

岩手医科大学
審査学位論文
(博士)

Original

経鼻免疫によるサーファクチンのアジュバント効果の検討

竹下亮輔¹⁾, 吉野直人²⁾, 佐々木裕²⁾, 松川直美²⁾,
利部正裕¹⁾, 佐藤成大²⁾, 杉山 徹¹⁾

¹⁾ 岩手医科大学医学部, 産婦人科学講座

²⁾ 岩手医科大学医学部, 微生物学講座: 感染症学・免疫学分野

(Received on December 18, 2013 & Accepted on December 26, 2013)

要旨

粘膜組織での感染防御免疫を誘導するためには、効果的なアジュバントが必要になる。これまでの研究から、ポリミキシンに粘膜アジュバント作用があることが明らかになっており、ポリミキシンと化学構造が類似し微生物由来であるサーファクチン (surfactin; SF) のアジュバント効果を検討した。アジュバント活性は、抗原として卵白アルブミン (OVA) と SF をマウスに経鼻免疫することで検討した。SF 非投与群と比べると、投与群では粘膜分泌液や血漿中で

の OVA 特異的抗体価の上昇や免疫組織での特異的抗体産生細胞が誘導された。作用機序を検討したところ、肥満細胞からの脱顆粒が確認されケミカルメディエーターの放出も検出された。また、肥満細胞が産生し獲得免疫の増強に関与するサイトカイン遺伝子の発現誘導も確認された。以上より、SF のアジュバント効果が明らかになり、新規アジュバントとして SF のワクチンへの応用が期待された。

Key words : *surfactin, mucosal adjuvant, mast cell activator, mucosal immunity, vaccine*

I. 緒 言

ヒトにおいて最も広い病原体の侵入門戸である粘膜上皮は、脆弱ではあるが自然免疫と獲得免疫が密接に関わりあうことで感染防御機能を増強している。このような免疫系を粘膜免疫と呼び、誘導組織である鼻咽頭関連リンパ組織 (nasopharynx-associated lymphoid tissue; NALT) や腸管関連リンパ組織 (gut-associated lymphoid tissue; GALT) などを刺激することで、実行組織である気管や消化管、膈などに抗原特異的免疫が誘導される。従来の注射型ワクチンと異なり、粘膜ワクチンは粘膜防御機能を増強し病原体の侵入自体を防ぐことが可能である^{1, 2)}。しかしながら、粘膜組織にワクチンに対する強い免疫応答を誘導するためには、粘膜アジュバントが必要である。

アジュバントとは一般に免疫増強物質と呼ばれており、ワクチン接種におけるアジュバントの必要性は次の 4 つに大別される。第 1 に、アジュバントは精製タンパク抗原に対する免疫原性を高めるために用いられる^{3, 4)}。第 2 に、ワクチン抗原とアジュバントの同時投与は防御免疫発現のために必要なワクチンの量を減らすことを可能にする⁵⁾。第 3 に、アジュバントを使用することによって新生児や高齢者におけるワクチンの有効性を高めることができる⁶⁻⁹⁾。第 4 に、アジュバントは抗原提示細胞による抗原取り込みの効率を高め、抗原特異的獲得免疫誘導を増強する^{10, 11)}。

アルミニウム塩であるアラムアジュバントはヒトに使用されている数少ないアジュバント^{5, 6, 12)}でワクチン抗原に対する全身免疫を増

強するが、経口あるいは経鼻でアラムアジュバント添加ワクチンを投与した場合、アジュバント効果は失われてしまう¹³⁾。また、コレラ毒素 (CT) や大腸菌易熱性毒素 (LT) は強力な粘膜アジュバントとして知られているが¹⁴⁻¹⁷⁾、LT をインフルエンザワクチンのアジュバントとして用いた臨床試験において顔面神経麻痺などの副反応が報告されたため、臨床応用は困難になっている¹⁸⁾。現在、臨床で使用されている不活化ワクチンで粘膜面に効果的な感染防御免疫を誘導できるワクチンはなく、安全性を考慮した新規粘膜アジュバントの研究開発が期待されている。

近年の研究において、肥満細胞が獲得免疫の誘導に深く関わっていることが明らかになり、肥満細胞活性化物質をワクチン抗原と同時投与した時に抗原特異的免疫応答が誘導されることが報告されている¹⁹⁻²³⁾。さらに、活性化した肥満細胞は所属リンパ節にリンパ球やランゲルハンス細胞を流入させ^{19, 24, 25)}、炎症反応を含む自然免疫はワクチン特異的免疫応答を促進させている²⁶⁾。

我々はより安全な粘膜アジュバントを開発するために、既にヒトに使用されていて安全性が確認されている低分子化合物に着目した。ポリミキシン B (PMB) やコリスチン (CL) は *Bacillus polymyxa* から産生される抗生物質であり²⁷⁾、肥満細胞の活性化能を有する^{28, 29)}。抗原として卵白アルブミン (OVA) とアジュバントとして PMB または CL を経鼻免疫したところ、血漿中および粘膜分泌液中の OVA 特異的抗体価が上昇することが確認され、さらに、PMB と CL の粘膜アジュバント活性には疎水性である脂肪鎖と親水性の環状ポリペプチドからなる両親媒性構造が関与していることが明らかになっている³⁰⁾。

本研究では PMB と類似した分子構造を持ち³¹⁾、*Bacillus subtilis* が産生するサーファクチン (SF)³²⁾ に着目した。SF はマウスやウサギの

皮膚を用いた研究において低毒性であり³³⁾、皮膚に対して低刺激性である³⁴⁾。また、SF は癌³⁵⁾ やアルツハイマー病³⁶⁾ などの治療に対して臨床応用も期待されており、化粧品や臨床への応用など様々な可能性がある物質である。

今回我々は、安全性に関してすでに優位な SF を抗原と共にマウスに経鼻免疫することで、その粘膜アジュバント活性を動物レベルで検討した。

II. 研究材料および方法

1. 候補アジュバントと抗原

アジュバント効果の検討において、候補アジュバントとして SF ナトリウム (和光純薬工業株式会社, 大阪, 日本) と抗原として OVA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を用いた。SF と OVA は生理食塩水 (大塚製薬工場, 徳島, 日本) で溶解し接種液とした。

2. 経鼻免疫

本研究の動物実験は岩手医科大学動物実験委員会の承認後、本学動物研究センターで、本学動物実験規定を順守して実施した。実験動物には 5 週齢の雌の C57BL/6NJcl マウス (日本クレア, 東京, 日本) を用いた。環境適応のため 1 週間飼育後に、ケタミン塩酸塩 (第一三共プロファーマ株式会社, 東京, 日本) をケタミン換算で 1 mg 腹腔内投与して浅麻酔を行った後、0, 0.005, 0.05, 0.5, 5, 50, 500 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ の濃度の SF と 100 μg の OVA を混合した溶液を、片鼻 2.5 μl ずつ (計 5 μl) 投与した。経鼻投与は、常法に従い窒息を回避するために 5 分の投与間隔を設けた。免疫スケジュールは多くの研究で用いられているもので、1 週間間隔で合計 3 回経鼻免疫を行った^{16, 30, 37-39)}。

