The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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

【13】

氏　　名	國澤　純（くにさわ　じゅん）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学位記番号	第　16160　号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	**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**
論文審査委員	（主査） 教授　真弓　忠範 （副査） 教授　前田　正知　　教授　山元　弘　　教授　馬場　明道

論文内容の要旨

近年、全身系とは異なる免疫機構を有することで話題となっている粘膜免疫は基礎医学、臨床医学の両分野において精力的な研究がなされている。昨今問題となっているAIDSやO−157などの新興・再興感染症の多くが粘膜を介し感染することにより発症することを考慮すると、粘膜面に存在する免疫機構に抗原特異的免疫応答を誘導することで感染を初期の段階で防ぐということは極めて有効な手段であると考えられる。このような概念のもと、抗原の経口・経鼻投与といった粘膜を介した免疫方法で投与部位や遠隔の粘膜面、さらには全身面に存在する免疫機構に抗原特異的免疫応答を惹起しようとする粘膜ワクチンが注目されている。これら粘膜ワクチンを安全でかつ効率のよいワクチン療法として確立する手段として、粘膜面において抗原を分解から回避しつつ目的の部位へ送達するためのDrug Delivery System（DDS）技術の開発が注目されている。そこで申請者は、膜融合リポソーム、ポリ乳酸マイクロスフェアー、Adhesive Micromatrix System（AdMMS）という3種類のDDS技術を用い、粘膜面における抗原の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。

膜融合リポソームはセンダイウイルスの細胞膜融合能を付与したリポソームであり、これまでに*in vitro*、*vivo*を問わずリポソーム内封物を細胞内に効率よく導入できることを見いだしている。これらの*in vivo*での従来の検討は主に皮下投与など注射による投与を行った際のものであったが、センダイウイルスが本来気道粘膜に感染するウイルスであることから、膜融合リポソームは粘膜を介した抗原キャリアーとしても有効に機能し得ると期待された。そこでモデル抗原にFITC標識デキストランを用い経鼻投与後の動態を検討することで、膜融合リポソームの鼻腔リンパ組織への抗原送達能を評価した。その結果、膜融合リポソームを用いることにより、FITC標識デキストラン単独投与群や膜融合活性をもたないリポソームを用い投与した群に比べ非常に強い蛍光が鼻腔リンパ組織の上皮細胞や抗原提示細胞、M細胞で観察され、膜融合リポソームが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。さらに膜融合リポソームにより導入された抗原がMHC分子を介して抗原提示されること、ならびに膜融合リポソームが粘膜上皮細胞に対しMHC分子の発現を増強することが確認された。この高い抗原送達能と抗原提示促進の結果を反映し、膜融合リポソームを用い抗原を経鼻投与することで投与部位の粘膜面はもちろん遠隔の粘膜面、さらにはこれら粘膜面のみならず全身系免疫組織にも抗原特異的抗体産生が誘導されていた。さらにはこれら抗体産生に加えて、ウイルス感染細胞排除に中心的な役割を担っている細胞傷害性T細胞の誘導も認められ、膜融合リポソームが粘膜面と全身面の両部位において抗体産生と細胞傷害性T細胞の両システムを顕著に誘導可能な優れた経鼻ワクチンキャリアー

であることが示された。

一方、小腸にはパイエル板と呼ばれるリンパ組織が存在しており、小腸における免疫誘導組織として機能している。近年、パイエル板形成に必要なシグナルを阻害することでパイエル板を欠損させたマウスが作製され、溶液状態の抗原を経消化管免疫した場合はパイエル板欠損マウスにおいても免疫誘導されること、すなわちパイエル板非依存的免疫誘導経路が存在することが示された。さてポリ乳酸マイクロスフェアーは経口ワクチンのキャリアーとして古くから研究されている。特に粒子径8 μmのものはパイエル板に効率よく取り込まれることで免疫誘導効果が高いといわれているが、パイエル板欠損マウスを用いたパイエル板非依存的な免疫誘導経路については検討されていない。そこでポリ乳酸マイクロスフェアーを用いた経消化管免疫誘導におけるパイエル板の役割についてIL－7レセプターα鎖抗体を胎児期に投与することによりパイエル板を欠損させたマウスを用い検討を行った。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ーを用いた経消化管免疫により誘導される抗原特異的免疫応答が抗体産生、ヘルパーT細胞応答とも著しく減弱していた。本結果はパイエル板を介しポリ乳酸マイクロスフェアーが生体内に取り込まれることで免疫誘導されるという従来の説を支持するものであった。さらに正常マウスに経消化管免疫した際に誘導されるヘルパーT細胞応答について検討したところ、溶液状態の抗原とポリ乳酸マイクロスフェアーに封入した抗原を免疫した場合では誘導されてくるヘルパーT細胞のタイプが変化することが確認された。以上の結果より、抗原の形態（粒子状、溶液状）が異なることにより取り込み経路が変わり、その為にその後の免疫応答が変化することが示唆され、今後この様なDDS技術を用いた免疫応答制御への応用が期待された。

