

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 1 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790543

研究課題名（和文）ポリミキシン系抗生物質による新規粘膜アジュバント開発のための基礎的研究

研究課題名（英文）The fundamental study for polymyxins as novel and safe mucosal adjuvants

## 研究代表者

吉野 直人 (YOSHINO NAOTO)

岩手医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20372881

研究成果の概要（和文）：ワクチンによる抗原特異的免疫応答を増強するためには、安全かつ有効なアジュバントを開発する必要がある。本研究で、臨床で使用されているポリペプチド系抗生物質（ポリミキシン B（PMB）とコリスチン（CL））を卵白アルブミン（OVA）とともに経鼻免疫をすることで、用量依存的に全身および粘膜組織に OVA に特異的な液性免疫応答を増強させることを明らかにし、追加免疫により OVA 特異的免疫応答が 8 ヶ月間持続することを示した。さらに、PMB または CL の経鼻免疫では、鼻腔と嗅球のいずれの炎症反応も腎障害も示さなかった。これらのデータは、ポリミキシンが液性免疫応答を増強する新規かつ安全な粘膜アジュバントとして用いられる可能性があることを示唆した。リポ多糖（LPS）低反応性マウスと LPS 感受性マウスで PMB のアジュバント効果はほぼ同等であることから、PMB のアジュバント活性はその殺菌効果により放出された LPS によるものではなかった。また、PMB を前投与することで抗 PMB 抗体が誘導されるが、抗 PMB 抗体が経鼻免疫によるアジュバント効果の減弱は認められなかった。OVA と PMB または CL を併用した経鼻免疫での OVA 特異的抗体価は、ポリミキシンの誘導體（ポリミキシン B ノナペプチド（PMBN）やコリスチンメタンスルホン酸塩（CLMS））を投与したマウスでの抗体価より有意に高かった。PMB または CL の刺激により肥満細胞培養上清中に放出されるヒスタミンや  $\beta$ -ヘキソサミニダーゼも、誘導體によって放出されるレベルより有意に高かった。これらの結果は、疎水性炭素鎖と親水性陽イオン環状ペプチドが PMB と CL の粘膜免疫賦活作用に寄与することを示唆した。

研究成果の概要（英文）：There is currently an urgent need to develop safe and effective adjuvants for enhancing vaccine-induced antigen-specific immune responses. We demonstrate here that intranasal immunization with clinically used polypeptide antibiotics, polymyxin B (PMB) and colistin (CL), along with ovalbumin (OVA), increases OVA-specific humoral immune responses in a dose-dependently manner at both mucosal and systemic compartments. Enhanced immunity by boosting was found to persist during 8 months of observation. Moreover, mice intranasally immunized with OVA plus various doses of PMB or CL showed neither inflammatory responses in the nasal cavity and olfactory bulbs nor renal damages, compared to those given OVA alone. These data suggest that polymyxins may serve as novel and safe mucosal adjuvants to induce humoral immune responses. The polymyxin adjuvant activity was found to be independent of endotoxins liberated by its bactericidal activity, as indicated by similar enhancing effects of PMB in lipopolysaccharide (LPS)-hyporesponsive and LPS-susceptible mice. However, despite the presence of preexisting anti-PMB antibodies, we observed no reduction in the adjuvant function of polymyxins when they were given intranasally. Furthermore, the titers of OVA-specific Abs in mice intranasally immunized with OVA plus PMB or CL were significantly higher than those in mice administered with polymyxin analogues, such as polymyxin B nonapeptide and colistin methanesulfonate. The levels of released  $\beta$ -hexosaminidase and histamine in mast cell culture supernatants stimulated by PMB or CL were also significantly higher than those stimulated by their analogues. These results suggest that both the hydrophobic carbon chain and hydrophilic cationic cyclic peptide contribute to the mucosal adjuvant activity of PMB and CL.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：粘膜免疫、ワクチン、アジュバント

### 1. 研究開始当初の背景

多くの病原体は、口腔、鼻腔、消化管、気管、泌尿生殖器などの粘膜面を介して感染していく。これら粘膜組織には、全身性の免疫機構とは異なる特徴を有した免疫系（粘膜免疫）が存在する。言うなれば、粘膜免疫は病原体の侵入門戸であると同時に生体防御の最前線を担っている。粘膜面の防御免疫能を高めることは病原体の侵入を水際で防ぐことになり、近年粘膜ワクチン開発のための研究が世界的に盛んに行われるようになった。