3. 検体採取

最終免疫より 1 週間後に粘膜分泌液 (鼻腔洗浄液, 唾液, 糞便抽出液, 膣洗浄液) と血液の検体を採取した⁴⁰⁻⁴²⁾。唾液はピロカルピン塩酸塩 2.5 mg/ml (Sigma-Aldrich) を 0.1 ml 腹

腔内投与し、分泌された唾液を採取した。糞便は採取後、0.1%NaN₃添加リン酸緩衝液 (phosphate buffered saline; PBS) に糞便が 10 μg/ml となるように調整して攪拌後に遠心して上清 (糞便抽出液) を回収した。ケタミン塩酸塩で浅麻酔後に、50 μl の PBS で3回腔を洗浄して腔洗浄液を得た。ヘパリン処理済マイクロ採血管を用いて眼窩採血を行った。頸椎脱臼で安楽殺後に、マウスの頭部を切断して1mlのPBSで鼻腔を3回洗浄して鼻腔洗浄液を得た。検体は使用するまで-80℃に保存した。これらの検体採取後に、鼻腔粘膜固有層 (nasal lamina propria; n-LP), NALT, 小腸粘膜固有層 (small intestinal lamina propria; i-LP), 腸管膜リンパ節 (mesenteric lymph nodes; MLNs), 下顎リンパ節 (submandibular lymph nodes; SMLNs), 唾液腺 (submandibular glands; SMGs), 脾臓 (spleen; SP), 腋窩リンパ節 (axillary lymph nodes; ALNs) を採取し、リンパ球を得た⁴²⁾。

4. enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

粘膜分泌液 (鼻腔洗浄液, 唾液, 糞便抽出液, 腔洗浄液) 中の OVA 特異的免疫グロブリン A (IgA) 抗体と、血漿中の OVA 特異的 IgA 抗体および IgG 抗体を end-point ELISA^{38, 40)} で測定した。OVA でコーティングした 96 穴プレートに検体添加後、ペルオキシダーゼ (HRP) 標識ヤギ抗マウス IgA 抗体 (Southernbiotech, Birmingham, AL) または HRP 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Southernbiotech) で OVA 特異的抗体を検出した。発色反応には基質として TMB + (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine: DAKO, Carpinteria, CA) を、反応停止液として 0.5 mol/L 硫酸を用いて、マイクロプレートリーダーで吸光度 (OD₄₅₀) を測定した。抗体価は、(検体の OD₄₅₀) - (陰性対照の OD₄₅₀) ≥ 0.1 とする最大希釈濃度とした。

5. enzyme linked immunospot (ELISPOT) 法
粘膜免疫関連組織と全身性免疫関連組織における OVA 特異的抗体産生細胞数を ELISPOT 法^{38, 40)} を用いて検討した。OVA でコーティングした 96 穴フィルタープレートに各組織から得たリンパ球を加え、4 時間後に放出された OVA 特異的抗体を、アルカリホスファターゼ (AP) 標識抗マウス IgA 抗体または AP 標識抗マウス IgG 抗体 (Southernbiotech) で検出した。NBT/BCIP (nitro-blue tetrazolium chloride/ 5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate p-toluidine salt; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) で発色させ、実体顕微鏡で OVA 特異的抗体産生細胞数を測定した。

6. β-hexosaminidase およびケミカルメディエーターの測定

マウス肥満細胞株 (MC/9: American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)⁴³⁾ を用いて β-hexosaminidase 放出試験^{30, 44)} およびケミカルメディエーター放出試験を行った。MC/9 は Dulbecco's Modified Eagle Medium に 10% ウシ胎児血清, 10% ConA 添加ラット T-STIM (BD biosciences, Bedford, MA, USA), 0.05 mM 2-mercaptoethanol を添加した培養液で、37℃, 10% CO₂ 条件下で培養した。MC/9 の細胞濃度は 1 × 10⁶ 個/ml とし、SF を各種濃度で用いた。発色反応には基質として 1 mM 4-nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosaminide (Sigma-Aldrich) を、反応停止液として 2 M glycine buffer を用い、吸光度 (OD₄₀₅) をマイクロプレートリーダー (Tecon Austria GmbH, Austria) で測定した。β-hexosaminidase 放出の割合は以下の計算で得た。β-hexosaminidase (%) = (上清の OD₄₅₀ - 陰性対照の OD₄₅₀) ÷ (0.2% Triton X で処理した MC/9 の OD₄₅₀ - 陰性対照の OD₄₅₀)。ケミカルメディエーターであるヒスタミン, ロイコトリエン B₄ (LTB₄), プロスタグランジン D₂ (PGD₂) の放出は EIA kit

(histamine; SPI-Bio, Montigny le Bretonnex, France, LTB4 and PGE2; Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA) を用いて測定した.

7. 定量リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 法

MC/9 細胞における SF 誘導性のサイトカイン遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR 法を用いて解析した. MC/9 細胞 (1×10^6 個/ml) に SF を添加し, SF 処理 24 時間後に細胞を回収した. Nucleo Spin RNA II kit (Macherey-Nagel GmbH & Co KG, Dure, Germany) を用いて総 RNA を抽出した. 総 RNA 500ng 相当を SuperScript III (Life Technologies Co., Carlsbad, CA, USA) と oligo (dT) プライマーを用いた逆転写反応に供し, cDNA を合成した. サイトカイン遺伝子の発現は SYBR Green II (タカラバイオ株式会社, 滋賀, 日本) とインターロイキン 4 (*IL-4*), 腫瘍壊死因子 α (*TNF- α*)⁴⁵⁾, CCL5 (別名 RANTES) (fwd: 5'-GCCAACCCAGAGAAGAAGTG-3', rev: 5'-AGCAAGCAATGACAGGGAAG-3') 特異的プライマーを用いたリアルタイム PCR 法により解析した. 内部標準遺伝子にはグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (*GAPDH*)⁴⁶⁾ を用いた.

8. 血漿中の総 IgE 抗体濃度

SF を経鼻免疫し, 最終免疫後第 1 週に採取した血液中の総 IgE 抗体濃度を sandwich ELISA⁴⁷⁾ で測定した. 抗マウス IgE 抗体 (BD biosciences) でコーティングした 96 穴プレートに血漿検体を加え, ビオチン標識ラット抗マウス IgE 抗体 (BD biosciences) で血漿中の IgE 抗体を検出した. HRP 標識ストレプトアビジン (BD biosciences) を加えたのち, TMB + で発色し, 0.5mol/L 硫酸で反応停止した. 標準曲線作成には精製マウス IgE 抗体 (κ 鎖; BD biosciences) を用いた.

