

## 新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究

所 属 国立感染症研究所感染病理部  
研究者 長谷川 秀樹

研究要旨 感染防御能力の高い粘膜ワクチンの効果をあげる為にはアジュバントの併用が必要である。我々は経鼻インフルエンザワクチンのヒトへの応用を目指し、安全で効果のある新しいアジュバントの開発に関する基礎的実験を行った。新しいアジュバントの候補としてマクロファージの協力な刺激物質として知られるキチン微粒子(CMP)、Toll like receptor 9 のリガンドとして知られ共存する抗原に対する特異免疫応答を高める CpG-ODN, コレラトキシンの小胞体残留シグナル KDEL 配列(リジン-アスパラギン酸-グルタミン酸-ロイシン)と毒素活性を消失させる変異 (CT E112K: A サブユニットの 112 番目をグルタミン酸からリジンに置換) を導入した 2 種のダブル mCT (dmCT E112K/KDEV, dmCT E112K/KDGL) を候補として粘膜接種時の免疫応答と感染防御について調べそれぞれに粘膜での交叉防御能の高い分泌型 IgA の誘導と血清中の IgG の誘導がみられ、インフルエンザウイルスの感染防御に有効であった。またホルマリン不活化全ウイルス粒子ワクチンの経鼻接種により高いレベルの IgA 及び IgG 抗体応答が誘導されることもわかった。それぞれの新規アジュバント及びワクチン作成方法によりヒトへの応用に向けた研究への発展が期待される。

### 分担研究者

- (1) 社団法人北里研究所・生物製剤研究所・駒瀬勝啓
- (2) 財団法人阪大微生物病研究会・東 雍
- (3) 大阪大学微生物病研究所・田村慎一

### A. 研究目的

我々はこれまで経鼻不活化インフルエンザワクチンの実用化を目指して、コレラ菌の毒素派生物(コレラ・トキシンの無毒の成分 B サブユニットに微量の.0.1%のトキシンを混ぜたもの;CTB\*)をアジュバントとした経鼻不活化インフルエンザワクチンの開発に取り組んできた。この経鼻ワクチンを投与すると、インフルエンザの主要な防御抗原であるウイルス表面の糖タンパク質、ヘマグルチニン(HA) に対する血清の IgG 抗体のみならず、気道に分泌される IgA 抗体の誘導が増強されることが明らかになっている。これによってインフルエンザの発症が阻止されるばかりでなく、ウイルス性肺炎の発症も阻止される。さらに、多量体である気道の IgA 抗体は、単量体の IgG

抗体よりも交叉反応性が高く、変異の激しいウイルスの流行の防御に有効であることが示されている。これら粘膜免疫を誘導するためにはワクチンを粘膜に投与することが必要であるが、高い免疫応答を誘導するにはワクチンと共に投与するアジュバントの併用が不可欠である。これまで、有効なアジュバントとして実験ではコレラトキシン B サブユニットや大腸菌易熱性毒素やその変異体が用いられてきた。またヒトでは大腸菌易熱性毒素併用の経鼻不活化インフルエンザワクチンがスイスで実用化されたが副作用として顔面神経麻痺の発生が問題となりその使用については安全性に疑念がでていた。そこで新たな安全性の高い粘膜アジュバントの開発やその他の投与方法が求められている。本研究班においては新規アジュバントとしてマクロファージを活性化する事が知られている天然物由来のキチン微粒子、TLR9 を介して作用する CpG-ODN、コレラ・トキシン (CT) の細胞内輸送に関連すると考えられている A サブユニットの COOH-末端に存在する小胞体残留シグナル KDEL 配列(リジン-アスパラギン酸-グルタミン酸-ロイシ

ン)と毒素活性を消失させる変異(CTE112K: Aサブユニットの112番目をグルタミン酸からリジンに置換)を導入した2種のダブル mCT (dmCT E112K/KDEV, dmCT E112K/KDGL)に注目し、それぞれの経鼻アジュバントとしての効果と安全性を調べた。またアジュバントを用いない投与方法として不活化ウイルス粒子ワクチンの経鼻投与での免疫応答について調べた。それぞれの免疫増強効果が示されればその意義は大きい。そこで本研究では種々の新規経鼻アジュバントとしてのキチン微粒子、CpG-ODN、dmCT、不活化ウイルス粒子の効果をCTB\*と比較検討した。

