



Title	粒子状キャリアーによる粘膜面での抗原動態制御と粘膜ワクチン効果の連関評価
Author(s)	國澤, 純
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3184258
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

**粒子状キャリアーによる粘膜面での抗原動態制御と
粘膜ワクチン効果の連関評価**

2001年

國澤 純

**粒子状キャリアーによる粘膜面での抗原動態制御と
粘膜ワクチン効果の連関評価**

2001 年

國澤 純

略語一覽

AP	Alkaline Phosphatase
AdMMS	Adhesive Micromatrix System
BALT	Bronchus-Associated Lymphoreticular Tissue
BSS	Balanced Salt Solution
CCD	Charge-Coupled Device
CIITA	Class II Transactivator
CMIS	Common Mucosal Immune System
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte
DDS	Drug Delivery System
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ELISPOT	Enzyme-Linked Immunospot
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
GALT	Gut-Associated Lymphoreticular Tissue
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEL	Hen Egg Lysozyme
HRP	Horseradish Peroxidase
IL	Interleukin
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunoglobulin
LPS	Lipopolysaccharide
MHC	Major Histocompatibility Complex
NALT	Nasopharyngeal-Associated Lymphoreticular Tissue
OVA	Egg White Ovalbumin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
RNA	Ribonucleic Acid
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
TMBZ	3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine
UEA-1	Ulex Europaeus Agglutinin-1
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid

目次

緒論	1
本論	
第一章 新規経鼻ワクチンキャリアーとしての膜融合リポソームの機能評価	4
第一節 膜融合リポソームによる鼻腔組織への抗原送達に関する検討	6
第二節 膜融合リポソームが上皮細胞の抗原提示に与える影響	12
第三節 膜融合リポソームにより誘導される抗原特異的免疫応答の評価	20
第四節 小括	29
第二章 ポリ乳酸マイクロスフェアによる消化管免疫誘導におけるパイエル板の役割	31
第一節 抗原特異的免疫誘導に与えるパイエル板欠損の影響	32
第二節 抗原の形態変化による免疫応答制御	37
第三節 小括	40
第三章 新規粘膜ワクチンキャリアーとしての Adhesive Micromatrix System (AdMMS) の設計と機能評価	42
第一節 AdMMS の作製と製剤特性評価	43
第二節 AdMMS による抗原特異的抗体産生誘導の評価	47
第三節 小括	48
総括	50
結論	52
謝辞	53
参考文献	54

緒論

20 世紀に発達した産業は世界のボーダレス化を推進し、21 世紀を迎えた現在、各国間の垣根はますます低くなっている。このボーダレス化した世界では、ヒト、動物、植物などの交流が常に行われている。これは各種疾病を引き起こす病原体についても同様で、様々な物流に伴い病原体も国境を越え移動してきている。この病原体の流布は感染症を世界的規模で再び起こしつつある(1-3)。過去 20 年間に振り返ってみても、HIV 感染症 (AIDS) の世界的大流行が起こったのを始め、結核、コレラ、肺炎など制圧できたと考えられていた疾患が再び世界中で流行し始めた。WHO も感染症が世界的驚異であるという強い認識の下に、1997 年に “Emerging Infectious Diseases : Global Alert、Global Response” と題する文書を発表し、その中で AIDS などの新興感染症を “かつては知られていなかったか、あるいは新しく認識された感染症で、局地的に、または国際的に公衆衛生上問題となる感染症”、そして再興感染症を “既知の感染症ですでに公衆衛生上問題とならない程度まで患者数が減少していた感染症のうち、再び流行し始め患者数が増加したもの” と定義しそれぞれに対する対策が重要課題であるとまとめた。また 2000 年に行われた沖縄サミットにおいても感染症の対策が重要項目であると宣言され、感染症に対する再認識が高まったことは記憶にあたらしい。

一方、20 世紀後半に行われてきた感染症との戦いを紐解いてみると抗生物質や化学療法主体の歴史であったといっても過言ではない。ペニシリンの発見に端を発する数多くの抗生物質の発見は感染症、特に細菌性感染症の治療に革命的手段を提供した(4)。かつて猛威をふるったほとんどの急性感染症が少なくとも先進国においては激減した。慢性感染症でも例えば結核などは、抗生物質が大きな治療効果をもたらした患者数は著しく激減した。一方、ウイルス性感染症に対してもノイラミニダーゼ阻害薬を用いたインフルエンザ治療、逆転写酵素阻害剤 2 種とプロテアーゼ阻害剤 1 種を組み合わせた多剤併用療法 (Highly Active Anti-Retroviral Therapy : HAART) によるエイズ治療など多くの治療薬が開発されている(5)。しかしながらこれらは全て対処療法、すなわち感染後の対

処・対策を講じたものであり、感染そのものを防ぐことはできない。また耐性株の出現や根本的治療に至らない場合があるなどの問題点が報告されており、既存の薬物治療にならぶ治療・予防法の開発が必要とされている(6, 7)。

このような背景のもと、抗生物質などの陰に隠れていたワクチンに対する再認識が高まってきた(8)。周知のようにワクチンとは 1786 年に Jenner が James Phipps に種痘を施行したのがはじまりであり、それから 100 年たった 1885 年に Pasteur が狂犬病ワクチンを開発し“ワクチン”という呼称が使用されるようになった。さらに 100 年以上たった現在においては数多くのワクチンが開発され実用化されている。現在、臨床応用されているワクチンを眺めてみるとポリオ生ワクチンの経口免疫を除き、その全ては注射による免疫法である。

一方、我々の生体内を観察してみると、外界と接しているのは皮膚ならびに呼吸器、消化管、泌尿器といった粘膜面である。特に粘膜面は食べる、飲む、吸う、性交渉という生命の維持に必要な生理的・生殖行為を介して病原体の侵入という危険に曝されている。これらの病原体に対し生体は粘膜面に粘液層などの物理的バリアーに加え、粘膜免疫システムと呼ばれる精密な免疫システムを備えることで第一線の防御機構を構築している(9, 10)。感染症に対するワクチン開発を考慮した際、侵入門戸である粘膜面に抗原特異的免疫応答を誘導しようという考えはきわめて理にかなったものであろう。しかしながら上述の注射による現行のワクチンでは第一線の防御バリアーである粘膜系免疫システムに抗原特異的免疫応答を誘導することはできない。そこで経口、経鼻免疫といった粘膜を介した免疫方法、すなわち“粘膜ワクチン”の開発が必要となってくる。Figure 1 に示すように、粘膜ワクチンは現行のワクチンに比べ多くの特色を有している(11, 12)。なかでも特筆すべきは粘膜を介し免疫することで、投与部位の粘膜面のみならず遠隔の粘膜面、さらには全身に存在する免疫組織にも抗原特異的免疫応答が誘導できる、すなわち生体内に粘膜系免疫システムと全身系免疫システムによる二段構えの防御機構が構築できるということであろう。この次世代型ワクチンとしての粘膜ワクチンの期待を裏付けるかのように最近の WHO 主導の“The Children’s Vaccine Initiative”に関連する報告によれば現行の注射によるワクチンから、経口、経鼻に代表される粘膜ワクチンへの移行

が強く示唆されている(13)。このように期待されている粘膜ワクチンであるが実用化にあたっては様々な問題が挙げられている。そのなかでも最たるものは抗原の生体内取り込み効率の低さと抗原の分解である。通常、小腸や鼻腔といった粘膜組織は外界から侵入してくる危険な異物を生体内に取り込まないように粘液層やリソソームなどによる何重もの物理的排除機構を備えているため(14)、抗原を単独で投与してもほとんど全て排除されてしまう。また消化組織である小腸においては、分解酵素や界面活性作用が非常に強いためせっかく投与した抗原もすぐに分解されてしまう。特に近年の遺伝子技術、タンパク工学の発展に伴い開発・実用化されつつあるサブユニットワクチンやペプチドワクチンなど緻密にワクチン設計されている抗原においては(15, 16)、働き得る形態で目的部位に送達されなければ意味をなさない。そこで現在、効果的な抗原特異的免疫応答を誘導するために抗原を目的の免疫組織へ送達する技術、すなわち粘膜ワクチンにおける Drug Delivery System (DDS) 技術の応用が期待されている(17, 18)。

そこで著者は膜融合リポソーム、ポリ乳酸マイクロスフェア、Adhesive Micromatrix System (AdMMS) という 3 種類の異なる粒子状キャリアーを用い、粘膜ワクチンにおける DDS 技術の新しい応用方法、ならびにこれら粒子ごとの粘膜面における抗原の動態特性とワクチン効果の連関を評価し、次世代における DDS を利用した粘膜ワクチンの可能性について検討し、ここに博士論文としてまとめた次第である。

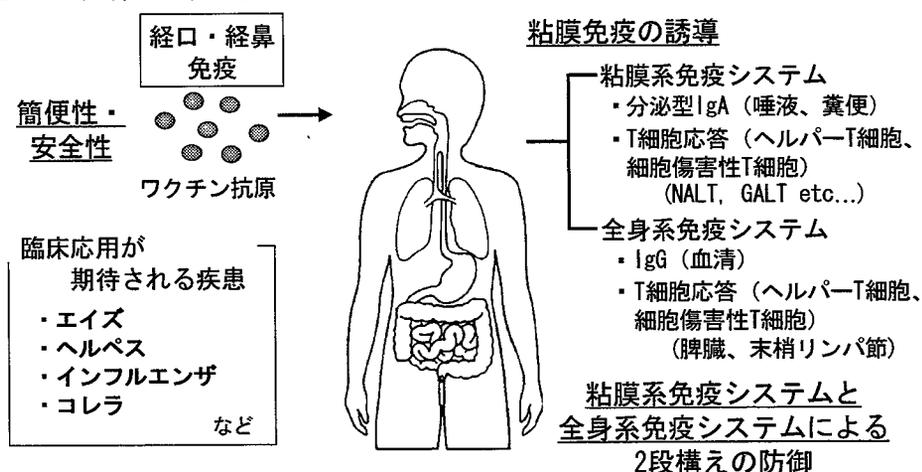


Figure 1 Application of mucosal immune system for the prevention of infectious diseases

本論

第一章 新規経鼻ワクチンキャリアーとしての膜融合リポソームの機能評価

鼻腔、気管支といった上気道はインフルエンザをはじめとする多くのウイルスの侵入門戸となっている(19)。前述のように、生体はこれら病原体に対し粘膜免疫システムという巧妙かつダイナミックな防御機構を構築することで感染症対策を講じている(9, 10)。近年、消化管関連リンパ組織（Gut-Associated Lymphoreticular Tissue : GALT）に比べ研究が立ち遅れ気味であった鼻咽頭関連リンパ組織（Nasopharyngeal-Associated Lymphoreticular Tissue : NALT）や気管支関連リンパ組織（Bronchus-Associated Lymphoreticular Tissue : BALT）に関する研究が飛躍的に進歩し、その免疫誘導組織としての機能が明らかとなるにつれ、これらのリンパ組織が上気道におけるワクチン抗原の送達標的組織として注目されるようになってきた(20-22)。

効果的な免疫誘導を行うためには、なによりもまず抗原が生体内にとりこまなければならないが、鼻腔、小腸といった粘膜組織は外界から侵入してくる危険な異物を生体内に取り込まないように何重にも及ぶ排除機構を備えているため、抗原を単独で投与してもほとんど全て排除されてしまう。すなわち効果的な抗原特異的免疫応答を誘導するためにはこれらの排除機構をくぐり抜け、抗原をNALTやBALTといった目的部位に送達するDDS技術が必要となってくる。つまりNALTやBALTに存在するリンパ組織へ適切に抗原送達し得るDDS技術が構築できれば、粘膜面における感染症予防を目指した経鼻ワクチンの可能性は大きく広がると思われる。

これまで著者はリポソームにセンダイウイルスの膜融合能を付与した膜融合リポソーム（Fusogenic Liposome）の開発に携わってきた（Figure 2）。すでに膜融合リポソームがセンダイウイルスの膜蛋白質を利用した細胞膜との融合により、細胞に傷害を与えることなく、*in vitro*ならびに*in vivo*において遺伝子や蛋白質といったリポソーム内封物を効率よく導入できることを報告している

(23-25)。また膜融合リポソームを用いることで、内封した抗原が標的細胞の細胞質中に導入され、MHC class I分子を介して抗原提示されること、さらに抗原封入膜融合リポソームを注射により免疫すると全身系免疫組織に抗原特異的抗体産生のみならず細胞傷害性T細胞（Cytotoxic T Lymphocyte : CTL）を誘導できることを示し、膜融合リポソームが全身系免疫を標的としたワクチンキャリアーとして高い機能を有していることを報告している(26, 27)。一方、膜融合リポソームの作製に用いているセンダイウイルスは本来気道粘膜に感染するウイルスであることから(28, 29)、生体内においてセンダイウイルスと同様の挙動を示すと思われる膜融合リポソームもまた粘膜面に投与すると効果的に融合し、その内封物を粘膜組織に送達できると期待される。すなわち膜融合リポソームは全身系免疫システムを標的としたワクチンキャリアーとしてのみならず粘膜系免疫システムを標的としたワクチンキャリアーとしても高い機能を有していると期待される。

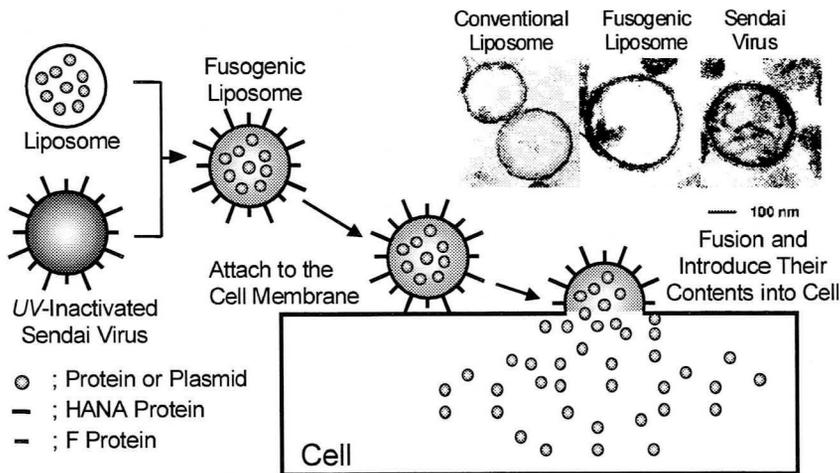


Figure 2 Novel hybrid delivery system, fusogenic liposome, for the induction of mucosal and systemic immune responses

さらにセンダイウイルスを含む多くのウイルスはリンパ球や上皮細胞に対しサイトカインの産生誘導や抗原提示に携わる分子の発現を増強するなどのいわゆるアジュバント活性を有していることが知られている(27, 30-33)。多くのセンダイウイルスの構成成分を有する膜融合リポソームにも同様の活性が期待される。

そこで本章では、膜融合リポソームによる鼻腔組織への抗原送達、センダイウイルス由来物質によるアジュバント効果、膜融合リポソームにより誘導される免疫応答という3つの観点から、膜融合リポソームの経鼻ワクチンキャリアーとしての機能評価を行った。

第一節 膜融合リポソームによる鼻腔組織への抗原送達に関する検討

鼻腔には NALT と呼ばれる鼻腔下側壁にそって前後にのびる洋梨状のリンパ組織が観察される (Figure 3 : Arrows)。そこには樹状細胞や T、B 細胞といった免疫担当細胞が存在しており、ひとつのリンパ組織として機能している(21, 22, 34)。NALT に存在する B 細胞はそのほとんどが IgA 前駆細胞であり、プラズマ細胞はわずかしか認められない。反対に鼻腔固有層 (Nasal Passage) (Figure 3 : Arrow heads) では、プラズマ細胞が多数存在しており、そのほとんどは IgA を産生している(21, 22, 35, 36)。そこには Common Mucosal Immune System (CMIS) と呼ばれる免疫帰巢経路が仲立ちする免疫誘導経路が存在する。すなわち NALT と鼻腔固有層は CMIS を介した免疫誘導組織と免疫実効組織の関係にあるとされ、それぞれ鼻腔における重要な免疫組織として機能している(21, 22)。

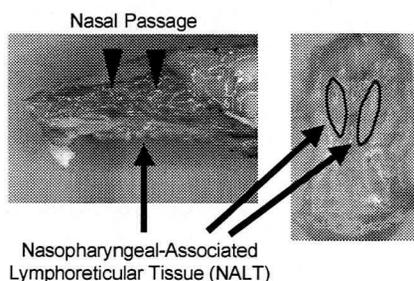


Figure 3 Histological analysis of nasal lymphoid tissue

そこで本節においては蛍光標識デキストランをマーカーに用い、FACS 法ならびに共焦点レーザー顕微鏡により、抗原封入膜融合リポソームの経鼻投与後における NALT と鼻腔固有層での抗原動態について検討を行った。

【実験材料】

BALB/c マウス(雌性、7-10 週齢)は日本チャールズリバー(Yokohama, Japan)より購入したものを実験に供した。センダイウイルス(Z strain)は中西真人先生(大阪大学微生物病研究所)から分与されたものを用いた。MODE-K 細胞は Dr. D. Kaiserlian (Institute Pasteur de Lyon) より供与していただいた。Fluorescein Isothiocyanate (FITC) 標識デキストラン (Mw 40,000) と Phycoerythrin (PE) 標識抗 Mac-1 抗体はそれぞれ Sigma (St Louis, MO) と CALTAG (Burlingame, CA) のものを用いた。ローダミン標識 M 細胞特異的レクチン(Ulex Europaeus Agglutinin-1, UEA-1)は Vector Laboratory (Burlingame, CA) より購入した。Block Ace は大日本製薬 (Osaka, Japan) のものを実験に供した。パーコールは Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ) より購入し、10 倍濃度の Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (Gibco, Gaithersburg, MD) と 9:1 で混合したものを 100%パーコールとして実験に供した。卵黄レシチン、フォスファチジン酸は日本油脂 (Tokyo, Japan) より購入した。その他のものは和光純薬 (Osaka, Japan) の特級、もしくはそれに準ずるものを用いた。

