

2010/5/1A

厚生労働科学研究費補助金

医療技術実用化総合研究事業（臨床研究推進研究事業）

漢方薬によるワクチンアジュバント効果

の検討と臨床応用

平成22年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 済木 育夫

平成23年（2011年）5月

目 次

I. 総括研究報告

- 漢方薬によるワクチンアジュバント効果の検討と臨床応用 ······ 1
済木 育夫

II. 分担研究報告

1. 漢方薬十全大補湯によるがんワクチン増強効果に関する基礎研究 ······ 8
済木 育夫
2. 粘膜免疫システムを介した漢方アジュバントの作用メカニズムの解明 ······ 17
清野 宏
3. 子宮頸癌前癌病変に対するヒトパピローマウイルス (HPV) 治療ワクチン開発における漢方ア
ジュバントの有効性に関する研究 ······ 22
川名 敬
4. 十全大補湯・補中益気湯の自然免疫ならびに獲得免疫に及ぼす影響に関する予備的研究
··· 26
後藤 博三
(資料) 医師問診表ならびに患者問診表
5. 漢方薬によるワクチンアジュバント効果の検討と臨床応用 :RA 患者におけるインフルエンザワ
クチン予防接種後の免疫応答の経過観察 ······ 35
小暮 敏明
6. 当院での入院患者における細菌検出の調査～手術予定患者における補中益気湯の内服による
影響研究ための予備的検討 ······ 38
並木隆雄
7. 十全大補湯によるヒトパピローマウィルスワクチンワクチン接種時の副作用軽減効果および
アジュバント効果に関する研究 ······ 44
斎藤 滋、日高 隆雄
(資料) 医師問診表ならびに患者問診表
8. 漢方ワクチンアジュバント開発のための宮内膜粘膜免疫における NK 細胞の役割に関する研究
斎藤 滋、日高 隆雄 ······ 48
9. 漢方薬のインフルエンザワクチンアジュバント療法に関する臨床試験の計画及び統計解析に
に関する研究 ······ 52
折笠 秀樹

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 57

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業（臨床研究推進研究事業））

総括研究報告書

漢方薬によるワクチンアジュバント効果の検討と臨床応用

主任研究者 済木育夫 富山大学和漢医学総合研究所病態生化学分野 教授

研究要旨

まず初めに、基礎研究において、抗原特異的アジュバント活性を有する漢方薬を、細胞実験で網羅的に探索し、次に、ワクチンアジュバント効果を動物実験により評価した。その結果、ワクチン皮下摂取、経口ワクチン、および乳酸菌改変型子宮頸がん治療ワクチンの併用で、十全大補湯、補中益氣湯、黃耆建中湯がワクチンアジュバントの候補となることが明らかとなった。そこで、免疫能低下が推測される高齢者患者（46名）ならびに関節リウマチ患者（45名）を対象に、インフルエンザワクチン接種前から接種後12週まで、上記の漢方薬等を投与し、特異的抗体産生、交差反応性抗体、副作用の軽減（感染症ならびに炎症等の軽減に関する臨床効果）を評する臨床試験を開始した。

分担研究者

清野 宏 東京大学医科学研究所炎症免疫
学分野 教授
川名 敬 東京大学医学部附属病院産科婦
人科学 助教
後藤博三 富山大学大学院医学薬学研究部
和漢診療学 准教授
小暮敏明 社会保険群馬中央総合病院和漢
診療科 部長
並木隆雄 千葉大学大学院医学研究院和漢
診療学講座 准教授
斎藤 滋 富山大学大学院医学薬学研究部
産科婦人科学 教授
日高隆雄 富山大学大学院医学薬学研究部
産科婦人科学 准教授
折笠秀樹 富山大学大学院バイオ統計学・
臨床疫学 教授

A. 研究目的

高齢化が進む中、高騰する医療費の削減や、感染症の罹患率低減、さらには近年の

がん研究の進展を背景としてがんの発症抑制を目的とした、種々のワクチンが医療現場で利用されている。海外では、効率的にワクチンの効果を得るために、アジュバントを用いた製剤が広く用いられているが、安全性を懸念する声もあり、国内では、アジュバントの使用はごく一部の製剤に限られている。このような中、新型インフルエンザ等の新興感染症に対するワクチンや、がん治療ワクチンの効果増強等のため、安全かつ効果的なワクチンアジュバントが強く求められている。一方、漢方薬の免疫に対する影響について、これまで我々は、自然免疫の活性化を介して薬効が発揮されることを数多く報告してきた（eCAM, 2008. 他37編）。漢方薬の獲得免疫に対する影響は未だ明らかでないが、最近我々は、漢方薬である十全大補湯が、がんワクチンを用いた抗原特異的な獲得免疫の誘導を促進し、抗がん効果の増強につながることを動物実験において明らかにした。この結果から、

現在医療現場で用いられている漢方薬は、安全性の高い経口ワクチンアジュバントとして、速やかに応用できるものと期待している。そこで本研究では、現在医療現場で接種可能なワクチンを用いて、併用した際にそのワクチンの効果を増強する漢方薬を網羅的に探索する基礎研究を行うと共に、その有用性を臨床研究により評価する。これにより、既存のワクチンによる予防医療をより効果的・効率的に行うための漢方薬併用療法を、薬都・富山より提言するとともに、新規ワクチン開発時の未承認アジュバントの安全性リスクの回避による開発促進、抗原使用量減少による製造量の増加に資することを目的とする。具体的には、基礎研究と臨床研究を連関させながら遂行することで、漢方薬の中から、ワクチン抗原に対する(1)特異的抗体の産生、(2)特異的細胞傷害性T細胞(CTL)の誘導、さらには(3)交差反応性抗体の産生の増強が可能な漢方薬を網羅的に探索し、治療適応根拠に基づき、免疫力が低下した高齢者、およびリウマチ患者のインフルエンザならびに子宮頸がんワクチンアジュバントとして迅速に利用可能とする点にある。

以下に本年度の具体的な研究項目を列挙する。

1. 基礎研究(ワクチンアジュバント効果を有する漢方薬の探索、およびその機序解析) 済木、清野、川名、齋藤、日高
2. 臨床研究①(リウマチ患者および高齢者のインフルエンザワクチンに対する漢方薬のアジュバント応用に向けた予備的検討) 後藤、小暮、並木、折笠
3. 臨床研究②(子宮頸がんワクチンに対する漢方薬のアジュバント応用に向けた予備的検討) 川名、齋藤、日高、折笠

