

200735064A

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

粘膜投与等の新投与経路ワクチン研究における
品質管理に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 板村繁之

平成20(2008)年 3月

目 次

I. 総括研究報告

- 粘膜投与等の新投与経路ワクチン研究における品質管理に関する研究 ----- 1
板村繁之

II. 分担研究報告

1. 合成二本鎖 RNA 粘膜アジュバントの安全性試験に関する研究 ----- 8
長谷川 秀樹
2. 粘膜ワクチンの品質管理に必要な免疫学的試験法の開発 ----- 14
横田 恭子
3. 粘膜投与等の新投与経路ワクチン研究における品質管理に関する研究 ----- 18
笠井道之

粘膜投与等の新投与経路ワクチン研究における品質管理に関する研究

主任研究者 板村繁之 国立感染症研究所ウイルス第3部 主任研究官

研究要旨

経鼻接種による粘膜免疫を誘導する粘膜ワクチンが開発されれば、従来感染阻止のできなかった急性呼吸器感染症などに対して発病予防だけでなく感染予防や流行阻止に有効なワクチンの実現が期待される。また、新型インフルエンザに対するワクチンとしても高い有効性が期待される。本研究では、アジュバント添加不活化インフルエンザ経鼻接種粘膜ワクチンを新しい投与経路ワクチンのモデルとし、安全性が高く高品質のワクチンを製造するために必要な品質管理方法の確立を目的とした。初年度である本年度は、以下のような研究成果を得た。

- (1) アジュバント添加経鼻接種不活化インフルエンザワクチンの製剤化を試み、一定の安定した製剤とすることができた。
- (2) 経鼻接種ワクチンのアジュバントの安全性について経鼻連続投与及び頭蓋内直接投与の方法で粘膜アジュバント候補である合成二本鎖RNA, poly(I:C)を調べ、コントロールのPBSと同等の毒性であることがわかった。
- (3) H5亜型HA特異的なモノクローナル抗体を組み合わせてクレード特異的なH5HAあるいは全てのクレードH5HAを定量検出するサンドイッチELISAシステムを確立し、これらの抗体は経鼻接種ワクチンの品質管理に有用であることがわかった。
- (4) 不活化型全粒子ワクチンの脂質成分または核酸成分に反応性のTLRsシグナル強度をNF- κ Bレポーターアッセイとそれの伴うサイトカイン産生を調べることにより、不活化全粒子インフルエンザワクチンの免疫原性を測定できる可能性を明らかにした。

研究組織

笠井道之 国立感染症研究所血液・安全性研究部

主任研究者

主任研究官

板村繁之 国立感染症研究所ウイルス第3部

谷本武史 (財) 阪大微生物病研究会観音寺研究所

主任研究官

課長補佐

分担研究者

A. 研究の目的と背景

長谷川秀樹 国立感染症研究所感染病理部 室長

従来のワクチンの多くは皮下などの接種経路で実

横田恭子 国立感染症研究所免疫部 室長

施されている。ところが、インフルエンザに代表さ

れる感染が身体の表層部分で起こる急性の感染症に対する有効な生体防御応答を誘導するには、現行の接種経路のワクチンは適していない。現行のインフルエンザワクチンは、皮下接種によって血中に IgG を主体としたウイルスの中和抗体を産生することによって上気道から下気道へ感染が拡大して肺炎などに重症化するのを抑制するように働く。そのために感染阻止には有効ではないが発病阻止や重症化阻止には機能する。しかしながら上気道での感染を阻止するためには粘膜局所での免疫応答を効率よく誘導する必要があるが、現行の接種経路では効率良く粘膜局所での IgA を主体とした免疫応答を誘導することができない。また、インフルエンザのように病原体の抗原性が頻繁に変化するものに対しては交差反応性に優れた防御免疫応答が重要であるが、血清中の中和抗体である IgG は粘膜局所に分泌される IgA と比較してその交差反応性に劣る。

