

## 論文内容の要旨

トレハロース誘導体の粘膜アジュバント活性：経鼻免疫を行ったマウスでの液性免疫増強効果の検討

(川村花恵, 吉野直人, 佐々木裕, 村上一行, 川村英生, 利部正裕, 村木靖, 杉山徹)  
(岩手医学雑誌 68 巻, 2 号 平成 28 年 6 月掲載)

### I. 研究目的

感染症を予防する手段として、ワクチン接種は非常に有効な手段である。ほとんどのワクチンは皮下もしくは筋肉内へ接種するが、この接種方法では多くの病原体の侵入門戸である粘膜組織に感染防御免疫を誘導できない。しかし、粘膜からの抗原投与は粘膜組織に防御機構を構築することが可能である。粘膜ワクチンは粘膜を介した免疫誘導によってより感染防御に適した免疫を惹起できることが期待されるため、次世代ワクチン開発において着目されている。安全性の点から不活化抗原を用いた粘膜ワクチンの開発が目標とされているが、ワクチン抗原特異的な免疫を誘導するためにはアジュバントが必要となる。

トレハロース-6,6'-ジミコレート (TDM) は結核菌の細胞壁を構成する物質で、トレハロースに 2 つのミコール酸がエステル結合した構造である。TDM はマクロファージに発現するパターン認識受容体である Macrophage-inducible C-type lectin (Mincle) に結合し、炎症性サイトカインの産生を促すことで強力な免疫賦活化作用を示す。しかし、安全性の点からアジュバントとしてヒトへ応用するのは困難である。そこで、TDM と類似構造で、Mincle への結合能を持ち、TDM に比べて毒性が低いと考えられるトレハロース誘導体の粘膜アジュバント効果を検討した。

### II. 研究対象ならび方法

TDM に類似した構造を持ち、Mincle に結合能を持つトレハロース誘導体として、オクタノン酸トレハロースエステル (C8) の粘膜アジュバント効果を検討した。抗原として卵白アルブミン (OVA) と C8 の混合液をマウスに 1 週間毎に計 3 回経鼻投与し、以下について検討した。

1. 最終投与から 1 週間後に、粘膜分泌液（糞便抽出液，鼻腔洗浄液，唾液，膣洗浄液）中の OVA 特異的 IgA 抗体価および血漿中の OVA 特異的 IgA, IgG 抗体価を ELISA で計測し、OVA 単独投与群と比較した。さらに、血漿中の OVA 特異的 IgG 抗体のサブクラス解析を行った。
2. 粘膜関連組織および脾臓における OVA 特異的抗体産生細胞数を ELISPOT 法で測定した。
3. 記憶免疫の成立を確認するため、最終投与から 13 週間後に追加免疫 1 回を行い、OVA 特異的抗体価の推移を長期的に観察した。
4. C8 と同様に Mincle に結合能を持つトレハロース誘導体であるデカン酸トレハロース

エステル (C10), ドデカン酸トレハロースエステル (C12) と, 比較対象としてトレハロース (C0) にもアジュバント効果があるかを検討するため, C8 と同様の方法でマウスに経鼻投与を行い, 粘膜分泌液中および血漿中の OVA 特異的抗体価を ELISA で計測した.

5. トレハロース誘導体が TDM の免疫賦活化作用と同様の機序を持つかを検討するため, TDM が Mincle に結合した際にマクロファージから産生される炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$  および IL-6) を, トレハロース誘導体で刺激したマウスマクロファージ細胞株である RAW264.7 を用いて確認した.

