

## 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 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590855

研究課題名（和文） 気管支随伴リンパ組織内細胞動態からみた T 細胞非依存性不活化ワクチンの投与方法の工夫

研究課題名（英文） The study on administration route of T-cell independent vaccine from the point view of bronchus-associated lymphoid tissue

研究代表者

千田 金吾（CHIDA KINGO）

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40197611

研究成果の概要（和文）：肺炎球菌莢膜多糖体ワクチンの効果を高めるため、従来の皮下投与に比べて局所経鼻投与の有用性を検討した結果、後者において気管支肺胞洗浄液中に特異的 IgG を検出できた。

研究成果の概要（英文）：In order to enhance the efficacy of pneumococcal capsular polysaccharide vaccine (PPV), we compared the subcutaneous administration of PPV with intranasal route of PPV. Intranasal administration caused the induction of PPV-specific IgG antibody, but not subcutaneous vaccination.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科

キーワード：気管支随伴リンパ組織，T 細胞非依存不活化ワクチン，肺炎球菌莢膜多糖体ワクチン，経鼻投与

### 1. 研究開始当初の背景

肺炎球菌による肺炎は最も頻度が高く病原性が高いため、その制御は臨床的に重要な課題である。肺炎球菌性肺炎に関して我々は以下の4点が問題と推定している。すなわち、1)菌の耐性化、2)集団内伝搬、3)内因性感染、4)L-form 菌の関与である。

1)について、肺炎球菌の耐性化が拡大するとともに、抗菌薬による治療失敗例が多く経験されるようになってきている。最近ではレ

スピラトリーキノロン薬での耐性化が懸念されている。2)と3)について、市中肺炎球菌感染に関して集団内あるいは家族内伝搬が注目されるようになってきている。鼻、咽頭には肺炎球菌が常在していることが問題点として指摘されている。成人の 3.7%に対して 6 歳未満の乳幼児では 53%が保菌者であると報告されている (Clin Infect Dis 38:632, 2004)。そして家族内親子伝搬が細菌遺伝子

学的にも証明されている (J Clin Microbiol 40:4357, 2002). 保菌者であれば内因性感染がもたらされる結果となる. 4)の L-form 菌については, 細胞壁を欠き細胞内に入り込むため通常の治療は無効である. これらの前3者については, ワクチン投与がひとつの大きな解決策であると期待される.

しかしながら, これまで 23 価の肺炎球菌莢膜多糖体に対する不活化ワクチン (pneumococcal capsular polysaccharide vaccine : PPV)は T 細胞非依存抗原であるため, その効果は十分なものではない. このため肺炎球菌ワクチンの効果を高める種々の解決策が模索されている. その一つが担体となるキャリア蛋白に莢膜多糖体を結合させた conjugate ワクチンであり, 7 価の蛋白結合型 (7-valent pneumococcal conjugate vaccine : PCV-7)は非病原性のジフテリア蛋白7種の血清型の莢膜多糖体を結合させたもので, B 細胞が未熟な乳幼児での導入が試みられている. また, 肺炎球菌蛋白質ワクチン抗原 (pneumococcal surface protein A : PspA)は, 防御領域の遺伝子配列の family 1~3 のうち十分に交差反応性を示すことが判明しているが (Infect Immun 68:5889, 2000), その後開発が中断されている.

そこで, 現行の安全性が確立している PPV をいかに応用していくかは有用な対応であり, 投与方法を工夫し効果的な抗体価上昇を得ることができれば, 実地臨床上現実的と考えられる. この観点から筋注と皮下注の接種方法の相違によりどちらが有効であるか広く検討されてきた. 60歳以上の高齢者に PPV を2つの方法で接種した結果では, 皮下接種と筋肉内接種で差はなかったという (Vaccine 25:4767, 2007). 同じ不活化ワクチンであるインフルエンザウイルスワクチンにおいては多くの検討がなされ, 過去の報告では筋注

接種が, 最近の報告ではむしろ皮下接種の量が少ない量で両者同等の抗体価が得られるとされている (N Engl J Med 351:2295, 2004). 皮下接種では皮膚に存在する樹状細胞群の一つであるランゲルハンス細胞が, 重要な役割を果たしていると推定されている. いずれにしてもその効果についての結果は相反しており, IgG 抗体産生をみるにとどまっている.