なお、本総括研究報告書は研究組織全体の総括的な研究概要の報告とするため、分

担研究の詳細は各分担研究報告書に記載する。

B. 研究方法

1. 基礎研究(ワクチンアジュバント効果を有する漢方薬の探索、およびその機序解析) 済木、清野、川名、齋藤、日高

まず初めに、済木が臨床上汎用されており、かつ自然免疫活性化作用が報告されている30種類の漢方薬の中から、樹状細胞を用いた *in vitro* 抗原提示試験により、ワクチンアジュバント効果を有する可能性が高い漢方薬を網羅的に探索した。次に、これら *in vitro* で探索された漢方薬のワクチンアジュバント効果の有無を、注射型のがんワクチンに関しては済木が、感染症を標的とした次世代型の経口ワクチンに関しては清野が、モデル抗原としてOVAを使用し、漢方薬のアジュバント効果を動物実験により解析し、これらと連関して齋藤、日高らが粘膜免疫に関する基礎知見を取得した。さらに川名は、自身が既に開発し、臨床試験が開始されている子宮頸がん治療ワクチン(乳酸菌E7ワクチン: GLBL101c)と上記漢方薬の併用効果を動物実験により解析した。

2. 臨床研究①(リウマチ患者および高齢者のインフルエンザワクチンに対する漢方薬のアジュバント応用に向けた予備的検討) 後藤、小暮、並木、折笠

自然免疫活性化作用は、獲得免疫も活性化される。従って、漢方薬がワクチンアジュバントの効果を有するのは、服用する漢方薬が自然免疫活性化作用を有することが望ましい。そこで、本年度は、後藤、並木が多剤耐性菌・弱毒菌の保菌状況、漢方薬投与開始前と内服4、8、12週後の採血によるNK細胞活性・血算・血液生化学検査、観察期間中の37.5度以上の発熱者数と発熱日数を指標として、上記1の基礎研究から

探索された漢方薬を中心に、自然免疫活性化作用を解析した。対象は長期療養型病床2施設に入院中の患者39名。対象者は65才以上で、重篤な担癌患者・感染症患者、全身状態の著しく悪化している患者は除外した。この2施設において高齢者を無作為に十全大補湯エキス投与群（一日量7.5g/日）と非投与群、補中益気湯エキス投与群（一日量7.5g/日）と非投与群の2群に分け、12週間経過観察を実施した。さらに、後藤、小暮により免疫機能低下した高齢者46名、およびリウマチ患者45名のインフルエンザワクチン接種し、種々漢方薬を併用し、漢方薬投与開始前と内服4、8、12週後のアジュバント効果を、インフルエンザ抗体(HI)抗体価、およびDAS28(Disease activity score 28 joint)、血液、生化学的検査を指標として解析した。なお、これら臨床研究のデザイン、および解析を折笠が担当した。

3. 臨床研究②（子宮頸がんワクチンに対する漢方薬のアジュバント応用に向けた予備的検討）川名、齋藤、日高、折笠
子宮頸がん治療ワクチンに関しては、HPV16型E7が細胞表面に提示された乳酸菌 *Lactobacillus casei* (乳酸菌E7ワクチン: GLBL101c) のGMP製剤を作成した。施設研究倫理委員会の承認を得て、第I/IIa相臨床試験を計画し、平成21年から臨床試験が開始している。
CIN3患者を対象とし、GLBL101cは1日1回5日間を1クールとして、1, 2, 4, 8週の4クール内服した。安全性とHPV16E7に対する細胞性免疫誘導能（末梢血リンパ球と子宮頸部リンパ球）をELISPOT法により解析した。子宮頸がん予防ワクチンに関しては、漢方薬投与群と対照群の2群に無作為に振り分ける（無作為化比較試験）。漢方薬投与群50例と対照群50例の総計100例を予定症例数とした。十全大補湯は

ワクチン接種1ヶ月前から接種後1ヶ月まで投与し、登録時、ワクチン接種時、接種1ヶ月、6ヶ月、12ヶ月、24ヶ月、36ヶ月後の各調査項目を測定し、漢方薬非投与者と比較検討する。ヒトパピローマウィルスワクチンは0、1、6ヶ月後に3回、筋肉内接種する。調査項目は副反応の軽減の有無を局所(注射部位)の特定した症状(疼痛、発赤、腫脹)および全身性の特定した症状(疲労、筋肉痛、頭痛、胃腸症状、関節痛、発疹、発熱、尋麻疹)とした。血液検体は生化学検査および免疫学的検査(HPV抗体価)の測定に用いる。

(倫理面への配慮)

本研究で用いる十全大補湯、補中益気湯および黃耆建中湯等の漢方薬はすでに医薬品として使用され、重篤な副作用の報告はない。仮に投与中に副作用が生じた際には、直ちに投与を中止し適切な処理を行う。この点に関して対象患者にはインフォームドコンセントを行い承諾を得た。なお、この臨床研究は富山大学倫理委員会から承認済みである。実験動物を用いた基礎研究に関しては、national animal welfare committeeのガイドラインを尊守して行った。

C. 研究結果

1. 基礎研究（ワクチンアジュバント効果を有する漢方薬の探索、およびその機序解析） 済木、清野、川名、齋藤、日高

済木のin vitro抗原提示試験により網羅的に検索した結果、十全大補湯、補中益気湯および黃耆建中湯に強いワクチンアジュバント活性があることが示唆された。そこで、済木は、動物モデルにおいて十全大補湯のがんワクチン増強効果機序を解析した。その結果、十全大補湯はがんモデルワクチン抗原に対する特異的細胞傷害性T細胞(CTL)の誘導能力に基づくアジュバント効

果を有することが明らかとなった。清野は、これまで脾臓などの全身系免疫に対し免疫調節機能があることが報告されている補中益気湯に腸管免疫を活性化する機能があることを見いだした。さらに経口ワクチン投与期間中、補中益気湯を同時に投与すると抗原特異的 IgA 抗体の産生が増強することを見出した。さらに、川名は、子宮頸がん治療ワクチン（乳酸菌 E7 ワクチン：GLBL101c）に対して、脾臓リンパ球における抗 E7 細胞性免疫誘導能(IFN γ 産生細胞)が十全大補湯、補中益気湯併用内服群において有意に上昇することを明らかにした。

2. 臨床研究①（リウマチ患者および高齢者のインフルエンザワクチンに対する漢方薬のアジュバント応用に向けた予備的検討）

後藤、小暮、並木、折笠

後藤、並木らの検討結果から、長期療養型病床群に入院中の高齢者に十全大補湯エキスと補中益気湯エキスを 12 週間投与し、非投与群と比較検討した。その結果、十全大補湯と非投与群の比較では、開始時に比べて 12 週後に、NK 細胞活性が非投与群で低下傾向を示した。漢方薬投与群と非投与群の比較では、開始時に比べて 12 週後に、リンパ球数が漢方薬投与群で有意に低下し、NK 細胞活性が非投与群で低下傾向を示した。以上の結果から、漢方薬の内服により NK 細胞活性の低下抑制を認め、自然免疫系に好影響を及ぼす可能性が示唆された。さらに、小暮は、大防風湯 10 名、桂枝芍藥知母湯 6 名、その他 6 名：それぞれ加減方含む）を投与されている RA 患者 45 名に対してインフルエンザワクチンを接種し、その抗体価について前後比較を実施した。投与されていた西洋薬は、Biologics5 名、MTX23 名（Biologics を投与されていた患者は除く）、TAC4 名、その他の DMARDs のみ 16 名であった。インフルエンザ抗体価（A: H1N1, H3N2, B: H1）が 40 倍以上を陽性として、