9. 統計処理

結果は正規分布となるデータでは平均値 \pm 標準偏差 (SD), 非正規分布となるデータ

では中央値 \pm 四分位範囲 (IQR) として表した. グループ間の多重比較では, データは一元配置分散分析 (one-way analysis of variance; one-way ANOVA) により分析し, 有意差は Tukey-Kramer 多重比較検定を用いて分析した. $p < 0.05$ の値を有意とみなした.

抗原特異的抗体価は 2 倍階段希釈を行ったサンプルを ELISA で測定した. 抗体価 (図 1) は希釈倍率の幕指数で表記した.

III. 結 果

1. OVA 特異的抗体価

マウスを用いて経鼻免疫を行い, 最終免疫から 1 週で糞便抽出液中の OVA 特異的 IgA 抗体は SF の投与量が $0.005 \mu\text{l}/\text{mouse}$ では 8 匹中 2 匹で検出され, 用量依存的に抗体価の上昇が認められた. また, 鼻腔洗浄液と唾液における OVA 特異的 IgA 抗体は, それぞれ $0.5 \mu\text{g}/\text{mouse}$, $0.05 \mu\text{g}/\text{mouse}$ で検出され, これらも用量依存的に抗体価の上昇が見られた. 腔洗浄液は 4 匹のマウスより同体積の腔洗浄液を集め, 一つの検体にしたものを使用した. $500 \mu\text{l}/\text{mouse}$ の容量において OVA 単独群に比べ有意 ($p < 0.005$) に高い抗体価が得られた. 血漿中の OVA 特異的 IgA 抗体は, OVA 単独群では糞便抽出液, 鼻腔洗浄液, 唾液と同様に検出限界未満であったが, SF の添加により OVA 特異的 IgA 抗体が検出された. 血漿中の OVA 特異的 IgG 抗体価は $5 \mu\text{g}/\text{mouse}$ の投与量までは上昇が見られたが, $5 \mu\text{g}/\text{mouse}$ から $500 \mu\text{g}/\text{mouse}$ の投与量では抗体価は横ばいだった (図 1).

2. OVA 特異的抗体産生細胞

マウスの粘膜分泌液中の抗原特異的 IgA 抗体には血中から移行した抗原特異的 IgA 抗体も含まれる^{48, 49)}. このため, 実際に粘膜組織に OVA 特異的抗体産生細胞が誘導されているか確認するために各組織における OVA 特異的抗体産生細胞数を測定した. 粘膜関連組織 (n-LP,

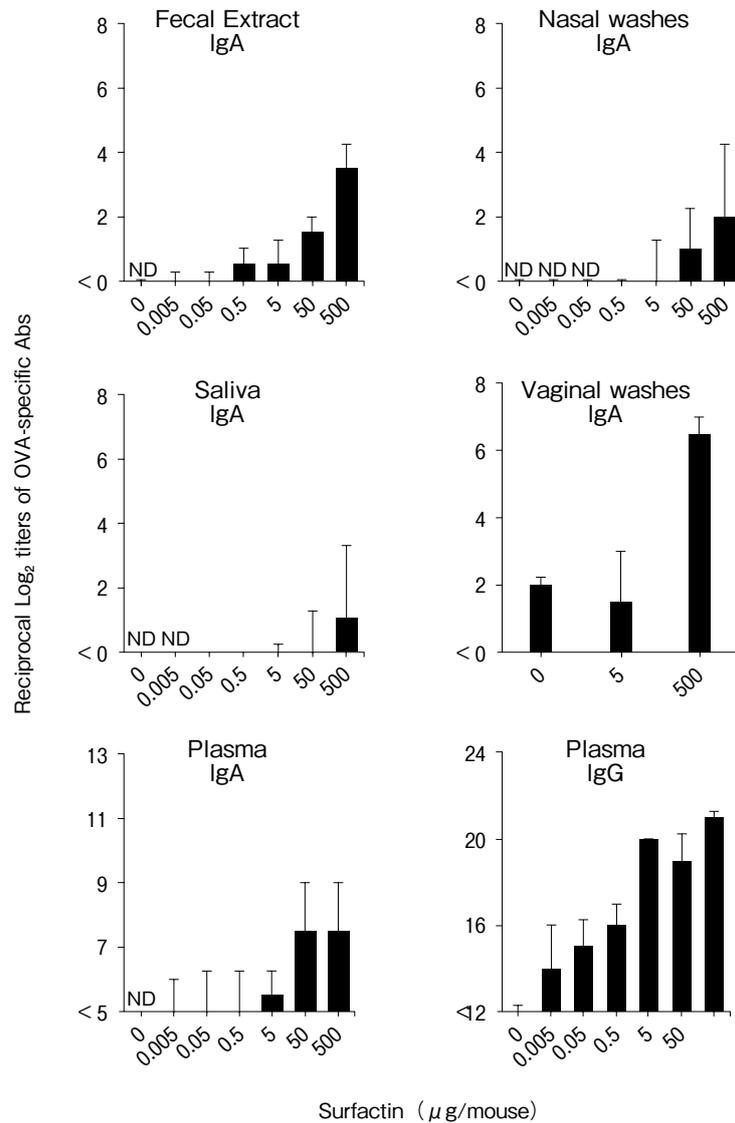


図1. 粘膜分泌液および血漿中の OVA 特異的抗体価

最終免疫後第1週に各検体を採取し、end-point ELISAでOVA特異的抗体価を測定した。鼻腔洗浄液、唾液、糞便抽出液および血漿では、経鼻免疫はOVA(100 µg/mouse)とSF(0, 0.005, 0.05, 0.5, 5, 50, 500 µg/mouse; 各群n=8)で行った。膣洗浄液は4匹分を1検体としており、経鼻免疫はOVA単独投与群(n=7; 28匹), SF 5 µg/mouse投与群(n=7; 28匹), SF 500 µg/mouse投与群(n=5; 20匹)で行った。各抗体価は検出限界未満の検体が存在したため中央値とIQRで表した。ND = not detected.

