

論文内容の要旨

農学国際専攻

平成 14 年度博士課程進学

氏名 米田 篤史

指導教官名 松本 安喜 助教授

経鼻免疫により誘導される狂犬病発症防御免疫機構に関する研究

世界的に重要な人獣共通感染症である狂犬病は、イヌ科動物間およびイヌ科動物からの感染によりヒト、家畜に感染する。狂犬病のコントロールには、市街地や森林のイヌ科動物へのワクチン接種、飼いイヌの繫留、市街地のノラ犬の排除が重要である。現行の狂犬病ワクチンは、注射により投与されているが、これは、熟練者を要する点、森林動物に接種できないこと、あるいはワクチンの保存等、課題も多い。経鼻・経口投与のような、注射器を用いない粘膜免疫法は、投与が容易であり、実際に北米やロシア等で、森林のイヌ科動物に対し、組換えワクシニアウイルスを用いた狂犬病ワクチンを混入した肉の経口投与が行われ、効果を示している。本研究では、より安全な粘膜免疫法を確立する目的で、感染性のない不活化狂犬病ウイルス(RV)の経鼻投与による狂犬病ウイルス感染防御免疫の誘導を試みた。RV は、感染動物の咬傷等から宿主動物に侵入し、末梢感染組織から末梢神経細胞に感染、上行し、脳内に達し、脳細胞を傷害することにより発症し、死に至る。RV は、感染部位である末梢組織と脳神経組織の双方で免疫反応にさらされると考えられるが、脳は血液脳関門により血液循環から隔離されており、抗体や高分子量の補体成分(C4等)は、末梢に比べ脳内では低濃度でしか存在していない。このため、末梢と脳内の RV に対し、特に抗体および補体を介する感染防御機構は、効果が異なると考えた。そこで、本研究第1章において、末梢と脳内のウイルスに対して中和抗体や異なるサブクラスの抗体がどのように作用するかを、ddy マウスへの抗体移入実験により解析した。次に、不活化 RV ワクチンの経鼻投与によって ddy マウスに誘導される免疫反応および致死量 RV 攻撃試験によるマウス生残率を、ワクチン検定の定法である NIH 法に準じた腹腔接種法を対照として、第2章では脳内 RV 接種、第3章では筋肉内 RV 接種により検討した。と比較した。末梢感染 RV に対する感染防御効果を検討した。研究論文は以下の3章によって構成される。

(第1章) 末梢および脳内の異なる感染ステージの RV に対する抗体による感染防御機構の解析

血液脳関門により、抗体および補体の濃度が末梢と脳内では異なることから、機能する免疫機構が異なると考え、脳内と末梢における抗体の感染防御機構を解析した。不活化 RV ワクチン (TC ワクチン) を超遠心法で濃縮した濃縮 RV (CRV) 30 μ l を 2 回腹腔免疫し、抗 RV 抗血清を作製した。TC ワクチンを抗原とした ELISA 法により、抗 RV 抗体価 (endpoint titer) を測定し、ELISA において OD が陽性となる最大希釈血清 100 μ l に含まれる抗 RV 抗体を 1 EPU (endpoint unit) とした。致死量 (25 LD₅₀) の RV CVS 株の接種において、マウスを 50 % 生残させるのに要する抗 RV 抗体量を EPU で表記した。抗 RV 抗血清を腹腔に移入した後、RV をマウス臀筋より末梢感染させたところ、50% 生残させるために 356,516 EPU の抗 RV 抗体を要した。一方、脳内感染させた場合は、50% 生残のために、あらかじめ脳内に抗血清を移入した場合には 81,789 EPU 要した。脳内に抗血清を移入し、脳内にウイルス感染させた場合に比べて、腹腔に抗血清を移入し、末梢感染させた方が 4.4 倍の抗体を要しているが、末梢では抗体が血液循環へ希釈されること、および末梢感染させるウイルス量が、脳内感染の 2,000 倍であることを考慮すると、抗 RV 抗体は、末梢のウイルスに対して、脳内よりも低濃度で効率的にウイルスを排除していると思われた。次に、補体活性化能の強い IgG₁ サブクラスに属し、共に RV の外被膜蛋白 (G 蛋白) を認識するモノクローナル抗体 (mAb) で、中和活性のない 2B9 および中和活性のある 12D15 を用い、RV CVS 株をこれらの mAb でオプソニン化した後ウイルスを末梢または脳内に接種した。末梢感染させた結果、マウス 50 % 生残に要する mAb 量は、2B9 が 1,426,063 EPU、12D15 が 629 EPU であった。中和活性のない 2B9 処理でマウスが生残したことより、末梢における IgG₁ を介した補体によるウイルス排除の有効性が示唆された。また、12D15 が少量で効果を示したことから、補体存在下でも、中和抗体はウイルス除去に貢献することが示された。一方、オプソニン化 RV を脳内感染させた結果、マウス 50 % 生残に要する mAb 量は、12D15 では 8,389 EPU であったが、2B9 処理では、マウスを生残させることはできなかった。これらの結果より、脳内感染 RV に対しては、補体によるウイルス排除はほとんど行われず、感染防御には中和活性が有効で有効であること、さらに、50 % 生残に要する 12D15 抗体量が、末梢より脳内で 12 倍必要としたことから、中和抗体による感染防御においても、補体が相乗的に機能することが示唆された。また、2B9 が、脳内で感染防御を示さなかったこと、および腹腔マクロファージを用いたオプソニン化 RV 食食実験で、補体によるウイルス排除が行われる抗体濃度では、少なくともウイルス力価を低下させなかったことから、食食細胞によるウイルス捕捉は、それほど効率的に機能していないと考えられた。

