

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18317

研究課題名（和文）高齢者の肺炎球菌感染予防のためのホスホリルコリン経鼻追加ワクチンの開発

研究課題名（英文）Development of an additional intranasal phosphorylcholine vaccine for prevention of pneumococcal infection in the elderly

研究代表者

宮本 佑美（Miyamoto, Yumi）

鹿児島大学・医歯学総合研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学分野・医員

研究者番号：60747690

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）：本研究は、高齢者の肺炎球菌感染予防のための、現行の注射型ワクチンの共通課題点である粘膜免疫誘導能及び、広域スペクトラムを持つ経鼻ワクチンの投与方法開発を目的とした。肺炎球菌結合型ワクチンには肺炎球菌莢膜ポリサッカライド(PPS)が含まれ、これまでの当科の研究によりホスホリルコリン(PC)も含有することがわかっている。PPS及びPCの同時投与が可能という理由などで最終的に13価肺炎球菌結合型ワクチンを経鼻投与したところ、血清中のPPS及びPC特異的IgG上昇、唾液・鼻洗浄液中のPPS及びPC特異的IgA上昇を認め、全身免疫及び粘膜免疫がともに誘導されることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺炎球菌は乳幼児の鼻咽腔に高率に検出される肺炎最大の原因菌である。小児と高齢者で多数を占める菌血症・髄膜炎等の侵襲性肺炎球菌感染症(IPD)の原因となる。早期集団保育や高齢者の育児機会の増える現代において、小児のみならず高齢者も共に守るワクチン戦略が必要である。注射型ワクチンの課題点として粘膜免疫を誘導しない、非ワクチン株によるIPDの増加等がある。本研究では、全身・粘膜免疫を共に誘導し広域スペクトラムをもつ投与方法の開発として、最終的に肺炎球菌結合型ワクチンの経鼻投与を行った。研究遂行する中で、ポリサッカライド単独投与の課題点を、他研究から得られた共通点(後述)と重ね合わせることで抽出した。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to develop an intranasal vaccine with a broad spectrum and induction of mucosal immunity for prevention of pneumococcal infection in the elderly, which is a common problem of current injectable vaccines. The 13-valent pneumococcal conjugate vaccine, which contains pneumococcal capsular polysaccharide (PPS) and phosphorylcholine (PC), was administered intranasally because PPS and PC can be administered simultaneously, and the serum levels of PPS and PC were significantly elevated. The results showed an increase in PPS and PC specific IgG in serum, and an increase in PPS and PC specific IgA in saliva and nasal wash, indicating that both systemic and mucosal immunity of the upper airway were induced.

研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科

キーワード：経鼻ワクチン 上気道の粘膜免疫 分泌型IgA 肺炎球菌 肺炎球菌莢膜ポリサッカライド ホスホリルコリン

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

肺炎球菌は肺炎の最大の原因菌である。高率に乳幼児の鼻咽腔に検出され、中耳炎・副鼻腔炎等の非侵襲性感染症や、時に菌血症・髄膜炎等の侵襲性肺炎球菌感染症(IPD)の原因ともなる。国立感染症研究所の報告によると、患者属性として小児と高齢者が多数を占める。早期集団保育や高齢者の育児機会の増える現代において、小児のみならず高齢者も共に守るワクチン戦略が必要である。現行の注射型ワクチンの課題点として粘膜免疫を誘導しない、非ワクチン株によるIPD罹患率の増加(血清型置換)、疼痛、注入できる抗原量の少なさ、針・冷蔵庫・医療従事者などの医療資源の利用、複数回接種の必要性などがある。

経鼻型ワクチンは、抗原を粘膜面に投与することで鼻咽頭関連リンパ組織を刺激し、分泌型IgAを主体とした粘膜免疫応答を誘導し、上気道への細菌侵入時点で感染を防御することを目指したワクチンである。分泌型IgAは凝集作用や中和作用を持ち、粘液線毛輸送を介して細菌を効率よく体外へ排除する。また細菌の鼻咽腔上皮細胞への接着が有意に抑制されることもわかっている。更に、粘膜に分泌される分泌型IgAの交差反応性(抗体が、その抗体産生を引き起こした抗原以外の抗原の抗原決定基に結合すること)はIgGよりも高いと考えられているため、より広域のスペクトラム(多種の抗原への反応性)が期待できる。つまり、肺炎球菌感染症などの細菌感染症においては血清型を超えた反応が可能であることを意味する。さらに、経鼻ワクチンは、投与の簡便さや針を使用しない、という点で疼痛や医療資源、注入できる抗原量の少なさの問題、複数回接種の際の煩雑さをクリアできる可能性がある。また当科の以前の研究で、注射型のワクチンでプライミングを行い、経鼻型ワクチンでブーストを行うことで、鼻腔に効率的に分泌型IgAが誘導できる可能性が示唆されている<sup>1)</sup>。

