

厚生科学研究研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

粘膜免疫機構の基盤と応用

平成12年度 総括・分括研究報告書

主任研究者 田村 慎一

平成13（2001）年 3月

目 次

I.	総括研究報告		
	粘膜免疫機構の基盤と応用	-----	1
	田村慎一		
II.	分担研究報告		
1.	感染や粘膜ワクチン投与に伴う粘膜免疫組織の組織学的解析-----		5
	岩崎琢也		
2.	腸管粘膜免疫機構:パイエル版はIgA誘導に必要か?-----		8
	清野 宏		
3.	経鼻投与された微量の毒素を含むコレラ毒素(や大腸菌の易熱性)の Bサブユニットの脳に及ぼす影響 -----		12
	田村慎一		
4.	経鼻う触ペプチドワクチンの開発に関する研究-----		15
	西沢俊樹		
5.	乳酸菌を用いた経口ワクチンデリバリーシステムの開発-----		22
	五十君静信		
6.	鼻粘膜アレルギー治療におけるDNAワクチンのアレルゲン 特異的IgE抗体の制御 -----		25
	坂口雅弘		
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	-----	30
IV.	研究成果の刊行物・別刷	-----	32

粘膜免疫機構の基盤と応用

主任研究者 田村 慎一 国立感染症研究所感染病理部

研究要旨 粘膜局所の免疫機構を分子・細胞・組織レベルで明らかにし、それを活用した有用な粘膜ワクチンを開発するために、次の三つのテーマについて研究を行った。1) ウイルスや細菌の感染、また、それらに対する粘膜ワクチンの投与によって誘導される主に気道の粘膜免疫応答の、粘膜組織、免疫担当細胞レベル、抗体やサイトカインレベルでの解析。2) アジュバント併用経鼻インフルエンザワクチン及び口腔ペプチドワクチンの開発、及び経口ワクチンの有用なベクターの開発。3) 粘膜アレルギー反応の抑制機構の解析。

研究組織：

田村慎一：国立感染症研究所感染病理部室長
岩崎琢也：国立感染症研究所感染病理部室長
清野 宏：大阪大学微生物病研究所教授
西沢俊樹；国立感染症研究所口腔科学部室長
五十君静信：国立感染症研究所食品衛生微生物部
坂口雅弘：国立感染症研究所免疫部

以上6名（他研究協力者11名）

A. 研究目的

広大な粘膜面を介して生体に感染し病気を起こす多くの細菌やウイルスに対して、生体はIgA抗体関与の粘膜免疫機構によって感染による病気から回復し、回復後再度の感染に対する特異的な強い免疫能力を準備する。粘膜ワクチンは、発病させることなく生体に免疫能力を準備させるために予め粘膜に投与される抗原であり、感染によって誘導されるのと同様に強い免疫能力を準備することがその理想条件になる。本研究は、ウイルスや細菌感染に伴う、また、粘膜ワクチンの投与に伴う粘膜免疫応答とその制御機構を、粘膜関連リンパ系の分子・細胞・組織のレベルで明らかにすると共に、それを基礎に予防効果の高い安全な粘膜ワクチンを開発することを目的としている。

B. 研究方法

1. 粘膜ワクチンの有効性の免疫学的基礎の解析。
1) インフルエンザのモデルマウスにおいて、致死量のA型及びB型ウイルス感染後の上気道粘膜の感染巣の広がりや鼻咽頭関連リンパ組織(NALT)のM細胞の動態を免疫組織化学的にまたレクチンによる染色によって検討した(岩崎)。2) 腸管でのIgA誘導組織として代表的なパイエル板の欠損マウスを、LT-bRからのシグナルを阻止するこ

とによって作成し、抗原特異的IgA誘導における個体レベルでの同組織の重要性を検討した(清野)。

2. 新しい粘膜ワクチンの開発。

1) 現行のインフルエンザ不活化ワクチンをアジュバントである微量のコレラトキシン(CT)を含むそのBサブユニット(CTB*)、あるいは、微量の大腸菌易熱性毒素(LT)を含むそのBサブユニット(LTB*)と共にマウスに経鼻投与した時の、これらアジュバントの脳に及ぼす影響を明らかにするために、次の実験を行った。CTB*あるいはLTB*を脳内に直接注射したときの死亡率や体重に及ぼす影響、CTB*をマウスの脳内及び鼻腔内に投与したときのCTB-HRPの局在、更に、CTB*あるいはLTB*を頻回鼻腔内投与したときの体重、様々な臓器の組織像及び血清の成分に及ぼす影響(田村)。

2) これまでに、B10マウスにおいてう蝕病原菌(*Streptococcus mutans*)の初期付着因子(菌体表層蛋白質抗原:PAc)に対する阻害抗体のみを誘導できる最小のペプチド抗原(13残基)を構築した。本研究では、この最小ペプチド抗原(13残基)のうちのB細胞エピトープ(3残基)以外のアミノ酸を置換することにより、他の5系統のマウスにおいても阻害抗体を誘導できるペプチド抗原を構築した。次に、ヒトの種々のMHC(HLA)に同時に対応できるう蝕ワクチン用最小ペプチド抗原(OMT)をデザインし、これをユニットとしリジンスペーサーで連結した35残基のペプチド抗原(OMP-KK-U)を合成した。このOMP-KK-Uをマウスに経鼻免疫したときの抗体誘導能を検討した(西沢)。

3) 乳酸菌を抗原運搬体とした粘膜ワクチンを開発するために、アミラーゼのアンカーをコードする遺伝子の下流にリステリアの溶血素であるリステリオリジン0(LL0)関連遺伝子をエピトープとして挿入したプラスミドを用いて、組み換え乳酸菌

(*Lactobacillus casei*)を構築した。この組み換え体は菌体表層にエピトープが結合し発現した。プラスミドからアンカーをコードする遺伝子を除くと菌体からエピトープが分泌された。LL0の遺伝子(Y7)とその溶血活性のない変異遺伝子(BUG)の組み換え体について、エピトープの菌体表層型と分泌型のそれぞれのクローンの性質を検討した(五十君)。

3. 粘膜アレルギー抑制機構の解析。

1) スギ花粉症の主要なアレルゲンであるCry11にCpGオリゴヌクレオチド(CpG-ODN)を結合したDNAワクチンを作製し、その免疫活性をマウスを用いて検討した(坂口)。

C. 研究結果

1. 粘膜ワクチンの有効性の免疫学的基礎の解析。

1) マウス馴化A型インフルエンザウイルス(PR8; H1N1)の致死量(20 μ l)を感染させたBALB/cマウスにおいて、感染12-24時間で鼻腔から気管支上皮にウイルス抗原陽性細胞が出現し、その数は次第に増加し、感染3-5日には肺胞レベルでも抗原陽性細胞が観察されるようになった。鼻腔内のウイルス感染細胞は、嗅上皮細胞にも見られるが円柱上皮細胞が多く、ランダムに局在していた。B型ウイルス(B/Ibaraki)感染の場合もPR8の場合と同様であるが、感染の広がりが早く広範囲であった。また、NALTのM細胞はレクチン(PNA)で特異的に染色され、M細胞の感染は5日目に確認された(岩崎)。

2) パイエル板欠損マウスに、コレラ毒素をアジュバントとして卵白アルブミンを三回経口投与すると、分泌液中に特異的IgA抗体が誘導された。また、腸管の粘膜免疫の実行組織である粘膜固有層に抗原特異IgA抗体産生細胞が検出された(清野)。

2. 新しい粘膜ワクチンの開発。

1) CTB*あるいはLTB*を脳内に直接注射したとき、3 μ g以下では注射後7日間全く体重の変化が認められなかった。また、0.1 μ gのCTB*を脳内に注射して3時間後、CTB-HRPの局在が側脳室に認められたが鼻粘膜には認められず、24時間後にはどちらでも認められなくなった。0.1 μ gのCTB*を鼻腔内に投与したとき、CTB-HRPの局在が鼻粘膜に認められたが脳には認められなかった。更に、0.1-10 μ gCTB*あるいはLTB*を頻回鼻腔内投与(1日1回で30回)したとき、体重、様々な臓器の組織像及び血清の成分に殆ど変化が認められなかった(田村)。