(第2章) 不活化 RV の経鼻投与により誘導される狂犬病発症防御免疫の RV 脳内感染実験による

評価

経鼻投与による RV 感染防御効果をマウスにおいて検討した。経鼻免疫抗原には CRV 30 μ l を、単独 (CRV) あるいはコレラトキシン (CT) 5 μ g と共に (CRV/CT), ddy マウスに 5 回経鼻投与した。最終免疫一週間後に採血し、抗体価を測定した後、致死量 (25 LD₅₀) の RV CVS 株を脳内感染させ、14 日間生死を観察した。対照として、CRV 30 μ l を 2 回腹腔免疫した群および非免疫群を設定した。CRV/CT 経鼻免疫群と腹腔免疫群は、血中抗 RV-IgG 抗体価は同程度の抗体価を示したが、中和抗体価は、有意差はないものの腹腔免疫群の方が若干高かった。IgG サブクラスでは、高レベルの IgG_{2a} 抗体が双方の免疫群で検出され、Th1 型の免疫が誘導されていることが示唆された。一方で、IgG₁ 抗体は、腹腔免疫群よりも、CRV/CT 経鼻免疫群で高値を示すマウスが多かった。CRV 経鼻免疫群では中和抗体は検出されたものの、前述の 2 群よりも低位だった。RV の脳内感染に対するマウス生残率は、CRV/CT および CRV 経鼻免疫群において、それぞれ 67 % および 17 % であった。CRV 腹腔免疫群は 6 頭全頭生残し、非免疫群は 6 頭全頭死亡した。30 μ l の CRV 免疫群で、RV の脳内接種で生残したマウスと死亡したマウスの血清中の抗 RV-IgG₁, IgG_{2a} 抗体価、中和抗体価を比較したところ、生残マウスの中和抗体価と IgG_{2a} 抗体価は、死亡マウスよりも有意に高かった。IgG_{2a} 抗体が Th1 の活性化の指標であることから、脳内感染 RV に対しては、Th1 型の免疫応答と中和抗体による免疫応答が有効であることが示唆された。これらの結果より、不活化 RV の経鼻投与により、RV に対する発症防御免疫を誘導することが可能であること、および CT 等のアジュバントが必須であることが示された。また、経鼻投与により IgG_{2a} のみならず IgG₁ も高値を示すマウスが多数見られたことから、Th1 型および Th2 型の双方の免疫反応を誘導することが示唆された。

(第3章) 不活化 RV の経鼻投与により誘導される狂犬病発症防御免疫の RV 末梢感染実験による 評価

第1章および第2章の結果から、IgG₁ 産生を誘導する経鼻免疫法は、補体を活性化し、末梢の RV に対して腹腔免疫法と同等以上の感染防御効果が期待できると考え、本章では、CRV/CT 経鼻投与の末梢感染 RV に対する感染防御効果を検討した。CRV または CRV/CT 経鼻免疫および CRV 腹腔免疫したマウス群をそれぞれ 2 分し、RV を脳内感染または末梢感染させた。その結果、双方の免疫マウスの生残率は、脳内感染群より、末梢感染群の方が高かった。すべての末梢感染マウスについて、生残したマウスと死亡したマウスの血清抗体価を比較したところ、生残マウスの中和抗体価と抗 RV-IgG_{2a} 抗体価に加えて IgG₁ 抗体価も、死亡マウスよりも有意に高か

ったことから、末梢の RV に対しては、Th1 型のウイルス感染細胞傷害、中和抗体による RV 感染阻止に加え、補体によるウイルス排除も感染防御に強く寄与している可能性が支持された。経鼻免疫マウス血清中の IgG₁ 抗体の末梢感染 RV 感染防御における寄与について、さらに検討するため、経鼻免疫または腹腔免疫マウス血清をそれぞれマウス腹腔に移入した後、RV 末梢感染実験を行った。その結果、50 %のマウスを生残させるために要した抗 RV 抗体量は、経鼻投与血清では 471,859 EPU、腹腔免疫血清では 356,516 EPU であった。それぞれに含まれる中和抗体量の比は 1:2.6、IgG₁ 抗体量比は、逆に 3:1 であった。これらの結果より、末梢感染 RV に対する抗体の作用として、経鼻免疫群では、IgG₁ 抗体を介して補体によるウイルス排除が行われるため、中和抗体価が低くても腹腔免疫と同等か、それ以上の感染防御効果を示したと考えられた。

本研究より、経鼻免疫による狂犬病の発症防御免疫の誘導は可能で、その効果は、通常の感染経路である末梢感染において、より効果を発揮することが示唆された。本研究は、狂犬病に対する経鼻免疫法の有用性を示し、現行のワクチンに代わる新しいワクチン投与方法になり得る可能性を示した。