## B. 研究方法

ワクチン: Influenzavirus A,: A/Puerto Rico/8/34 (A/PR8; H1N1), A/Yamagata/120/86 (A/Yamagata; H1N1), A/Guizhou/54/89 (A/Guizhou, H3N2), B :B/Ibaraki/2/85 (B/Ibaraki), それぞれのウイルス由来のエーテル・ホルマリン処理ワクチンは北里研究所より提供して頂いた。NewCaledonia/20/99(A/NC) (H1N1), A/Panama/2007/99(A/Pa)(H3N2), B/Shanddong/7/97(B/S)の精製ウイルス、及びその sp1it・product ワクチン(HA ワクチン)を(財)阪大微研会から供給して頂いた。

アジュバント: キチン微粒子 (Chitin Microparticles, Sigma-Aldrich, Poole, UK) :1-20 $\mu$ m 大の微粒子。CTB\*: コレラトキシン B サブユニット、0.1%コレラトキシン入り, Sigma, St. Louis, MO

Mycobacterium DNA:感染症研究所、山本三郎先生より御提供頂いた。

CpG-ODN:non-CpGODN(tggatccagcatgacg), ODN1826(tccatgacgttctctgacgtt), CG-30(accgataacgttgggtgacggcaccag) (感染症研究所、山本三郎先生より御提供頂いた)、5002(tccatgacgttctctgacgtt), 5004(tccatgacgttctctgacgtt), 5006(tccatgacgttctctgacgtt), S 化 5006 を用いた。

ダブル mCT の作製、精製; mCTE112K 発現プラスミドの小胞体残留シグナル KDEL 配列上に、変異部位を挿入した特異的プライマーを用

いた PCR を行い KDEL 配列上に変異を導入した発現プラスミドを作製した。このプラスミドを大腸菌に形質転換し、培養、集菌後、菌をTENに懸濁、破碎し、遠心により上清を回収した。上清をD-Galactose Immobilized Column (PIERCE)にかけてmCTを精製した。

マウス: 6-8週齢のメス BALB/c マウス (日本 SLC)

ウイルス: マウス馴化 A/Puerto Rico/8/34 (A/PR8; H1N1)をチャレンジに用いた。

## ワクチン接種と抗体測定

1群5匹のBALB/cマウスにエーテル麻酔下にHA ワクチン1 $\mu$ g とアジュバントとしてキチン微粒子10 $\mu$ g, 100 $\mu$ g, CTB\* 1 $\mu$ g をそれぞれ用い経鼻接種を行った。第1回目の接種後4週間及び6週間後に追加免疫を行った。最終免疫の2週間後にマウスの麻酔条件下で全採血し血清材料とした。又1群5匹のマウスに、麻酔条件下で、ワクチン・CpGODN を左右鼻孔から1 $\mu$ l ずつ点鼻投与し、3週間後同様に点鼻追加免疫した。2回目投与後10日目のマウスより、麻酔条件下で全採血して血清材料とした。マウスの上頭部をはずして1ml PBSで鼻腔を洗浄し鼻腔洗浄液とした。1群5匹のマウスに、麻酔条件下で、様々な投与量の不活化全ウイルス粒子ワクチン、及びHA ワクチンを左右鼻孔から1 $\mu$ l ずつ点鼻投与し、3週間後同様に点鼻追加免疫した。また、陽性対照としてCTB\*と混合したHA ワクチン(各0.1 $\mu$ g)を左右鼻孔から1 $\mu$ l ずつ点鼻投与し、3週間後ワクチンのみ(0.1 $\mu$ g)を追加免疫した。

抗体測定はIgA及びIgG抗体価をELISA法により測定した。固相に用いたそれぞれのA/PR8由来のHA分子はトライトンで溶解した精製ウイルスから抗HAモノクローナル抗体を用いたセファロースのアフィニティーカラムを用いて分離・精製した。血清および鼻腔洗浄液を段階希釈し固相のプレートに加えその抗原・抗体複合物にビオチン標識ヤギ抗マウスIgAあるいはIgGを反応させ次にアビジン-ALP、次にpNPを添加した。それぞれのサンプルの抗体価は濃度の測定され精製された抗