このような問題点を克服するために、経鼻接種による粘膜免疫を誘導する粘膜ワクチンの開発が進められ有望な結果も集積してきている。こうしたワクチンが開発できれば、従来感染阻止のできなかつた急性呼吸器感染症などに対して発病予防だけでなく感染予防や流行阻止に有効なワクチンの実現が期待される。また、新型インフルエンザに対するワクチンとしても高い有効性が期待される。米国やスイスでは弱毒生ワクチンや不活化ワクチンのインフルエンザワクチンが経鼻接種ワクチンとして開発されてきたが、安全性や効果の点から問題点が残されており、新しいワクチンの接種経路としての経鼻ワクチンについて安全性やその品質を確保するために必要な品質管理の方法について確立しているとは言い難い。

本研究では、アジュバント添加不活化インフルエンザ経鼻接種粘膜ワクチンを新しい投与経路ワクチンのモデルとし、安全性が高く高品質のワクチンを

製造するために必要な品質管理方法の確立を目的として実施した。

B. 研究方法

1) 新しい投与経路ワクチンのモデルとしてのアジュバント添加経鼻接種不活化インフルエンザワクチンの製剤化

パンデミック用ワクチンとして高病原性鳥インフルエンザ H5N1 ウイルスを使用した全粒子タイプの不活化ワクチンと通常期用のインフルエンザワクチンとしてスプリットタイプのインフルエンザ HA ワクチンの2種類について粘膜ワクチンのアジュバントとして合成二重鎖 RNA を用いて製剤化を試みた。

2) アジュバント添加経鼻接種不活化インフルエンザワクチンに使用するアジュバントの安全性評価

経鼻粘膜ワクチンとしての合成二本鎖 RNA アジュバントの安全性評価のために、経鼻反復投与及び鼻腔に接する脳内への直接投与での安全性を体重減少及び病理学的に解析を行った。

3) HA 含量測定によるワクチン力価試験法の開発

A/Vietnam/1194/2004 (NIBRG-14) (H5N1) 株を発育鶏卵で増殖させたのち蔗糖密度勾配遠心法で精製し、UV またはホルマリンで不活化して免疫抗原としてマウスに免疫した。免疫したマウスの脾臓細胞とミエローマ細胞を細胞融合させてハイブリドーマを作製した。ELISA 法で NIBRG-14 (H5N1) 株に特異的に反応する抗体を産生するハイブリドーマを選択した。得られた HA 蛋白に特異的なモノクローナル抗体を使用してサンドイッチ ELISA 法による HA 抗原検出系の開発を行った。

4) アジュバント添加経鼻接種不活化インフルエン

ザワクチンの免疫原性評価によるワクチン力価試験法の開発

転写因子 (NF- κ B) に対するレポーター遺伝子を組み込んだ人由来モノサイト細胞 (THP-Blue-CD14 細胞) を指示細胞として TLR アゴニストとしての免疫誘導能について不活化全粒子インフルエンザワクチンとスプリットワクチンであるインフルエンザ HA ワクチンと比較して評価した。

C. 研究結果・考察

1) 新しい投与経路ワクチンのモデルとしてのアジュバント添加経鼻接種不活化インフルエンザワクチンの製剤化

アジュバントを混合したワクチンとして製剤化を試みた。その結果、作製したアジュバント添加ワクチンは比較的安定して特性を維持していた。今後さらに製剤としての安定性などについて検討を加える必要がある。

2) アジュバント添加経鼻接種不活化インフルエンザワクチンに使用するアジュバントの安全性評価

合成二本鎖 RNA アジュバントである poly(I:C) の経鼻ルートでの投与時の安全性を調べる為に、過剰量の poly(I:C) と実験的に使われて来た細菌性毒素由来のアジュバントである CTB* を経鼻で連続 9 日間投与した。それぞれのアジュバントを経鼻連続投与したマウスの経時的体重変化を測定し、また投与終了後、安楽死させた後解剖を行い鼻腔領域の組織を採取し病理学的に解析を行った。10 μ g の poly(I:C) を 9 日間連続投与したマウスにおいてはコントロール群である PBS 投与群と比較して体重減少は認められなかった。一方細菌由来の毒素系アジュバントである CTB* を 9 日間連続投与した群ではコントロール群と比較して体重減少が認められた。Poly(I:C) 連続

