

# ピリプロキシフェンは、マウスにおいてIgGの免疫応答を増強する

タンジナ・シャーミン

福岡大学薬学部

## Pyriproxyfen enhances the Immunoglobulin G immune response in mice

Tanjina Sharmin

Faculty of Pharmaceutical Sciences

### Abstract

Pyriproxyfen is a juvenile hormone mimic of vital importance for insect development with little risk to humans. This study was performed to investigate whether high doses of pyriproxyfen affect the immune response in mammals. Mice were immunized thrice with OVA in 5% ethanol, with or without pyriproxyfen or alum. Pyriproxyfen significantly enhanced specific total IgG immune response. This enhancement was observed with high doses of pyriproxyfen (9 or 15 mM) and the enhancement was not observed after 24 hr in treatment with pyriproxyfen. These results therefore suggested pyriproxyfen as a safe chemical. Moreover, pyriproxyfen induced higher levels of IgG2a and enhanced TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  responses whereas alum induced IgG1 with enhanced IL-4 and IL-10. These observations indicated that the mechanism of immune enhancement with pyriproxyfen may differ from that of alum.

**Keywords:** IgG, IgG2a, pyriproxyfen

### 1. 緒言

セスキテルペン類に含まれる幼若ホルモン (Juvenile hormones; JH) は、昆虫の様々な生理機能を調節する。また、蛹への変態に抑制的に作用することで正確な成長や発達を調節している<sup>1)</sup>。ピリプロキシフェン (Fig. 1) は、昆虫の発達を阻害するが、ヒトに対してはほとんど無害な幼若ホルモン類似体 (JH analog; JHA) である<sup>2)</sup>。近年、2つの Per-Arnt-Sim (PAS) ドメインとそれに続く基本的な helix-loop-helix モチーフを持つ methoprene-tolerant タンパク質 (Met) がピリプロキシフェンに結合すること、また、JH 依存的に働く受容体型転写因子であることが報告されている<sup>3)</sup>。そのため、ピリプロキシフェンは、Met の強力なリガンドであり、幼若ホルモン様の作用により成虫への成長を阻止している。これまでの研究で、ピリプロキシフェンをマウスに 5 g/kg 経口投与した場合、安定で安全であること、また投与後速やかに生分解されることが示されている<sup>4)</sup>。しかし、高容量のピリプロキシフェン投与による哺乳類に対する免疫応答に関する作用はまだ知られていない。したがって、本研究では、高容量のピリプロキシフェンが免疫応答を惹起すること、また生体において高い安全性を有することを検討した。本研究では、抗原として

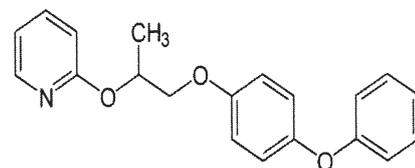


Fig. 1 Chemical structure of pyriproxyfen

広く使用されている卵白アルブミン (ovalbumin; OVA) を使用したピリプロキシフェンによる IgG の免疫応答を評価した。さらに、ピリプロキシフェンの抗原に対する免疫応答における免疫の変動について評価するために IgG のアイソタイプである IgG1, IgG2a や IgE, サイトカインの産生を測定した。

## 2. 材料と方法

### 2.1. 動物

本研究には、4週齢の BALB/c マウスの雌を使用した。動物の世話および動物を用いた実験は、福岡大学動物実験指針に基づいて行った (承認番号: 1104474)。