PR/8 HA-IgA, -IgG を標準に希釈系列の ALP 活性に基づく吸光度より決定した。

ウイルスチャレンジ  $1 \times 10^2$  PFU のマウス馴化 PR8 ウイルスを片鼻  $1.2 \mu\text{l}$  ずつ両鼻に接種した。回収された鼻腔洗浄液及び血清中の抗体価は ELISA 法を用いて HA 特異的 IgA 及び IgG の測定を行った。ウイルス価は MDCK 細胞を用いたプラーク法で測定した。

ダブル mCT の細胞内輸送の観察； 消化管上皮のモデルとして汎用されるヒト大腸ガン細胞株 T84 を用い、蛍光標識した dm CT を細胞に取り込ませ native CT との細胞内輸送の違いを免疫化学染色により観察した。

mCT のアジュバント活性: 卵白アルブミン (OVA) を抗原としてマウスに免疫して評価した。C57BL/6 マウスに OVA  $100 \mu\text{g}$  を mCT  $0.5 \mu\text{g}$  と共に、1 週間間隔で 3 回経鼻接種し、最終免疫から 1 週間後に血漿および粘膜分泌液を採取し、抗体価の測定をおこなった。

(倫理面への配慮)

マウスの飼育環境は良好でありまたマウスから気道洗浄液の採取は麻酔条件での心臓からの全採血による死亡後に行い苦痛を与えない配慮をした。

### C. 研究結果

キチン微粒子アジュバント併用インフルエンザワクチンを経鼻接種後の鼻腔洗浄液中の HA 特異的 IgA と血清中の HA 特異的 IgG の抗体価を測定したところ PR8 ワクチンと CMP  $100 \mu\text{g}$ ,  $10 \mu\text{g}$  を経鼻接種すると CTB\* をアジュバントに匹敵する特異的 IgA 及び IgG 応答が見られた。

アジュバント併用経鼻インフルエンザワクチンの接種により A/Yamagata (H1N1), A/Guizhou (H3N2), B/Ibaraki について PR8 と交叉反応する鼻腔洗浄液中に IgA が検出された。

### 感染防御

CMP 併用インフルエンザワクチンを経鼻接種後 1 匹あたり  $100 \text{pfu}$  のインフルエンザウイルスチャレンジ感染を行った。 $100 \mu\text{g}$ ,  $10 \mu\text{g}$  の

CMP と共にワクチン接種した群において CTB\* を用いた場合と同様 PR8 (H1N1) ウイルスのチャレンジを完全に防御した。ワクチンのみの接種ではまったく防御効果が見られなかった。

交叉防御能に関しては同じ H1N1 である A/Yamagata は完全防御が成立し、A/Guizhou (H3N2) は部分防御、B/Ibaraki に関しては感染抑制効果がまったく見られなかった。

スプリット・ワクチンの経鼻投与による抗体応答に及ぼす CpG ODN の応答増強効果  $1 \mu\text{g}$  のスプリット・ワクチンのみ、また、CpG モチーフを含まない non-CpG ODN の経鼻投与では、鼻洗浄液の IgA 抗体も血清中の IgG 抗体も共に低レベルであった。一方、CpG モチーフを含む Mycobacterium の DNA を添加することによって、鼻洗浄液 IgA の低レベルの増強と血清の IgG の高いレベルの増強が認められた。マウス型の CpG ODN (1826, CG · 30.5002) に、鼻洗浄液 IgA の中程度の増強活性が、また、血清の IgG の高い増強活性が認められた。マウス・ヒト型の CpG ODN (5006) には、用いた CpG ODN の中で最も高い IgA 増強活性と高い IgG 増強活性が認められた。しかしながら、その増強活性は、鼻洗浄液 IgA、血清の IgG 抗体共に、CTB\* をアジュバントとして用いた場合よりも多少低かった。

不活化全ウイルス粒子ワクチンとスプリットワクチンの経鼻投与量に依り抗体応答の比較したところ全ウイルス粒子ワクチンは、 $0.1 \mu\text{g}$  前後で非常に高いレベルの IgA 及び IgG 抗体応答を誘導したが、スプリットワクチンはこの投与量の前後で全く応答を示さなかった。しかしながら、スプリットワクチンに CTB\* ( $0.1 \mu\text{g}$ ) を添加した条件では、ワクチンの投与量  $0.1 \mu\text{g}$  前後で、全ウイルス粒子ワクチンのレベルを超える非常に高いレベルの IgA 及び IgG 抗体応答を誘導した。不活化全ウイルス粒子ワクチンのウイルスの亜型や型また不活化の方法の違いによる抗体応答を比較したところ全粒子ワクチン、 $0.1 \mu\text{g}$  を経鼻投与した時の鼻洗浄液の IgA 及び血清の IgG 抗体応答は、ウイルスの亜型や型、また、不活化の方法によっても影響を受けた。

