

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790475

研究課題名(和文) 舌を介した粘膜免疫誘導と経舌ワクチン開発のための基礎的研究

研究課題名(英文) The fundamental study for translingual vaccine development

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)：多くの感染症は粘膜面を介して生体に侵入する。近年、粘膜免疫を指標としたワクチン開発が多くなされており、エンテロトキシンをアジュバントとした経鼻ワクチンは、その有効性から期待が持たれていたが臨床試験において顔面麻痺を引き起こし、安全性が問題となっている。有効性、安全性、そして簡便なワクチン接種方法を開発するため、経舌接種の可能性を検討する事を目的とした。マウスに抗原として OVA、アジュバントとしてコレラ毒素(CT)を用い、マウスの舌に塗布した。一定期間後、血漿および粘膜分泌液中の OVA 特異抗体価、各種臓器における特異抗体産生細胞数を測定し、また安全性に関する試験を行った。C57BL/6 マウスの舌の上面または下面に OVA を 100  $\mu$ g と CT を 0, 0.5, 5  $\mu$ g を塗布した。血中の OVA 特異的 IgG 抗体価は CT 非投与群では低レベルであったが、CT 投与群では高レベルで特異抗体が観察された。糞便抽出液中の OVA 特異的 IgA、IgG 抗体も CT 投与群で検出された。粘膜組織においても OVA 特異的 IgG、IgA 産生細胞が ELISPOT 法で確認できた。経口免疫を行ったマウスでの糞便抽出液中の CT-B 特異的 IgG、IgA 抗体価は経口免疫群 > 舌下免疫群 > 経舌免疫群の順であった。ワクチン効果を比較するために CT を経口、舌下免疫した。下痢の度合いは、Fluid Accumulation (FA) = 下痢を含む小腸の重量/(マウス体重-下痢を含む小腸の重量) x 1,000 として測定した。免疫を行っていないマウスで生理食塩水を投与したマウスでの FA は 51 であったのに対し、20  $\mu$ g の CT を投与したマウスの FA は 123 でありマウスで下痢が誘導されることを確認した。経舌、舌下、経口免疫を行ったマウスでの FA は 64、70、69 であった。いずれも非免疫群と比較して有意に下痢を抑制できることが確認された。安全性試験では、経舌免疫と舌への筋注を行った群で検討した。5  $\mu$ g の CT を筋注した群では 5 日以内に全例で死亡し、0.5  $\mu$ g の CT を筋注した群でも 1 週間以内に約 2 割のマウスが死亡した。この時、急激な体重の減少と体温の低下が観察された。0.05  $\mu$ g の CT を筋注した群では 1 週間以内に死亡した例はなかったが、一時的な体重減少と体温の低下が見られた。経舌免疫群ではこれらの異常および死亡例は無かった。味覚試験では経舌免疫群で異常は見られなかった。舌に CT を塗布するだけでは安全性に問題は無いが、舌に傷などがある場合に副作用が起こる事が想定された。しかし、経舌免疫は粘膜免疫および全身免疫を誘導することが明らかとなり、より安全なアジュバントを使用する事で「舐める」ワクチンには可能性があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Most generic immunization procedures use needles to administer vaccines, which poses the risk of cross-contamination arising from needle reuse. Immunization without physical penetration by needles would greatly increase vaccination ease. In nasal and oral antigen administration, mucosal adjuvants such as cholera toxin (CT) are commonly used to enhance subsequent immune responses. We present herein another novel route of vaccine delivery: translingual immunization (immunization via the surface of the tongue).

We found that when ovalbumin (OVA) and CT applied to the tongue surface of C57BL/6 mice stimulated antigen-specific mucosal and systemic immune responses. Increased levels of OVA-specific IgA and IgG antibodies in mucosal secretions and plasma samples were observed, and the enhanced immunity persisted for a full year of observation. Translingual immunization also could induce OVA-specific IgA and IgG Ab-forming cells in the mucosal tissues and spleen. Moreover, in mice translingually immunized with CT, diarrhea induced by oral CT challenge was significantly suppressed. We demonstrated that there was no great

difference in translingual, sublingual, intranasal, and intragastric immunization for prevention of CT-induced diarrhea.

