

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861572

研究課題名(和文) Phosphorylcholine経皮投与による粘膜免疫応答の誘導と制御機構の解明

研究課題名(英文) Transcutaneous immunization with phosphorylcholine induces antigen-specific mucosal and systemic immune responses in BALB/c mice

研究代表者

永野 広海 (Nagano, Hiromi)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：60613148

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：目的：経皮免疫は、新しい投与形態である。ホスホリルコリン(以下PC)をマウスに経皮投与することにより、免疫特性に関して研究する。方法：抗原のPCにアジュバンドとしてコレラトキシンを用いBALB/cマウスの背部に抗原投与した。抗原投与は1回/週ごとに6回投与し、経時的のELISA法にて測定した。結果：投与終了後から6ヶ月に渡り血清中にPC特異的IgG、IgAを認め、また唾液中の特異的IgAを認めた。結論：ホスホリルコリンをマウスに経皮投与することにより、これまで我々が報告してきた経鼻投与と同様に、血清中や粘膜面に半年に渡りPC特異的抗体の産生を高める効果が認められた。

研究成果の概要(英文)：Objective: Transcutaneous immunization (TCI) is a novel route of vaccination through application of a topical vaccine antigen on the skin. The purpose of the study was to examine the effect of TCI using PC in BALB/c mice. Methods: TCI was performed in BALB/c mice using PC-keyhole limpet hemocyanin (KLH) plus cholera toxin (CT). Immunogenicity was evaluated by measuring PC-specific IgG and specific IgG1, IgG2a, IgM, IgA, and secretory IgA antibodies by ELISA. Results: Six months after immunization, IgG after TCI using PC plus CT was significantly higher than in controls, but this was not found for IgA. In saliva, secretory IgA antibodies decreased with a peak level at two to three months. IgG1 was significantly higher than IgG2 after TCI. Conclusions: These results suggest that TCI using PC plus CT with BALB/c mice is a simple approach for induction of systemic and mucosal immune responses that are shifted in the Th2 direction.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：経皮免疫 ホスホリルコリン コレラトキシン 特異的IgA

1. 研究開始当初の背景

近年、抗菌剤の乱用から MRSA や多剤耐性緑膿菌などの薬剤耐性菌が蔓延し、臨床の現場では感染の遷延化・難治化が起こり加療の難渋するケースは決して少なくない。われわれ耳鼻咽喉科でも例外はなく、小児の難知性中耳炎は、加療に難渋し、炎症の遷延化から聴力低下をきたすこともある。ワクチンの投与経路には皮下注射などの全身投与と経鼻ワクチンや舌下ワクチンなどの経粘膜投与の2つが代表的であるが、経粘膜投与の経鼻ワクチンでは顔面神経麻痺の有害事象が報告された。有害事象の少ない投与経路が模索されており、近年新たな投与方法として経皮ワクチンが注目されている。その特徴として、他の粘膜ワクチンと同様に接種時に痛みを伴わないこと、また血管が分布していない皮膚の表皮に局限して抗原を投与するため発熱やアナフィラキシーのような副作用が起こらないなどの特徴がある。しかし皮膚の角質層は500ダルトンルールがあるように高分子物質の透過は難しいため、確実に表皮に抗原を投与する必要があり、マイクロニードルを用いた方法が報告がされている。我々もマイクロニードルを用いコレラトキシンを用い経皮免疫することで血清中や口腔を含む上気道や腸管粘膜においてCT特異的IgAの産生を促すこと報告した。

今回の研究テーマである粘膜免疫は、病原菌を含めた抗原の侵入門戸である粘膜における抗原特異的分泌型IgAを誘導するとともに、血中の抗原特異的IgGも誘導することによる二段構えの防御機構を有する免疫機構である。これまで我々は、中耳炎を含めた上気道感染防御粘膜ワクチン開発に向けて、基礎実験を行い、知見を蓄積してきた。現在は、ワクチン抗原としてグラム陽性菌や陰性菌

の細胞膜の細胞膜の存在する多糖性構造物として知られるPCに注目している。以前経鼻PC投与により肺炎球菌やインフルエンザ菌の鼻腔からのクリアランスが上昇することを報告してきた。今回はPCの経皮投与により、粘膜面にPC特異的IgAが誘導され、そのPC特異的IgAを含む唾液が肺炎球菌やインフルエンザ菌の鼻腔からのクリアランスが上昇することが推測され、新しい上気道感染予防が期待される。

PCの経皮投与によって誘導される粘膜および全身免疫応答の特徴やその誘導起序は未だに明らかにされていない。

2. 研究の目的

今回使用した抗原であるPCは、様々な細菌の細胞膜の表面に発現している共通の構成成分であり、これらに対する抗体の産生を安全に誘導できれば粘膜面において幅広い細菌制御の可能性はある。