肺炎球菌のPneumococcal Polysaccharide(PPS)は血清型を決定する強力な抗原であり約100種類報告されている。また、phosphorylcholine(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る。PPS及びPCに対する全身免疫及び粘膜免疫を誘導することができれば、肺炎球菌感染からより強力に、より広域に防御されることが期待できる。

肺炎球菌ワクチンは大きく2種類に分類される。代表的なワクチンである23価肺炎球菌莢膜Polysaccharideワクチン(PPSV23)には23種類の血清型特異的なPolysaccharideが含まれる。Polysaccharide自体はT細胞の誘導能がなく、PolysaccharideがB細胞レセプターに結合して形質細胞に変化した後に抗体産生を行う。よって、B細胞が未熟な2歳以下の小児では十分な免疫誘導が得られない。またT細胞を誘導しないため、複数回接種してもブースター効果が期待できない。現在5年おきのワクチン接種が行われている。

一方、13価肺炎球菌結合型ワクチン(PCV13)は13種類のpolysaccharideに、無毒性ジフテリア毒素CRM<sub>197</sub>を結合させており、このキャリア蛋白がB細胞内に取り込まれることで、T細胞上のMHCに抗原提示され、B細胞の形質細胞転化を促進し、メモリー細胞の誘導も行う。よってT細胞を介して特異的抗体を誘導することが可能となる。また、アジュバントとしてAlumが含まれている。Polysaccharideワクチンと比べると、結合型ワクチンのポリサッカライド含有量は1/10程度にも関わらず、T細胞依存性でありBoost効果が期待できる。また、これまでの当科の研究によりPCV13中にホスホリルコリン(PC)も含有することがわかっている<sup>1)</sup>。この2種類の性質の異なるワクチンの効果については、現在も議論と検証が続けられている。

## 2. 研究の目的

本研究は、高齢者の肺炎球菌感染予防のための、現行の注射型ワクチンの共通課題点である、粘膜免疫の誘導能と広域スペクトラムを持つ経鼻ワクチンの投与方法開発を目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究は初年度 Balb/c マウスを用いて研究を開始したが、高齢マウスが入手困難であったため次年度以降は C57BL/6 マウスを用いて動物実験を施行した。

- (1) PPSV23 の腹腔内投与により、全身免疫及び粘膜免疫誘導が得られるか検討した。PPSV23 原液を腹腔内投与し、PPS 及び PC 特異的血清 IgG、唾液中 IgA を評価した。
- (2) (1)の方法ではポリサッカライド自体の抗原量が少ないと考え、PPS powder を用いて抗原量を PPSV23 原液の 5 倍にした高濃度 PPS を腹腔投与及び経鼻投与し、全身免疫及び粘膜免疫誘導が得られるか否かについて検討した。PPS 特異的血清 IgG、唾液中 IgA を評価した。
- (3) 本研究中では(1)(2)において PPSV23 及び PPS powder の腹腔投与及び経鼻投与にて有効な免疫誘導が観察されなかったため、PCV13 を用いて腹腔投与効果と経鼻投与効果を比較した。高濃度に調整した PCV13 の腹腔及び経鼻投与を計 4 回行い PPS 及び PC 特異的血清 IgG・IgA、唾液中 IgA、鼻洗浄液中 IgA を評価した。
- (4) 投与方法を組み合わせる(priming-boost)することでより有効な免疫誘導能が出るか検証した。腹腔投与群、腹腔投与後経鼻投与群、経鼻投与群に分け効果を比較した。PPS 特異的血清 IgG・IgA 及び唾液中 IgA を評価した。
- (5) PCV13 経鼻投与を原液と、高濃度に調整した場合の濃度(抗原量)の差による全身及び粘膜免疫誘導能について比較した。PPS 特異的血清 IgG・IgA 及び唾液中・鼻洗浄液中 IgA を評価した。

尚、上記(1)-(5)の血清、唾液、鼻洗浄液中の抗体評価は ELISA 法を用いた。PPS と PC に対する特異的抗体は個別に評価した。当初予定していた感染実験による免疫効果の検証に関しては、本研究が当学内の動物実験施設工事と期間が重複し施行不可であった。