Translingual immunization with CT as a mucosal adjuvant did not cause weight loss, hypothermia, fever, or severe inflammatory response, nor did it affect taste perception. However, these adverse effects were observed in mice in which CT was intramuscularly injected into the tongue. Although use of CT might not necessarily be safe in translingual vaccination, by using much safer mucosal adjuvant, translingual immunization is achieved by simple application of a solution to the surface of the tongue, and it has been important in the development of the novel mucosal route as a useful and easily accessible, noninvasive way to induce vaccine immunity.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

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、経口での接種が検討され、他にも直腸、膣、皮膚を介した接種方法が検討されている。また、約10年前には粘膜免疫を誘導する新たな方法として経皮免疫が報告された。それぞれの投与経路には長所短所がある。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。経皮ワクチンでは生ワクチンのような場合、皮膚の接触による他者への二次感染の危険性もある。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と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（研究業績論文番号13）。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。

粘膜免疫能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

効果を維持し、安全性を高めるアジュバントの研究報告は世界中でなされているため、本研究ではこれまでのワクチン接種経路ではなく簡便で新たな接種方法、即ち今までの粘膜免疫学ではあまり注目されていなかった“舌”を介した粘膜免疫の誘導を目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では経舌免疫の可能性を確かめるものとするための基礎研究であり、経舌免疫による1) 免疫応答、2) 安全性、3) ワクチン効果に焦点を当てた研究を行った。

#### 1) 免疫応答の解析

・C57BL/6マウスにOVAとCTを経舌免疫し、

血中及び粘膜分泌液（糞便抽出液、唾液、鼻腔洗浄液、膣洗浄液）で特異 IgG、IgA 抗体を ELISA により測定した。

- ・粘膜関連組織（鼻咽頭粘膜関連組織、鼻腔粘膜固有層、腸管粘膜固有層、腸間膜リンパ節、唾液腺）と脾臓における特異抗体産生細胞数を ELISPOT 法により計測した。
- ・長期免疫応答を解析するために経舌免疫を行い経時的に血液、唾液、糞を採取し特異抗体価を 1 年間測定した。途中追加免疫を行い、追加免疫群と非追加免疫群との抗体価を測定した。
- ・ハプロタイプの異なるマウスでの免疫応答を解析した。
- ・経鼻、経口、舌下接種と免疫応答の比較を行い、経舌免疫の特性を検討した。

## 2) 安全性の検討

- ・舌及び脳の組織レベルで主に炎症応答を病理学的に解析した。
- ・血中の総 IgE 抗体量と抗原特異的 IgE 抗体価を ELISA で測定した。
- ・Two-bottle Choice Test を行い、マウスの味覚障害に関して検討した。方法は、1 つのケージに精製水を入れたボトルと 10% ショ糖水溶液または 50mM クエン酸水溶液を入れ他ボトルを用意し、マウスが飲んだそれぞれの液量を比較した。

## 3) ワクチン効果の解析

- ・腸管粘膜免疫効果を確認するため、経舌免疫群と比較として経口免疫群に CT を経口投与し下痢の度合いを確認する。下痢の度合いは、CT を経口投与し一定時間後に Sealed Adult Mice 法で行った。

## 4. 研究成果

マウスに抗原として OVA、アジュバントとしてコレラ毒素 (CT) を用い、マウスの舌に塗布した。最終免疫から 1 週間後、血漿および粘膜分泌液中の OVA 特異抗体価を測定した。C57BL/6 マウスの舌の上面または下面に OVA を 100  $\mu$ g と CT を 0, 0.5, 5  $\mu$ g を塗布した。血中の OVA 特異的 IgA、IgG 抗体価は CT 非投与群では低レベルであったが、CT 投与群では高レベルで特異抗体が観察された。糞便抽出液中の OVA 特異的 IgA、IgG 抗体、鼻腔洗浄液および唾液中の OVA 特異的 IgA 抗体も CT 投与群で検出された (図 1)。