その陽性率を各治療群で解析した結果、過去の報告と比較すると漢方薬を服用している RA 患者では十分なインフルエンザワクチン接種効果が得られていた。特に MTX ならびに TAC 投与群においても同様であった。Seroprotection に関しては過去の報告と同様あるいはそれ以上であった。したがって漢方薬服用 RA 患者では Seroconversionにおいて特に意義があることが示唆された。今年度の短期効果の検討で、最も有効性の認められた漢方薬一つを用いて、次年度以降、長期療養型病床群入所の高齢者でインフルエンザワクチン接種予定者 100 例を対象に、漢方薬投与群と非投与群の無作為化比較臨床研究を実施する予定であり、現在、この候補漢方薬を選択すべく、後藤を中心として、長期療養型病床群入所の高齢者 46 名に対して、インフルエンザワクチン接種前より接種後 12 週まで、基礎研究から選択された漢方薬を服用、経時的なインフルエンザ抗体価（A: H1N1, H3N2, B: H1）の測定を実施中である。

3. 臨床研究②（子宮頸がんワクチンに対する漢方薬のアジュバント応用に向けた予備的検討）

川名、齋藤、日高

川名の報告から、子宮頸がん治療ワクチン（乳酸菌 E7 ワクチン：GLBL101c）の経口投与により、子宮頸部粘膜に抗 E7 細胞性免疫が誘導された。また子宮頸部リンパ球の約 25% は腸管粘膜由来の integrin b7+細胞であることから経口投与によって腸管粘膜を介して免疫が誘導されたと考えられる。末梢血の抗 E7 細胞性免疫よりも子宮頸部の方が優位であった。臨床効果としては、1, 2cap/d 内服群の 4 例においては、CIN3 病変が残存し、円錐切除術を必要としたが、4cap/d 内服群では 3 例全例が CIN1-2 に退縮し、臨床的有効性が示された。また、齋藤、日高らは、ワクチン接種時の副作用軽減に関する漢方薬の併用効果、およびナヒトバ

ピローマワクチンのアジュバント効果の有無も明らかにするために、臨床研究プロトコールを整備した。本臨床研究遂行にあたり、中高生へのヒトパピローマウィルスワクチンの無料接種が国内でひろく行われたこと、かつ、3月の東日本大震災の影響によりヒトパピローマウィルスワクチンの確保が平成22年度内で困難になった。現在、安定的なワクチン供給が可能になるまでプロトコール開始を待機している状況である。

D. 考察

E. 結論

新型インフルエンザの流行や懸念されている高病原性鳥インフルエンザに関する諸問題等から、人類は感染症の脅威に直面しており、効果的かつ包括的なインフルエンザワクチン療法の開発が急務である。さらには近年のがん研究の進展を背景として、発症抑制や治療を目的とした、種々のがんワクチンの開発・応用が目覚ましく進歩している現在において、これらワクチンの効果を増強するアジュバントの開発が強く求められている。一方で、漢方薬の自然免疫活性化作用は数多く報告されている反面で、獲得免疫系に対する作用については明らかとなっていない。そこで我々は、平成22年度の本事業において数十種類の漢方薬に対して検討を行った結果、強いワクチンアジュバント効果を有する十全大補湯以外にも数種類の漢方薬の選択に基礎研究で成功し、これらの作用機序も、全身免疫および粘膜免疫系の両観点から明らかにできた。さらに、選択された漢方薬は、子宮頸がん治療ワクチン（乳酸菌E7ワクチン：GLBL101c）の効果も増強することから、次年度以降に遂行される臨床応用へつなげるための橋渡し研究は、十分に成果をあげたと思われる。さらに、本研究課題「漢方薬によるワクチンアジュバント効果の検討と臨床応用」は、基礎研究と臨床研究の連関を取

りながら、現在医療現場で用いられている漢方薬は安全性の高い経口ワクチンアジュバントとして、速やかに応用し、ワクチンによる予防、および治療をより効果的・効率的に行うことを目指している。そのことからも、実際に次年度以降に、高齢者に対するインフルエンザワクチンに対する漢方薬のアジュバント効果に関する無作為化比較臨床研究を実施する際に使用する漢方薬の選択のための予備試験も、現在開始できており、基礎研究から橋渡しされた臨床研究も予定通り遂行している。さらに、今年度の進行が順調なため、当初計画を上方修正し、次年度は、臨床研究③ 乳酸菌改良型子宮頸がん治療ワクチンによる治療実施患者への漢方薬投与による粘膜免疫活性化に関する検討も開始予定である。しかしながら、施策、および震災の影響があったにせよ、子宮頸がん予防ワクチンの副作用軽減、ならびにワクチンアジュバント効果の解析に関する臨床研究は進展の緒を見ていません。次年度は、この臨床研究の速やかな履行が必須である。

F. 健康危険情報

特記事項無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kato S, Koizumi K, Yamada M, Inujima A, Takeno N, Nakanishi T, Sakurai H, Nakagawa S, Saiki I. A phagocytotic inducer from herbal constituent, pentagalloylglucose enhances lipoplex-mediated gene transfection in dendritic cells. Biol Pharm Bull. 2010;33(11):1878-85.
- 2) Tokuhara D, Yuki Y, Nochi T, Kodama T, Mejima M, Kurokawa S, Takahashi Y, Nanno M, Nakanishi U, Takaiwa F, Honda T, Kiyono H., Secretory IgA-mediated

