

粘膜インフルエンザワクチンの実用化に関する研究

所 属 国立感染症研究所 感染病理部
研究者 佐多 徹太郎

分担研究者

- (1) 大阪大学微生物病研究所 田村 慎一
- (2) 社団法人北里研究所生物製剤研究所 駒瀬 勝啓
- (3) 財団法人阪大微生物病研究会観音寺研究所 東 雍
- (4) 国立感染症研究所 板村 繁之

要旨

(1) アジュバント併用経鼻不活化インフルエンザワクチンの有用性の根拠が気道の IgA 抗体の誘導による交叉防御能力の増強にあることを確証し、(2) 有効且つ安全な粘膜アジュバントの性状が如何なるものかを明らかにし、また、(3) ワクチンの防御成分として HA と NA を用いることの意義を示し、経鼻不活化インフルエンザワクチン(HANASpray)の実用化に向けてアジュバントや NA の量産に関する具体的な研究を行った。

1. 研究目的

(1) アジュバント併用経鼻インフルエンザワクチンの有用性の根拠を明らかにするために、以下の研究を行った。①このワクチンの有用性の根拠は、交叉反応性の高い分泌型 IgA 抗体を気道に誘導できる点であり、これによってワクチン株と流行ウイルス株が異なる場合にも、血中の単量体の IgG 抗体よりも高い交差感染防御能力を準備できる点である。このことを直接的に証明するために、種々の A 型および B 型インフルエンザワクチンをアジュバントと共に経鼻免疫した pIgR (IgA の外分泌輸送に関与する多量体抗体受容体) 欠損マウスにおいて、即ち分泌型 IgA 抗体不在条件で、ワクチン株とは異なる株の感染(流行)に対する交叉防御能がどのようになるかを検討した。②気道の抗体の感染防御上の役割を、ウイルスゲノムを高感度に検出できるリアルタイム定量 PCR 法(QPCR 法)を用いて、感染マウスの上気道におけるウイルスの動態を分析することにより、また、ウイルスと抗体の複合体の存在を明らかにすることにより検討した。

(2) 有効且つ安全な粘膜アジュバントの性状を明らかにし、それをワクチンに応用するために以下の研究をした。①安全且つ有効なコレラトキシンの変異毒素、CT112K (A サブユニットの N 末から 112 番目のグルタミン酸をリジンに置換したもの) が、ワクチンと共に経鼻投与されたとき、インフルエンザの防御に有効などのような免疫反応を誘導するかを検討した。②CT112K を大腸菌で大量に調整する方法を確立することを試みた。

(3) ウイルス成分の中で HA と NA はそれぞれ 30%と 5%前後を占める糖蛋白質であり、その量が多く安定であるが故に HA に関しては精製も容易で、防御上の役割についても多くの検討がなされている。しかしながら、NA に関しては、その性状が充分には検討されていない。そこで、ワクチン成分としての HA のみでなく NA の有用性を明らかにし、それをワクチンの予防効果増強に応用するために以下の研究をした。①A/Beijing/262/95(A/Beijing) (H1N1)ウイルスより HA と NA 分子を精製し、これらを H-2 congenic mouse に CTB*と共に経鼻免疫して、HA と NA 分子に対する抗体応答の MHC 拘束性を検討した。②NA 分子の精製・定量の手段として、A/New Caledonia/20/99(H1N1)、A/Panama/2007/99(H3N2)、B/Shangdong/7/97 ウイルスの NA 分子に対するモノクローナル抗体の作製を試みた。③現行のワクチンに NA を添加することによって、あるいは、HA と NA を主要成分としたワクチンを創製することによって、不活化ワクチンの予防効果を増強できる。しかし、ウイルス成分中の NA 含量は HA の 1/5-1/10 で、HA と同量の NA を入手するには 5 倍から 10 倍量のウイルスが必要になる。そこで、ウイルスに依らない NA 入手方法として、ほ乳動物培養細胞を用いた NA の大量生産系の開発を試みた。