NALT, i-LP, MLNs, SMGs, SMLNs) および脾臓ではOVA特異的抗体産生細胞がOVAとSFの併用で経鼻免疫したマウスで誘導されていた。特に、経鼻免疫での誘導組織であるNALTやその所属リンパ組織であるSMLNsおよび実行組織であるn-LPとi-LP、全身リンパ組織である脾臓で、OVA単独群と比べ

有意にOVA特異的抗体産生細胞数が高かった。また、糞便抽出液や鼻腔洗浄液ではOVA特異的IgA抗体価は用量依存的に推移しており、OVA特異的IgA抗体産生細胞数も5 µg/mouse群に比べ500 µg/mouse群では有意に高かった。一方、血漿中のOVA特異的IgG抗体価は5 µg/mouse群と500 µg/mouse群で

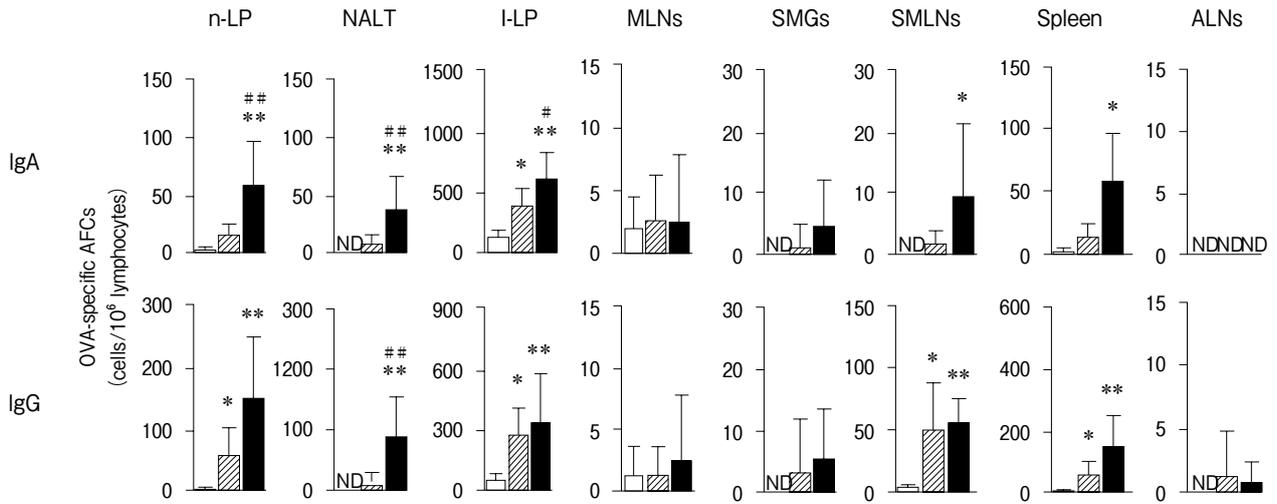


図2. OVA 特異的抗体産生細胞数

最終免疫後第1週にリンパ球を採取してELISPOT法で各組織のOVA特異的抗体産生細胞数を測定した。経鼻免疫はOVA単独投与群(白色), SF 5 µg/mouse投与群(斜線), SF 500 µg/mouse投与群(黒色)(各群n = 8)で行った。各OVA特異的抗体産生細胞数は平均値と標準偏差で表し, 有意差はone-way ANOVAおよびTukey-Kramer検定を用いて分析した。OVA単独投与群との有意差をアスタリスク(*p < 0.05, **p < 0.005) 5 µg/mouse投与群と500 µg/mouse投与群間の有意差をスクエア(#p < 0.05, ##p < 0.005)で示した。ND = not detected. 略語は本文参照。

はほぼ同等であり, 脾臓におけるOVA特異的IgG抗体産生細胞数にも有意差は認められなかった(図2)。

3. β -hexosaminidase とケミカルメディエーターの放出

SFの作用機序を検討するため, 肥満細胞に対するSFの作用を検討した。まず, SFによる脱顆粒反応を確認するために β -hexosaminidase放出試験を*in vitro*で行った。その結果, SFの濃度依存的に β -hexosaminidaseの上昇が認められ, 肥満細胞からの脱顆粒反応が確認された(図3)。さらに, 肥満細胞が放出するケミカルメディエーターであるヒスタミン, LTB₄, PGD₂の培養上清中の濃度を測定したところ, いずれもSFの濃度依存的に検出された(図3)。図中の破線は, SF未刺激でのMC9培養上清中の各ケミカルメディエーターの濃度である。

4. サイトカイン遺伝子の発現

肥満細胞と他の免疫細胞の関係性を確認するために, 肥満細胞が産生し獲得免疫の増強に関与するTNF- α , IL-4, CCL5の遺伝子発現レベルを測定した。すべてのサイトカイン遺伝子は, 未刺激細胞に比べて 1×10^{-3} mg/ml濃度のSF処理を行った細胞で有意に高い発現を示した。また, SF処理によるTNF- α 遺伝子の発現量は濃度依存性を示し, 1×10^{-4} mg/ml濃度のSF処理に比べ 10^{-3} mg/ml濃度のSF処理ではIL-4およびCCL5遺伝子が有意差はないが高い発現を示した(図4)。

5. 血漿中総IgE抗体濃度

ワクチンアジュバントの副反応の検討として, 血中総IgE抗体量の測定を行った。最終免疫後第1週で血漿中の総IgE抗体の濃度を測定したところ, SFの投与量が500 µg/mouseの群で76.9 ng/ml, 5 µg/mouseの群で78.5 ng/mlであった。OVA単独接種群での総

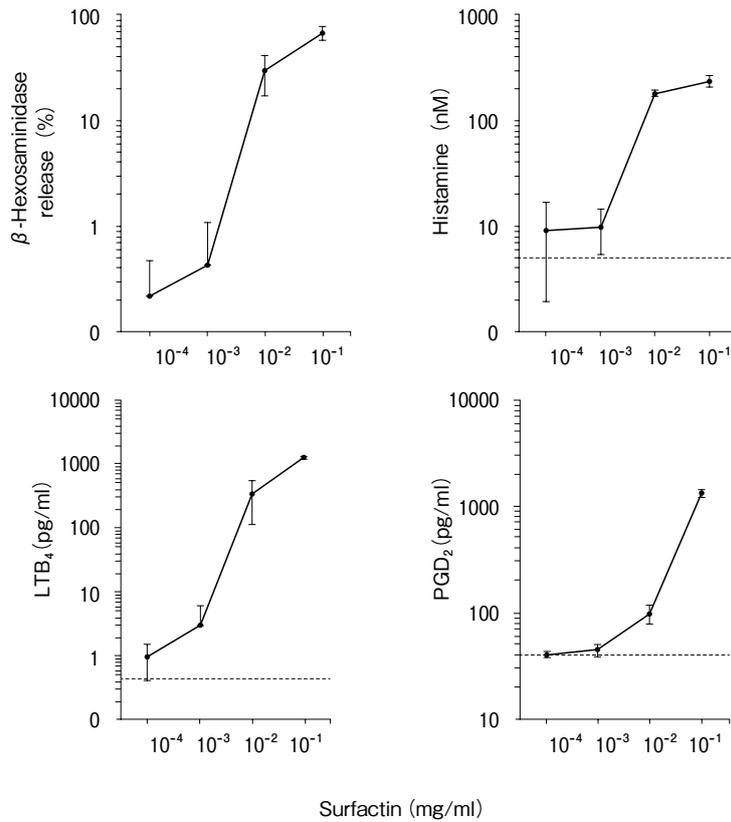


図3. MC/9からの β -hexosaminidaseおよびケミカルメディエーターの放出
 β -hexosaminidaseはMC/9 (1×10^6 個/ml)にSF (10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} mg/ml)を作用させて測定した。ヒスタミン、LTB₄、PGD₂はMC/9 (1×10^6 個/ml)にSF (10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} mg/ml)を作用させて測定した。再現性を確認するために同一の実験を2回行った。 β -hexosaminidaseの放出割合とヒスタミン、LTB₄、PGD₂の培養上清中の濃度を平均値と標準偏差で表した。SF未刺激での培養上清中の各ケミカルメディエーターの濃度は破線で表した。