### 2.2. 免疫

ピリプロキシフェンにより誘導される OVA 特異的 total IgG 免疫応答を評価するために、1群17匹のマウスに対して、5%エタノールに溶解した OVA (2.5 µg/ml), Imject Alum (alum, 200 µg/ml, ポジティブコントロール) またはピリプロキシフェン (15 mM) を含む OVA を 0, 3, 6週目に3週間隔で免疫した。そして、3, 5, 7, 8週目にそれぞれのマウスの尾静脈から血液を回収した。用量依存的な作用の検討では、1群6匹のマウスに対して、3濃度のピリプロキシフェン (3 mM, 9 mM, 15 mM) を含む OVA を 0, 3, 6週目に免疫した。時間依存的な作用の検討では、1群12匹のマウスに対して、0, 3, 6週目にそれぞれ、ピリプロキシフェン (15 mM) 投与の 0, 3, 24時間後に OVA を免疫した。用量または時間依存的な作用の検討では、8週目に血液を回収した。次に、IgG1/IgG2a レベルを測定するために、1群6匹のマウスに対して、ピリプロキシフェン (15 mM) または alum と 5%エタノールに溶解した OVA を 0, 3, 6週目に免疫し、5, 8週目に血液を回収した。さらに、IgE レベルを測定するために、1群6匹のマウスに対して、同様の方法で3回免疫し、8週目に血液を回収した。すべての免疫は、200 µl の腹腔内投与で行った。回収した血液は、血清を回収するために、遠心 (12,000 rpm, 15分) した。血清は、非動化 (50°C, 30分) し、実験に用いるまで -20°C で保存した。免疫したマウスの血清は、ELISA に使用した。加えて、ピリプロキシフェンによる免疫応答のバランスを確認するために、サイトカインの変動を解析した。1群5匹のマウスに対して、ピリプロキシフェン (15 mM) または alum と 5%エタノールに溶解した OVA を 0, 3, 6週目に免疫し、3週目と5週目に脾臓を回収した。それから、脾臓細胞を調整し、OVA 0.5 mg/ml を曝露した。24時間または72時間後に培養上清を回収し、サンドイッチ ELISA によりサイトカイン量を定量した。

### 2.3. 統計解析

データは平均値 ± 標準誤差 (SEM) で表している。また、終点抗体価測定の解析ではノンパラメトリック Mann-Whitney *U* test を用い、サイトカイン変動の解析では Student's *t* test を用いて、データの比較を行った。すべての解析で、 $P < 0.05$  を統計的に有意であると判断した。

## 3. 結果

### 3.1. ピリプロキシフェンは、OVA 特異的 IgG の免疫応答を誘導した

Fig. 2 に total IgG の終点抗体価を示した。Fig. 2 (a), (b) より、ピリプロキシフェンを含む OVA を免疫した群において、3, 5週目では、コントロールと比較して OVA 特異的 total IgG の抗体価に有意な差は見られなかった。しかし、7週目に OVA 特異的 total IgG の抗体価の有意な上昇が見られ、その上昇は8週目にかけて増加した (3倍 ( $P = 0.04$ ), 4倍 ( $P = 0.02$ ))。Alum を含む OVA を免疫した群では、3

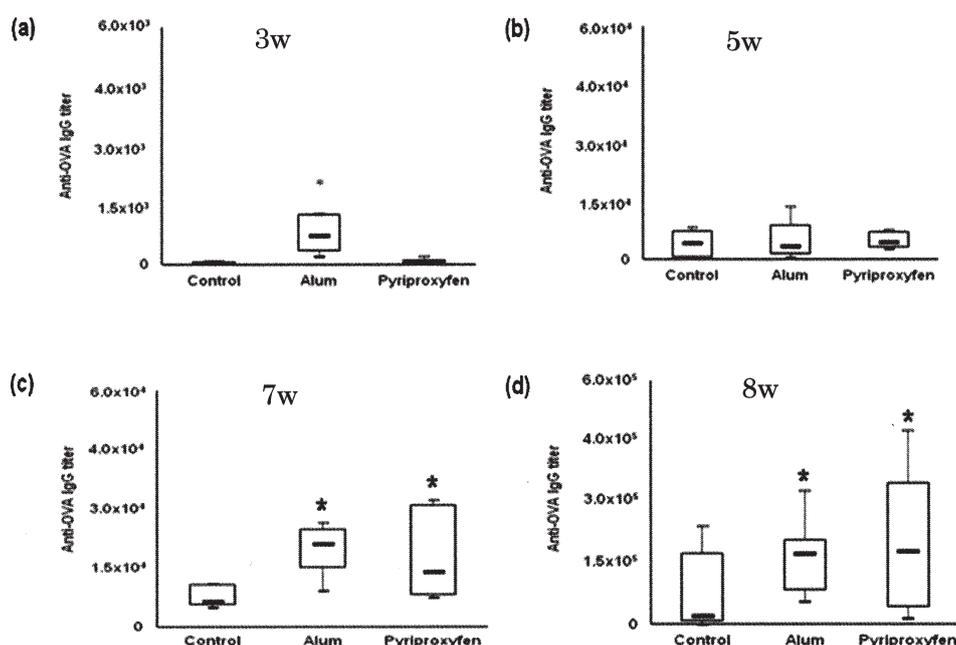


Fig. 2 Levels of OVA-specific total IgG immune responses.