【実験方法】

FITC 標識デキストラン封入膜融合リポソームの調製

リポソームは Bangham らの方法を一部改変して作製した(37)。卵黄レシチン: コレステロール: フォスファチジン酸をモル比で 4:5:1 で混合した脂質 (7.5 mg) を塩化メチレンとジエチルエーテルの混合溶媒 (56:44) 1 ml に懸濁し、ロータリーエバポレーターにて薄膜を形成させた。内水相として FITC 標識デキストラン (50 mg/ml) を 200 μ l 加え、ボルテックスミキサーにて多重膜リポソームを作製した。リポソーム調製液を液体窒素にて 4 回凍結融解を繰り返すことで一枚膜リポソームを得た。ポリカーボネート製フィルター (0.4 μ m) を用い、Extruder によりリポソーム粒子径をそろえた後、遠心操作 (20,000 rpm, 4°C, 30 分) を行うことでリポソームを回収した。これらのリポソームと紫外線照射することでウイルス RNA を断片化したセンダイウイルスを混合し、37°Cにて 2

時間振盪することにより反応させた。反応液をステップシヨ糖密度勾配（50、30、12%）上に重層し、遠心操作（24,000 rpm、4°C、2 時間）することで膜融合リポソームの精製を行った。12%と 30%の間に存在する膜融合リポソームを回収し、Balanced Salt Solution（BSS）にて洗浄（20,000 rpm、4°C、30 分間）した後、BSS に再懸濁したものを膜融合リポソームとして用いた。

鼻腔組織からの単核球、上皮細胞の回収(38, 39)

安楽死させたマウスより口蓋を回収し、鼻腔側のリンパ組織（NALT）からステンレスメッシュを用い単細胞にすることで単核球を得た。口蓋を除去した頭部を縦割し、スパーテルを用い鼻腔固有層から単核球を回収した。回収した単核球をパーコール密度勾配（25、40%）の上に重層し、遠心操作（2,000 rpm、20°C、20 分間）を行った。25%と 40%の間に存在する細胞を回収し、上皮細胞として用いた。

膜融合リポソーム内封物の経鼻投与後の動態評価

Phosphate Buffered Saline（PBS）に溶解した FITC 標識デキストラン、リポソームもしくは膜融合リポソームに封入した FITC 標識デキストラン（5 mg/ml）をマウス鼻腔内に 10 μ l 投与した。1 時間後、NALT ならびに鼻腔固有層から上皮細胞、単核球を回収し、各細胞中の FITC による蛍光を FACScan Flow Cytometer（Becton Dickinson、Mansfield、Mass）を用い測定した。また Mac-1 陽性細胞は PE 標識した抗 Mac-1 抗体を用い同定した。

膜融合リポソームによる MODE-K 細胞への抗原送達評価

5 x 10⁴ cells の MODE-K 細胞をチャンバースライドに播種し一晩培養した。培養上清を取り除いた後、100 μ g/ml に相当する FITC 標識デキストランを加え、37°C で 1 時間共培養した。2% FCS 含有 PBS で 3 回洗浄した後、共焦点レーザー顕微鏡（Bio-rad、Hercules、CA）で観察した。

免疫組織学染色による M 細胞の同定

FITC 標識デキストラン封入膜融合リポソームを投与した1時間後に口蓋を回収した。4%パラホルムアルデヒドで固定（4℃、4 時間）した後、Milli Q で 2 倍希釈した Block Ace でブロッキング（室温、1 時間）した。この試料を 20 µg/ml になるように PBS で希釈したローダミン標識 UEA-1 で染色（室温、2 時間）した後、PBS で洗浄し共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

【結果および考察】

膜融合リポソームの経鼻ワクチンキャリアーとしての機能を評価するために、FITC 標識デキストランを封入した膜融合リポソームを作製し、経鼻投与した後の動態を FACS 法にて解析した。Figure 4 に示されるように膜融合リポソームを用いて FITC 標識デキストランを投与した群では NALT ならびに鼻腔固有層の上皮細胞、Mac-1 陽性の細胞に強い蛍光が確認された（Figure 4 : red line）。またこれらの蛍光強度はコントロール群である通常のリポソームを用いた群や FITC 標識デキストラン単独投与群に比べ非常に高いものであったことから、膜融合リポソームは鼻腔組織への高い抗原送達能を有していることが示された。前述のように膜融合リポソームはセンダイウイルスの融合機構を利用し、細胞に直接結合、融合することができる。またセンダイウイルスは本来、気道粘膜上皮細胞に感染するウイルスであることから、粘膜上皮細胞に対しても高い結合、融合活性を有していると期待される。これらを確認するために FITC 標識デキストラン封入膜融合リポソームを粘膜上皮細胞である MODE-K 細胞に作用させ共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、MODE-K 細胞内に強い蛍光が確認された（Figure 5C）。一方、FITC 標識デキストラン単独処理群では全く蛍光は検出されず、通常のリポソームを用いた群ではエンドサイトーシスを介して取り込まれたと思われる若干の蛍光が確認されたのみであった（Figures 5A and B）。これらの結果は Figure 4 に示した *in vivo* での結果と関連したものであると考えられ、膜融合リポソームの融合活性が高い抗原送達能に反映していると推測された。

さてNALTの上皮細胞層にはM (microfold) 細胞と呼ばれる特殊に分化した細胞が存在する。Figure 6にM細胞の電子顕微鏡像ならびに特徴を示した。M細胞は隣接する上皮細胞と比較すると絨毛を欠き、抗原補足能が高いことが知られている。また基底膜側ではポケット状に陥没した状態になっており、そこにはマクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞やリンパ球が集積している(40-42)。すなわちM細胞はNALTの抗原提示細胞へ効果的に抗原送達する機能を有していると考えられており、粘膜ワクチンにおける重要な標的細胞のひとつである。そこで次に膜融合リポソームのM細胞への抗原送達について解析を行った。

M細胞は様々なレクチンや細胞表面に存在するレクチン様蛋白質などに対するレセプターとして機能するglycoconjugateを有しており、それぞれM細胞のマーカーとして使用されている(43, 44)。本検討では最も汎用されているUEA-1を用いM細胞を同定した。膜融合リポソームを用いFITC標識デキストランを経鼻投与したマウスからNALTを回収し、ローダミン標識UEA-1でwhole mount染色したところ、赤色蛍光陽性のM細胞にFITC標識デキストランによる緑色蛍光が観察されM細胞に抗原送達されていることが示された (Figure 7)。また緑色蛍光単陽性の細胞も検出されたことからM細胞に隣接する通常の上皮細胞にも抗原送達されていることが示唆された。

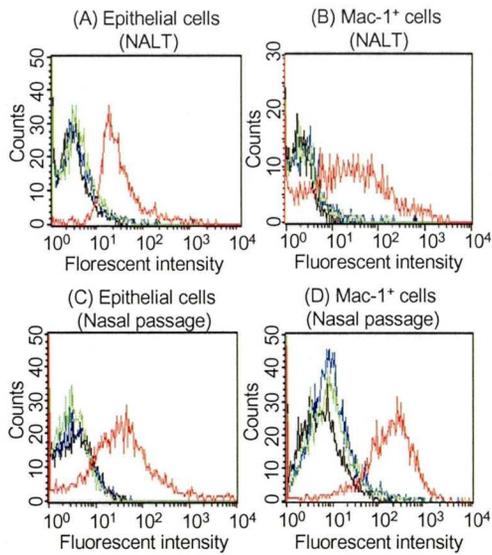


Figure 4 *In vivo* antigen distribution following nasal immunization with fusogenic liposomes. One hour after nasal administration with FITC-fusogenic liposomes (red), FITC-liposomes (green), FITC-alone (blue) or none (black), epithelial cells (A) and Mac-1⁺ cells (B) of nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissue (NALT) and epithelial cells (C) and Mac-1⁺ cells (D) of nasal passage were isolated. Fluorescent intensity was detected using a FACScan flow cytometer.

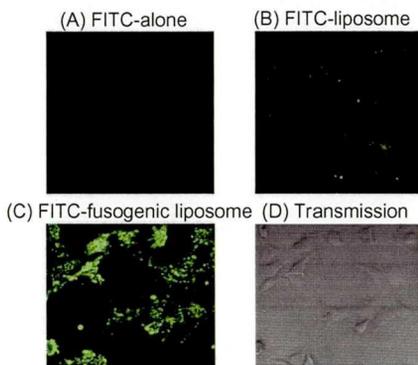
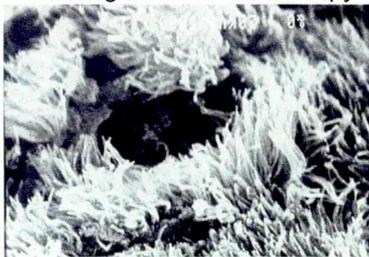


Figure 5 Analysis of antigen uptake by epithelial cells *in vitro*. MODE-K cells were cultured with FITC-alone (A), FITC-liposomes (B) or FITC-fusogenic liposomes (C). After 1 hr, cells were washed and observed by confocal microscopy. The same sample was observed by transmission microscopy (D).

Scanning electron microscopy



Characteristics

- Exist at epithelial cell layer of Peyer's patches and NALT
- High endocytosis/phagocytosis activity
- Lack of apical brush border microvilli and mucus layer
- Specific glycosylation pattern (stained with some kinds of lectin)
- Lack of disassimilative enzymes

Figure 6 Characteristics and scanning electron microphotograph of M cell

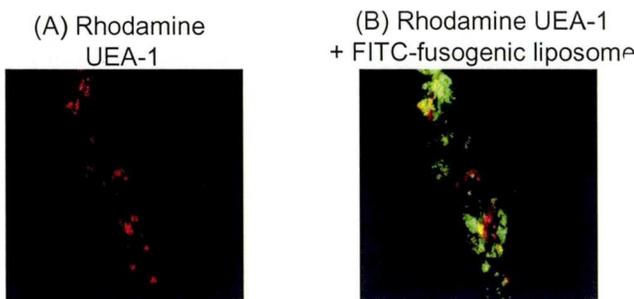


Figure 7 Whole mount staining of nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissue (NALT) from mice nasally administered with FITC-fusogenic liposomes using rhodamine-labeled UEA-1. Findings from three independent experiments were similar.

以上の結果より膜融合リポソームは NALT に存在する M 細胞への高い抗原送達能を有していることが示された。また前述のように M 細胞の下層にはマクロファージや樹状細胞など抗原提示細胞が多数存在していることから、Figure 4 に観察された NALT の Mac-1 陽性細胞への抗原送達はこの M 細胞を介した抗原送達がひとつの送達経路である可能性が推測された。一方、鼻腔固有層の Mac-1 陽性細胞への抗原送達経路は現在までのところ明らかではないが、小腸においても同様に小腸固有層中の抗原提示細胞が管腔内に存在する抗原を取り込んでいることが報告されている(45)。最近、その取り込み経路のひとつにアポトーシスした上皮細胞を介したものと報告されたが(46)、鼻腔に関しては現在まで報告はなく今後の研究進展が期待される。

第二節 膜融合リポソームが上皮細胞の抗原提示に与える影響

前節において、膜融合リポソームは鼻腔組織の上皮細胞ならびに Mac-1 陽性細胞、NALT の M 細胞に高い効率で抗原送達できることを示した。しかし実際に免疫誘導されるためには単に抗原が送達されるだけではなく、MHC 分子を介して抗原提示される必要がある。そこで本節においては膜融合リポソームにより導入された抗原の MHC 分子を介する抗原提示について検討した。

さらに前述のように多くのウイルスは様々な細胞に対しアジュバント活性を有することが知られている(27, 30-33)。特にセンダイウイルスと同科ウイルス（パラミクソウイルス）である Human Parainfluenza Virus は粘膜上皮細胞に対し、MHC クラス II 分子の発現を増強することが報告されている(30)。この報告は同じパラミクソウイルス科に属するセンダイウイルスもしくはセンダイウイルス由来成分を多く含有する膜融合リポソームも同様のアジュバント活性を有していると期待させるものである。そこで本節においては上述の抗原提示に加え、センダイウイルスによる上皮細胞へのアジュバント活性、特に MHC クラス II 分子の発現増強についてそのメカニズムの解析を含め検討した。

【実験材料】

C3H マウス（雌性、7-10 週齢）は日本チャールズリバー（Yokohama, Japan）より購入したものを実験に供した。CTLL-2 細胞、3A9 細胞(47)はそれぞれ濱岡利之先生（大阪大学医学部バイオメディカルセンター）、Dr. P. Allen (Washington university) より供与していただいた。Hen Egg Lysozyme (HEL)、Interferon- γ (IFN- γ) はそれぞれ Appligene、Gibco (Gaithersburg, MD) のものを実験に供した。Cell Dissociation Solution とニワトリ卵白アルブミン (Egg White Ovalbumin, OVA) は Sigma (St Louis, MO) のものを、Fix and Permeabilization Kit は CALTAG (Burlingame, CA) のものを使用した。抗 CD16/32 抗体、FITC 標識 I-A^k 抗体、PE 標識抗 I-A^k 抗体は Pharmingen (San Diego, CA) より購入した。³H-Thymidine (3.00 TBq/mmol) は Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ) のものを使用した。また Trizol、Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase は Gibco (Gaithersburg, MD)、ddGTP、ddATP、ddTTP、ddCTP および各種プライマーは Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ)、Taq Polymerase Gold、Oligo dT Primer は Perkin Elmer (Norwalk, CO) よりそれぞれ購入した。それ以外は前節に準じたものを使用した。

【実験方法】

BSS 封入膜融合リポソーム、HEL 封入膜融合リポソーム、OVA 封入膜融合リポソームの調製

BSS 封入膜融合リポソーム、HEL 封入膜融合リポソーム、OVA 封入膜融合リポソームはそれぞれ内水相に BSS、HEL (20 mg/ml)、OVA (100 mg/ml) を用い作製した。その他の方法は前節の方法に準じた。

腹腔浸潤マクロファージの回収

腹腔浸潤マクロファージは C3H マウスのチオグリコレート培地誘発浸出細胞中の接着細胞分画を用いた。すなわち 3%チオグリコレート培地 (2 ml) を腹腔内投与し、4 日後に腹腔浸潤細胞を回収した。得られた細胞を FCS コートした

プラスチックディッシュに播種し、37°C、5% CO₂条件下で1時間培養した後、非接着細胞を除くことで、腹腔浸潤マクロファージを得た。

HEL 特異的抗原提示の評価

HEL 特異的抗原提示の評価は Kaiserlian らの方法に準じて行った(48)。チオグリコレート培地誘発腹腔浸潤マクロファージもしくは IFN- γ で前処理 (100 units/ml、3日間)した MODE-K 細胞をマイトマイシン C (50 μ g/ml) で 37°C、45 分間処理した。これらの細胞を 96 穴プレートに 5×10^4 cells/well で播種し 37°C で 2 時間培養した後、各種濃度に調製した HEL 封入膜融合リポソームを加えさらに 5 時間共培養した。DMEM で 3 回洗浄した後、HEL 特異的 3A9 細胞 (5×10^4 cells/well) を播種した。24 時間後、培養上清を回収し、IL-2 濃度依存的に細胞増殖する CTLL-2 細胞を加え (5×10^3 cells/well)、24 時間培養した。細胞回収 8 時間前に 1 μ Ci の ³H-Thymidine を添加し、回収した細胞の放射活性を測定することで細胞増殖を評価した。

FACS 法による上皮細胞の MHC クラス II 分子の発現評価

MODE-K 細胞を 2.5×10^5 cells/well で 12 穴プレートに播種し、5 時間培養することでプレートに接着させた。非接着細胞を取り除いた後、各サンプルを加え共培養した。48 時間後、Cell Dissociation Solution を用いて細胞を回収し、抗 CD16/32 抗体 (1 μ g/ml) で処理した後 (室温、15 分間)、PE 標識した抗 I-A^K 抗体で染色した。細胞内の標識は FITC 標識抗 I-A^K 抗体を用い Fix and Permeabilization Kit のプロトコールに従い行った。

Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

上記と同様の方法で MODE-K 細胞を各種サンプルと共培養した後、48 時間後に RNA を定法に従い回収した(39)。回収した RNA より cDNA を合成し、40 サイクルの PCR (94°C 1分、55°C 1分、72°C 1分) を行った。2-2.5% アガロースゲルを用い各 PCR 産物を電気泳動した後、エチジウムブロマイドで染色しバンドを観察した。また各種プライマーは以下に示す配列を用いた。

GAPDH : Sense、CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT
Antisense、AGCCTCCATGGTGGTGAAGAC,

Class II Transactivator (CIITA) :

Sense、CAAGTCCCTGAAGGATGTGGA
Antisense、ACGTCCATCACCCGGAGGGA,

I-A^k α Chain : Sense、TCCAGGCCTCCTAATACA
Antisense、AAGAGATTGTGAGGATCCAG

【結果ならびに考察】

抗原特異的な免疫応答が誘導されるためには、単に抗原が生体内に取り込まれるだけではなく、マクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞に取り込まれプロセッシングされた後、MHC分子を介して抗原提示される必要がある。我々は以前、膜融合リポソームにより導入された抗原がMHC class I分子を介して抗原提示されることを報告しているが(26)、MHC クラス II分子を介した抗原提示については検討していない。さらに粘膜面に存在する上皮細胞はマクロファージや樹状細胞などと同様、通常の細胞には発現されていないMHC クラス II分子を発現し、抗原提示できることが報告されている(49-51)。そこで本検討ではHELをモデル抗原として、HEL/MHC クラス II複合体を認識しIL-2を産生するハイブリドーマ(3A9)を用い、膜融合リポソームにより導入された抗原のMHC クラス II分子を介した提示を検討した。その結果、膜融合リポソームにより導入されたHELはマクロファージのMHC クラス II分子を介して抗原提示されることが示された(Figure 8)。さらに興味深いことに、これらの抗原提示はマクロファージのみならず粘膜上皮細胞であるMODE-K細胞でも観察された。またこれらの反応はHELの代わりにOVAを封入した膜融合リポソームやBSSを封入した膜融合リポソームでは認められなかったことから、膜融合リポソームによる3A9細胞の非特異的な活性化ではないことが確認された。以上の結果より、膜融合リポソームにより鼻腔上皮細胞とMac-1陽性細胞に送達された抗原はMHC class I分子のみならずMHC クラス II分子を介して抗原提示される可能性が示唆された。

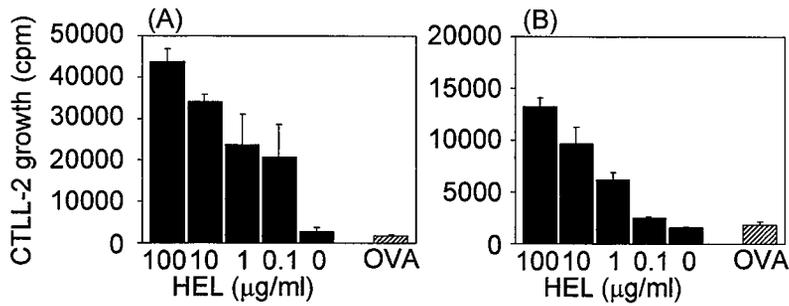


Figure 8 Fusogenic liposomes induced MHC class II-mediated antigen presentation of HEL. Macrophages (A) or IFN- γ pretreated MODE-K cells (B) were cultured with fusogenic liposomes containing HEL (closed column) or OVA (100 μ g/ml, hatched column) for 5 hr, then antigen presentation was analyzed. Values are expressed as means \pm SD of triplicate cultures.