当教室では、以前よりPCに注目し、PCの経鼻投与により肺炎球菌やインフルエンザ菌の鼻腔からのクリアランスが上昇することを報告してきた。

ワクチン開発において、有害事象が少なく、簡便な投与方法を模索すべく、我々がこれまで報告してきた経鼻免疫以外の投与経路を探るべく、経皮免疫について検討した。

3. 研究の方法

6週齢のBALB/cマウスを用いて無刺激コントロール群と背部の皮膚にPC200 μ gを塗布した群(アジュバンドとしてCT1 μ g)とで比較検討を行った。刺激頻度は、1週間に1度を6週間行い、合計6回の免疫投与を行った。

血清中のPC特異的IgM、IgG、IgA、IgG

サブクラス、唾液中の PC 特異的 IgA を投与終了後から 1 ヶ月ごとに 6 ヶ月まで経時的の ELISA 法にて測定した。

投与終了後 6 ヶ月後に血清、鼻汁洗浄液、唾液、膣洗浄液、脾臓を採取した。血清からは PC 特異的 IgM, IgG, IgA, IgG サブクラスを、ELISA 法を用いて測定した。また鼻汁洗浄液、唾液、膣洗浄液からは PC 特異的 IgA を、ELISA 法を用いて測定した。

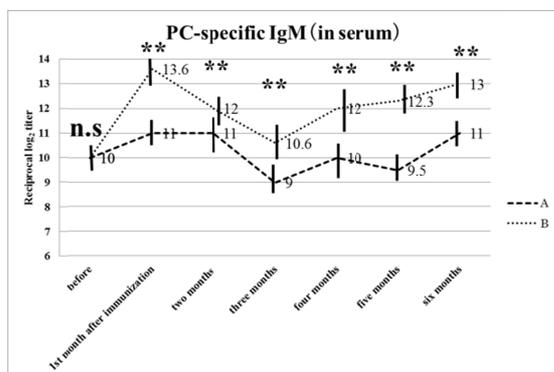
脾臓からは、PC 特異的リンパ球を分離しサイトカイン (IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IFN- γ) を ELISPOT 法で測定した。

4. 研究成果

血清では、コントロール群、経皮免疫群ともに PC 特異的 IgM, IgA, IgG の産生を確認できた。IgM では 2 群間に有意差は認めなかったものの、IgG, IgA では、経皮免疫群の方が統計学的有意に高値であった。

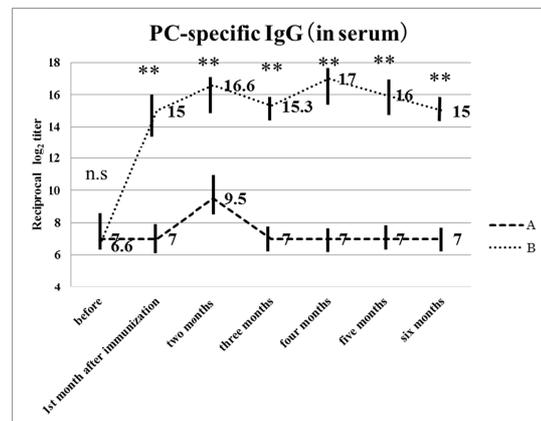
鼻汁洗浄液、唾液、膣洗浄液では、コントロール群では、PC 特異的 IgA の産生は確認できなかった。一方経皮免疫群では、すべての部位で PC 特異的 IgA の産生を確認できた。

血清中 PC 特異的 IgM の経時の変化は、経皮免疫群では 6 ヶ月間コントロールより有意の高値を示した (Fig.1)。

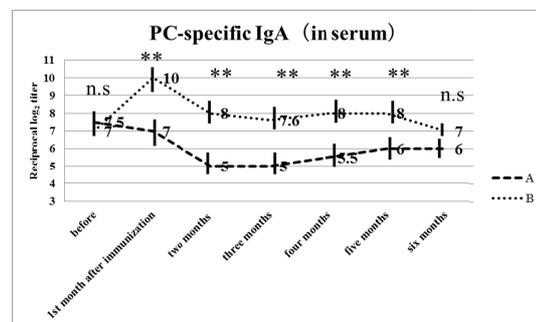


血清中 PC 特異的 IgG の経時の変化は、経皮免疫群では 6 ヶ月間コントロールより有意の

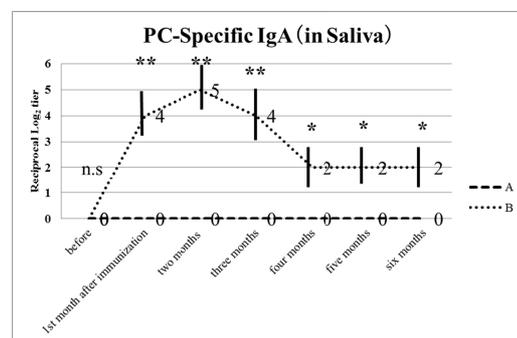
高値を示した (Fig.2)。



血清中 PC 特異的 IgA の経時の変化は、経皮免疫群では 5 ヶ月間コントロールより有意の高値を示したが、次第に減少し 6 ヶ月目の有意差がなくなった (Fig.3)。