週目という早い段階で、コントロールと比較してOVA特異的total IgGの抗体価が上昇し(1.5倍,  $P=0.02$ ) (Fig. 2 (a)), 最終的に7, 8週目には, 3倍に上昇した( $P=0.02$ ,  $P=0.02$ ) (Fig. 2 (c, d))。しかし, 7, 8週目で, ピリプロキシフェンまたはAlumを含むOVAを免疫した2群の間に, OVA特異的total IgGの抗体価の有意な差は見られなかった。ポジティブコントロールであるAlumを含むOVAを免疫した群がtotal IgGの免疫応答を増強したため, 本実験が正確に行われていることが示された。

### 3.2. ピリプロキシフェンの免疫応答に対する用量および時間依存的作用

ピリプロキシフェンの免疫応答能を明らかにするために, 3濃度のピリプロキシフェン (3mM, 9mM, 15mM) を含むOVAを免疫した。興味深いことに, Fig. 3で示すように, 低濃度のピリプロキシフェン (3mM) を免疫した群は, 8週目に, コントロールと比較してOVA特異的total IgGの免疫応答を増強しなかった。しかし, 9mMまたは15mMのピリプロキシフェンを投与した群はコントロールと比較して, OVA特異的total IgGの免疫応答を強く増強した (2倍 ( $P=0.01$ ), 5倍 ( $P=0.002$ ))。また, 9mMまたは15mMのピリプロキシフェンを投与した2群の間には, total IgGの誘導に有意な差が見られなかった。Fig. 4で示すように, ピリプロキシフェンの投与0時間または3時間後にOVAを免疫した群において, OVA特異的total IgGの抗体価は, コントロールと比較して有意に上昇した (3倍 ( $P=0.008$ ,  $P=0.006$ ))。Alumを含むOVAを免疫した群においても, OVA特異的total IgGの抗体価が上昇した ( $P=0.01$ )。予想した通り, Alumおよびピリプロキシフェン投与後0時間または3時間後にOVAを免疫した群の3群において, 抗体価の上昇に有意な差は見られなかった。一方で, ピリプロキシフェン投与後24時間後にOVAを免疫した群では, コントロールと同程度の抗体価にとどまった。

