

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（Ⅱ）

平成18年度

政策創薬総合研究

重点研究報告書（Ⅱ）

目 次

KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法 (DLI) の実用化	藤原成悦 ……	589
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 ……	636
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 ……	656
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 ……	671
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 ……	680
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 ……	691
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 ……	707
KH51048	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	長谷川秀樹 ……	720
KH51049	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 ……	728
KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 ……	740
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 ……	761
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 ……	772
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 ……	783
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 ……	795
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 ……	814
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 ……	826
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 ……	836
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 ……	839
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 ……	919
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 ……	939
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法の確立に関する研究	乾 賢一 ……	951
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 ……	966

KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 979
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 …… 1000
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサーの開発	永森静志 …… 1021
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤の開発	西尾和人 …… 1042
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄 …… 1054
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的評価	澤田康文 …… 1070
KHB1201	タンパクリン酸化酵素SIKの糖・脂質代謝における役割と創薬標的評価系の開発	竹森 洋 …… 1080
KHB1202	家族性黄斑変性カニクイザルを用いた加齢黄斑変性の新規治療及び予防薬の開発	寺尾恵治 …… 1086
KHC1203	弱毒性ウイルスワクチンの品質向上、生産性向上に関する研究	大隈邦夫 …… 1090
KHC1204	チオレドキシシンなど抗酸化反応性活性酸素種処理分子の高発現を促す新しい健康増進医薬の開発	井上 達 …… 1096
KHC2206	腹膜癒着予防剤の開発と応用	土肥多恵子 …… 1106
KHD1205	ヒト乾燥羊膜の機能再生医療材料への実用化に関する研究	阿久津英憲 …… 1111
KHD2207	ヒト由来細胞・組織バンクの活用拡大のためのシステム構築と研究資源の高度化に関する研究	後藤雄一 …… 1115

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

新しい粘膜アジュバントとしてヒトでの安全性が確認されている二本鎖 RNA polyI:polyC₁₂U(Ampligen)、ダブルミュータントコレラ毒素 (dmCT) E112K/KDEV および dmCT E112K/KDGL をアジュバントとして用いたインフルエンザ不活化ワクチンの経鼻接種による感染防御の研究を行った。それぞれのアジュバント併用または、全粒子不活化ワクチンの経鼻接種によりマウスの粘膜における有効な IgA 抗体の分泌とそれによる交叉防御能が確認された。

分担研究者

- (1) 社団法人北里研究所・生物製剤研究所
萩原 由加利
駒瀬 勝啓
- (2) 財団法人阪大微生物病研究会・東 雍

その上気道での IgA 抗体と血中の IgG 抗体を誘導能、および感染防御能を調べメカニズムを解析することを目的とする。

A. 研究目的

粘膜ワクチンは粘膜免疫の誘導により皮下接種ワクチンに比べ交叉防御能と感染防御に有利である。本研究では粘膜ワクチンの為の新規アジュバントを開発する事を目的としている。新規アジュバントの候補としてヒトでの安全性が確認されている二本鎖 RNA poly(I:C₁₂U)、2種のダブルミュータントコレラトキシン (dmCT E112K/KDEV, dmCT E112K/KDGL)、全粒子不活化ワクチンをインフルエンザ経鼻ワクチンに用い

B. 研究方法

材料と方法：

ウイルス株及びワクチン株

インフルエンザウイルス A/PR8/H1N1, 高病原性鳥インフルエンザ H5N1 株 (A/VN/1194/2004, A/HK/483/97) を用いてマウス感染実験を行った。ワクチン株としては A/VN/1194/2004 (H5N1) 由来の NIBRG14 株を使用した。インフルエンザウイルス H1N1 のワクチンとしては

A/PR8/H1N1, および B/Ibaraki A/New Caledonia/20/99 (H1N1) ウイルス split-product ワクチンを用いた。

アジュバントの調整

合成二本鎖 RNA poly(I:C₁₂U) (Ampligen) は米国 Hemispherex Biopharma 社より分与を受けた。

dmCT E112K/KDEV, E112K/KDGL, nCT, mCT E112K をアジュバントとして用いた。

免疫方法

マウスにワクチンと共に polyI:polyC₁₂U アジュバントと共に経鼻投与した。dmCT E112K/KDEV, E112K/KDGL を用いた実験では 1 週間間隔で 3 回経鼻免疫を行った。

