

## 総説

## 細菌感染に対する防御ワクチン

渡末 仁

大阪府立大学大学院生命環境科学研究科

(〒 598-8531 大阪府泉佐野市りんくう往来北 1-58)

## [はじめに]

感染症を予防するうえで有効なワクチンは、自然感染による免疫応答の誘導プロセスを模倣できるワクチンが有用である。病原微生物が生体に感染する場合その多くは粘膜を介して感染し、その後誘導される免疫（粘膜局所免疫ならびに全身免疫）応答により排除される。そのため、病原微生物感染の第一ステップである粘膜感染を防止できるワクチン（粘膜ワクチン）は、感染症を予防する上で特に有効な防御ワクチンとなる。しかしながら、従来からの注射によるワクチンは、全身免疫応答を効率よく誘導できるが、病原微生物の感染部位である粘膜局所に免疫応答を誘導できない。そのため防御効果は不十分である。自然感染による免疫応答の誘導プロセスを模倣できる粘膜ワクチンの開発には、粘膜免疫誘導組織へ効率よくワクチン抗原を送達できるシステムの構築が重要である。

近年、粘膜免疫誘導組織にワクチン抗原を送達させるシステムとして人工マイクロカプセルであるリポソームが注目されている。リポソームは、その膜上に病原体の抗原物質を再構成することができるだけでなくカプセル内に封入することもできる。さらにリポソームは、免疫担当細胞への抗原の提示をより有効なものとするように働くため、ワクチンキャリアーとしての応用研究が多くなされている。これまで我々は、効率の良い免疫誘導能をリポソームに持たせるために新たに pH 感受性膜融合高分子を構築し

た。新規 pH 感受性膜融合高分子を修飾したりリポソームは樹状細胞に対して指向性を持ち、高い免疫応答を誘導できることから、家畜における感染症予防のための防御ワクチン（新規粘膜ワクチン）として応用が可能である。今回、細菌感染に対する防御ワクチンとして新規 pH 感受性膜融合高分子修飾リポソーム粘膜ワクチンの有用性について概説する。

## [粘膜免疫]

ほ乳類において粘膜は、生体が直接外界と接し無数の病原微生物や外来抗原などの異物と直接接触する最前線である。外部環境と接する界面の粘膜は、同じく外界と接する皮膚に比べて数百倍の表面積を有しており、さまざまな病原微生物にとって動物体内に侵入する主要な経路となっている。そのため、あらゆる異物の体内への侵入を阻止する上で、粘膜面における免疫防御機構が重要な役割を果たしている。

例えば、消化管や呼吸器などの生体粘膜は、絶えず暴露されている細菌、ウイルスなどの微生物、異物の侵入を阻止するために、粘膜免疫を誘導する誘導組織と実際に粘膜免疫が機能する実行組織からなる共通粘膜免疫機構（common mucosal immune system: CMIS）を形成し、粘膜局所において生体防御を営んでいる（図 1A & B）[9, 10]。消化器・呼吸器の粘膜面に存在する粘膜関連リンパ組織（mucosa-associated lymphoid tissue: MALT）は粘膜