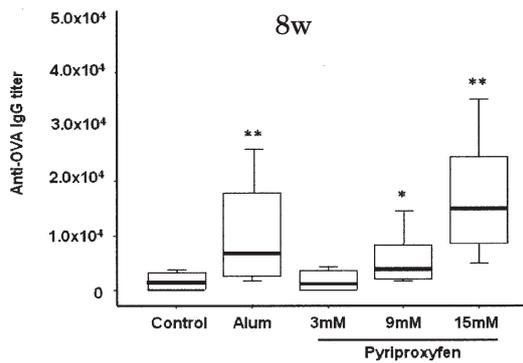


Fig. 3 Dose-dependent OVA-specific total IgG immune responses

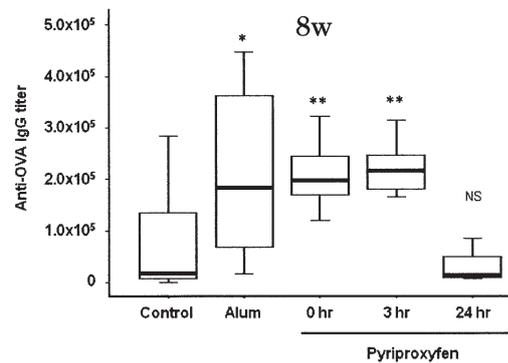


Fig. 4 Time-dependent OVA-specific total IgG immune responses

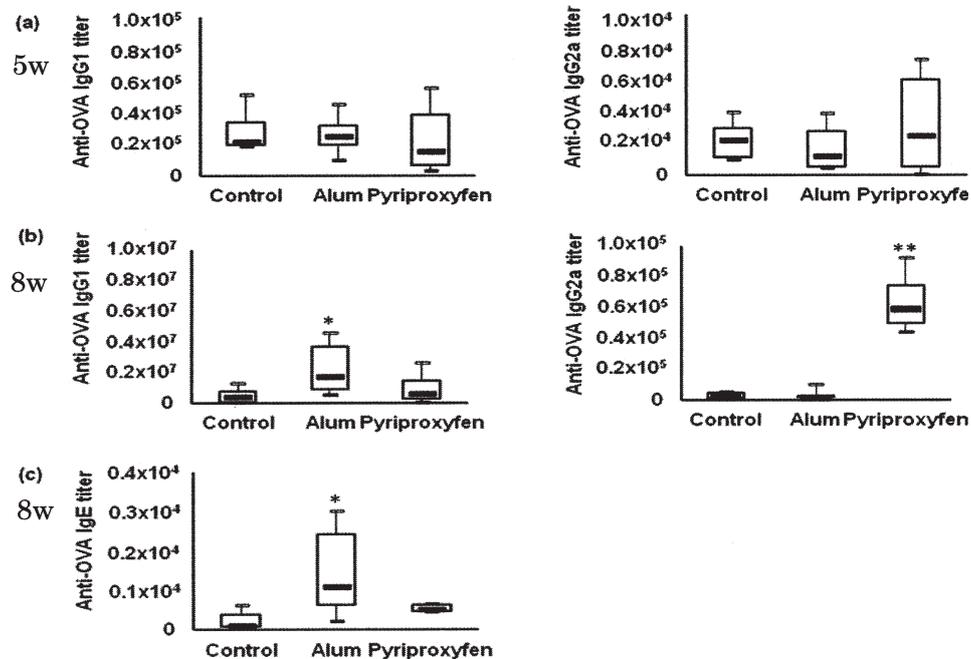


Fig. 5 OVA-specific IgG subtypes and IgE responses

### 3.3. ピリプロキシフェンのIgGアイソタイプとIgEの応答に対する影響

Fig. 5 (a) で示すように、ピリプロキシフェンまたはAlumを含むOVAを免疫した群の2群において、5週目に、OVA特異的IgG1、IgG2aの抗体価に有意な差は見られなかった。Fig. 5 (b) に示すように、ピリプロキシフェンを含むOVAを免疫した群において、8週目では、コントロールと比較してOVA特異的IgG2aの抗体価は有意に上昇した(8倍,  $P=0.002$ )。一方で、OVA特異的IgG1の抗体価はコントロールと同程度にとどまった。予想した通り、8週目では、Alumを含むOVAを免疫した群において、OVA特異的IgG1の抗体価は、コントロールと比較して有意に上昇した(4倍,  $P=0.01$ ) (Fig. 5 (b))。これらの結果は、IgGサブタイプであるIgG1、IgG2aがピリプロキシフェンあるいはAlumによる免疫を3回行うことで、有意に上昇することを示唆している。Fig. 5 (c) で示すように、ピリプロキシフェンを

含むOVAで免疫した群は、コントロールと比較して、OVA特異的IgEの抗体価を上昇しなかった。8週目において、Alumを含むOVAを免疫した群でのみ、コントロールと比較して、OVA特異的IgEの抗体価が増大した( $P=0.01$ )。