さて粘膜を介し感染するウイルスのなかには、感染した上皮細胞の抗原提示に関わる分子 (MHC クラス I 分子、MHC クラス II 分子、ICAM-1、B7 分子など) の発現を増強するものが存在する(30-32)。特にセンダイウイルスと同じパラミクソウイルス科に属する Human Parainfluenza Virus は粘膜上皮細胞の MHC 分子の発現を増強することから(30)、センダイウイルスの構成成分をもつ膜融合リポソームも同様に粘膜上皮細胞に対するアジュバント活性を有していると推測される。そこで次に MODE-K 細胞とセンダイウイルスもしくは膜融合リポソームを共培養した際の MHC クラス II 分子の発現について検討した。その結果、センダイウイルスや膜融合リポソームと培養した MODE-K 細胞では通常ではほとんど検出されない MHC クラス II 分子の発現が増強していることが確認された (Figure 9)。またこれらの効果は通常のリポソームを用いた場合には観察されなかったことから、リポソーム構成脂質ではなくセンダイウイルス由来の物質が上皮細胞の MHC クラス II 分子の発現を増強していることが示唆された。

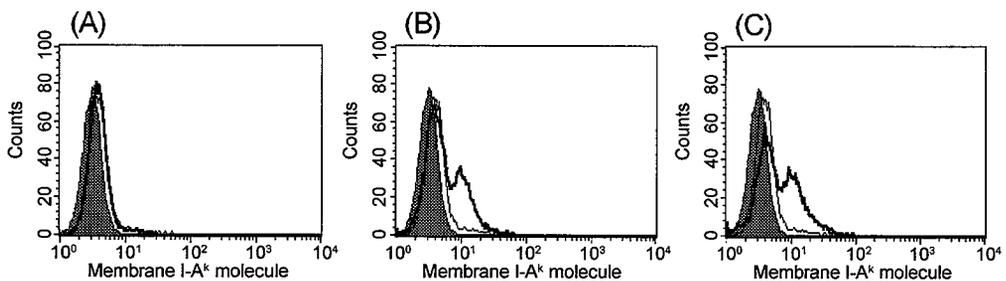


Figure 9 Fusogenic liposomes activated expression of MHC class II molecules on epithelial cells. MODE-K cells were cultured with medium (plain line), conventional liposomes (A, bold line), fusogenic liposomes (B, bold line) or Sendai virus (C, bold line). Cells were stained with anti-I-A^k antibody 48 hr later. Expression was determined using a FACScan flow cytometer. Data are representative of three separate experiments.

このように粘膜上皮細胞の MHC クラス II 分子の発現を増強するウイルス以外の分子として IFN- γ が知られている。IFN- γ は上皮細胞上の IFN- γ レセプターに結合し、Jak/STAT-1 を介し、Class II Transactivator (CIITA) 分子の発現を誘導する。この CIITA が MHC クラス II 分子の転写を活性化することで、IFN- γ は上皮細胞の MHC クラス II 分子の発現を増強する(52, 53)。そこで次にセンダイウイルスによる上皮細胞の MHC クラス II 分子の発現増強メカニズムを解明する目的で、センダイウイルスもしくは膜融合リポソームで処理した MODE-K 細胞における CIITA と MHC クラス II 分子の RNA レベルでの発現について RT-PCR 法を用いて検討した。その結果、IFN- γ で処理した MODE-K 細胞においてはこれまでの報告と同様、CIITA の発現誘導と MHC クラス II 分子の発現増強が観察された (Figure 10)。しかしながらセンダイウイルスや膜融合リポソームで刺激した MODE-K 細胞ではこれらの分子の誘導は認められなかった (Figure 10)。以上の結果よりセンダイウイルスは IFN- γ による発現増強とは異なる経路で MHC クラス II 分子の発現を増強していることが示された。前述の Human Parainfluenza Virus を用いた研究においても、CIITA^{-/-} 細胞、STAT-1^{-/-} 細胞で MHC クラス II 分子の発現が増強され、IFN- γ とは異なる経路が関与していることが示唆されていることから(30)、パラミクソウイルス属には同様の経路を介した MHC クラス II 分子の発現増強機構が存在すると推測される。しかしながら Human Parainfluenza Virus についても詳細なメカニズムについては明らかとはならず、さらに進んだ機構解明が必要である。

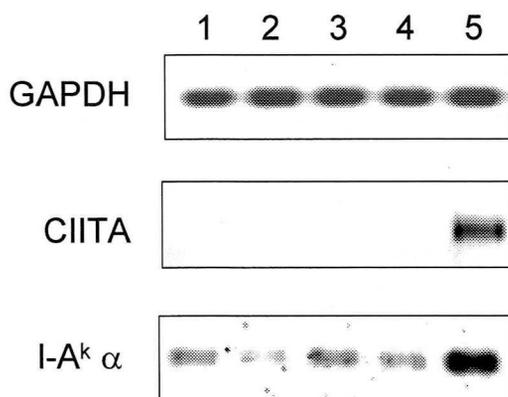


Figure 10 mRNA expression of CIITA and I-A^k in MODE-K cells. MODE-K cells were cultured with none (lane 1), conventional liposomes (lane 2), Sendai virus (lane 3), fusogenic liposomes (lane 4) or IFN- γ (lane 5) for 48 hr. Cells were harvested and RNA was prepared. RT-PCR analysis was performed using primers for GAPDH, CIITA, I-A^k α chain. Data are representative of three independent experiments.

さて MODE-K 細胞は細胞表面には MHC クラス II 分子をほとんど発現していないが、細胞内には蛋白質レベルで保持している (Figure 11)。そこで次にセンダイウイルスの刺激により、細胞内の MHC クラス II 分子が細胞表面に移動するという仮説をたて、ウイルスで刺激を加えた後の細胞内 MHC クラス II 分子の発現について検討することで、センダイウイルスによる MHC クラス II 分子の発現増強に関するさらなるメカニズムの解明を試みた。その結果、IFN- γ で刺激することで細胞表面の MHC クラス II 分子の発現が増強している MODE-K 細胞では、細胞内の MHC クラス II 分子も発現増強していることが確認された (Figure 12)。これは Figure 10 に示されるように、IFN- γ は MHC クラス II 分子を転写レベルから発現促進した結果と推測された。一方、センダイウイルスや膜融合リポソームで刺激を加えることで、細胞表面の MHC クラス II 分子の発現が増強している細胞では、細胞内の MHC クラス II 分子は逆に減少していた (Figure 12)。

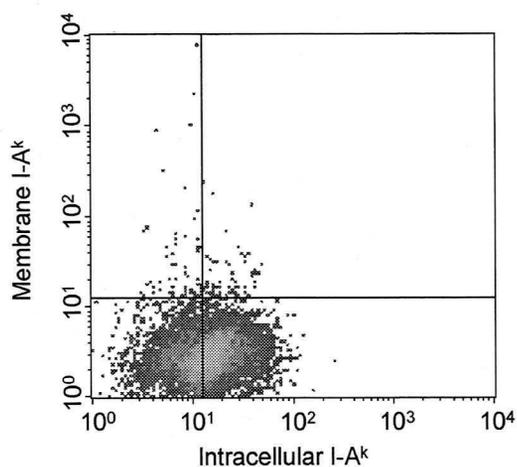


Figure 11 Membrane and intracellular expression of MHC class II molecules on MODE-K cells. Membrane and intracellular I-A^k α molecules were stained with PE- and FITC-labeled anti-I-A^k antibody, respectively. Data is a representative of three separate experiments.

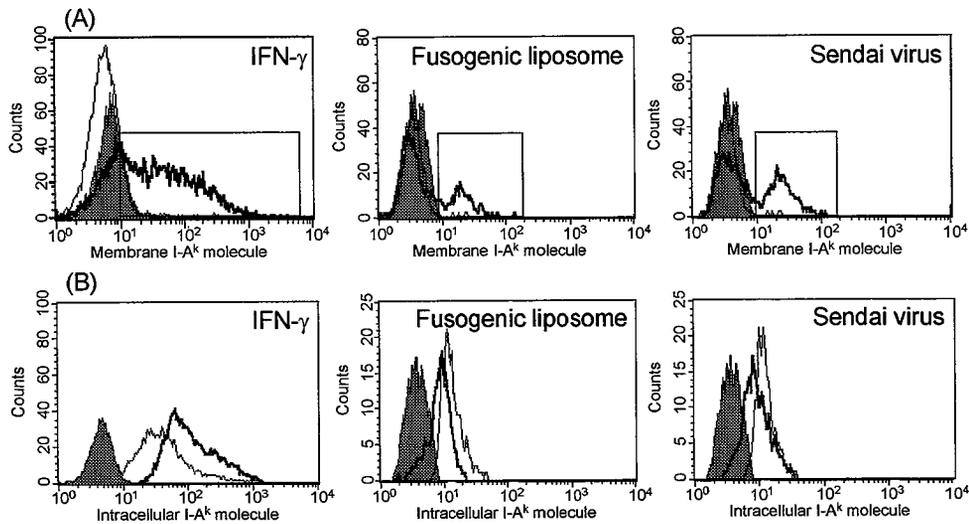


Figure 12 FACS analysis of intracellular I-A^k expression in membrane I-A^k positive MODE-K cells. Cells were cultured with IFN- γ (left), fusogenic liposomes (middle) or Sendai virus (right) for 48 hr. Membrane I-A^k molecules on MODE-K cells were stained with PE-labeled specific antibody (A). Following fixation with paraformaldehyde, intracellular I-A^k molecules were stained with FITC-labeled anti-I-A^k antibody. Intracellular expression of I-A^k molecules in membrane I-A^k positive cells (gated cells in figure 12A) were determined using a FACScan flow cytometer (B). (Shadow, control: Plain line, spontaneous expression: Bold line, sample treatment).

これらの結果より、センダイウイルス等で細胞表面の MHC クラス II 分子の発現が増強したのは、細胞内の MHC クラス II 分子が細胞表面に移動したためであると推測された。興味深いことに同様な現象は樹状細胞の成熟課程でも観察された。すなわち未熟な樹状細胞は細胞表面に MHC クラス II 分子を発現しないが、Lipopolysaccharide (LPS) などの刺激が加わり、成熟型の樹状細胞に変化すると細胞表面に MHC クラス II 分子を発現するようになる(54, 55)。この際に輸送経路を決定する重要因子は MHC クラス II 分子に結合しているインバリアント鎖の分解である(56, 57)。通常、未熟樹状細胞ではインバリアント鎖が分解されず、リソソームに輸送され分解されてしまう。しかし LPS などの刺激が加わると、インバリアント鎖の分解に働くカテプシン S の抑制物質であるシスタチン C が減少する結果、カテプシン S が活性化状態となり、インバリアント鎖の N 末に存在する細胞内輸送ドメインが分解され、MHC クラス II 分子は細胞表面に輸送されるようになる(56, 57)。上皮細胞における同一輸送促進経路の存在は不明であるが、ウイルス側の促進因子の同定も含め、ウイルスによる上皮細胞

の MHC クラス II 分子の発現増強メカニズムを解明することは、ウイルス学の進展のみならず新規粘膜ワクチンアジュバントの開発につながるものと期待される。

第三節 膜融合リポソームにより誘導される抗原特異的免疫応答の評価

前節までに膜融合リポソームは鼻腔リンパ組織の上皮細胞や Mac-1 陽性細胞、NALT の M 細胞に高い効率で抗原送達できることが示された。さらに送達された抗原は上皮細胞やマクロファージの MHC 分子を介して提示されること、ならびに膜融合リポソームは粘膜上皮細胞に対しアジュバント活性を有していることが示唆された。これらの結果は膜融合リポソームの粘膜ワクチンキャリアーとしての高い機能を示唆するものであると考えられる。そこで本節においては OVA をモデル抗原に用い、膜融合リポソームを用いた経鼻免疫で誘導されてくる抗原特異的免疫応答についてヘルパー T 細胞活性、抗体産生、CTL 活性という 3 種類の観点から検討を行った。

【実験材料】

C57BL/6 マウス（雌性、7-10 週齢）は日本チャールズリバーより購入した。EL4 は東北大学加齢医学研究所より供給していただいた。EG7 は American Type Culture Collection (ATCC) より購入したものを実験に供した。コラーゲンタイプ IV は Sigma (St Louis, MO) のものを使用した。Biotin 標識抗マウス IgG、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgA、Alkaline Phosphatase (AP) 標識抗マウス IgG、IgA、IgM 抗体は Southern Biotechnology Associate (Birmingham, AL)、Biotin 標識抗マウス IgM^a 抗体は Pharmingen (San Diego, CA)、Horseradish Peroxidase (HRP) 標識ストレプトアビジンは Gibco (Gaithersburg, MD) よりそれぞれ購入した。3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine (TMBZ) は Moss Inc. (Pasadena, CA) のものを、Na₂⁵¹CrO₄ (15.5 TBq/mg) は第一化学 (Tokyo, Japan) のものを実験に供した。その他のものは前節に準じた。

【実験方法】

OVA の経鼻免疫

マウスへの経鼻免疫は OVA 量として 5 mg/ml に調製した各サンプルを 10 μ l 投与することで行った。この免疫を 0、7、14 日目に行った。

各リンパ組織からの単核球回収

各リンパ組織からの単核球回収は最終免疫の一週間後に行った。NALT ならびに鼻腔固有層からの単核球の回収は前節の方法に準じて行った。頸部リンパ節、腸間膜リンパ節、脾臓は各組織を取り出した後、ナイロンメッシュを用い、単細胞にすることで単核球を得た。小腸固有層由来の単核球は、パイエル板を除去した小腸を切り開いた後、0.5 mM EDTA/2% FCS 含有 RPMI 1640 培地で 37°C、15 分間、2% FCS 含有 RPMI 1640 培地中で 37°C、15 分間、1 mM EDTA 入り PBS (EDTA \cdot 2NA 1.86 g/1000 ml) 中で室温、20 分間、順次上清を除き残渣を攪拌した。得られた残渣をコラーゲン処理 (1.5 mg/ml、37°C、攪拌条件下で 1 時間) することで単核球を回収した。

OVA 特異的 CD4 陽性細胞増殖反応の測定

CD4 陽性細胞は抗マウス CD4 抗体結合マグネティックビーズと MACS (Magnetic-Activated Cell Sorter) カラム (Miltenyi Biotec, Sunnyvale, CA) を用いて行った。回収した CD4 陽性細胞 (2×10^6 cells/ml) と、1 mg/ml の OVA を放射線照射 (3000 rad、26 分間) した同系マウスの脾細胞 (2×10^5 cells/ml) 存在下で 96 時間培養した。反応停止 8 時間前に 1 μ Ci の 3 H-Thymidine を加え放射活性を測定し、以下の式に準じて Stimulation Index として表示した。

Stimulation Index = (cpm in the presence of OVA/ cpm in the absence of OVA)

サイトカイン産生の測定

上記の方法で OVA と反応させた CD4 陽性細胞の培養上清を回収した。サンプル中のサイトカイン量は Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ) のサイトカイン ELISA キットを用い測定した。

血清、鼻腔洗浄液、糞便抽出物の回収

最終免疫の 1 週間後に、各サンプルを回収した。血清は眼窩より採取した血液を 3,000 rpm、20°C、15 分間遠心することで得た。鼻腔洗浄液は安楽死させたマウスの気道より鼻腔へ向け 200 μ l の PBS を流すことで得られた洗浄液を実験に用いた。糞便抽出物は 100 mg/ml になるように PBS を加え、4°C で 30 分間強撹拌した。得られた懸濁液を 14,000 rpm、4°C、15 分間遠心し、上清を回収し糞便抽出物として用いた。

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法を用いた OVA 特異的抗体産生の測定

OVA (10 μ g/ml、in 50 mM Bicarbonate Buffer) 100 μ l を ELISA プレート (NUNC) に加え、4°C で一晩放置することで固相化した。固相化液を除去した後、Milli Q で 2 倍希釈した Block Ace (250 μ l/well) でブロッキングした (室温、1 時間)。0.05% Triton X-100 含有 PBS で 4 回洗浄後、各濃度に調製したサンプルを加え、4°C で一晩放置した。これらのプレートを 0.05% Triton X-100 含有 PBS で 4 回洗浄した後、1/4000 に希釈した各 Biotin 標識抗体を加え室温で反応させた。6 時間後、プレートを洗浄し 1/2000 に希釈した HRP 標識ストレプトアビジン各プレートに加え、さらに室温で 1 時間反応させた。0.05% Triton X-100 含有 PBS で 4 回洗浄した後、100 μ l の TMBZ を加え HRP と反応させた。15 分後、50 μ l の HCl を加え反応を止め、吸光波長 450 nm、副波長 690 nm における吸光度を測定した。抗体価は非免疫マウスよりも吸光度が 0.1 以上高い最大希釈倍率を Reciprocal Log₂ Titer で表した。なおサンプル、抗体の希釈は Milli Q で 10 倍希釈した Block Ace で行った。

Enzyme-Linked Immunospot (ELISPOT) 法による OVA 特異的抗体産生細胞の測定

96 穴ニトロセルロースプレートを OVA (1 mg/ml in PBS) でコーティングした (4°C、一晩)。10% FCS 含有 RPMI 1640 培地でブロッキングした後 (37°C、5 時間)、各濃度に調整した単核球を加え、37°C で 5–6 時間培養した。0.05%