さてAdMMSは粘膜付着性高分子をマイクロスフェアーに組み込んだものであり、従来のマイクロスフェアーに比べ高い消化管滞留性を有していることが知られている。この技術を粘膜ワクチン用DDSとして応用することで、すなわちAdMMSにより粘膜面において効果的に抗原を放出することにより免疫誘導能に優れた粘膜ワクチンシステムが提示できるものと期待される。またこれらの粒子は構成組成が異なると放出性などが変化することが知られている。そこで各種組成を有するAdMMSを作製し、経粘膜キャリアーとして応用することにより、製剤特性と免疫誘導能の連関について検討するとともにAdMMSの経粘膜ワクチンキャリアーとしての有用性を評価した。まず製剤特性について検討したところ、AdMMSにおいても同様に組成変化により抗原の放出性、粒子の安定性、消化管内の滞留性が変化することが確認された。次にこれら製剤特性の異なるAdMMSを用い経消化管免疫した際の免疫誘導能を比較したところ、抗原の放出性と消化管内における滞留性のバランスが最も優れていたものが最も高い抗体産生誘導を示した。以上の結果より、抗原の放出性や小腸内での滞留性といった製剤特性が免疫誘導能に影響を与える重要な因子の一つであること、さらに適切な組成を有するAdMMSが優れた経粘膜ワクチンキャリアーとなり得ることが示された。以上、申請者は膜融合リポソーム、ポリ乳酸マイクロスフェアー、AdMMSという3種類のDDS技術を用い、粘膜面における抗原の動態特性と免疫誘導能が密接な関係を有していること、さらに膜融合リポソームやAdMMSが新規経粘膜ワクチンキャリアーとして優れた機能を有していることを提示し、粘膜ワクチンにおけるDDS技術の有用性を明確に示した。

論文審査の結果の要旨

粘膜ワクチンは抗原投与部位である粘膜面のみならず、他の遠隔の粘膜面、さらには全身系免疫組織にも抗原特異的免疫応答が誘導できることが知られている。したがって、粘膜ワクチンは病原体の初発感染防御に働く粘膜系免疫システムと、万一感染が成立した際の排除機構である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ことから次世代型ワクチン療法として注目されている。しかしながら、ワクチン抗原を単独に経粘膜投与しても、生体内への取り込み効率の低さや安定性のなさといった諸問題により、十分な効果は得られておらず、これら問題点を解決する技術の開発が切望されている。

著者はこれらの観点より、膜融合リポソーム、ポリ乳酸マイクロスフェアー、粘膜付着性マイクロマトリックスといったDDS技術を用いて、粘膜面における抗原分子の動態と粘膜ワクチン効果の連関を詳細に評価し、効果的な粘膜ワクチン開発に向けたDDS技術の有用性を検討した。その結果、以下の成果が得られた。

1）膜融合リポソームはM細胞、鼻腔上皮細胞、Mac－1陽性細胞など、鼻腔リンパ組織への高い抗原送達能を有していることを明らかにした。

2）膜融合リポソームは粘膜上皮細胞のMHC class Ⅱ分子の発現を増強するというアジュバント活性を有していることを示した。

3）膜融合リポソームによって細胞内に導入された抗原は、マクロファージおよび粘膜上皮細胞のMHC class Ⅱ分子を介して抗原提示されることが判明した。

4）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、抗原特異的ヘルパーT細胞応答や抗体産生、細胞傷害性T細胞が効率よく誘導されることを認め、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示された。

5）ポリ乳酸マイクロスフェアー、粘膜付着性マイクロマトリックスを用いた検討から、抗原の形態（粒子状／溶液状）および、抗原の溶出性、小腸における粒子の滞留性などの製剤特性が免疫応答に重要な影響を与えることを示した。

以上の成果は、粘膜ワクチンにおけるDDS技術の有用性を明らかにしたものであり、今後の新規ワクチン開発に新しい方向性を提示しており、博士（薬学）の学位を授与するにふさわしいものと考える。