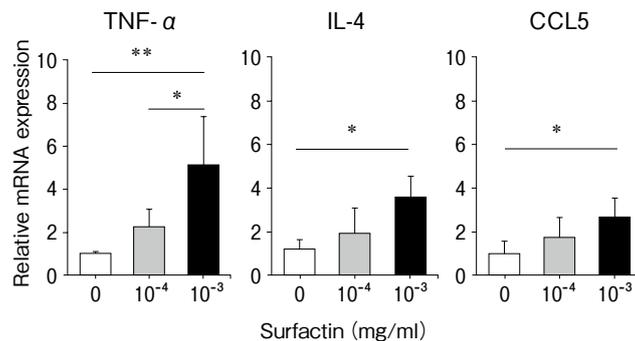


図4. MC/9からのサイトカインの放出
 MC/9 (1×10^6 個/ml)にSF 10^{-4} mg/ml (斜線), SF 10^{-3} mg/ml (黒色)を作用させ、リアルタイムRT-PCR法にてTNF- α 、IL-4、CCL5の遺伝子発現を確認した。再現性を確認するために同一の実験を5回行った。各遺伝子発現レベルは平均値とSDで表し、有意差はone-way ANOVAおよびTukey-Kramer検定を用いて分析した。SF未刺激群(白色)との有意差をアスタリスク(* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$)で示した。

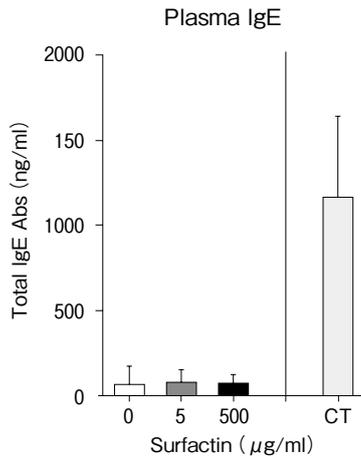


図5. 血漿中の総IgE抗体濃度
最終免疫後第1週の血漿中の総IgE抗体濃度を測定した。OVA単独投与群(白色), SF 5 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 投与群(斜線), SF 500 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 投与群(黒色)およびCT投与群(0.5 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) (ドット) (各群 $n = 8$) での総IgE抗体濃度を平均値とSDで表した。

IgE抗体濃度は68.3ng/mlで, SFによる有意なIgE抗体の上昇は認められなかった。一方, 強力な粘膜アジュバントであるCT(投与量0.5 $\mu\text{g}/\text{mouse}$)とOVAで経鼻免疫したところ, 総IgE抗体濃度は1,165.2ng/mlであった(図5)。

IV. 考察

アジュバント候補物質であるSFと抗原としてOVAをマウスに経鼻投与した結果, OVA特異的IgA抗体価や血漿中のOVA特異的IgGおよびIgA抗体価の上昇が認められた。また, 粘膜関連組織および脾臓においてOVA特異的抗体産生細胞は誘導された。粘膜免疫は接種部位の粘膜組織のみならず遠隔の粘膜組織にも特異免疫を誘導出来ることが知られているが⁵⁰⁾, 本研究においても鼻腔粘膜のみならず, 腸管や唾液腺あるいは腔粘膜にも抗体産生細胞が誘導されていた。以上より, SFはアジュバントとして経鼻免疫することで, 抗原特異的な粘膜免

疫および全身性免疫応答を高めることが明らかになった。これらの知見から, SF添加経鼻ワクチンが呼吸器感染症のみならず腸管感染症や性行為感染症に対する有効なワクチンを開発できる可能性があることが示唆された。

血漿中のOVA特異的IgG抗体価は, SFの投与量が5 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ では 219.9 ± 1.1 で500 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ では 220.8 ± 1.4 ではほぼ同等となった。これは, 脾臓におけるOVA特異的IgG抗体産生細胞数も5 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 群と500 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 群で有意差は認められなかったことから裏付けられるが, 何故SFの用量依存的に抗体価が上昇しなかったのかは本研究では明らかになっていない。マウスの抗体産生能力の限界が考えられるが, CTとOVAで同様に経鼻免疫した同系マウスにおいて, 血漿中のOVA特異的IgG抗体価は $2^{24.3 \pm 2.5}$ (範囲: $2^{22} - 2^{29}$)であった³⁸⁾。即ち, 動物としての抗体産生の限界ではなく他の機序が存在するもの思われた。

Bacillus属の産生するPMBには粘膜アジュバント活性があることが先行研究で明らかになっている³⁰⁾。SFの500 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 群とPMBの500 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 群を比較すると血漿中のOVA特異的IgG抗体価はそれぞれ $2^{20.9 \pm 1.4}$ と $2^{21.1 \pm 1.6}$ であり有意差は存在しなかったが, SFの5 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 群とPMBの5 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 群を比較すると, IgG抗体価はそれぞれ $2^{19.9 \pm 1.1}$ と $2^{13.9 \pm 2.6}$ であり有意にSF群の方が抗体価が高かった($p < 0.0005$)。SFナトリウムの分子量は1,058.33であり, PMB硫酸塩の平均分子量は1,301.56である。投与モル数はSFで4.7nmol/mouse, PMBで3.8nmol/mouseとなる。投与モル数はSFの方がわずかに多いが, 抗体価で64倍の差が生じるとは考えにくい。両者の化学構造は疎水基と親水基をもち界面活性作用を有する構造であるが, PMBの疎水基である炭素直鎖は7つの炭素原子であるのに対しSFでは12個の炭素原子から炭素直鎖が出