2) う蝕病原菌(*Streptococcus mutans*)の初期付着因子(菌体表層蛋白質抗原:PAc)に対する阻

害抗体のみを誘導できる最小のペプチド抗原(13残基)のうちのB細胞エピトープ(3残基)以外のアミノ酸を置換することにより、他の5系統のマウスにおいても阻害抗体を誘導できるペプチド抗原を構築できた。即ち、マルチアグレートープ型T細胞エピトープ内存型ペプチド抗原を構築できた。次に、ヒトの種々のMHC(HLA)に同時に対応できるマルチアグレートープ型T細胞エピトープ内存型ペプチド抗原(OMT)をデザインし、これをユニットとしリジンスパーサーで連結した35残基のペプチド抗原(OMP-KK-U)を合成した。このOMP-KK-Uをマウスに経鼻免疫したとき抗体を誘導した(西沢)。

3) 羊赤血球を用いた溶血テスト及びLL0特異的抗体を用いたFACSによる結果から、Y7、BUG両遺伝子について、菌体表層結合型、分泌型いずれのクローンもLL0を発現していることが確認された。これらを経口免疫したマウスにおいて、抗LL0-IgA抗体が検出された。また、菌体表層結合型のY7及びBUG発現株において、血中のIFN γ 産生が認められた。更に、菌体表層結合型と分泌型をマウスの腹腔内投与してLL0に対する抗体価を測定した結果、Y7、BUG発現株共に菌体表層結合型のものが分泌型よりも数倍高かった(五十君)。

3. 粘膜アレルギー抑制機構の解析。1) Cry11-CpG-ODN(DNAワクチン)は、予め皮下投与されたBALB/cマウスにおいて、アレルゲン特異的なTh1細胞を誘導し、同時にアレルゲン特異的なIgE抗体の産生を抑制した(坂口)。

D. 考察

1. 粘膜ワクチンの有効性の免疫学的基礎の解析。

1) NALTのM細胞の感染は感染後5日目に観察され、感染の後期に当たることから、M細胞が粘膜免疫応答に重要な役割を果たしているとしても感染することとは関係がないことが示唆された(岩崎)。

2) パイエル板欠損マウスにおいて抗原特異的なIgA抗体を誘導できるという事実は、パイエル板を介さないIgAの誘導システムが存在することを示唆している。一方、TNF/LT-a欠損マウスでは、パイエル板と腸管膜リンパ節が欠損し、経口免疫した抗原に対する特異的IgAが誘導されないことが知られている。このことは、LT-bR-Ig複合体処理によって作成されたパイエル板欠損マウスでは、腸管膜リンパ節がIgAの誘導組織として働いていることを示唆している(清野)。

2. 新しい粘膜ワクチンの開発。

1) CTB*あるいはLTB*を脳内に直接注射したとき、3 μ g以下では注射後7日間全く体重の変化が認

められなかった。また、0.1 μ gのCTB*を脳内に注射して3時間後、CTB-HRPの局在が側脳室に認められたが鼻粘膜には認められず、24時間後にはどちらでも認められなくなった。0.1 μ gのCTB*を鼻腔内に投与したとき、CTB-HRPの局在が鼻粘膜に認められたが脳には認められなかった。更に、0.1-10 μ gCTB*あるいはLTB*を頻回鼻腔内投与（1日1回で30回）したとき、体重、様々な臓器の組織像及び血清の成分に殆ど変化が認められなかった（田村）。

2) ヒトにう蝕病原菌の初期付着因子(PAc)の生物活性阻害抗体のみを誘導できる35残基のペプチド抗原(OMP-KK-U; マルチアグレートープ型T細胞エピトープ内存型ペプチド抗原)が、ヒトのう蝕予防ワクチンとして使われうることが示唆された（西沢）。

3) *Lactobacillus casei* の新しい宿主ベクター系は、挿入したLLO関連遺伝子の発現が良好で、菌体表層結合型と分泌型のクローンを目的通り得ることができた。（五十君）。

3. 粘膜アレルギー抑制機構の解析。

1) プラスミドDNAにCryj1の遺伝子を組み込んだDNAワクチンと同様に、Cryj1にCpGオリゴヌクレオチド(CpG-ODN)を結合したDNAワクチンは、杉花粉症の治療法として有用であることが示唆された（坂口）。

E. 結論

1. 粘膜ワクチンの有効性の免疫学的基礎の解析。

1) インフルエンザウイルス感染において、NALTのM細胞に感染が及ぶのは粘膜免疫応答が始まる感染後期であり、M細胞の抗原処理機能と感染とは無関係であることが示唆された（岩崎）。

2) パイエル板欠損マウスを作成し、生体における抗原特異的なIgA抗体誘導システムの検討を行った。パイエル板欠損マウスにおいても経口投与された抗原に対するIgA抗体を誘導できることから、パイエル板を介さないIgA抗体の誘導システムが存在することが示唆された（清野）。

2. 新しい粘膜ワクチンの開発。

1) BALB/cマウスにおいて、経鼻インフルエンザワクチンのアジュバントの最小有効濃度として用いられてきた0.1 μ gのCTB*やLTB*が、脳毒性の少ない安全なアジュバントとして用いることができることが示唆された（田村）。

2) ヒトのう蝕予防ワクチンとして、粘膜経路で投与され、う蝕病原菌(*Streptococcus mutans*)の初期付着因子(菌体表層蛋白質抗原: PAc)に対する阻害抗体のみを誘導できるペプチド抗原(OMP-KK-U; マルチアグレートープ型T細胞エピトープ

内存型ペプチド抗原)が構築された（西沢）。

3) 今後リステリア菌の菌体成分の遺伝子の幾つかをこの*Lactobacillus casei* の新しい宿主ベクター系に挿入し、誘導された免疫とそのリステリア感染に対する防御能によって、この乳酸菌を抗原運搬体とした粘膜ワクチンの有用性の評価がなされることになる（五十君）。

4. 粘膜アレルギー抑制機構の解析。

1) 杉花粉アレルギー(Cryj1)にCpGオリゴヌクレオチド(CpG-ODN)を結合したDNAワクチンによって杉花粉症を予防できる可能性がある（坂口）。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

(田村、岩崎分)

Hagiwara Y, et al. Effects of intranasal administration of cholera toxin (or *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin) subunits supplemented with a trace amount of the holotoxin on the brain. Vaccine 19, 1652-60, 2001

Tamura S.-I. & Kurata T. A proposal for safety standards for human use of cholera toxin (or *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin) derivatives as an adjuvant of nasal inactivated influenza vaccine. Jpn J Infec Dis 53, 98-106, 2000

(清野分)

Yamamoto M, et al. Alternate mucosal immune system: Organized Peyer's patches are not required for mucosal IgA antibody responses in the gastrointestinal tract. J Immunol 164, 5184-91, 2000

(西沢分)

Oishi, Y., et al. The effect of amino acid spacers on the antigenicity of dimeric peptide-inducing cross-reacting antibodies to a cell surface protein antigen of *Streptococcus mutans*. Oral Microbiol Immunol, 16, 40-4, 2001

(五十君分)

Igimi, S. Development of the recombinant vaccines with Lactic Acid Bacteria as antigen delivery vehicles for mucosal immunization. J Intestinal Microbiol, 14, 67-73, 2001

(坂口分)

Toda M, et al. Inhibition of IgE response to Japanese cedar pollen allergen (Cry j 1) in

mice by DNA immunization : Different outcome depending on the plasmid DNA inoculation method. Immunology 99, 179-86, 2000

2. 学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

粘膜免疫機構の基盤と応用

(代表研究者：田村慎一)