局所での抗体価上昇を期待する場合には, IgA 抗体が誘導される経鼻接種が有用と考えられている. しかしながら PPV を経鼻的に投与した場合に, 特異的 IgA 抗体が得られるか否かは不明である. また PPV は莢膜多糖体不活化ワクチンであるため, T 細胞非依存性であり細胞傷害性 T 細胞 (CTL) や IgA の誘導はなく IgG 抗体の産生が見込めるのにとどまる. このため PPV の効果は限定的であり, 肺炎に対するワクチンの予防効果は懐疑的な意見が存在する.

PPV の安全性は高く再接種も認められるようになった. この利点を最大限に生かして PPV を有効に活用するため, 経鼻接種での免疫動態, 特に特異的 IgA 産生をどの程度期待できるか検討する. 次に T 細胞を介した免疫反応を誘導し強い免疫記憶をうるために, アジュバントにて前処置をしておくことは有用な方法であるかを検討する. われわれはヒトから分離した樹状細胞において muramyl dipeptide-Lys (MDP-Lys)投与により機能亢進 (CD80, CD83, CD86, CD40 の表出増加と IL-6, -8, -12 の産生増加)が認められることを報告した (J Leukoc Biol 70:723, 2001).

また, これまで我々は気管支随伴リンパ組織 (bronchus-associated lymphoid tissue : BALT) の病態生理学的意義について研究をおこなってきた. すなわち, 臨床的にびまん性汎細気管支炎 (Am Rev Respir Dis 146:473,

1992), 過敏性肺炎(Chest 115:357, 1999), 膠原病肺(Am J Respir Crit Care Med 154:1531, 1996), 局所免疫への関与の解析については, 家兎における BALT の構造と機能解析(結核 60:65, 1985), ラットでの抗原サンプリング機構(Respirology 5:141, 2000), BALT と全身へのリンパ球動態(Lung 178:295, 2000)など, 肺局所での免疫動態での BALT の意義を報告してきた. 局所免疫の動態解析には BALT が深く関わっているため, 経鼻的に PPV を接種した場合の BALT 内に存在する細胞について, T 細胞, 特にヘルパーT細胞や制御性T細胞 (Treg)などのT細胞の関与を誘導することになるかその動態検討する. 肺炎球菌の鼻咽頭定着抑制メカニズムとして, 抗体非依存性, CD4<sup>+</sup> T 細胞依存性の機序が注目されており (Infect Immun 75:5460, 2007), 保菌者の管理に有用な方法であるかもしれない.

## 2. 研究の目的

肺炎球菌ワクチンは同菌の耐性化の進行と相まって臨床的に重要性を増しているが, 23 価の肺炎球菌莢膜多糖体ワクチン (pneumococcal capsular polysaccharide vaccine : PPV)は T 細胞非依存抗原であるため, その効果は限定的である. このため肺炎球菌ワクチンの効果を高める種々の解決策が模索され, B 細胞が未熟な乳児では 7 価の蛋白結合型 (7-valent pneumococcal conjugate vaccine : PCV-7)や肺炎球菌蛋白質ワクチン抗原(pneumococcal surface protein A: PspA など)の導入が計られている. 一方, 成人では現行の安全性が確立している PPV の投与方法を工夫し効果的な抗体価上昇を得ることができれば, 現実的な対応と考えられる. この観点から筋注と皮下注の接種方法の相違によりどちらが有効であるか広く検

討されている.

