



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

①

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

大阪大学歯学部口腔治療学講座
柳田学

(指導：岡田 宏 教授)

大阪大学歯学部口腔治療学講座（主任：岡田宏教授）

本論文の要旨は、第26回日本免疫学会総会（平成8年11月、横浜）、第41回秋期日本歯周病学会学術大会（平成10年10月、東京）、第28回日本免疫学会総会（平成10年12月、神戸）において発表した。

緒言

口腔をはじめとして呼吸器、消化器、泌尿生殖器を被う粘膜面に免疫応答を誘導するには、抗原の皮下もしくは筋肉内投与ではなく経口投与に代表される粘膜面を介しての抗原投与が有効であることが知られている¹⁴⁾。従来用いられている注射免疫(例:筋肉内投与)では全身系免疫機構に効果的に免疫を誘導できるが粘膜免疫系を活性化することは困難であった。ヒトの日常生活の中で、呼吸、消化、吸収という生理現象の過程を通して種々の病原微生物やアレルゲン(花粉、粉塵、食物)が粘膜面を介して体内に取り込まれている。そこで粘膜面に予め病原微生物やアレルゲンに対する免疫を誘導することにより、宿主に悪影響を及ぼす異物の侵入を阻止することが、生体防御にとって必要となってくる。同時に第一線の防御バリアーである粘膜免疫系で異物の侵入を防げなかった場合に全身系免疫機構にも抗原特異的免疫応答が誘導されていることは、生体防御という観点から非常に重要である。つまり粘膜系と全身系の二段階の防御機能を誘導するワクチンの開発が期待される。そこで注目されるのが粘膜系と全身系両者の免疫系を誘導・制御できる粘膜面を介した抗原の投与、すなわち粘膜ワクチンの概念がこれからのワクチン開発の上で重要であると考えられている。

粘膜面を介して抗原を投与すると腸管に散在する腸管関連リンパ組織: gut associated lymphoreticular tissue (GALT)や鼻腔に存在する鼻咽腔関連リンパ組織: nasopharyngeal associated lymphoreticular tissue (NALT)、気管に存在する気管支関連リンパ組織: bronchus associated lymphoreticular tissue (BALT)といったIgA誘導組織と呼ばれる組織で抗原感作がおこなわれる⁴⁾。ここで活性化された各種免疫担当細胞が血液循環系を介して全身のIgA実効組織に到達する。代表的なIgA実効組織には、消化管粘膜組織の粘膜固有層や涙腺、唾液腺などの腺組織があり、同局所で産生されたIgA抗体が上皮細胞より産生される分泌成分(secretory component: SC)をともなって管腔外へ分泌型IgA (Secretory IgA: S-IgA)となっ

て運搬される。この誘導組織における抗原感作から実効組織粘膜面での S-IgA 産生の一連のメカニズムは IgA 循環帰巢経路(common mucosal immune system : CMIS)と呼ばれている⁴⁾。しかしながら、蛋白抗原を粘膜面に単独で投与しても抗原特異的な S-IgA 免疫応答はほとんど誘導されない。抗原特異的 S-IgA 抗体を中心とした粘膜免疫応答を適確にかつ効果的に誘導するには抗原とともに粘膜アジュバントもしくは粘膜免疫調節因子と呼ばれる免疫活性化物質を併用しなければならない^{5,6)}。

粘膜アジュバント/調節因子として代表的なものにコレラ菌(*Vibrio cholerae*)が産生する外毒素であるコレラトキシン(cholera toxin : CT)があり現在までに粘膜アジュバントとして実験動物では広く用いられ粘膜免疫誘導システムの解明に貢献してきた¹⁻⁶⁾。つまり CT を蛋白抗原と共に経粘膜的に投与することにより抗原特異的分泌型 IgA や全身系 IgG の誘導を高めることができる^{7,8)}。この CT の粘膜アジュバント効果については現在活発な研究が進行中であり、まだ細胞・分子レベルでは未解明な部分が多い。しかし最近の報告によれば CT は粘膜系の CD4 陽性 T 細胞に IgA や IgG の誘導を支持する Th2 型サイトカインである IL-4、IL-5、IL-6 の産生を選択的に誘導する^{7,8)}。さらに CT は抗原提示細胞上に発現する T 細胞の活性化に不可欠な副刺激因子を導入する B-7 ファミリーの発現を調節し得ることなどが示された⁹⁾。しかしながら、これらの事実だけでは CT の粘膜アジュバント機構のメカニズムを説明することはできず、今後細胞内シグナル伝達系への影響も含めて詳細な検討が必要である。

経粘膜免疫法の投与経路としては飲むもしくは食べる経口免疫法、鼻から吸入させる経鼻免疫法、もしくは経肛門免疫法が考えられる。さらに最近増加している性行為を介した感染症予防の観点から経膣免疫法などに代表される生殖器粘膜を介したワクチン抗原の投与も考えられる。これらの経粘膜免疫法の中でも経口免疫法による抗原特異的免疫応答の誘導・制御機構についてはよく研究されているが、その

他の経粘膜免疫法に関してはその機構解明のための細胞・分子レベルでの研究はあまり進んでいないのが現状である。

鼻腔には先述の鼻咽腔関連リンパ組織 (NALT) とよばれるリンパ球の集簇が認められる¹⁰⁾。この組織はマウスでは鼻腔の左右に一对あり下側壁に前後にのびて存在し上皮細胞層を介して鼻腔と接する。NALT 及び鼻腔粘膜固有層の解析は形態学的、組織学的解析以外ほとんど行われていなかったが最近我々は正常マウスの NALT 及び鼻腔粘膜固有層(nasal passage : NP)に存在する単核球の分離を試み、T 細胞、B 細胞レベルの解析を行ない、NALT と NP では各種免疫担当細胞の存在比率や性状に明確な差があることを明らかにした¹¹⁾。経鼻ワクチンの開発ということ考えると鼻腔及びその周辺の局所の粘膜免疫機構による抗原特異的免疫応答の誘導・制御システムをより詳細に検討する必要がある。本研究ではワクチン抗原として歯周病原性細菌である *Porphyromonas gingivalis* の線毛蛋白を使用し、さらに粘膜アジュバントとして CT を併用してマウスに経鼻免疫し、誘導されてくる抗原特異的免疫応答について誘導・実効組織の観点から解析、検討した。その効果について現在までに解析の進んでいる経口免疫法と比較検討した。さらに経鼻ワクチンにより誘導された抗原特異的免疫応答が実際に歯周病原性細菌の上皮細胞への付着を抑制し感染防御の役割を果たし得るかを検討した。

材料及び方法

1. 実験動物

実験動物として、生後8週齢の雌性 BALB/c マウス(日本チャールスリバー株式会社, 厚木) を1群10匹として用いた。

2. 抗原蛋白

本研究に用いた *P. gingivalis* 381 線毛保有株の培養はヘミン(5mg/L: 和光純薬、大阪)及びメナジオン(1mg/L: 和光純薬)を添加した GAM ブイヨン (日水製薬、東京) を使用した。嫌気チャンバー(Model 1024, Forma Scientific, Marietta, Ohio, U.S.A.)を用いて、5%CO₂、5%H₂、90% N₂ 混合ガスによる嫌气的条件下で 37°C、26時間培養した。*P. gingivalis* 381 株菌体からの線毛の分離並びに精製は Ogawa らの記載にもとづいて行った¹²⁾。すなわち *P. gingivalis* 381 株菌体を 0.15M NaCl 及び 10mM MgCl₂ を含む 20mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.4)に懸濁し、ピペッティングにより機械的に菌体より線毛を剥離した。遠心により菌体を除去した後、上清の 40%飽和硫酸アンモニウム沈澱物を 20mM トリス塩酸緩衝液 (pH8.0)で平衡化した DEAE-Sepharose Fast Flow (Pharmacia Fine Chemical, Uppsala, Sweden) に供した。同緩衝液 (pH 8.0)で未吸着画分を溶出した後、0.15M NaCl を含む 20mM トリス塩酸緩衝液(pH 8.0)により線毛を溶出した。線毛含有画分を 50%飽和硫酸アンモニウムを用いて沈澱させ、少量の 20mM トリス塩酸緩衝液 (pH8.0)に再懸濁し、同緩衝液に対して透析し、透析内液を精製線毛蛋白溶液として用いた。線毛蛋白濃度の測定は BCA 蛋白測定キット(Pierce, Rockford, Ill., U.S.A.)を用いて、ウシ血清アルブミン(BSA Fraction V; Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., U.S.A.)を標準蛋白として行った。精製された線毛のサブユニット蛋白であるフィンブリリンはドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)法により 41kDa の単一バンドとして確認された^{12,13)}。

3. 免疫スケジュール

経鼻免疫群ではマウス一匹あたり 10 μ g の線毛蛋白に 1 μ g のコレラトキシン(CT) を添加したものを 5 μ l ずつ、0、7、14 日目に 投与した。一方経口免疫群ではまず 2 時間の絶食の後、500 μ l の 7.5% の重炭酸ナトリウムと Hank's balanced salt solution (HBSS ; Gibco BRL) の混合液 (3 : 1) を経口ゾンデ (フチガミ器械店、京都) を用いての胃内挿管法により投与し胃酸を中和した。さらにその 30 分後 200 μ g の線毛蛋白に 20 μ g の CT を添加したものを経口ゾンデを用いて 500 μ l ずつ、経鼻免疫群と同様のスケジュールで 経口投与した⁷⁾。

4. 血清及び分泌液の採取

免疫前ならびに免疫後 7、14 日目に血清と唾液の採取を行った。血清の採取はケタミン(2.5mg/匹) 麻酔下で眼窩下静脈叢より微量採血管 (テルモ、東京) を用いて採血し、12,000rpm、10 分の遠心分離によって血清を分離した。また唾液は塩酸ピロカルピン (和光純薬、5 μ g/g 体重) を腹腔内に注射した後、誘発分泌される唾液をパスツールピペットを用いて採取し、10,000rpm、10 分の遠心分離によりデブリスを除去したものをサンプルとした^{11,13,14)}。免疫後 21 日目に血清、唾液のほか、糞便抽出液と鼻洗浄液を採取した。採取した糞便 0.1g あたり 1ml の PBS で懸濁し 10,000rpm、10 分の遠心分離を行なうことによりその上清を糞便抽出液とした^{11,14)}。鼻洗浄液は頸椎脱臼後のマウス頸部を切断し鼻咽腔より鼻孔にむけて 500 μ l の PBS を注入し、鼻孔より流出した液を回収、遠心してその上清を鼻洗浄液とした¹¹⁾。採取した血清並びに各種分泌液は抗体価の測定まで -20 $^{\circ}$ C で凍結保存した。