感染や粘膜ワクチン投与に伴う粘膜免疫組織の組織学的解析

分担研究者	岩崎琢也 国立感染症研究所感染病理部
研究協力者	鄭 光一、倉田 毅、佐藤由子、旭 康子 国立感染症研究所感染病理部

研究要旨

経口あるいは経気道的あるいは接触により粘膜に感染するウイルスにおいては初期感染病巣の免疫応答が感染細胞あるいはウイルスの排除に重要な役割を果たしていると考えられる。今年度はA型ならびにB型インフルエンザウイルスのマウス感染モデルにおいてウイルス感染細胞の動態ならびにそれに伴うNALT上のM細胞の変動をレクチン染色を用いて組織学的に解析した。その結果、レクチン陽性のM細胞数は接種後殆ど変動はなく、また、M細胞のウイルス感染が確実に認められるのは接種後5日以上経過していた。従って、もし粘膜免疫応答において、M細胞が重要な免疫応答惹起の役割を果たしているとしても、その惹起はM細胞のウイルス感染による訳ではないことが判明した。

A. 研究目的

粘膜面を接点として体内に感染するウイルスは非常に多い。粘膜表面に接したウイルスは最初が親和性を有する細胞に初感染巣を形成し、ウイルスの一次増殖が開始される。その後、ウイルスそれぞれの様式に従い、血行性、リンパ行性あるいは管腔性にウイルスが体内伝播し、二次増殖を引き起こす。宿主の免疫応答はこの侵入、一次増殖、体内伝播、二次増殖のすべての過程で引き起こされると想定される。

本分担研究では初期感染巣・二次増殖におけるウイルス増殖と、それに伴う宿主の免疫応答を組織学的に解明することを目的としてきた。

今年度はA型ならびにB型インフルエンザウイルスの動態ならびにそれに伴うNALTのM細胞を解析した。

B. 材料と方法

1. 動物: BALB/c の 6-10 週令の SPF マウス、雌(日本 SLC, 浜松市)を使用した。

2. ウイルス感染: インフルエンザウイルス A/ Puerto Rico/8/34 (H1N1) (PR8)ならびに B/Ibaraki を麻酔下でマウスに経鼻的に感染させた。接種量は 20 μ l で、それぞれに $10^{4.1}$ EID₅₀ の同一量の感染性ウイルスが含まれるように調整した。感染後、マウスは毎日観察した。

3. 組織標本作製: マウスは深麻酔下で脱血し、脳、上顎、脊椎、肺、心、胸腺、肝、脾、腎を採取し、直ちに緩衝ホルマリン溶液中で固定し、パラフィンに包埋した。厚さ 3 μ m の薄切標本作製し、hematoxylin-eosin 染色と免疫組織化学的検討を行った。

4. 免疫組織化学: インフルエンザウイルスの組織内の局在を明らかにするため、PR8 の nucleoprotein

ならびに B/Ibaraki を認識する一次抗体（ウサギ血清・マウス血清）を用い、SLAB-ペルオキシダーゼ法により、DAB を基質とし、免疫組織化学的検討を行った。メチルグリーンもしくはヘマトキシリンによる核染色を加えた。

さらに、*Canavalia estiformis* (ConA), *Lens culinaris* (LCA), *Dolichos biflorus* (DBA), *Helix pomatia* (HPA), soybean: *Glycine max* (SBA), *Vicia villosa* (VVA), *Griffonia simplicifolia* I (GSL-I), Peanut; *Arachis hypogaea* (PNA), *Lycopersicon esculentum* (LEL), *Triticum vulgare* (WGA), *Ulex europaeus* (UEA-I), *Limax flavus* (LFA), *Limulus polyphemus* (LPA), *Phaseolus vulgaris*, erythroagglutinating (PHA-E), *Phaseolus vulgaris*, leucoagglutinating (PHA-L) の 15 種類のレクチンを使用した解析も行った。

C. 結果

1. マウス PR8 (H1N1) 感染実験

20 µl 経鼻的に感染させ、ウイルスの体内の局在ならびに宿主の免疫系組織の経時的変化について検討した。昨年度までに報告してきたように、接種後 12-24 時間で鼻腔から気管支上皮にウイルス抗原陽性細胞が出現し、その数は次第に増加し、感染 3-5 日目には肺胞レベルにおいても陽性細胞が出現する。また、その分布は気管支を中心としており、経気道的に感染が拡散していることが判明した。

鼻腔内のウイルス感染細胞はランダムに局在しているが、円柱上皮を主体としており、嗅上皮には時に感染が観察された。感染細胞は将棋倒し的に拡散しており、古い病変においては上皮・繊毛が脱落していた。NALT の M 細胞の感染は接種後 5 日目に確認された。

2. マウス B 型インフルエンザウイルス感染実験

原則的には A 型インフルエンザウイルス感染とほぼ同様であるが、粘膜上皮における進展は非常に早く、また、広範囲に感染が拡大していた。

3. NALT M 細胞の解析

15 種類のレクチンを使用した染色では非感染 BALB/c マウスにおいて M 細胞は PTA によりその細胞表面が陽性となることが判明した。他のレクチン染色では有意の所見は認められなかった。

D. 考察

粘膜免疫応答において重要な役割を NALT

が果たしていることが推察されているが、NALT のウイルス感染は感染後 5 日以上経過してから観察されていることより、この部位での直接の感染が免疫誘導に重要であるとは考えがたい。したがって、NALT の M 細胞が、もし粘膜免疫応答に重要な役割を果たしているとしても、その過程は感染ではないと考える。また、感染経過中、M 細胞の有意の増加は認められておらず、M 細胞がどのような役割を果たしているかは不明である。

E. 結論

インフルエンザウイルス感染において、NALT 上皮、とくに M 細胞に感染が及ぶのは感染後期で、すでに免疫応答が開始されている時期であり、直接のウイルス感染が NALT の免疫応答を誘導しているわけではない。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Matsuo K, Iwasaki T, Asanuma H, Yoshikawa T, Chen Z, Tsujimoto H, Kurata T, Tamura S: Cytokine mRNAs in the nasal-associated lymphoid tissue during influenza virus infection and nasal vaccination. *Vaccine* 18: 1344-1350, 2000

Iwasaki T, Nagata N, Hatano I, Harashima A, Horiuchi A, Konishi K, Koike S, Nomoto A, Kurata T: Transgenic mice bearing human poliovirus receptor for quality control. *Pharmeuropa, Special Issue*: 59-68, 2000

Hasegawa H, Kadowaki S, Takahashi H, Iwasaki T, Tamura S, Kurata T: Protection against influenza virus infection by nasal vaccination in advance of sublethal irradiation. *Vaccine* 18: 2560-2565, 2000

Matsuo K, Yoshikawa T, Asanuma H, Iwasaki T, Hagiwara Y, Chen Z, Kadowaki S, Tsujimoto H, Kurata T, Tamura S: Induction of innate immunity by nasal influenza vaccine administered in combination with an adjuvant (cholera toxin). *Vaccine* 18: 2713-2722, 2000

Nishimura H, Itamura S, Iwasaki T, Kurata T, Tashiro M: Characterization of human influenza A (H5N1) virus infection in mice: neuro-, pneumo- and adipotropic infection. *J Gen Virol* 81:2503-2510, 2000

Iwasaki T, Muraki R, Kasahara T, Sato Y, Sata T,

Kurata T: Pathway of viral spread in herpes zoster: distribution of the protein encoded by the open reading frame 63 of varicella-zoster virus in biopsy specimens. Arch Virol 17: suppl, in press

Ando Y, Iwasaki T, Terao K, Nishimura H, Tamura S: Conjunctivitis following accidental exposure to influenza B virus/Shangdong/07/97. J Infect in press.

Hagiwara Y, Iwasaki T, Asanuma H, Sato Y, Sata T, Aizawa C, Kurata T, Tamura S: Effects of intranasal administration of cholera toxin (or Escherichia coli heat-labile enterotoxin) B subunits supplemented with a trace amount of the holotoxin on the brain. Vaccine in press.