今回, 1)PPV を経鼻投与した場合の抗体価上昇効果を皮下接種の経路と比較し, 抗原特異的 IgA の誘導が期待できるか検討する. また, 2)PPV 投与前にアジュバントを投与し, T 細胞非依存性の抗原である PPV が T 細胞を介する免疫反応を誘導するか否かを確認する. 以上の事象について, 3)局所免疫に重要な気管支随伴リンパ組織(BALT)内の細胞動態に焦点を置き解析する.

## 3. 研究の方法

【実験 1】前実験をもとに, マウスに対して PPV を経鼻投与(IN), 皮下投与(SC)し, いずれの方法がより血清, BAL 中の抗原特異的 IgG, IgA が誘導できるか検討する. 経鼻投与をする際にはアジュバントとして LPS, Poly:IC を用いる.

### 【方法】(Figure1)

SC 群: PPV (575ug/0.5ml/1V) に生食 12ml を加え 25 倍希釈し, 1 匹につき 23ug/0.5ml の PPV を day1 に SC する.

IN(LPS)群: 1 匹につき PPV 原液 (23u/20ul) + LPS (10ug/20ul) 合計 40ul を day1, 15 に IN する.

IN(Poly:IC)群: 1 匹につき PPV 原液 (23u/20ul) + Poly:IC (10ug/1ul) + PBS19ul 合計 40ul を day1, 15 に IN する.

IN(アジュバント無し): 1 匹につき PPV 原液 (23u/20ul) + PBS20ul 合計 40ul を day1, 15 に IN する.

②day28 に心臓採血, BAL 実施. ELISA 法で血清中, BAL 中 IgG, IgA を測定する.

### 【実験 2】

SC 群の血清 IgG, IgA の上昇の再確認.

IN で血清 IgG, IgA を誘導させるため, PPV の投与量を 23ug→69ug に増量し, 投与回数も 2 回/4 週→4 回/4 週に増やして再検.

【方法】(Figure2)

SC 群：希釈した PPV 23ug/0.5ml を day1 に SC.

IN(LPS)群：PPV(69u/60u1) + LPS(10ug/20u1) を day1, 8, 15, 22 に IN.

IN(Poly:IC)群：PPV(69u/60u1) + Poly:IC(10ug/1u1) + PBS19u1 を day1, 8, 15, 22 に IN.

IN(アジュバント無し)：PPV 原液(69u/0u1) + PBS 20u1 を day1, 8, 15, 22 に IN.

day28 に心臓採血, BAL を行い ELISA 法で血清中, BAL 中 IgG, IgA を測定.

【実験 3】

いずれの群でも BAL 中の IgG, IgA 誘導が得られなかったため, BAL の手技に肺を揉みだす方法を取り入れて再検.

さらに SC と IN を併用し BAL 中の IgG, IgA が誘導されるか検討.

IN 群では新たにコレラトキシンをアジュバントとして採用し検討.

【方法】(Figure3)

SC 群：希釈した PPV 23ug/0.5ml を day1 に SC.

IN(LPS)群：PPV(69u/60u1) + LPS(10ug/20u1) を day1, 8, 15, 22 に IN.

IN(コレラトキシン)群：PPV(69u/60u1) + コレラトキシン(1.6ug/8u1) + PBS19u1 を day1, 8, 15, 22 に IN.

SC+IN(LPS)群：PPV 23ug/0.5ml を day1 に SC, PPV(69u/60u1) + LPS(10ug/20u1) を day22 に IN.

SC+IN(LPS)群：PPV 23ug/0.5ml を day1 に SC, PPV(69u/60u1) + コレラトキシン(1.6ug/8u1) を day22 に IN.

day28 に心臓採血, BAL を行い ELISA 法で血清中, BAL 中 IgG, IgA を測定.

4. 研究成果

【実験 1~3 の結果のまとめ】

血清 IgG：SC, IN(コレラトキシン, LPS), SC+IN(コレラトキシン, LPS)で誘導できた.

血清 IgA：SC, SC+IN(コレラトキシン, LPS)で誘導できたが, IN では誘導できなかった.