- protection against *V. cholerae* and heat-labile enterotoxin-producing enterotoxigenic *Escherichia coli* by rice-based vaccine. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 8794–9, 2010
- 3) Nuchi T, Yuki Y, Takahashi H, Sawada S, Mejima M, Kohda T, Harada N, Kong IG, Sato A, Kataoka N, Tokuhara D, Kurokawa S, Takahashi Y, Tsukada H, Kozaki S, Akiyoshi K, Kiyono H., Nanogel antigenic protein-delivery system for adjuvant-free intranasal vaccines. *Nat Mater* 9:572–8, 2010
- 4) Yuki Y, Nuchi T, Harada N, Katakai Y, Shibata H, Mejima M, Kohda T, Tokuhara D, Kurokawa S, Takahashi Y, Ono F, Kozaki S, Terao K, Tsukada H, Kiyono H., In vivo molecular imaging analysis of a nasal vaccine that induces protective immunity against botulism in nonhuman primates. *J Immunol* 185: 5436–43, 2010
- 5) D. Y., Kim, A. Sato, S. Fukuyama, H. Sagara, T. Nagatake, I. G. Kong, K. Goda, T. Nuchi, J. Kunisawa, S. Sato, Y. Yokota, C. H. Lee, and H. Kiyono, The airway antigen sampling system: respiratory M cells as an alternative gateway for inhaled antigens. *J Immunol* 186: 4253–63, 2011
- 6) J. Kunisawa, and H. Kiyono, Analysis of intestinal T cell populations and cytokine productions. *Methods in Microbiology* (Edited by Stefan H.E. Kaufmann and Dieter Kabelitz). Academic Press, Oxford, pp. 183–193, 2011
- 7) Miura S, Kawana K, Schust DJ, Fujii T, Yokoyama T, Iwasawa Y, Nagamatsu T, Adachi K, Tomio A, Tomio K, Kojima S, Yasugi T, Kozuma S, Taketani Y: CD1d, a sentinel molecule bridging innate and adaptive immunity, is downregulated by the human papillomavirus (HPV) E5 protein: a possible mechanism for immune evasion by HPV. *J Virol*, 84: 11614–11623, 2010
- 8) Okuma K, Yamashita H, Kawana K, Nakagawa S, Oda K, Nakagawa K, Advanced age is a significant determinant of poor prognosis in patients treated with surgery plus postoperative radiotherapy for endometrial cancer. *J Obstet Gynecol Res*, 36: 757–763, 2010
- 9) Shoji K, Oda K, Nakagawa S, Kawana K, Yasugi T, Ikeda Y, Takazawa Y, Kozuma S, Taketani Y. Aromatase inhibitor anastrozole as a second-line hormonal treatment to a recurrent low-grade endometrial stromal sarcoma: a case report. *Med Oncol*, Mar 31. [Epub ahead of print], 2010
- 10) Adachi K, Kawana K, Yokoyama T, Fujii T, Tomio A, Miura S, Tomio K, Kojima S, Oda K, Sewaki T, Yasugi T, Kozuma S, Taketani Y: Oral immunization with *Lactobacillus casei* vaccine expressing human papillomavirus (HPV) type 16 E7 is an effective strategy to induce mucosal cytotoxic lymphocyte against HPV16 E7. *Vaccine*, 28: 2810–2817, 2010
- 11) Yamashita H, Okuma K, Kawana K, Nakagawa S, Oda K, Yano T, Kobayashi S, Wakui R, Ohtomo K, Nakagawa K. Comparison Between Conventional Surgery Plus Postoperative Adjuvant Radiotherapy and Concurrent Chemoradiation for FIGO Stage IIB Cervical Carcinoma: A Retrospective Study. *Am J Clin Oncol*, [Jan 15, Epub.], 2010

2. 学会発表

- 1) 加藤真一郎、小泉桂一、山田美幸、犬鳴明子、竹野伸洋、中西剛、櫻井宏明、中川晋作、済木育夫 芽胞成分 pentagalloylglucose の貪食亢進作用に基づく樹状細胞への遺伝子導入剤としての応用、第 27 回和漢医薬学会学術大会、京都、2010
- 2) Hiroshi Kiyono Symposium on Reduced uptake of Oral vaccines in the tropics from the perspective of mucosal immunology, “ MucoRice and MucoNanogel: New Generation of Mucosal Vaccine” (Invited Lecture, June 2010, Sapporo , Japan)
- 3) Hiroshi Kiyono The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity (United states-Japan Cooperative Medical Science Program 23rd Joint Meeting of the AIDS Panels,” Mucosal chaperoning nanogel vaccine for the induction of protective immunity ” (lecture, September 2010, Awaji, Japan)
- 4) Hiroshi Kiyono 4th Vaccine and ISV Annual Global Congress, “Mucosal Nanogel-based chaperon vaccine for the induction of protective immunity” (lecture, October 2010, Vienna, Austria)
- 5) Hiroshi Kiyono Prato Conference on the Pathogenesis of Bacterial Diseases of Animals, “New Prospects on the Aerodigestive Immunity for Mucosal Vaccine Development ” (Invited lecture, October 2010, Prato, Italy)
- 6) Hiroshi Kiyono Molecular Farming: Promises and Challenges,” Spick-and-Span in the development of Mucosal Vaccine: MucoRice- and Nanogel-based Vaccine for induction of Protective Immunity” (Invited Lecture, January 2011, Seoul, Korea)
- 7) 川名 敬ら、CIN3 に対する乳酸菌 HPV 治療ワクチン臨床試験例の免疫学的解析、日本産科婦人科学会総会、東京、4 月
- 8) 川名 敬ら、子宮頸癌前癌病変に対する HPVE7 を標的にした癌ワクチン療法の臨床試験における有用性、日本癌治療学会、シンポジウム 20 癌免疫療法、京都、10 月
- 9) 川名 敬ら、子宮頸がん前癌病変に対する乳酸菌を利用した HPV 治療ワクチンの第 I/IIa 相臨床試験症例における有効性の免疫学的解析、日本癌学会、大阪、9 月
- 10) 第 1 回群馬臨床漢方懇話会を開催 (H23. 1. 21) 基調講演「インフルエンザと漢方薬」巽武司。特別講演「呼吸器疾患への漢方薬の臨床応用」伊藤隆。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業（臨床研究推進研究事業））

分担報告書

漢方薬十全大補湯によるがんワクチン増強効果に関する研究

研究分担者 済木育夫 富山大学和漢医薬学総合研究所病態生化学分野 教授

研究要旨

漢方薬は、生体内に本来備わる免疫機構を調整することで、さらに病態を改善していく性質をもつことから、広い領域での応用とその治療効果が期待されている。漢方薬の自然免疫活性化作用は数多く報告されている反面で、獲得免疫系に対する作用については明らかとなっていない。最近我々は、漢方薬である十全大補湯が、ワクチンを用いた抗原特異的な獲得免疫を誘導し、抗がん効果が増強されることを動物実験において明らかにした。そこで本研究では、この抗がん効果が増強機序に関して、免疫学的な観点から解析を行った。その結果、十全大補湯はがんモデルワクチン抗原に対する特異的細胞傷害性T細胞(CTL)の誘導能力を有することが明らかとなった。

A. 研究目的

漢方薬は自然免疫を賦活する作用を持つことが数多く報告されている。代表的な補剤である十全大補湯は、臨床的には化学療法や放射線療法を受けているがん患者および外科療法の術前・術後において、食欲不振の改善ならびに白血球減少の緩解を目的に用いられている。基礎研究からは、肝臓における natural killer T (NKT) 細胞誘導作用、マクロファージ貪食能の増強および各種免疫細胞のサイトカイン産生の誘導、抗体産生能の増強、脾臓細胞のマイトジェン活性の誘導などが報告されている。また、本研究室においては、1998年に Ohnishi らによって、マウス大腸がん細胞による肝転移モデルにおいて、マウスに十全大補湯を経口投与することにより、肝転移が抑制されることが分かり、その効果はマクロファージやT細胞を介して発揮されることが報告された。また、2005年に Chino らによっ