Hagiwara Y, Tsuji T, Iwasaki T, Kadowaki S, Asanuma H, Chen Z, Komase K, Suzuki Y, Aizawa C, Kurata T, Tamura S: Effectiveness and safety of mutant

Escherichia coli heat-labile enterotoxin (LT H44A) as an adjuvant for nasal influenza vaccine. Vaccine in press

Nagata N, Iwasaki T, Ami Y, Harashima A, Hatano I, Suzuki Y, Yoshii K, Yoshii T, Nomoto A, Kurata T: Comparison of neuropathogenicity of poliovirus type 3 in transgenic mice bearing the poliovirus receptor gene and cynomolgus monkeys. Vaccine in press

2. 学会発表
なし。

H. 知的財産権の取得状況
なし

腸管粘膜免疫機構：パイエル板は IgA 誘導に必要なか？

分担研究者：清野 宏 大阪大学微生物病研究所 教授
研究協力者：権 美那 大阪大学微生物病研究所 助手
山本 正文 大阪大学微生物病研究所 非常勤講師

腸管での粘膜免疫誘導に関しては IgA 誘導組織と実効組織を結ぶ循環帰巢経路 (CMIS)が重要である。前者の代表的組織としてパイエル板があり、最近はその組織構築に必要なサイトカインネットワークも解明されてきている。その一つである LT-βR からのシグナルを阻止することで、パイエル板欠損マウスを作成し、抗原特異的 IgA 誘導における個体レベルでの同組織の重要性を検討した。その結果、パイエル板欠損の状態でも抗原特異的 IgA 誘導ができる代替機構が腸管免疫システムに存在している事が確認された。

研究目的

経口ワクチン開発に向けて、その要となる腸管免疫機構の基礎的解明を進めた。特に抗原特異的 IgA 誘導の中核と言われているパイエル板に注目し、個体レベルにおける同組織の免疫学的役割をパイエル板欠損マウスを作成して検討した。

研究方法

1. パイエル板欠損マウスの作成

LT-βR の細胞外部分と IgG1 の結合した複合体タンパクを合成した。妊娠マウスに 200ug の LT-βR-Ig 複合体を2回投与することにより、パイエル板が欠損している新生児マウスを作成した。対照群としては LFA-3-Ig 複合体で処理した妊娠マウスより誕生したパイエル板形成が正常なマウスを使用した。

2. 経口免疫と免疫応答の解析

パイエル板欠損マウスと対照マウスを卵白アルブミン(1mg)と粘膜アジュバントであるコレラ毒素(CT 10ug)の混合液で経口免疫した。三回の経口免疫後、粘膜免疫系と全身免疫系における抗原特異的免疫応答を ELISA 法, ELISPOT 法,免疫組織染色法を駆使して検討した。

研究結果

1. 蛍光抗体を用いた免疫組織染色法によりパイエル板欠損マウスの腸管粘膜固有層に高頻度で IgA 形質細胞が存在していることが確認された
2. パイエル板欠損マウスの腸管粘膜固有層から分離した単核細胞群には高頻度で IgA 抗体産生細胞が存在している事が ELISPOT 法で確認された。

3. 経口免疫により卵白アルブミン特異的IgA抗体がパイエル板欠損マウスの分泌液中に誘導されていた。さらに、腸管粘膜固有層の単核細胞群にも抗原特異的IgA抗体産生細胞が誘導されていることを確認した。

考察

IgA 誘導組織として、IgA 前駆細胞が高頻度で存在するパイエル板が欠損したマウスにおいても抗原特異的 IgA 抗体が誘導出来るという興味ある結果を得た。現在までパイエル板は IgA 誘導組織の中核と考えられ、それを支持するデータが蓄積されている。我々の結果はパイエル板を介さないで抗原特異的 IgA 抗体が誘導出来るシステムが存在している事を強く示唆している。分泌型 IgA 抗体が広大な粘膜面における第一線のバリアという事を考えると、2重、3重の IgA 抗体誘導システムが生体に存在している。さらに、TNF/LT- α 欠損マウスではパイエル板と腸管膜リンパ節両者が欠損しているが、同マウスを経口免疫すると抗原特異的 IgA 抗体の誘導がまったく起きてこない。一方、LT- β R-Ig 複合体処理によりパイエル板が欠損したマウスには腸管膜リンパ節が存在している。これらの結果を総合するとパイエル板欠損の状況下では腸管膜リンパ節が IgA 誘導組織としての役割を果たしているのかもしれない。

結論

パイエル板欠損マウスを作成し、生体における抗原特異的 IgA 抗体誘導システムの検討を行った。生体の第一線のバリアとして重要な分泌型 IgA 抗体の誘導システムにはパイエル板を中心とした C M I S 依存型だけではなく、他のシステムが存在していることが強く示唆された。今後、新規 IgA 抗体誘導システムを解明することにより、新しい粘膜ワクチン開発の展開が開けてくるであろう。

研究発表

1. Yamamoto, M., Rennert, P., Kweon, M-N., Yamamoto, S., Dohi, T., Bluethmann, H., Fujihashi, K., McGhee, J.R. and **Kiyono, H.** 2000. Alternate mucosal immune system : Organized Peyer's patches are not required for mucosal IgA antibody responses in the gastrointestinal tract. J. Immunol. 164 : 5184-5191.
2. Hiroi, T., Yanagita, M., Ohta, N., Sakaue, G. and **Kiyono, H.** 2000. Interleukin 15 and IL-15R selectively regulate differentiation of common mucosal immune system-independent B-1 cells for IgA responses. J. Immunol. 165 : 4329-4337.
3. Kishi, D., Takahashi, I., Kai, Y., Tamagawa, H., Iijima, H., Obunai, S., Nezu, R., Ito, T.,

- Matsuda, H. and **Kiyono, H.** 2000. Alteration of V β usage and cytokine production of CD4⁺ β T cells by elimination of *Bacteroides vulgatus* prevents the development of colitis in TCR α -chain deficient mice. *J. Immunol.* 165 : 5891-5899.
4. Kweon, M-N., Yamamoto, M., Kajiki, M., Takahashi, I. and **Kiyono, H.** 2000. Systemically derived large intestinal CD4⁺ Th2 cells play a central role for the development of STAT6-mediated allergic diarrhea. *J. Clin. Invest.* 106 :199-206.
 5. Dohi, T., Fujihashi, K., **Kiyono, H.**, C.O. Elson. and McGhee, J.R. 2000. Mice Dificient in Th1 and Th2-type cytokines develop distinct forms of hapten-induced colitis. *Gastroenterology.* 119 : 724-733.
 6. Yamamoto, M., **Kiyono, H.**, Kweon, M-N., Yamamoto, S., Fujihashi, K., Kurazono, H., Imaoka, K., Bluethmann, H., Takahashi, I., Takeda, Y., Azuma, M. and McGhee, J.R. 2000. Enterotoxin adjuvants have direct effects on T cells and APC which result in either IL-4-dependent or-independent immune responses. *J. Infect. Dis.* 182 : 180-190.
 7. Koga, T., McGhee, J.R., Kato, H., Kato, R., **Kiyono, H.** and Fujihashi, K. 2000. Evidence for early aging in the mucosal immune system. *J. Immunol.* 165 : 5352-5359.
 8. Higuchi, K., Fujihashi, K., Kweon, M-N., McGhee, J.R., and **Kiyono, H.** 2000. Comparison of inhibitory effects of intranasal and oral administration of bovine type II collagen on collagen induced arthritis in DBA1/J mice. *J. Rheumatol.* 27(4) :1038-1044.
 9. Saitoh-Inagawa, W., Hiroi, T., Yanagita, M., Iijima, H., Uchio, E., Ohno, S., Aoki, K. and **Kiyono, H.** 2000. Immunological characterization of lacrimal glands as a part of mucosal immune network. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 41 : 138-144.
 10. Boyaka, P. N., Wright, P.F., Marinaro, M., **Kiyono, H.**, Johnson, J.E., Gonzales, R., Ikizler, M.R., Werkhaven, J.A., Jackson ,R.J., Fujihashi, K., Di Fabio, S., Staats, H. F. and McGhee, J.R. 2000. Functional analysis of subepithelial and intraepithelial B and T cells from adenoids and tonsils. *Am. J. Pathol.* 157 : 2023-2035.