ダブル mCT の細胞内輸送の観察 : native CT では細胞内に取り込まれた後、Golgi から小胞体 (ER) に輸送される様子が観察されたのに対して、dmCT E112K/KDEV では細胞内には取り込まれたものの Golgi に蓄積され ER には輸送されなかった、また dmCT E112K/KDGL は細胞内への取り込まれ方が native CT と比較して遅く、Golgi までは輸送されるものの、蓄積せずに細胞表面に再分布している様子が観察された

ダブル mCT のアジュバンド活性 : 血漿中での OVA-特異的抗体応答を測定した結果、何れのダブル mCT でも native CT と同程度の高い OVA-特異的 IgG 応答を誘導できた。この値は、mCT E112K と比較して優位に高かった。次に、この血漿中 OVA-特異的 IgG のサブクラスを測定したところ、dmCT E112K/KDGL は native CT と同様に高い IgG2a の誘導が見られたのに対して、dmCT E112K/KDEV は先に特異的に Th2-type の応答を誘導することが報告されている mCT E112K と同様に IgG2a の誘導は低かった。次に粘膜面での OVA-特異的 IgA 応答を測定した結果、評価をおこなった nasal wash、fecal extract、saliva のすべてにおいてダブル mCT は native CT と同程度の OVA-特異的 IgA を誘導した。

#### D. 考 察

今回種々の新しいアジュバンドを用いることによりワクチンの経鼻接種で粘膜での特異的 IgA 誘導と血清中の IgG を誘導することができ感染防御に非常に有用であることが示された。いままで粘膜免疫誘導によるインフルエンザウイルス感染防御の研究はコレラトキシン (CTB) や大腸菌易熱性毒素 (LT) などを用いて行われてきた。粘膜免疫誘導の重要性は示されてきたがヒトへの応用はその副作用により進まなかったのが現状である。今回アジュバンド効果がみとめられたキチン微粒子はカニの甲羅やえびの甲羅など天然物を原料とする安全な物質である。その作用機序はまだ不明な点が多いがキチンには IL-12、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  などの Th1 関連サイトカインの誘導が知られておりワクチンとともに経鼻接種されたばあい鼻

咽頭関連リンパ装置 NALT で直接抗原提示細胞に取り込まれ働いていると考えられる。CpGODN は、抗原提示機能を持った細胞に存在する Toll-like receptor9 のリガンドとして作用し、抗原提示細胞の機能を高めることによって、共存する抗原に対する特異免疫応答を高めることが知られている。本実験結果において、CpGODN が経鼻不活化スプリットワクチンに対する抗体応答を増強することが示された。また不活化全ウイルス粒子には単鎖 RNA がウイルスの遺伝子として含まれており、これが TLR7 のリガンドとしてアジュバンド作用を発揮することが報告されている。従って、不活化全ウイルス粒子は自身が有する単鎖 RNA のアジュバンド作用により、高いレベルの抗体応答を誘導する、と考えられる。また、ガングリオシド GM1 経路で作用する CTB\* のアジュバンド作用は、TLR3 経路で働く 2 重鎖 RNA (polyI:C)、TLR7 経路で働く単鎖 RNA 及び TLR9 経路で働く CpGODN のアジュバンド作用よりも、その投与量ベースで比較した時、多少高いことが明らかになった。

CT や LT の強力な粘膜アジュバンド効果は周知されており、遺伝学的手法により毒性が無く、且つ免疫増強活性が維持されている改良型 mCT が報告されている。ところが最近中枢神経系での神経障害等安全性が懸念されている。そこで CT の細胞内輸送に関与する A サブユニットに変異を導入することにより中枢神経へ移行しない変異体が作製を目指しダブル mCT を作製し、細胞内移行を観察した。ダブル mCT は native CT より遅く細胞内に取り込まれ Golgi に蓄積され ER には輸送されず細胞表面に再分布している様子が観察された。この結果よりダブル mCT の細胞内輸送は native CT とは明らかに異なっており、神経細胞での輸送も異なることが期待された。また従来 mCT E112K 同様、安全性、アジュバンド活性も確認され、ダブル mCT は経鼻免疫の有効なアジュバンドである可能性が示された。