### III. 研究結果

1. OVA 単独投与群に比べ OVA+C8 投与群では粘膜分泌液中の OVA 特異的 IgA 抗体価および血漿中 OVA 特異的 IgA, IgG 抗体価が有意に上昇した. 粘膜関連組織および脾臓における OVA 特異的抗体産生細胞数が OVA 単独投与群に比べ有意に増加していた. これらの結果から C8 の粘膜アジュバント効果が証明された.
2. OVA+C8 投与群の血漿中の OVA 特異的 IgG 抗体のサブクラス解析では IgG1/IgG2c 比が非常に高値であり, Th2 型優位のアジュバント効果を持つことが示唆された.
3. OVA+C8 投与群の長期観察では, 追加免疫による抗体価の再上昇を認め, 記憶免疫の成立が確認された.
4. C8 と同様に C10, C12 も経鼻免疫による粘膜アジュバント効果を認めたが, 炭素直鎖を持たない C0 には認めなかった.
5. TDM の刺激では RAW264.7 から産生される炎症性サイトカインの発現レベルが未刺激群に比べ上昇したが, C8, C10, C12, C0 の刺激による発現レベルは未刺激群とほぼ同等で低レベルであり, トレハロース誘導体の安全性が示唆された.

### IV. 結 語

本研究から, C8, C10, C12 のアジュバント作用は粘膜免疫および全身免疫の両方を増強し, トレハロース誘導体添加経鼻ワクチンは呼吸器系のみならず消化器系や生殖器系における感染症に対する有効なワクチンとして開発できる可能性が示唆された. また, C8 は Th2 型優位であることから特に抗体応答を増強させると考えられた. さらに, ワクチンにとって最も重要な記憶免疫を成立させる有効なアジュバントであることも明らかとなった. 安全性にも期待ができることから, C8, C10, C12 に効果的な新規粘膜アジュバントとしての臨床応用の可能性が見出された.

## 論文審査の結果の要旨

### 論文審査担当者

主査 教授 石田 陽治 (内科学講座血液腫瘍内科分野)  
副査 准教授 石田 和之 (病理診断学講座)  
副査 教授 村木 靖 (微生物学講座 感染症学・免疫学分野)

感染防御に有効な免疫を誘導する粘膜ワクチンには、免疫を増強するアジュバントが不可欠である。TDM は強力な免疫賦活作用があるものの、重篤な副作用があるので臨床応用は難しい。本研究論文では、TDM と類似構造を持つもので毒性が低いと思われる 3 種類のトレハロース誘導體 (C8, C10, C12) について、アジュバンド効果と副作用について検討した。C8 と卵白アルブミンの混合液で経鼻免疫を行った結果、糞便中、鼻腔洗浄液、膣洗浄液に卵白アルブミンに対する特異的 IgA 抗体価が、血漿中には特異的 IgA 抗体価ならびに IgG 抗体価が有意に増加していた。エリスポットアッセイでは卵白アルブミン抗体産生細胞が確認でき、また免疫記憶も成立していた。さらに C10 と C12 にもアジュバンド効果を認めた。経鼻免疫後、副作用の原因となるようなサイトカインの産生は認めなかった。本論文は、将来有望視されている経鼻免疫において、アジュバント効果も有意に認められることからトレハロース誘導體が臨床的に使用できる可能性を示した有益な研究と言える。学位に価する論文である。

### 試験・試問の結果の要旨

ワクチンに関する免疫、経鼻免疫、アジュバンド効果、トレハロース誘導體の構造などについて試問を行い、適切な回答を得た。学位に価する学識を有していると考えられる。

### 参考論文

- 1) 卵巣静脈に留置された下大静脈フィルターを術中に卵巣静脈末梢からスネアカカテーテルを用い回収した一例 (新沼花恵 他 7 名と共著)  
岩手県立病院医学会雑誌, 54 巻, 1 号 (2014) : p48-51
- 2) A pilot study of oxaliplatin with oral S-1 as second-line chemotherapy for patients with recurrent adenocarcinoma of the uterine cervix (再発子宮頸部腺癌に対する SOX 両方の pilot study) (高取恵里子 他 9 名と共著)  
International Journal of Clinical Oncology, 19 巻, 2 号 (2014) : p336-340