11. Kunisawa, J., Okudaira, A., Tsutsumi, Y., Takahashi, I., Nakanishi, T., **Kiyono, H.**, and Mayumi, T. 2000. Characterization of mucoadhesive microspheres for the induction of mucosal and systemic immune responses. *Vaccine*. 19 : 589-594.
12. Byun Y., Ohmura, M., Fuhiihashi, K., Yamamoto, S., McGhee, J.R., Udaka, S., **Kiyono, H.**, Takeda, Y., Kohsaka, T. and Yuki, Y. 2001. Nasal immunization with *E. coli* verotoxin 1 (VT1)-B subunit and a nontoxic mutant of cholera toxin elicits serum neutralizing antibodies. *Vaccine* (in press).
13. Saito, M., Otake, S., Ohmura, M., Hirasawa, M., Takeda, K., Mega, J., Takahashi, I., **Kiyono, H.**, McGhee, J.R., Takeda, Y. and Yamamoto, M. 2001. Protective immunity to *Streptococcus mutans* induced by nasal vaccination with surface protein antigen and mutant cholera toxin adjuvant. *J. Infect. Dis.* 183 : 823-826.
14. Simizu, M., Minakuchi, K., Tuda, A., Hiroi, T., Tanaka, N., Koga, J. and **Kiyono, H.** 2001. A role of stem cell factor and c-kit signaling for the organogenesis of intestine : regulation of fetal intestinal epithelial cell adhesion to fibronectin. *Exp. Cell Res.* (in press).
15. Simecka, J.W., Jackson, R., Kiyono, H. and McGhee, J.R. 2001. IgA responses and IgE associated inflammation along the respiratory tract after mucosal but not systemic immunization. *Infect. Immun.* (in press).
16. Ohta, N., Shimaoka, M., Imanaka, H., Nishura, M., Taenaka, N. and **Kiyono, H.** 2001. Steroid attenuates ventilator-induced lung injury. *Crit. Care Med.* (in revision).

厚生科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)
分担研究報告書

経鼻投与された微量の毒素を含むコレラ毒素(や大腸菌の易熱性毒素)のBサブユニットの
脳に及ぼす影響

主任研究者 田村 慎一 国立感染症研究所感染病理部
研究協力者 萩原由加利、岩崎琢也、浅沼秀樹、佐藤由子、佐多徹太郎、
倉田毅 国立感染症研究所感染病理部

研究要旨 我々はこれまで、微量のコレラトキシン(CT)や大腸菌易熱性毒素(LT)を含むそのBサブユニット(それぞれをCTB* 及びLTB*と呼ぶ)を、経鼻インフルエンザワクチンの有用なアジュバントとして、ワクチンと共に経鼻投与してきた。しかしながら、これら粘膜アジュバントの安全性、特に、脳に及ぼす影響について、十分な検討がなされていない。そこで、色々の投与量のCTB* あるいはLTB*を脳内或いは鼻腔内に投与した時の致死毒性、体重変化、CTBの組織内分布などを検討した。また、CTB* あるいはLTB*を頻回鼻腔内投与した時の体重変化、血清成分組成の変化、組織の変化などを検討した。その結果、BALB/cマウスにおいて経鼻インフルエンザワクチンのアジュバントとして最小有効濃度である0.1マイクログラムのCTB* 及びLTB*が、脳に副反応を及ぼすことなく安全に経鼻投与できることが示唆された。

A. 研究目的

我々はこれまで、マウスを用いた実験系において、現行のインフルエンザワクチンを、微量(0.2%)のコレラ毒素(CT)や少量の(1%)の大腸菌易熱性毒素(LT)を含むそのBサブユニットをアジュバント(CTB*あるいはLTB*)として経鼻接種することにより、上気道上に分泌型のIgA抗体を誘導でき、それに伴い変異ウイルスの流行にも対応する交叉感染防御を準備できることを報告してきた。しかしながら、これら粘膜アジュバントの安全性、特に、脳に及ぼす影響について、十分な検討がなされていない。そこで、色々の投与量のCTB* あるいはLTB*を脳内或いは鼻腔内に投与した時の致死毒性、体重変化、CTBの組織内分布などを検討した。また、CTB* あるいはLTB*を頻回鼻腔内投与した時の体重変化、血清成分組成の変化、組織の変化などを検討した。その結果、BALB/cマウスにおいて経鼻インフルエンザワクチンのアジュバントとして最小有効濃度である0.1マイクログラムのCTB* 及びLTB*が、脳に副反応を及ぼすことなく安全に経鼻投与できることが示唆された。

B. 研究方法

- (1) マウス;BALB/cマウス(6週令、雌)を用いた。
- (2) CTやLT派生物;CTやCTBは市販のシグマ製のものを用いた。LTやLTBは組み換え体を用いた。
- (3) CTB*あるいはLTB*の脳内注射及び鼻腔内投与:エーテルで麻酔下のマウスの左脳の頭蓋骨に

直角に0.3mmの深さで注射針を刺して、25 μ lのCTB*あるいはLTB*溶液を注入した。これら溶液は脳室内に検出された。また、アモバルビタル溶液の腹腔注射によって麻酔条件下のマウスに、2.5 μ lのCTB*あるいはLTB*溶液をそれぞれの鼻孔経由で鼻腔内に滴下投与した。

(4) CTBの局在の組織学的検索:CTBとホースラヂッシュ・ペルオキシダーゼの結合物(HRP-CTB:原液1mlの溶液中に100 μ gのHRP、2mgのCTB、4 μ gのCTを含む)を含むCTB*溶液(0.1或いは10 μ g)を25 μ lを脳内注射、或いは2.5 μ lを鼻腔内に滴下投与した。投与後3時間と24時間後にマウスを麻酔条件でホルマリンを用いて還流固定し、頭部を分離してホルマリン固定し、脱灰し、包埋した。組織切片上のCTB-HRPの局在は免疫組織学的手法によって分析した。即ち、組織切片を、パラフィンを除去後、内在性のペルオキシダーゼ活性を阻止するために1%過酸化水素で処理した。その後正常の羊血清で5分間処理し、ペルオキシダーゼ結合ウサギ抗ペルオキシダーゼ血清と4 $^{\circ}$ Cで一昼夜反応させた。洗浄後、切片にビオチン化抗ウサギIgG、ストレプトアビジン・ペルオキシダーゼを順に反応させ、最後にジアミノベンジジン中で過酸化水素を基質としたペルオキシダーゼ反応を誘導した。細胞の核はメチルグリーンで染め分けられた。

(5) 血清の成分分析:血清成分の分析は、三菱化学BCLに依頼した。測定された血清成分は、ALP、GOT、GPT、 γ -GTP、CPK、クレアチニン、BUN、

全蛋白量、アルブミン、グロブリン、A/G、グルコース、全コレステロール、トリグリセリド、全ビリルビン、Ca 及び無機リンであった。

(6) 組織病理所見: 脳、鼻、鼻関連リンパ組織、心臓、肺、肝臓及び腎臓の組織切片を作製し、その病理学的検索を行った。

C. 研究成果

(1) CTやLT派生物をマウスの脳内に注射したときの死亡率や体重に及ぼす影響; CTやLT派生物の0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10及び23 μ g脳内に注入し、その後7日目までの死亡率と体重変化を検討した。CT, LT, CTB*およびLTB*のLD50は、それぞれ0.6, 1.7, 8.7及び23 μ g以上であった。即ち、CTB*の致死毒性はLTB*より高く、CTの約1/60、LTの約1/3であった。7日間の体重変化について、3 μ g以下のCTB*およびLTB*処理群では、全く変化がなかった(Figure 1)。CTの場合、0.03 μ g以下の投与量で、また、LTの場合0.3マイクログラム以下の投与量で体重変化が認められなくなった。即ち、マウスの脳に注入された場合にも、0.3マイクログラム以下の投与量のCTB*およびLTB*が、体重変化によって評価したときに毒性がないことが示された。