5. 血清及び分泌液中の抗体価測定

血清及び分泌液中の *P. gingivalis* 線毛特異的抗体価の測定を ELISA 法を用いて免疫グロブリンクラス別に行った^{11,13}。すなわち PBS に溶解した線毛蛋白(5µg/ml) を 96 ウェル平底 ELISA プレート(Nunc, Roskilde, Denmark)に各ウェルに 100µl ずつ分注した後、4°C、16 時間静置して吸着させた。PBS で 4 回洗浄後ブロックエース (雪印乳業、札幌) を各ウェルに 200µl ずつ分注した後、37°C、2 時間静置しブロッキングを行なった。PBS で 3 回洗浄後 10%ブロックエースで段階希釈した被験血清及び分泌液を各々 100µl ずつ各ウェルの分注し、37°C、2 時間反応させた。その後 PBS で 4 回洗浄することにより未吸着画分を除去した後、0.05%Tween 20 (和光純薬) を含む PBS (PBS-T)で 4000 倍に希釈したビオチン標識ヤギ抗マウス IgM [µ鎖特異的; Southern Biotechnology Associates (SBA); Birmingham, AL., U.S.A.], IgG (γ鎖特異的; SBA) 並びに IgA (α鎖特異的; SBA) 抗体を用いて各々 100µl ずつ各ウェルに加え 37°C、2 時間静置した。PBS-T で 4 回洗浄後、PBS-T で 2000 倍に希釈したストレプトアビジン結合西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ (HRP-streptoavidin: Gibco BRL; Gaithersburg, MD., U.S.A.) を各々 100µl ずつ各ウェルの分注して室温、1 時間静置した。PBS で 4 回洗浄後、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (TMB; Moss Inc., Pasadena, MD, U.S.A.) を 50µl ずつ各ウェルに加え室温、15 分発色反応させた。ついで 50µl の 0.5N HCl で反応を停止させ、マイクロプレート光度計 (Model 450, Bio-Rad; Hercules, CA., U.S.A.) の 450nm における励起波長を用いて測定を行った。

6. 各組織中の単核球の分離

脾臓、NALT の細胞を #400 金属メッシュにて機械的に分散後 10%牛胎児血清 (FBS; JRH BIOSCIENCE, Lenexa, KS., U.S.A.) を含む RPMI 1640 (Gibco BRL) 培養

液に浮遊した。同浮遊液を 1,300rpm、4°C、10 分間遠心洗浄後、沈渣に赤血球溶血試薬 (Ortho mune Lysing Reagent ; オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス、東京) を加え 4°C、5 分間静置し RPMI 1640 培養液を加え 1,300rpm、4°C、10 分間遠心洗浄後 10% FBS を含む RPMI 1640 培養液中に再浮遊した。摘出した鼻腔粘膜 (NP)、顎下腺 (submandibular gland: SMG)、パイエル板 (Peyer's patch: PP)、小腸粘膜固有層 (lamina propria of small intestine: LP) の各々の組織より単核細胞を分離する目的で酵素処理分離法を利用した^{11,15,16)}。つまり、各組織をコラゲナーゼ (type IV; Sigma) を含む RPMI 1640 培養液中で 37°C、30 分間攪拌処理を行なった。得られた単核細胞を RPMI 1640 培養液で洗浄した後、PP 単核細胞群に関しては 10% FBS を含む RPMI 1640 培養液中に再浮遊した。その他の組織より分離した単核細胞群については Percoll (Pharmacia) を用いた比重遠心法により精製分離し RPMI 1640 培養液で洗浄した後 10% FBS を含む RPMI 1640 培養液中に再浮遊した。

7. 抗原特異的抗体産生細胞数の算出

各組織より分離した単核細胞中の *P. gingivalis* 線毛に対する特異抗体産生細胞数の測定ならびに抗体アイソタイプ/サブクラスの同定は ELISPOT 法を用いて行った^{12,17)}。すなわち精製線毛を 25 μ g/ml になるように PBS に溶解させ、96 ウェルニトロセルロースプレート (Millititer HA; Millipore Co., Bedford, MA, U.S.A.) に 50 μ l ずつ分注し 4°C、16 時間静置し、抗原をプレートにコートした。PBS で 3 回洗浄後、10% FBS 含有 RPMI 1640 培養液を加え 37°C、2 時間処理し、10% FBS を含む RPMI 1640 培養液で所定細胞数 ($8 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ /ウェル) に調整した細胞浮遊液を分注して 5% CO₂ 存在下で 37°C、4 時間培養した。培養終了後 PBS-T で 3 回洗浄し、PBS-T にて 1000 倍に希釈した 100 μ l の HRP 標識ヤギ抗マウス IgM (μ 鎖特異的; SBA)、IgG (γ 鎖特異的; SBA) および IgA (α 鎖特異的; SBA) 抗体を

用いて各ウェルに加え 4°C、16 時間反応させた。PBS-T で洗浄した後 PBS でさらに洗浄して 3-アミノ-9-エチルカルバゾール (AEC; Moss Inc.) を含む反応基質溶液を各ウェルに 100 μ l ずつ加え 30 分間反応させた。反応後、各ウェルの発色したスポット数を実体顕微鏡下で測定し、単核球 10⁶ あたりの各種抗原特異的抗体産生細胞数として表した。

8. 各組織中の CD4 陽性 T 細胞の分離

各組織 (NALT、鼻腔粘膜、顎下腺、脾臓) からの CD4 陽性 T 細胞の分離はまず単核細胞調製後、培養用ディッシュにて 10% FBS を含む RPMI 1640 培養液で 5% CO₂、37°C、4 時間の培養にて大食細胞に代表される付着性細胞を除去し、次いでヤギ抗マウス免疫グロブリン F(ab')₂ をコートした培養用ディッシュを用いた panning 法にて B 細胞を除去した CD3 陽性 T 細胞に富む分画を得た⁷⁾。さらに CD3 陽性 T 細胞に富む単核細胞からの CD4 陽性 T 細胞の純化は磁気細胞分離システム (magnetic activated cell sorter; MACS) を用いて行った。すなわち単核細胞を PBS で 2 回洗浄後、マイクロビーズ標識抗マウス CD4 抗体 (Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch, Germany) を加え 6°C、15 分間静置した後 MACS-マグネット® (Miltenyi Biotech GmbH) の磁場内に固定した MACS-スティールウールカラム® (Miltenyi Biotech GmbH) に吸着させた。PBS でマイクロビーズ非標識細胞群を除去した後、カラムを磁場から解放し、さらに PBS で洗浄することにより CD4 陽性 T 細胞画分を回収し以後の実験に供した。なお、同分画中に占める CD4 陽性 T 細胞の割合は 95% 以上であることを、フローサイトメーター (FACSCalibur; BECTON DICKINSON, Mountain View, CA, U.S.A.) により確認した。

9. 抗原特異的 T ヘルパー 1 型 / 2 型 サイトカインの検出法

前述の方法で得られた精製 CD4 陽性 T 細胞群の細胞培養は 10% FCS、100U/ml ペニシリン(Gibco BRL)、100 μ g/ml ストレプトマイシン(Gibco BRL)、50 μ g/ml ゲンタマイシン(BIOWHITTAKER、Walkersville、ML、U.S.A.)を加えた RPMI 1640 培養液で 5% CO₂、37 °C、湿度 95% の条件下で行った。*P. gingivalis* 線毛抗原との共培養は 96 ウェル平底培養用プレート (No.3860-096、岩城ガラス、千葉)を用いて 1 ウェル 1X10⁵ 個の CD4 陽性 T 細胞と 1X10⁵ 個の γ 線照射(30Gy)したマウス脾細胞を線毛抗原の存在下(1~100 μ g/ml)もしくは非存在下で 96 時間培養を行った。培養後の得られた培養上清は T ヘルパー 1 型及び 2 型(以後 Th1 型、Th2 型と略す) サイトカイン産生量を ELISA 法で測定するまで -70 °C で凍結保存した。培養上清中の Th1 型サイトカイン(IFN- γ 、IL-2)及び Th2 型サイトカイン(IL-4、IL5、IL-6、IL-10)の検出には murine cytokine ELISA kit®(Amersham Life Science、Arlington Heights、IL、U.S.A.)を用いて測定した。

10. 全 RNA の抽出及び相補鎖 DNA (Complementary DNA、以下 cDNA と略す) の作成と定量

96 ウェル平底培養用プレートを用いて 1 ウェル 1X10⁵ 個の CD4 陽性 T 細胞群と 1X10⁵ 個の γ 線照射(30Gy)したマウス脾細胞を線毛抗原の存在下(100 μ g/ml)もしくは非存在下で 48 時間培養を行った後、同細胞群を PBS で 2 回洗浄し、再度前述と同様に CD4 陽性 T 細胞を MACS 法を用いて精製した。全 RNA の分離には Trizol reagent (Life Technologies、Gaithersburg、MD、U.S.A.)を用いて行った。すなわち培養後回収された CD4 陽性 T 細胞群に Trizol reagent を加えホモジナイズし、1/10 量のクロロホルムを添加後、14000rpm、15 分間遠心分離した。分離された水層から RNA をイソプロパノールの添加により沈澱させ 70% エタノールによる洗浄後、得られた全 RNA 沈澱を 10 μ l の DEPC 処理水に溶解した。

全 RNA より逆転写反応を行ない相補的 DNA (complementary DNA)を合成した(7,18)。すなわち、70 °C で熱処理された 10 μ l RNA 溶液にまず 1 μ l の Oilgo(dT)₁₂₋₁₈ (GibcoBRL)を加え 70 °C、10 分間処理した後氷上に静置しさらに 2 μ l の DIG Labeled Mix®(Boehringer Mannheim)、4 μ l の 5X First strand buffer(GibcoBRL)、2 μ l の 100mM DTT、0.5 μ l の Rnase inhibitor (40U/ml ; 東洋紡、大阪)、0.5 μ l の Superscriptase II (GibcoBRL)を加え 42 °C、60 分インキュベーション後、70 °C にて 10 分処理し残留酵素を失活させて cDNA を調合した。合成された cDNA は以下の方法で定量した。ナイロンメンブレン (Amersham Life Science) に cDNA または段階希釈した DIG-labeled control cDNA (Boehringer Mannheim)を各々 1 μ l ずつドットプロットを行ない UV クロスリンカー(Spectronics、Westbury、NY、U.S.A.)を用いて核酸をメンブレンにクロスリンクさせた。この膜を 0.15M NaCl と 0.1M マレイン酸を含む 1% Blocking reagent®(Boehringer Mannheim)中で 30 分間ブロッキング処理を行った。さらに 7.5U/L のアルカリフォスターゼ結合抗 DIG 抗体 (Boehringer Mannheim)を 1% Blocking reagent®(Boehringer Mannheim)存在下で 30 分間処理を行った。0.15M NaCl、0.1M マレイン酸を含む洗浄液で膜洗浄後、100mM トリス塩酸緩衝液、100mM NaCl、50mM MgCl₂ 存在下でアルカリフォスターゼ用ケミルミネッセンス基質である 1% CSPD™ (TROPIX、Bedford、MA、U.S.A.) を反応させた。膜上のケミルミネッセンスシグナルの検出にはイメージアナライザー (Molecular Imager® system; Bio-Rad Laboratories、Hercules、CA.、U.S.A.)を用いてコントロール DNA の発光量の標準曲線から得られた cDNA 量を算定した。