投与群では PBS 投与群と同様に病理学的変化は認められなかった。一方 CTB* 連続投与群では鼻腔内に炎症細胞を伴った粘液の滲出が認められた。

鼻腔領域は解剖学的に脳と嗅神経を介して接している為、経鼻粘膜アジュバントの神経毒力を調べる目的で poly(I:C) 及び CTB* を頭蓋内接種した時の体重変化及び生存、病理組織を調べた。1 群 5 匹のマウスを用い CTB* を 2.5 μ g, 10 μ g, 25 μ g 投与 poly(I:C) を 0.25 μ g, 2.5 μ g, 25 μ g、二段針を用いて頭蓋内に直接投与した。コントロールとして PBS 投与群をそれぞれおいた。CTB* 10 μ g 及び 25 μ g 投与群のマウスは投与 3 日目までに 15% の体重減少を示し 10 μ g 投与群の 1 匹及び 25 μ g 投与群のマウス 2 匹が頭蓋内投与から 4 日目で死亡した。一方 0.25 to 25 μ g の poly(I:C) を頭蓋内投与した群においてはいずれも 7 日間体重減少がみられず生存した。脳の組織を病理組織学的に解析した結果、CTB* を 10 μ g 頭蓋内投与したマウスでは脳出血が認められた。ところが、poly(I:C) を頭蓋内投与した群においては PBS 投与群と同様にいずれの量を投与した群においても病理学的な変化は認められ無かった。これらの結果から粘膜アジュバントとしての poly(I:C) は経鼻的にも神経毒力の観点からも毒性の低いものであると考えられる。

ワクチン等の予防医薬は十分に安全性が確保されたものでなくてはならない。ワクチンの経鼻接種法は現行の皮下接種ワクチンに代わり粘膜感染ウイルスの防御にはその感染防御能力が高く実用化が待たれるが、経鼻接種特有の安全性を調べる必要がある。本研究において経鼻粘膜アジュバントの候補である poly(I:C) の安全性について調べた。鼻腔は嗅神経を介して脳と接している為、鼻腔周辺組織に対する影響を鼻連続投与でまた神経毒力を頭蓋内投与した時の病理学的変化で調べた。いずれの投与方法においても実験的にもちいられてきた粘膜アジュバントで

ある CTB*と比較し poly(I:C)は局所及び脳組織において安全性が高い事が示された。

3) HA 含量測定によるワクチン力価試験法の開発

2C2 抗体は conformational epitope を認識すると思われ、免疫に用いた Clade 1:NIBRG-14 だけでなく Clade 2.1:Indo05/PR8-RG2 の H5HA にも強く反応する。OM-b 抗体も両者に反応する。一方、1A1 抗体は NIBRG-14 株 HA に特異的である。これらを組み合わせてサンドイッチ ELISA 法を確立した。まずこの ELISA 法の特異性を検討するため、Clade の異なる H5N1 精製ウイルス抗原ワクチンに対する反応を2つの系で測定した。1A1 系で10倍希釈したワクチン抗原を用いた場合、Clade 1:NIBRG-14 と Clade 2.2:NIBRG-23 を検出したが、残りの2つは検出しなかった。一方、2C2 系は反応が強く、100倍希釈したワクチン抗原全てを検出した。最もタイトーの低い NIBRG-23 の OD 値から類推すると、 10^4 TCID₅₀ 程度がこの系の検出限界であると思われる。また、通常のインフルエンザワクチンに用いられる H1N1 (New Caledonia), H3N2 (Hiroshima), B 株 (Malaysia) や H5 以外の HA:H1-15 には全く反応しないことも確認した。

上述の系では Triton X100 を detergent として用いている。不活剤による検出感度の違いを野外株の培養上清で比較した。Kyoto 株 (1×10^4 TCID)、Ohita 株 (1×10^4 TCID)、Yokohama 株 (3.5×10^3 TCID) に NP40 あるいは Triton X100 を最終濃度 1% になるように加えた培養上清を2倍から2段階希釈して 2C2 系 ELISA で精製 NIBRG-14 ワクチンを対照として吸光度を測定した。これら野外株は日本で分離された株である。ウイルス不活剤としては Triton X100 の方がどのウイルス株に対しても優れていた。ここでは 10^3 TCID₅₀ が検出限界であったが、用いた培養上清中の TCID₅₀ 値と ELISA の値には相関がなかったこと