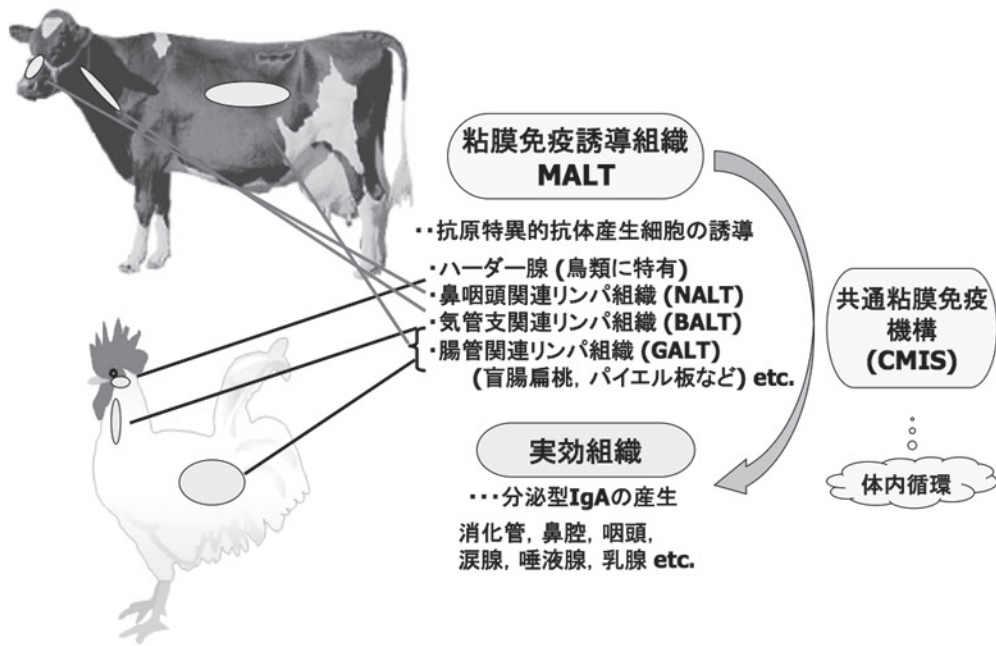


図 1A 粘膜免疫システム

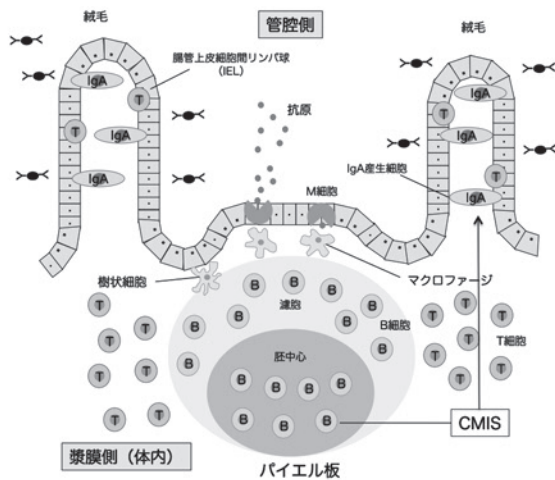


図 1B 粘膜免疫システム

免疫誘導組織としてその中核をなし、ほ乳類では鼻咽頭関連リンパ組織 (nasopharynx-associated lymphoid tissue: NALT)、気管支関連リンパ組織 (bronchus-associated lymphoid tissue: BALT)、腸管関連リンパ組織 (gut-associated lymphoid tissue: GALT) がある。また、鳥類ではハーダー腺も MALT として機能している (図1A)。これらいずれかの粘膜面を介して侵入してきた抗原は、MALT の上皮細胞層に存在する M 細胞によって取り

込まれ、その後、下層に存在するマクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞へ効率的に抗原が送達され、抗原特異的な粘膜免疫が誘導される (図 1A & B) [1, 4, 7]。

このように、粘膜免疫が誘導されるためには、ワクチン抗原が粘膜面を介して取り込まれる必要性があり、従来から行われている筋肉内や皮下へのワクチン接種では誘導されない。感染症の多くは粘膜を介して起こるため、効果的な感染防御の手段として、粘膜免疫の重要性が高まっている。さらに、粘膜面を介した免疫誘導は、粘膜局所のみならず全身における免疫も活性化できることから、効果的な感染症予防法として臨床への応用が期待されている。

**[pH 感受性膜融合高分子修飾リポソーム]**

**pH 感受性膜融合高分子**

粘膜免疫を誘導するためには、粘膜免疫誘導組織にワクチン抗原を効率よく送達させる必要がある。近年、ワクチン抗原のキャリアー (抗原デリバリーシステム (ADS)) として人工マイクロカプセルであるリポソームが注目されて

おり、多くの応用研究がなされている [2, 3, 5, 6, 8, 13-15]。

ADSとしてリポソームの有用性を高めるためには、リポソームに新たな機能を与え、しかも高いパフォーマンスを実現することが重要となる。リポソームに新たな機能とパフォーマンスを持たせるためには、温度、pH、光など、さまざまな刺激や環境変化に対して感受性を有する高分子を修飾し機能化する必要がある。ADSとしてのリポソームを考えた場合、高い免疫応答を誘導するために樹状細胞内に効率よく封入抗原をデリバリーする必要がある。そのためには、抗原を封入したリポソームが、樹状細胞のレセプターを介して取り込まれた後、エンドソーム膜と融合し、封入抗原を細胞質に放出できることが重要である。そのため我々は、エンドソームの持つ特殊環境である弱酸性の環境下で膜融合を起こす pH 感受性膜融合高分子（サクシニル化ポリグリシドール（SucPG）ならびにメチルグルタル化ポリグリシドール（MGluPG））を構築し、これらの高分子を修飾した新規 pH 感受性膜融合リポソームを考案し