### 3.4. ピリプロキシフェンがサイトカインの変動に与える影響

Fig. 6で示すように、ピリプロキシフェンを含むOVAで免疫した群において、3, 8週目に、コントロールと比較してIL-4, IL-10, IL-13の産生に有意な差は見られなかった。しかし、TNF- $\alpha$ の産生は、3, 8週目の両方でコントロール ( $479.6 \pm 59.7$ ,  $363.0 \pm 72.8$  pg/ml) と比較して有意に上昇した ( $907 \pm 57.9$  ( $P=0.04$ ),  $363.0 \pm 72.8$  pg/mL ( $P=0.03$ ))。INF- $\gamma$ の産生は、3, 8週目の両方でコントロール ( $83.5 \pm 29.2$ ,  $68.9 \pm 32.9$  pg/mL) と比較して有意に上昇した ( $370.6 \pm 45.34$  ( $P=0.001$ ),  $273.0 \pm 66.2$  pg/mL ( $P=0.01$ ))。Alumを含むOVAで免疫した群におけるIL-4の産生は、8週目においてのみ、コントロール ( $113.3 \pm 5.6$  pg/mL) と比較して有意に上昇した ( $290.9 \pm 22.1$  pg/ml ( $P=0.001$ ))。IL-10の産生は、3, 8週目の両方でコントロール ( $395.1 \pm 92.8$ ,  $420.9 \pm 20.9$  pg/ml) と比較して、有意に上昇した ( $700.2 \pm 85.0$  ( $P=0.04$ ),  $555.1 \pm 32.1$  pg/ml ( $P=0.01$ ))。しかし、IL-13の産生は、3, 8週目の両方で、有意な上昇は見られなかった。

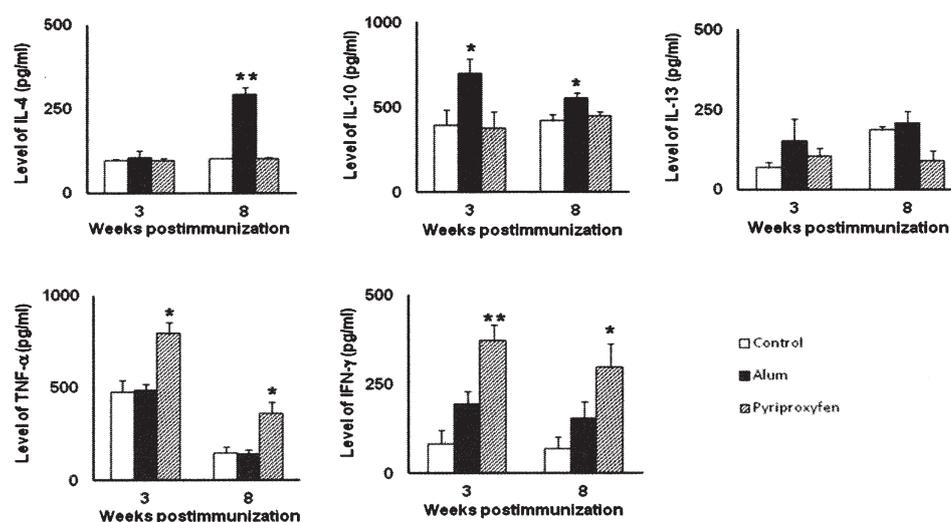


Fig. 6 Cytokine profiles

## 4. 考察

本研究で、私たちは、高用量のピリプロキシフェンの投与がtotal IgG免疫応答を顕著に増大させることを明らかにした (Fig. 3)。さらに、高用量のピリプロキシフェンがマウスに対して有害な作用を与えないことを示した。この結果は、ピリプロキシフェンが哺乳類に対して安全であることを示唆している。興味深いことに、ピリプロキシフェンと抗原の投与時間に差があると、total IgG免疫応答の増強作用が消失した (Fig. 4)。これまでに、 $[^{14}\text{C}]$ ピリプロキシフェンを経口投与したラットでは、ピリプロキシフェンが48時間以内に、大部分は糞便から、4%-11%は尿中から排泄されることが報告されている<sup>4)</sup>。この体内からのピリプロキシフェンのすみやかな排泄が、高濃度のピリプロキシフェン投与によるtotal IgG免疫応答の増大に時間制限を与えているかもしれない。また、体内に維持される時間が短いことで、哺

乳類の免疫応答におけるピリプロキシフェンの有害な作用が抑制される可能性もある。これらの2つの特徴は、*in vivo*において、ピリプロキシフェンがtotal IgG免疫応答を増大させるアジュバントとして安全であることを示している。

