

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31日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591911

研究課題名（和文） 経皮免疫による上気道粘膜免疫応答の誘導

研究課題名（英文） Transcutaneous immunization induces antigen specific mucosal and syatemic immune responses in mice

研究代表者

間世田 佳子(MASEDA YOSHIKO)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：70535666

研究成果の概要（和文）：

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、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 PC 特異的抗体の産生を高める効果が認められた。また、アジュバントとしてコレラトキシンを用いることで更なる効果を期待できると考える。

研究成果の概要（英文）：

In order to investigate the differences in the immune responses among several mucosal immunizations, mice were immunized with phosphorylcholine (PC) together with cholera toxin (CT) as mucosal adjuvant intranasally and transcutaneously, and the mucosal as well as systemic immune responses were compared. PC-specific IgA antibody titers in saliva and nasal wash were increased by intaranasal as well as transcutaneous immunization to the same levels.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2011年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2012年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

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：ホスホリルコリン コレラトキシン 経皮免疫 経鼻免疫 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・難治化がお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。

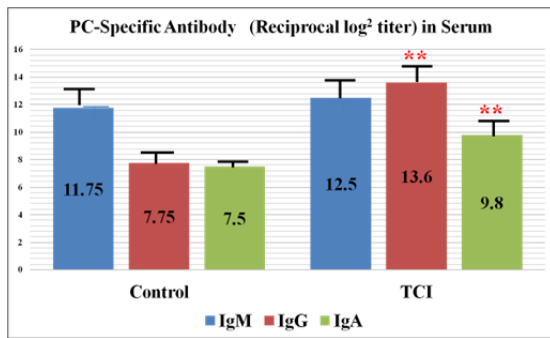
7週目に血清、鼻汁洗浄液、唾液、膣洗浄液、脾臓を採取した。血清からはPC特異的IgM, IgG, IgA, IgGサブクラスを、ELISA法を用いて測定した。

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。

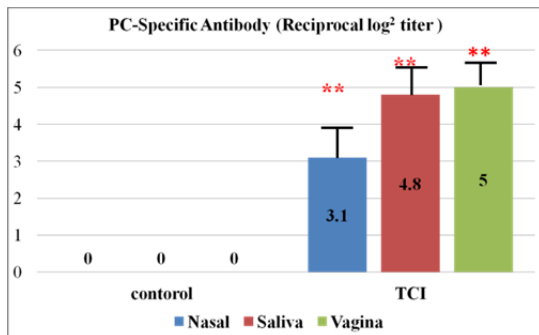
脾臓からは、PC特異的リンパ球をELISPOT法で測定した。

4. 研究成果

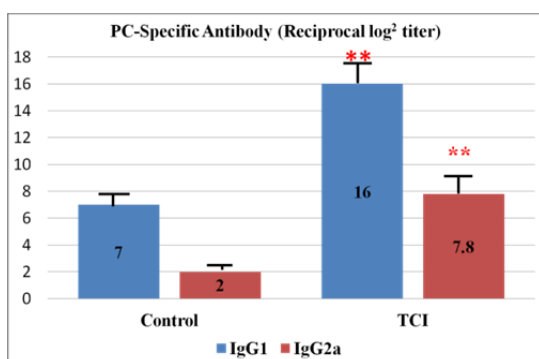
血清では、コントロール群、経皮免疫群ともにPC特異的IgM, IgA, IgGの産生を確認できた。IgMでは2群間に有意差は認めなかったものの、IgG, IgAでは、経皮免疫群の方が統計学的有意に高値であった。



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。

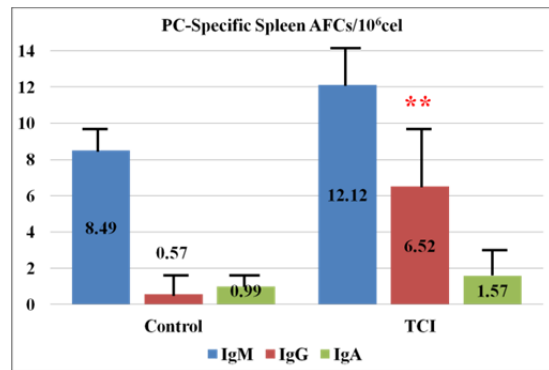


血清を用いた IgG サブクラスの検討では、コントロール群、経皮免疫群ともに PC 特異的 IgG1, IgG2a の産生を確認できた。IgG1, IgG2a とともに、経皮免疫群の方が統計学的有意に高値であった。また、経皮免疫群において、IgG1の方が IgG2a よりも統計学的有意に高値であった。



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、粘膜面における鼻汁洗浄液、唾液、膣洗浄液において統計学的有意に抗原特異的 IgA の産生を認めた。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. 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)
2. Y. Kurono : Diversity of mucosal immune responses in upper respiratory airways and the suitability of mucosal vaccines. Clinical & Experimental Allergy Reviews 12 1-6 2012 (査読無)

[学会発表] (計 5 件)

1. 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)
2. 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)

3. 間世田佳子：ホスホリルコリンによる経鼻免疫・舌下免疫応答の違いについて
第10回日本ワクチン学会 11月17日-18日 2012 (横浜)

4. Y. Kurono : Intranasal immunization of with Phosphorylcholine reduced type I allergic responses in mice. 24th Congress of the European Rhinologic Society. 31th International Symposium of Infection & Allergy of the Nose. 17-21 Jun. 2012 (Toulouse France)

5. 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

間世田 佳子 (MASEDA YOSHIKO)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教
研究者番号：70535666

田中 紀充 (TANAKA NORIMITSU)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号：90404483

(2) 研究分担者

黒野 祐一 (KURONO YUICHI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号：80153427

宮下 圭一 (MIYASHITA KEIICHI)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教
研究者番号：30585063

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

牧瀬 高穂 (MAKISE TAKAO)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・医員
研究者番号：30585120

松根 彰志 (MATSUNE SHOJI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・
准教授

研究者番号：00253899