た（図2）。

図2に示すように、pH感受性膜融合高分子である SucPG ならびに MGluPG はいずれもカルボキシル基（R-COOH）を有している。カルボキシル基（R-COOH）は、中性環境下ではプロトン（H<sup>+</sup>）が電離してカルボキシラートアニオン（R-COO<sup>-</sup>）となる。そのため、pH感受性膜融合高分子を修飾したリポソーム膜表面は、中性下においてはカルボキシラートアニオン（R-COO<sup>-</sup>）を発現し、陰性に荷電し安定化する。陰性に荷電したリポソームは樹状細胞の持つスカベンジャーレセプターを介して細胞内に特異的に取り込まれる事が知られている。取り込まれた後、樹状細胞のエンドソーム内においてリポソームを修飾している pH 感受性高分子のカルボキシラートアニオン（R-COO<sup>-</sup>）がプロトン（H<sup>+</sup>）化され、再度カルボキシル基（R-COOH）となる。エンドソームの酸性環境下で形成されたリポソームの pH 感受性膜融合高分子のカルボキシル基（R-COOH）は、エンドソーム膜のリン酸極性基と水素イオン結合し、リポソーム膜とエンド

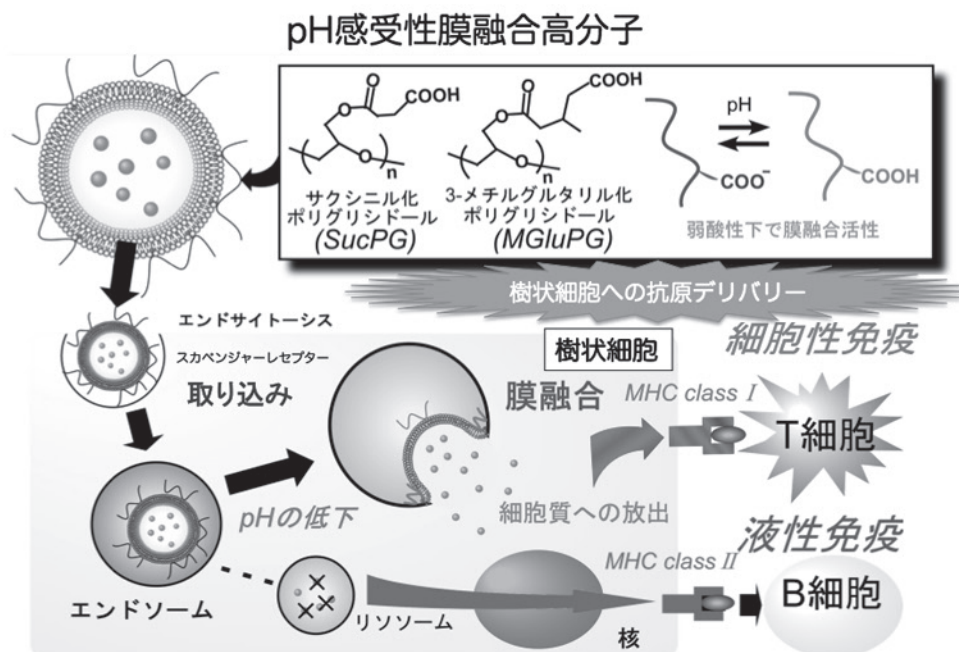


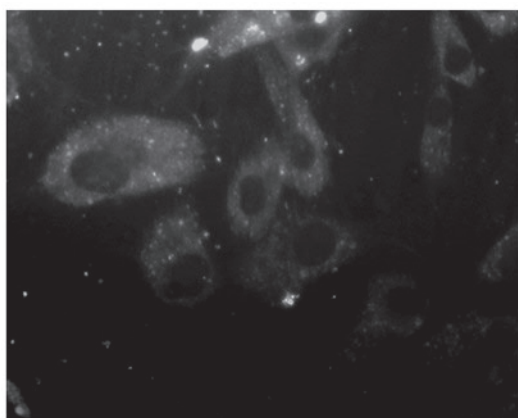
図2 pH感受性膜融合高分子修飾リポソームによる樹状細胞内への抗原の送達

ソーム膜が膜融合を引き起こす。その結果、リポソーム内に封入された物質（抗原）が樹状細胞内へ移行し、効率の良い免疫応答（液性免疫ならびに細胞性免疫）を誘導する。この様に、リポソームへの pH 感受性膜融合能の賦与は、樹状細胞内に効率よく封入抗原をデリバリーし、免疫誘導するうえで重要な機能となる。