2. 研究方法

(1) アジュバント併用経鼻ワクチン有用性の根拠: ① pIgR-KO マウス; マウス pIgR 遺伝子の exon 2 が欠損した KO マウスが、ヤクルト中央研究所の Shimada et al. によって開発された。まず、雄の pIgR 遺伝子の exon 2 欠損キメラマウスと BALB/c マウスの交配によってヘテロ接合体マウスが作られ、その F1 マウスが BALB/c マウスと戻し交配された。その F2 のヘテロ接合体マウスがさらに BALB/c マウスと戻し交配され、その 10 世代以上の繰り返しによって生み出された pIgR-KO BALB/c マウスが実験に使用された。ワクチン; 抗原性の異なる A 型の H1N1 亜型のインフルエンザウイルス、A/PR/8/34 (A/PR8)、A/Yamagata/120/86 (A/Yamagata)、A/Beijing/262/95 (A/Beijing)、及び抗原性の異なる二つの系統の B 型インフルエンザウイルス、B/Victoria 系統 [B/Ibaraki/2/85 (B/Ibaraki)、B/Aichi/5/88 (B/Aichi)、B/Nagasaki/1/87 (B/Nagasaki)] および B/Yamagata 系統 [B/Yamagata/16/88 (B/Yamagata)、B/Mie/1/93 (B/Mie)] 由来の HA ワクチン(split-product virus vaccine)は、Davenport 等の方法に従って北里研究所で作られたものを用いた。免疫; 野生型 (pIgR+/+) 及び pIgR-KO (pIgR-/、ホモ接合体) の BALB/c マウス (6-8 週齢、雌及び雄) が、1 群 5-6 匹ずつ使用された。一回免疫方式の実験においては、マウスは、麻酔条件下で、CTB* [コレラ毒素(CT)の無毒の成分である B サブユニット(CTB)に微量の毒素を添加したもの] と混合した HA ワクチンを、左右鼻孔から 1 μ l ずつ点鼻投与することによって免疫された。二回免疫方式の実験においては、マウスは、CTB* と混合した HA ワクチンを経鼻免疫 4 週間後、ワクチンのみを点鼻追加免疫された。感染; マウスに、麻酔条件下で、マウスに馴化した A/PR8 ウイルス (10^4 EID₅₀) あるいは B/Ibaraki ウイルス (10^4 EID₅₀) を、左右鼻孔から 1 μ l ずつ点鼻投与することにより上気道に限局した感染をした。この方法によっては主として上気道に感染が成立するのみで致死性ではなく、鼻洗浄液中のウイルス価が感染後 3-5 日に極大値に達し、1 1 日には検出限界以下になった。この上気道感染条件を、インフルエンザのモデルとして用いた。また、麻酔条件下で、A/PR8 ウイルス (10^4 EID₅₀) あるいは B/Ibaraki ウイルス (10^4 EID₅₀) を、片方の鼻孔から 20 μ l 点鼻投与すると、全気道に感染が起こり、感染 7 日目に殆どのマウスが肺炎死した。この全気道致死感染条件は、ウイルス性肺炎のモデルとして用いた。鼻洗浄液及び血清材料; 麻酔条件下のワクチン免疫マウスの心臓から全採血し、その血清を分離して IgA 及び IgG 抗体応答測定のための材料とした。また、全採血後のマウスから頭部を切り離し、その鼻腔を 0.1% BSA を含む 1ml の PBS で 3 回洗浄することによって得られた鼻洗浄液を、IgA 及び IgG 抗体応答測定及びウイルス価測定のための材料とした。抗体応答; 鼻洗浄液及び血清の IgA 及び IgG 抗体価を ELISA 法により測定した。ウイルス価; ワクチン免疫マウスにチャレンジ感染して 3 日目の鼻洗浄液のウイルス価を、MDCK 細胞を用いたブラック法により測定し、免疫マウスの上気道における感染防御の指標とした。② リアルタイム定量 PCR 法 (QPCR 法); BALB/c マウスにインフルエンザ A/PR/8/34 ウイルスを初感染、又は初感染後 4 週間経てから再感染させ、鼻腔洗浄液を経時的に回収した。このサンプル中の感染性のあるウイルス量に関しては、MDCK 細胞を用いたブラック法を用いて測定した。また鼻腔洗浄液中の全ウイルス RNA コピー数を、Mタンパクをコードする遺伝子に特異的なプライマーとプローブを用いてウイルスと抗体との複合体で定量した。更にウイルス-抗体複合体は、予め抗マウスイムノグロブリンをコートした ELISA プレートに鼻腔洗浄液を添加し、キャプチャーされた複合体のウイルス RNA コピー数を QPCR 法で定量した。