ELISA アッセイ

抗体価の測定は、ELISA にておこなった。2 段階希釈の標準曲線を作成して抗体価を表現した。

CD11c⁺樹状細胞サブセットの解析: 経鼻免疫したマウスの脾臓および頸部リンパ節よりシングル細胞を調整した。細胞を、FITC-標識 抗-CD11b、-CD8 または-B220 モノクローナル抗体、および APC-標識 抗-D11c モノクローナル抗体で染色し、FACS Calibur によりフローサイトメトリー解析した

C. 研究結果

1、 polyI:polyC₁₂U (Ampligen) の粘膜アジュバント作用と交叉防御

ヒトでの安全性が確認されている合成二本

鎖 RNA polyI:polyC₁₂U (Ampligen) を用いた経鼻インフルエンザワクチンによる粘膜免疫応答を調べた A/PR8/H1N1 ワクチンを用いた時鼻腔洗浄液中に特異的な分泌型 IgA が誘導され、同型のウイルスによる攻撃感染時に鼻腔でのウイルス増殖が完全に抑えられた。

polyI:polyC₁₂U を用いて高病原性鳥インフルエンザワクチンとの併用によるアジュバント作用を調べた結果皮下接種群においては鼻腔洗浄液中の NIBRG14 特異的 IgA 抗体はまったく認められず、経鼻接種群のみで認められた。中和抗体価は使用したワクチン NIBRG14 の親株である A/Vietnam/1194/2004 に対してのみ認められ、その値は皮下接種と経鼻接種で変りなかった。また、抗原性の異なる A/HongKong/H5N1 による攻撃感染後に鼻腔洗浄液中のウイルス価を 100 分の 1 に現象させた。交叉防御効果が示された。

2、 dmCT で経鼻免疫したマウスにおける CD11c⁺樹状細胞のサブセット解析:

nCT, dmCT E112K/KDEV および dmCT E112K/KDGL を経鼻アジュバントとして免疫したマウスの、脾臓および頸部リンパ節より調整したシングル細胞の CD11c⁺細胞サブセットをフローサイトメーターにより解析した。その結果、CD11⁺, CD8⁺細胞の CD11c⁺細胞における割合は、脾臓では nCT 11.1 ± 1.5 %, dmCT E112K/KDEV 13 ± 1.4 %, dmCT E112K/KDGL 12.1 ± 1.4 %, 頸部リンパ節では nCT 14.56 ± 1.3 %, dmCT E112K/KDEV 15.8 ± 1.3 %, dmCT E112K/KDGL 14.2 ± 1.3 %であった。

3、免疫方法による HI 価の変化

血清 HI 抗体価は、2 回とも HA 皮下群と 1 回目 HA 経鼻、2 回目 HA 皮下群、HA 皮下+経鼻群がほぼ同等で、1 回目全粒子皮下、2 回目 HA 皮下群と 1 回目 HA 皮下、2 回目 HA 経鼻群それに次ぎ、1 回目全粒子経鼻、2 回目 HA 皮下群、1 回目全粒子皮下、2 回目 HA 経鼻群、1 回目 HA 皮下、2 回目全粒子皮下群が続いた。粘膜 IgA と血清 HI 抗体価の両方がほぼ感染防御レベル(それぞれ ≥ 32 と ≥ 40)となったのは、1 回目全粒子皮下、2 回目 HA 経鼻群で、それに近い抗体応答となったのは 1 回目 HA 皮下、2 回目 HA 経鼻群であった。

D. 考察

ヒトで安全が確認されえちる合成二本鎖 RNA polyI:polyC₁₂U をアジュバントとして用いた経鼻ワクチンの接種により鼻腔粘膜上に感染防御に有効な HA 特異的分泌型 IgA 抗体、及び血清中の IgG 抗体が誘導される。これら免疫応答のうち分泌型 IgA には株の異なるワクチンであっても交叉防御能があった。また dmCT E112K/KDEV および dmCT E112K/KDGL 2 種類の dmCT の間で認められるアジュバント活性の性質の差の理由の一つは、樹状細胞に対する影響の違いに起因しているものと示唆された。また経鼻接種における粘膜免疫誘導は全粒子ワクチンが優れている。