実際に pH 感受性膜融合高分子である SucPG を修飾したリポソームに蛍光物質であるカルセインを封入し、牛マクロファージ細胞株である MP3 細胞を用いて細胞質内へのカルセインのデリバリーについて調べて見るとカルセインが MP3 細胞に導入され、細胞質内にカルセインの蛍光が観察された（写真 1）。この結果は、カルセインが pH 感受性膜融合高分子修飾リポソームによって効率よく MP3 細胞の細胞質に導入されていることを示しており、pH 感受性膜融合高分子修飾リポソームをワクチン用 ADS として使用した場合、樹状細胞内に効率よく封入抗原をデリバリーできることを示唆するものである。

### pH 感受性膜融合高分子修飾リポソーム粘膜ワクチンによる免疫誘導

そこで、pH 感受性膜融合高分子修飾リポ



MP3細胞

写真 1 pH 感受性膜融合高分子修飾リポソームを用いた牛マクロファージ細胞内へのカルセインの導入

ソームが粘膜ワクチンとして機能し、免疫応答を誘導するかについて明らかにするために、モデル抗原として卵白アルブミン（OVA）を SucPG 修飾 pH 感受性膜融合高分子修飾リポソームに封入させ、マウスに経鼻免疫を行った。その結果、SucPG 修飾リポソームによる免疫は、修飾していないリポソームで免疫した場合に比べ血清ならびに腸液中に有意に高い抗 OVA 抗体（IgG、IgA）を誘導した（図 3）。一方、IgE 抗体の誘導は認められなかった。さらに、血清中の抗 OVA-IgG 抗体のサブクラスについて解析した結果、SucPG を修飾していないリポソームで免疫した場合においては、Th2 タイプのサブクラスである IgG1 のみ誘導されていたが、SucPG を修飾したリポソームでは Th2 タイプのサブクラスである IgG1 のみならず、Th1 タイプのサブクラスである IgG2a ならびに IgG3 の誘導を認めた（図 3）。さらにサイトカインの mRNA について RT-PCR 法により解析した結果、SucPG 修飾リポソームで免疫したマウス脾臓リンパ球においてインターフェロン（IFN） $\gamma$  ならびに IL-4 の mRNA の発現が認められた（図 3）。同様の免疫応答の結果は、MGluPG 修飾リポソームを用いて経鼻免疫した場合においても認められた。特に、MGluPG 修飾リポソームは SucPG 修飾リポソームに比べ高い免疫応答を誘導できることが示された [12]。これらの結果は、pH 感受性膜融合高分子（SucPG あるいは MGluPG）修飾リポソームを応用した粘膜（経鼻）ワクチンが、全身免疫ならびに粘膜局所免疫を効率よく誘導できること、さらに誘導される免疫応答が、液性免疫、細胞性免疫の両者であることを示している。

### [リポソーム粘膜ワクチン]

#### 牛における免疫誘導効果

上述した免疫誘導能に優れる pH 感受性膜融



合リポソームが、家畜においてもマウスと同様に粘膜ワクチンとして機能することを明らかにするために牛を用いて解析を行なった。具体的には、高い免疫応答を誘導できる pH 感受性膜融合高分子 (MGIuPG) を修飾したリポソーム (MGIuPG リポソーム) に黄色ブドウ球菌 (SA) の破砕抗原を封入し、7~10 歳の乳牛 (1 群 3 頭) に 2 週間間隔で 3 回経鼻免疫を行い、全身ならびに乳房局所における免疫誘導効果について調べた。経鼻免疫の抗原量は、1 頭 1 回当たり 5mg (破砕抗原のタンパク量) とした。図 4 に示すように、SA 抗原封入 MGIuPG リポソームを乳牛に経鼻免疫した結果、免疫前に比べ、免疫後 42 日目において血清ならびに乳汁中に有意に高い抗 SA 抗体 (IgG、IgA) の誘導が確認された。血清中では、IgA 抗体に比べて高い IgG 抗体が誘導されたのに対して、乳汁中においては、IgG 抗体よりも高い IgA 抗体が誘導された。一方、SA 抗原のみを経鼻免疫した場合においては、血清ならびに乳汁の

いずれにおいても抗 SA 抗体 (IgG、IgA) の誘導が確認されなかった。この結果は、MGIuPG 修飾リポソームを応用した牛経鼻ワクチンは、全身免疫ならびに粘膜局所免疫を効率よく誘導でき、粘膜ワクチンとして機能していることを示唆している。さらに、経鼻ワクチン接種牛の末梢血リンパ球を用いて Th1 サイトカインであるインターフェロン (IFN) - $\gamma$  の mRNA の発現について RT-PCR 法により解析した結果、免疫牛の全例においてインターフェロン (IFN) - $\gamma$  の mRNA (77bp) の発現が確認された (写真 2)。これらの結果は、MGIuPG リポソームを応用した経鼻ワクチンは、牛において液生免疫のみならず細胞性免疫も誘導できることを示唆するものである。さらに、SA 抗原封入 MGIuPG リポソームの牛への経鼻投与による免疫誘導効果は、牛乳房炎に対する新規リポソーム経鼻ワクチン開発の可能性を示唆している。

