

氏名(本籍)	若本裕晶(広島県)		
学位の種類	博士(獣医)		
学位記番号	獣医博甲第236号		
学位授与年月日	平成19年9月14日		
学位授与の要件	学位規則第3条第1項該当		
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻		
研究指導を受けた大学	帯広畜産大学		
学位論文題目	ポリカチオン性物質を用いた新規アジュバントの開発に関する研究		
審査委員	主査	帯広畜産大学	教授 牧野壮一
	副査	帯広畜産大学	教授 武士甲一
	副査	岩手大学	教授 津田修治
	副査	東京農工大学	教授 松田浩珍
	副査	岐阜大学	教授 福士秀人

### 論文の内容の要旨

これまで種々のワクチンアジュバントが疾病予防のために実用化されてきたが、最も普及しているのがアルミニウムゲル(以下 ALUM)である。ALUM は主に Th2 側の応答を惹起し、高い IgG 抗体産生を促す一方で細胞性免疫の増強は小さい。感染防御にはバランスの取れた Th1 と Th2 の応答が必要といわれているので、体液性免疫(Th2)と細胞性免疫(Th1)の両方を刺激する有効かつ安全なアジュバントの開発が重要である。

ポリカチオン性の物質は、バランス良く Th1 と Th2 を刺激し、免疫応答を惹起することが報告されており、その内、イプシロン-ポリリジン(以下 EPL)はカチオン性のリジンの水溶性ホモポリマーで、その抗菌活性から食品の日持ち向上剤として日本国内で広く使われてきた。同様にポリエチレンイミン(PEI)もカチオン性の水溶性ポリマーで、食品製造原料などに広く使われている。両物質は Th1 側の惹起に有望なアジュバントになりうると考えられる。これらは、経口接種では極めて安全であるが、高濃度で静脈注射した場合、水溶性であるため、細胞に直接作用して毒性を示す。そこで、毒性をなくすために、両ポリマーに疎水基(ステアリルグリシジルエーテル)を化学的に導入し、疎水化した微小粒子、イプシロン-ポリリジン微小粒子(以下 SGEPL)とポリエチレンイミン微小粒子(以下 SGPEI)を作出した。両微小粒子と ALUM について免疫応答を比較した。

まず、SGEPL および SGPEI の作成と物理化学的特徴と免疫学的応答について調べた。SGEPL および SGPEI は、Triton-X-405 存在下、100℃で18-24時間攪拌させながらステアリルグリシジルエーテル(SGE)と共有結合させて、得られた沈殿を水に透析し調製した。EPL と疎水基の反応モル比にかかわらず表面荷電は変わらなかったが、卵白アルブミン(OVA)の微小粒子への吸着量は、疎水基の反応モル比を上げると極端に減少した。

このことは、OVA が SGEPL の荷電のみで吸着しているわけではないことを示していた。抗原を OVA とし、反応モル比の異なる条件で作成した SGEPL をアジュバントとしてマウス (BALB/c) に腹腔内投与したところ、OVA の吸着量が少ない条件の SGEPL では血中抗体量が減少した。次に、抗原を OVA とし、SGEPL と SGPEI および ALUM をアジュバントとしてマウス (BALB/c) に腹腔内投与したところ、SGEPL は血中の抗 OVA-IgG2a 抗体の産生を有意に増強した。免疫後に摘出した脾臓細胞に OVA をパルスあるいはパルスしなかった場合についてサイトカイン産生を調べたところ、SGEPL は IL-4, IL-5 の産生を抑え、IL-12 と IFN- $\gamma$  の産生を増強した。SGEPL と SGPEI の表面荷電は、ほぼ同じであったが、免疫応答は明らかに異なり、SGPEI は SGEPL と ALUM の中間的な応答を示した。

次に、この免疫応答が、SGEPL と OVA の組み合わせ特異的に起こったのではないことを確認した。ナイーブマウス (BALB/c) に SGEPL (抗原なし) あるいはリン酸緩衝生理食塩水 (PBS<sup>-</sup>) を腹腔内投与して得られた脾細胞に、OVA をパルスした場合とパルスしない場合について、サイトカイン産生を調べた。脾細胞に対する OVA のパルスの有無は、サイトカインの産生にほとんど影響を与えておらず、SGEPL のみの投与が PBS<sup>-</sup> のみの投与よりも有意に IL-4, IL-5 の産生を抑え、IL-12 の産生を増強した。このことは、SGEPL と OVA の組み合わせによって、2 段落目に記載した免疫応答を示したのではなく、また、OVA が直接脾細胞に作用してサイトカインを誘導したわけではないことを示していた。すなわち、SGEPL はそれ自身が IL-4 と IL-5 の抑制および IL-12 を増強することが示された。次に OVA 以外の抗原を用いて免疫誘導能を確認するために、豚丹毒の感染防御抗原として報告されている SpaA の組換え蛋白を抗原として使用すると、ALUM と比較して Th1 側の応答がより強く惹起された。