E. 結論

高病原性インフルエンザ H5N1 のマウス感染モデルを用いアジュバント併用経鼻 H5N1 ワクチンによる交叉防御能を示した。また、ヒトでの安全性が確認されている二本鎖 RNA である polyI:polyC₁₂U を用いて交叉防御能を持つ粘膜免疫誘導が可能であった。今後はヒトへの応用

を考えた研究につなげていく予定である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

1. Ichinohe T, Ito S, Kawaguchi A, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Moriyama M, Chiba J, Kurata T, Sata T, and Hasegawa H* Protection against influenza virus infection by intranasal vaccine with Surfclam Powder as a mucosal adjuvant. **J Med Virol**, 2006 78:954-963.
2. Asahi-Ozaki Y., Itamura S., Ichinohe T., Strong P., Tamura S., Takahashi H., Sawa H., Moriyama M., Tashiro M., Sata T., Kurata T., Hasegawa H*., Intranasal administration of adjuvant-combined recombinant influenza virus HA vaccine protects mice from the lethal H5N1 virus infection. **Microbes and Infection** 2006 Oct;8(12-13):2706-14. 2006 Aug 28; [Epub ahead of print]
3. Hagiwara Y, Kawamura YI, Kataoka K, Rahima B, Jackson RJ, Komase K, Dohi T, Boyaka PN, Takeda Y, Kiyono H, McGhee JR, and Fujihashi K. A second generation of double mutant cholera toxin adjuvants: enhanced immunity without intracellular trafficking. **J. Immunol.** 2006. 177:3045-3054.

学会発表

1. 一戸猛志、田村慎一、板村繁之、小田切孝人、田代真人、千葉丈、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹 アジュバント併用経鼻 H5N1 高病原性鳥インフルエンザワクチンの交叉防御効果の検討 第 10 回日本ワクチン学会学術集会 平成 18 年 10 月 21 日-22 日 大阪
2. 永田典代、岩田奈織子、長谷川秀樹、福士秀悦、西條政幸、森川茂、佐藤由子、佐多徹太郎 マウス、ラット馴化 SARS-CoV を用いた SARS 発症動物モデルの作製 第 54 回日本ウイルス学会学術集会 平成 18 年 11 月 19 日-21 日 名古屋
3. 長谷川秀樹、一戸猛志、網康至、永田典代、川口晶、岩田奈織子、須崎百合子、田村慎一、二宮愛、今井正樹、小田切孝人、田代真人、倉田毅、佐多徹太郎 カニクイザルを用いた高病原性鳥インフルエンザ (H5N1) 経鼻ワクチンによる感染防御 第 54 回日本ウイルス学会学術集会 平成 18 年 11 月 19 日-21 日 名古屋
4. 一戸猛志、伊藤智史、田村慎一、二宮愛、今井正樹、小田切孝人、田代真人、千葉丈、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹 自然免疫による高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) の感染抑制効果 第 54 回日本ウイルス学会学術集会 平成 18 年 11 月 19 日-21 日 名古屋
5. 一戸猛志、田村慎一、二宮愛、今井正樹、小田切孝人、田代真人、千葉丈、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹 アジュバント併用経鼻 H5N1 インフルエンザワクチンの交叉防御効果の検討 第 54 回日本ウイルス学会学術集会 平成 18 年 11 月 19 日-21 日 名古屋
6. Yoshino N, Kanekiyo M, Okamura T, Hagiwara Y, Someya K, Matsuo K, Ami Y, Yamamoto N, Sato S, and Honda M. Replication-deficient vaccinia virus DIS recombinant as an effective and safe mucosal vaccine for immunodeficiency virus. XVI International AIDS Conference, Toronto Canada, 2006/8/13-18
7. 吉野直人、萩原由加利、菅野祐幸、堤玲子、野田公俊、佐藤成大. リンゴポリフェノール併用によるコレラ毒素アジュバントの毒性軽減と抗原特異的抗体産生 第 10 回日本ワクチン学会, 大阪, 2006/10/21-22
8. Hagiwara Y, Kiyono H, McGhee J.R and Fujihashi K. Double Mutant of Nontoxic Cholera Toxin dmCT E112K/KDGL Provides Potent Oral Adjuvant Activity. 第 36 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 2006/12/11-13
- H. 知的財産権の出願、登録状況 なし

平成18年度
政策創薬総合研究
重点研究報告書(Ⅱ)

平成19年7月31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