(2) 有効且つ安全な粘膜アジュバントの性状: ① 免疫; BALB/c マウスに PR8 ワクチン (最小有効濃度 0.1 μ g) をアジュバント (0.1 μ g) と共に初回投与し、4 週後に同じ PR8 ワクチン (0.1 μ g) のみを追加免疫した。鼻咽頭関連リンパ組織 (NALT) および脾臓の抗体産生細胞 (AFC) 数; それぞれの臓器の AFC 数を ELISPOT 法により測定した。遅延型過敏症 (DTH); 惹起抗原を注射後 24 時間の足跡の腫張により測定した。細胞溶解性 T 細胞 (CTL) 活性; 免疫マウスの脾臓のリンパ球を感染細胞存在下で培養し、5 日後のリンパ球による ⁵¹Cr 放出により測定した。② mCT の量産; CT112Kno 高発現プラスミド (pTrecLT02) で形質転換した大腸菌 (DH10B) を、Terrific Broth (TB) でサブカルチャー後、1.5 l の TB に植菌し、培養装置 (BMS-03PI) を用いて 24 時間培養した。mCT の性状; mCT のガングリオシド GM1 に対する結合能を ELISA により測定した。mCT の CT 活性は、培養 Y-1 細胞の形状の変化を指標に測定した。また、その分子の大きさを SDS-PAGE により、その分子の特異性を Western Blotting により同定した。mCT のアジュバント活性; mCT を A/Beijing の HA ワクチンと共に経鼻免疫後 7 日目の遅延型過敏症反応により測定した。

(3) ワクチン成分としての HA 及び NA の有用性：① H-2congenic mice; B10(H-2^b), B10.A(H-2^a) 及び B10.D2(H-2^d) の6週齢、雌マウスを SLC より購入し実験に用いた。A/Beijing ウイルスの HA と NA 分子；発育鶏卵で増殖したウイルスの濃縮液を Triton X-100 で溶解・遠心後の上清を、HA 及び NA に対するのモノクローナル抗体を結合したアフィニティー・カラムに結合させることによって調整した。免疫；マウスの鼻腔内に、0.1、0.3、及び 1.0 µg の HA あるいは NA 分子をアジュバント(1µg; 0.2% のコレラトキシンを含むその B サブユニット)と共に初回投与し、4 週間後に同じアジュバント併用 HA あるいは NA 分子 (0.3 µg) を追加免疫する二回投与方式を用いた。②NA の精製；ウイルスの濃縮液にプロナーゼを添加し、ゲル濾過により NA の精製を試みた。NA-DNA ワクチンの作製；ニワトリのアクチンプロモーターを含むプラスミド(pCAGGS-P7)に、ウイルス NA 遺伝子の cDNA を組み込んで NA-DNA ワクチンを作製した。ウイルスの NA 分子に対するモノクローナル抗体作製；精製 NA をアジュバント (GERBU)と共に、あるいは、NA-DNA ワクチンをエレクトロポレーション法により、マウスの筋肉に免疫した。それぞれの免疫マウスから脾臓を採取し、ハイブリドーマの作製に用い、NA 分子に対するモノクローナル抗体産生クローンを得た。③NA 遺伝子；精製ウイルスの濃縮液より RNA を抽出し、適当なプライマーを用いた RT-PCR 法で NA の cDNA を合成し、pGEM-T-Easy vector にクローニングした。NA 発現ベクター；NA 遺伝子を制限酵素で切り出して CHO-K1 細胞による組換え発現用ベクター pCXM-MCS に導入した。形質転換 CHO-K1 細胞から NA 遺伝子高発現クローンの選抜；NA 発現ベクターをトランスフェクションした CHO-K1 細胞のうち、NA 遺伝子を高発現しているものを FACS を用いて選別しクローン培養した。NA 産生クローンからの NA の精製；NA 活性の高いクローンの培養細胞を Triton で溶解し、その溶解液中の NA をモノクローナル抗体を用いたアフィニティー・カラムによって精製した。

