

平成15年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

目 次

課題番号

20030933A KH51041	臍帯血を用いた移植・再生医療に関する研究	梨井 康 …… 1
934A KH51042	組換えDNA食品遺伝子産物の慢性経口毒性評価モデルの確立	廣瀬 雅雄 …… 5
935A KH51043	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦 善治 …… 10
936A KH51044	細胞内脂質輸送系に着目した血清脂質改善薬の開発のための基礎的研究	最上 知子 …… 16
KH51045	粘膜インフルエンザワクチンの実用化に関する研究	佐多 徹太郎 …… 21
937A KH51046	日本人糖尿病感受性遺伝子に基づく脂肪細胞を分子標的とした糖尿病・肥満の予防及び治療薬の開発	門脇 孝 …… 24
938A KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチン開発のための基礎研究	竹森 利忠 …… 27
939A KH51048	ノーウォークウイルスの超高感度核酸定量システム、及びベッドサイド抗原検出システムの開発	武田 直和 …… 31
940A KH51049	ワクチン創製の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島 朝人 …… 38
941A KH51050	食品および環境中の食中毒原因菌の病原因子に対する免疫学的高感度検出法に関する研究	五十君 静信 …… 43
942A KH51051	安全なアジュバントを用いた粘膜ワクチンの開発に関する研究	後藤 紀久 …… 48
943A KH51052	リポソーム表面結合型抗原のアレルギー予防・治療への応用に関する研究	内田 哲也 …… 55
944A KH51053	肺炎球菌感染症の標準的抗体価測定方法の確立に関する研究	岡部 信彦 …… 61
945A KH51054	PPAR α をターゲットとした生活習慣病予防薬の開発	片山 茂裕 …… 64
946A KH51055	感染症領域における先端的遺伝子診断技術の開発に関する研究	薄井 貢 …… 68
947A KH51056	乳幼児下痢症の原因ウイルス検出法に関する研究	西尾 治 …… 71
948A KH51057	可溶性ウイルス受容体等によるウイルス吸着阻止を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口 文広 …… 77
949A KH51058	EPA・DHA含有エステル交換構造脂質の体脂肪蓄積抑制効果に関する研究	斎藤 衛郎 …… 86
950A KH51059	エネルギー消費調節機構に立脚した生活習慣病予防薬に関する基礎研究	大坂 寿雅 …… 89
951A KH51060	遺伝子解析によるヒトエンテロウイルス同定の標準化	清水 博之 …… 93
952A		

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

研究要旨 (1) アジュバント併用経鼻不活化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認し、(2) 有効且つ安全な粘膜アジュバントの量産系を開発し、また、(3) 防御成分である HA と NA を精製して、ヒトでの経鼻投与試験を行った。

分担研究者

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

A. 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 抗体よりも高い交叉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 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 の外分泌輸送に参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感染に対する完全な感染阻止が成立する最小有効ワクチン量免疫条件で、気道の様々な部位(鼻腔、気管、気管支及び気管細支の粘膜及び肺胞)における特異 IgA および IgG 抗体の分布と濃度を検討した。

(2) 有効且つ安全な粘膜アジュバント CT112K を大腸菌で大量生産する方法を確立することを試みた。

(3) 二人の被験者において、三種類のウイルス由来の精製 HA と NA から成る三価ワクチンを創製し、これを CTB*と共に経鼻投与し、ヒトでの HA と NA に対する抗体応答を検討した。

B. 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 マウスは、ヤクルト中央研究所の Shimada et al.によって開発されたものを用いた。ワクチン; マウスに馴化したインフルエンザウイル

ス、A/PR/8/34 (A/PR8)、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。また、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、PR8 (10^4 EID₅₀)、B/Ibaraki (10^4 EID₅₀) あるいは B/Yamagata 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局限した感染をした。この方法によって、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。また、麻酔条件下で、A/PR8 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。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 鼻腔、咽頭、気管、気管支及び気管細支の粘膜、及び肺胞上皮の表面積および粘液及び漿液の体積の測定;未処理 BALB/c マウスの鼻腔を含む上頭部及び分離した気管肺組織をホルマリン固定し(上頭部については脱灰し)、パラフィンに胞埋後、連続切片(4 μm)を作製した。スライド・ガラス上の連続切片の組織像をヘマトキシリンとエオシンで染色し、100 μm間隔で写真撮影(適当な倍率で)した。次に、写真上で、鼻腔、咽頭、気管、気管支及び気管細支の粘膜あるいは肺胞上皮の周囲長を各切片毎に計測し、2連続切片間の厚さを掛けてその2連続切片間の表面積を推定した。それぞれの気道の部位の全表面積は、気道のそれぞれの部位全長に渡って連続切片間の表面積を積算することによって算定した。鼻腔、咽頭、気管、気管支及び気管細支の粘膜上皮細胞上の粘液の体積は、その液層の厚さを0.01mmと仮定(電子顕微鏡像などの資料から)することによって推定された。また、肺胞上皮細胞上の漿液の体積は、その液層の厚さを0.0001mmと仮定(電子顕微鏡像などの資料から)することによって推定された。