免疫経路としては主に経鼻、経口、経直腸、経膣での接種が検討されているが、それぞれの投与経路には長所短所がある。例えば、直腸、膣を介した接種方法はヒトへのワクチン接種において簡便ではない。経口接種は既にポリオワクチンでも行われている方法であるが、サブユニット型ワクチンなどでは抗原量を増やしたり制酸剤を使用する必要がある。また、高齢マウスを用いた研究では、若年マウスに比較して免疫は効果が減弱することが明らかになっている。経鼻免疫は免疫効率が非常に高いが、嗅球や脳への影響が問題となる。粘膜免疫を効果的に高めるために病原体抗原とともに粘膜アジュバントを併用して経粘膜接種するワクチンが研究されており、代表的な粘膜アジュバントにコレラ毒素(CT)がある。その効果は小動物のみならず、アカゲザルを使用した研究においても確認されている。しかし、CTの脳への影響やエンテロトキシンをアジュバントとしたワクチンの臨床試験では顔面麻痺といった重篤な副作用も報告されている。

### 2. 研究の目的

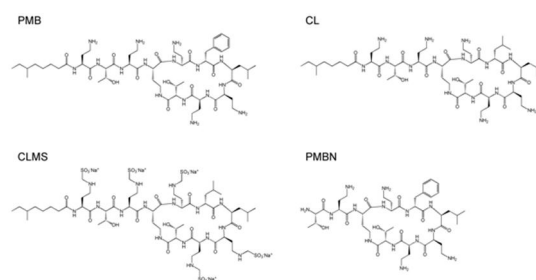
本研究は、安全性を最優先に考慮した新規粘膜アジュバントの研究開発である。そこで、既存の医薬品に着目し、まず免疫系を刺激/増強する可能性のある医薬品を検索した。アジュバントの多くが自然免疫を刺激する作用を持つことから、肥満細胞に作用することが知られているポリミキシン系抗生物質を選択した。本研究では、粘膜アジュバントとしてのポリミキシン系抗生物質の免疫誘導効果、ワクチンとしての感染防御効果、安全性、作用機序に焦点をあて解析検討を行うことを目

的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では将来的なポリミキシン類アジュバントの初期研究であり、ポリミキシン類による粘膜免疫誘導の基礎的知見を得るためのものである。そのため、基礎検討では抗原として繁用されているOVAを用いることとした。ポリミキシン類は *Bacillus polymyxa* が産生した抗生物質として使用されているPMB、CL、PMBN、CLMSを使用した (Fig. 1)。

Fig. 1



#### (1) 免疫応答に関して

血中及び粘膜分泌液中にOVA特異抗体をELISAで測定し、また粘膜関連組織における特異抗体産生細胞数をELISPOT法で計測した。長期的な観察を行うことで免疫応答の持続や記憶免疫の誘導を確認した。

#### (2) 安全性に関して

接種を行ったマウスの鼻組織や脳、および副作用が知られている腎臓などの病理解析を行った。免疫増強による副反応を検討するため、血中IgE抗体量の測定を行った。

#### (3) 作用機序に関して

ポリミキシン類はLPS結合能を持つためLPSに対する感受性の異なるマウス(C3H/HeN、C3H/HeJ)を用い、アジュバント効果を検証した。培養細胞を用い、*in vitro*においてポリミキシン類の作用を検討した。