(2) CTB*をマウスの脳内及び鼻腔内に投与したときの脳及び鼻粘膜におけるCTB-HRPの局在; 0.1及び10 μ gのCTB*をマウスの脳内及び鼻腔内に投与し、3及び24時間後の脳及び鼻粘膜におけるCTB-HRPの局在を検討した。0.1 μ gのCTB*をマウスの脳内注射して3時間のマウスの側脳室の上衣にCTB-HRPの局在が、同時に、上衣細胞の障害が認められた。また、10 μ gのCTB*を脳内注射して3時間のマウスでは、脳室の上衣と上衣下の組織ばかりでなく、鼻粘膜の嗅神経の神経周膜にもCTB-HRPの局在が認められた。一方、0.1及び10 μ gのCTB*を脳内注射して24時間のマウスでは、脳にも鼻粘膜にもCTB-HRPの局在は認められなかった。

次に、0.1及び10 μ gのCTB*をマウスの鼻腔内に投与し、3及び24時間後の脳及び鼻粘膜におけるCTB-HRPの局在を検討した。0.1 μ gのCTB*を鼻腔内に投与し3時間のマウスでは、鼻粘膜の柱状上皮の表面にCTB-HRPの局在が認められたが、嗅上皮にも脳にもCTB-HRPの局在は認められなかった。また、10 μ gのCTB*を鼻腔内に投与し3時間のマウスでは、鼻粘膜の柱状上皮、粘膜固有層、嗅上皮にCTB-HRPの局在が認められたが、脳にはCTB-HRPの局在は認められなかった。

一方、0.1及び10 μ gのCTB*を鼻腔内に投与して24時間のマウスでは、鼻粘膜にも脳にもCTB-HRPの局在は認められなかった。即ち、0.1及び10 μ gのCTB*をマウスの鼻腔内に投与しても、脳には殆ど傷害を与えない。

(3) CTB*あるいはLTB*の頻回鼻腔内投与の体重、様々な組織の組織像及び血清の成分に及ぼす影響: 0.1及び10 μ gのCTB*やLTB*を一日一回ずつ30回鼻腔内投与しても体重変化は全く認められなかった(Figure 2)。また、投与後のマウスの鼻粘膜の組織学的変化は認められたが、脳組織の変は全く認められなかった。更に、血清の生化学的な組成の変化も認められなかった。

D. 考察

CTやLT派生物をマウスの経鼻インフルエンザワクチンのアジュバントとして用いようとするとき、安全性の観点から、脳毒性の検討は重要である。何故ならば、鼻粘膜には嗅神経が表在しており脳に近接しているからである。結果は、脳に注入された場合にも、0.3 μ g以下の投与量のCTB*およびLTB*は、毒性(体重変化によって評価したとき)がないことを示していた(Figure 1)。また、0.1及び10 μ gのCTB*を鼻腔内に投与しても、CTB-HRPは鼻粘膜には局在したが、脳に局在することはなかった。さらに、CTB*やLTB*を30回鼻腔内に投与しても、投与期間中の体重に変化がなく(Figure 2)、処理後のマウスの組織形態、血清成分組成の変化も殆どなかった。従って、少なくともこれまで経鼻インフルエンザワクチンの最小有効濃度として用いられてきた0.1 μ gのCTB*やLTB*が、脳に副反応のない安全なアジュバントとして使われうることが示唆された。本実験でBALB/cマウスに経鼻投与された0.1 μ gのCTB*やLTB*は、20kgのヒトに100 μ gのアジュバントを投与する条件に対応する。既に我々は、LTB*(100 μ g)が、経鼻インフルエンザワクチン(100 μ g)のアジュバントとしてヒトにおいて有効であることを示唆してきた。本実験結果は、このLTB*(100 μ g)が、経鼻インフルエンザワクチン(100 μ g)のアジュバントとしてヒトにおいて安全に使われ得ることを支持するものであると考えられる。

最近、アイソトープ(ヨード125)を標識したCTBやCTをマウスの鼻腔内投与したときの、各種組織におけるCTBやCTの分布の経時変化を検討した報告がなされている(J Immunol 165:4778-4782, 2000)。それによると、10 μ gのCTBを経鼻投与されたマウスにおいて、投与6時間に約0.3%が嗅神経/

嗅上皮に、0.03%が嗅球に、0.1%が脳に分布することになっている。また、10 μ gのCT投与の場合には、6時間に約5%が嗅神経/嗅上皮に、0.03%が嗅球に、0.05%が脳に分布することになっている。しかも、嗅神経/嗅上皮や嗅球に分布したCTBやCTは、6日間存続する。これらの結果は、経鼻投与されたCTBやCTが細胞上のレセプターであるGM1ガングリオシドを介して神経細胞に侵入し嗅球に達し得ることを示している。本実験結果では、10 μ gのCTB*を鼻腔内投与したマウスにおいて、投与3時間後、鼻粘膜にHRP-CTBの局在が観察されたが、脳内には観察されなかった。本実験結果と上記報告の結果の差異は、分析感度の差異によるものと考えられる。即ち、鼻腔内投与されたCTB*は、微量であるが、嗅神経細胞に結合し鼻粘膜から逆行して嗅球に達するものがあることを否定できない。しかしながら、本実験結果から明らかなように、これによって病的な症状が起こることは全くないように見える。

E. 結論

CTB*(あるいはLTB*)をBALB/cマウスに経鼻投与したときの脳毒性を、脳内に直接投与した場合のそれと比較検討した。(1)CTB*やLTB*を10 μ g以上脳内に注射すると、7日以内に有意に体重が減少し、投与量に依存した死亡が観察されたが、3 μ g以下の投与量では、7日以内の体重減少は観察されなかった。また、3 μ g以下の投与量の脳内注射では、3時間後にHRP-CTBの脳内の局在は認められたが、鼻粘膜には局在が認められなかった。(2)10 μ gのCTB*を鼻腔内投与すると、投与3時間後、鼻粘膜にHRP-CTBの局在が観察されたが、脳内には観察されなかった。また、10 μ gのCTB*やLTB*を一日一回ずつ30回鼻腔内投与後、体重、脳の組織像、また、血清の生化学的な組成に変化が認められなかった。これらの結果は、少なくとも、BALB/cマウスにおいて、アジュバントの最小有効濃度である0.1 μ g/マウスのCTB*あるいはLTB*が、脳毒性の少ない経鼻インフルエンザワクチンのアジュバントとして安全に使われ得ることを示唆している。

F. 研究発表

(1) Hagiwara Y, Iwasaki T, Asanuma H, Sato Y, Sata T, Aizawa C, Kurata T, and Tamura S.-I. : Effects of intranasal administration of cholera toxin (or *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin) B subunits supplemented with a

trace amount of the holotoxin on the brain. Vaccine 19, 1652-1660 (2001)

分担研究報告書(平成12年度)

経鼻う蝕ペプチドワクチンの開発に関する研究

分担研究者 西沢俊樹 国立感染症研究所 口腔科学部 室長

研究要旨： ある種の病原体や寄生虫あるいはアレルゲン等に対するヒトの免疫応答反応が個体(HLAの遺伝子の相違)により様々に異なることは、良く知られた事実である。このMHCによる免疫反応の拘束性が、ペプチドをワクチン用抗原として用いる際の最大の弱点であり、万人に有効なペプチド抗原の開発には、MHCの拘束性の解析とその解除方法の考案が必要不可欠となる。う蝕ワクチン用として開発した、う蝕病原細菌の歯面定着関与因子(PAc)の生物活性阻害抗体を誘導できる最少単位のペプチド抗原(ユニットペプチド:TYEAALKQYEADL)を基本とし、そのアミノ酸配列に意図的に手を加えることにより、このペプチドワクチンの最大の弱点を回避可能か否か検討した。