3. 研究成果

(1) アジュバント併用経鼻ワクチン有用性の根拠：①A 型の H1N1 亜型内のいくつかのウイルス株および B/Victoria 系統および B/Yamagata 系統のいくつかのウイルス株由来の HA ワクチンをアジュバントと共に経鼻免疫した pIgR 欠損マウスにおいて、ワクチン株とは異なるウイルス株による感染（流行）に対する交叉防御能がどのようになるかを検討した結果、上気道への IgA 抗体分泌抑制に伴って変異ウイルスの感染に対する交叉防御能が低下することが明示された。即ち、変異ウイルスの感染に対する交叉防御能が上気道の分泌型 IgA 抗体に依存していることが直接的に示された。②ウイルスを初感染すると、感染量の指標の一つであるプラークは、感染1日目から増加し始め、3～4日目にピークに達し、その後減少する。このプラークの推移と平行して、プラーク法に比べ非常に感度高くウイルスの RNA コピー数の同様の変動が認められた。一方、予め初感染をして4週間たったマウスに再感染すると、感染のみの対照群と感染後 12 時間目までは差が無いが、24 時間目頃から再感染群ではウイルスの RNA コピー数が減少しはじめ、やがて検出されなくなった。この再感染時のウイルスコピー数の減少と平行して、感染直後からウイルス-抗体複合体が鼻洗浄液中に検出された。

(2) 有効且つ安全な粘膜アジュバントの性状：①最小有効濃度のワクチンの初回免疫のみでは不完全であったが、2回の免疫によっては、致死量のウイルス感染に対して追加免疫後2週間目の直後から鼻および肺のウイルス価が検出限界以下になり、完全な防御が認められた。このような完全な防御の成立条件では、初回免疫7日目に低レベルの IgM、IgG、IgA-AFC が検出され、2回免疫後5日目に高いレベルの IgM、IgG と中等度の IgA-AFC が検出された。また、AFC の出現と相関して、初回免疫4週目に低レベルの鼻洗浄液の IgA と血清中の IgG 抗体応答が、2回免疫2週後に高レベルの鼻洗浄液の IgA と血清中の IgG 抗体応答が検出された。これら抗体応答のレベルは防御能力とよく相関していた。一方、DTH や CTL 応答は感染防御能力と相関していなかった。また、感染株と異なるワクチン株を免疫に用いた場合、鼻洗浄液の交差反応性の高い IgA 抗体の出現と相関して交差感染防御が認められた。②大腸菌の中規模培養で得られた精製 CT112K は 5-10mg/l であった。この精製 mCT は、Y-1 細胞を用いた ADP-ribosyltransferase 活性が本来の CT の約 1/1000 から 1/5000 以下に低下しており、毒性が明らかに減弱していた。一方、GM1 結合能、SDS-PAGE のパターンやその特異性は CT と同様であった。また、DTH によるアジュバント活性は CT に比較して多少低かった。

(3) ワクチン成分としての HA 及び NA の有用性：①A/Beijing(H1N1)ウイルスの HA 分子の経鼻免疫によって、B10.A(H-2^a)及び B10.D2(H-2^d)マウスは低 HA 投与量でも高いレベルの血清の抗 HA IgG 抗

体応答を誘導し感染防御したが、B10 (H-2^b) マウスは高 HA 投与量で初めて抗 HA IgG 抗体応答を誘導し感染防御した。一方、NA 分子の経鼻免疫によって、B10. A (H-2^a)、B10. D2 (H-2^d) 及び B10 (H-2^b) マウスのどれもが、低 NA 投与量でも感染防御に必要なレベルの血清及び鼻洗浄液の抗 NA 抗体応答を誘導した。これらの結果は、A/Beijing ウイルスの HA 分子及び NA 分子に対する応答性が H-2 遺伝子によって拘束されていることを示している。② A/New Caledonia/20/99 (H1N1)、A/Panama/2007/99 (H3N2)、B/Shangdong/7/97 ウイルスの NA 分子に対するモノクローナル抗体を得た。これらを利用したアフィニティー・カラムによって、それぞれのウイルスの NA 分子を精製することが可能になった。③ 4 種のウイルス [A/New Caledonia/20/99 (H1N1)、A/Panama/2007/99 (H3N2)、B/Shangdong /7/97、A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)] 由来の NA の発現ベクターを用いて得られた NA 遺伝子を高発現している CHO-K1 形質転換細胞クローンのうち、A/New Caledonia ウイルス由来の N1 型 NA 以外は、ウイルス由来の NA と同等の分子サイズの蛋白が精製された。回収された蛋白量は、細胞溶解液 (8~10mg) から 25~70 μ g (総蛋白量の 0.3~0.7%) であった。その後、この形質転換細胞をフローサイトメトリー法と磁気ビーズ法で二重に選抜することにより、NA の発現量を選抜前の 4~8 倍程度にまで増大させることに成功している。