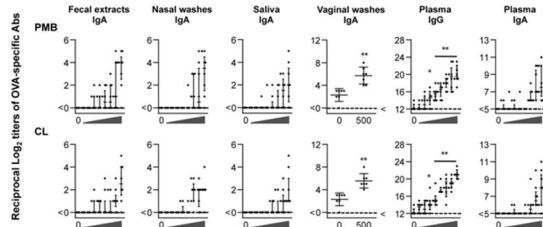
### 4. 研究成果

#### (1) OVA特異的液性免疫の評価

OVA単独で経鼻投与したマウスの糞便の抽

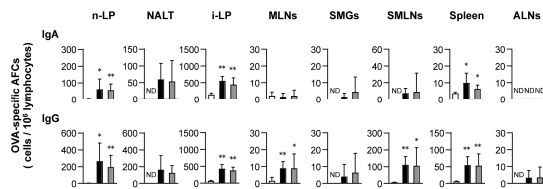
出液、鼻腔洗浄液、唾液中の OVA 特異的 IgA 抗体価は検出限界以下であったが、PMB または CL と共に免疫をすると OVA 特異的 IgA 抗体価は用量依存的に増大した。また、OVA 単独群と比較して、PMB 群または CL 群での膣洗浄液中の OVA 特異的 IgA 抗体価は有意に高かった。血漿中の OVA 特異的 IgA および IgG 抗体価も同様であった。ただし、同一量での PMB 群と CL 群には差はなかった (Fig. 2)。

Fig. 2



更に OVA 特異的な抗体応答を確認するために、粘膜組織 (n-LP、NALT、i-LP、MLNs、SMGs と SMLNs) および全身組織 (脾臓と ALNs) での OVA 特異的抗体産生細胞数を比較した。OVA 特異的抗体産生細胞は測定した全粘膜組織で検出された。また、OVA 単独群と比較して有意に OVA 特異的抗体産生細胞が多く誘導された組織が存在した (Fig. 3)。

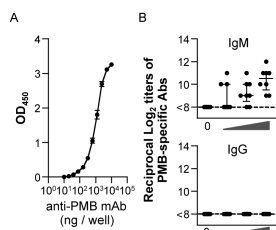
Fig. 3



#### (2) 血漿中抗 PMB 抗体の定量化

抗 PMB 抗体を検出するための ELISA を確立し、OVA+PMB を経鼻免疫した後の抗体価を測定した。抗 PMBIgM 抗体は OVA+PMB で免疫をしたマウスの血漿で検出されたが、IgG 抗体価は検出限界未満だった (Fig. 4)。

Fig. 4



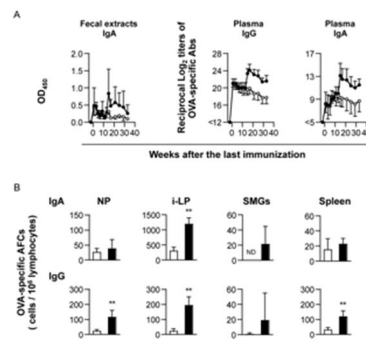
抗 PMB 抗体が検出されたため抗 PMB 抗体が PMB のアジュバント効果を減ずるかどうかを

調べたが、抗 PMB 抗体が存在していても経鼻免疫でのアジュバント効果に影響はなかった (data not shown)。

#### (3) OVA 特異的抗体産生の持続性の評価

糞便抽出液中の OVA 特異的 IgA 抗体レベルおよび血漿中の OVA 特異的 IgG、IgA 抗体レベルはピーク後に減少し続けたが、追加免疫を行った群では抗体価の上昇が見られ、31 週まで維持された。さらに、追加免疫群では最終免疫から 31 週間後でも NP、i-LP、SMGs、脾臓での OVA 特異的抗体産生細胞が検出された (Fig. 5)。

Fig. 5



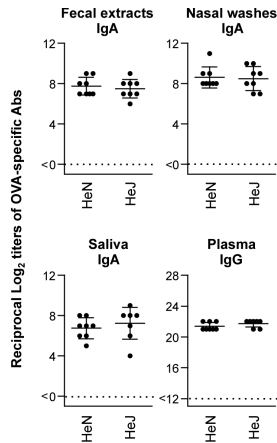
#### (4) 総 IgE 抗体量およびポリミキシンの亜急性毒性

CT を用いた経鼻免疫では血漿中の総 IgE 抗体量は 1,165ng/mL であった。これに対し、PMB または CL での免疫後の総 IgE 抗体量は OVA 単独群での値 (68.3ng/mL) とほぼ同じだった。また、CT の経鼻免疫では鼻粘膜に重度の炎症を起こしたのに対し、PMB または CL ではこれらの反応は見られなかった。また、嗅球、腎臓でも異常は見られなかった。