BAL IgG：IN(コレラトキシン)のみ上昇. SC, SC+IN(コレラトキシン, LPS)では誘導できなかった.

BAL IgA：いずれの群でも誘導できなかった.

実地臨床において 23 価の肺炎球菌莢膜多糖体ワクチン (pneumococcal capsular polysaccharide vaccine: PPV) の効果を高めるため, 従来の皮下投与 (SC) と PPV を経鼻的に投与した場合 (IN) の比較を行い, 呼吸系局所の免疫誘導の効果を検討した.

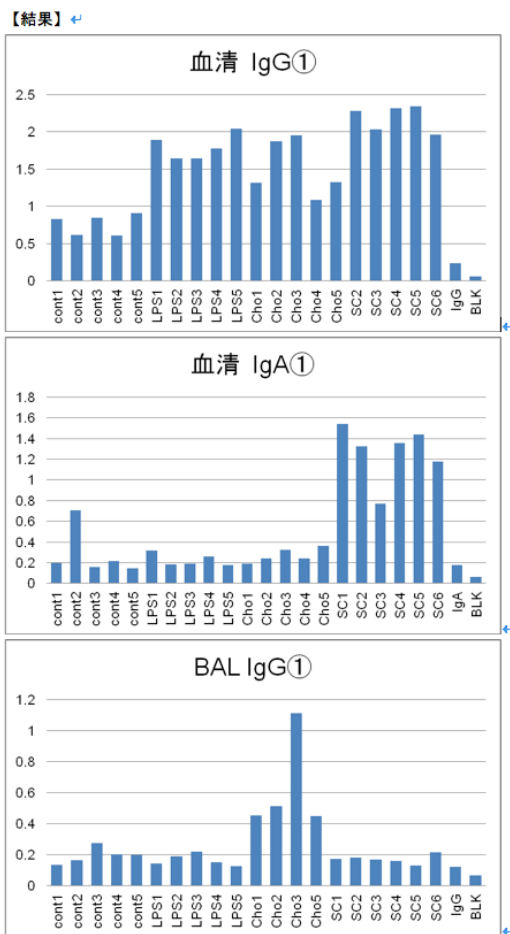
【実験 1】BLAB/c マウスにおいて, SC 群では血清 IgG, IgA の誘導された. IN 群ではいずれも誘導されなかった. 気管支肺胞洗浄液 (BAL) 中の IgG, IgA はいずれの群でも誘導されなかった.

【実験 2】PPV の量を 23  $\mu$ g  $\rightarrow$  69  $\mu$ g に増量し, 投与回数も 2 回/週  $\rightarrow$  4 回/週に増加したが, 結果はいずれの群でも BAL 中での特異的免疫グロブリンは検出出来なかった.

【実験 3】上記の結果を踏まえ次のような条件下で実験を進めた. すなわち SC 群：希釈した PPV 23ug/0.5ml を day1 に SC. IN(LPS)群：PPV(69u/60u1) + LPS(10ug/20u1) を day1, 8, 15, 22 に IN. IN(コレラトキシン)群：PPV(69ug/60u1) + コレラトキシン(1.6ug/8u1) + PBS19u1 を day1, 8, 15, 22 に IN. SC+IN(LPS)群：PPV 23ug/0.5ml を day1 に SC, PPV(69ug/60u1) + LPS(10ug/20u1) を day22 に IN. SC+IN(LPS)群：PPV 23ug/0.5ml を day1 に SC, PPV(69ug/60u1) + コレラトキシン(1.6ug/8u1) を day22 に IN. day28 に ELISA 法で血清中, BAL 中 IgG, IgA を測定した.

結果：BAL IgG：IN(コレラトキシン)のみ上昇. SC, SC+IN(コレラトキシン, LPS)では誘導できなかった.