11. Polymerase Chain Reaction 法 (以下 PCR 法と略す) による cDNA の増幅及び検出

合成された cDNA を鋳型として陽性コントロールである β -actin、そして Th1 型・Th2 型サイトカインである IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 mRNA の PCR 法による増幅を行った。2.5 μ l の 10X PCR Buffer (Pharmacia Biotech)、2 μ l の 20mM dNTP mixture (Pharmacia Biotech)、0.125 μ l の 5000U/ml Taq DNA Polimerase (Pharmacia Biotech)、5ng の cDNA、そして検出する mRNA に特異的な 12.5mM のアンチセンスセンスおよびセンスプライマー 0.5 μ l の混合物を加え全量 25 μ l の反応液を調合した。94 $^{\circ}$ C、2 分の熱処理後に 94 $^{\circ}$ C、1 分の熱変性、60 $^{\circ}$ C、1 分のアニーリングおよび伸張反応を 1 サイクルとして GeneAmpTM PCR System 9600 (Perkin Elmer, FosterCity, CA, U.S.A.) を用いて cDNA の増幅を行った。35 サイクルの反応終了後検体を 7 μ l 分取し、1.8%アガロースゲル (アガロース-RE; ナカライテスク、京都) に電気泳動後、エチジウムブロマイド (ニッポンジーン、東京) DNA 染色を行った。なお実験に供した各々のプライマーの塩基配列は以下の通りである。 β -actin (センス、5'-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C-3'、アンチセンス、5'-TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G-3')、IFN- γ (センス、5'-TGA ACG CTA CAC ACT GCA TCT TGG-3'、アンチセンス、5'-CGA CTC CTT TTC CGC TTC CTG AG -3')、IL-2 (センス、5'-ATG TAC AGC ATG CAG CTC GCA TC -3'、アンチセンス、5'-GGC TTG TTG AGA TGA TGC TTT GAC A -3')、IL-4 (センス、5'-ATG GGT CTC AAC CCC CAG CTA GT -3'、アンチセンス、5'-GCT CTT TAG GCT TTC CAG GAA GTC -3')^{以上文献 19)}、IL-5 (センス、5'-GAA AGA GAC CTT GAC ACA GCT G -3'、アンチセンス、5'-GAA CTC TTG CAG GTA ATCCAG G -3')、IL-6 (センス、5'-GAA CAA CGA TGA TGC ACT TGC AG -3'、アンチセンス、5'-AAA TCG GTG AGG AAG AAG AAC TG -

3)、 IL-10 (センス、 5'-ATG CAG GAC TTT AAG GGT TAC TTG GGT T -3'、 アンチセンス、 5'-TAA AGC CTC TCT CCA TGT TTG CTG CTC CAA A -3')^{以上文献 20})。

12. 抗原特異的モノクローナル抗体の作成

経鼻免疫した BALB/c マウスの顎下腺 (SMG) より単核球を分離し、マウス骨髄腫細胞である X63Ag8.653 とを融合させることによりハイブリドーマを作成した。ハイブリドーマのスクリーニングは前述の ELISA 法に準じて行った。その結果 87 クローン中 4 つの抗 *P. gingivalis* 線毛蛋白モノクローナル抗体 5G4、2D3、2B2、5H3 (いずれも IgA タイプでκ鎖) を樹立した。ハイブリドーマは無血清培地 (CELGROSSER-H、住友製薬、大阪) で培養し、その培養上清中の抗体を 50%飽和硫酸アンモニウムを用いて沈澱させ、少量の 20mM トリス塩酸緩衝液 (pH8.0) に再び懸濁し、同緩衝液に対して透析し透析内液を精製抗 *P. gingivalis* 線毛蛋白モノクローナル抗体溶液として用いた。抗体蛋白濃度の測定は BCA 蛋白測定キット (Pierce) を用いて、ウシ血清アルブミン (BSA Fraction V; Sigma Chemical Co.) を標準蛋白として行った。

13. モノクローナル抗体による *P. gingivalis* の口腔上皮細胞への付着阻害実験

ヒト口腔上皮癌由来 KB 細胞株は ATCC (ATCC CCL17: Rockville, MD, U.S.A.) より購入した。KB 細胞は 10% FCS、50μg/ml ゲンタマイシンを含む DMEM (日研生物、京都) で 5% CO₂、37°C、湿度 95% の条件下で培養し、実験に供する 24 時間前に 96 ウェル平底培養用プレート (岩城ガラス) を用いて 1 ウェル 4.5X10⁴ 個/200μl DMEM になるように調製した。*P. gingivalis* の KB 細胞への付着実験は Mintz らの方法を改変して行った²¹⁾。細菌の放射性元素標識には

5 μ Ci/ml の [3 H]チミジン (Amersham) を細菌培養液中に加え 5%CO₂、5%H₂、90% N₂ 混合ガスによる嫌氣的条件下で 37°C、24 時間培養した。未反応の [3 H]チミジンを PBS で 6,000rpm、10 分の洗浄を 3 回行なうことにより除去した後 10⁸ 個の [3 H]チミジン標識 *P. gingivalis* を 50 μ g/ml の抗 *P. gingivalis* 線毛蛋白モノクローナル IgA 抗体、精製マウス IgA (Pharmingen, San Diego, CA, U.S.A.)、または経鼻免疫を行ったマウスもしくは非免疫マウスより採取した唾液 1/10 量を含む 200 μ l DMEM に懸濁し、96 ウェル平底培養用プレートの KB 細胞モノレイヤーに加え 37°C、1.5 時間付着反応させた。反応後 KB 細胞モノレイヤーを PBS で 4 回洗浄して非付着細菌を除去し 0.5M NaOH、0.1% SDS 溶液を各ウェルに 100 μ l ずつ加え 37°C、24 時間静置した。溶解した細胞の有する放射活性は TopCount Microplate Scintillation Counter® (Packard, Groningen, Netherlands) を用いて計測した。細菌の付着抑制率は { [KB に付着した非抗体処理細菌の放射活性 - KB に付着した抗体・唾液処理をおこなった細菌放射活性] / KB に付着した非抗体処理細菌の放射活性 } X 100 } で表した。

14. 口腔上皮細胞への *P. gingivalis* 吸着による 口腔上皮細胞由来炎症性サイトカインの検出

KB 細胞群は 10% FCS、50 μ g/ml ゲンタマイシンを含む DMEM で 5% CO₂、37°C、湿度 95% の条件下で培養し、実験に供する 24 時間前に 48 ウェル平底培養用プレート (岩城ガラス) を用いて 1 ウェル 1X10⁵ 個 / 1ml DMEM (抗生物質を含まない) になるように調製した。*P. gingivalis* の KB 細胞への付着実験は 50 μ g/ml の抗 *P. gingivalis* 線毛蛋白モノクローナル IgA 抗体もしくは精製マウス IgA (Pharmingen) を含んだ、抗生物質無添加 DMEM に *P. gingivalis* を 5X10⁸ 個懸濁し 48 ウェル平底培養用プレートの KB 細胞モノレイヤーに加え 5% CO₂、37°C、湿度 95%、1.5 時間付着反応させた。ついで PBS で 5 回洗浄して新鮮な抗生

物質を含まない DMEM を加え 5% CO₂、37°C、湿度 95% の条件下で 24 時間培養した。培養終了後培養上清を回収し、得られた培養上清は炎症性サイトカイン、ケモカイン産生量を測定するまで -70°C で凍結保存した。培養上清中の IL-6、IL-8、MCP-1 の検出には human cytokine ELISA kit® (BioSource International、Camarillo, CA., U.S.A.) を用いて測定し、それぞれの実験における標準曲線から各上清中に含まれるサイトカイン産生量を算出した。

結 果

1. 経鼻免疫法による抗原特異的抗体の誘導

粘膜アジュバント存在下で抗原である *P. gingivalis* の線毛蛋白を経鼻投与 (10 μ g/匹)もしくは経口投与 (200 μ g/匹)したマウスより血清、唾液、糞便抽出液、鼻洗浄液を採取した。経鼻投与法と経口投与法の抗原特異的抗体価は ELISA 法を用いて比較検討した (図1)。

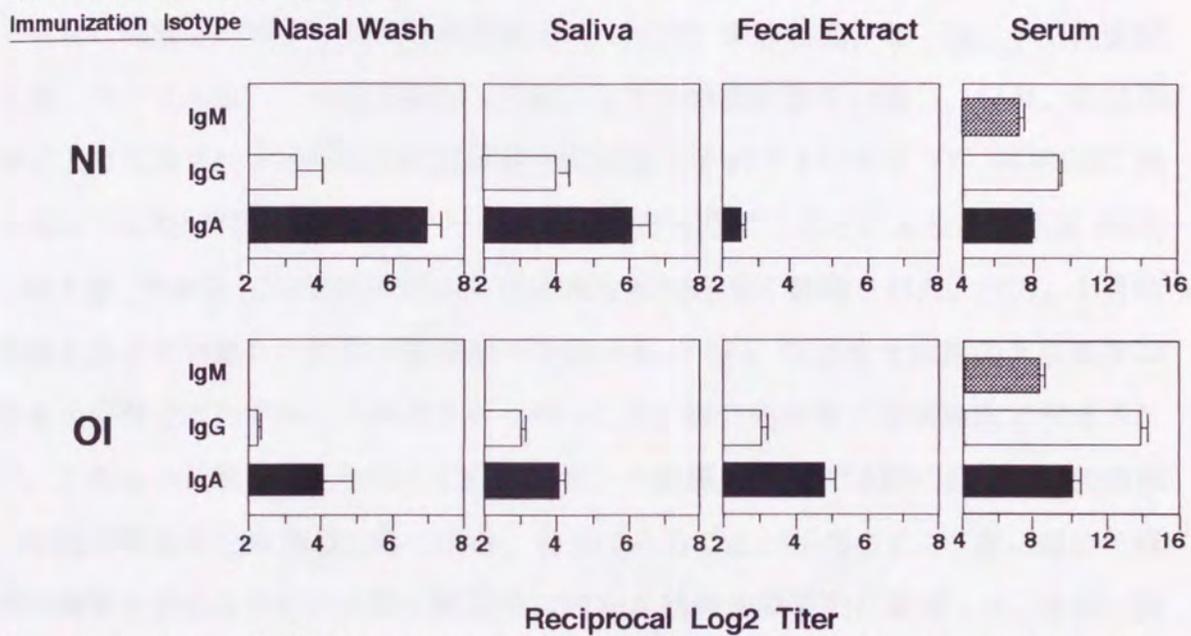


図1 *F.gingivalis* 線毛抗原とコレラトキシン (CT) を経鼻免疫 (NI) もしくは経口免疫 (OI) したマウス血清、粘膜分泌液中に誘導された抗原特異的抗体価の検討 (初回免疫より 21 日目)

鼻腔洗浄液 (nasal wash), 唾液 (saliva), 糞便抽出液 (fecal extract), 血清 (serum) 中の抗原特異的抗体価は抗原特異的, アイソタイプ特異的 ELISA 法を用いて解析した。抗体価は励起波長が非免疫マウスの試料と比較して OD 値が 0.1 を越える 2 倍希釈度数 n にて示した。各抗体価は平均値と標準偏差を示す。