て、十全大補湯にはマクロファージの LPS 誘導性 IL-12 p40 および IFN- γ 産生を増強する効果および Toll like receptor (TLR) を介したシグナル伝達分子に作用することが明らかにされている。これらの報告からも、十全大補湯は有効な BRM の一つになりうるものと考えられる。漢方薬は、単剤単効な西洋薬に対し、単剤多効であるという特徴があり、生体内に本来備わる免疫機構を調整することで、生体内の恒常性を維持し、さらに病態を改善するという性質を持つことから、広い領域での応用とその治療効果が期待されている。しかしながら、BRM としての役割が期待される一方で、漢方薬の獲得免疫系に対する作用については、抗原特異的免疫誘導における詳細な作用メカニズムに関してはほとんど明らかとされていない。したがって、本研究では漢方薬の一つである十全大補湯が獲得免疫を増強することでがん抗原特異的な CTL を誘導し、

その結果、がんワクチンアジュバントとして応用できるか否かの検討を行った。

B. 研究方法

1. 細胞株

マウスリンパ腫細胞 EG7 は、EL4 細胞にネオマイシン耐性遺伝子と共に OVA cDNA を導入した transfectant であり、MHC class I 分子上に OVA 由来エピトープペプチド (OVA257-264) を恒常に提示している。EG7 細胞は、大阪大学大学院薬学研究科 中川晋作先生・中西剛先生（現岐阜薬科大学）より恵与され、37℃、5%CO₂ 環境下単層培養で *in vitro* にて継代、維持した。

2. 実験動物

日本エスエルシー株式会社(浜松)より、C57BL/6 マウス (H-2Kb; 5 週齢、雌性) を購入し、富山大学和漢医薬学総合研究所病態制御部門病態生化学分野動物実験室にて飼育した。全ての実験において、1 週間の実験前飼育を行い、6 週齢のマウスを実験に用いた。給水と給餌は自由摂取とした。飼育および実験は本学実験動物センターのガイドラインに従って実施した。

3. がんモデル抗原 OVA 免疫の方法

本研究では、がんモデル抗原として OVA を用いた。OVA を HBSS(−) (GIBCO、USA) に溶解し作製した OVA 溶液を、等量の FIA によりエマルジョン化（以後 OVA/FIA と表記する）した。C57BL/6 マウスへの免疫は、OVA/FIA を OVA 量として 100 μg/mouse で背部皮下に接種することで行った。

4. 十全大補湯のワクチンアジュバントとしての評価

C57BL/6 マウスに OVA/FIA を接種し、7 日後にこれらのマウスの側腹部皮内に EG7 細胞 (5 × 10⁵ cells) を接種した。十全大補湯は OVA ワクチンの接種日より実験終了日

の 37 日目まで投与を行った。また同日より 4 日ごとに腫瘍径を測定し、下式に従って腫瘍体積を算出した。

$$\text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = [(\text{腫瘍の長径; mm}) \times (\text{腫瘍の短径; mm})^2] \times 0.530$$

5. がんワクチン増強効果解析研究における OVA 免疫の方法

C57BL/6 マウスに OVA/FIA を接種し、7 日後に同所に免疫を行った。十全大補湯は 1 回目の OVA 接種日より開始し、実験終了日までの 21 日間投与を行った。

7. 血清採集の方法

ワクチンの接種を行い、2 回目の免疫より 14 日後（1 回目の免疫より 21 日後）にジエチルエーテル麻酔下において下大静脈より採血を行った。採血の際には 25G のシリソジを用いた。採血したマウス全血を 1.5mL エッペンチューブに移し、30 分間室温に静置した。その後、3000rpm、20min、20℃で遠心分離を行い、上清を採取し血清とした。

8. ELISA 法

ELISA 用 96-well plate に 10mg/mL の OVA (Grade V) 溶液を 100 μL ずつ添加し、4℃ で一晩反応させた。5 回の洗浄後、ブロッキング溶液を 150 μL ずつ加え室温に 1 時間静置した。血清を希釈し、100 μL ずつプレートに添加し、室温にて 2 時間静置した。5 回の洗浄後、2 次抗体を添加し、1 時間静置した。洗浄後、TMB (3,3'-5,5'-Tetramethyl benzidine) を添加し、発色反応後、H₂SO₄ (2N) を加え、発色反応を停止させた。定量は 450nm 吸光度より算出した。

9. 脾臓細胞の回収

OVA ワクチンの接種を行い、2 回目の免疫より 14 日後にジエチルエーテル麻酔科

において下大静脈を切除し脱血を行い犠牲死させ、その後、脾臓を摘出した。摘出した脾臓は臓器回収用 PBS にて 2 度の洗浄を行った後、プレパラートのすり合わせにより細胞を分離し 15mL の遠心管に採集した。遠心分離後、Lysis buffer を用いて溶血処理を行った。その後、3 回の洗浄を行い脾臓細胞として実験に用いた。

10. ELISpot アッセイ

96well の 0.45 μm ポリビニリデンジフルオライド膜 (Immobilon-P, Millipore) を 70% エタノール処理後、抗マウス IFN-γ 抗体 (clone ; AN18) を 1 μg/mL となるように加え 4 °C で一晩反応させた。5 回の洗浄後、10% FCS 入りの RPMI を 150 μL ずつ加え 37°C、5% CO2 インキュベーターでプロッキング処理を行った。脾臓細胞を 2×10^5 個 /100 μL になるように AIM-V に懸濁させ、プロッキングを行ったプレート上に加えた。OVA (St. Louis, USA) は最終濃度が 50 μg/mL となるように加え、37°C、5% CO2 インキュベーターにて 24 時間反応させた。その後、5 回の洗浄を行い、抗マウス IFN-γ 抗体 (clone ; R4-6A2) を 1 μg/mL となるように加え室温で 2 時間反応させた。5 回の洗浄後、Streptavidin-Alkaline Phosphatase (BD Pharmingen, USA) を加え室温で 1 時間反応させた。7 回の洗浄後、BCIP/NBT-plus substrate を加え室温で 20 分間反応させ、水道水を加え反応を停止させた。Eli-Puncher Kit (ZellNet Consulting Inc., USA) を用いてプレートより剥離後、顕微鏡下においてカウントした。

11. フローサイトメトリー

脾臓細胞を 1×10^6 個になるように 1.5mL のエッペンチューブに分注し、FCM buffer を 100 μL 加え、抗ラット CD16/CD32 (clone ; 2.4G) モノクローナル抗体 (BD

Pharmingen, USA) で室温にて 5 分間処理した。さらに T-Select MHC Tetramer OVA-PE (MBL(株)医学生物学研究所、名古屋) で室温にて 20 分間処理した。さらに抗マウス CD8-FITC (MBL(株)医学生物学研究所、名古屋) で室温にて 20 分間処理した。FCM buffer で 3 回洗浄した後、7-ADD (MBL(株)医学生物学研究所、名古屋) で室温にて 10 分間処理し、細胞懸濁液を FACS calibur (日本 Becton-Dickinson、東京) にて解析した。

12. 統計解析

統計的有意性は両側 Student's t-test 及び Mann-Whitney's test により解析し、 $p < 0.05$ を有意であると判断した。