#### (5) C3H/HeN と C3H/HeJ マウスでの免疫応答の比較

粘膜分泌液と血漿の OVA に特有の抗体のレベルは、LPS 低反応性の C3H/HeJ マウスでも LPS 感受性 C3H/HeN マウスでも同等であった (Fig. 6)。

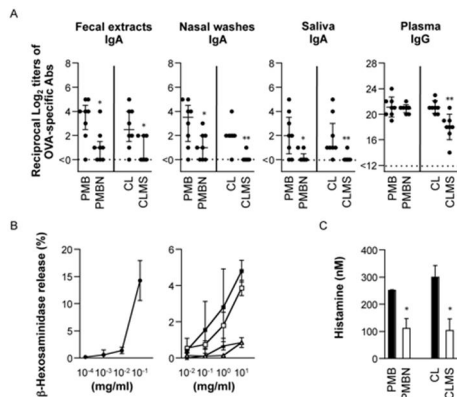
Fig. 6



(6) ポリミキシン誘導体との比較

経鼻投与でPMBNとPMB、CLMSとCLを比較すると、糞便抽出液、唾液、鼻腔洗浄液中のOVA特異的IgA抗体価は有意にPMBN、CLMSともに減少していた。マウス肥満細胞株からのβ-ヘキソサミニダーゼおよびヒスタミンの放出もPMBN、CLMSともにPMBおよびCLよりも低かった (Fig. 7)。

Fig. 7



PMB および CL の粘膜アジュバント活性には疎水性である脂肪鎖と分子の正の電荷が関与していると推測され、PMB および CL の陽イオン性界面活性剤の構造が重要であると考えられた。

粘膜を介して感染する病原体は特に5歳以下の小児に重篤な感染症を引き起こし、毎年小児の約1,000万人の死亡原因となる。ポリミキシンは小児や新生児でも臨床的に使われており、本研究はポリミキシンが成人のみならず小児を対象としたより安全な粘膜アジュバントとなり、効果的なワクチンを開発でき

る可能性があることを示した。

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2件)

1. Yoshino N, Kanno H, Takahashi K, Endo M, Sato S. Mucosal Immune Responses in *W/W<sup>u</sup>* and *SI/SI<sup>d</sup>* Mutant Mice. *Exp. Anim.* 2012;61(4):407-416. (査読あり) DOI: 10.1538/expanim.61.407
2. Yoshino N, Endo M, Kanno H, Matsukawa N, Tsutsumi R, Takeshita R, Sato S. Polymyxins as novel and safe mucosal adjuvants to induce humoral immune responses in mice. *PLoS One.* 2013 Apr 11;8(4):e61643. (査読あり) DOI: 10.1371/journal.pone.0061643

[学会発表] (計6件)

1. 吉野直人, 遠藤正宏, 松川直美, 堤玲子, 佐藤成大: ポリミキシン誘導体によるアジュバント効果の比較. 第16回日本ワクチン学会 (2012.11 横浜)
2. 吉野直人, 遠藤正宏, 松川直美, 堤玲子, 佐藤成大: ポリミキシンのアジュバント効果における分子構造の検討. 第66回日本細菌学会東北支部会 (2012.8 仙台)
3. 遠藤正宏, 吉野直人, 菅野祐幸, 堤玲子, 松川直美, 佐藤成大: 新規粘膜アジュバントとしてのポリミキシン類のアジュバント活性. 第15回日本ワクチン学会 (2011.12 東京)
4. Yoshino N, Ami Y, Hirai A, Suzuki Y, Sato S. Suppression of cholera toxin-induced diarrhea by translingual vaccination. *International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. (13th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology)* (2011.9. Sapporo, Japan).
5. 遠藤正宏, 吉野直人, 菅野祐幸, 堤玲子, 松川直美, 佐藤成大: ポリミキシン類の粘膜アジュバント活性と長期免疫誘導. 第65回日本細菌学会東北支部会 (2011.8 山形)
6. 遠藤正宏, 吉野直人, 菅野祐幸, 堤玲子, 松川直美, 佐藤成大: 経鼻投与におけるポリミキシン類の粘膜アジュバント活性. 第622回岩手医学会 (2011.5 盛岡)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
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  
吉野 直人 (YOSHINO NAOTO)  
岩手医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：20372881

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者