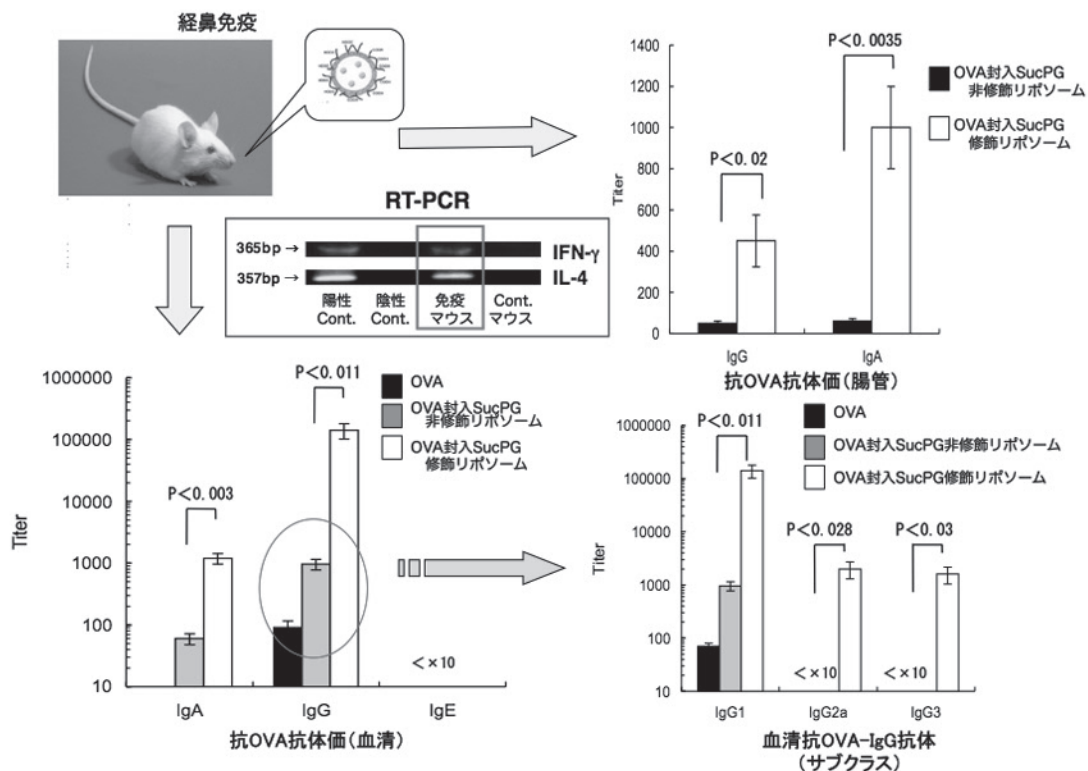


図 3 pH 感受性膜融合高分子修飾リポソーム粘膜ワクチンによる免疫応答

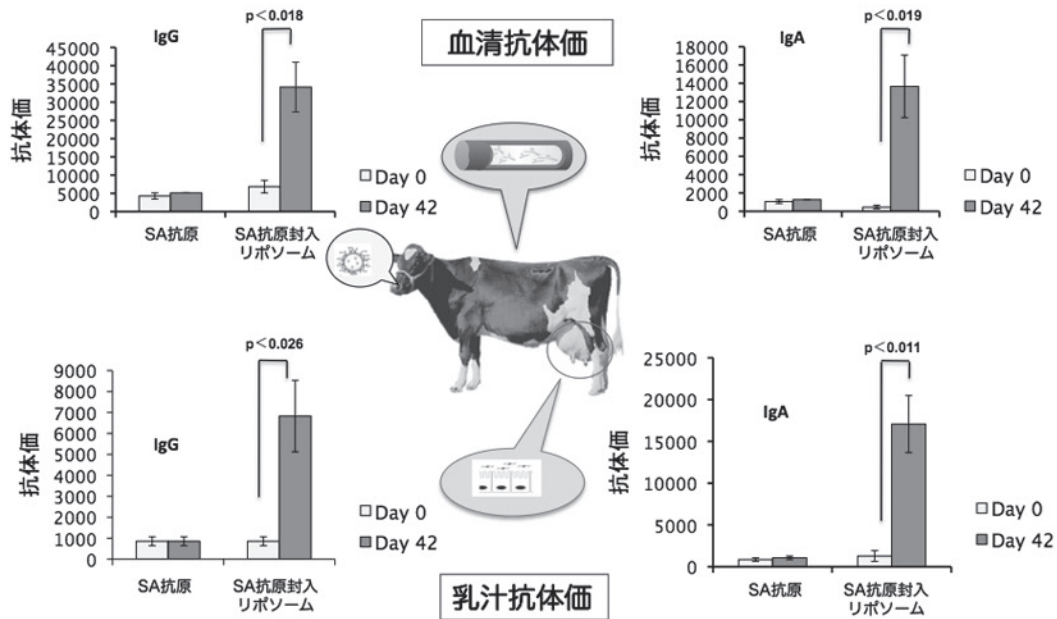


図4 黄色ブドウ球菌 (SA) 破碎抗原封入 MGlucan リポソーム経鼻免疫牛における免疫応答

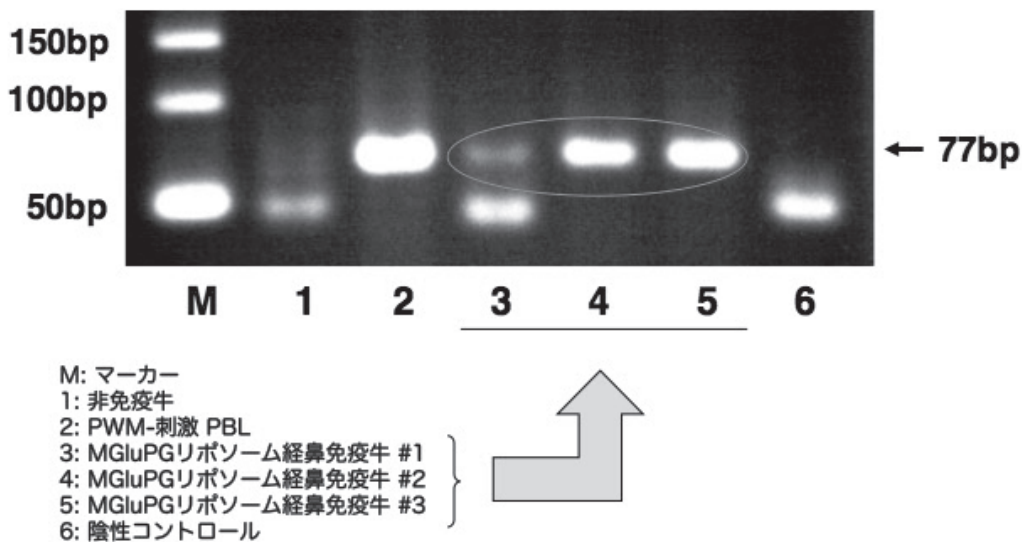


写真2 黄色ブドウ球菌 (SA) 破碎抗原封入 MGlucan リポソーム経鼻免疫牛の末梢血リンパ球におけるインターフェロン- $\gamma$  mRNA の発現解析

### 牛における感染防御効果

牛において、SA 抗原を封入した新規 pH 感受性膜融合高分子修飾リポソーム粘膜ワクチン (MGlucan リポソームワクチン) の経鼻免疫により、SA に対して全身ならびに乳房局所において高い免疫応答が誘導できた(図4)。そこで、細菌感染に対する防御ワクチンとして MGlucan リポソームワクチンが機能するか否かについて明らかにするために、SA 抗原封入 MGlucan

リポソーム経鼻ワクチンにより SA に対する免疫応答を誘導した牛の乳房内へ SA を接種し、その感染防御効果 (乳房炎発症防御効果) について乳汁中からの SA の分離、乳汁体細胞数の変化を指標に試験を行った。

まず、ワクチン接種群、ワクチン非接種群の乳牛の乳房内へ乳頭から 100CFU の SA を感染させ、その後、乳汁から SA の分離を行った。その結果、ワクチンを接種していないコント