本研究では、OVAとピリプロキシフェンを免疫したマウスがOVAとalumを免疫したマウスと比較して、高いIgG2aの抗体価を示すこと、TNF- $\alpha$ とIFN- $\gamma$ が強く誘導されることを明らかにした(Fig. 5, 6)。よって、ピリプロキシフェンによる免疫増強の作用機構がalumとは異なることが推察できる。これまでに、*In vitro*で、IFN- $\gamma$ はリポ多糖(LPS)により刺激したマウス脾臓B細胞からのIgG2a分泌を増大させること、IgG1およびIgEの産生を抑制することが報告されている<sup>5,6)</sup>。一方で、IL-4は、LPSにより刺激したB細胞からのIgG1およびIgEの分泌を促進することが報告されている<sup>6,7)</sup>。さらに、Constant *et al.*<sup>8)</sup>は、CD4<sup>+</sup>T細胞のTh1サブセットから分泌されるTNF- $\alpha$ とIFN- $\gamma$ がTh1免疫応答を誘発し、IgG2aを産生するB細胞を誘導すること、CD4<sup>+</sup>T細胞のTh2サブセットから分泌されるIL-4がTh2免疫応答に関連することを報告している。さらに、IL-10はTNF- $\alpha$ とIFN- $\gamma$ の産生を抑制し、Th1免疫応答を阻害することが報告されている<sup>9)</sup>。これらの報告は、TNF- $\alpha$ とIFN- $\gamma$ の増加に伴うIgG2aの産生がTh1-CD4<sup>+</sup>T細胞応答の特徴であり、IL-4とIL-10によるIgG1の産生がTh2-CD4<sup>+</sup>T細胞応答の特徴であることを示唆している。しかし、私たちの実験では、CD4<sup>+</sup>T細胞ではなく、赤血球を除去した全脾臓細胞を使用したため、T細胞やB細胞、樹状細胞、マクロファージなどが実験系に含まれていた。よって、本研究は、ピリプロキシフェンによるTh1/Th2細胞応答のシフトを示す証拠を明確に提示できるものではない。Th1/Th2-CD4<sup>+</sup>T細胞応答を決定するためには、フローサイトメトリーやmagnetic cell sorting解析が必要である。

本研究結果は、ピリプロキシフェンによるIgG免疫応答を実証したものであるが、この脂溶性ホルモンの作用機構は、未解明のままである。ピリプロキシフェンはテルペンファミリーに属するため、MF59(30炭素原子を持ちスクワレンに含まれるアジュバント)などの他のテルペンファミリーの免疫増強物質と同様の作用機構を有している可能性がある。しかし、ピリプロキシフェンとは異なり、MF59は、Toll-like receptor (TLR) 非依存的、myeloid differentiation factor 88 (MyD88) 依存的なシグナル経路を介して、IL-4、IL-5サイトカインの産生、IgG1レベルを増大させるTh2タイプの免疫応答を誘発する<sup>12,13)</sup>。一方で、JHAであるピリプロキシフェンは、20炭素原子を持ち、JHs(C<sub>15</sub>)に属する<sup>1)</sup>。興味深いことに、グラム陰性細菌に含まれるLPSの活性成分lipid A中のヒドロキシアシル鎖は、12-16の炭素原子で構成されている<sup>14)</sup>。よって、この点においては、ピリプロキシフェンはスクワレン(MF59)よりlipid Aに類似している。これまでに、lipid AがTh1免疫応答を強く誘導すること、その作用はTLR4-MyD88シグナル経路によって制御されていることが報告されている<sup>15,16)</sup>。これらの知見を考慮すると、抗原の存在下において、ピリプロキシフェンはMF59よりlipid Aと類似した作用を示すことが容易に推察できる。

結論として、本研究結果は、ピリプロキシフェンがtotal IgG応答を増強する能力を有していることを示唆している。重要なことは、高用量のピリプロキシフェンがtotal IgG免疫応答を有意に増強させたが、その作用はピリプロキシフェンの投与24時間後には観察されなかったことである。この結果は、ピリプロキシフェンが安全な物質であることを示唆している。さらに、ピリプロキシフェンはalumと異なり、高レベルのIgG2aを誘導し、IFN- $\gamma$ とTNF- $\alpha$ の発現を増大させた。これらの結果は、ピリプロキシフェンによる免疫増強の作用機構がアジュバントとして確立しているalumとは異なる可能性を示している。