Triton X-100 含有 PBS で洗浄した後、1/1000 に希釈した各種 AP 標識抗マウス Ig 抗体を加え、4°C で一晩反応させた。これらのプレートを PBS で洗浄した後、AP 発色基質 (5% Nitroblue Tetrazolium in 70% Dimethylformamide; 66 μ l/ 5% 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphate-p-Toluidine Salt in 100% Dimethylformamide; 33 μ l/Alkaline Phosphate Buffer 10 ml) 100 μ l を加え室温で 30 分間反応させることでスポットを発色させた。洗浄、風乾後、スポット数を実体顕微鏡で測定した。

OVA 特異的 CTL 誘導の評価

各免疫マウスの脾臓、頸部リンパ節、腸間膜リンパ節より回収した単核球 (4×10^6 cells/ml) を 30 μ g/ml のマイトマイシン C で 30 分間処理することで増殖を止めた EG7 細胞 (4×10^5 cells/ml) と 5 日間共培養し、Effector 細胞として用いた。標的細胞には $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ でラベル化 (0.56 MBq/ 10^6 cells、37°C、1 時間) した EL4 細胞と EG7 細胞を用い、96 穴プレートに 10^4 cells/well の濃度で播種した。これら標的細胞に Effector 細胞を加え、4 時間培養し、上清に遊離した ^{51}Cr の放射活性を測定した。なお CTL 活性は以下に示す式に従い算出した。

$$\% \text{ Lysis} = 100 \times \frac{\{(\text{Effector 細胞による } ^{51}\text{Cr 遊離量}) - (\text{自然 } ^{51}\text{Cr 遊離量})\}}{[(\text{最大 } ^{51}\text{Cr 遊離量}) - (\text{自然 } ^{51}\text{Cr 遊離量})]}$$

RT-PCR による Perforin の発現評価

RNA 抽出ならびに cDNA の合成は前節の方法に準じて行った。Perforin のプライマーは以下の配列のものを用い(58)、30 サイクルの PCR (94°C 1 分、55°C 1 分、72°C 1 分) を行った。

Perforin: Sense、GGAATTCAGATCGGAGGATTTTAAA

Antisense、GACTACTGTGCCTGCAGCATC

【結果ならびに考察】

獲得免疫系は大別すると抗体を中心とする体液性免疫と細胞傷害性 T 細胞 (Cytotoxic T Lymphocyte; CTL) を主とする細胞性免疫に分類される。いずれのタイプの免疫誘導においても抗原提示細胞による抗原提示とそれに引き続いておこる CD4 陽性ヘルパー T 細胞による抗原認識が必要となる。前節において、CD4 陽性ヘルパー T 細胞の T 細胞レセプターリガンドとなる MHC クラス II 分子を介した抗原提示が膜融合リポソームにより導入された抗原で起こることを確認した。そこでまず抗原特異的ヘルパー T 細胞の誘導について検討した。Figure 13 に示されるように、膜融合リポソームを用いて免疫したマウスから得られた CD4 陽性細胞では OVA 依存的な増殖が確認された (Figure 13)。またこれらの増殖応答は NALT、鼻腔固有層といった投与部位のみならず、頸部リンパ節、脾臓、腸間膜リンパ節といった全身のリンパ組織で認められた。一方、コントロール群である OVA 単独免疫群や通常のリポソームを用いて免疫した群ではわずかな抗原依存的増殖応答しか観察されなかった。これは前節までに示した膜融合リポソームの高い抗原送達能、ならびに上皮細胞に対するアジュバント活性によるものであると考えられた。

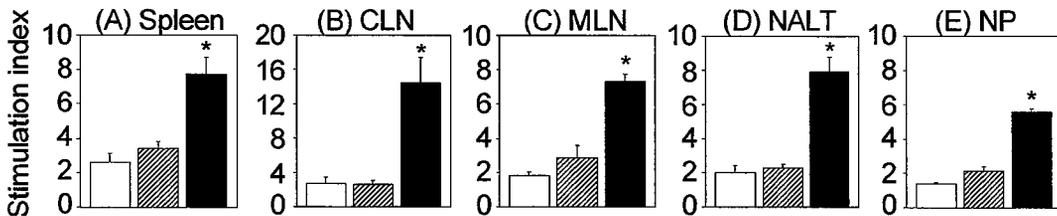


Figure 13 Nasally administered OVA-fusogenic liposomes induced antigen-specific CD4⁺ T cells from spleen, cervical lymph node (CLN), nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissue (NALT), nasal passage (NP) and mesenteric lymph node (MLN) were isolated and cultured with 1 mg/ml of OVA. Proliferative responses were determined by ³H-thymidine uptake (open column, OVA-alone; hatched column, OVA-liposomes; closed column, OVA-fusogenic liposomes). Error bars indicate means ± SE for four mice analyzed separately in triplicate assays. *, p<0.01 versus OVA-liposomes.

さてヘルパーT細胞はそのサイトカイン産生パターンにより1型ヘルパーT細胞と2型ヘルパーT細胞に分類される(59-61)。一般に1型ヘルパーT細胞から産生されるIFN- γ はCTL、NK細胞など細胞性免疫の誘導を、IL-4、5、6などの2型サイトカインはB細胞の分化、増殖を促し、体液性免疫の誘導を促進する。すなわちヘルパーT細胞から産生されたサイトカインパターンを解析することで、ヘルパーT細胞のタイプ、さらにはそれらヘルパーT細胞で誘導される細胞性免疫、体液性免疫について推測することができる。そこで次に膜融合リポソームを経鼻ワクチンキャリアーとして用いることで誘導されてくるヘルパーT細胞のパターンについてサイトカインプロファイルを指標に検討した。その結果、膜融合リポソームを用いて免疫したマウスでは1型、2型、両タイプのサイトカイン産生が粘膜面、全身面の両部位で認められた (Figure 14)。さらに鼻腔組織であるNALTと鼻腔固有層においては、異なる2型サイトカインの産生が観察された。すなわちNALTではIL-4の高い産生が認められた。これらのサイトカインはNALTに存在するB細胞に働き、免疫グロブリンの μ 鎖から α 鎖へのクラススイッチに働くことから、NALTの免疫誘導組織としての特徴を表していると言える(62-64)。一方、鼻腔の免疫実効組織として知られている鼻腔固有層由来のヘルパーT細胞からはIgA産生細胞をプラズマ細胞へと成熟させるのに働くIL-5やIL-6の強い産生誘導が認められた(62-64)。これら2型サイトカインに加え、鼻腔固有層で産生された1型サイトカイン(IFN- γ)はIgAの粘膜管腔側への分泌を促進することから(65)、鼻腔組織で産生されたサイトカインは粘膜面での感染防御に中心的に働いている抗原特異的IgAの産生を促進させていると期待された。

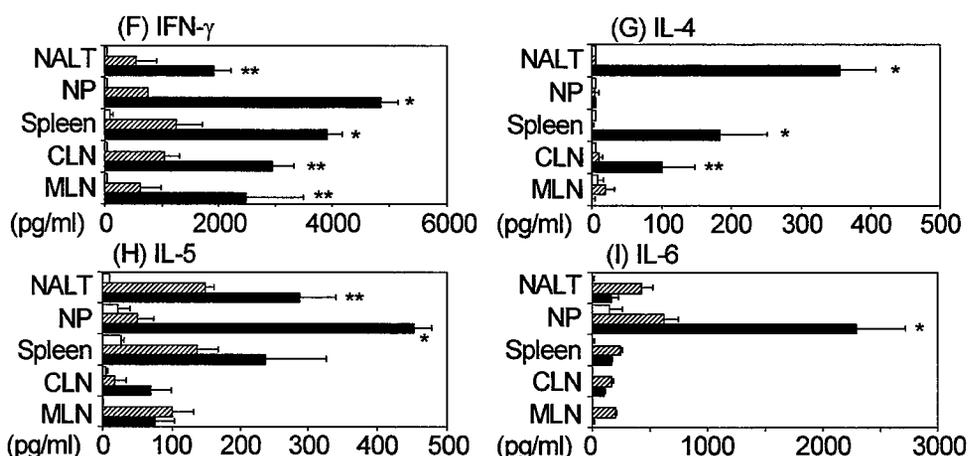


Figure 14 Nasally administered OVA-fusogenic liposomes induced antigen-specific Th1/Th2 cytokine production. Seven days after final nasal immunization, CD4⁺ T cells from spleen, cervical lymph node (CLN), nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissue (NALT), nasal passage (NP) and mesenteric lymph node (MLN) were isolated and cultured with 1 mg/ml of OVA. Th1- and Th2-type cytokine production was measured by ELISA (open column, OVA-alone; hatched column, OVA-liposomes; closed column, OVA-fusogenic liposomes). Error bars indicate means ± SE for four mice analyzed separately in triplicate assays. * and **, p < 0.01 and p < 0.05, respectively (versus OVA-liposomes).

そこで次に粘膜面における OVA 特異的抗体産生と全身系免疫の指標である血清中の OVA 特異的抗体産生について検討した。その結果、鼻腔洗浄液中にコントロール群よりも強い OVA 特異的 IgA の誘導が認められた (Figure 15)。さらに遠隔の粘膜面である糞便中にも OVA 特異的 IgA が検出された (Figure 15)。これら粘膜面での抗体産生に加え、血清中には多くの OVA 特異的 IgG が検出された (Figure 15)。さらにその血清中 IgG サブクラスについて検討すると、2 型ヘルパー T 細胞誘導型の IgG1 に加え 1 型ヘルパー T 細胞誘導型の IgG2a の誘導も認められ (Figure 15)、先のサイトカインプロファイルの結果 (Figure 14) を反映する結果となった。またこれら ELISA のデータを支持するように、鼻腔固有層、小腸固有層、脾臓中にそれぞれ OVA 特異的 IgA、IgG 産生細胞が ELISPOT 法により検出された (Figure 16)。以上の結果より、膜融合リポソームを用いた抗原の経鼻免疫により、粘膜面と全身面の両部位に抗原特異的抗体産生が誘導されることが示された。

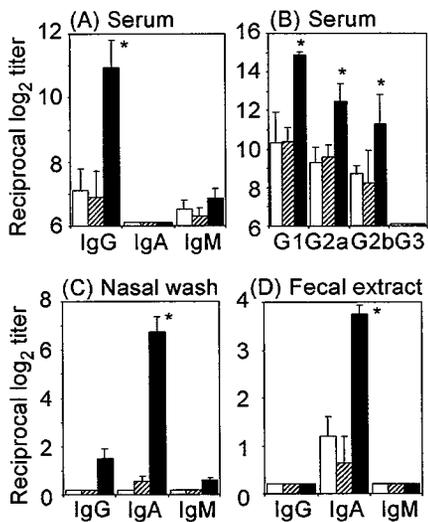


Figure 15 OVA-specific antibody responses after nasal immunization with OVA-fusogenic liposomes. Serum IgG, IgA and IgM responses (A), serum IgG subclass responses (B), IgG, IgA and IgM responses in nasal wash (C) and in fecal extract (D) were determined by ELISA (open column, OVA-alone; hatched column, OVA-liposomes; closed column, OVA-fusogenic liposomes). Findings are expressed as means \pm SE of four mice analyzed separately in triplicate assays. *, $p < 0.05$ versus OVA-liposomes.

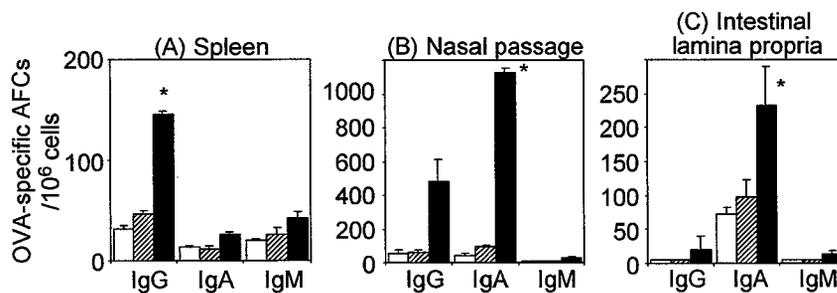


Figure 16 Antigen-specific antibody forming cells (AFCs) in spleen (A), nasal passage (B) and intestinal lamina propria (C) were determined by ELISPOT assay (open column, OVA-alone; hatched column, OVA-liposomes; closed column, OVA-fusogenic liposomes). Findings are expressed as means \pm SE of four mice analyzed separately in triplicate assays. *, $p < 0.01$ versus OVA-liposomes.

さてウイルス感染症を標的としたワクチン開発を考慮した際、上述の抗体は粘膜面で侵入してくるウイルスや細胞外に存在する遊離のウイルスには対応できるが、細胞内に感染しているウイルスに対しては効果は期待できない。そのため抗体に加え、ウイルス感染細胞を排除する細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の誘導が重要となってくる(66)。前述したように膜融合リポソームにより導入された抗原は MHC class I 分子とも抗原提示され CTL のリガンドとなり得ること、さらに上述のように膜融合リポソームを用いた経鼻免疫により CTL の誘導を補助する 1 型ヘルパー T 細胞も誘導できることから (Figure 14)、膜融合リポソームは抗体産生のみならず CTL をも誘導できる経鼻ワクチンキャリアーとして期待される。そこで次に膜融合リポソームを用いて OVA を免疫した際の OVA 特異

的 CTL の誘導について解析した。その結果、膜融合リポソームを用いて免疫したマウスの脾臓、頸部リンパ節、腸間膜リンパ節において OVA 特異的 CTL の誘導が認められた (Figure 17)。またこれまでの結果と同様、コントロール群である OVA 単独免疫群、通常のリポソームを用いて免疫した群では全く CTL 活性は認められなかった (Figure 17)。さらに膜融合リポソームを用いて免疫したマウスの鼻腔固有層から得られた単核球中には CTL の細胞傷害性分子のひとつである Perforin の転写増強が認められ、鼻腔においても抗原特異的 CTL が誘導されていることが示唆された (Figure 18)。

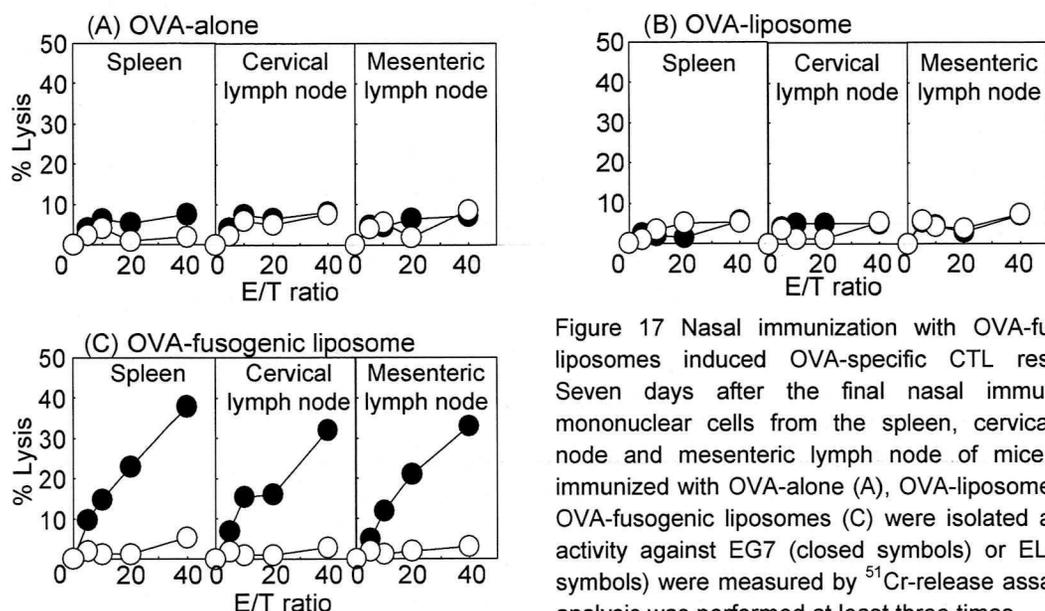


Figure 17 Nasal immunization with OVA-fusogenic liposomes induced OVA-specific CTL responses. Seven days after the final nasal immunization, mononuclear cells from the spleen, cervical lymph node and mesenteric lymph node of mice nasally immunized with OVA-alone (A), OVA-liposomes (B) or OVA-fusogenic liposomes (C) were isolated and CTL activity against EG7 (closed symbols) or EL4 (open symbols) were measured by ^{51}Cr -release assay. Each analysis was performed at least three times.

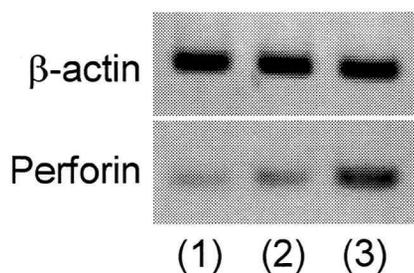


Figure 18 Nasal immunization with OVA-fusogenic liposomes induced nasal CTL responses. Seven days after the final nasal immunization, messenger RNA were isolated from the nasal passage of mice nasally immunized with OVA-alone (1), OVA-liposomes (2) or OVA-fusogenic liposomes (3) and perforin expression was determined by RT-PCR. Each analysis was performed at least three times.