来ている。これらの違いは界面活性に大きな差をもたらすことが予想され、今後両者を比較する上で界面化学的な解析が必要と考えられた。

近年の自然免疫の研究から、獲得免疫の誘導には自然免疫の誘導が必要である。インフルエンザウイルスや全粒子不活化ワクチンはウイルス遺伝子である一本鎖 RNA を持っており、これが内因性アジュバントとなり Toll 様受容体などのパターン認識受容体をもつ自然免疫細胞を活性化させ、インフルエンザウイルスに対する獲得免疫を誘導できる。しかし、日本などで使用されている精製スプリットワクチン (HA ワクチン) は RNA が除去されているため自然免疫を活性化できず、感染歴がなくインフルエンザウイルスに対する記憶免疫を持たないヒトには獲得免疫応答を誘導できない^{4, 51)}。

SF の作用機序を検討したところ、SF は自然免疫に関与する肥満細胞を活性化、脱顆粒させることが明らかになった。*in vitro* の検討では、培養上清中にヒスタミンが検出された。肥満細胞から脱顆粒により放出されるヒスタミンは、樹状細胞に作用すると、樹状細胞の分化成熟⁵²⁾、抗原取り込みの促進⁵³⁾、未熟樹状細胞に対する細胞遊走⁵⁴⁾、MHC class II や共刺激分子の発現増強⁵⁵⁾を行う。また、T 細胞に対してはナイーブ T 細胞を Th2 型細胞へ分化させる作用^{55, 56)}をもつ。また、SF の刺激で肥満細胞から LTB₄ や PGD₂ が放出されることが確認された。これらのケミカルメディエーターは、好中球、単球、好酸球を遊走させ局所における自然免疫を活性化させる⁵⁷⁾。さらに、本研究では SF 刺激による肥満細胞でのサイトカイン遺伝子の発現も解析し、検討した TNF- α 、IL-4、CCL5 のいずれでも遺伝子発現は上昇していた。TNF- α は樹状細胞の遊走や活性化に作用し^{58, 59)}、IL-4 はマクロファージに作用し活性化および細胞内細菌能を増強させる効果がある⁶⁰⁾。一方、ケモカインである CCL5 は T 細胞の局所への遊走に関与する⁶¹⁾。以上より、

SF によって活性化された肥満細胞から産生されたケミカルメディエーターやサイトカインが自然免疫細胞やリンパ球に作用することで、アジュバント作用が発現しているものと考えられた。

SF は粘膜吸収性の低い物質であり、マウスの LD₅₀ は静脈投与により 5.40mg/kg であるのに対して、経口投与では >500mg/kg である⁶²⁾。本研究で用いた SF の最大投与量は 500 μ g/mouse であり、マウス一匹あたりの体重を約 20g として計算すると 25mg/kg に相当する。500 μ g/mouse 群と 5 μ g/mouse 群での血漿中 IgG 抗体価がほぼ同じことから、5 μ g/mouse の投与量で計算すると、経口投与時 LD₅₀ と比べて約 1/2,000 以下の投与量である。ワクチンの副反応としての IgE 抗体へのクラススイッチやそれによるアナフィラキシーショックを考慮しなければならない⁶³⁻⁶⁵⁾。SF 投与群のマウスでは血漿中の総 IgE 抗体価の顕著な上昇は見られず、CT のような粘膜アジュバントと比べて安全性の高い候補アジュバントであると考えられる。

不活化ワクチンは、アジュバントの併用により免疫応答を増強することで生体に安全且つ効果的な防御免疫を誘導する手段として感染症防御に有用であると考えられる。粘膜ワクチンとしては、ポリオウイルス、ロタウイルス、インフルエンザウイルスに対するワクチンが既に開発されているが、これらはいずれも弱毒生ワクチンである。弱毒生ワクチンは、不活化ワクチンより効率的に免疫誘導をすることがわかっているが、ワクチン株の二次感染や強毒性変異など安全面では不活化ワクチンには劣る^{66, 67)}。即ち、より安全な不活化ワクチンをいかにしてより効率的に免疫を誘導するかが今後のワクチン開発の課題である。今回、候補アジュバントとして SF を用いた研究で、自然免疫の活性化と特異抗体の産生増強を証明し、IgE 抗体産生も低値であることを動物レベルで確認した。以上

より, 安全で効果的な新規粘膜ワクチンとして SF の可能性が示された。

稿を終えるにあたり御指導, 御協力を賜りました岩手医科大学微生物学講座感染症学・免疫学分野の古澤久美女史, 八重樫寿美子女史, 高橋尚子女史に深く感謝致します。動物実験にあたりましては御指導, 御協

力賜りました岩手医科大学医歯薬総合研究所動物実験センターの技術員諸兄に深く感謝致します。

本研究の一部は学術研究助成基金助成金 [科研費: 吉野直人 (基盤研究 C, 25460597)] の援助によって行われた。

利益相反: 本論文内容に関連する著者の利益相反はない。

References

- 1) **Cantey JR**: Prevention of bacterial infections of mucosal surfaces by immune secretory IgA. *Adv Exp Med Biol* **107**, 461-470, 1978.
- 2) **Hanson LA, Ahlstedt S, Andersson B, et al.**: Mucosal immunity. *Ann N Y Acad Sci* **409**, 1-21, 1983.
- 3) **Koyama S, Coban C, Aoshi T, et al.**: Innate immune control of nucleic acid-based vaccine immunogenicity. *Expert Rev Vaccines* **8**, 1099-1107, 2009.
- 4) **Koyama S, Aoshi T, Tanimoto T, et al.**: Plasmacytoid dendritic cells delineate immunogenicity of influenza vaccine subtypes. *Sci Transl Med* **2**, 25ra24, 2010.
- 5) **Glenny AT, Pope CG, Waddington H, et al.**: The antigenic value of toxoid precipitated by postassium-alum. *J Path Bacteriol* **29**, 38-45, 1926.
- 6) **Clements CJ and Griffiths E**: The global impact of vaccines containing aluminium adjuvants. *Vaccine* **20**, S24-33, 2002.
- 7) **Keith LS, Jones DE and Chou CH**: Aluminum toxicokinetics regarding infant diet and vaccinations. *Vaccine* **20**, S13-7, 2002.
- 8) **Hagiwara Y, Kawamura YI, Kataoka K, et al.**: A second generation of double mutant cholera toxin adjuvants: enhanced immunity without intracellular trafficking. *J Immunol* **177**, 3045-3054, 2006.
- 9) **Fukuyama Y, Tokuhara D, Kataoka K, et al.**: Novel vaccine development strategies for inducing mucosal immunity. *Expert Rev Vaccines* **11**, 367-379, 2012.
- 10) **Gupta RK, Rost BE, Relyveld E, et al.**: Adjuvant properties of aluminum and calcium compounds. *Pharm Biotechnol* **6**, 229-248, 1995.
- 11) **HogenEsch H**: Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminum adjuvants. *Vaccine* **31**, 34-39, 2002.
- 12) **Kenny RT and Cross AS**: Adjuvants for the future. In "New Generation Vaccines 4th ed", ed by Levine MM, pp. 250-262, Informa Healthcare, New York, 2010.
- 13) **Alpar HO, Bowen JC and Brown MRW**: Effectiveness of liposomes as adjuvants of orally and nasally administered tetanus toxoid. *Int J Pharm* **88**, 335-344, 1992.
- 14) **Elson CO and Ealding W**: Generalized systemic and mucosal immunity in mice after mucosal stimulation with cholera toxin. *J Immunol* **132**, 2736-2741, 1984.
- 15) **Clements JD, Hartzog NM and Lyon FL**: Adjuvant activity of Escherichia coli heat-labile enterotoxin and effect on the induction of oral tolerance in mice to unrelated protein antigens. *Vaccine* **6**, 269-277, 1988.
- 16) **Yamamoto S, Kiyono H, Yamamoto M, et al.**: A nontoxic mutant of cholera toxin elicits Th2-type responses for enhanced mucosal immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 5267-5272, 1997.
- 17) **Yoshino N, Lü FXS, Fujihashi K, et al.**: A novel adjuvant for mucosal immunity to HIV-1 gp120 in non-human primates. *J Immunol* **173**, 6850-6857, 2004.
- 18) **Mutsch M, Zhou W, Rhodes P, et al.**: Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland. *N Engl J Med* **350**, 896-903, 2004.
- 19) **McLachlan JB, Hart JP, Pizzo SV, et al.**: Mast cell-derived tumor necrosis factor induces hypertrophy of draining lymph nodes during infection. *Nat Immunol* **4**, 1199-1205, 2003.
- 20) **Jawdat DM, Rowden G and Marshall JS**: Mast cells have a pivotal role in TNF-independent lymph node hypertrophy and the mobilization of Langerhans cells in response to bacterial peptidoglycan. *J Immunol* **177**, 1755-1762, 2006.