4. 考察・まとめ

(1) アジュバント併用経鼻ワクチン有用性の根拠：① これまで Mbawuike 等が、CTB*併用経鼻インフルエンザワクチンを免疫した IgA-KO マウスが、致死量のウイルス (ワクチンと同じ株) のチャレンジ感染に対して完全に防御することを示し、それと平行して粘膜と血清中に HA 分子と反応する IgG と IgM 抗体が出現していることを報告している。このことから彼らは、粘膜の IgA 抗体はインフルエンザウイルス感染の防御には必要ないと主張している。しかしながら、気道粘膜の IgA 抗体が IgG 抗体よりも優れている点は、インフルエンザウイルスの侵入門戸である上気道に大量に分布し、変異ウイルスの感染に対する交叉防御の能力を準備することであり、彼らの IgA-KO マウスを用いた実験系ではこの交叉防御の能力が検討されていない。そこで我々は、変異ウイルスの感染に対する交叉防御能が上気道の分泌型 IgA 抗体の存在に依存していることをより直接的に立証するために、pIgR-KO マウスを用いて実験した。その結果、pIgR-KO マウスの上気道における IgA 抗体分泌能力の低下と良く相関して、交叉防御能力の低下が認められた。従って、経鼻ワクチンによって上気道の粘膜上に積極的に分泌される IgA 抗体が、A 型ウイルスの同じ亜型内の異なるウイルス株や、B 型の異なる系統のウイルス株の上気道感染に対しても交叉防御を準備することを示している。② 事前にウイルス感染によって免疫が成立していたマウスでは、ウイルスの再感染時には粘膜上に分泌されている抗体が速やかにウイルスと結合してその感染あるいは増殖を阻止することが示された。

(2) 有効且つ安全な粘膜アジュバントの性状：① CT112K 併用ワクチンの 2 回免疫によって、インフルエンザウイルスに対する液性の抗体応答や、DTH や CTL 等の細胞性免疫応答が誘導されるが、これらの中で、抗体応答が防御機構として最も重要な役割をはたしている。さらに、上気道での感染防御には IgA 抗体応答が、下気道では IgG 抗体応答が主要な役割を果たしていることが確かめられ、これらの結果は、CT112K の粘膜アジュバントとしての有効性を保証している。② 大腸菌で mCT (CT112K) の大量生産を可能にするために、CT 遺伝子のシグナル配列を大腸菌の LT のシグナル配列と置換した。それによって構造的に安定且つ毒性が低く、アジュバント活性を保持した CT112k が、5-10mg/l の収量で得られるようになった。今後実用化にむけて、さらに大量生産のシステムが開発されねばならない。

(3) ワクチン成分としての HA 及び NA の有用性：① 上記の結果は、既に、PR8 (H1N1) ウイルスの HA-DNA 及び NA-DNA を遺伝子銃を用いて免疫して得られた結果と相関している。即ち、PR8 の HA-DNA を免疫した BALB/c (H-2^d) と C3H (H-2^k) マウスは PR8 の感染に対して防御でき、C57BL/6 (H-2^b) は防御できなかった。一方、PR8 の NA-DNA を免疫した BALB/c (H-2^d)、C3H (H-2^k)、C57BL/6 (H-2^b) のどのマウスも PR8 の感染に対して防御を示した。これらの結果は、A 型の H1N1 亜型のウイルスの HA 分子に対して免疫応答の低いマウスでも NA 分子に対しては防御に必要な免疫応答を誘導できることを示唆している。このことは、現行の HA ワクチンに低応答性のヒトでも、NA を添加した新ワクチンを投与することによって、現行のワクチンの予防効果を改善出来ることを示唆している。② A/New Caledonia/20/99 (H1N1)、A/Panama/2007/99 (H3N2)、B/Shangdong/7/97 ウイルスの精製 NA 分子を現行のワクチンに添加することによって、あるいは、これらウイルスの HA と NA を主要成分としたワクチンを