投与 2 週目より抗原特異的な抗体価の上昇が観察された。血清においては経鼻、経口両群で高い抗原特異的 IgG 抗体価の誘導が認められた。両免疫法により唾液、

鼻腔洗浄液に線毛蛋白特異的 IgA 抗体が誘導された。両群の抗体価を比較すると経鼻投与した群で高いレベルの抗原特異的 IgA 免疫応答が認められたが経口免疫群では経鼻免疫群と比較して低レベルであった。一方、糞便抽出液中では経鼻免疫群は経口免疫群と比べ低レベルの線毛特異的 IgA 抗体価を検出するにとどまった。これらの結果から少数回の反復投与による経鼻免疫法は唾液、鼻洗浄液中に抗原特異的 IgA 抗体の誘導に効果的な免疫方法であることが示唆された。

さらに免疫されたマウスの粘膜系臓器 (NALT、鼻腔粘膜、顎下腺、小腸粘膜固有層、パイエル板)、全身系臓器 (脾臓) より単核細胞群を分離し、経鼻、経口免疫により誘導される抗原特異的抗体産生細胞数とそのアイソタイプを ELISPOT 法を用いて比較検討した (図 2)。その結果、経鼻免疫することにより鼻腔粘膜 (NP)、顎下腺 (SMG) に抗原特異的 IgA 抗体産生細胞が多く誘導された。一方、小腸粘膜固有層より分離した単核細胞群中の抗原特異的 IgA 抗体産生細胞の発現頻度は経鼻免疫群ではわずかしか誘導されなかったが、経口免疫群では高頻度で検出された。これらの結果は線毛蛋白と CT を併用した経鼻免疫法では特に鼻腔、口腔領域への抗原特異的 IgA 免疫応答の誘導に有効であることが示唆された。逆に経口免疫法は腸管を中心とする消化管に抗原特異的 IgA 抗体を効果的に誘導した。さらに両免疫法を比較すると経鼻免疫群では経口免疫群と比べて抗原、アジュバントともに約 1/20 量少ない投与量で線毛特異的 IgA 抗体が誘導されている。この事実を考慮すると、頭頸部粘膜組織への抗原特異的免疫応答の誘導には経鼻免疫法が有効な免疫経路であることが明らかとなった。

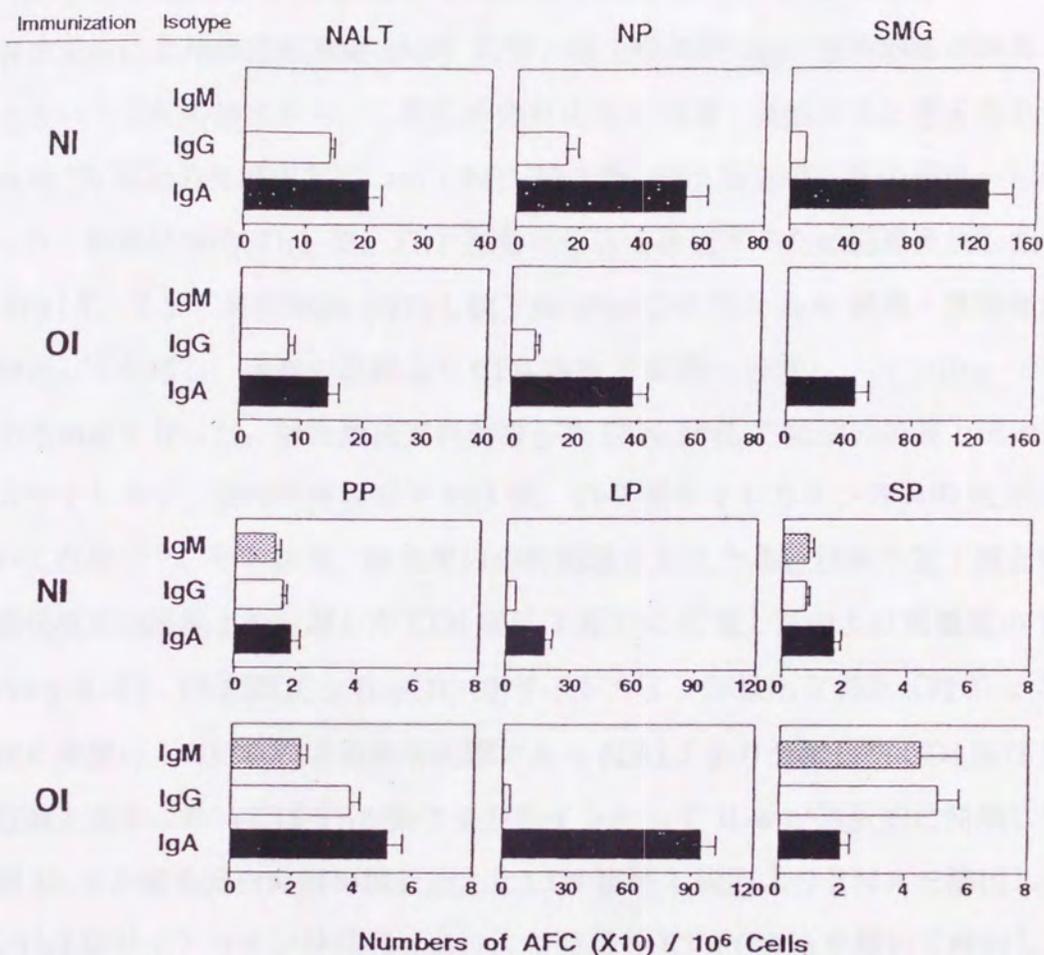


図2 *P. gingivalis* 線毛抗原とコレラトキシン(CT)を経鼻免疫(NI)もしくは経口免疫(OI)したマウスの粘膜系及び全身系臓器に誘導された抗原特異的抗体産生細胞数の測定。単核球はNALT, 鼻腔粘膜(NP), 唾液腺(SMG), パイエル板(PP), 小腸粘膜固有層(LP), 脾臓(SP)より分離した。抗原特異的, アイソタイプ特異的抗体産生細胞数の測定はELISPOT法を用いて行なった。各ウェルの発色したスポット数を実体顕微鏡下で測定し, 単核球 10^6 あたりの各種抗原特異的抗体産生細胞数として表した。

2. 経鼻免疫法により誘導される抗原特異的 Th1 型、2 型免疫応答

経鼻免疫により鼻腔粘膜面 (NP) に強い線毛特異的 IgA 免疫応答が誘導されているという上記の結果から、これらの免疫応答を誘導・調節すると考えられる抗原特異的 Th 細胞の免疫応答について特に Th1 型、Th2 型免疫応答の観点から解析を行った。抗原特異的 Th1 型、Th2 型免疫応答を検討するため経鼻免疫したマウスの NALT, そして鼻腔粘膜 (NP) と顎下腺 (SMG) を各々 IgA 誘導・実効組織の代表例として分離し、各々の組織より CD4 陽性 T 細胞を分離し、*in vitro* で線毛蛋白の再刺激を行った。線毛蛋白で再刺激した CD4 陽性 T 細胞の培養上清中に含まれるサイトカイン蛋白の発現量を Th1 型、Th2 型サイトカイン特異的 ELISA 法を用いて計測した。その結果、線毛蛋白の再刺激を加えた鼻腔粘膜や顎下腺といった粘膜免疫実効組織より分離した CD4 陽性 T 細胞の培養上清中より高濃度の Th1 型 (IFN- γ , IL-2)、Th2 型 (IL-5, IL-6, IL-10) サイトカインが検出された (図 3)。これとは逆に鼻腔の入口に存在する誘導組織である NALT より分離した CD4 陽性 T 細胞の培養上清中においては Th2 型サイトカインとして IL-4 が選択的に発現していた (図 3)。また線毛蛋白の再刺激を加えた CD4 陽性 T 細胞より RNA を抽出し、Th1 型、Th2 型サイトカイン特異的 mRNA の発現を RT-PCR 法を用いて検討した。鼻腔粘膜 (NP)、顎下腺 (SMG) では Th1 型、Th2 型サイトカイン特異的 mRNA 両者の発現が認められ特に Th1 型サイトカインの代表的存在である IFN- γ 、そして Th2 型サイトカインである IL-6 と IL-10 は高い発現が認められた。(図 4)。

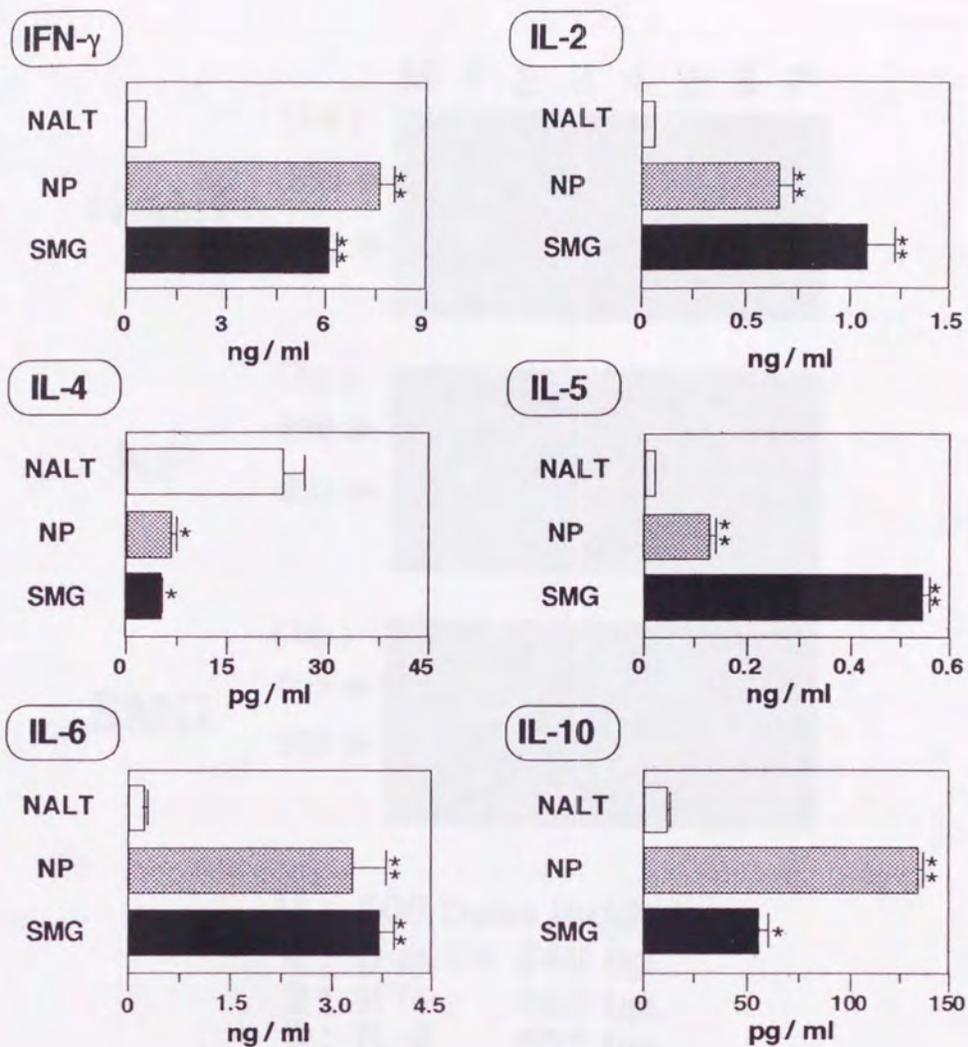
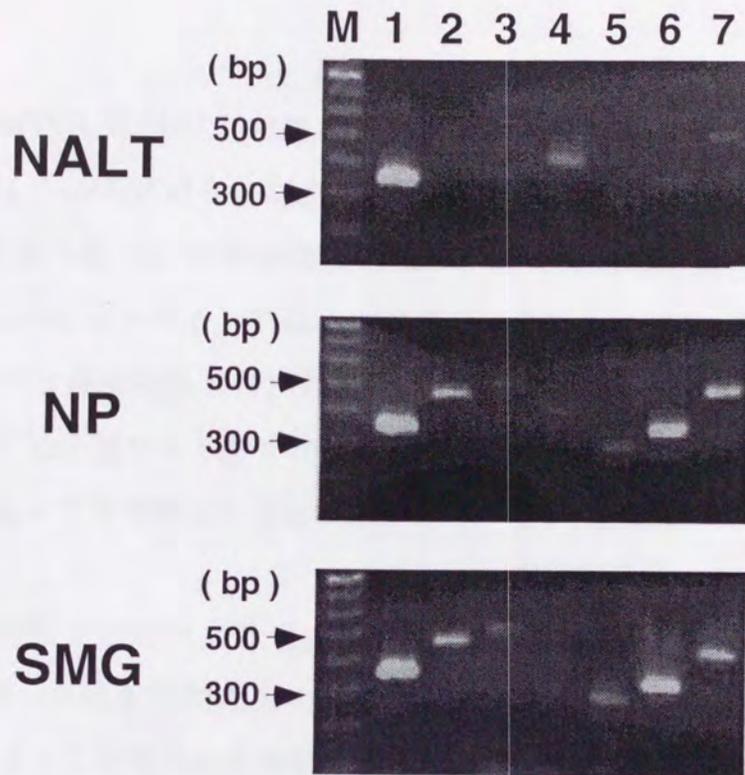