## References

1. Kotaki T., Shinada T., Kaihara K., Ohfune Y., Numata H. (2009) Structure determination of a new juvenile hormone from a heteropteran insect. *Org Lett* **11**: 5234–37.
2. Kamita S.G., Samra A.I., Liu J-Y., Cornel A.J., Hammock B.D. (2011) Juvenile hormone (JH) esterase of the mosquito *Culex quinquefasciatus* is not a target of the JH analog insecticide methoprene. *PLoS ONE* **6**: e28392.
3. Charles J-P., Iwema T., Epa V.C., Takaki K., Rynes J., Jindra M. (2011) Ligand-binding properties of a juvenile hormone receptor, Methoprene-tolerant. *PNAS* **108**: 21128–33.
4. The World Health Organization. (2004) Pyriproxyfen in Drinking-water: Background document for development of WHO *Guidelines for Drinking-water quality*.
5. Snapper C.M., Peschel C., Paul W.E. (1988) IFN- $\gamma$  stimulates IgG2a secretion by murine B cells stimulated with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* **140**: 2121–27.
6. Snapper C.M., Paul W.E. (1987) Interferon- $\gamma$  and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* **236**: 944–7.
7. Snapper C.M., Paul W.E. (1987) B cell stimulatory factor-1 (interleukin-4) prepares resting murine B cells to secrete IgG1 upon subsequent stimulation with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* **139**: 10–17.
8. Constant S. L., and Bottomly K. (1997) Induction of Th1 and Th2 CD4<sup>+</sup> T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol* **15**: 297–322.
9. Yang X., Gartner J., Zhu L., Wang S., and Brunham R.C. (1999) IL-10 gene knockout mice show enhanced Th1-like protective immunity and absent granuloma formation following *Chlamydia trachomatis* lung infection. *J Immunol* **162**: 1010–17.
10. Clegga C.H., Roquea R., Hoevenb N.V., Perronea L., Baldwinb S.L., Riningerc J.A., Bowend R.A., Reedb S.G. (2012) Adjuvant solution for pandemic influenza vaccine production. *PNAS* **109**: 17585–90.
11. Bernstein D.I., Cardin R.D., Bravo F.J., Strasser J.E., Farley N., Chalk C., Lay M., Fairman J. (2009) Potent Adjuvant Activity of Cationic Liposome-DNA Complexes for Genital Herpes Vaccines. *Clin Vaccine Immunol*. **16**: 699–705.
12. Singh M., Carlson J.R., Briones M., Ugozzoli M., Kazzaz J., Barackman J., Ott G., and O'Hagan D. (1998) A comparison of biodegradable microparticles and MF59 as systemic adjuvants for recombinant gD from HSV2. *Vaccine* **16**: 1822–27
13. Caroff M., Karibian D., Cavaillon J-M., Nicole Haeffner-Cavaillon N. (2002) Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. *Microbes and Infection* **4**: 915–26.
14. Seuberta A., Calabroa S., Santinia L., Gallia B., Genovesea A., Valentinia S., Apreaa S., Colapricoa A., D' Oroa U., Giuliania M.M., Pallaoroa M., Pizzaa M., O'Hagana D. T., Wacka A., Rappuolia R., De Gregorioa E. (2011) Adjuvant activity of the oil-in-water emulsion MF59 is independent of Nlrp3 inflammasome but requires the adaptor protein MyD88. *PNAS* **108**: 11169–74.
15. Marciani D.J. (2003) Vaccine adjuvants: role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. *DDT* **8**: 943–43.
16. Cekic C., Casella C.R., Sag D., Antignano F., Kolb J., Suttles J., Hughes M.R., Krystal G., Mitchell T.C. (2011) MyD88-Dependent SHIP1 regulates proinflammatory signaling pathways in dendritic cells after monophosphoryl Lipid A stimulation of TLR4. *J Immunol* doi: 10.4049/jimmunol.1001034.