創製することによって、新しい予防効果の高いワクチンを手入手可能になった。従って、ヒトにおいて、これらワクチンを経鼻投与することにより感染予防効果を増強できることを実証できる準備が整ったと言える。③ HA と NA を主成分とした経鼻ワクチンの実用化に向けて、NA の大量入手の方法として、CHO 細胞を用いた組換え生産系の開発に着手した。これにより、N2 型 NA では従来報告されているものよりも効率良く NA を量産できるばかりでなく、従来報告されていなかった N1 型や B 型の NA の量産も可能にみえる。

5. 研究発表

- 1) Hasegawa H, Kadowaki S, Aizawa H, Takahashi H, Iwasaki T, Tamura S-I, Kurata T, and Sata T. Persistent influenza virus infection of irradiated mice and its prevention by intranasal vaccination. *Vaccine* **20**:1050-1057, 2002
- 2) Asahi Y, Yoshikawa T, Watanabe I, Iwasaki T, Hasegawa H, Sato Y, Shimada S, Nanno M, Matsuoka Y, Ohwaki M, Iwakura Y, Suzuki Y, Aizawa C, Sata T, Kurata T, and Tamura S-I. Protection against influenza virus infection in polymeric Ig receptor-knockout mice immunized intranasally with adjuvant-combined vaccines. *J. Immunol.* **168**:2930-2938, 2002
- 3) Yamamoto H, Tamura S-I, Watanabe I, Iwasaki T, and Yodoi J. Enhanced resistancy of thio redoxin-transgenic mice against influenza virus-induced pneumonia. *Immunol. Lett.* **82**:165-170, 2002.
- 4) Tamura S-I, and Kurata T. Mucosal immune responses to influenza viruses. Research Signpost, Recent advances in influenza virus research, 2002, 143-160.
- 5) Watanabe I, Hagiwara Y, Kadowaki S-E, Yoshikawa T, Komase K, Aizawa C, Kiyono H, Takeda Y, McGhee J R, Chiba J, Sata T, Kurata T, and Tamura S-I. Characterization of protective immune responses induced by nasal influenza vaccine containing mutant cholera toxin as a safe adjuvant (CT112K). *Vaccine* **20**:3443-3455, 2002.
- 6) Kweon Mi-Na, Yamamoto M, Watanabe F, Tamura S-I, Ginkel F W van, Miyauchi A, Takagi H, Takeda Y, Hamabata T, Fujihashi K, McGhee J R, and Kiyono H. A nontoxic chimeric enterotoxin adjuvant induced protective immunity in both mucosal and systemic compartments with reduced IgE antibodies. *J. Infect. Dis.* **186**:1261-1269, 2002
- 7) Hagiwara Y, Tsuji T, Iwasaki T, Kadowaki S, Asanuma H, Chen Z, Komase K, Suzuki Y, Aizawa C, Kurata T, and Tamura S-I. Effectiveness and safety of mutant Escherichia coli heat-labile enterotoxin (LT H44A) as an adjuvant for nasal influenza vaccine. *Vaccine* **19**:2071-2079, 2001.
- 8) Hagiwara Y, Iwasaki T, Asanuma H, Sato Y, Sata T, Aizawa C, Kurata T, Tamura S-I.: Effects of intranasal administration of cholera toxin (or Escherichia coli heat-labile enterotoxin) subunits supplemented with a trace amount of the holotoxin on the brain. *Vaccine* **19**:1652-1660, 2001.
- 9) Chen Z, Kadowaki S, Hagiwara Y, Yoshikawa T, Sata T, Kurata T, Tamura S-I.: Protection against influenza B-type virus infection by immunization with DNA vaccines. *Vaccine* **19**:1446-1455, 2001.

6. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許取得；なし。
- 2) 実用新案登録；なし。
- 3) その他；なし。