

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

研究期間 平成16年4月～平成19年3月

研究要旨 粘膜ワクチンは皮下接種ワクチンの比較し感染防御能、交叉防御能に優れている。しかし効果ある粘膜ワクチンにはヒトで利用できる安全な粘膜アジュバントが必要である。本研究ではヒトで利用できるアジュバントの開発を行い二本鎖 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粘膜免疫誘導が認められ、臨床応用へつなげる結果となった。

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

(3) 大阪大学微生物病研究所・田村 慎一

A. 研究目的

粘膜免疫を利用した経鼻、経口ワクチンは感染症制御のための次世代ワクチンとして期待されている。しかし十分な s-IgA を粘膜上皮に誘導するためにはワクチン抗原とともにアジュバントを投与する必要がある。コレラ菌の産生するコレラトキシン (CT) や毒素原性大腸菌の産生する易熱性毒素 (LT) は、粘膜上に効率的に s-IgA を誘導する強力なアジュバントとして知られているが、実際にヒトへの応用を考えた場合、その強力な活性ゆえに毒性が問題となる。本研究ではヒトの粘膜ワクチンに利用できる安全なアジュバントの開発を目的とする。

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

新規アジュバントとして合成二本鎖 RNA polyI:polyC₁₂U (Ampligen)、Chitin microparticles (CMP)、dmCT E112K/KDEV、E112K/KDGL、nCT、mCT E112K を用いた。

免疫方法

マウスにワクチンと共に各種アジュバントと共に経鼻投与した。

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. 新規アジュバント併用経鼻インフルエンザワクチンによる感染防御

ヒトでの安全性が確認されている合成二本鎖 RNA polyI:polyC₁₂U (Ampigen) 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. 毒性を弱めたコレラとキシンドブルミュータント (dmCT) で経鼻免疫したマウスの解析:

コレラトキシン (nCT)、及びその毒性を弱めた変異体 dmCT E112K/KDEV および dmCT E112K/KDGL を経鼻アジュバントとして用いた。モデル抗原卵白アルブミン (OVA) と共に免疫したマウスで何れの dmCT でも nCT と同程度の高い OVA-特異的 IgG 応答を誘導できた。粘膜面での OVA-特異的 IgA 応答を測定した結果、評価をおこなった鼻洗浄液、糞便抽出液、唾液の全ての粘膜分泌液において dmCT は nCT と同程度の OVA-特異的 IgA を誘導した。

3. インフルエンザ全粒子ワクチンのアジュバント作用

全粒子ワクチンを適当な不活化条件で、一定以上経鼻接種することで、粘膜と血清の両方に感染防御レベル以上の抗体が誘導された。スプリットワクチンではワクチン単独では抗体応答が認められなかった。

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事が示された。

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. 研究発表

1. 論文発表

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.

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.

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.

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]

Yoshino N, Lu FX, Fujihashi K, Hagiwara Y, Kataoka K, Lu D, Hirst L, Honda M, van Ginkel FW, Takeda Y, Miller CJ, Kiyono H, McGhee JR. 2004. A novel adjuvant for mucosal immunity to HIV-1 gp120 in nonhuman primates. *J Immunol.* 173:6850-6857.

van Ginkel FW, Jackson RJ, Yoshino N, Hagiwara Y, Metzger DJ, Connell TD, Vu HL, Martin M, Fujihashi K, McGhee J.R. Enterotoxin-based mucosal adjuvants alter antigen trafficking and induce inflammatory responses in the nasal tract. 2005. *Infect Immun.* 73:6892-6902.

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. 2006. *J. Immunol.* 177:3045-3054.

2. 学会発表

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。

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。

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。

一戸猛志、尾崎泰子、板村繁之、田村慎一、田代真人、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有効性の検討 第9回日本ワクチン学会学術集会 平成17年10月15日-16日 大阪

田村慎一、尾崎泰子、長谷川秀樹、谷本武史、鈴木雄次郎、山本三郎、佐多徹太郎、倉田毅 経鼻不活化インフルエンザワクチンの開発 第9回日本ワクチン学会学術集会 平成17年10月15日-16日 大阪

一戸猛志、田村慎一、千葉丈、小田切孝人、田代真人、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹 NKT 細胞活性化による粘膜免疫応答の誘導と高病原性鳥インフルエンザウイルスに対するワクチンへの応用 第53回日本ウイルス学会学術集会2005年11月20-22日 横浜

永田典代、岩田奈緒子、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、ラットを用いた継代によるSARS-CoVの病原性の変化 第53回日本ウイルス学会学術集会2005年11月20-22日 横浜

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

永田典代、岩田奈緒子、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

長谷川秀樹、一戸猛志、網康至、永田典代、川口晶、岩田奈緒子、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

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

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

Nontoxic CT Mutant (E112K) With Second Mutated In The
COOH-Terminal KDEL Of The A Subunit Are Effective
Mucosal Adjuvants, Hagiwara Y, Kataoka K, Yoshino N,
Dohi T, Kawamura Y, Komase K, Suzuki Y, McGhee J. R. and
Fujihashi K. 12th International Congress of
Immunology, Montreal, Canada, 2004/7/18-23

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

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, 2004/12/1-3

Induction of CD8-Positive (CD8⁺) Cytotoxic T
Lymphocyte (CTL) Responses By Nontoxic Double Mutant
CT (E112K/KDGL) Adjuvant. Hagiwara Y, Hino A, Komase
K, Suzuki Y, Kiyono H, McGhee J. R and Fujihashi K, 12th
International Congress of Mucosal Immunology, Boston,
(USA), 2005/6/25-30

Nasal application of a Nontoxic Double Mutant Of CT
(E112K/KDGL) Induces CD11c⁺ Dendritic Cells. Hagiwara
Y, Hino A, Kataoka K, Komase K, Kiyono H, McGhee J. R
and Fujihashi K. 第35回日本免疫学会総会・学術集会, 横
浜, 2005/12/13-15

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

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

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

7. 知的所有権の取得状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許公開 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | 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