第四節 小括

本章において著者は膜融合リポソームの経鼻ワクチンキャリアーとしての有効性を示した。膜融合リポソームは親株であるセンダイウイルスの細胞膜との融合機能を発揮することで、鼻腔リンパ組織に高い効率で抗原送達していた (Figure 4)。従来からリポソームはワクチンキャリアーとして広く研究されており、著者らも含め多くのグループが全身性免疫を標的としたワクチンキャリアーとして有効に機能し得ることを報告している(67-70)。リポソームの経鼻ワクチンとしての有用性を示唆するような報告もなされているが、全身性免疫を標的としたワクチン開発の場合と比べ、それほど効果が上昇したものではなかった(71, 72)。これは注射による免疫法とは異なり、経鼻投与されたリポソームの生体内への取り込みは生体側によって規定されていたからであると思われる。すなわち Figure 4 に示されるように、自ら粘膜を介して生体内に進入するという活性を保持しない通常のリポソームでは生体側の排除機構の影響を受けてしまうため、抗原を単独で投与した場合と同レベルの取り込みしか示さなかった。これに対し、膜融合リポソームは通常のリポソームに比べ高い抗原送達能を有していた (Figure 4)。これは膜融合リポソームが生体側に取り込みを規定されず、自らが細胞膜に融合することで積極的に抗原送達できたためであると思われる。リポソーム以外にもオイルエマルジョンなどの粒子状キャリアーを用いた経鼻ワクチンの開発は行われているが(73, 74)、そのほとんどはリポソームと同様、生体内に取り込まれる前に排除されてしまうため、十分な効果が得られることは期待しにくい。さらに膜融合リポソームは上皮細胞に対するアジュバント活性を有しており、高い抗原送達能とあわせ、経鼻ワクチンキャリアーとしての高い機能を保持していると考えられる。実際に膜融合リポソームを経鼻ワクチンキャリアーとして使用すると、期待通り高い免疫誘導能を示した。粘膜面の感染防御に重要な役割を担っている抗原特異的 IgA の産生に加え、血清中にも抗原特異的 IgG の誘導が認められ、膜融合リポソームを用い鼻腔を介して免疫することで粘膜面と全身面に抗体特異的抗体産生が誘導できることが示された (Figures 15 and 16)。さらに抗体産生に加え、ウイルス感染細胞を排除する上で重要な役割を担っている CTL の誘導も認められた (Figures 17 and 18)。

これは以前、著者らが報告したように膜融合リポソームを用いることで、抗原が細胞質中に導入され内在性抗原として認識された結果、MHC class I分子を介した抗原提示が行われたためであると推測される(26)。以上、本研究は膜融合リポソームを高い抗原送達能を有する体液性・細胞性免疫誘導型の経鼻ワクチンキャリアーとして定義づける研究と言える。

一方、これら体液性免疫、細胞性免疫誘導を司るヘルパーT細胞について検討すると1型ヘルパーT細胞、2型ヘルパーT細胞、両タイプのヘルパーT細胞が誘導されていた (Figures 13 and 14)。特に鼻腔においては NALT で IgA へのクラススイッチに働く IL-4 の産生、鼻腔固有層でプラズマ細胞への成熟を司る IL-5、IL-6 の産生が認められ、Common Mucosal Immune System (CMIS)を介した免疫誘導が起こっていることが示唆された (Figure 14)。一方、最近、IL-5 や IL-15 による CMIS 独立型の免疫誘導機構が存在することが報告されている(75, 76)。特に IL-15 は病原体の感染シグナルにより上皮細胞から産生されることから(77)、膜融合リポソームが融合した鼻腔上皮細胞からも IL-15 が産生され CMIS 独立型の誘導機構も働いた可能性が考えられる。このように膜融合リポソームによる免疫誘導機構に関しては多くの可能性が残っているが、残念ながら現在までのところ全容は明らかとはなっておらず、その解明は今後の研究課題として興味深いものである。いずれにせよ今回著者の示した膜融合リポソームの可能性は、臨床応用も含め今後のさらなる発展を予感させるものであると期待する。

第二章 ポリ乳酸マイクロスフェアによる消化管免疫誘導におけるパイエル板の役割

前章においては Nasopharyngeal-Associated Lymphoreticular Tissue (NALT) を中心とする鼻腔リンパ組織を標的とした経鼻ワクチン開発について述べた。一方、消化管には Gut-Associated Lymphoreticular Tissue (GALT) と呼ばれる免疫ネットワークが存在し、消化管に侵入してきた病原体に対する感染防御を行っている(78, 79)。特にマウス小腸に 10 個前後点在するリンパ組織であるパイエル板は GALT における免疫誘導の要の組織として機能している (Figure 19A)。そこには樹状細胞、マクロファージといった抗原提示細胞に加え、T 細胞、B 細胞も存在し、上皮細胞層には第一章で述べた M 細胞も存在している(80)。この様な特徴から、パイエル板は鼻腔の NALT に相当する小腸の免疫誘導組織と考えられており、経口ワクチンにおける重要な標的組織として考えられている(64, 81)。近年、パイエル板の形成に必要な分子群が次々と同定され、これらのシグナルを阻害したパイエル板欠損マウスが作製されるようになってきた(82-85)。これらのパイエル板欠損マウスを用いた検討から、溶液状態の抗原による経口免疫誘導にはパイエル板非依存的経路が存在することが明らかとなってきた(86)。

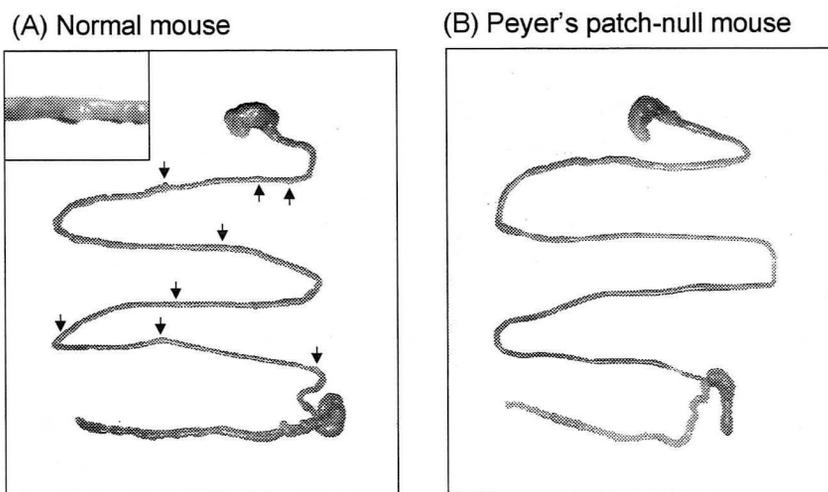


Figure 19 Lack of Peyer's patches by administration pregnant mouse with anti-IL-7 receptor α antibody

一方、粒子状キャリアーであるポリ乳酸マイクロスフェアは、その生分解性と徐放化能から経口ワクチンへの応用を含め、広く薬物キャリアーとして使用されている(87-91)。またポリ乳酸マイクロスフェアはその粒子サイズにより、経口投与後の動態が変化することも知られている。特に粒子径 8 μm のポリ乳酸マイクロスフェアはパイエル板によく取り込まれるため、免疫誘導効果が高いと考えられている(92, 93)。しかしながらポリ乳酸マイクロスフェアを含めた粒子状キャリアーによる消化管免疫誘導についてパイエル板欠損マウスを用いた検討はまだなされていないため、本系におけるパイエル板非依存的な免疫誘導経路の存在については不明である。

そこで本章においては前章と同様 OVA をモデル抗原に用い、ポリ乳酸マイクロスフェアによる消化管免疫誘導においてパイエル板が担っている役割についてパイエル板欠損マウスを用い検討した。

第一節 抗原特異的免疫誘導に与えるパイエル板欠損の影響

本節においては、ポリ乳酸マイクロスフェアによる消化管免疫誘導におけるパイエル板の役割について抗体産生とヘルパーT 細胞の誘導という観点から検討した。

【実験材料】

抗 IL-7 レセプター α 鎖抗体産生ハイブリドーマ (A7R34) は西川伸一先生 (京都大学医学部) より供与していただいた。その他の試薬は前節までに準じたものを使用した。

【実験方法】

パイエル板欠損マウスの作製

パイエル板欠損マウスは Yoshida らの方法に従い作製した(94)。すなわち妊娠 14.5 日目の BALB/c マウスに抗 IL-7 レセプター α 鎖抗体を静脈内ならびに皮下にそれぞれ 1 mg 投与した。これらの処理されたマウスから生まれてきた仔マウスは Figure 19B に示すようにパイエル板が欠損していた。

OVA 封入ポリ乳酸マイクロスフェアの作製

OVA 封入ポリ乳酸マイクロスフェアの作製は Okada らの方法に従い、w/o/w solvent evaporation 法にて作製した(90)。100 mg/ml の濃度で PBS に溶解した OVA をマイクロホモジナイザー (Microtec Niti-on、Chiba、Japan) を用い、200 mg/ml (in ジククロメタン) のポリ乳酸で乳化した (2,500 rpm、5 分間)。この w/o エマルジョンを大容量の 0.25% ビニルアルコール溶液に滴下し、攪拌 (2,000 rpm、2 時間) することで w/o/w ダブルエマルジョンを得るとともにジククロメタンを留去した。得られた OVA 封入ポリ乳酸マイクロスフェアからエルトリエーターにより粒子径約 8 μm のものを回収した (Figure 20)。

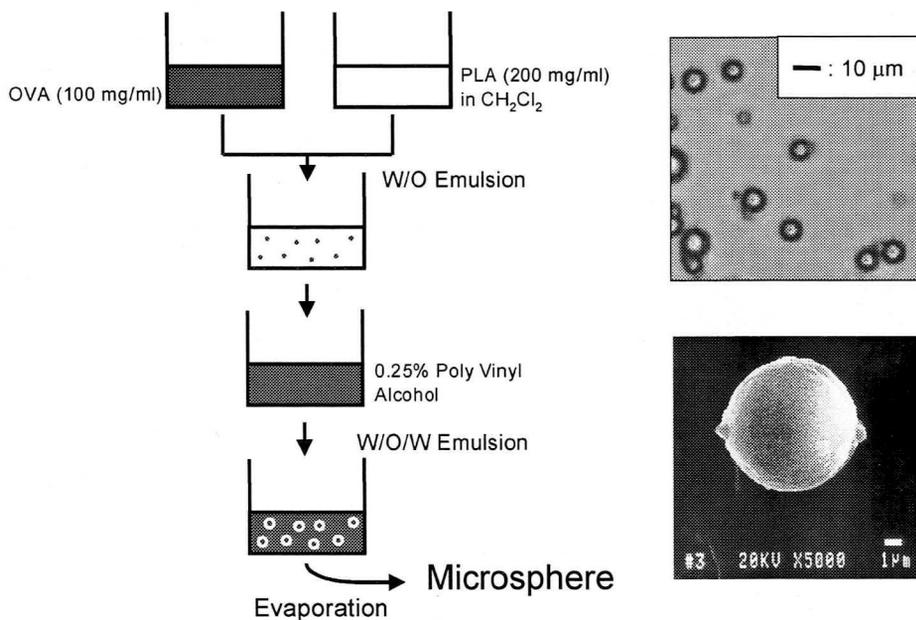


Figure 20 Preparation procedure and photograph of poly-lactic microspheres containing OVA

OVA 封入ポリ乳酸マイクロスフェアを用いた経消化管免疫

一晩絶食させた正常マウスもしくはパイエル板欠損マウスを麻酔条件下で開腹した。OVA 量として 100 μg に相当する OVA 封入ポリ乳酸マイクロスフェアもしくは PBS に溶解した OVA を十二指腸より投与後、縫合した。この免疫を 21 日おきに計三回行った。

ELISA 法による OVA 特異的抗体価の測定

前章に準じて行った。

各リンパ組織からの単核球回収

前章に準じて行った。

ELISPOT 法による OVA 特異的抗体産生細胞の測定

前章と準じて行った。

OVA 特異的 CD4 陽性細胞増殖反応の測定

前章の方法を一部改変し行った。すなわち 1×10^6 cells/ml の CD4 陽性細胞と 1×10^5 cells/ml の放射線照射同系脾細胞を OVA (1 mg/ml) の存在下で 96 時間培養した。その他は前章に準じた。

【結果および考察】

本章においては粒子状キャリアーであるポリ乳酸マイクロスフェアーを用い、消化管免疫誘導におけるパイエル板の役割について、パイエル板欠損マウスを作製し検討した。パイエル板は胎生 14 日頃から、IL-7 レセプターを介したシグナルに始まり、リンホトキシンによるシグナル伝達、VCAM-1 発現細胞、ICAM-1 発現細胞などの集積、リンパ球のホーミングなどを経て形成される。パイエル板形成に携わる各種シグナル分子をノックアウトしたマウスもすでに作製され、現在多くの研究者によりパイエル板形成の分子機構が研究されている(82-85)。またシグナルに関わる分子に対する阻害抗体を胎児期に投与することでパイエル板形成を阻害できることも報告されている(86, 94)。この方法を用い投与時期を調整することで、パイエル板のみを欠損させたマウスを作製することができ、消化管免疫におけるパイエル板の役割を検討することが可能となった。本検討においては胎生 14.5 日に抗 IL-7 レセプター α 鎖抗体を投与することでパイエル板を欠損させたマウスに、パイエル板に効率よく取り込まれることで免疫誘導すると考えられている粒子径約 8 μ m のポリ乳酸マイクロスフェアーを用い免

疫し、その後の免疫応答を解析することで、粒子状キャリアーによる経消化管免疫誘導におけるパイエル板の役割について検討した。ポリ乳酸マイクロスフェアを用い、パイエル板欠損マウスに OVA を経消化管免疫したところ、糞便ならびに血清中の OVA 特異的抗体産生が正常マウスに免疫した場合に比べ著しく減弱していた (Figure 21)。さらに小腸固有層、脾臓に存在する OVA 特異的抗体産生細胞を ELISPOT 法で測定したところ、パイエル板欠損マウスでは OVA 封入マイクロスフェアで誘導される OVA 特異的抗体産生細胞数の減少が確認され、ELISA の結果と一致する結果を得た (Figure 22)。以上の結果より消化管を介したポリ乳酸マイクロスフェアによる粘膜面、全身面での抗体産生誘導にパイエル板が重要な役割を担っていることが示された。

一方、PBS に溶解した溶液状態の OVA を経消化管免疫したところ、ELISA、ELISPOT の結果ともパイエル板の有無による影響は観察されなかった (Figures 21 and 22)。

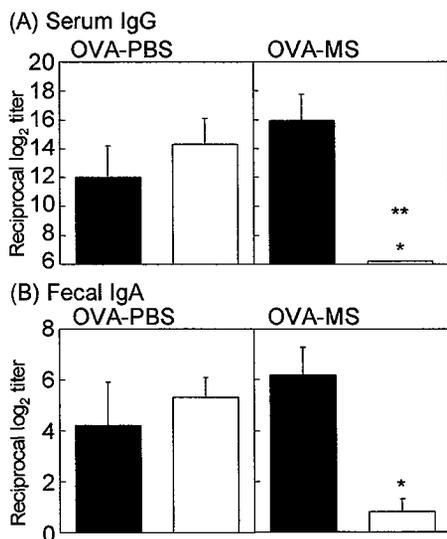


Figure 21 OVA-specific antibody production in serum and fecal extract induced by intestinal immunization with OVA-PBS or OVA-MS. Normal mice (closed column) or Peyer's patch-null mice (open column) were intestinally immunized with OVA-PBS (left) or OVA-MS (right) at days 0, 21 and 42. Seven days after the final immunization, serum (A) and fecal extract (B) were collected for the ELISA analysis of anti-OVA specific IgG and IgA productions, respectively. The error bars indicate the mean \pm SE for four mice analyzed separately in triplicate assays. *, $p < 0.05$ (compared with normal mice), **, reciprocal log₂ titer < 6 .

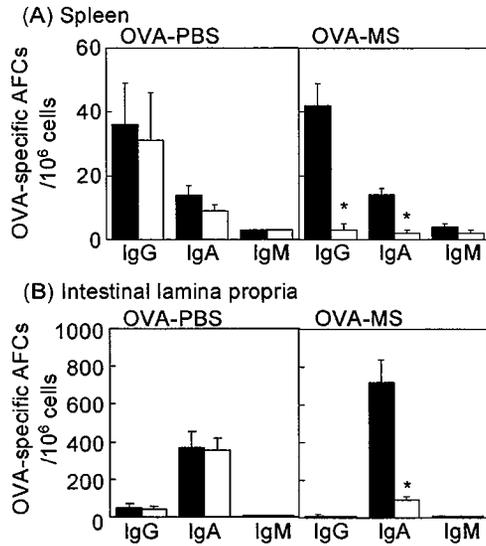


Figure 22 OVA-specific antibody forming cells (AFCs) in normal (closed column) and Peyer's patch-null mice (open column) following intestinal immunization of OVA-PBS and OVA-MS. Mice were intestinally immunized with OVA-PBS or OVA-MS at days 0, 21 and 42. Seven days after the final immunization, mononuclear cells were isolated from spleen (A) and intestinal lamina propria (B) of normal (closed column) and Peyer's patch-null (opened column) mice, and evaluated for OVA-specific IgG, IgM and IgA AFCs by ELISPOT assay. These presented values are representative of three separate experiments. *, $p < 0.01$ (compared with normal mice)

一方、前述のように抗体産生の誘導にはヘルパーT細胞の補助が必要となってくる。そこで次にヘルパーT細胞のOVA依存的増殖応答について検討した。その結果、抗体産生の結果と同様、ポリ乳酸マイクロスフェアを用いて免疫したパイエル板欠損マウスの脾臓ならびに腸間膜リンパ節から回収したCD4陽性細胞のOVA依存的増殖応答は著しく減弱していた (Figure 23)。しかしながら、溶液状態のOVAで免疫した場合は、パイエル板の消失による影響は認められず、OVA依存的増殖応答はほとんど変化しなかった (Figure 23)。

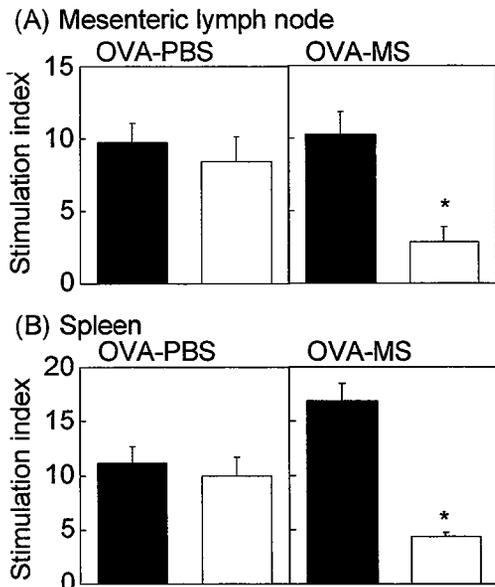


Figure 23 Proliferative responses of OVA-specific CD4⁺ T cells in mesenteric lymph node and spleen of normal and Peyer's patch-null mice following intestinal immunization of OVA-PBS or OVA-MS. CD4⁺ T cells were purified from mesenteric lymph node (A) and spleen (B) of normal mice (closed column) or Peyer's patch-null mice (open column) after last intestinal immunization and cultured with OVA (1 mg/ml) in the presence of irradiated syngenic spleen cells for 96 hr. During the last 8 hr of incubation, 1.0 μ Ci of ³H-thymidine was added. The results are expressed as the means \pm SE from four mice per group and from a total of three experiments. *, $p < 0.01$ (compared with normal mice)