長期間の抗体応答でも、最終免疫から 13 週後に追加免疫を行った群では抗体価が上昇し記憶免疫が誘導されていることが示唆された。さらに、追加免疫群では糞便抽出液および唾液中の OVA 特異的 IgA 抗体と血漿中の OVA 特異的 IgA、IgG 抗体が 61 週間維持された (図 2)。粘膜組織においても OVA 特異的 IgG、IgA 産生細胞が ELISPOT 法で確認できた (図 3)。

経口免疫を行ったマウスでの糞便抽出液

中の CT-B 特異的 IgG、IgA 抗体価は経口免疫群 > 舌下免疫群 > 経舌免疫群の順であった

(図 4)。ワクチン効果を比較するために CT を経口、舌下免疫した。下痢の度合いは、Fluid Accumulation (FA) = 下痢を含む小腸の重量 / (マウス体重 - 下痢を含む小腸の重量)  $\times$  1,000 として測定した。免疫を行っていないマウスで生理食塩水を投与したマウスでの FA は 51 であったのに対し、20  $\mu$ g の CT を投与したマウスの FA は 123 でありマウスで下痢が誘導されることを確認した。経舌、舌下、経口免疫を行ったマウスでの FA は 64、70、69 であった。いずれも非免疫群と比較して有意に下痢を抑制できることが確認された (図 5)。安全性試験では、経舌免疫と舌への筋注を行った群で検討した。5  $\mu$ g の CT を筋注した群では 5 日以内に全例で死亡し、0.5  $\mu$ g の CT を筋注した群でも 1 週間以内に約 2 割のマウスが死亡した (図 6)。この時、急激な体重の減少と体温の低下が観察された。0.05  $\mu$ g の CT を筋注した群では 1 週間以内に死亡した例はなかったが、一時的な体重減少と体温の低下が見られた。経舌免疫群ではこれらの異常および死亡例はなかった (図 6)。味覚試験では経舌免疫群で異常は見られなかった (図 7)。また、筋注した群では舌が肥大し、炎症が起きていることが確認された (図 8)。舌に CT を塗布するだけでは安全性に問題は無いが、舌に傷などがある場合に副作用が起こる事が想定された。

しかし、経舌免疫は粘膜免疫および全身免疫を誘導することが明らかとなり、より安全なアジュバントを使用する事で「舐める」ワクチンには可能性があると考えられた。

図 1. Translingual immunization of OVA + CT induced specific Abs in mucosal secretions and plasma.

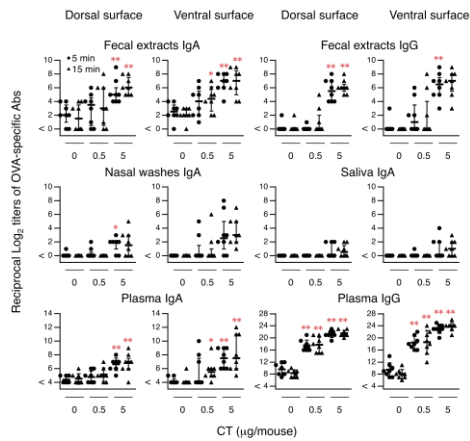


図 2. Translingual immunization of OVA + CT induced long-lasting humoral immune responses.

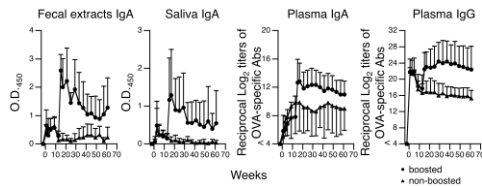


図 3. Comparison of the number of OVA-specific AFCs in the mucosal and systemic tissues of mice immunized via different routes.

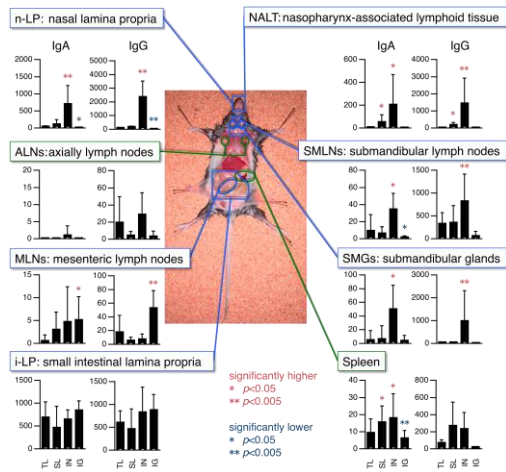


図 4. Translingual immunization induced CT-B specific Abs.