- 21) **McLachlan JB, Shelburne CP, Hart JP, et al.**: Mast cell activators: a new class of highly effective vaccine adjuvants. *Nat Med* **14**, 536-541, 2008.
- 22) **McGowen AL, Hale LP, Shelburne CP, et al.**: The mast cell activator compound 48/80 is safe and effective when used as an adjuvant for intradermal immunization with Bacillus anthracis protective antigen. *Vaccine* **27**, 3544-3552, 2009.
- 23) **Shelburne CP, Nakano H, St John AL, et al.**: Mast cells augment adaptive immunity by orchestrating dendritic cell trafficking through infected tissues. *Cell Host Microbe* **6**, 331-342, 2009.
- 24) **Martín-Fontecha A, Sebastiani S, Höpken UE, et al.**: Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. *J Exp Med* **198**, 615-621, 2003.
- 25) **Jawdat DM, Albert EJ, Rowden G, et al.**: IgE-mediated mast cell activation induces Langerhans cell migration *in vivo*. *J Immunol* **173**, 5275-5282, 2004.
- 26) **Akira S**: Innate immunity and adjuvants. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **366**, 2748-2755, 2011.
- 27) **Stansly PG, Shepherd RG and White HJ**: Polymyxin: a new chemotherapeutic agent. *Bull Johns Hopkins Hosp* **81**, 43-54, 1947.
- 28) **Bushby SRM and Green AF**: The release of histamine by polymyxin B and polymyxin E. *Br J Pharmacol Chemother* **10**, 215-219, 1995.
- 29) **Voitenko S, Bayramashvili DI, Zebrev AI, et al.**: Relationship between structure and histamine releasing action of polymyxin B and its analogues. *Agents Actions* **30**, 153-156, 1990.
- 30) **Yoshino N, Endo M, Kanno H, et al.**: Polymyxins as novel and safe mucosal adjuvants to induce humoral immune responses in mice. *PLoS One* **8**, e61643, 2013.
- 31) **Kakimura A, Hori M, Isono M, et al.**: Determination of amino acid sequence in surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by Bacillus subtilis. *Agr Biol Chem* **33**, 971-972, 1969.
- 32) **Arima K, Kakinuma A and Tamura G**: Surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by Bacillus subtilis: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem Biophys Res Commun* **31**, 488-494, 1968.
- 33) **Takahashi T, Ohno O, Ikeda Y, et al.**: Inhibition of lipopolysaccharide activity by a bacterial cyclic lipopeptide surfactin. *J Antibiot* **59**, 35-43, 2006.
- 34) **Yoneda T, Tsuzuki T, Ogata E, et al.**: Surfactin sodium salt: an excellent bio-surfactant for cosmetics. *J Cosmet Sci* **52**, 153-154, 2001.
- 35) **Kameda Y, Oira S, Matsui K, et al.**: Antitumor activity of Bacillus natto. V. Isolation and characterization of surfactin in the culture medium of Bacillus natto KMD 2311. *Chem Pharm Bull* **22**, 938-944, 1974.
- 36) **Han Y, Hung X, Cao M, et al.**: Micellization of surfactin and its effect on the aggregate conformation of amyloid β (1-40). *J Phys Chem B* **112**, 15195-15201, 2008.
- 37) **Hagiwara Y, Kawamura YI, Kataoka K, et al.**: A second generation of double mutant cholera toxin adjuvants: enhanced immunity without intracellular trafficking. *J Immunol* **177**, 3045-3054, 2006.
- 38) **Yoshino N, Fujihashi K, Hagiwara Y, et al.**: Co-administration of cholera toxin and apple polyphenol extract as a novel and safe mucosal adjuvant strategy. *Vaccine* **27**, 4808-4817, 2009.
- 39) **Yoshino N, Kanno H, Takahashi K, et al.**: Mucosal immune responses in W/W^v and Sl/Sld mutant mice. *Exp Anim* **61**, 407-416, 2012.
- 40) **Wu HY and Russell MW**: Induction of mucosal immunity by intranasal application of a streptococcal surface protein antigen with the cholera toxin B subunit. *Infect Immun* **61**, 314-322, 1993.
- 41) **Tamura S, Miyata K, Matsuo K, et al.**: Acceleration of influenza virus clearance by Th1 cells in the nasal site of mice immunized intranasally with adjuvant-combined recombinant nucleoprotein. *J Immunol* **156**, 3892-3900, 1996.
- 42) **Moldoveanu Z and Fujihashi K**: Collection and processing of external secretions and tissues of mouse origin. In: "Mucosal Immunology 3rd ed" ed by Mestecky J, et al., pp. 1841-1852, Academic Press, San Diego, 2005.
- 43) **Galli SJ, Dvorak AM, Marcum JA, et al.**: Mast cell clones: a model for the analysis of cellular maturation. *J Cell Biol* **95**, 435-444, 1982.
- 44) **Kawamoto S, Kaneoke M, Ohkouchi K, et al.**: Sake lees fermented with lactic acid bacteria prevents allergic rhinitis-like symptoms and IgE-mediated basophil degranulation. *Biosci Biotechnol Biochem* **75**, 140-144, 2011.
- 45) **Overberbergh L, Giulietti A, Valckx D, et al.**: The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression.