最後に、SGEPL の脾細胞と B 細胞への直接的影響を調べるために、ナイーブマウス (BALB/c) の脾細胞に SGEPL を直接加えて培養した。その結果、IL-12 と IFN- $\gamma$  の産生が増強された。脾細胞ならびに B 細胞を IL-4 および抗 CD40 モノクローナル抗体とともに培養すると、IgG1 とともに IgE が産生された。SGEPL を加えておくと、IFN- $\gamma$  の産生増強により、IgE の産生を抑制した。さらに精製 B 細胞からの IgE 産生を IL-12 や IFN- $\gamma$  の影響なしでも抑制した。

このように、SGEPL は、抗原に非依存的に Th1 側のサイトカイン産生を惹起することが明らかになった。また、機能は不明だが、B 細胞に直接働きかけて IgE の産生を抑制する効果も見られた。

以上の結果から、SGEPL は Th1 と Th2 のバランスを崩すことなく免疫を付与することが出来る有望な新規アジュバントであると考えられた。

## 審 査 結 果 の 要 旨

一般的に、感染症の防御にはバランスの取れた体液性免疫 (Th2) と細胞性免疫 (Th1) 応答が必要と考えられている。そこで、申請者は、Th1 と Th2 の両方を刺激する有効かつ安全なアジュバントの開発を試みた。現在、アルミニウムゲル (ALUM) がアジュバントとして広く普及しているが、ALUM は主に Th2 側の応答を惹起し、高い IgG 抗体産生を促す一方で、細胞性免疫の増強は小さい。そこで、申請者は、ポリカチオン性の物質であるイプシロン-ポリリジン (EPL) とポリエチレンイミン (PEI) に着目した。前者はカチオン性のリジンの水溶性ホモポリマー

で、その抗菌活性から食品の日持ち向上剤として国内で広く使われてきた。両者は経口接種では安全であるが、高濃度で静脈注射すると、水溶性であるため細胞に直接作用して毒性を示す。そこで、ステアリルグリシジルエーテル (SGE) と共有結合させて、疎水化により無毒化された微小粒子、イプシロン-ポリリジン微小粒子 (SGEPL) とポリエチレンイミン微小粒子 (SGPEI) を得た。まず、それらの免疫学的応答を、卵白アルブミン (OVA) を抗原として、SGEPL と SGPEI および ALUM をアジュバントとして、BALB/c マウスに腹腔内投与により調べた。その結果、SGEPL は血中の抗 OVA-IgG2a 抗体の産生を有意に増強し、IL-4 と IL-5 の産生を抑え、IL-12 と IFN- $\gamma$  の産生を増強した。SGPEI は SGEPL と ALUM の中間的な応答を示した。さらに、SGEPL はそれ自身が IL-4 と IL-5 の抑制および IL-12 の増強に関与していた。次に、豚丹毒の感染防御抗原 (SpaA) を抗原として使用すると、SGEPL は、ALUM より Th1 側の応答を強く惹起した。最後に、SGEPL の脾細胞と B 細胞への直接的影響を、BALB/c ナイーブマウスの脾細胞を用いて調べた。その結果、SGEPL は IL-12 と IFN- $\gamma$  の産生を増強した。また、脾細胞と B 細胞を IL-4 および抗 CD40 モノクローナル抗体とともに培養すると、IgE の産生が抑制された。このように、SGEPL は、抗原に非依存的に Th1 側のサイトカイン産生を惹起することが明らかになった。また、機能は不明だが、B 細胞に直接働きかけて IgE の産生を抑制する効果も見られた。これらの内容は、SGEPL は Th1 と Th2 のバランスを崩すことなく免疫を付与することが出来る有望な新規アジュバントであると考えられ、将来の予防法の新たな開発に大きな助けとなる可能性を示すものであり、学術的に重要な知見を提示したといえ、研究者としての素質ならびに熱意は十分学位を与えるだけの価値があると全員一致で判断した。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

#### 基礎となる学術論文

- 1). 題 目 : Epsilon-polylysine microparticle adjuvant drives cytokine production to Th1 profile  
著 者 名 : Wakamoto, H., Matsuda, H., Kawamoto, K. and Makino S-I.  
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science  
巻・号・頁・発行年 : 69(7) :717-723 2007

#### 既発表学術論文

なし