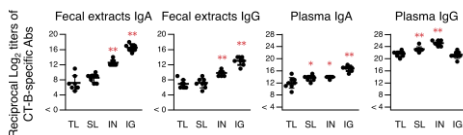


図 5. Translingual immunization suppressed CT-induced diarrhea.

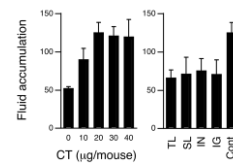


図 6. Acute toxicity of CT by translingual application and intramuscular injection.

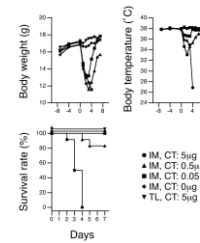


図 7. Translingual immunization did not affect taste perception.

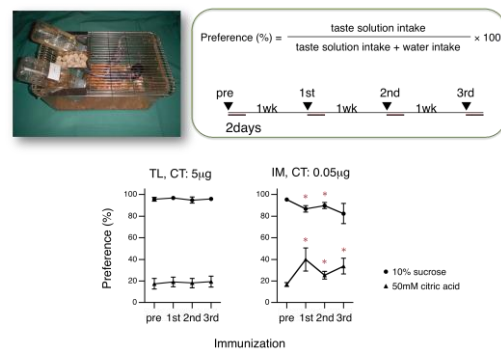
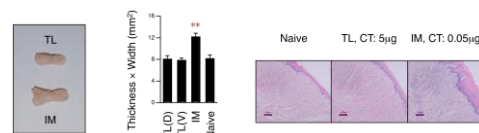


図 8. Inflammatory responses in the tongue of translingually immunized mice.



## 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 3 件)

- Murakami T, Eda Y, Nakasone T, Ami Y, Someya K, Yoshino N, Kaizu M, Izumi Y, Matsui H, Shinohara K, Yamamoto N, Honda M. Postinfection passive transfer of KD-247 protects against SHIV-induced CD4<sup>+</sup> T-cell loss in macaque lymphoid tissue. AIDS 2009 Jul;23(12):1485-1494.

2. Yoshino N, Fujihashi K, Hagiwara Y, Kanno H, Takahashi K, Kobayashi R, Inaba N, Noda M, Sato S. Co-administration of cholera toxin and apple polyphenol extract as a novel and safe mucosal adjuvant strategy. *Vaccine* 2009 Jul;27(35):4808-4817.
3. Yoshino N, Kanekiyo M, Hagiwara Y, Okamura T, Someya K, Matsuo K, Ami Y, Sato S, Yamamoto N, Honda M. Intradermal delivery of recombinant vaccinia virus vector DIs induces gut-mucosal immunity. *Scand J Immunol.* 2010 Aug;72(2):98-105.

[学会発表] (計 5 件)

1. Yoshino N, Ami Y, Hirai A, Suzaki Y, Sato S. Translingual vaccination induces an effective mucosal immunity. 14th International Congress of Immunology (2010. 8. Kobe, Japan).
2. 吉野直人、網康至、平井明香、須崎百合子、佐藤成大：経舌免疫と他の経粘膜免疫での免疫誘導能の比較。第 63 回日本細菌学会東北支部会 (2009. 8 盛岡)
3. 吉野直人、網康至、平井明香、須崎百合子、佐藤成大：経舌免疫でのコレラ毒素による下痢抑制効果。第 13 回日本ワクチン学会 (2009. 9 札幌)
4. 吉野直人、佐藤成大：新次世代型ワクチンの開発 ～経舌免疫の効果と安全性～。第 13 回日本神経ウイルス研究会招待講演 (2010. 1 安比)
5. 吉野直人、遠藤正宏、菅野祐幸、佐藤成大：ポリミキシン B の粘膜アジュバント効果。第 64 回日本細菌学会東北支部会 (2010. 8 仙台)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 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