(2) 有効且つ安全な粘膜アジュバントの量産:① mCTの量産:CT112Kの高発現プラスミド(pTrcLT02)で形質転換した大腸菌(DH10B)を、Terrific Broth(TB)でサブカルチャー後、1.7 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) ワクチン中のHAとNA成分の有用性:A/New Caledonia/20/99(H1N1)、A/Panama/2007/99(H3N2)、B/Shangdong/7/97ウイルスのHA及びNAをそれぞれに対するモノクローナル抗体を結合したアフィニティー・カラムによって精製した。

(倫理面への配慮)マウスの飼育条件の快適さ、また、取り扱い時の苦痛の軽減等倫理面への配慮をした。

C. 研究結果

(1) アジュバント併用経鼻ワクチン有用性の根拠:① 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 最小有効量のアジュバント併用不活化ワクチンを経鼻免疫したマウスにおいて完全な感染阻止が成立している条件下での気道の各部位(鼻腔、気管、気管支及び気管細支の粘膜上の粘液及び肺胞上皮上の漿液)の抗A/PR8-HA IgAおよびIgG抗体の分布(%)と濃度(μg/ml)を検討した。その結果、IgA抗体の74%が上気道に分布し、IgG抗体の91%が肺胞領域に分布していた。また、気道の各部位(鼻腔、気管、気管支及び気管細支の粘膜上の粘液及び肺胞上皮上の漿液)の抗A/PR8-HA IgAおよびIgG抗体濃度(μg/ml)を結果、鼻腔、気管、気管支及び気管細支の粘膜の粘液中のIgA抗体濃度が高く、一方、肺胞上の漿液中のIgA濃度は血清と同様に低く、IgAが粘膜領域で積極的な機構によって分泌されていることを示唆している。逆に、IgG抗体濃度は肺胞上の漿液中では血清と同等に高く、粘膜領域では濃度勾配によって浸みだしているために低いことを示唆していた。

(2) 有効且つ安全な粘膜アジュバントの量産: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、SDSPAGE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) ワクチン中のHA及びNAの有用性:A/New Caledonia(H1N1)、A/Panama(H3N2)、B/Shangdongウイルスの精製HA及びNA分子を各30 μg混合した三価ワクチンを、CTB*と共に二人の被験者に経鼻投与した。4週間隔での2回投与後、被験者の血清中のそれぞれのHAとNA分子に対するIgG抗体応答(ELISAによる抗体価)が、二人の被験者において4倍以上に高められた。

D. 考察

(1) アジュバント併用経鼻ワクチン有用性の根拠:①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る。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、A 型ウイルスの同じ亜型内の異なるウイルス株ばかりでなく、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、交叉防御を準備することを示している。②感染防御が成立している CTB* 併用経鼻ワクチン投与マウスにおいて、気道の各部位の抗 HA-IgA 及び IgG 抗体の分布と濃度を推定した。結果は次のように要約される。IgA 抗体の 74% は上気道に 23% は下気道に分布している。粘液の IgA 濃度は粘液の IgG 濃度よりも高く、粘膜上では感染防御上 IgG よりも IgA の役割が大きい。粘液の IgA 濃度は血清の IgA よりも高く、能動的に分泌されていることを示唆している。粘液中の IgG 抗体濃度は血清よりも低く、血清の IgG が粘液と血清間の濃度勾配に沿って粘膜上の粘液中にしみ出ていることを示唆している。IgG 抗体の 91% が肺胞の漿液中に分布し、ウイルス性肺炎の阻止には IgG 抗体が役割を果たしている。

(2) 有効且つ安全な粘膜アジュバントの量産：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/1 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) ワクチン中の HA と NA の有用性：既に、我々のものを含むいくつかのグループの報告によって、経鼻ワクチンの防御成分としての HA 以外の NA の重要性は明らかである。そこでヒトでの NA 投与の効果を検討した。即ち、CTB* 併用経鼻精製三価 HANA ワクチンを二人の被接種者投与し、その後の血清抗体応答を検討した。その結果、HA と NA に対する血清中の IgG 抗体応答の増強が認められた。この試験で用いられた投与量は各 30 μ g で、HA に関しては 2 倍、NA に関しては 4 ~ 5 倍量であった。従って、経鼻ワクチンの投与抗原量は現行の皮下注射量の 2 倍以上の量が良いと考えられる。

E. 結論

(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、上気道での IgA 抗体の誘導によるウイルスの侵入門戸での感染阻止と変異ウイルスに対する交叉防御能力の増強にあることを確

証した。また、下気道での IgG 抗体誘導によるウイルス性肺炎阻止も有用性の根拠になる。(2) 有効且つ安全な粘膜アジュバント CT112K の量産系を開発した。(3) ヒトでのアジュバント併用経鼻 HANA ワクチンの投与試験によって、HA のみでなく NA に対する IgG 抗体応答の増強を確認できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

* Ito R, Ozaki Y, Yoshikawa T, Hasegawa H, Sato Y, Suzuki Y, Inoue R, Morishima t, Kondo N, Sata T, Kurata T and Tamura S-I. Roles of anti-hemagglutinin IgA and IgG antibodies in different sites of the respiratory tract of vaccinated mice in preventing lethal influenza pneumonia. Vaccine 21; 2362-2371, 2003

2. 学会発表

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得；なし。
2. 実用新案登録；なし。
3. その他；なし。

平成15年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

平成16年9月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社