図3 *P.gingivalis* 線毛抗原とコレラトキシン(CT)を経鼻免疫したマウスの NALT, 鼻腔粘膜 (NP), 唾液腺(SMG)より分離した抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞によって産生された Th1 型(IFN- γ , IL-2)及び Th2 型(IL-4, IL-5, IL-6, IL-10)サイトカイン量の測定

マウスの NALT, 鼻腔粘膜 (NP), 唾液腺 (SMG) より分離した 1×10^5 個の CD4 陽性 T 細胞と 1×10^5 個の γ 線照射 (30Gy) したマウス脾細胞を線毛抗原の存在下 (1~100 μ g/ml) もしくは非存在下で 96 時間培養を行った。培養後の得られた培養上清は Th1 型、Th2 型サイトカイン産生量を ELISA 法で測定した。図は線毛抗原の存在下 (100 μ g/ml) で 96 時間培養を行った培養上清を用いた結果を示す。結果は同条件で実験を行なった 3 ウェルの平均と標準偏差を示す。*, **は NALT との間に有意差があることを示す (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。



M : 100 base ladder
1 : β -actin 349 bp
2 : IFN- γ 460 bp
3 : IL-2 502 bp
4 : IL-4 399 bp
5 : IL-5 277 bp
6 : IL-6 328 bp
7 : IL-10 455 bp

図4 *F. gingivalis* 線毛抗原とコレラトキシン(CT)を経鼻免疫したマウスのNALT, 鼻腔粘膜(NP), 唾液腺(SMG)より分離した抗原特異的CD4陽性T細胞によって産生されたTh1型(IFN- γ , IL-2)及びTh2型(IL-4, IL-5, IL-6, IL-10)サイトカイン mRNAの発現量
 マウスのNALT, 鼻腔粘膜(NP), 唾液腺(SMG)より分離した 1×10^6 個のCD4陽性T細胞と 1×10^6 個の γ 線照射(30Gy)したマウス脾細胞を線毛抗原の存在下(100 μ g/ml)で48時間培養を行った。培養後, さらにCD4陽性T細胞を純化してTh1型(IFN- γ , IL-2)及びTh2型(IL-4, IL-5, IL-6, IL-10)サイトカインの発現をRT-PCR法を用いて行なった。同一の実験を3回行ない, 代表的な結果を本図中に示す。

IL-4 特異的 mRNA は NALT 由来 CD4 陽性 Th 細胞で特に強く発現していることが認められた。つまりこれらの結果は先述の ELISA 法で得た結果を裏付けるものであり、線毛蛋白と CT の経鼻免疫により粘膜免疫誘導組織と考えられている NALT で Th2 型サイトカインの IL-4 が選択的に発現しており、粘膜免疫実効組織と考えられている鼻腔粘膜 (NP) や顎下腺 (SMG) において Th1 型サイトカインと IL-4 を除く Th2 型サイトカインの両方が発現していることが、それぞれ蛋白レベル、mRNA レベルで明らかとなった。

3. 線毛特異的モノクローナル IgA 抗体の樹立と同抗体による *P.gingivalis* の口腔上皮細胞への付着抑制効果の検討

経鼻免疫によって誘導された抗原特異的抗体による細菌の上皮細胞付着に対する抑制能を検討した。すなわち *in vitro* で口腔上皮細胞である KB 細胞株と [³H]チミジン標識した *P.gingivalis* と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線毛特異的 IgA 抗体による抑制効果を調べた (図 5)。まず最初に、経鼻免疫したマウスもしくは非免疫マウスより得た唾液を DMEM 中に 1/10 量懸濁し、10⁸ 個の [³H]チミジン標識 *P.gingivalis* を加え 1.5 時間嫌気条件下で反応させた。結果として非免疫マウスから得た唾液ではわずか数%の細菌付着抑制効果を認めるにすぎなかったが、経鼻免疫マウスから得た唾液では約 20%の細菌付着抑制効果を認めた (図 5)。

唾液には抗原特異的抗体のほか、当然ながら非特異的抑制因子、非特異的抗体、非特異的蛋白分解酵素など初期バリアーとして作用する雑多分子が多数含まれている。そこで抗原特異的 IgA 抗体の誘導が細菌付着抑制効果を有するかをより明確にするため経鼻免疫したマウスの顎下腺より線毛蛋白特異的モノクローナル IgA 抗体を分泌するハイブリドーマを樹立し以後の実験に用いた。細胞融合の結果 87

Reduction of *P.gingivalis* Adhesion to KB cells

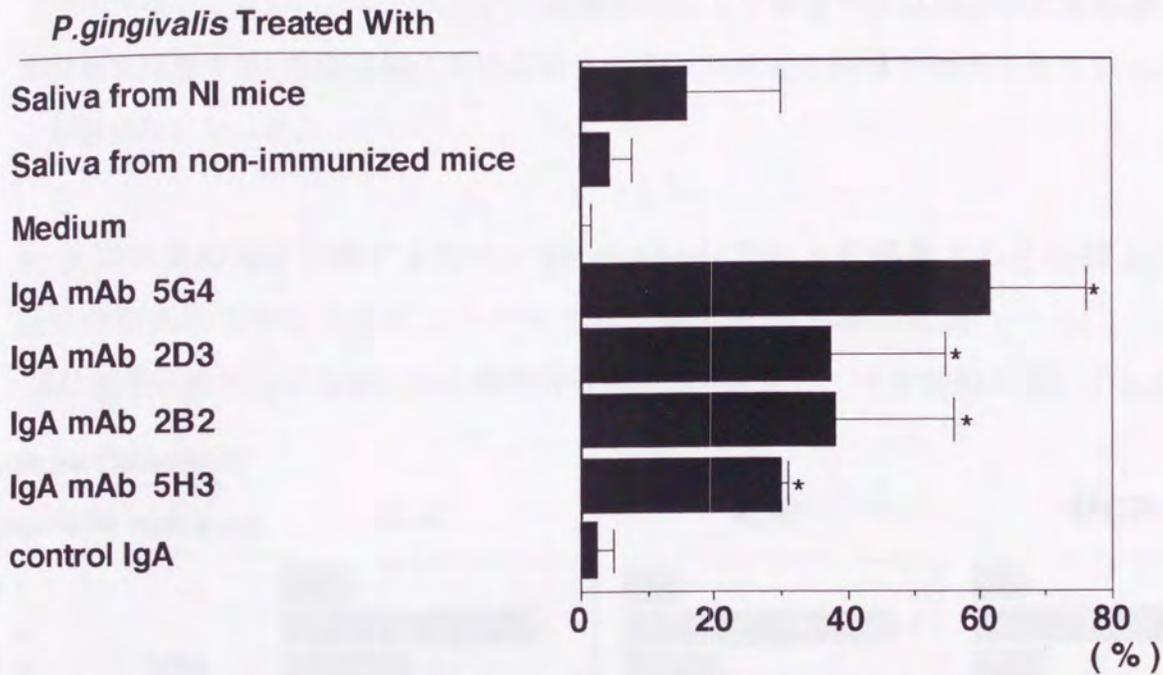


図5 経鼻免疫により誘導された抗原特異的 IgA 抗体による *P. gingivalis* 線毛の KB 細胞への付着抑制効果

KB モノレイヤーに ^3H チミジン標識した *F. gingivalis* 10^8 個と *F. gingivalis* 線毛特異的 IgA モノクローナル抗体 (5G4, 2D3, 2B2, 5H3 ; $50\mu\text{g/ml}$) もしくは経鼻免疫したマウス, 非免疫マウスより採取した唾液 (培地に対して 1/10 量) との混合培地を加え 37°C 、1.5 時間付着反応させた。付着抑制効果の算定は本文参照のこと。結果は同様の実験を 3 回行ないその平均と標準偏差を示す。*は「培地」のみとの間に有意差があることを示す ($*p<0.05$)。

のクローンを得、スクリーニングの結果 4 つの線毛蛋白特異的抗体産生クローンを樹立した。得られたクローンが産生するモノクローナル抗体は、顎下腺の抗体産生細胞の大部分が IgA 抗体産生細胞であることを反映して、全て IgA 型であった。これらのモノクローナル抗体を用いて前述の細菌付着抑制実験を行ったところ、抗体によって効果の大小はみられるものの約 30-70% の細菌付着抑制効果が認められた

(図 5)。またモノクローナル抗体の細菌付着抑制効果は濃度依存的に増強された(データは示さない)。このことから経鼻免疫により唾液中には細菌の上皮細胞への付着を抑制する、免疫学的に活性のある線毛特異的 IgA 抗体が誘導されていることが明らかとなった。

4. 抗原特異的 IgA 抗体による *P. gingivalis* 付着により誘導される口腔上皮細胞由来炎症性サイトカイン・ケモカイン産生抑制効果の検討

次に線毛特異的 IgA 抗体による細菌付着抑制効果によって上皮細胞の産生する炎

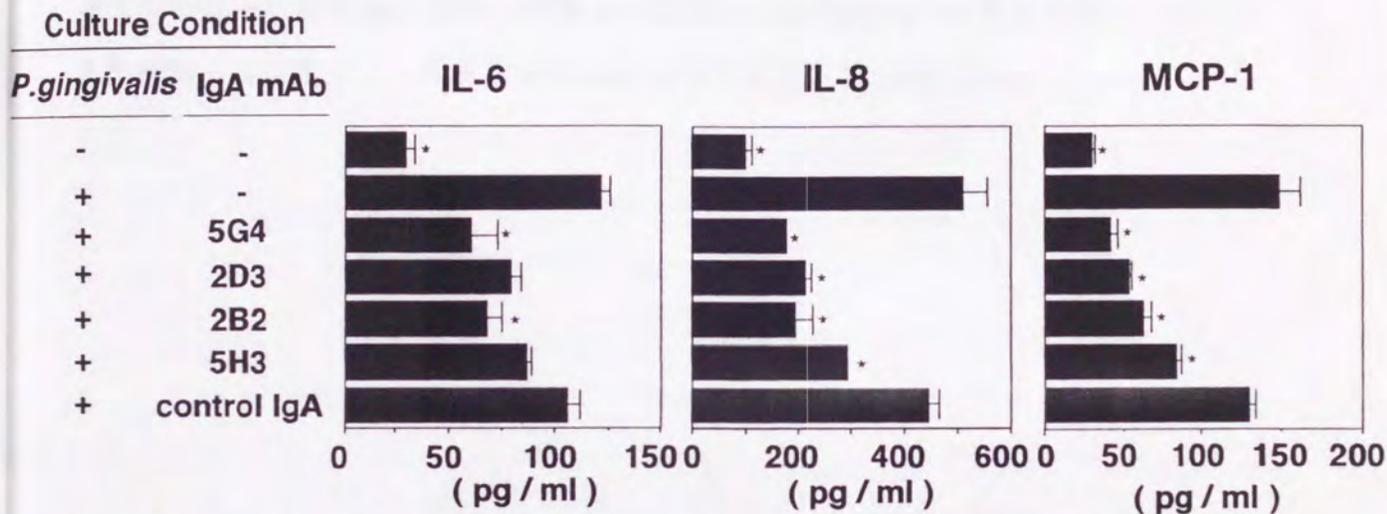


図 6 抗原特異的 IgA 抗体による *P. gingivalis* 付着により誘導される口腔上皮細胞由来炎症性サイトカイン産生抑制効果の検討

まずはじめに、*P. gingivalis* の KB 細胞への付着実験は 50 μ g/ml の抗 *P. gingivalis* 線毛蛋白モノクローナル IgA 抗体もしくは精製マウス IgA を含んだ抗生物質無添加 DMEM に *P. gingivalis* を 5X10⁸ 個懸濁し KB 細胞モノレイヤーに加え、37 $^{\circ}$ C、1.5 時間付着反応させた。ついで PBS で 5 回洗浄して新鮮な抗生物質を含まない DMEM を加え 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C、湿度 95% の条件下で 24 時間培養した。培養終了後培養上清を回収し、得られた培養上清は炎症性サイトカイン、ケモカイン産生量を各々のサイトカイン特異的 ELISA 法を用いて計測した。結果は同様の実験を 3 回行ないその平均と標準偏差を示す。*は *P. gingivalis* のみを含む培地との間に有意差があることを示す (*p<0.05)。

炎症性サイトカインの産生が抑制されるか否かを検討した。上述した細菌付着抑制効果試験法を利用して、線毛特異的モノクローナルIgA抗体処理、非処理群における培養上清中の炎症性サイトカインをサイトカイン特異的ELISA法を用いて解析した。モノクローナル抗体非存在下で*P.gingivalis*とKB細胞株の共培養を行った場合の炎症性サイトカインの産生量を100%とすると、抗原特異的モノクローナルIgA抗体存在下では炎症性サイトカイン・ケモカインの産生量はIL-6では50-70%、IL-8では35-57%、MCP-1では28-56%であり産生量は明らかに抑制された(図6)。この結果と前項(図5)の結果を合わせて考えると、経鼻免疫によって防御的な機能を有する線毛特異的IgA抗体が誘導され細菌の上皮細胞への付着を抑制し、加えて上皮細胞の炎症性サイトカイン産生量を抑制することが示唆された。

考 察

テニスコート 1.5 面分に匹敵するといわれている広大なヒト粘膜面に抗原特異的免疫応答を誘導するには IgA 誘導組織 (例; GALT, NALT) が散在している粘膜を介して免疫しなければならないことが知られている¹⁻⁴⁾。現在、粘膜免疫機構における一連の抗原特異的免疫応答誘導のメカニズムは IgA 循環帰巢経路と呼ばれるシステムを介して誘導されるとする説が有力でありそれを支持する結果が多数報告されている¹⁻⁴⁾。しかしながら分子・細胞レベルにおけるその詳細については不明な点が多々ある。現在まで経粘膜免疫法による抗原特異的免疫応答誘導メカニズムの研究としては経口免疫法が主として取り上げられ経鼻免疫法による免疫応答の解析はほとんど進められていない。また経口免疫の根幹となる消化器免疫機構に比較して鼻腔をはじめとして呼吸器系の粘膜免疫機構の基礎的解析の情報は少ない。鼻から吸入する経鼻ワクチン開発ということを考えると、経鼻免疫により惹起される免疫応答の解析は極めて重要な課題である。

本研究においてはまずはじめに経鼻免疫法と経口免疫法の比較検討を行い、鼻腔・口腔領域への抗原特異的免疫応答の誘導における経鼻免疫法の有用性について示した。そして図 1,2 に示すようにそれぞれの免疫法による免疫応答の局在性を明確にした。つまり経鼻免疫法は口腔や鼻腔を含む呼吸器系粘膜組織を中心として体上半身への抗原特異的免疫応答の誘導に有効であり、一方経口免疫法は腸管をはじめとする消化管粘膜への免疫応答の誘導に有効な抗原投与経路であることが示された。経鼻免疫群に抗原を 2 倍量多く投与すると腸分泌液中に誘導される抗原特異的抗体価が増加すること (データは示さない)、また経鼻免疫することにより腔分泌液中にも抗原特異的抗体を誘導し得る^{14,22)}という報告から異なる粘膜面に効果的に抗原特異的免疫を誘導するには、総じて経鼻免疫法が有効であるかもしれない。しかしながら感染を引き起こす病原微生物の生物学的性質・特徴の観点から経口免疫が有利な場合も考えられ今後さらなる検討が必要である。

粘膜ワクチンの開発に向けて、本研究は経鼻、経口免疫法の使い分けにより鼻腔、口腔領域における感染症もしくは腸内での感染症に対する抗原特異的な免疫応答の誘導を有効に行える可能性を示唆した。*V.cholerae*, *Salmonella*, 病原性 *E.coli*, *Shigella*などによって引き起こされる腸内感染症には経口免疫法が有効であると考えられる。またインフルエンザウイルス、アデノウイルス、RSV、*S.pneumoniae*などによっておこる呼吸器系疾患には経鼻免疫法が奏功するかもしれない。それを支持するように Tamura らは抗原としてインフルエンザウイルス抗原を、粘膜アジュバントとしてCTもしくはLT (heat-labile enterotoxin of *E. coli*)と併用して経鼻免疫することにより呼吸器系組織に防御的免疫応答が誘導されたことを報告している²³⁾。また抗原として細菌性肺炎や副鼻腔炎、耳炎を引き起こす *S.pneumoniae* の表面蛋白である pneumococcal surface protein A (PspA) 抗原を、最近開発された粘膜アジュバントであり毒性が失活しなおかつ免疫応答賦活効果が維持されている mutant CT を含む経鼻ワクチンとしてマウスに与えることによって同細菌感染に対して防御的な機能を有する分泌型 IgA および血清 IgG が誘導された²⁴⁾。本研究においても経鼻投与は鼻腔、口腔領域への抗原特異的免疫応答を少量の抗原とアジュバントで誘導できる有効な免疫投与経路であることを強く示唆している。口腔は唾液と歯肉溝浸出液の二方面から各々粘膜系分泌型 IgA と全身系由来の血清 IgG が誘導される免疫学的にユニークな器官である。ゆえに高い抗体価の線毛特異的分泌型 IgA と血清 IgG が経鼻免疫により口腔内に誘導されることから経鼻ワクチンの概念は口腔内の感染症発症を防ぐ新しい免疫学的予防療法の開発に応用できよう。

CT は抗原特異的な粘膜系、全身系免疫応答の誘導のための強力な粘膜アジュバントである^{5,6)}。しかしながらその作用機序の詳細についてはいまだ明らかではないが、最近の研究の急速な進展によりそのメカニズムの解明が進んでいる。例えば、CT は抗原特異的な Th1 型、Th2 型応答の誘導および調整に関与しているという報

告が数グループよりなされている。Munoz らの報告では CT は Th1 型細胞の IL-2 産生およびその増殖を抑制する一方、IL-4 の産生と Th2 型細胞の増殖は抑制しない²⁵⁾。また Xu-Amano や Marinaro らは CT を経口アジュバントとしてワクチン抗原と併用して免疫すると抗原特異的 Th2 型免疫応答を強く惹起することを報告している^{7,26)}。本研究結果においても線毛蛋白と CT の経鼻免疫によって NALT において Th2 型免疫応答、その中でも IL-4 を選択的に発現、誘導していることが示された。マウス B 細胞は IL-4 存在下では選択的に IgG1 と IgE のクラススイッチングが誘導され、両アイソタイプ抗体の産生増強につながっている²⁷⁾。また IL-4 は TGF- β の IgA クラススイッチングを支持・賦活することが示されている²⁸⁾。このことから NALT では IL-4 産生 Th2 型細胞が多く誘導されており B 細胞における IgM 遺伝子から IgA 遺伝子への免疫グロブリンクラススイッチングという遺伝子変換を積極的に行う場となっていることが予想される。今回は TGF- β について検討していないため今後 NALT において IgA クラススイッチングに関与していると考えられる TGF- β の発現も検討する必要がある。

経鼻投与された抗原刺激によって、鼻腔粘膜や顎下腺といった粘膜免疫実効組織において顕著な抗原特異的分泌型 IgA 抗体産生が誘導されている事実を基に Th1 型、Th2 型サイトカイン誘導について検討すると、抗原特異的両型 Th 細胞の誘導を示唆するサイトカイン産生パターンが確認された。例えば Th2 型サイトカインの中でも IgA 前駆 B 細胞の最終分化および実際に抗体を産生する形質細胞化に寄与する、IgA 産生を賦活するサイトカインである IL-5, IL-6, IL-10²⁹⁻³¹⁾ が強く誘導された。逆にアイソタイプスイッチングに関与している IL-4 は産生されていなかった。このことは NALT とは対極をなすサイトカイン産生プロファイルであり興味深い。さらに鼻腔粘膜や顎下腺において Th1 型サイトカインも強く誘導されていた。その中でも IFN- γ は分泌型 IgA 形成に不可欠な分泌成分(SC)の発現を強めることが報告されている⁴⁾。さらに SC の基となる上皮細胞由来の poly Ig 受容体 (poly Ig

receptor : pIgR)は形質細胞より分泌された二量体もしくは多量体IgAの上皮内輸送に関わる重要な分子である³²⁾。IL-2はIgA産生を賦活するサイトカイン(例えばIL-5)によるIgA前駆B細胞の分化を補助する作用がある³³⁾。抗原特異的なCD4陽性T細胞が産生するTh1型、Th2型サイトカインは鼻腔粘膜、顎下腺といった粘膜免疫実効組織において抗原特異的な分泌型IgAの産生に非常に有効な免疫学的環境を生み出しているのかもしれない。またIFN- γ やIL-2は細胞性免疫を強化するサイトカインであるため病原体の宿主細胞内への侵入をとともなう感染症(例;ウイルス, *Salmonella*, *Chlamidia*, *Rickettsia*, 原虫など)にたいしても期待できる免疫応答を実効組織に誘導する可能性がある。しかしながら粘膜免疫誘導組織と実効組織における異なるサイトカインプロファイルの誘導システムの違いについての説明, または誘導組織から実効組織へのリンパ球のホーミング機構についてはこれからさらなる検討が必要である。NALTにはほとんど存在せず、しかしながら鼻腔粘膜や顎下腺といった実効組織に多く認められる $\gamma\delta$ T細胞もIgA産生を強化するサイトカイン産生もしくはIgA産生促進のための環境を作り出している可能性も考えられ、この機構を考える上で鍵となるのかもしれない^{11,34)}。また鼻腔上皮、粘膜層においてそれを制御するような未知の分子、液性因子が存在するかもしれない。

*P. gingivalis*はKB細胞株や歯肉上皮細胞といった上皮細胞に付着、侵入する能力を有することが知られている^{35,36)}。さらに線毛は上皮細胞への付着、侵入の開始に中心的な役割をはたすという報告がある³⁷⁾。たとえば野生型の*P. gingivalis*と線毛の欠損している変異株とで歯肉上皮細胞への侵入率を比べたところ変異株では上皮への侵入が全く認められなかった³⁷⁾。*P. gingivalis*の上皮への侵入機構について詳細は不明であるためあくまで想像にすぎないが、KB細胞株や歯肉上皮細胞上に*P. gingivalis*線毛に対するレセプターが存在しそれを介して細菌と上皮細胞との相互作用が惹起されるのかもしれない。これを示唆するように例えば*Yersinia enterocolitica*や*Yersinia pseudotuberculosis*は強い細胞付着性と侵入性

を示すがこの細胞侵入はインベインと呼ばれる蛋白が行なう³⁸⁾。インベインは上皮細胞のインテグリン β 1鎖と結合する。さらに β 1鎖を発現していない上皮細胞株へ *Yersinia* は侵入しない。このことから *Yersinia* は β 1鎖との結合を介して上皮細胞へ侵入し感染成立に伴う多彩な変化をひきおこす(例: 終末回腸炎, 腸管膜リンパ腺炎, 関節炎, ペスト等)。

P. gingivalis 線毛特異的免疫応答が口腔内に誘導されれば、誘導された抗原特異的抗体が細菌と結合し細菌と上皮細胞との付着を抑制し、この病原微生物の上皮細胞への侵入の第一段階で阻止する可能性がある。それを支持するように線毛蛋白に対するモノクローナル抗体は *in vitro* で細菌の上皮細胞への付着を抑制することが示された³⁹⁾。また *P. gingivalis* の外膜蛋白でありヒトの赤血球凝集能を持つ血液凝集素・HA (hemagglutinin) - Ag2⁴⁰⁾ に対する IgM 型特異抗体は *P. gingivalis* と KB との細胞間相互反応を阻止したという報告もある⁴¹⁾。これらの知見は線毛特異的抗体の口腔内への誘導は上皮細胞への *P. gingivalis* の付着を阻止させるという考えを支持するものである。本研究において、線毛と CT を併用した経鼻ワクチンは分泌型 IgA の高い抗体価に加えて血清由来の IgG を誘導し、さらに上皮細胞への細菌付着を阻害することを強く示唆した。

免疫学的予防分子としての線毛特異的 IgA 抗体の役割について詳細な検討を加えるため経鼻免疫したマウスの顎下腺より線毛特異的モノクローナル IgA 抗体を樹立した。得られた線毛特異的モノクローナル IgA 抗体は KB 細胞株への *P. gingivalis* の付着を抑制する能力を有していた(図5)。この結果は唾液 IgA の免疫学的役割は軟組織(例; 上皮細胞)や硬組織(例; 歯牙)上での微生物の付着、定着、成長を抑制するという事実⁴²⁾をさらに支持している。しかしながらこれらの線毛特異的モノクローナル IgA 抗体は KB への *P. gingivalis* の付着を抑制するものの、その抑制効果は完全なものではなかった。おそらく他の細菌表面分子も細菌付着に関与しているものと考えられる。例えば hemagglutinin や capsule といっ

た細胞表面構成成分も上皮細胞への細菌付着に重要な役割を果たしていることが示唆されている⁴⁰⁾。細菌付着の抑制効果を最大限にするため線毛のほか、他の *P. gingivalis* の細胞付着因子もワクチン抗原として経鼻免疫の際、考慮に入れる必要があると考えられる。

本研究では経鼻免疫による *P. gingivalis* の上皮細胞への付着抑制を裏付ける目的で細菌付着により上皮細胞から産生される炎症性サイトカイン・ケモカインである IL-6, IL-8, MCP-1 の産生量の変化についても検討した。これらの炎症性サイトカイン・ケモカインの産生を阻止することで次に続く炎症反応の惹起を防ぐという意味で線毛特異的 IgA 抗体のとりうる役割を検討することは重要である。IL-6 は生体防御機構において中心的な役割を果たす多様な機能を持つサイトカインであり感染後や組織損傷時に血小板や急性炎症蛋白の産生を誘導する⁴³⁾。IL-8 は好中球に対する代表的な化学走化物質であり骨髄から末梢血への好中球の動員、好中球の活性化、好中球の血管内皮細胞への接着増強、また好塩基球や T 細胞に対する遊走活性作用がある^{44,45)}。興味あることに IL-8 レセプターを欠損したマウスでは好中球の殺細菌能には変化はみられないが好中球が炎症局所に浸潤できず血中で好中球が増加する好中球症をおこしていた⁴⁶⁾。このことから IL-8 は好中球の血管外浸潤に必須であると考えられる。MCP-1 は単球の活性化に中心的役割を果たすケモカインであり慢性炎症巣で多量に検出される。さらに走化性亢進、好塩基球に対して脱顆粒、ヒスタミンの放出活性を持つ^{44,45)}。これらの炎症性サイトカイン・ケモカインは細菌の曝露により上皮細胞より産生が増強され⁴⁷⁾、本研究でも KB 細胞株を *P. gingivalis* と共培養することにより IL-6, IL-8, MCP-1 の産生量の増加が認められた (図 6)。線毛特異的モノクローナル IgA 抗体を同培養系に添加することにより炎症性サイトカイン産生が抑制された。これらの知見は上皮細胞への細菌付着抑制効果を有する抗原特異的 IgA 抗体の誘導の重要性を強調するものである。

結 論

1. 経鼻免疫は鼻腔、口腔領域における抗原特異的分泌型 IgA 免疫応答の誘導に効果的な免疫経路であることが明らかとなった。
2. 経鼻免疫により全身系にも抗原特異的免疫応答が誘導されることから粘膜系と全身系の二段階の防御機能を構築できることが示唆された。
3. 線毛特異的 CD4 陽性 T 細胞の産生する Th2 型サイトカインの産生プロファイルが IgA 誘導組織である NALT と、鼻腔粘膜、顎下腺に代表される実効組織で異なることが明らかとなった。NALT ではアイソタイプスイッチングに関与する IL-4 を選択的に産生するのに対して鼻腔粘膜や顎下腺では IgA の産生を賦活するサイトカインである IL-5、IL-6、IL-10 の産生が顕著に認められた。
4. 経鼻免疫により上皮細胞への細菌付着抑制能を有する線毛特異的 IgA 抗体が誘導され、その結果上皮細胞が細菌付着によって産生する炎症性サイトカインの発現量の抑制効果が認められた。

以上の結果は鼻腔、口腔領域に発症する感染症に対しての経鼻ワクチン開発に有益な新情報を提供した。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究を行う機会を与えて頂き、ご教示、ご鞭撻を賜った本学口腔治療学講座岡田 宏教授に深謝いたします。

本研究に際し、懇篤なる指導と校閲の労をとられた本学微生物病研究所免疫化学分野清野 宏教授ならびに廣井隆親博士に心より感謝いたします。さらに、*P. gingivalis* 線毛蛋白の精製に関して懇切なる技術的助言を頂きました楠本 豊博士、吉田穰次博士、林 尚志博士をはじめとしてさまざまなご援助を頂いた口腔治療学講座および免疫化学分野の教室員の皆様方にも厚くお礼申し上げます。

最後に、本研究に対し不断の御支援を賜りました柳田勇夫、ならびに淳子の両氏に心から感謝申し上げます。

文 献

- 1) Mestecky, J. and McGhee, J. R. (1989) : New strategies for oral immunization. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* , **146** , 3-11.
- 2) McGhee, J. R., Mestecky, J., Dertzbaugh, M. F., Eldridge, J., Hirasawa, M. and Kiyono H. (1992) : The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine.* , **10** , 75-88.
- 3) Ogra, P.L. (1996) : Mucosal Vaccine (Kiyono, H., Ogra, P. L. and McGhee J. R., editor). ed.1. Academic Press, San Diego, CA, 3-14.
- 4) Mestecky, J. and McGhee, J.R. (1987) : Immunoglobulin A (IgA) : Molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response. *Adv. Immunol.* , **40** , 153-245.
- 5) Elson, C.O., and Ealding, W. (1984) : Generalized systemic and mucosal immunity in mice after mucosal stimulation with cholera toxin. *J. Immunol.* , **132** , 2736-2741.
- 6) Vajdy, M., and Lycke, N.Y. (1990) : Cholera toxin adjuvant promotes long-term immunological memory in the gut mucosa to unrelated immunogens after oral immunization . *Immunology* , **75** , 488-492 .

- 7) Xu-Amano, J., Kiyono, H., R. J. Jackson, R. J., Staats, H. F., Fujihashi, K., Burrows, P. D., Elson, C. O., Pillai, S. and McGhee, J. R. (1993) : Helper T cell subsets for immunoglobulin A responses: oral immunization with tetanus toxoid by use of cholera toxin as adjuvant selectively induces Th2 cells in mucosa associated tissues. *J. Exp. Med.*, **178**, 1309-1320.
- 8) Xu-Amano, J., Jackson, R. J., Fujihashi, K., Kiyono, H., Staats H. F. and J. R. McGhee (1994) : Helper Th1 and Th2 cell responses following mucosal or systemic immunization with cholera toxin. *Vaccine*, **12**, 903-911.
- 9) Cong, Y., Weaver, C.T., and Elson, C.O. (1997) : The mucosal adjuvanticity of cholera toxin involves enhancement of costimulatory activity by selective up-regulation of B7.2 expression. *J. Immunol.*, **159**, 5301-5308.
- 10) Kuper, C.F., Koornstra, P.J., Hamelers, D.M.H., Biewenga, J., Spit, B.J., Duijvestijn, A.M., van Breda Vriesman, P.J.C. and Sminia, T. (1992) : The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol. Today*, **13**, 219-224.
- 11) Hiroi, T., Iwatani, K., Iijima, H., Kodama, S., Yanagita, M. and Kiyono, H. (1998) : Nasal immune system: distinctive Th0 and Th1/Th2 type environments in murine nasal-associated lymphoid tissues and nasal passage, respectively. *Eur. J. Immunol.*, **28**, 346-3353.
- 12) Ogawa, T., Kusumoto, Y., Kiyono, H., McGhee, J. R. and Hamada, S. (1992) : Occurrence of antigen-specific B cells following oral or parenteral immunization with *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *Int. Immunol.*, **4**, 1003-1010.

- 13) Ogawa, T., Shimauchi, H. and Hamada S. (1989) : Mucosal and systemic immune responses in Balb/c mice to *Bacteroides gingivalis* fimbriae administered orally. *Infect. Immun.*, **57** , 3466-3471.
- 14) Yamamoto, S., Kiyono H., Yamamoto, M., Imaoka, K., Yamamoto, M., Fujihashi, K., Van Ginkel, F. W., Noda, M., Takeda, Y. and McGhee, J. R. (1997) A nontoxic mutant of cholera toxin elicits Th2-type responses for enhanced mucosal immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* ,**94** ,5267-5272.
- 15) Asanuma, H., Inaba, Y., Aizawa, C., Kurata, T. and Tamura, S.(1995): Characterization of mouse nasal lymphocytes isolated by enzymatic extraction with collagenase. *J. Immunol. Methods.*, **187** ,41-51.
- 16) Mega, J., McGhee, J.R. and Kiyono, H. (1992) : Cytokine- and Ig-producing cells in mucosal effector tissues: Analysis of IL-5- and IFN- γ -producing T cells, T cells receptor expression, and IgA plasma cells from mouse salivary gland-associated tissues. *J. Immunol.*, **148** , 2030-2039.
- 17) Jackson, R. J., Fujihashi, K., Xu-Amano, J., Kiyono, H., Elson, C.O. and McGhee J. R.(1993) : Optimizing oral vaccines: induction of systemic and mucosal B-cell and antibody responses to tetanus toxoid by use of cholera toxin as an adjuvant. *Infect. Immun.* ,**61** , 4272-4279.
- 18) Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) : Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162** ,156-159.

- 19) Reiner, S.L., Zheng, S., Corry, D.B. and Locksley, R.M.(1994) : Constructing polycompetitor cDNAs for quantitative PCR. *J. Immunol. Methods.*, **175**, 275.
- 20) Hiroi, T., Fujihashi, K., McGhee, J. R. and H. Kiyono. (1995) : Polarized Th2 cytokine expression by both mucosal $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ T cells. *Eur J Immunol.*, **25**, 2743-2751.
- 21) Mintz, K. P. and Five-Taylor, P. M.(1994) : Adhesion of *Actinobacillus actinomycetem com itans* to a human oral cell line. *Infect. Immun.*, **62**, 3672-3678.
- 22) Imaoka, K., Miller, C. J., Kubota, M., McChesney, M. B., Lohman, B., Yamamoto, M., Fujihashi, K., Someya, K., Honda, M., McGhee, J. R. and Kiyono, H. (1998) : Nasal immunization of nonhuman primates with simian immunodeficiency virus p55^{gag} and cholera toxin adjuvant induces Th1/Th2 help for virus-specific immune responses in reproductive tissues. *J. Immunol.*, **161**, 5952-5958.
- 23) Tamura, S-I, Yamanaka, A., Shimohara, M., Tomita, T., Komase, K., Tsuda, Y., Suzuki, Y., Nagamine, T., Kawahara, K., Danhara, H., Aizawa, C., Oya, A. and Kurata, T.(1994) : Synergistic action of cholera toxin B subunit (and *E. coli* heat-labile toxin B subunit) and a trace amount of cholera whole toxin as an adjuvant for nasal influenza vaccine. *Vaccine*, **12**, 419-426.

- 24) Yamamoto, M., Briles, D. E., Yamamoto, S., Ohmura, M., Kiyono, H. and McGhee, J. R. (1998): A nontoxic adjuvant for mucosal immunity to pneumococcal surface protein A. *J. Immunol.*, **161**, 4115-4122.
- 25) Munoz, E., Zubiaga, A. M., Merrow, M., Sauter, N. P. and Huber, B.T. (1990): Cholera toxin discriminates between T helper 1 and 2 cells in T cell receptor-mediated activation. Role of cAMP in T cell proliferation. *J. Exp. Med.*, **172**, 95-103.
- 26) Marinaro, M., Staats, H. F., Hiroi, T., Jackson, R.J., Coste, M., Boyaka, P. N., Okahashi, N., Yamamoto, M., Kiyono, H., Bluethmann, H., Fujihashi, K. and McGhee J. R. (1995): Mucosal adjuvant effect of cholera toxin in mice results from induction of T helper (Th2) cells and IL-4. *J. Immunol.*, **155**, 4621-4629.
- 27) Stavnezer, J. (1996): Antibody class switching. *Adv. Immunol.*, **61**, 79-146.
- 28) McIntyre, T. M., Kehry, M. R. and C. M. Snapper. (1995): Novel *in vitro* model for high-rate IgA class-switching. *J. Immunol.*, **154**, 3156-3161.
- 29) Beagley, K. W., Eldridge, J. H., Kiyono, H., Everson, M. P., Koopman, W.J., Honjo, T. and McGhee, J.M. (1988): Recombinant murine IL-5 induces high rate IgA synthesis in cycling IgA-positive Peyer's patch B cells. *J. Immunol.*, **141**, 2035-2042.

- 30) Beagley, K. W. , Eldridge, J. H., Lee, F., Kiyono, H., Everson, M. P., Koopman, W. J., Hirano, T., Kishimoto, T. and McGhee, J. R. (1989) : Interleukins and IgA synthesis: human and murine IL-6 induce high rate IgA secretion in IgA-committed cells. *J. Exp. Med.* ,**169** , 2133-2148.
- 31) Briere, F., Bridon, J. M., Chevet, D., Souillet, G., Bienvenu, F., Guret, C., Martines-Valdez, H. and Banchereau, J. (1994) : Interleukin 10 induces B lymphocytes from IgA-deficient patients to secrete IgA. *J. Clin. Invest.* ,**94** , 97-104.
- 32) Mostov, K.E. and Deitcher, D.L. (1986) : Polymeric immunoglobulin receptor expressed in MDCK cells transcytoses IgA. *Cell*, **46**, 613-621.
- 33) Coffman, R. L., Lebman, D. A. and Schrader, B. (1989) : Transforming growth factor- β specifically enhances IgA production by lipopolysaccharide-stimulated murine B lymphocytes. *J. Exp. Med.* , **170**, 1039-1044.
- 34) Fujihashi, K., McGhee, J.R., Kweon, M-N., Cooper, M.D., Tonegawa, S., Takahashi, I., Hiroi, T., Mestecky, J. and Kiyono, H. (1996) : γ/δ T cell-deficient mice have impaired mucosal immunoglobulin A responses. *J. Exp. Med.*, **183**, 1929-1935.
- 35) Lamont, R. J., Chan, A., Belton, C. M., Izutsu, K. T., Vasel, D. and Weinberg, A. (1995) : *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. *Infect. Immun.*, **63**. 3878-3885.

- 36) Duncan, M. J., Nakao, S., Skobe, Z. and Xie, H. (1993) : Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with epithelial cells. *Infect. Immun.*, **61**, 2260-2265.
- 37) Njoroge, T., Genco, R. J., Sojar, H. T., Hamada, N. and Genco C. A. (1997) : A role for fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of oral epithelial cells. *Infect. Immun.*, **65**, 1980-1984.
- 38) Isberg, R.R., and Leong, J.M. (1990) : Multiple β 1 chain integrins are receptors for invasins, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell*, **60**, 861-871.
- 39) Isogai, H., Isogai, E., Yoshimura, F., Suzuki, T., Kagota, W. and Takano, K. (1988) : Specific inhibition of adherence of an oral strain of *Bacteroides gingivalis* 381 to epithelial cells by monoclonal antibodies against the bacterial fimbriae. *Arch. Oral Biol.*, **7**, 479-485.
- 40) Cutler, C. W., Kalmar, J.R. and Genco, C.A. (1995) : Pathologic strategies of the oral anaerobe, *Porphyromonas gingivalis*. *Trends in Microbiol.*, **3**, 45-51.
- 41) Du, L., Pellen-Mussi, P., Chandad, F., Mouton, C. and Bonnaure-Mallet, M. (1997) : Fimbriae and the hemagglutinating adhesin HA-Ag2 mediate adhesion of *Porphyromonas gingivalis* to epithelial cells. *Infect. Immun.*, **65**, 3875-3881.

- 42) Challacombe, S.J. and Shirlaw, P.J. (1994) : Handbook of Mucosal Immunology (Ogra, P. L., Mestecky, J., Lamm, M.E., Strober, W., McGhee J. R., Bienenstock, J. editor). ed.1. Academic Press, San Diego, CA, 607-624.
- 43) Hirano, T., Akira, S., Taga, T. and Kishimoto, T. (1990) : Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunol. Today*, **11**, 443-449.
- 44) Baggiolini, M., Dewald, B. and Moser, B. (1994) : Interleukin-8 and related chemotactic cytokines- CXC and CC chemokines. *Adv. Immunol.*, **55**, 97-177.
- 45) Ebnet, K., Kaldjian, E., Anderson, A. O. and Shaw, S. (1996) : Orchestrated information transfer underlying leukocyte endothelial interactions. *Annu. Rev. Immunol.*, **14**, 155-177.
- 46) Cacalano, G., Lee, J., Kikly, K., Ryan, A.M., Pitts-Meek, S., Hultgren, B., Wood, W.I. and Moore, M.W. (1994) : Neutrophil and B cell expansion in mice that lack the murine IL-8 receptor homolog. *Science*, **265**, 682-684.
- 47) Jung, H. C., Eckmann, L., Yang, S-k., Panja, A., Fiere, J., Morzycka-Wroblewska, E. and Kagnoff, M.F. (1995) : A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J. Clin. Invest.*, **95**, 55-65.