- J Biomol Tech **14**, 33-43, 2003.
- 46) **Liu J** and **Ma C**: Interferon regulatory factor 8 regulates RANTES gene transcription in cooperation with interferon regulatory factor-1, NF- κ B, and PU.1. *J Biol Chem* **281**, 19188-19195, 2006.
- 47) **Kweon MN, Yamamoto M, Watanabe F, et al.**: A nontoxic chimeric enterotoxin adjuvant induces protective immunity in both mucosal and systemic compartments with reduced IgE antibodies. *J Infect Dis* **186**, 1261-1269, 2002.
- 48) **Meckelein B, Externest D, Schmidt MA, et al.**: Contribution of serum immunoglobulin transudate to the antibody immune status of murine intestinal secretions: influence of different sampling procedures. *Clin Diagn Lab Immunol* **10**, 831-834, 2003.
- 49) **Brandtzaeg P**: Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. *Vaccine* **25**, 5467-5484, 2007.
- 50) **Holmgren J** and **Czerkinsky C**: Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med* **11**, 45-53, 2005.
- 51) **Koyama S, Ishii KJ, Kumar H, et al.**: Differential role of TLR- and RLR-signaling in the immune responses to influenza A virus infection and vaccination. *J Immunol* **179**, 4711-4720, 2007.
- 52) **Szeberényi JB, Pállinger E, Zsinkó M, et al.**: Inhibition of effects of endogenously synthesized histamine disturbs in vitro human dendritic cell differentiation. *Immunol Lett* **76**, 175-182, 2001.
- 53) **Amaral MM, Davio C, Ceballos A, et al.**: Histamine improves antigen uptake and cross-presentation by dendritic cells. *J Immunol* **179**, 3425-3433, 2007.
- 54) **Gutzmer R, Diestel C, Mommert S, et al.**: Histamine H4 receptor stimulation suppresses IL-12p70 production and mediates chemotaxis in human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* **174**, 5224-5232, 2005.
- 55) **Caron G, Delneste Y, Roelandts E, et al.**: Histamine polarizes human dendritic cells into Th2 cell-promoting effector dendritic cells. *J Immunol* **167**, 3682-3686, 2001.
- 56) **Dunford PJ, O'Donnell N, Riley JP, et al.**: The histamine H4 receptor mediates allergic airway inflammation by regulating the activation of CD4+ T cells. *J Immunol* **176**, 7062-7070, 2006.
- 57) **Luster AD** and **Tager AM**: T-cell trafficking in asthma: Lipid mediators grease the way. *Nat Immunol* **4**, 711-724, 2004.
- 58) **Steinman RM** and **Inaba K**: Myeloid dendritic cells. *J Leukoc Biol* **66**, 205-208, 1999.
- 59) **Cumberbatch M, Dearman RJ, Griffiths CE, et al.**: Langerhans cell migration. *Clin Exp Dermatol* **25**, 413-418, 2000.
- 60) **Ketavarapu JM, Rodriguez AR, Yu JJ, et al.**: Mast cells inhibit intramacrophage *Francisella tularensis* replication via contact and secreted products including IL-4. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 9313-9318, 2008.
- 61) **Orinska Z, Bulanova E, Budagian V, et al.**: TLR3-induced activation of mast cells modulates CD8+ T-cell recruitment. *Blood* **106**, 978-987, 2005.
- 62) **Hwang YH, Kim MS, Song IB, et al.**: Subacute (28 day) toxicity of surfactin C, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, in rats. *J Health Sci* **55**, 351-355, 2009.
- 63) **Kelso JM, Jones RT** and **Yunginger JW**: Anaphylaxis to measles, mumps, and rubella vaccine mediated by IgE to gelatin. *J Allergy Clin Immunol* **91**, 867-872, 1993.
- 64) **Sakaguchi M, Ogura H** and **Inouye S**: IgE antibody to gelatin in children with immediate-type reactions to measles and mumps vaccines. *J Allergy Clin Immunol* **96**, 563-565, 1995.
- 65) **Kumagai T, Yamanaka T, Wataya Y, et al.**: Gelatin-specific humoral and cellular immune responses in children with immediate- and nonimmediate-type reactions to live measles, mumps, rubella, and varicella vaccines. *J Allergy Clin Immunol* **100**, 130-134, 1997.
- 66) **Fine PE** and **Carneiro IA**: Transmissibility and persistence of oral polio vaccine viruses: implications for the global poliomyelitis eradication initiative. *Am J Epidemiol* **150**, 1001-1021, 1999.
- 67) **Gundlach BR, Lewis MG, Sopper S, et al.**: Evidence for recombination of live, attenuated immunodeficiency virus vaccine with challenge virus to a more virulent strain. *J Virol* **74**, 3537-3542, 2000.

Study of a new mucosal vaccine based on surfactin as an adjuvan

Ryosuke TAKESHITA¹⁾, Naoto YOSHINO²⁾,
Yutaka SASAKI²⁾, Naomi MATSUKAWA²⁾, Masahiro KAGABU¹⁾,
Shigehiro SATO²⁾ and Toru SUGIYAMA¹⁾

¹⁾ Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine,
Iwate Medical University, Morioka, Japan

²⁾ Division of Infectious Diseases and Immunology, Department of Microbiology,
School of Medicine, Iwate Medical University, Yahaba Japan

(Received on August 6, 2013 & Accepted on December 5, 2013)

Abstract

Most infectious agents enter their hosts via mucosal surfaces. Although immunoprophylaxis by the mucosal route is an important approach for controlling mucosally transmitted infections, an effective adjuvant is required to induce protective immunity against pathogens in mucosal tissues. Polymyxin, a biosurfactant isolated from *Bacillus polymyxa*, has mucosal adjuvanticity that is dependent upon mast cell activation. We demonstrated the adjuvanticity of surfactin (SF), a potent surfactant isolated from *Bacillus subtilis*, which has an amphiphilic structure resembling polymyxin. Intranasal immunization of mice with

ovalbumin (OVA) in combination with varying doses of SF resulted in increased levels of OVA-specific antibodies (Abs) in mucosal secretions and plasma samples, as well as in the Ab-forming cells of mucosal and systemic tissues. Moreover, the release of β -hexosaminidase and chemical mediators in mast cell culture supernatants in response to SF was detected. Expression levels of cytokine mRNAs (TNF- α , IL-4, and CCL5) were also significantly increased by SF stimulation. These findings suggest that SF could be employed as a novel mucosal adjuvant to induce a humoral immune response.
