

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月4日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11238

研究課題名(和文) 粘膜免疫応答誘導型経皮ワクチンの開発

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

研究代表者

永野 広海 (Nagano, Hiromi)

鹿児島大学・医歯学域医学系・講師

研究者番号：60613148

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

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。またそれらは長期間にわたり血清中と粘膜面にPC特異的抗体を誘導することができた。以上からホスホリルコリンによるワクチン開発の可能性を示唆するものである。サイトカインの分析からは、この実験系ではTh2型ヘシフトしており、接種部位のアレルギー反応には留意が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究より、背部の皮膚を用いた経皮免疫は、簡単な投与方法であるが一定期間血清中や唾液中に抗原特異的免疫グロブリンを確認でき、新たな投与経路としての可能性を示唆することができた。

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. 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.

研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科

キーワード：ホスホリルコリン 経皮免疫 特異的IgA

## 1. 研究開始当初の背景

近年、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌や多剤耐性緑膿菌などの薬剤耐性菌が蔓延し、また高病原性鳥インフルエンザの広域感染など、その予防と医療経済の観点からもワクチンの開発は急務である。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、期待されていた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。我々も以前、他誌にCTを抗原とした経皮免疫による粘膜免疫応答に関して報告した。

## 2. 研究の目的

今回使用した抗原であるホスホリルコリン(以下PC)は、様々な細菌の細胞膜の表面に発現している構成成分であり、これに対する抗体産生を誘導できれば粘膜面において幅広い細菌感染を制御できるのではないかと考える。またワクチンは摂取後どの程度の期間抗体価維持できるかを知ることは、実地臨床での応用を見据えると必要となる。PCの経皮投与による血清や粘膜面における免疫応答の誘導を経時的に調べ、経皮免疫の持続性を調べることを目的とする。

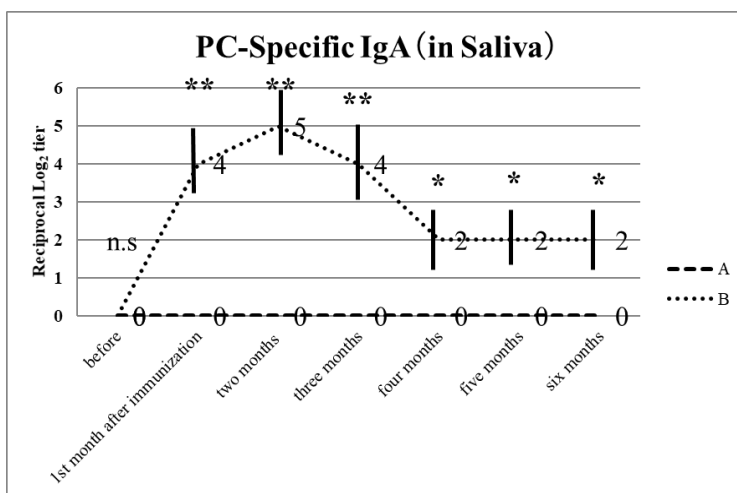
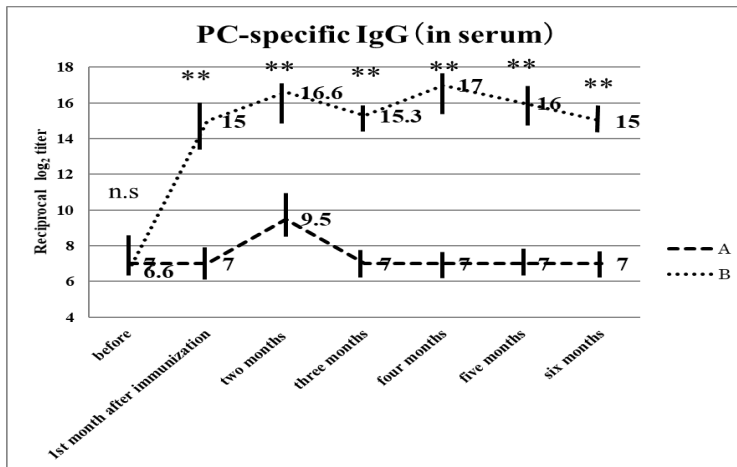
## 3. 研究の方法

実験動物として6週齢のBALB/cマウスを用いた。経皮投与群における抗原はPC(200 µg/回)を用いて、除毛した背部皮膚に滴下した。コントロール群は、リン酸緩衝生理食塩水(Phosphate buffered saline; 以下PBS)とCT(2 µg/回)を背部皮膚に滴下した。免疫は、1回/週の頻度で6回施行した。最終免疫から1回/月ごとに6カ月後まで、血清中PC特異的IgM、IgG、IgA、唾液中のPC特異的IgAをELISA法にて測定し、経時的变化を追跡した。また最終免疫から6カ月後に血清中PC特異的IgGサブクラスの測定と摘出した脾臓よりCD4陽性細胞を分離72時間培養し上清中のIFN-、IL-5、IL-4、IL-10、IL-12、IL-13をELISA法にて測定した。