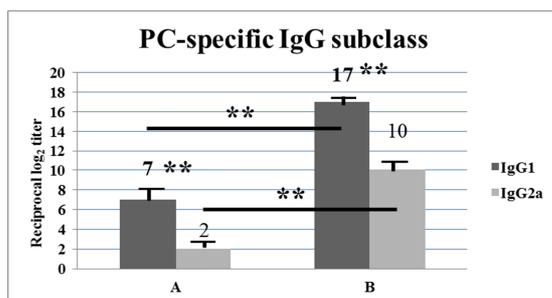
唾液中の PC 特異的 IgA の経時の変化は、経皮免疫群では 6 ヶ月間コントロールより有意の高値を示した (Fig.4)。



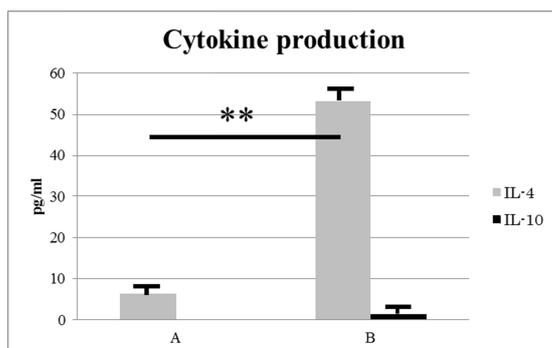
コントロール群では一度も検出されなかつ

た。

血清を用いた IgG サブクラスの検討では、コントロール群、経皮免疫群ともに PC 特異的 IgG1, IgG2a の産生を確認できた。IgG1, IgG2a とともに、経皮免疫群の方が統計学的有意に高値であった。また、経皮免疫群において、IgG1の方が IgG2a よりも統計学的有意に高値であった (Fig.5)。



またサイトカインは IL-4 がコントロールと比べて有意の上昇していた (Fig.6)。



IFN- γ , IL-5, IL-12, IL-13 は検出されなかった。

脾臓を用いた ELISPOT 法の検討では、コントロール群、経皮免疫群ともに IgM, IgG, IgA を産生する PC 特異的リンパ球を確認できた。IgM と IgA では、2 群間に有意差は認めなかったものの、IgG では、経皮免疫群の方が統計学的有意に高値であった。

以上の結果より、PC は様々な細菌の細胞膜の構成成分であるため腸内細菌等によりコ

ントロール群でも血清中では確認されるものの粘膜面では抗原特異的 IgA は確認されなかった。経皮免疫群では、コントロール群と比較して、血清中の IgA、粘膜面 (唾液) において統計学的有意に抗原特異的 IgA の産生を約 6 ヶ月間にわたり認めた。したがって PC を経皮免疫することで、血清中や粘膜面において抗原特異的抗体産生を認め、粘膜免疫の可能性が示唆された。

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. H. Nagano : Transcutaneous immunization with phosphorylcholine induces antigen-specific mucosal and systemic immune responses in BALB/c mice. *Auris Nasus Larynx*. In press. 2015 (査読有り)

2. 永野広海 : コレラトキシン経皮免疫による粘膜免疫応答 日本口腔・咽頭科学会 25(1) 79-84 2012 (査読有り)

[学会発表](計 6 件)

1. 永野広海 : ヒアルロン酸マイクロニードルを用いた経皮免疫による粘膜免疫応答の誘導 第 32 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2月6日-8日 2015 (東京)

2. 永野広海 : PC および CT 経皮免疫による粘膜免疫応答の誘導 第 32 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2月6日-8日 2014 (徳島)

3. 永野広海 : 経皮免疫による口腔粘膜免疫応答の誘導 第 32 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 9月6日-8日 2013 (名古屋)

4. 永野広海 : PC 経皮免疫による粘膜免疫応答の誘導 第 31 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2月7日-9日 2013 (倉敷)

5. 永野広海 : PC 経皮免疫による粘膜免疫応答の誘導 第 10 回日本ワクチン学会 11月17日-18日 2012 (横浜)

6. H. Nagano : Transcutaneous immunization with cholera toxin in BALB/C mice. *The 14th Japan-Korea*

Joint Meeting of
Otorhinolaryngology-Head and Neck
Surgery 12-14 Mar. 2012 (Kyoto)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

永野 広海 (NAGANO HIROMI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60613148