以上の結果より、粒子状態の抗原の場合はパイエル板依存的経路で免疫誘導されるのに対し、溶液状態の場合はパイエル板非依存的経路も存在することが示された。この溶液状態の抗原による免疫誘導の経路に関して Yamamoto らは、パイエル板に加え腸間膜リンパ節を欠損している TNF/リンホトキシン α ダブルノックアウトマウスを用い、腸間膜リンパ節が誘導組織として機能している可能性を報告している(86)。さらに MacPherson らのグループは小腸固有層に存在する樹状細胞が抗原を取り込み、腸間膜リンパ節に抗原を運搬していることを報告している(95)。最近同グループより、固有層に存在する樹状細胞の取り込み経路のひとつにアポトーシスした上皮細胞が関与していることが報告された(46)。また前章でも述べたように、上皮細胞も抗原提示細胞として働き得る可能性についても多数報告されている(49, 50)。これら上皮細胞、樹状細胞、T、B細胞などの細胞間イントラネットワークに関する研究は現在も多くのグループで検討中であり、これらの研究を通じ粘膜ワクチンを含めた粘膜免疫の新しい概念が提唱できるものと期待される。

第二節 抗原の形態変化による免疫応答制御

前節において、ポリ乳酸マイクロスフェアを用いて免疫した場合はパイエル板依存的に免疫誘導されるのに対し、溶液状態の場合はパイエル板非依存的な経路も介し、免疫誘導されることが示された。一方、前章でも述べたようにヘルパーT細胞はそのサイトカイン産生パターンにより1型ヘルパーT細胞と2型ヘルパーT細胞に分類され、各々がその後の免疫応答を制御していることが知られている。そこで本節においては、抗原の形態（粒子状・溶液状）によるヘルパーT細胞誘導パターンの変化について検討した。

【実験材料】

前節までに準じたものを使用した。

【実験方法】

サイトカイン産生の測定

前節の OVA 特異的 CD4 陽性細胞増殖反応の測定実験で得られた培養上清を用い、前章に準じてサイトカイン濃度を測定した。

ELISA 法による OVA 特異的抗体価の測定

前章に準じて行った。

【結果および考察】

本節では抗原の形態（溶液状/粒子状）によるヘルパーT 細胞のバランス（1型/2型）変化について解析を行った。OVA を免疫したマウスの脾臓、腸間膜リンパ節から CD4 陽性細胞を回収し、OVA で再刺激した際のサイトカイン産生について検討したところ、溶液状の OVA で免疫した場合には脾臓、腸間膜リンパ節とも 2 型ヘルパーT 細胞から産生される IL-4 は検出されたが、1 型ヘルパーT 細胞から産生される IFN- γ は認められなかった（Figure 24）。一方、ポリ乳酸マイクロスフェアで正常マウスに免疫した場合には、IL-4 に加え、IFN- γ の産生も認められ、1 型・2 型の両タイプの T 細胞が誘導されていることが示唆された（Figure 24）。また先の OVA 依存的増殖応答の結果（Figure 23）を反映し、ポリ乳酸マイクロスフェアを用いて免疫したパイエル板欠損マウスから得られた CD4 陽性細胞からは 1 型、2 型いずれのサイトカインの産生も認められなかった。

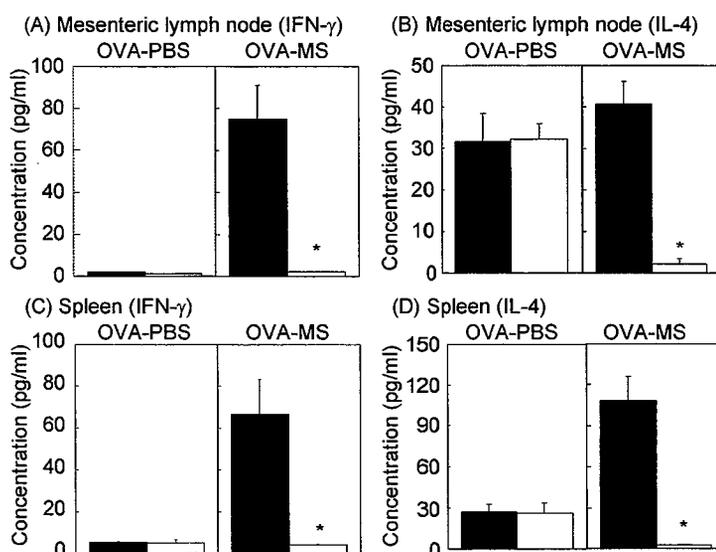


Figure 24 Analysis of Th1 (IFN- γ)- and Th2 (IL-4)-type cytokine productions by CD4⁺ T cells in mesenteric lymph node and spleen of intestinally immunized normal (closed column) and Peyer's patch-null mice (open column) with OVA-PBS or OVA-MS. CD4⁺ T cells from mesenteric lymph node (A and B) and spleen (C and D) of intestinally immunized mice were stimulated *in vitro* with OVA. Culture supernatants were harvested for the analysis of secreted Th1- and Th2-type cytokines using the respective cytokine-specific ELISA. The results are expressed as the means \pm SE from four mice per group and from a total of three experiments. *, p<0.01 (compared with normal mice).

また血中の OVA 特異的 IgG のサブクラスについて検討したところ、溶液状の OVA で免疫した際には、2 型 T 細胞誘導型の IgG1 が優先的に誘導されていたが、ポリ乳酸マイクロスフェアを用いた場合には IgG1 に加え、1 型 T 細胞誘導型の IgG2a などの産生も認められた (Figure 25)。

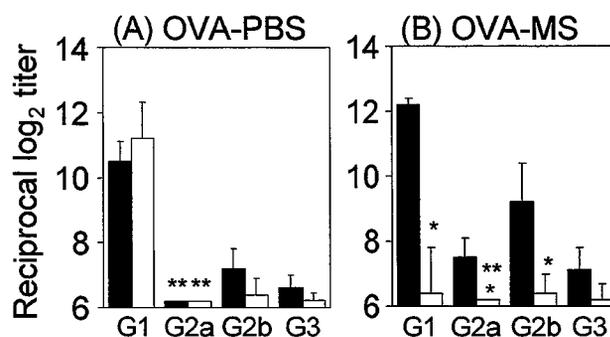


Figure 25 Serum IgG subclass responses to OVA in mice intestinally immunized with OVA-PBS or OVA-MS. Normal mice (closed column) or Peyer's patch-null mice (open column) were intestinally immunized with OVA-PBS (A) and OVA-MS (B). Serum samples were collected at day 49 and examined for OVA-specific serum IgG subclass responses by ELISA. The error bars indicate the mean \pm SE for four mice analyzed separately in triplicate assays. *, p<0.05 (compared with normal mice), **, reciprocal log₂ titer < 6.

これらの結果は抗原の形態が異なることで、その後誘導されてくる免疫応答が変化することを示唆するものである。最近、パイエル板にはケモカインレセプターの発現で分類される2種類の樹状細胞が存在し、各々が免疫応答を制御していることが報告されている(96-100)。ひとつはCCR7陽性の樹状細胞であり、この樹状細胞の抗原提示を受けたT細胞は1型ヘルパーT細胞応答を示すようになる。もう一方はCCR6/CCR7両陽性の樹状細胞であり、2型T細胞応答を誘導するとされている(98, 100)。さらにこれらの樹状細胞による抗原の取り込みは抗原濃度やバクテリアの刺激などに依存することが示唆されている(99)。これらの報告から推測すると、ポリ乳酸マイクロスフェアによりパイエル板に送達されたOVAは局所的な濃度が上昇することで、CCR7陽性樹状細胞とCCR6/CCR7陽性の樹状細胞に取り込まれ、その結果、1型・2型両タイプのヘルパーT細胞が誘導されたと考えられる。一方、粘膜固有層にはCCR5陽性の樹状細胞が存在することが報告されている(101)。残念ながら、このCCR5陽性の樹状細胞はどのようなヘルパーT細胞応答を誘導するかは不明であるが、これらの報告と今回著者の得た結果を統合し推測すると、抗原の形態により取り込まれる樹状細胞が規定された結果、免疫応答が変化した可能性が考えられる。

第三節 小括

小腸は前章で示した鼻腔などに比べ、粘膜免疫の歴史のなかでは最もよく研究されている臓器である。特にパイエル板は小腸に肉眼で観察できるリンパ組織であり、その機能に関しては多くの報告がある(64, 81)。一方、粒子状キャリアーであるポリ乳酸マイクロスフェアは古くから開発されてきた薬物キャリアーであり、現在においては実際に臨床応用されているものもある(87-91)。ポリ乳酸マイクロスフェアは経口ワクチンキャリアーとしての歴史も古く、粒子サイズや構成組成を変化させたものなど多くの検討がなされているが、そのいずれの検討でもパイエル板が取り込み部位であるというのが基本概念であった(102, 103)。そこで本検討においてはその基本概念を確認すべく、パイエル板形成に必要なシグナルを胎児期に阻害することでパイエル板を欠損させたマウスを用い、ポリ乳酸マイクロスフェアによる経消化管免疫誘導におけるパイ

エル板の役割について検討を行った。その結果、パイエル板欠損マウスにおいてはポリ乳酸マイクロスフェアにより誘導される抗原特異的免疫応答が著しく減弱することが示され、パイエル板がポリ乳酸マイクロスフェアの取り込み部位となっているという従来の説を支持する結果を得た (Figures 21-23)。一方、PBS に溶解させた状態で OVA を免疫した場合にはパイエル板欠損の影響は受けなかった。これは過去に Yamamoto らが報告した結果と同様の結果であり、パイエル板非依存的免疫誘導経路の存在を示唆するものである(86)。前述のように現在これらの機構解明は急速に進んでおり、B-1 細胞の関与など含め多くの説が提唱されている。またパイエル板欠損マウスを用いた経口免疫寛容についての解析も進んでおり、免疫誘導と免疫寛容という相反する反応が小腸においてどのように制御されているのか明らかとなるひとつの手がかりとなるかもしれない。これらパイエル板を中心とした消化管免疫誘導の機構解明は新しいワクチン戦略の提示につながると考えられ、今後ますますの発展が期待される。

一方、著者らは抗原の形態 (粒子状・溶液状) により誘導されてくるヘルパーT 細胞応答が変化することを示した (Figures 24 and 25)。前述のようにパイエル板には少なくとも2種類の樹状細胞が存在することが明らかとなっており、これらの樹状細胞の関与が推測される(96, 98, 100)。特にこの誘導機序のひとつには抗原濃度の関与が示唆されていることから(99)、ポリ乳酸マイクロスフェアを用いることでパイエル板における局所的な抗原濃度が上昇し、1型、2型の両タイプのヘルパーT 細胞が誘導されたと推測される。また抗原濃度が上昇することで、樹状細胞やマクロファージにおいては MHC クラス II 分子による抗原提示のみならず、MHC class I 分子による抗原提示も増強されることから(104, 105)、先に示した1型ヘルパーT 細胞の誘導もあわせ、ポリ乳酸マイクロスフェアでは CTL をも誘導できると考えられる。事実、ポリ乳酸マイクロスフェアを用いた経口免疫による CTL の誘導も報告されており、樹状細胞などとの関連も含めその誘導機序の解明が待たれる(106)。いずれにせよ、今回著者が示したポリ乳酸マイクロスフェアによる免疫応答の制御は粘膜ワクチンの開発のみならず、炎症性腸疾患や経口免疫寛容など消化管免疫組織を介した多くの疾患治療に応用可能と考えられ、今後ますますの発展が期待される。

第三章 新規粘膜ワクチンキャリアーとしての Adhesive Micromatrix System (AdMMS)の設計と機能評価

前章でも述べたように小腸は GALT という免疫システムを構築することで、飲む、食べるという行為を介し感染してくる病原体に対する防御機構を構築している。これら GALT システムを標的とした経口ワクチンにおいても新規 DDS 技術の応用が期待されている。

Adhesive Micromatrix System (AdMMS) は、粘膜付着性高分子をマトリックス内部に含有させた新しいタイプの経口剤キャリアーとして注目されている(107-109)。従来から粘膜付着性高分子を用いたマトリックス製剤は知られていたが(45)、これらは全て表面にコーティングする形式をとっていたため、投与後すぐにコーティングした高分子がはがれてしまい長期的な効果は得られていなかった。これに対し、AdMMS は粒子内部に含有した粘膜付着性高分子が水に触れ膨潤し、経時的に粒子表面に突出した形態をとるために、粘膜付着性が長時間維持される (Figure 26) (107)。すでに AdMMS はピロリ菌除去を目的とした抗生物質療法に応用されており、経口薬物キャリアーとして優れた機能を有していることが報告されている(109)。この AdMMS を経口ワクチン用 DDS として応用することで、すなわち AdMMS により効果的に抗原を放出することで免疫誘導能に優れた抗原キャリアーシステムが提示できると期待される。そこで本章においては、モデル抗原である OVA を含有した AdMMS の作製を試み、その製剤特性と免疫誘導能について検討を行った。

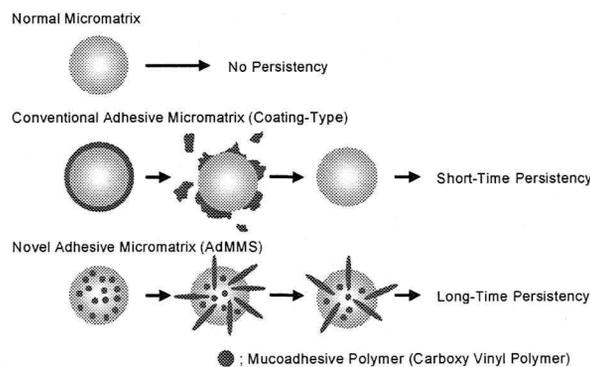


Figure 26 Characteristics of Adhesive Micromatrix System (AdMMS)

第一節 AdMMS の作製と製剤特性評価

一般にマトリックス粒子はその構成成分や混合比率などにより製剤特性が変化することが知られている(110-112)。そこで本節においては、モデル抗原である OVA を 1%含有し、構成基本素材である Hydrogenate Caster Oil と粘膜付着性高分子である Carboxy Vinyl Polymer の混合比の異なる 3 種類の AdMMS を作製し(Table 1)、それぞれの製剤特性について検討した。

【実験材料】

前章までに準じたものを用いた。

【実験方法】

OVA 含有 AdMMS の作製

OVA 含有 AdMMS の作製は Akiyama らの方法により作製した(107)。すなわち各種比率 (Table 1) で混合した OVA と Carboxy Vinyl Polymer を、加温により融解させた Hydrogenated Castor Oil 中で攪拌・混合した。これら混合物を約 2,500 rpm で回転しているアルミニウム板に滴下することで OVA 含有 AdMMS を作製した。

% (w/w)	MS-10	MS-8	MS-6
Carboxy Vinyl Polymer	10	8	6
Hydrogenated Caster Oil	89	91	93
Ovalbumin	1	1	1

Table 1 Composition of mucoadhesive polymer-dispersed microspheres containing OVA

OVA 溶出性試験

0.01% Tween-20 を含む日本薬局方第 2 液 (0.05M リン酸水素 2 カリウム、0.024M 塩化ナトリウム; pH 6.8) 40 ml 中に 100 mg の OVA 含有 AdMMS を懸濁した。この懸濁液を 37°C、約 100 rpm で攪拌し、経時的に上清を回収した。遠心操作 (12,000 rpm、4°C、10 分間) により AdMMS の残渣を取り除いた後、上清中の OVA 量を抗 OVA 抗体 (mouse、rabbit 由来; 大阪大学大学院薬学研究

科薬剤学分野で作製) を用いた Sandwich ELISA 法で測定した。

In vitro での安定性評価

上記の OVA 溶出性試験条件下における AdMMS の粒子状態を CCD (charge-coupled device) カメラ (Fuji film、Tokyo、Japan) を用いて観察した。

OVA 含有 AdMMS の小腸内滞留性評価

一晩絶食させた BALB/c マウス (雌性、8 週齢) に 10 mg の AdMMS を前章の方法に準じて十二指腸より投与した。8 時間後、各マウスより小腸を回収、均等に 3 分割したものを縦断し、小腸内に残存している AdMMS の数をルーペによる検鏡で測定した。

In vivo における OVA 含有 AdMMS の安定性評価

上記の OVA 含有 AdMMS の小腸内滞留性評価において AdMMS を測定した後、小腸中間部に残存していた AdMMS を回収し、CCD カメラで観察した。

【結果および考察】

本検討においては、AdMMS の構成組成変化に伴う製剤特性変化を解析する目的で抗原である OVA の含有量を 1% に固定し、粘膜付着性高分子である Carboxy Vinyl Polymer の割合を変えた 3 種類の AdMMS を作製した (Table 1)。各 AdMMS の日本薬局方第 2 液中における溶出性を調べたところ、Carboxy Vinyl Polymer の含有量に依存した溶出が観察された (Figure 27)。すなわち Carboxy Vinyl Polymer を 10% 含有する AdMMS (MS-10) では攪拌 30 分でほとんど全ての OVA が溶出されたのに対し、Carboxy Vinyl Polymer をそれぞれ 6%、8% 含有する AdMMS (MS-6、MS-8) では抗原の経時的な放出が観察され、15 時間でほぼ全ての OVA が溶出された (Figure 27)。またこの際の粒子状態を CCD カメラで観察すると、MS-10 では攪拌 1 時間でほぼ全ての粒子が崩壊していた (Figure 28)。一方、MS-6 や MS-8 は攪拌 12 時間後でも安定な粒子状態を保持していたことから (Figure 28)、Figure 27 に示した溶出性を規定している一因として粒

子の安定性が考えられた。親水性高分子である Carboxy Vinyl Polymer は作製時には Hydrogenated Castor Oil からなるマトリックス中に分散した状態となっているが、水に接触すると膨潤し表面に突出した状態となる。この際、膨潤する Polymer の量が増えると、Hydrogenated Castor Oil によるマトリックス構造が崩壊し、粒子状態を形成し得なくなると考えられる。上記の結果より、本系においては Polymer の含有量が 8% と 10% の間に安定な粒子状態を保てるボーダーラインが存在すると推測された。

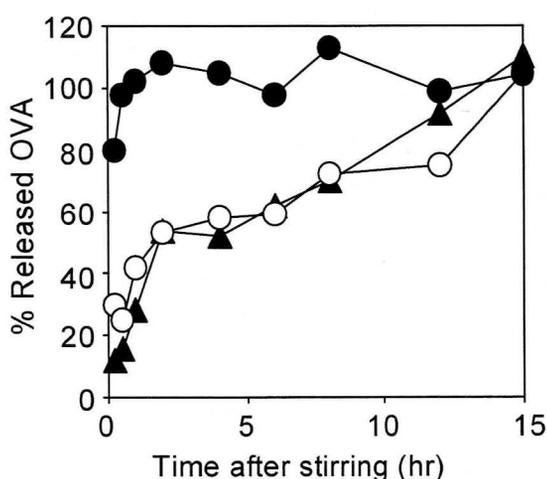


Figure 27 Release profiles of OVA from MS with various ratios of carboxy vinyl polymer. Carboxy vinyl polymer contents (%); 10% (MS-10, closed circles), 8% (MS-8, open circles), 6% (MS-6, triangles).