BAL IgA: いずれの群でも誘導できなかった。



## 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 43 件)

研究期間(H22年～24年, 2010年～2012年)の研究実績,

- 1) Kato A, Suzuki Y, Suda T, Suzuki M, Fujie M, Takita T, Furuhashi M, Maruyama Y, Chida K, Hishida A : Relationship between an increased serum kynurenine/tryptophan ratio and atherosclerotic parameters in hemodialysis patients. Hemodial International 14(4) : 418-424, 2010.
- 2) Suda T, Kono M, Nakamura Y, Enomoto N, Kaida Y, Fujisawa T, Imokawa S,

Yasuda K, Hashizume H, Yokomura K, Toyoshima M, Koshimizu N, Suganuma H, Shirai T, Hashimoto D, Inui N, Colby TV, Chida K : Distinct prognosis of idiopathic nonspecific interstitial pneumonia (NSIP) fulfilling criteria for undifferentiated connective tissue disease (UCTD). Respir Med 104: 1527-34, 2010.

3) Suzuki Y, Suda T, Furuhashi K, Suzuki M, Hashimoto D, Nakamura Y, Inui N, Nakamura H, Chida K : Increased serum kynurenine/tryptophan ratio correlates with disease progression in lung cancer . Respir Med 67(3) : 361-5, 2010.

4) Karayama M, Inui N, Suda T, Nakamura Y, Nakamura H, Chida K : Antiendothelial Cell Antibodies in Patient With COPD. Chest 138(6) : 1303-8, 2010.

5) Uto T, Tsujimura K, Uchijima M, Seto S, Nagata T, Suda T, Chida K, Nakamura H, Koide Y. : A novel vaccine strategy to induce mycobacterial antigen-specific Th1 responses by utilizing the C-terminal domain of heat shock protein 70. FEMS Immunol Med Microbiol. 61(2):189-96, 2011.

6) Furuhashi K, Suda T, Hasegawa H, Suzuki Y, Hashimoto D, Enomoto N, Fujisawa T, Nakamura Y, Inui N, Shibata K, Nakamura H, Chida K : Mouse Lung CD103+ and CD11bhigh dendritic cells preferentially induce distinct CD4+ T cell responses. Am J Respir Cell Mol Biol 46(2): 165-172, 2011.

7) Suzuki Y, Suda T, Furuhashi K, Shibata K, Hashimoto D, Enomoto N, Fujisawa T, Nakamura Y, Inui N, Nakamura H, Chida K : Mouse CD11bhigh lung dendritic cells

have more potent capability to induce IgA than CD103+ lung dendritic cells in vitro. Am J Respir Cell Mol Biol 46(6):773-80, 2012

8) Kono M, Nakamura Y, Suda T, Uchijima M, Tsujimura K, Nagata T, Giermasz A, Kalinski P, Nakamura H, Chida K: Enhancement of protective immunity against intracellular bacteria using type-1 polarized dendritic cell (DC) vaccine. Vaccine 30:2633-2639, 2012

9) Karayama M, Inui N, Suda T, Nakamura Y, Enomoto N, Chida K: Pulmonary dendritic cell accumulation in usual interstitial pneumonia and nonspecific interstitial pneumonia. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis 29:69-73, 2012

10) Inui N, Kato T, Uchida S, Chida K, Takeuchi K, Kimura T, Watanabe H: Novel patch for transdermal administration of morphine patch for transdermal administration of morphine. J Pain Symptom Manage 44(4):479-85, 2012

11) Kusagaya H, Inui N, Karayama M, Nakamura Y, Kuroishi S, Yokomura K, Toyoshima M, Shirai T, Masuda M, Yamada T, Yasuda K, Suda T, Chida K: Biweekly combination therapy with gemcitabine and carboplatin compared with gemcitabine monotherapy in elderly patients with advanced non-small-cell lung cancer: a randomized, phase-II study. Lung Cancer 77(3):550-5, 2012

[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  
なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
千田 金吾 (CHIDA KINGO)  
浜松医科大学・医学部・准教授  
研究者番号 40197611

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし