

# 肺炎球菌経鼻粘膜ワクチンに関する基礎的研究

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 生命薬科学専攻 大間敬太

## [目的]

肺炎球菌は主要な呼吸器病原性菌で、髄膜炎や敗血症などの侵襲性感染症や肺炎、副鼻腔炎を惹起し、莢膜多糖体の血清型により少なくとも 90 種類に分類される。これまでに肺炎球菌ワクチンとして莢膜多糖体抗原をベースにした 23 価肺炎球菌ワクチン、7 価コンジュゲートワクチンが臨床応用されているが、原理的に多価ワクチンである必要がある。このため、全ての肺炎球菌に共通な抗原を用いた新規ワクチンの開発が望まれている。新規ワクチン抗原として注目されている **Pneumococcal surface protein A (PspA)** は全ての肺炎球菌が保有しており、PspA に対する抗体がマウスへの肺炎球菌感染に対する防御効果を示す事が知られている。また、肺炎球菌は気道粘膜より侵入するため、その感染予防には気道粘膜における防御が重要だと考えられる。粘膜局所への抗原投与により、全身性のみでなく粘膜面への抗原特異的な抗体産生を誘導できるが、抗原単独の投与では抗体産生能が低いため粘膜アジュバントが必要となる。

粘膜アジュバントには様々なものが報告されているが、PspA に対する粘膜アジュバントとして、抗原提示細胞の中でも中心的な役割をする樹状細胞の分化および活性化を促進する **Flt3 ligand (FL)** の遺伝子配列を組み込んだ **plasmid DNA (pFL)** および病原体成分を認識し自然免疫応答を活性化する **Toll-like receptor (TLR)** に対する **agonist** に着目した。本研究では、PspA に対する pFL および TLR agonist (TLR 2, 3, 4 および 9) の粘膜アジュバント効果および肺炎球菌感染に対する防御効果を検討した。

## [実験方法]

免疫動物には C57BL/6 マウスを用いた。PspA 5.0 $\mu$ g および pFL 50 $\mu$ g を同時にマウス鼻腔へ投与した。コントロール群として FL の遺伝子配列を組み込んでいないプラスミド (pORF) 投与群または PspA 単独投与群を用いた。また、TLR agonist は、TLR 2; Pam3CSK4, TLR 3; Poly(I:C), TLR 4; LPS および TLR 9; CpG1826 を検討した。PspA 2.5 $\mu$ g および各 TLR agonist 10 $\mu$ g を同時にマウス鼻腔へ投与した。マウスへの免疫は、1 週間おきに 3 回おこない最終免疫後 1 週間目のマウスより血漿、気管支肺胞洗浄液 (BALF) および鼻腔洗浄液 (NW) を回収し PspA 特異的抗体を ELISA にて測定した。感染防御効果は肺炎球菌生菌を経鼻的に投与し、感染後の肺、NW または血中の肺炎球菌数を定量培養法にて測定した。

## [結果]

pFL の検討では、pFL+PspA 投与群において鼻腔および肺内の CD11c<sup>+</sup> 細胞数がコントロール群と比較して有意に増加していた。脾臓においては CD11c<sup>+</sup> 細胞数の増加は見られなかった。さらに、pFL+PspA 投与群において、BALF, NW および血中の PspA 特異的 IgA または IgG が、コントロール群と比較して有意に増加していた (図 1)。肺炎球菌経鼻感染後の気道および血中の肺炎球菌数は、pFL+PspA 投与群において pORF+PspA 投与群と比較して有意な菌数の減少が見られた。

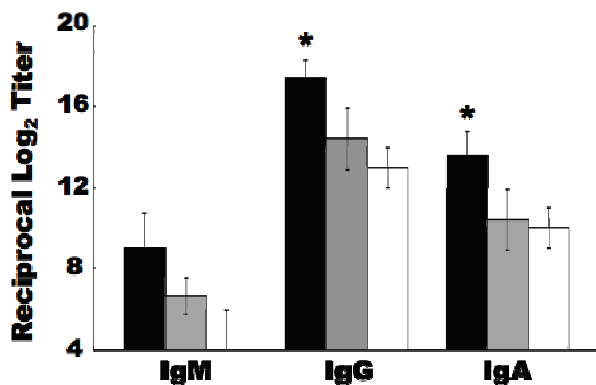


図 1. pFL+PspA (black bar), pORF+PspA (gray bar) および PspA 単独 (white bar) 経鼻投与後の血中 PspA 特異的抗体価。  
\* $P < 0.05$ , PspA+pORF および PspA 単独との比較

TLR agonist の検討では、各 TLR agonist+PspA 投与群において血中の PspA 特異的 IgG が、PspA 単独投与群と比較して有意に増加していた。さらに、各 TLR agonist+PspA 投与群において BALF および NW 中の PspA 特異的 IgA または IgG が、PspA 単独投与群と比較して有意に増加していた。さらに、Th1/Th2 免疫応答の誘導を IgG1 および IgG2a の産生により比較した。Th1 細胞より産生される IFN- $\gamma$  により IgG2a 産生が誘導され、Th2 細胞から産生される IL-4 により IgG1 産生が誘導される。Pam3CSK4 および LPS では PspA 特異的 IgG1 が主に誘導されたのに対し、Poly(I:C) および CpG1826 では PspA 特異的 IgG2a が Pam3CSK4 および LPS 群と比較して有意に増加していた (図 2)。また、肺炎球菌経鼻感染による防御効果の検討では、感染 3 時間後の肺内および感染 1 日後の鼻腔中の菌数が、各 TLR agonist+PspA 投与群において PspA 単独投与群および PBS(-) 投与群と比較して有意に減少しており、各 TLR agonist 間の菌数に有意差は見られなかった。

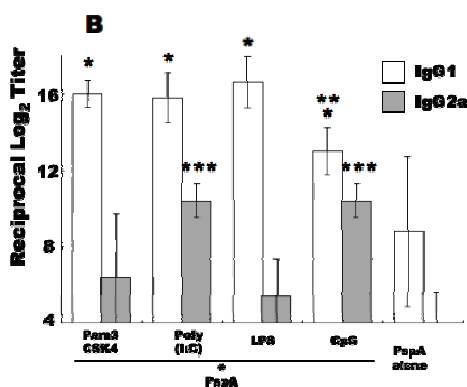


図 2. PspA+TLR agonist の経鼻免疫後の血中 PspA 特異的抗体価。  
\* $P < 0.05$ , PspA 単独群との比較, \*\* $P < 0.01$ , PspA と Pam3CSK4, Poly (I:C) あるいは LPS との併用接種群との比較, \*\*\* $P < 0.001$ , PspA と Pam3CSK4 あるいは LPS との併用接種群との比較。

#### [考察]

pFL および各 TLR agonist が、PspA に対し粘膜アジュバント効果を示す事が明らかとなった。pFL の経鼻投与により気道粘膜に増加した樹状細胞による抗原提示が促進し、気道粘膜上に PspA 特異的 IgA 産生が誘導されたと考えられる。さらに、気道における肺炎球菌感染防御効果は、粘膜上に誘導された PspA 特異的 IgA によるものだと考えられる。

各 TLR agonist のアジュバント効果により血中および気道粘膜中へ同等の PspA 特異的 IgG および IgA 産生が誘導された。さらに、各 TLR agonist は異なる免疫応答を誘導

する事が示され、Pam3CSK4 および LPS では Th2 免疫応答が主に誘導され、Poly(I:C) および CpG1826 では Th1 免疫応答も強く誘導される事が明らかとなった。しかしながら、各 TLR agonist+PspA 投与群間において、肺炎球菌気道感染に対する防御効果が同等に見られた事から、気道における肺炎球菌感染防御に Th1/Th2 免疫応答の優位性は影響しない事が明らかとなった。PspA に対する粘膜アジュバントの選択時には、Th1/Th2 免疫応答を考慮せずに選択可能である事が示唆された。

[基礎となった学術論文]

(1) Oma K., Zhao J., Ezoe H., Akeda Y., Koyama S., Ishii KJ., Kataoka K., Oishi K., *Vaccine*. In press (2009).