## 4. 研究成果

経皮投与群は、コントロール群と比較して最終免疫から6カ月後も血清中PC特異的IgGは有意( $p<0.01$ )に高値を維持した。一方で血清中PC特異的IgAは、5カ月後までは有意( $p<0.01$ )に高値であったものの、6カ月後には有意差( $p>0.05$ )はなくなった。唾液中のPC特異的IgAは、経皮投与群は6ヶ月後も有意差( $p<0.01$ )を認めた。血清中PC特異的IgGサブクラスの検討では、経皮投与群( $p<0.01$ )とコントロール群( $p<0.01$ )ともIgG1がIgG2aより有意に高値であった。またIgG1( $p<0.01$ )、IgG2a( $p<0.01$ )ともに経皮投与群が有意に高値であった。IL-4は、経皮投与群( $53.3\pm 3.11\text{pg/ml}$ )がコントロール群( $6.4\pm 0.58\text{pg/ml}$ )と比較して有意( $p<0.01$ )に高値であった。IL-10は両群間で有意差は認めなかった。IFN-、IL-5、IL-12、IL-13は検出されなかった。

本研究より、背部の皮膚を用いた経皮免疫は、簡単な投与方法であるが一定期間血清中や唾液中に抗原特異的免疫グロブリンを確認でき、新たな投与経路としての可能性を示唆することができた。



## 引用文献

- [1] Margot M, Weigong Z, Rhodes P, Bopp M, Chen RT, Linder T, et al. Use of inactivated intranasal influenza vaccine and risk of Bells palsy in Switzerland. *N Engl J Med* 2004; 350:896-903.
- [2] Glenn GM, Rao M, Matyas GR, Alving CR. Skin immunization made possible by cholera toxin. *Nature* 1998;391:851.
- [3] Glenn GM, Kersten TS, Vassell R, Mallett CP, Hale TL, Alving CR. Cutting edge: transcutaneous immunization with cholera toxin protects mice against lethal mucosal toxin challenge. *J Immunol* 1998;161:3211-4.
- [4] Nagano H, Makise T, Kurono Y. Transcutaneous immunization with cholera toxin in BALB/c mice. *Stomatopharyngol* 2012;25:79-84 (in Japanese).
- [5] Tanaka N, Fukuyama S, Fukuiwa T, Kawabata M, Sagara Y, Ito HO, et al. Intranasal immunization with phosphorylcholine induces antigen specific mucosal and systemic immune responses in mice. *Vaccine* 2007;25:2680-7.
- [6] Kurono Y, Miyashita K, Makise T, Nagano H. Diversity of mucosal immune responses in upper respiratory organs and its application for mucosal vaccine. *Adv Otorhinolaryngol* 2011;72:146-8.
- [7] Mestecky J, Michalek SM, Moldoveanu Z, Russell MW. Routes of immunization and antigen delivery systems for optimal mucosal immune responses in humans. *Behring Inst Mitt* 1997; 98:33-43.
- [8] Rattanpak T, Birchall JC, Young K, Kubo A, Fujimori S, Ishii M, et al. Dynamic visualization of dendritic cell-antigen interactions in the skin following transcutaneous immunization. *PLoS One* 2014;9: e89503.
- [9] Baatarjav T, Kataoka K, Gilbert RS, Terao Y, Fukui M, Goto M, et al. Mucosal immune features to phosphorylcholine by nasal Flt3 ligand cDNA-based vaccination. *Vaccine* 2011; 29:5747-57.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Hiromi Nagano, Tomohiro Jimura, Miho Nagano, Takao Makise, Keiichi Miyashita,  
Yuichi Kurono

Transcutaneous immunization in auricle skin induces antigen-specific mucosal and systemic immune responses in BALB/c mice

Auris Nasus Larynx 44 411-416 2017

DOI 10.1016/j.anl.2016.08.006 (査読有)

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 永野広海

PspA 経皮ワクチンによる免疫応答の誘導

第 119 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 2018

2. Hiromi Nagano

Transcutaneous immunization with pneumococcal surface protein A in mice

The 17<sup>th</sup> Japan-Korea Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery  
2018

3. 永野広海

PspA 点眼投与による上気道粘膜免疫応答の誘導

第 36 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2017

4. 永野広海

PspA 点眼投与による上気道粘膜免疫応答の誘導

第 30 回日本口腔・咽頭科学会総会ならびに学術講演会 2017

5. 永野広海

シンポジウム「耳鼻咽喉科医療最前線」- ホスホリルコリンを用いたワクチン開発の展望 -

第 78 回耳鼻咽喉科臨床学会総会および学術講演会 2016

6. 永野広海

耳介経皮免疫によるホスホリルコリン特異的粘膜免疫応答の誘導

第 117 回日本耳鼻咽喉科学会通常総会・学術講演会 2016

〔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〕

ホームページ等 なし

## 6．研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：黒野 祐一

ローマ字氏名：KURONO Yuichi

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学域医学系

職名：教授

研究者番号（8桁）：80153427

研究分担者氏名：宮下 圭一

ローマ字氏名：MIYASHITA Keiichi

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学域附属病院

職名：助教

研究者番号（8桁）：30585063

研究分担者氏名：牧瀬 高穂

ローマ字氏名：MAKISE Takao

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学域医学系

職名：助教

研究者番号（8桁）：30585120

研究分担者氏名：地村 友宏

ローマ字氏名：JIMURA Tomohiro

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：附属病院

職名：医員

研究者番号（8桁）：10709596

### (2) 研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。