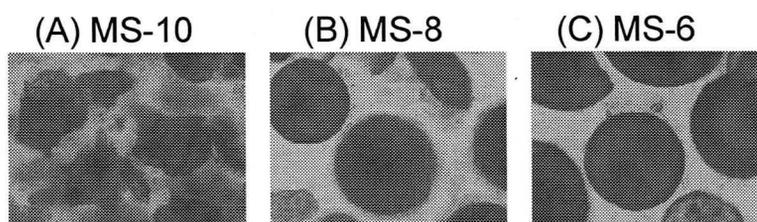


Figure 28 *In vitro* stability determined from scanned morphology of MS. One (A: MS-10) or eight (B: MS-6 and C: MS-8) hr after stirring, MS were collected and observed using a CCD camera.

次に各 OVA 含有 AdMMS (MS-6、MS-8、MS-10) を小腸内に投与した際の滞留性について検討した。小腸内に投与した 8 時間後に小腸を回収し 3 分割した後、各部位に残存している粒子数を測定した。その結果、MS-10 の大部分は小腸上部ならびに中間部に残存していた (Figure 29)。しかしながらその粒子を小腸より回収し、CCD カメラで観察すると *in vitro* での検討と同様、その大部分

は崩壊していた (Figure 30)。一方、*in vitro* では同様の溶出性を示し (Figure 27)、*in vivo* でも比較的安定した粒子状態を保持していた MS-8 と MS-6 では (Figure 28)、MS-8 の大部分が小腸下部に、MS-6 は中間部と下部に約半数ずつに残存していた (Figure 29)。またこの際、いずれの粒子を投与した場合も、盲腸、大腸では粒子はほとんど確認されなかった (data not shown)。

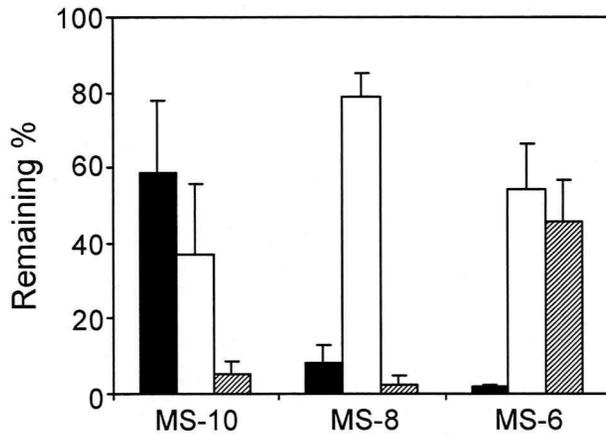


Figure 29 Percentage of MS remaining in the small intestine 8 hr after injection into the duodenum. Upper segment of small intestine (closed columns), Middle segment of small intestine (open columns), Lower segment of small intestine (hatched columns).

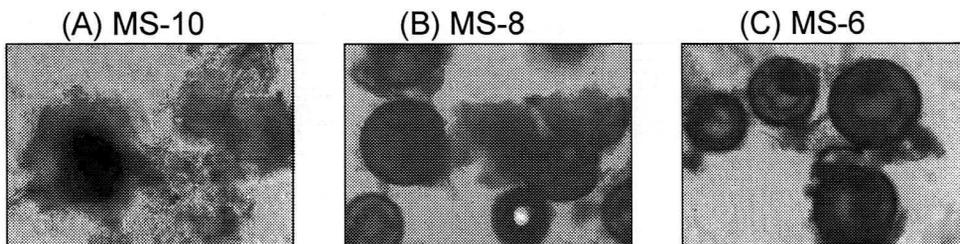


Figure 30 *In vivo* stability of MS. Eight hr after direct administration of MS into the duodenum, MS were obtained from the middle of small intestine and observed using a CCD camera.

以上の結果をまとめると、MS-10 は安定性に乏しく投与後すぐに崩壊しほとんど全ての OVA を溶出する。MS-6 は粒子の安定性は高く、抗原を経時的に放出するが小腸滞留性がやや乏しい。一方、MS-8 の溶出性は MS-6 とほぼ同様に、滞留性は MS-6 より優れているという製剤特性を有していた。

第二節 AdMMS による抗原特異的抗体産生誘導の評価

前節において抗原の溶出性、小腸内での滞留性といった製剤特性の異なる 3 種類の AdMMS を作製した。本節においてはこの各種 AdMMS をマウスに免疫し、その後の抗体産生を測定することで、経口ワクチンとして最適な AdMMS 組成を検索すると共に粒子の製剤特性と免疫誘導能の連関について解析した。

【実験材料】

前節までに準じたものを使用した。

【実験方法】

免疫

前節に示した投与方法を用い、OVA 量として 100 μg の AdMMS を投与した。この免疫を 1 週間おきに計 2 回行った。

血清、糞便抽出液の回収

前章に準じて行った。

ELISA 法による OVA 特異的抗体産生の測定

前章に準じて行った。

【結果ならびに考察】

前節において示された製剤特性の異なる各 OVA 含有 AdMMS を用い消化管内に免疫し、血清中ならびに糞便中の OVA 特異的抗体産生を解析することで、製剤特性と免疫誘導能の連関について検討した。その結果、各 AdMMS はいずれも OVA 特異的抗体産生を誘導できることが確認された (Figure 31)。またその誘導能の高さについて検討すると血清、糞便中とも MS-8>MS-6>MS-10 の順であった (Figure 31)。これは前節で示した抗原の溶出性と小腸内での滞留性のバランスが、MS-8 が最も優れていたためだと推測された。すなわち MS-10 は投与後すぐに崩壊し、OVA を速やかに放出した結果、OVA の単独免疫群とあまり

変わらない免疫誘導能であったと思われる。一方、MS-6 や MS-8 は小腸内で抗原を長時間にわたり溶出したが、MS-6 は OVA が完全に放出される前に生体内から排泄されてしまい、滞留性の高い MS-8 のほうが大量の抗原を供給できたと推測された。

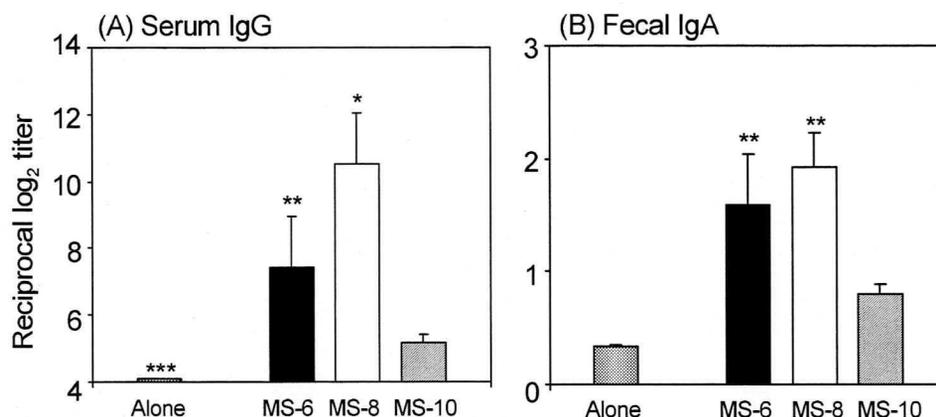


Figure 31 Analysis of antigen-specific antibody responses induced by intestinal administration with MS. Anti-OVA IgG responses in serum (A) and IgA responses in fecal extracts (B). Mice were immunized twice with MS by direct administration into the duodenum on day 0 and 7. Seven days after the final immunization, serum and fecal extracts were collected and anti-OVA antibody responses were measured using ELISA. Results are shown as means \pm SE for four mice per group. * $P < 0.05$ versus MS-6, ** $P < 0.05$ versus MS-10, *** reciprocal log₂ titer < 4 .

第三節 小括

本章においては AdMMS の経口ワクチンキャリアーとしての設計と機能評価を行った。AdMMS は経口投与すると大部分が胃内壁に付着してしまうため (107)、今回は消化管に直接投与したが、今後、臨床応用する場合には腸溶性カプセルに包含などのさらなる工夫が必要となってくる。しかし AdMMS はその構成成分が全て日本薬局方収載品であることや、経口薬物キャリアーとしてすでに臨床トライアルが始まっていることもあり (108)、臨床応用へかなり近い剤型であると言えよう。また今回は抗原として OVA というタンパク質を用いているが、AdMMS はその作製手技上、粒子状の抗原をそのまま含有させることも理論的には可能である。すなわち前章で示したポリ乳酸マイクロスフェアなどを含有した AdMMS も作成可能であり、AdMMS から抗原を含有したポリ乳酸マイクロスフェアを放出させるというさらに免疫誘導能に優れた新規ハイブリッド型の抗原キャリアーシステムが開発できるものと期待される。

また本検討では過去の例にならい Carboxy Vinyl Polymer を粘膜付着性高分子として用いた。現在、Carboxy Vinyl Polymer など既存高分子の粘膜付着性は粘液層中に存在するシアル酸との電気的相互作用など様々な要因によって規定されていると考えられており現在もそのメカニズムについては多くの研究者により解明中である(113, 114)。従って現在までのところ最も有効な粘膜付着性高分子はどのようなものなのか定かではない。今後、新規高分子も含め、粘膜ワクチンキャリアーに用いる上で最適な高分子が開発され、AdMMS に適用されることを期待したい。

また著者は抗原の溶出性や滞留性といった製剤特性の違いにより免疫誘導能が変化することを示した。当然、抗原や付着性高分子が異なると溶出性等の製剤特性が変化することから、今後の病原体抗原を用いた解析においては、各抗原や高分子に応じた粒子設計が必要であると思われる。また今回は抗原量を 1% と固定しているが、総合投与量を減らすためには抗原含有割合をどこまで増加させ得るかということも製剤学的には重要な検討項目となってくる。さらに消化管における粒子の滞留性は消化管の蠕動運動など生体側の因子によっても大きく左右される。今回著者の示した結果は AdMMS に限らずいかなる経口免疫法においても、キャリアーに用いた製剤の特性、さらには摂食条件や罹患病歴など生体側の因子を考慮した上で抗原を経口投与する必要があることを示唆するものである。これはいままで以上に緻密な製剤設計ならびに解析が必要であることを提示しているものであるが、今回著者が示した AdMMS の動態特性と免疫誘導能の連関評価が一つの指標になれば幸いである。

総括

21世紀を迎え、医学・薬学は大きく進歩したが未だ治療法の確立されていない疾患が数多く存在している。なかでも感染症は古くから人類が格闘してきた疾患のひとつであるが、今日においても根絶には至っておらず、加えて各種新興・再興感染症が問題となっている。一方、ここ10年あまりにおける分子生物学的手法の飛躍的進歩に伴い、感染症との戦いのために生体が備えた免疫機構の精密かつダイナミックな機能が明らかとなり、感染症対策を考える上で重要な位置を占めるようになってきた。なかでも生体の“内なる外”を形成している粘膜面は粘膜免疫システムを備えることで外界から侵入してくる病原体に対する防御機構として機能している。この粘膜免疫システムを標的としたワクチン“粘膜ワクチン”は現行の注射による免疫法に比べ多くの利点を有していることから各種感染症に対する次世代型ワクチン療法として注目されている（Figure 1）。しかしながら注射による免疫とは異なり、抗原を単独で投与した場合、粘膜面に備えられている排除機構のためそのほとんどは生体内に取り込まれることすらできない。当然、続いて起こるべき免疫応答も誘導されないことから、上記問題点を解決する技術、すなわち粘膜ワクチンにおける DDS 技術の開発が必要とされていた。

本論文では、このような観点から膜融合リポソーム、ポリ乳酸マイクロスフェア、Adhesive Micromatrix System (AdMMS) という3種類の粒子状キャリアーを用い、粘膜面における抗原動態特性と免疫誘導能の連関を評価し、粘膜ワクチンにおける DDS の有用性について検討した。その結果、各粒子状キャリアーを用いることで粘膜面における抗原動態、特に取り込み特性が変化しその後の免疫応答が制御されることを示した。これは今後、粘膜ワクチンにおける粒子設計を考えるうえで、重要な指針になるものと期待される。また膜融合リポソームや AdMMS が新規粘膜ワクチンキャリアーとして有効に機能することを見だし、その可能性について議論した。今回は全て OVA というモデル抗原を用いた製剤特性評価しか行うことができず、実際の病原体抗原を用いた検討を行うことはできなかった。しかしながら現在これらについても検討中であり、

今後、感染実験等、臨床応用を見据えた研究結果が得られるものと期待する。

一方、標的組織である粘膜免疫についても全容は明らかになっておらず、現在日進月歩でその解明が進んでいる。特に粘膜免疫の特徴として知られている粘膜免疫誘導と粘膜免疫寛容という相反する免疫応答の誘導制御機序についてはまだその大部分は解明されておらず、機構解明につながるブレークスルーが待望されている。その点、今回著者の示した DDS 技術を用いたアプローチは抗原送達部位を制御できるなどの利点を有していることから、粘膜免疫の機能解析という基礎学問の発展にも寄与できるものと思われる。

いずれにせよ、本論文で示した研究は粘膜ワクチンにおける DDS 技術の有用性と重要性を示し得たと考える。しかしながら今回は多くの DDS 技術のうち、その一部を検討したにすぎない。今回示した結果をもとにさらに情報を集積し粘膜ワクチンキャリアーシステムとしてさらにシステムアップしていくとともに、新しい概念に基づく新規キャリアーの設計が必要になると思われる。特に薬学領域における化学的な技術と生物学的解析がうまく融合できれば、全く新しいコンセプトに基づく斬新なアプローチが提唱できると考えられる。今後、分子生物学、合成高分子学など様々な分野が発展すると共にそれぞれの技術が融合し新規 DDS 技術が開発されることで、DDS 技術を用いた粘膜ワクチンの開発がさらに進歩することを期待したい。

結論

1. 膜融合リポソームを用いることで鼻腔リンパ組織に存在する M 細胞、鼻腔上皮細胞、Mac-1 陽性細胞へ効率よく抗原送達されることが確認された。また膜融合リポソームは粘膜上皮細胞の MHC クラス II 分子の発現を増強するというアジュバント活性を保持しており、その作用は細胞内の輸送経路を変化させることにより誘導されることが示唆された。さらに膜融合リポソームにより導入された抗原はマクロファージならびに粘膜上皮細胞の MHC クラス II 分子を介して抗原提示されることが示された。
2. 1 の機能を反映し、膜融合リポソームを用いて経鼻免疫することで粘膜系免疫組織ならびに全身系免疫組織に抗原特異的抗体産生とヘルパー T 細胞応答、細胞傷害性 T 細胞が誘導されることが示され、膜融合リポソームが優れた経鼻ワクチンキャリアーとなり得ることが確認された。
3. ポリ乳酸マイクロスフェアを用いた検討から、パイエル板が小腸における粒子状抗原キャリアーの取り込み部位となり免疫誘導に関与していることが実証された。また抗原の形態（粒子状・溶液状）により取り込み経路が異なり、その後の免疫応答が変化することが示された。
4. Adhesive Micromatrix System (AdMMS) が新規消化管粘膜ワクチンキャリアーとなり得ることが示唆された。また AdMMS からの抗原の溶出性、小腸における粒子の滞留性といった製剤特性がその後の免疫応答に影響を与えることを示した。

以上、粘膜ワクチンにおける DDS 技術の有用性を提示し、粘膜面における抗原動態とその後の免疫応答が密接に関係していることを示した。

謝辞

本稿を終えるにあたり、終始ご懇切なるご指導、ご鞭撻を賜るとともに、研究に対する姿勢、情熱をご教授くださいました恩師、大阪大学大学院薬学研究科教授 真弓忠範先生に衷心より深甚なる謝意を表します。

また研究に対する夢とロマンを与えて下さり、終始ご懇篤なるご指導を賜りました大阪大学微生物病研究所教授 清野宏先生に深謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、昼夜益暮を問わずご指導いただきました大阪大学微生物病研究所講師 高橋一郎先生に心より御礼申し上げます。併せて種々ご指導賜りました大阪大学微生物病研究所助手 廣井隆親先生、山本正文先生（現、日本大学歯学部）、権美那先生、同研究員 瀬良田政志先生（現、旭化成株式会社）をはじめとする大阪大学微生物病研究所免疫化学分野の諸先生方に感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり貴重なご助言、ご指導を賜りました大阪大学大学院薬学研究科助教授 中川晋作先生、久保一義先生、大阪大学大学院薬学研究科助手 堤康央先生に厚く御礼申し上げます。

また研究の立ち上げの時期からご指導くださいました大阪大学大学院薬学研究科助手 中西剛先生、国立医薬品食品衛生研究所 水口裕之先生、徳島文理大学薬学部助手 近藤昌夫先生、Yale University 中川哲彦先生、ベーリンガーインゲルハイム株式会社 今津進先生に深謝いたします。