その結果、交叉反応性阻害抗体を誘導するために必要なこのペプチド上のB細胞エピトープ(-Y---L--Y----)はそのままに残し、それ以外のアミノ酸残基を意図的に置換(例えば10,11,12番目のEDAをQTEに置換)することにより、これまで不応答だったマウスにおいて、目的抗体を誘導させることに成功した。すなわち、ワクチン効果を存続させたまま、複数種のアグレトープを抗原分子内に重複およびシフトで共存させる「マルチアグレトープ型T細胞エピトープ内蔵型ペプチド抗原」を構築することにより、複数種(今のところ5種)のマウスに同時に抗体を誘導できることを実証した。

ついで、人為的デザインによるこの方法で、ヒトMHC(HLA)の種々の遺伝子型に同時に対応できるう蝕ワクチン用ペプチド抗原のプロトタイプとしてOMP(Overlapping Multiagretope Peptide)をデザインし、前年度完成させた実用段階におけるペプチド抗原の連結方式の基本形に則り、OMPとユニットペプチドをリジンスペーサーで連結した35残基のペプチド抗原(OMP-KK-U)を合成した。このペプチド抗原は、マウスにおいてではあるが、経鼻免疫においても、目的抗体を効率よく誘導し、ヒトにおける経鼻免疫への応用が示唆された。

A. 研究目的

う蝕は世界に蔓延している細菌感染症であり、その予防は国を問わず口腔保健領域における最優先課題の一つである。しかしながら、う蝕は口腔という特殊環境下における多因性疾患であり、そのため、その制圧には幾つかの予防方法の並用が必須となる。我々の最終目標は、典型的な小児う蝕である表面う蝕や隣接面う蝕、そして高齢者に多い根面う蝕を、物理学的、生物化学的及び免疫学的予防方法の並用により抑制しようとするものであり、現在、病原菌の効率的な除菌方法の確立を目指し、抗菌剤、代用糖、ワクチン等の研究を平行して行っている。

本研究課題は除菌のためのワクチン開発の一部であり、う蝕病原菌 (*Streptococcus mutans*) の菌体や菌体表層蛋白質抗原 (PAC) の免疫で、単一菌感染動物における細菌の歯面定着や実験う蝕が抑制できることは、我々を含め国内外の幾つかの研究グループですでに実証されている。しかしながら、菌体や表層蛋白質抗原の免疫によりヒトの心筋に結合する抗体の誘導される危険性が事実として指摘されており、これがヒトへのう蝕ワクチンの応用を足踏みさせてきた。

う蝕が致死性の疾患でなく、総義歯という究極の代替手段も現実に存在する以上、う蝕ワクチンには他のいかなるワクチンにもまして安全性求される。また、口腔という特殊環境下での疾患ゆえ、ワクチンの効果は唾液中の分泌型 IgA (sIgA) が主体となる粘膜免疫に依存することが大となる。これら口腔の特殊性に鑑み、我々はここ数年来、う蝕予防に最適なワクチンとして、副作用の削除が容易でsIgAの誘導が可能な経鼻う蝕ペプチドワクチンの開発研究を続けている。

短鎖ペプチドをワクチン用抗原として用いることの利点は、成分が均一で安定、目的抗体のみの誘導が可能、高分子抗原では誘導できないようなマイナーな抗原決定基を認識する抗体の誘導も可能、抗原デザインの自在性などたくさんあるが、一方では、弱点として、1. 免疫原性が弱い、2. 阻害抗体の誘導が難しい、3. 阻害効果の減弱、4. ヒトによる免疫原性の強弱、5. 細胞性免疫誘導能が弱い、が存在する。我々は、弱点1-3をすでに解決している。また、幸いなことに、口腔という特殊事情ゆえキラーT細胞など細胞免

疫はう蝕予防には期待できない事実から、弱点5は回避できる。残るは弱点4、すなわちMHC遺伝子によるペプチドの免疫原性の拘束をいかに回避するかである。

本研究事業の目的は、う蝕ワクチン用として特定したユニットペプチドを基本とし、そのアミノ酸配列に意図的に手を加えることにより、ワクチン効果を存続させたまま、複数種のアグレトープを抗原分子内に重複およびシフトで共存させた「マルチアグレトープ型 T 細胞エピトープ内蔵型ペプチド抗原」を構築し、ペプチドワクチンの最大の弱点である「免疫応答に対するMHC遺伝子の拘束性に起因するペプチド抗原のヒトによる免疫原性の強弱」が回避できるか否かを検討することである。

B. 研究方法

(1) 免疫原性の解析

一連の B10 コンジュニック マウス「遺伝的背景は B10 と同じで MHC (H-2) の遺伝子型のみが異なるマウスの系統」にそれぞれのペプチド抗原 (25-200ug /マウス) をフロイント不完全アジュバント (IFA)、あるいは、アジュバント非存在下 (PBS) で腹腔免疫した。2週目に等量の免疫原で追加免疫し、その1週後に採血。抗血清中の抗体価を「免疫原 (総抗体価)」、「仔牛血清アルブミンと結合したPAC (365-377) ペプチド (ユニットに対する抗体価)」、「rPAC (交叉反応抗体価)」をそれぞれコート抗原としたELISA法により測定した。

(2) T 細胞エピトープの解析

一連の B10 コンジュニックマウスに幾つかのペプチド抗原 (25 ug /マウス) をフロイント不完全アジュバント存在下にそれぞれ免疫し、2週後等量の免疫原で追加免疫し、その3日後に脾臓細胞を調製した。この脾臓細胞よりナイロンウールカラムで調製した T 細胞画分を使用し、未感作同系マウスの3000 rad r 線照射脾臓細胞および免疫原ペプチドの部分ペプチド共存下に3日間培養する試験管内 T 細胞増殖実験を行い、トリチウムチミジンの取り込量からそれぞれのマウスに対するそれぞれのペプチド分子上の T 細胞エピトープ

領域を推定した

(3) ヒト MHC DR 遺伝子型に固有のアグレットープモチーフの解析

PCR 法により DR 遺伝子の遺伝子型が (8、8) ホモ、および、(5、6) と同定された被験者の末梢血リンパ細胞 (PBLC) を EB ウイルスで不活化させ、B-LCL 株を樹立した。B-LCL 株の培養細胞から DR 抗原分子をそれぞれ可溶化し、抗 HLA-DR 単クローン抗体 (L243) をコートした ELISA プレート、ビオチン標識 19 残基オーバーラップペプチド、ビオチン標識ペプチド検出用アルカリフォスファターゼ標識アビジン、を用いた試験管内ペプチド-DR 抗原結合試験により結合ペプチドを選択した。結合ペプチドの G 置換ペプチドを合成し、その結合能からそれぞれのアグレットープのモチーフを解析した。

なお、本研究で使用したペプチドはいずれも 350 型マルチペプチドシンセサイザー (アドバンスドケムテック社) を用いて Fmoc 法により合成し、HPLC で精製した純度 95% 以上の標品である。

C. 研究結果および考察

ある種の病原体や寄生虫あるいはアレルゲン等に対するヒトの免疫応答反応が個体 (HLA の遺伝子の相違) により様々に異なることは、良く知られた事実である。この MHC による免疫反応の拘束性が、ペプチドをワクチン用抗原として用いる際の最大の弱点であり、万人に有効なペプチド抗原の開発には、MHC の拘束性の解析とその解除方法の考案が必要不可欠となる。