(倫理面への配慮)

動物実験は富山大学のガイドラインに則り行った。

C. 研究結果

1. 十全大補湯のワクチンアジュバントとしての評価

OVA ワクチンの接種と十全大補湯の投与を併用する群の対象として OVA ワクチンの接種し水を投与する群を作製した。また、OVA ワクチンの非接種群も水投与群と十全大補湯投与群を作製した。以後、1.2-6 に準じた方法で OVA ワクチンの接種を行った群を、OVA(+)群と表記し、非接種群を、OVA(-)群と表記する。また、十全大補湯の投与を行った群を、JTT 群と表記し、水の投与を行った群を、Water 群と表記する。その結果、OVA(-)・Water 群において経日に腫瘍体積の増大、すなわち腫瘍の増殖が観察された。この増殖は十全大補湯のみの投与 (OVA(-)・JTT 群) では抑制されなかった。OVA ワクチンの接種を行った結果 (OVA(+)-Water 群)、OVA 抗原に対する免疫が誘導されるため、OVA のエピトープペプチドが MHC class I 上に提示されている

EG7 腫瘍は拒絶され、腫瘍増殖の抑制が確認された。さらに十全大補湯の投与を併用することにより (OVA(+)・JTT 群)、興味深いことに、腫瘍増殖の抑制が顕著に観察される結果となった。

2. 腫瘍生着までの期間

腫瘍体積が 10 mm^3 以上となった日を腫瘍が生着した日とみなし、腫瘍生着までの期間を検討し、OVA ワクチンによる免疫と十全大補湯の投与による併用効果を評価した結果、OVA ワクチンの接種をする (OVA(+)・Water 群) ことで遅延した腫瘍の生着までの期間が、十全大補湯を投与し併用する (OVA(+)・JTT 群) ことによりさらに延長した。さらに、観察期間の最終日である 37 日目においても、10 例中 2 例の腫瘍生着が確認されず、EG7 腫瘍が完全に拒絶されたものとみなした。

3. 生存期間

生存期間についても同様に検討を行った結果、OVA ワクチンの接種を行っていない OVA(−)・Water 群は 13 日目より死亡が確認され始め、25 日目において全例の死亡が確認された。十全大補湯の投与のみでは生存期間は対象群と比較して延長せず、効果は確認されなかった。OVA ワクチンの接種を行うことで抗腫瘍免疫が誘導されたため、明らかな生存期間の延長が観察された。OVA ワクチンの接種に十全大補湯の投与を併用した OVA(+)・JTT 群において、さらなる生存期間の延長が確認された。OVA ワクチンの接種群と比較しても有意な生存期間の延長が確認され、OVA ワクチンの接種を行うことによる免疫誘導を十全大補湯が増強することを示唆する結果が得られた。

4. OVA 抗原特異的な血清 IgG 産生に及ぼす増強効果

マウス血清中の OVA 抗原特異的 IgG1 およ

び IgG2a を測定した。その結果、OVA ワクチンの接種を行わなかった群 (OVA(−)・Water 群および OVA(−)・JTT 群) の血清中からは、抗体は検出されなかった (Not Detected : N. D.)。このことは、本実験の信頼性を裏付けるものである。次に、OVA ワクチンの接種を行うことにより、OVA 抗原特異的 IgG1 および IgG2a の産生が確認された。さらに、十全大補湯の投与を併用すると IgG2a で著明な抗体産生の増強作用が確認された。OVA ワクチンの接種により誘導された抗体量を基準として、十全大補湯の投与による併用効果を相対的に評価したところ、5.8 倍もの OVA 抗原特異的な抗体産生の増強が観察された (Fig. 7B)。また、IgG1 に関しても、IgG2a ほどではないが、有意な抗体産生の増加が確認された (図 1)。

5. IFN- γ 産生細胞数の増加効果

マウス脾臓細胞中の OVA 抗原反応性 IFN- γ 産生細胞数を ELISpot アッセイにより解析した。ELISpot アッセイでは、IFN- γ 産生細胞とプレート上の捕捉抗体が密接しているため、産生されたサイトカインがプロテアーゼによる分解を受けるなどの影響がなく、抗原に反応し放出されたサイトカインを適格に捕捉することにより、サイトカインを産生する細胞数を測定することができる。OVA タンパクを作用させ、産生された IFN- γ を測定することにより、脾臓細胞中の OVA 抗原反応性 IFN- γ 産生細胞数を解析したところ、OVA ワクチンの接種により OVA 抗原に対する免疫の誘導が起り、その結果、IFN- γ 産生細胞は増加した。さらに、十全大補湯を併用投与することにより脾臓細胞中の IFN- γ 産生細胞数は有意に増加し、免疫の増強効果が確認された (図 2)。

6. 抗原特異的 CTL の誘導効果

マウス脾臓細胞を OVA257-264 ペプチド

と共に 5 日間の *in vitro* にて刺激を行い、蛍光染色を行い、FACS 解析を行った。その結果、OVA ワクチンの接種により OVA 抗原に対する免疫を誘導したマウスにおいて、抗原特異的 CTL が検出された。さらに十全大補湯の投与を併用すると、マウスの脾臓細胞中の抗原特異的 CTL の誘導が増強し、OVA ワクチンの接種単独群と比較して約 1.5 倍を示した（図 3）。

D. 考察

E. 結論

これまで多くの漢方薬を用いて、抗腫瘍効果が検討されてきたが、そのほとんどが漢方薬による自然免疫、すなわち抗原非特異的な免疫誘導に基づく抗腫瘍効果に関するものであった。しかしながら、特にがんなどの難病に対しては、実際の医療現場を意識した漢方薬の基礎研究へと遷移する時期に来ていると思われる。従って、これまでの漢方薬の基礎研究の ①デザイン上の問題点を洗い出し、かつ、②これまでの見から得られた情報を最大限に活用して、突破口を開くべきであると考えている。すなわち、問題点として以下の 2 点を考えている。(a) 漢方薬、特に補剤単独投与によりがん治療を行うことは現実的ではない。(b) 自然免疫を高めることを最大の根拠にしてがん治療に望むのは、治療根拠としては脆弱である。そこで、本研究では、以下の 2 点を念頭において検討を行った。①問題点の解決：漢方薬単独では、がんの治療効果が得られない実験系をセットする。②情報の活用：漢方薬は自然免疫を賦活化するのであれば、獲得免疫が誘導されやすい生体内環境を整えているとの仮説を証明する。その結果、十全大補湯単独の投与では、抗腫瘍効果が本実験モデルでは確認できなかつたにも関わらず、OVA ワクチンの接種により OVA 抗原を MHC Class I に提示している EG7 に対する特異的な抗腫瘍免疫