から、検体には感染性を失った粒子も数多く含まれていると思われる。

確立された ELISA システムはさらに改良を重ねる必要があるが、これらの系はワクチンの品質管理だけでなく、感染者の診断にも応用することが期待される。今後 ELISA 法によるワクチン有効成分である HA 蛋白含量測定を標準化するためにはウイルス由来の HA 蛋白と組換え HA 蛋白との比較も必要である。

4) アジュバント添加経鼻接種不活化インフルエンザワクチンの免疫原性評価によるワクチン力価試験法の開発

はじめに、 $0.1 \text{ ng/mL} \sim 1 \mu\text{g/mL}$ の濃度の LPS (E. coli K12) に対する反応性を調べた。この濃度の範囲にある LPS は THP-Blue-CD14 細胞に対して NF- κ B 活性を誘導する。また、PMA 処理によりマクロファージ化した場合、NF- κ B 活性は上昇した。その培養上清中には IL-1 β を検出した。次に $1 \mu\text{g/mL} \sim 100 \mu\text{g/mL}$ の濃度の single-strand RNA (ssRNA40 complexed with the cationic lipid LyoVec) に対する NF- κ B 活性誘導能を調べた。PMA 処理によりマクロファージ化した場合に限り NF- κ B 活性を検出し、その培養上清中に TNF- α を検出した。最後に $1 \mu\text{g/mL} \sim 100 \mu\text{g/mL}$ の濃度のインフルエンザ HA ワクチンおよび不活化型全粒子新型インフルエンザワクチンに対する NF- κ B 活性誘導能を調べた。PMA 処理によりマクロファージ化した THP-Blue-CD14 細胞に対して不活化型全粒子ワクチンは NF- κ B 活性と IL-1 β 産生を誘導できるが、インフルエンザ HA ワクチンは NF- κ B 活性もサイトカイン産生も誘導できなかった。

PMA 処理によりマクロファージ化した THP-Blue-CD14 細胞における不活性化全粒子ワクチンに対する NF- κ B 活性は、そのワクチンに由来する脂質成分と TLR との相互作用により誘導されたと

考えられる。IL-1 β 産生も同様な相互作用の結果誘導されたと考えられる。今後、これらの生体反応がワクチンの力価として免疫応答に繋がるのか検討し、免疫誘導能をワクチン力価として測定するシステムの開発を目指す。

D. 結論

- (1) アジュバント添加経鼻接種不活化インフルエンザワクチンの製剤化を試み、一定の安定した製剤とすることができた。
- (2) 経鼻接種ワクチンのアジュバントの安全性について経鼻連続投与及び頭蓋内直接投与の方法で粘膜アジュバント候補である合成二本鎖 RNA, poly(I:C)を調べ、コントロールのPBSと同等の毒性であることがわかった。
- (3) H5 亜型 HA 特異的なモノクローナル抗体を組み合わせてクレード特異的な H5HA あるいは全てのクレード H5HA を定量検出するサンドイッチ ELISA システムを確立し、これらの抗体は経鼻接種ワクチンの品質管理に有用であることがわかった。
- (4) 不活化型全粒子ワクチンの脂質成分または核酸成分に反応性の TLRs シグナル強度を NF- κ B レポーターアッセイとそれの伴うサイトカイン産生を調べることにより、不活化全粒子インフルエンザワクチンの免疫原性を測定できる可能性を明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Hasegawa H*, Ichinohe T, Tamura S, Kurata T
Development of a mucosal vaccine for influenza viruses: preparation for a potential influenza pandemic. *Expert Review of Vaccines*, April 2007,

Vol. 6, No. 2, Pages 193-201.