ロール群 (Cont. 群) の乳牛においては、接種後 2 日目から実験期間中の間、実験に供した乳牛全例の乳汁から SA が分離された (表)。一方、ワクチン接種群 (Vac. 群) においては、実験期間中、いずれの乳牛の乳汁からも SA は分離されなかった (表)。さらに、乳汁体細胞数の変化について調べた結果、コントロール群 (Cont. 群) の乳汁においては、菌接種後 2 日目で体細胞数が乳汁 1ml 当たり 20 万を超え、3 日目以降は乳汁 1ml 当たり 30 万以上の高い値を示し、乳房炎を発症した (図 5)。しかしながら、ワクチン接種群 (Vac. 群) においては、実験期間中、体細胞数は、乳汁 1ml 当たり 10 万以下で推移し、乳房炎の発症は認められなかった (図 5)。この結果は、SA 抗原封入 MGlucPG リポソーム経鼻ワクチンにより乳房粘膜局所に誘導された免疫応答が SA の感染防御に有効に働いていることを示唆しており、今後の牛乳房炎ワクチン開発において、新規 pH 感受性膜融合高分子修飾リポソーム粘膜ワクチンの有用性を示している。

### 【おわりに】

今回、新たに構築した pH 感受性膜融合高分子を修飾したリポソームのワクチンキャリアーとしての高い免疫誘導能と、それを応用した粘膜 (経鼻) ワクチンの細菌感染に対する防御ワクチンとしての有用性について概説した。pH 感受性膜融合高分子をリポソームに導入することにより、抗原提示細胞である樹状細胞に対し

て、スカベンジャーレセプターを介してワクチン抗原を効率良く送達できる機能をリポソームに与えることができた。この機能は、リポソームを応用したワクチン開発において高い免疫応答を効果的に誘導するうえで重要な機能となる。リポソームの pH 感受性膜融合能による樹状細胞の細胞質内への封入抗原の内在化は、免疫誘導 (液性免疫ならびに細胞性免疫) に役立つ抗原搬送システムであり、感染防御に効果的なワクチン開発に不可欠の新技术といえる。pH 感受性膜融合高分子修飾リポソームを応用した牛乳房炎のモデル経鼻ワクチンは、乳房内粘膜に IgA を中心とした免疫応答を効率よく誘導でき、誘導された免疫応答は原因菌の乳房粘膜への定着阻止に有効に働くと考えられ、乳房炎発症予防ワクチンとして機能することが示唆された。そのため、pH 感受性膜融合高分子修飾リポソームを応用したリポソーム粘膜ワクチンの技術は、実際の感染症予防に効果的な粘膜免疫応答を誘導できる有用な技術であるといえる。また、封入抗原を樹状細胞の細胞質内への内在化できる本技術は、細胞内感染する細菌やウイルス、原虫などの感染防御に有効な細胞性免疫応答を効率よく誘導できる。これまで生ワクチンでしか誘導することが出来なかった細胞性免疫応答が本技術を応用することにより不活化抗原でも誘導でき、より安全性の高いワクチン開発が可能となる。今後、pH 感受性膜融合高分子修飾リポソームを応用したワクチンの技術が、多くの家畜感染症のワクチン開発のた

表 黄色ブドウ球菌 (SA) 感染後の乳汁からの菌の分離

群*	SA 陽性頭数 / 実験に供した頭数							
	感染前	1 日目	2 日目	3 日目	4 日目	5 日目	6 日目	7 日目
Cont.	0/3 (0.0)	0/3 (0.0)	3/3 (100)	3/3 (100)	3/3 (100)	3/3 (100)	3/3 (100)	3/3 (100)
Vac.	0/3 (0.0)	0/3 (0.0)	0/3 (0.0)	0/3 (0.0)	0/3 (0.0)	0/3 (0.0)	0/3 (0.0)	0/3 (0.0)