を誘導し、併用することにより、有意に腫瘍増殖を抑制し、腫瘍生着までの期間と生存期間の延長が観察できた。この結果より、十全大補湯がワクチン接種による特異的な免疫誘導を増強するという、がんワクチンのアジュバントになり得ることが明らかとなった。OVA というモデル抗原を用いた実験系であるが、十全大補湯ががんワクチンによる抗腫瘍効果を増強することが確認できた。抗腫瘍免疫において、その中心的な役割を担うエフェクター細胞は、がん抗原特異的な CTL であることから、この抗腫瘍効果の増強は、がん抗原特異的 CTL の誘導の増強に基づくものであることが明らかにされた。がん特異的 CTL の誘導に関わるサイトカインとして IFN- γ がよく知られている。IFN- γ は Th1 細胞より産生され、Th1/Th2 バランスを Th1 優位に傾ける作用を持ち、そのほか APC の共刺激分子の発現増加や抗原のプロセッシングの増強、CD4 陽性細胞の増殖を増強する働きをすることが知られている。また、マウスの IgG サブタイプには、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c、IgG3、IgG4 があり、そのうち IgM から IgG1 へのクラススイッチには Th2 タイプのサイトカイン IL-4 が関与し、IgG2a へのクラススイッチには Th1 タイプのサイトカイン IFN- γ が関与していることが知られている 31, 32)。そこで、OVA 抗原特異的な IgG2a の産生量を調べた結果、OVA ワクチンの接種を行ったマウスに十全大補湯を併用することで、有意にその産生量が増加することが確認できた。ELISpot アッセイにより、直接的に IFN- γ 産生細胞数に対する十全大補湯の効果を検討したところ、抗原反応性 IFN- γ 産生細胞を有意に増加させることができ認められた。OVA ワクチンを接種した際に、十全大補湯の併用投与することにより、OVA 抗原特異的 CTL が増強されるか否かを確認するため、OVA/MHC テトラマーを用いて解析を行った。最近、末梢血や組織

から分離した CTL を、フローサイトメトリーを用いて高感度・定量的・簡便に解析する方法として、MHC (HLA) テトラマーが頻繁に用いられるようになっている。MHC モノマーでは TCR との親和性が非常に低いので安定して TCR に結合することができない。そこでペプチド/MHC class I 複合体を 4 量体化することにより TCR との親和性を向上させ、抗原特異的 CTL の TCR に安定して結合することを可能にしたものが、この MHC テトラマーである。本法により OVA 抗原特異的な CTL の誘導を解析した結果、OVA ワクチン接種と十全大補湯を併用投与したマウスにおいて、OVA ワクチンを接種し水を投与したマウスに比べ、OVA 抗原特異的な CTL の誘導が増強されることが明らかとなった。したがって、第 1 章で確認された十全大補湯によるがんワクチンによる抗腫瘍効果は、IFN- γ 產生に基づく抗原特異的な CTL の誘導を増強させたことによるものであることが示された。一方、OVA ワクチンの接種と十全大補湯を併用投与した群において、IgG1 の產生も OVA ワクチン接種単独の群に比較して増加していた (Fig. 7A)。その結果をさらに裏付けるように、ELISpot アッセイにおいても、ワクチン免疫に十全大補湯の投与を併用することにより、IL-4 產生細胞数の増加が認められた (Fig. 8)。Th1/Th2 バランスの観点から考えると、IL-4 の產生が抑制され、結果として Th1 優位に働くものと予想される。十全大補湯が Th1 と Th2 の両者を増強するという結果から以下のことが考察される。CTL を誘導する際に CD8 陽性 T 細胞が、ヘルパー T 細胞からの刺激を受けず、DC 上の MHC class I からの刺激のみで分化・増殖した場合、一過性に細胞障害性を発揮することができるものの、メモリー T 細胞化することができないという報告がある³⁷⁾ことから、同時にヘルパー T 細胞の活性化が必要であると考えられる。そのため、CD8 陽性 T 細胞と

ヘルパー T 細胞を同時に活性化する目的で、腫瘍特異的な MHC class I エピトープペプチドと同時に MHC class II エピトープペプチドを用いて DC を刺激する方法がマウスを用いた実験モデルで試みられ、その有効性が示されている。このように、がんワクチン療法をはじめとする、がん免疫療法において、Th1 のみならず、Th2 を活性化することが、治療成績の向上に繋がるものと考えられる。したがって、十全大補湯は、Th1 と Th2 の両者の活性を高める興味深いアジュバントとなりうることが示唆された。しかしながら、Th1 と Th2 が関わる獲得免疫の誘導は IFN- γ と IL-4 という 2 つのサイトカイン産生のバランスのみで十分に説明できるものではなく、他のサイトカイン、例えば IL-12 の產生量の変動を調べるなど、さらなる解析を要するものと考える。

F. 健康危険情報

総括研究報告書を参照

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kato S, Koizumi K, Yamada M, Inujima A, Takeno N, Nakanishi T, Sakurai H, Nakagawa S, Saiki I. A phagocytotic inducer from herbal constituent, pentagalloylglucose enhances lipoplex-mediated gene transfection in dendritic cells. Biol Pharm Bull. 2010;33(11):1878-85.

2. 学会発表

加藤真一郎、小泉桂一、山田美幸、犬鳴明子、竹野伸洋、中西剛、櫻井宏明、中川晋作、済木育夫

芍薬成分 pentagalloylglucose の貪食亢進作用に基づく樹状細胞への遺伝子導入剤としての応用、第 27 回和漢医薬学会学術大会、京都、2010

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

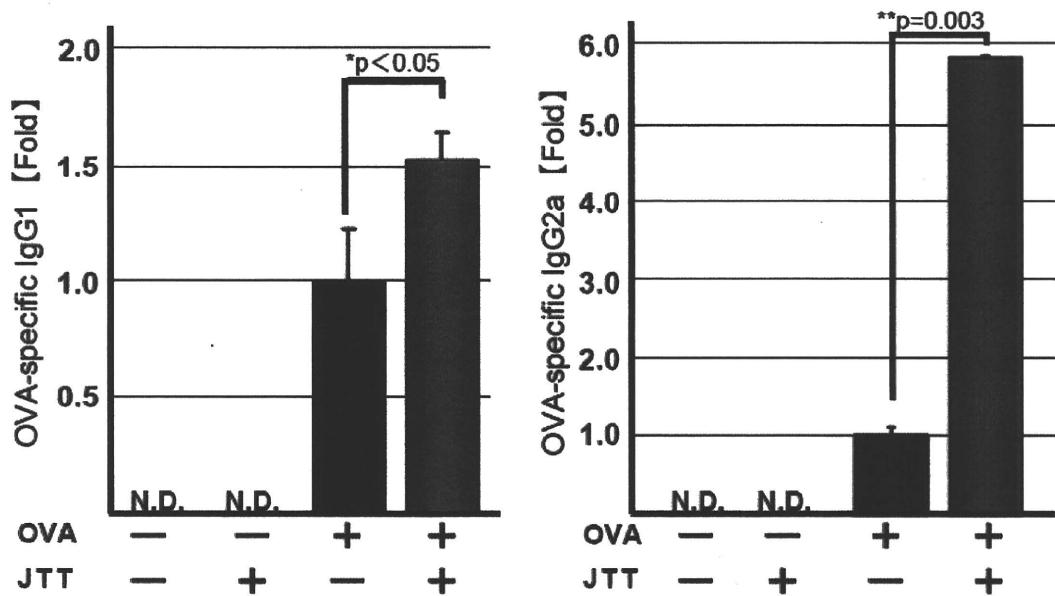


図 1.