経鼻ワクチンは抗原と粘膜アジュバンドの混合物を鼻腔に噴霧するだけで免疫応答を誘導でき、針を使用しないことから痛みを伴わず、投与する側にも安全なワクチンである。この粘膜ワクチン開発の鍵を握っているのが有効で

安全な粘膜アジュバントの開発であり今回多くの安全なアジュバント候補が示された。

#### E. 結論

不活化ワクチンを経鼻粘膜接種することは粘膜免疫誘導に有用であり粘膜を介して感染する様々な病原体に対して有効である。しかし不活化ワクチンでの粘膜免疫誘導のためにはアジュバントが必要であり、ヒトでの応用が可能な新しいアジュバントの開発が望まれている状況である。今回新しく粘膜アジュバント作用が示されたキチン微粒子、CpG-ODN、ウイルス全粒子ワクチン、ダブル mCT はヒトでの応用を考えた場合安全で有効なアジュバントとして有望であると考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Hasegawa H, Ichinohe T, Strong P, Watanabe I, Ito S, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Chiba J, Kurata T, and Sata T. Protection against influenza virus infection by intranasal administration of HA vaccine with chitin microparticles as an adjuvant. **Journal of Medical Virology**, 2005 Jan; 75:130-136.
2. Ichinohe T, Watanabe I, Ito S, Fujii H, Moriyama M, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, and Hasegawa H\*, Synthetic double-stranded RNA [poly (I:C)] combined with mucosal vaccine protects against influenza virus infection. **Journal of Virology**, 2005 Mar; 79(5):2910-2919.
3. Shin-ichi Tamura and Takeshi Kurata Defense Mechanisms against Influenza Virus Infection in the Respiratory Tract Mucosa, Japanese Journal of Infectious Diseases 2004. Dec. Vol.57

##### 2. 学会発表

1. 一戸猛志、渡邊 泉、伊藤智史、森山雅美、田村慎一、千葉 丈、倉田 毅、佐多徹太

郎、長谷川秀樹：合成 2 本鎖 RNA, Poly(I:C) をアジュバントに用いた経鼻インフルエンザワクチンの開発。第 52 回日本ウイルス学会総会（横浜）2004 年 11 月。

2. 一戸猛志、渡邊 泉、伊藤智史、森山雅美、田村慎一、千葉 丈、倉田 毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹：合成 2 本鎖 RNA, Poly(I:C) をアジュバントとして用いた経鼻インフルエンザワクチンの開発。第 8 回日本ワクチン学会学術集会（札幌）2004 年 10 月。
3. 長谷川秀樹、一戸猛志、渡邊 泉、伊藤智史、千葉 丈、田村慎一、倉田 毅、佐多徹太郎。天然物由来微粒子の粘膜ワクチンアジュバント効果の検討第 8 回日本ワクチン学会学術集会（札幌）2004 年 10 月。
4. Nontoxic Mutant CT (E112K/KDGL) Elicits Antigen-specific CD8+ Cytotoxic T Lymphocyte (CTL) Responses , Y.Hagiwara, A.Hino, K.Kataoka, K.Komase, Y.Suzuki, H.Kiyono, J.R.McGhee and K.Fujihashi 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会, 札幌, 2004 年 12 月
5. Nontoxic CT Mutant (E112K) With Second Mutated In The COOH-Terminal KDEL Of The A Subunit Are Effective Mucosal Adjuvants, Y.Hagiwara, K.Kataoka, N.Yoshino, T.Dohi, Y.Kawamura, K.Komase, Y.Suzuki, J.R.McGhee and K.Fujihashi 12th International Congress of Immunology, Montreal, Canada, 2004/7/18-23
6. Nontoxic CT (E112K) Mutated In The COOH-Terminal KDEL Of The A Subunit Elicits Mucosal Adjuvant Activity Without Intracellular Trafficking, Y.Hagiwara, T.Dohi, Y.Kawamura, N.Yoshino, K.Kataoka, K.Komase, Y.Suzuki, H.Kiyono, J.R.McGhee and K.Fujihashi 4th World Congress on Vaccines and Immunization, Tsukuba Science City, Japan, 2004/9/30-10/3

#### G. 知的財産権の出願、登録状況 なし