### 4. 研究成果

- (1) 血清中の PPS 及び PC 特異的 IgG は control 群と比較し上昇を認めたが、 $2^{10}$  倍以上の上昇は得られなかった。唾液中の PPS 及び PC 特異的 IgA は検出されなかった。
- (2) PPS powder の腹腔投与及び経鼻投与についても十分な血清 IgG の上昇を認めず、唾液中の分泌型 IgA も検出されなかった。
- (3) 腹腔投与群も経鼻投与群も、control 群と比較し有意な PPS 特異的血清 IgG 上昇がみられた。PPS 特異的血清 IgA に関しては、腹腔投与群と経鼻投与群で有意差がみられなかった。唾液中及び鼻洗浄液中 PPS 特異的 IgA に関しては経鼻投与群で有意な上昇が認められた。PCV13 中に PC が含有されていることにより、同様の傾向が PC 特異的抗体価でも認められた。
- (4) PCV13 の腹腔投与単独群、腹腔投与後経鼻投与群、PCV13 経鼻投与群にていずれも PPS 特異的血清 IgG は上昇し、群間差は認めなかった。PPS 特異的血清 IgA に関しても群間差を認めなかった。唾液中の PPS 特異的分泌型 IgA の検出は、経鼻投与群でのみ検出された。
- (5) PCV13 高濃度群で control 群及び PCV13 原液群と比較し PPS 特異的血清 IgG の有意な上昇を認めた。PPS 特異的血清 IgA の群間差は認めなかったが、PCV13 高濃度群で PPS 特異的唾液・鼻洗浄液中 IgA の有意な上昇を認めた。

#### 本研究の結論

PPSV23 及び PPS powder のようなポリサッカライド単独投与のみでは、腹腔投与・経鼻投与ともに十分な PPS 及び PC 特異的血清 IgG 上昇と分泌型 IgA の上昇が得られなかった。PCV13 腹腔投与により、PPS 及び PC 特異的な血清中 IgG を誘導した。一方 PCV13 経鼻投与では PPS 及び PC 血清中 IgG と分泌型 IgA の両方が誘導された。腹腔投与により誘導されなかった粘膜免疫が経鼻投与により誘導されている可能性が示唆された。

また、本研究においては、経鼻投与と比較した場合に prime-boost(本研究中では腹腔投与後の経鼻投与)が優位であるという結果は得られなかった。つまり経鼻投与のみで PPS 及び PC 特異的血清 IgG と分泌型 IgA の上昇が得られた。

#### 本研究から得られた洞察と今後の展望

当科の以前の研究<sup>1)</sup>や他施設の報告<sup>2)</sup>でも、PC や PsPA(pneumococcal surface protein A)に対する分泌型 IgA を誘導する抗原はいずれも抗原にキャリア蛋白を結合している。これらの実験結果からは、T 細胞が抗原に刺激される際に抗原ペプチドやキャリア蛋白が必要であることが示唆される。本研究の結果もこれを支持し得るものであるが、経鼻投与における粘膜免疫誘導における抗原ペプチドやキャリア蛋白の役割に関しては更なる検討が必要である。また、PPS 特異的血清 IgA と唾液中・鼻洗浄液中の IgA に相関がみられなかったという実験結果より、分泌型 IgA が全身性の免疫システムではなく、局所的な免疫システムによって産生されることが示唆された。これらの機序解明に向けて、追加実験を検討していく予定である。

## 引用文献

- 1) Ohori J. et al. Phosphorylcholine intranasal immunization with a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine can boost immune response against *Streptococcus pneumoniae* , *Vaccine* 38: 699-704, 2020.
- 2) 鈴木英彦ら, ワクチンデリバリーを基盤とした粘膜ワクチン開発, *Drug Delivery System* 33: 43-49, 2018

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮本佑美, 大堀純一郎, 川畠雅樹, 山下勝
2. 発表標題 13価肺炎球菌結合型ワクチン(PCV13)の高齢マウスへの経鼻投与効果
3. 学会等名 第5回日本アレルギー学会九州・沖縄支部地方部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮本佑美, 大堀純一郎, 松元隼人, 川畠雅樹, 永野広海, 山下勝
2. 発表標題 肺炎球菌ワクチン経鼻投与効果の検討
3. 学会等名 鹿児島大学第16回桜ヶ丘地区基礎系研究発表会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮本佑美, 大堀純一郎, 川畠雅樹, 永野広海, 山下勝
2. 発表標題 13価肺炎球菌結合型ワクチン経鼻投与による免疫誘導
3. 学会等名 第3回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮本佑美, 大堀純一郎, 永野広海, 山下勝
2. 発表標題 肺炎球菌結合型ワクチン経鼻投与による免疫誘導
3. 学会等名 第48回日本耳鼻咽喉科学会鹿児島県地方部会総会ならびに学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

肺炎球菌ワクチン経鼻投与効果の検討, 鹿児島大学第16回桜ヶ丘地区基礎系研究発表会  
優秀プレゼンテーション賞

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------