The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	経鼻ワクチンの可能性 : 鼻咽腔関連リンパ組織より誘導される粘膜免疫は細菌付着と炎症性サイトカイン産生を抑制する
Author(s)	柳田, 学
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3155297
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【5】

氏　　名	柳田　学（やなぎた　まなぶ）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学位記番号	第　14543　号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科歯学臨床系専攻
学位論文名	**「経鼻ワクチンの可能性：鼻咽腔関連リンパ組織より誘導される粘膜免疫は細菌付着と炎症性サイトカイン産生を抑制する」**
論文審査委員	（主査） 教　授　岡田　宏 （副査） 教　授　浜田　茂幸　　講　師　岩本　容泰　　講　師　永田　英樹

論文内容の要旨

経粘膜免疫法は全身性と粘膜系免疫システム両方を活性化して生体に二段構えの防御バリアーを構築できる。経鼻免疫法は経口免疫法と比較して非常に少量の抗原投与で粘膜組織に免疫誘導することが可能であり，かつ免疫誘導される組織が広範囲に及ぶという報告があり現在注目を浴びつつある，鼻腔には鼻咽腔関連リンパ組織（NALT）が存在し頭頸部粘膜組織における粘膜免疫誘導組織と考えられている。しかしながら現在までNALTとその周辺組織の抗原特異的免疫応答の誘導・制御機構に関してくわしく検討されていない。経鼻ワクチン開発という観点から経鼻免疫によって惹起される抗原特異的免疫応答に関する詳細な解析を行うことが必要である。そこで本研究において経鼻免疫法により誘導される抗原特異的免疫応答を解析し，さらに経鼻免疫法により誘導された抗原特異的免疫応答による粘膜上皮細胞への細菌の付着抑制能を解析し口腔・鼻腔領域における感染症に対する予防効果を検討した。

抗原として歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis*（*P.g*）381の線毛蛋白を，粘膜アジュバントであるコレラトキシン（CT）を併用して8週齢のBALB／cマウスに0，7，14日に経鼻免疫（*P.g*線毛蛋白10μg＋CT1μg），または経口免疫（*P.g*線毛蛋白200μg＋CT20μg）した。21日目にマウスより唾液，鼻腔洗浄液，血清，糞便を採取しELISA法にて抗原特異的抗体価を測定した。また脾臓，パイエル板，鼻腔粘膜（NP），顎下線（SMG），小腸粘膜固有層より単核球を分離しELISPOT法により抗原特異的抗体産生細胞数を測定した。さらにNALT, NP, SMGより$CD4^+$T細胞を分離し線毛蛋白と抗原提示細胞をともに96時間培養して線毛特異的$CD4^+$T細胞によるTh1・Th2型サイトカインの発現をELISA法とRT-PCR法により検討した。次に*P.g*と口腔上皮細胞（KB）の共培養による細菌付着実験を応用し，経鼻免疫により誘導された抗原特異的IgA抗体の予防効果について検討をおこなった。[^{3}H]チミジン標識した*P.g*を経鼻免疫したマウスもしくは非免疫マウスより採取した唾液1／10を含むDMEM中に懸濁しKB細胞と1.5時間付着反応させて，反応終了後KB細胞を溶解させてその放射活性を測定した。加えて経鼻免疫したマウスの顎下腺より線毛特異的IgAモノクローナル抗体を樹立した。そして得られた線毛特異的IgAモノクローナル抗体を用いて上記と同じ細菌付着抑制実験をおこなった。さらに細菌付着抑制効果を上皮細胞による炎症性サイトカイン産生量を計測することで評価した。すなわちKB細胞と*P.g*を線毛特異的IgAモノクローナル抗体もしくはアイソタイプコントロール抗体存在下で1.5時間共培養した後新鮮なDMEMに置換してさらに24時間KB細胞を培養しその培養上清中の炎症性サイトカインをELISA法で測定した。

