に感染させたのち、新生児マウスの生存期間を検討する。

(4) 母体免疫にて新生児マウスに誘導される Th1/Th2/Th17 系免疫応答の検討

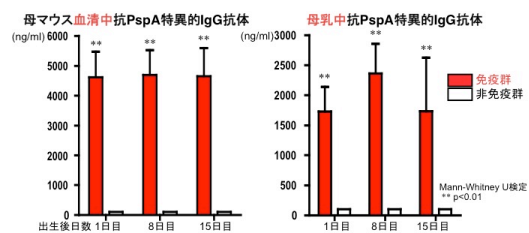
(2) と同様に新生児マウスを作成する。免疫群と非免疫群の新生児マウスについて、生後 7 日目に新生児マウス脾臓を摘出し、脾細胞を分離する。肺炎球菌感染前および後の新生児マウス脾細胞を PspA 1 μ g、5 μ g、ConA にて 72 時間刺激し、培養上清に産生された IL-4、IFN- γ 、IL-17 値を ELISA 法にて測定する。

4. 研究成果

(1) 母体免疫による母マウスおよび新生児マウスへの肺炎球菌特異的免疫応答の誘導

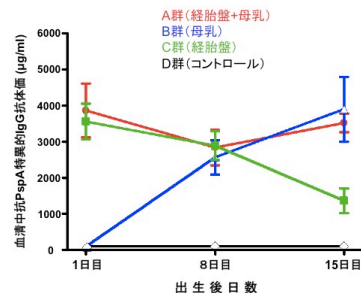
PspA を用いた経鼻免疫により、哺乳期間中、母マウスの血清および母乳中に抗肺炎球菌特異的抗体が誘導された。(図 2)

図2. 母マウスにおける特異的抗体の誘導



さらに PspA で免疫された母マウス由来の新生児マウスの血清中には、出生時より経胎盤由来の抗肺炎球菌特異的抗体が存在し、母乳栄養を受けることで、抗体が高い値で維持された。(図 3)

図3. 仔マウス血清中の抗PspA特異的抗体の誘導



(2) 母体免疫の新生児マウスにおける肺炎球菌感染予防の検討

鼻咽腔コロニーモデル、肺炎モデル、全身感染モデルのいずれの感染様式においても、免疫群の母マウス由来の新生児マウスは非免疫群由来の新生児マウスと比較して、有意に肺炎球

菌感染に対する予防効果を示した。(図 4、5、6)

図4. 鼻洗浄液・鼻粘膜組織中の肺炎球菌数の変化

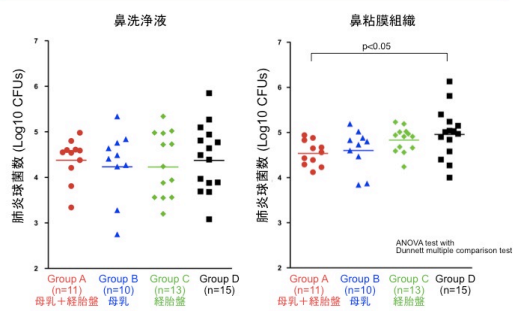


図5. 肺炎モデルにおける肺組織中の肺炎球菌数の比較

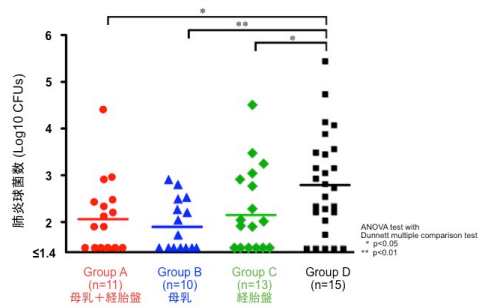
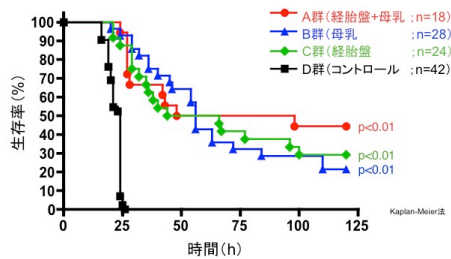
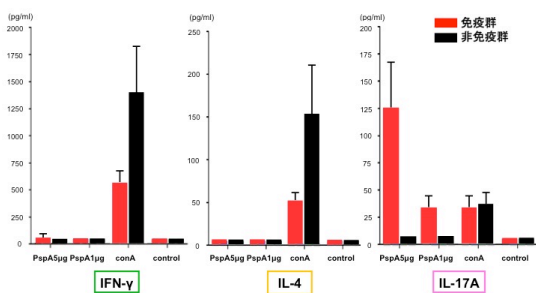


図6. 全身感染モデルにおける生存期間の比較



(3) 母体免疫にて新生児マウスに誘導される Th1/Th2/Th17 系免疫応答の検討
 新生児マウスより採取した脾細胞を PspA で刺激すると、Th17 系サブセットのサイトカインである IL-17A が産生された。母体免疫における新生児マウスの抗肺炎球菌特異的免疫応答には、Th17 系サブセットが関与している可能性が示された。(図 7)

図7. PspA刺激による仔マウスリンパ球のサイトカイン産生量



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 2 件)

①Kono M, Hotomi M, Hollingshead SK, Briles DE, Yamanaka N. Maternal immunization with pneumococcal surface protein A protects against pneumococcal infections among derived offspring. PLoS One. 査読有. 6(10), 2011, e27102

②Hotomi M, Kono M, Hollingshead SK, Briles DE, Yamanaka N. Protection of pneumococcal infection by maternal intranasal immunization with pneumococcal surface protein A. Adv Otorhinolaryngol. 査読無. 72, 2011, 121-125

[学会発表] (計 3 件)

①Kono M, Hotomi M, et al. Induction of specific immune responses against *S. pneumoniae* by maternal immunization with pneumococcal surface protein A (PspA). 10th International Symposium on Recent Advances in Otitis Media. 6/8 2011. New Orleans, USA

② Hotomi M, et al. Protection of pneumococcal infection by maternal intranasal immunization with pneumococcal surface protein A (PspA). The 7th International Symposium on Tonsils and Mucosal Barriers of the Upper Airways. 7/8 2010. Asahikawa, Japan

③Kono M, Hotomi M, et al. Production of IL-17A by splenocytes of offspring delivered from PspA-immunized mother mice. 6th Extraordinary International Symposium on Recent Advances in Otitis Media. 5/8 2009. Seoul, Korea

④ Katsurahara T, Hotomi M, et al. Protection of pneumococcal infection by maternal intranasal immunization with pneumococcal surface protein A (PspA). 9th International Symposium on Recent Advances in Otitis Media. 6/4 2007. St. Pete Beach, USA

[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

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・講師
研究者番号：90336892

(2) 研究分担者

山中 昇 (Yamanaka Noboru)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：10136963
田村 真司 (Tamura Shinji)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：10244724
戸川 彰久 (Togawa Akihisa)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：70305762

(3) 連携研究者

()

研究者番号：