\* Cont.、コントロール群；Vac.、ワクチン接種群  
カッコ内は%を表す。

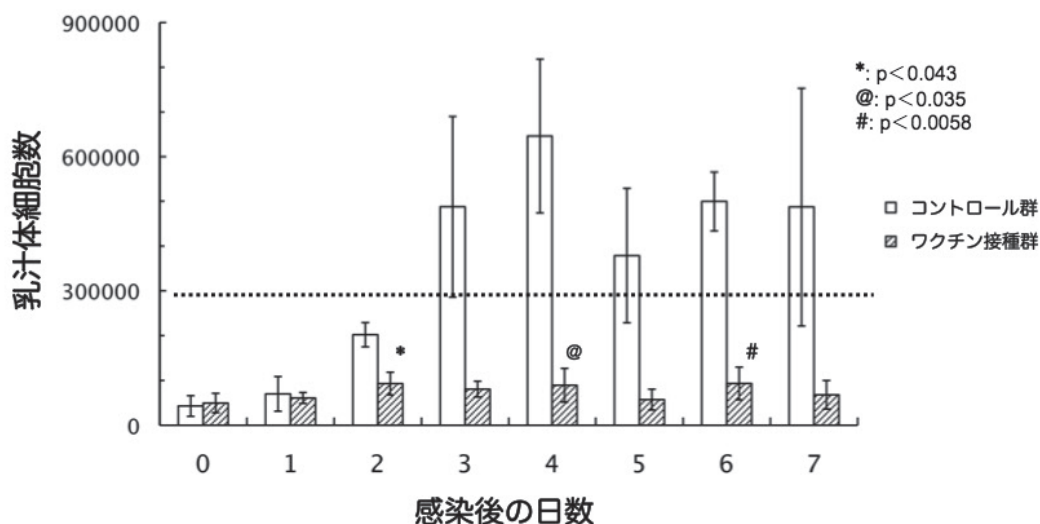


図5 黄色ブドウ球菌感染後における乳汁体細胞数の変化

めの新規技術として応用されることを期待している。

[引用文献]

1. Brandtzaeg, P., Farstad, I. N. and Haraldsen, G. 1999. Regional specialization in the mucosal immune system: primed cells do not always home along the same track. *Immunol. Today* 20: 267-277.
2. Fukutome, K., Watarai, S., Mukamoto, M. and Kodama, H. 2001. Intestinal Mucosal Immune Response in Chickens Following Intraocular Immunization with Liposome-Associated *Salmonella Enterica* Serovar Enteritidis Antigen. *Dev. Comp. Immunol.*, 25: 475-484.
3. Han, M., Watarai, S., Kobayashi, K. and Yasuda, T. 1997. Application of liposomes for development of oral vaccines: Study of *in vitro* stability of liposomes and antibody response to antigen associated with liposomes after oral immunization. *J. Vet. Med. Sci.*, 59: 1109-1114.
4. 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: 3346-3353.
5. Irie, T., Watarai, S. and Kodama, H. 2003. Humoral immune response of carp (*Cyprinus carpio*) induced by oral immunization with liposome-entrapped antigen. *Develop. Comp. Immunol.*, 27: 413-421.
6. Irie, T., Watarai, S., Iwasaki, T. and Kodama, H. 2005. Protection against experimental *Aeromonas salmonicida* infection in carp by oral immunisation with bacterial antigen entrapped liposomes. *Fish Shell. Immunol.*, 18: 235-242.
7. Kunkel, E. J. and Butcher, E. C. 2003. Plasma-cell homing. *Nat. Rev. Immunol.*



- nol., 3: 822-829.
8. Li, W., Watarai, S., Iwasaki, T. and Kodama, H. 2004. Suppression of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis excretion by intraocular vaccination with fimbriae incorporated in liposomes. *Develop. Comp. Immunol.*, 28: 29-38.
  9. McDermott, M. R. and Bienenstock, J. 1979. Evidence for a common mucosal immunologic system. I. Migration of B immunoblasts into internal, respiratory, and genital tissues. *J. Immunol.*, 122: 1892-1898.
  10. Mestecky, J. 1987. The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. *J. Clin. Immunol.*, 7: 265-276.
  11. Tana, Watarai, S., Isogai, E. and Oguma, K. 2003. Induction of intestinal IgA and IgG antibodies preventing adhesion of verotoxin-producing *Escherichia coli* to Caco-2 cells by oral immunization with liposomes. *Lett. Appl. Microbiol.*, 36: 135-139.
  12. Yuba E., Kojima C., Harada A., Tana, Watarai S., and Kono K. 2010. pH-Sensitive fusogenic polymer-modified liposomes as a carrier of antigenic proteins for activation of cellular immunity. *Biomaterials*, 31, 943-951.
  13. Uemura, A., Watarai, S., Ohnishi, Y. and Kodama, H. 2005. Protective effect of anti-ganglioside antibodies against experimental *Trypanosoma brucei* infection in mice. *J. Parasitol.*, 91: 73-78.
  14. Watarai, S., Han, M., Tana and Kodama, H. 1998. Antibody response in the intestinal tract of mice orally immunized with antigen associated with liposomes. *J. Vet. Med. Sci.*, 60: 1047-1050.
  15. Watarai, S., Tana, Inoue, K., Oguma, K., Naka, K. and Kodama, H. 2000. Inhibitory effect of intestinal anti-globotriaosylceramide IgA antibody on verotoxin-induced cytotoxicity. *Lett. Appl. Microbiol.*, 31: 449-454.

### Protective Vaccine against Bacterial Infection

Shinobu Watarai

Division of Veterinary Science, Graduate School of Life and Environmental Sciences,

Osaka Prefecture University

(1-58 Rinkuourai-kita, Izumisano, Osaka 598-8531, Japan)