さらに Adhesive Micromatrix System を用いた研究においてご指導賜りました聖マリアンナ医科大学 小川泰亮先生ならびに武田薬品工業 秋山洋子先生、永原直樹先生に感謝いたします。

そして本研究を行うにあたりともに苦労してくれた林哲修士、奥平章子修士、形山和史修士、増田幸史学士、有山輝子学士をはじめとする大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野の諸氏ならびに研究を仲立ちとして知り合えた友人に深謝いたします。

また在学中の経済的援助を賜りました日本学術振興会、日本育英会、東京生化学研究会、東ソー奨学会、小野薬品工業株式会社に感謝いたします。

最後に常に励まし支えてくれた家族に感謝いたします。

参考文献

1. Schwartz, D. A. (1997) *Arch Pathol Lab Med* **121**, 776-84.
2. Ostroff, S. M. & Kozarsky, P. (1998) *Infect Dis Clin North Am* **12**, 231-41.
3. Murphy, F. A. (1994) *Adv Virus Res* **43**, 1-52.
4. Roe, V. A. (1999) *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* **28**, 639-48.
5. Shirasaka, T., Choekijichai, S., Yamada, A., Gosselin, G., Imbach, J. L. & Mitsuya, H. (1995) *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 2555-9.
6. Schapiro, J. M., Winters, M. A., Lawrence, J. & Merigan, T. C. (1999) *Aids* **13**, 359-65.
7. Blick, T. J., Sahasrabudhe, A., McDonald, M., Owens, I. J., Morley, P. J., Fenton, R. J. & McKimm-Breschkin, J. L. (1998) *Virology* **246**, 95-103.
8. Ellis, R. W. (1999) *Vaccine* **17**, 1596-604.
9. McGee, J. R. & Kiyono, H. (1999) in *Fundamental Immunology*, ed. Paul, W. E. (Lippincott-Raven, Philadelphia), Vol. 4th, pp. 909-945.
10. Ogra, P. L. (2000) *Pediatr Infect Dis J* **19**, S4-8.
11. Cardenas-Freytag, L., Cheng, E. & Mirza, A. (1999) *Adv Exp Med Biol* **473**, 319-37.
12. Boyaka, P. N., Marinaro, M., Vancott, J. L., Takahashi, I., Fujihashi, K., Yamamoto, M., van Ginkel, F. W., Jackson, R. J., Kiyono, H. & McGhee, J. R. (1999) *Am J Trop Med Hyg* **60**, 35-45.
13. Levine, M. M. & Dougan, G. (1998) *Lancet* **351**, 1375-1376.
14. Hecht, G. (1999) *Am J Physiol* **277**, C351-8.
15. Ertl, H. C. & Xiang, Z. (1996) *J Immunol* **156**, 3579-82.
16. Ada, G. (1997) *Mol Biotechnol* **8**, 123-34.
17. FitzGerald, D. & Mersny, R. J. (2000) *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* **17**, 165-248.
18. Singh, M. & O'Hagan, D. (1999) *Nat Biotechnol* **17**, 1075-81.
19. Malhotra, A. & Krilov, L. R. (2000) *Pediatr Clin North Am* **47**, 353-72, vi-vii.
20. Thompson, A. H., McRoberts, J. G., Crowe, S. R., London, L. & London, S.

- D. (1999) *Vaccine* **17**, 1404-15.
21. Wu, H. Y. & Russell, M. W. (1997) *Immunol Res* **16**, 187-201.
 22. Kuper, C. F., Koornstra, P. J., Hameleers, D. M., Biewenga, J., Spit, B. J., Duijvestijn, A. M., van Breda Vriesman, P. J. & Sminia, T. (1992) *Immunol Today* **13**, 219-24.
 23. Mizuguchi, H., Nakanishi, M., Nakanishi, T., Nakagawa, T., Nakagawa, S. & Mayumi, T. (1996) *Br J Cancer* **73**, 472-6.
 24. Mizuguchi, H., Nakagawa, T., Toyosawa, S., Nakanishi, M., Imazu, S., Nakanishi, T., Tsutsumi, Y., Nakagawa, S., Hayakawa, T., Ijuhin, N. & Mayumi, T. (1998) *Cancer Res* **58**, 5725-30.
 25. Watabe, A., Yamaguchi, T., Kawanishi, T., Uchida, E., Eguchi, A., Mizuguchi, H., Mayumi, T., Nakanishi, M. & Hayakawa, T. (1999) *Biochim Biophys Acta* **1416**, 339-48.
 26. Nakanishi, T., Hayashi, A., Kunisawa, J., Tsutsumi, Y., Tanaka, K., Yashiro-Ohtani, Y., Nakanishi, M., Fujiwara, H., Hamaoka, T. & Mayumi, T. (2000) *Eur J Immunol* **30**, 1740-7.
 27. Hayashi, A., Nakanishi, T., Kunisawa, J., Kondoh, M., Imazu, S., Tsutsumi, Y., Tanaka, K., Fujiwara, H., Hamaoka, T. & Mayumi, T. (1999) *Biochem Biophys Res Commun* **261**, 824-8.
 28. Tashiro, M., McQueen, N. L. & Seto, J. T. (1999) *Front Biosci* **4**, D642-5.
 29. Yonemitsu, Y., Kitson, C., Ferrari, S., Farley, R., Griesenbach, U., Judd, D., Steel, R., Scheid, P., Zhu, J., Jeffery, P. K., Kato, A., Hasan, M. K., Nagai, Y., Masaki, I., Fukumura, M., Hasegawa, M., Geddes, D. M. & Alton, E. W. (2000) *Nat Biotechnol* **18**, 970-3.
 30. Gao, J., De, B. P. & Banerjee, A. K. (1999) *J Virol* **73**, 1411-8.
 31. Papi, A. & Johnston, S. L. (1999) *J Biol Chem* **274**, 9707-20.
 32. Wang, S. Z., Hallsworth, P. G., Dowling, K. D., Alpers, J. H., Bowden, J. J. & Forsyth, K. D. (2000) *Eur Respir J* **15**, 358-66.
 33. Milone, M. C. & Fitzgerald-Bocarsly, P. (1998) *J Immunol* **161**, 2391-9.

34. Csencsits, K. L., Jutila, M. A. & Pascual, D. W. (1999) *J Immunol* **163**, 1382-9.
35. Asakura, K., Saito, H., Hata, M. & Kataura, A. (1998) *Acta Otolaryngol* **118**, 859-63.
36. Asanuma, H., Aizawa, C., Kurata, T. & Tamura, S. (1998) *Vaccine* **16**, 1257-62.
37. Bangham, A. D. (1972) *Annu Rev Biochem* **41**, 753-76.
38. Yamamoto, M., Briles, D. E., Yamamoto, S., Ohmura, M., Kiyono, H. & McGhee, J. R. (1998) *J Immunol* **161**, 4115-21.
39. Yanagita, M., Hiroi, T., Kitagaki, N., Hamada, S., Ito, H. O., Shimauchi, H., Murakami, S., Okada, H. & Kiyono, H. (1999) *J Immunol* **162**, 3559-65.
40. Debard, N., Sierro, F. & Kraehenbuhl, J. P. (1999) *Semin Immunol* **11**, 183-91.
41. Hathaway, L. J. & Kraehenbuhl, J. P. (2000) *Cell Mol Life Sci* **57**, 323-32.
42. Sansonetti, P. J. & Phalipon, A. (1999) *Semin Immunol* **11**, 193-203.
43. Hassid, S., Salmon, I., Brugmans, M., Dawance, S., Kiss, R., Gabius, H. J. & Danguy, A. (1997) *Eur J Morphol* **35**, 79-86.
44. Takata, S., Ohtani, O. & Watanabe, Y. (2000) *Arch Histol Cytol* **63**, 305-12.
45. Lehr, C. M., Bouwstra, J. A., Kok, W., De Boer, A. G., Tukker, J. J., Verhoef, J. C., Breimer, D. D. & Junginger, H. E. (1992) *J Pharm Pharmacol* **44**, 402-7.
46. Huang, F. P., Platt, N., Wykes, M., Major, J. R., Powell, T. J., Jenkins, C. D. & MacPherson, G. G. (2000) *J Exp Med* **191**, 435-44.
47. Allen, P. M. & Unanue, E. R. (1984) *Immunobiology* **168**, 182-8.
48. Vidal, K., Grosjean, I., evillard, J. P., Gespach, C. & Kaiserlian, D. (1993) *J Immunol Methods* **166**, 63-73.
49. Mayer, L. & Blunberg, R. S. (1999) in *Mucosal Immunogy*, eds. ogra, P. L., Mestecky, J., Lamm, M. E., Storober, W., Bienesnstock, J. & McGhee, J. R. (Academin Press, San Diego), Vol. 2nd, pp. 365-.

50. Hershberg, R. M. & Mayer, L. F. (2000) *Immunol Today* **21**, 123-8.
51. Telega, G. W., Baumgart, D. C. & Carding, S. R. (2000) *Gastroenterology* **119**, 1548-59.
52. Steimle, V., Siegrist, C. A., Mottet, A., Lisowska-Grospierre, B. & Mach, B. (1994) *Science* **265**, 106-9.
53. Chang, C. H., Fontes, J. D., Peterlin, M. & Flavell, R. A. (1994) *J Exp Med* **180**, 1367-74.
54. Cella, M., Engering, A., Pinet, V., Pieters, J. & Lanzavecchia, A. (1997) *Nature* **388**, 782-7.
55. Pierre, P., Turley, S. J., Gatti, E., Hull, M., Meltzer, J., Mirza, A., Inaba, K., Steinman, R. M. & Mellman, I. (1997) *Nature* **388**, 787-92.
56. Pierre, P. & Mellman, I. (1998) *Cell* **93**, 1135-45.
57. Villadangos, J. A. & Ploegh, H. L. (2000) *Immunity* **12**, 233-9.
58. Shiraishi, H., Hayakawa, S. & Satoh, K. (1996) *J Clin Lab Immunol* **48**, 93-108.
59. Golding, B., Zaitseva, M. & Golding, H. (1994) *Am J Trop Med Hyg* **50**(4), 33-40.
60. Murphy, K. M., Ouyang, W., Farrar, J. D., Yang, J., Ranganath, S., Asnagli, H., Afkarian, M. & Murphy, T. L. (2000) *Annu Rev Immunol* **18**, 451-94.
61. Romagnani, S. (1991) *Int J Clin Lab Res* **21**, 152-8.
62. Jackson, R. J., Marinaro, M., VanCott, J. L., Yamamoto, M., Okahashi, N., Fujihashi, K., Kiyono, H., Chatfield, S. N. & McGhee, J. R. (1996) *J Biotechnol* **44**, 209-16.
63. Takatsu, K. (1997) *Proc Soc Exp Biol Med* **215**, 121-33.
64. Husband, A. J., Bao, S. & Beagley, K. W. (1999) *Vet Immunol Immunopathol* **72**, 135-42.
65. Mestecky, J. & McGhee, J. R. (1987) *Adv Immunol* **40**, 153-245.
66. Slater, J. & Hannant, D. (2000) *Vet Clin North Am Equine Pract* **16**, 49-68.
67. Nakanishi, T., Kunisawa, J., Hayashi, A., Tsutsumi, Y., Kubo, K., Nakagawa,

- S., Nakanishi, M., Tanaka, K. & Mayumi, T. (1999) *J Controlled Release* **61**, 233-40.
68. Nakanishi, T., Kunisawa, J., Hayashi, A., Tsutsumi, Y., Kubo, K., Nakagawa, S., Fujiwara, H., Hamaoka, T. & Mayumi, T. (1997) *Biochem Biophys Res Commun* **240**, 793-7.
69. Wassef, N. M., Alving, C. R. & Richards, R. L. (1994) *Immunomethods* **4**, 217-22.
70. Gregoriadis, G., McCormack, B., Obrenovic, M., Saffie, R., Zadi, B. & Perrie, Y. (1999) *Methods* **19**, 156-62.
71. Almeida, A. J. & Alpar, H. O. (1996) *J Drug Target* **3**, 455-67.
72. de Haan, A., Geerligs, H. J., Huchshorn, J. P., van Scharrenburg, G. J., Palache, A. M. & Wilschut, J. (1995) *Vaccine* **13**, 155-62.
73. Eyles, J. E., Williamson, E. D. & Alpar, H. O. (1999) *Int J Pharm* **189**, 75-9.
74. McDermott, M. R., Heritage, P. L., Bartzoka, V. & Brook, M. A. (1998) *Immunol Cell Biol* **76**, 256-62.
75. Hiroi, T., Yanagita, M., Iijima, H., Iwatani, K., Yoshida, T., Takatsu, K. & Kiyono, H. (1999) *J Immunol* **162**, 821-8.
76. Hiroi, T., Yanagita, M., Ohta, N., Sakaue, G. & Kiyono, H. (2000) *J Immunol* **165**, 4329-37.
77. Yoshikai, Y. (1999) *Immunol Res* **20**, 219-35.
78. Saif, L. J. (1996) *Vet Immunol Immunopathol* **54**, 163-9.
79. Shields, J. W. (2000) *Lymphology* **33**, 47-57.
80. Kerneis, S. & Pringault, E. (1999) *Semin Immunol* **11**, 205-15.
81. Mayer, L. (1997) *Aliment Pharmacol Ther* **11 Suppl 3**, 81-5; discussion 85-8.
82. Adachi, S., Yoshida, H., Honda, K., Maki, K., Saijo, K., Ikuta, K., Saito, T. & Nishikawa, S. I. (1998) *Int Immunol* **10**, 1-6.
83. Adachi, S., Yoshida, H., Kataoka, H. & Nishikawa, S. (1997) *Int Immunol* **9**, 507-14.

84. Matsumoto, M., Fu, Y. X., Molina, H. & Chaplin, D. D. (1997) *Immunol Rev* **156**, 137-44.
85. Mayrhofer, G. (1997) *Gut* **41**, 707-9.
86. Yamamoto, M., Rennert, P., McGhee, J. R., Kweon, M. N., Yamamoto, S., Dohi, T., Otake, S., Bluethmann, H., Fujihashi, K. & Kiyono, H. (2000) *J Immunol* **164**, 5184-91.
87. Jones, D. H., McBride, B. W. & Farrar, G. H. (1996) *J Biotechnol* **44**, 29-36.
88. Jung, T., Kamm, W., Breitenbach, A., Kaiserling, E., Xiao, J. X. & Kissel, T. (2000) *Eur J Pharm Biopharm* **50**, 147-60.
89. Nakase, H., Okazaki, K., Tabata, Y., Uose, S., Ohana, M., Uchida, K., Matsushima, Y., Kawanami, C., Oshima, C., Ikada, Y. & Chiba, T. (2000) *J Pharmacol Exp Ther* **292**, 15-21.
90. Okada, H., Doken, Y., Ogawa, Y. & Toguchi, H. (1994) *Pharm Res* **11**, 1143-7.
91. O'Hagan, D. T., Jeffery, H., Roberts, M. J., McGee, J. P. & Davis, S. S. (1991) *Vaccine* **9**, 768-71.
92. Tabata, Y., Inoue, Y. & Ikada, Y. (1996) *Vaccine* **14**, 1677-85.
93. Eldridge, J. H., Meulbroek, J. A., Staas, J. K., Tice, T. R. & Gilley, R. M. (1989) *Adv Exp Med Biol* **251**, 191-202.
94. Yoshida, H., Honda, K., Shinkura, R., Adachi, S., Nishikawa, S., Maki, K., Ikuta, K. & Nishikawa, S. I. (1999) *Int Immunol* **11**, 643-55.
95. Liu, L. M. & MacPherson, G. G. (1993) *J Exp Med* **177**, 1299-307.
96. Kelsall, B. L. & Strober, W. (1996) *J Exp Med* **183**, 237-47.
97. Kelsall, B. L. & Strober, W. (1997) *Res Immunol* **148**, 490-8.
98. Iwasaki, A. & Kelsall, B. L. (1999) *J Exp Med* **190**, 229-39.
99. Iwasaki, A. & Kelsall, B. L. (1999) *Am J Physiol* **276**, G1074-8.
100. Iwasaki, A. & Kelsall, B. L. (2000) *J Exp Med* **191**, 1381-94.
101. Geijtenbeek, T. B., Kwon, D. S., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Middel, J., Cornelissen, I. L., Nottet, H. S.,

- KewalRamani, V. N., Littman, D. R., Figdor, C. G. & van Kooyk, Y. (2000) *Cell* **100**, 587-97.
102. Frey, A. & Neutra, M. R. (1997) *Behring Inst Mitt*, 376-89.
103. Beier, R. & Gebert, A. (1998) *Am J Physiol* **275**, G130-7.
104. Kovacsovics-Bankowski, M., Clark, K., Benacerraf, B. & Rock, K. L. (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 4942-6.
105. Mitchell, D. A., Nair, S. K. & Gilboa, E. (1998) *Eur J Immunol* **28**, 1923-33.
106. Mora, A. L. & Tam, J. P. (1998) *J Immunol* **161**, 3616-23.
107. Akiyama, Y., Nagahara, N., Kashihara, T., Hirai, S. & Toguchi, H. (1995) *Pharm Res* **12**, 397-405.
108. Akiyama, Y., Nagahara, N., Nara, E., Kitano, M., Iwasa, S., Yamamoto, I., Azuma, J. & Ogawa, Y. (1998) *J Pharm Pharmacol* **50**, 159-66.
109. Nagahara, N., Akiyama, Y., Nakao, M., Tada, M., Kitano, M. & Ogawa, Y. (1998) *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 2492-4.
110. Bouillot, P., Babak, V. & Dellacherie, E. (1999) *Pharm Res* **16**, 148-54.
111. Bezemer, J. M., Radersma, R., Grijpma, D. W., Dijkstra, P. J., van Blitterswijk, C. A. & Feijen, J. (2000) *J Control Release* **67**, 249-60.
112. Pignatello, R., Consoli, P. & Puglisi, G. (2000) *J Microencapsul* **17**, 373-83.
113. Peppas, N. A. & Sahlin, J. J. (1996) *Biomaterials* **17**, 1553-61.
114. Vyas, S. P., Venugopalan, P., Sood, A. & Mysore, N. (1997) *Pharmazie* **52**, 339-45.