(1) ユニットペプチド抗原に存在する各種 H-2 遺伝子型にそれぞれ特有のアグレットープの解析

ペプチド抗原に対する MHC 拘束性の解除方法を模索するため、う蝕ワクチン用ペプチド抗原の有力候補である ユニットペプチドをモデル抗原とし、ヒトへの応用を考慮しつつ、実験および結果解析の容易なマウスの系を用いて MHC 拘束性の修飾実験を試みた。

まず、マウス MHC クラス II 遺伝子 (I-A^d, I-E^d) に対する単クローン抗体とユニットペプチドを用い

た阻害実験から、このペプチドが I-A 抗原により抗原提示されることを明かにした。次いで、一連の B10. コンジェニック マウス、B10. 「A (H-2 の遺伝子型は a)、D2 (d)、M (f)、BR (k)、Y (Pa)、G (q)、RIII (r)、S (s)、SM (v)」にユニットペプチドを免疫し、このペプチドの MHC 拘束性を解析し、このペプチドが B10.A、B10.D2、B10.M、B10.BR の 4 種のマウスで抗体誘導能を持つことを明かにした。すなわち、ユニットペプチドは I-A 抗原の遺伝子型 a、d、f、k にそれぞれ拘束されていた。

そこで、ユニットペプチドのアミノ酸残基を順次バリン (V) に置き換えた V 置換ペプチドを合成し、それらを前述のユニット抗原応答マウス (一例として B10.D2 マウスの結果を Fig.1 に示す) に免疫することにより、抗体誘導に不可欠のアミノ酸残基を推定した。次いで、これらの推定結果とユニットペプチドの T 細胞エピトープの解析結果 (Table 2) から、アグレットープに関与すると思われる全てのアミノ酸残基を V で同時に置き換えた位置限定 V 置換ペプチドをそれぞれ合成した (Table 1)。それら位置限定 V 置換ペプチドの免疫による抗体誘導能の検討 (一例として B10.D2 マウスの結果を Fig. 2 に示す) から、それぞれの遺伝子型に特有なユニットペプチド抗原のアグレットープを推定した。それらをまとめて Table 3 にしめす。このように、ユニットペプチドには 4 種の遺伝子型にそれぞれ対応する特有のアグレットープが重複あるいはシフトした形で共存していることが明らかとなった。

これら事実は、アミノ酸配列に意図的に手を加えることにより、ワクチン効果を存続させたまま、複数種のアグレットープを抗原分子内に重複およびシフトで共存させた「マルチアグレットープ型 T 細胞エピトープ 内存型 ペプチド抗原」の構築が可能であることを強く示している。

(2) アミノ酸置換による MHC 拘束性の人為的制御

(1) で得られた知見に基づき、「マルチアグレットープ型 T 細胞エピトープ 内存型 ペプチド抗原」の構築が可能であることを実験的に示すため、ユニットペプチドのアミノ酸残基を他のアミノ酸と置換することで、人為的に MHC 拘束性の抗体誘導能を制御できるか否か、検討した。

遺伝子型 a、d、f に対応するアグレットープの一部が共存しているユニットペプチドの 10~12 番目の部位に着目し、この部分のアミノ酸残基を種々

のアミノ酸で置換したペプチドを多種合成し、その抗体誘導能を一連の B10 コンジェニックマウスで検討したところ、そのアミノ酸の配列により応答マウスの種類や応答の強さに異なりが認められた。その代表例を Fig. 3 にしめすが、このようにアミノ酸のデザインを変えることにより、一種から6種類まで随意に応答能の増減が可能であった。

以上、ユニットペプチドに対する MHC 拘束性の解析から、MHC 拘束の解除方法のモデルとして、重複型のマルチアグレトープ型 T 細胞エピトープの構築が可能であること、また、複数の T 細胞エピトープを直列に持つクラスター型 T 細胞エピトープの構築も可能であることが、マウスにおいては強く示唆された。

(3) ヒト用マルチアグレトープ型ペプチド抗原の最小単位的设计

すでに我々は、ヒトにおいても DR 1 は低応答遺伝子型、DR 9 は中応答型、DR 5, DR 6, DR 8 はそれぞれ高応答型と、PAC に対するヒト MHC (HLA) の拘束性が存在することを明かにしている。

ペプチドワクチンのヒトでの実用を考えたとき、ヒト用のマルチアグレトープ型 T 細胞 エピトープの構築が不可欠となる。そのためにはマウスの場合と同様に、HLAクラスII 遺伝子の各遺伝子型におけるアグレトープのアミノ酸配列モチーフの解析がまず必要となる。今のところモチーフが報告されている遺伝子型は、DR 1, 3, 4, 7, 11 の五つである。

そこでまず、未定の遺伝子型のうち DR 8 および DR 5, 6 のモチーフにつき解析を試みた。

a) HLAクラスII 遺伝子のアグレトープモチーフの解析

PCR 法により DR 遺伝子の遺伝子型が (8, 8) ホモ、および、(5, 6) と同定された被験者の末梢血単核細胞 (PBMC) を用いた試験管内 T 細胞増殖実験の結果から、PAC (316-334) ペプチドが DR 8 に拘束されるペプチドとして特定できた。さらに、上記被験者の末梢血から樹立した培養 B-LCL 細胞から可溶化した DR 分子と ELISA プレートを使用した試験管内 ペプチド - DR 分子 結合試験において、上記 PAC (316-334) ペプチドに加え PAC (369-387) ペプチドが新たに DR 8 および DR 5, 6 拘束ペプチドとして特定できた。すなわち、PAC 分子の 301-394 領域においては、DR 8 および DR 5, 6 に対するアグレトープは (316-334)、(369-387) 部位に存在すると推定された。そこで

その部位の部分ペプチドを合成し、試験管内結合試験を行った結果、(316-334) 部位では 316-330 部分が、(369-387) 部位では 373-386 部分が結合能を持つための最少単位と同定され、その両者の共通アミノ酸配列、-Y---LA-V-KA NA--、の中にそれぞれのアグレトープが存在すると推定された。さらに、同ペプチドのアミノ酸残基 1 個のみを順番にグリシン (G) と置き換えた G 置換ペプチドを合成し、DR 分子への結合能を検討した結果、DR 8 のアグレトープのモチーフは ---L--V-K--DR 5, 6 のそれは ---L-RV-K--A と推定された。

b) OMP (overlapping multiagretope peptide) の構築

これまでの結果や知見を基に、ヒト用のう蝕ワクチン用「マルチアグレトープ型 T 細胞エピトープ」のデザインを検討しており、そのプロトタイプとして、アミノ酸 20 残基から成るオーバーラッピング マルチアグレトープ ペプチド (OMP) を構築し合成した。ちなみに、このペプチドは、アグレトープシフトおよび重複により、ヒト MHC (HLA) の DR1, DR3, DR4, DR5, DR6, DR7, DR8, DR11 に対するそれぞれのアグレトープを同時に共存させるようデザインしてある (Table 4)。

(4) う蝕予防用ペプチドワクチンの基本型

本研究事業において、我々は、スパーサーとして用いるアミノ酸の種類および数に付き検討し、誘導されてくる抗体の質、量、いずれにおいてもリジンダイマー (-KK-) がスパーサーとして最適であることを明らかにした。また、多価ペプチド抗原のモデルとして 2 種の異なったペプチドをリジンダイマーで連結したところ、スパーサーを挟んで C 末側に位置するペプチドの抗体誘導能が N 末側のそれより高く、N 末側が T 細胞エピトープとして、C 末側が B 細胞エピトープとしてより強く認識されることを明らかにしている。

これらの知見に鑑み、OMP とユニットペプチドをリジンスパーサーで連結した 35 残基のペプチド抗原 (OMP-KK-U) をヒトう蝕予防用ワクチンの基本形 (Fig.4) として、現在、我々は提唱している。事実、このペプチド抗原はマウスにおいては、経鼻免疫においてもコレラトキシン B の共存下に目的抗体を効率よく誘導している (Fig.5)。

今後、この 35 残基ペプチドを基本とし、アジュバントなしに使用出来る経鼻免疫用ワクチンのデザインを検討していく予定である。