まずはじめに血清，分泌液中の抗原特異的抗体価をELISA法にて測定した。その結果，経鼻免疫法は経口免疫法

と比較して唾液並びに鼻腔洗浄液中への抗原特異的IgA抗体の誘導に有効であった。次いで粘膜系および全身系臓器より単核球を分離しELISPOT法により抗原特異的抗体産生細胞数を測定したところNP,SMGでは抗原特異的IgA抗体産生細胞が経鼻免疫法により高頻度で誘導された。経鼻免疫により口腔・鼻腔粘膜面に強い線毛特異的IgA免疫応答が誘導されるという上記の結果からこれらの抗体産生を調節すると考えられる線毛特異的Th細胞の免疫応答（例：Th1型・Th2型サイトカイン産生）の解析をELISA法とRT-PCR法により行った。Th1型（IFN-γ，IL-2）サイトカイン産生抗原特異的$CD4^+$T細胞はNALTではほとんど認められずNP,SMGでのみ検出された。Th2型サイトカインに関してもIgA誘導組織（NALT）とIgA実効組織間において異なる産生プロファイルが認められた。NALTにおいてはアイソタイプクラススイッチングに関与するIL-4を選択的に発現していた。逆に実効組織であるNP,SMGから分離した抗原特異的$CD4^+$T細胞はIgA賦活型サイトカイン（IL-5,IL-6,IL-10）を選択的に産生していた。これらの結果はIgA誘導組織であるNALTにおけるアイソタイプクラススイッチング，そしてNPとSMGなどの実効組織ではIgA前駆B細胞が形質細胞化するために必要なサイトカインを供給するTh2型細胞群が各々誘導されている。次いで経鼻免疫により誘導された抗原特異的免疫応答が実際に上皮細胞への細菌の付着を抑制し得るかを検討するため*P.g*の上皮細胞への付着抑制実験を行った。その結果，経鼻免疫したマウスから得た唾液では約20%の細菌付着抑制効果が認められた。さらに樹立した数種類の線毛特異的IgAモノクローナル抗体は*P.g*のKB細胞への付着を30-70%抑制した。また線毛特異的IgAモノクローナル抗体は同細菌の上皮細胞への付着を抑制することにより上皮細胞の炎症性サイトカイン（IL-6,IL-8,MCP-1）産生量を抑制した。これらの結果は経鼻免疫法によって誘導された線毛特異的IgA抗体には細菌の上皮細胞への付着抑制能力を有することを示唆している。

以上の結果から経鼻免疫法は口腔・鼻腔領域に抗原特異的免疫応答を誘導するのに有効な免疫法であることが明らかになった。またNALTが重要なIgA誘導組織であることが示唆された。さらに経鼻免疫法で誘導された線毛特異的IgA抗体にはP.gの上皮細胞への付着を阻止し，炎症性サイトカイン産生を阻害することから炎症の予防効果も期待できる。すなわち，我々が得た知見は口腔・鼻腔領域における感染症に対する経鼻ワクチンの開発に有益な新情報を提供したと思われる。

論文審査の結果の要旨

本研究は歯周病原性細菌である*Porphyromonas gingivalis*の線毛蛋白を抗原として，粘膜アジュバントとともに経鼻免疫して誘導される抗原特異的免疫応答を解析したものである。

その結果，経鼻免疫法は経口免疫法と比較して口腔・鼻咽腔領域に抗原特異的IgA抗体産生をより効果的に誘導した。さらに*P.gingivalis*感染に及ぼす抗原特異的IgA抗体の影響を調べるため線毛特異的IgAモノクローナル抗体を作製し，同抗体が*P.gingivalis*の口腔粘膜上皮への付着を阻止することを明らかにした。

以上の知見は口腔・鼻咽腔領域における感染症に対する予防法としてのワクチンの開発に有益な新情報を提供するものであり，本研究は博士の学位請求に十分値するものと認める。