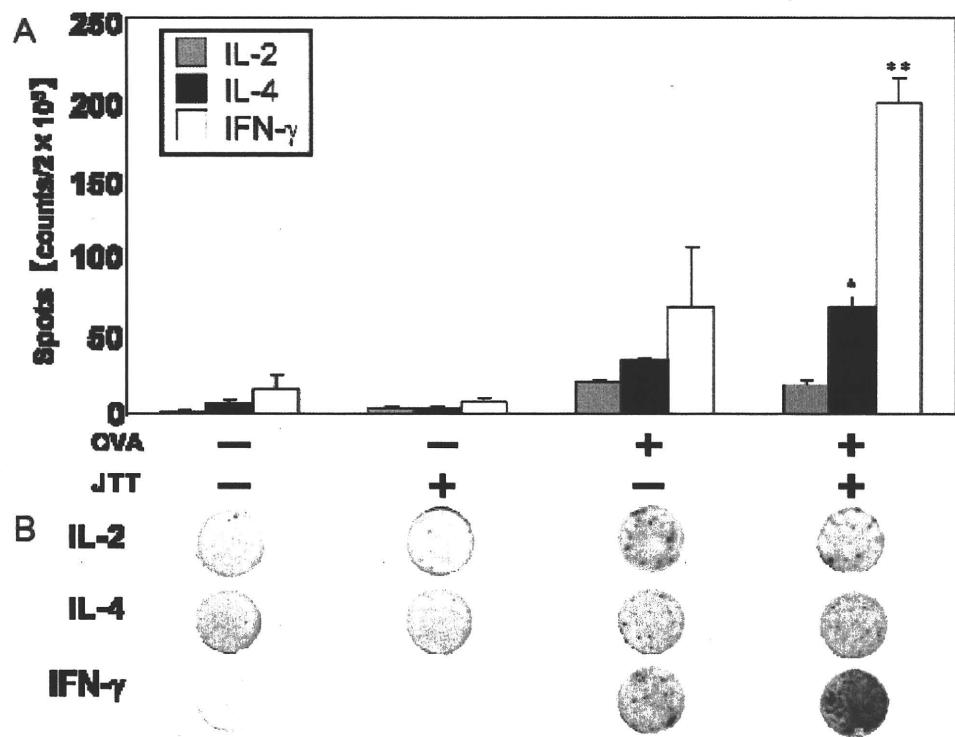


図 2.

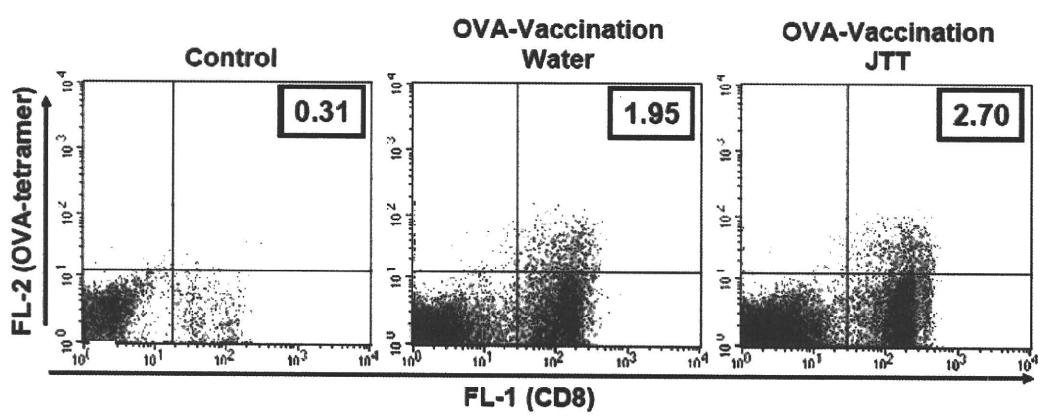


図 3.

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業（臨床研究推進研究事業））
分担報告書

粘膜免疫システムを介した漢方アジュバントの
作用メカニズムの解明

研究分担者 清野 宏 東京大学医科学研究所炎症免疫学分野 教授

研究要旨

漢方薬は免疫調整作用があることが古くから知られているが、その作用メカニズムの多くは不明である。特に漢方薬の多くが内服処方なのにも関わらず、最も影響を受けると予想される腸管免疫への作用についてはほとんど未解明である。本研究では研究分担者の清野がこれまで進めてきた腸管免疫を中心とする粘膜免疫に関する先導的研究から得られた知的・技術基盤をもとに、アジュバント作用を中心に漢方薬の粘膜免疫に対する作用について、その免疫学的メカニズムを明らかにする為の基礎実験を推進する。本年度に行った研究から、これまで脾臓などの全身系免疫に対し免疫調節機能があることが報告されている補中益氣湯に腸管免疫を活性化する機能があることを見いだした。さらに経口ワクチン投与期間中、補中益氣湯を同時に投与すると抗原特異的 IgA 抗体の產生が増強することが判明した。

A. 研究目的

漢方薬は免疫調整作用があることが古くから知られているが、その作用メカニズムの多くは不明である。特に漢方薬の多くが内服処方なのにも関わらず、最も影響を受けると予想される腸管免疫に対する作用はほとんど未解明である。一方で研究分担者である清野はこれまでに冬虫夏草をリード化合物とする FTY720 を用いた研究から、生体防御に関わる IgA の產生を始めとする腸管免疫制御機構に関する知見を得ている。本研究ではこれらの研究成果を中心に、清野がこれまで進めてきた腸管免疫を中心とする粘膜免疫に関する先導的研究から得られた知的・技術基盤をもとに、アジュバント作用を中心に漢方薬の粘膜免疫に対する作用について、その免疫学的メカニズムを明らかにする。本事業の初年度である 22

年度においては、これまでの脾臓などの全身系免疫システムの活性化を指標にした研究から、免疫調節機能があることが報告されている十全大補湯や補中益氣湯、黃耆建中湯を投与した際の腸管免疫の機能を解析した。

B. 研究方法

1. 十全大補湯や補中益氣湯、黃耆建中湯を週 5 回の頻度でマウスに経口投与し (40 mg/head/time)、経日的に糞便、血清を回収し、その中に含まれる抗体値を ELISA 法で測定した。
2. 経口投与した抗原に対する特異的な免疫応答を検討する目的で、上記、漢方薬を 5 日間前投与したマウスにモデル抗原であるニワトリ卵白アルブミン (OVA) を粘膜アジュバントであるコレラトキシンと共に経