- 2) Ichinohe T, Nagata N, Strong P, Tamura SI, Takahashi H, Ninomiya A, Imai M, Odagiri T, Tashiro M, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H*. Prophylactic effects of chitin microparticles (CMP) on highly pathogenic H5N1 influenza virus. *J Med Virol.* 2007 Jun;79(6):811-819
- 3) Ichinohe T, Kawaguchi A, Tamura S, Ninomiya A, Imai M, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Chiba J, Sata T, Kurata T and Hasegawa H* Intranasal immunization with H5N1 vaccine plus Poly I:Poly C12U, a Toll-like receptor agonist, protects mice against homologous and heterologous virus challenge. *Microbes and Infection* 2007 Sep;9(11):1333-40.
- 4) Tsunetsugu-Yokota, Y., Ishige, M., Murakami, M.: Attenuated *Salmonella* Typhimurium expressing codon-optimized HIV-1 Gag potentiated Gag-specific CD8⁺ T cell-response in intestinal mucosa. *Aids Res. Hum. Retro.* 23:278-286, 2007
- 5) Tsunetsugu-Yokota, Y., Ato, M., Takahashi, Y., Hashimoto, S-I., Kaji, T., Kuraoka, M., Yamamoto, K-I., Mitsuki, Y-Y., Yamamoto, T., Ohshima, M., Ohnishi, K., Takemori, T. Formalin-treated UV-inactivated SARS coronavirus vaccine retains its immunogenicity and promotes Th2-type immune responses. *Jap. J. Infect. Dis.*, 60:106-112, 2007
- 6) Nitahara-Kasahara, Y., Kamata, M., Zhang, X., Muneta, K., Miyamoto, Y., Yamamoto, T., Iijima, S., Yoneda, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y., Aida, Y. A novel nuclear import of Vpr promoted by importin α is crucial for HIV-1 replication in macrophage. *J. Virol.* 81:5284-5293, 2007
- 7) Takayanagi, R., Ohashi, T., Yamashita, E.,

Kurosaki, Y., Tanaka, K., Hakata, Y., Komoda, Y., Ikeda, S., Tsunetsugu-Yokota, Y., Tanaka, Y., H. Shida. Enhanced replication of human T-cell leukemia virus type 1 in T cells from transgenic rats expressing human CRM1 that is regulated in a natural manner. *J Virol.*, 81:5908-5918, 2007

8) Takuya, Y and Tsunetsugu-Yokota, Y. Prospects for the therapeutic application of lentivirus-mediated gene therapy to HIV-1 infection. *Curr. Gene Therapy*, in press, 2008

9) 寺原和孝 横田(恒次)恭子: 粘膜ワクチンの研究開発、ワクチンの展望4、ワクチン感染症のコントロールに向けて、治療学4: 67-70, 2007

学会発表

1) Kawaguchi A, Orba Y, Sawa H, Sata T, Hall WW, Hasegawa H, Adult T cell leukemia/lymphoma(ATLL): Exploitation of transgenic mouse model to understand disease pathogenesis and for the development of rational therapeutics. 13th International Conference on Human Retrovirology 21th-25h May 2008 Hakone

2) 長谷川秀樹、一戸猛志、田村慎一、板村繁之、小田切孝人、田代真人、佐多徹太郎、倉田毅 2005/2006 シーズナルインフルエンザワクチンの経鼻接種による高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)感染の交叉防御効果の検討 第11回日本ワクチン学会学術集会(2007年11月横浜)

3) Tsunetsugu-Yokota, Y. and Yamamoto, T. Immune control of HIV-1 by restoring HIV-specific CD4+ T-cell function: a vaccine strategy against chronic HIV/SIV infection. The 8th Seminar in Kumamoto, Kumamoto, September, 2007

4) 光木裕也、山本拓也、水越文徳、山岡昇司、山本直樹、横田(恒次)恭子: マクロファージにおける

Nef 蛋白質発現に伴う自然免疫機構異常に関する解析。第55回ウイルス学会、札幌、平成19年10月。

5) 光木裕也、山本拓也、水越文徳、寺原和孝、稲垣好雄、山岡昇司、山本直樹、横田(恒次)恭子: EGFPとDsRedを発現するX4型及びR5型HIV-1の作製とその応用。第55回ウイルス学会、札幌、平成19年10月。

6) 石井孝司、横田恭子、長谷川秀樹、永田典代、森川茂、福士秀悦、水谷哲也、鈴木哲郎、田代真人、田口文広: 高度弱毒化ワクチニアウイルス株DIsの組換えSARSワクチンとしての検討。第55回ウイルス学会、札幌、平成19年10月。

7) 山本拓也、光木裕也、水越文徳、小林和夫、井上純一郎、横田(恒次)恭子: HIV特異的な免疫担当細胞にHIV抵抗性を賦与しうるRNAi誘導型エイズワクチンの開発。第55回ウイルス学会、札幌、平成19年10月。

8) Yamamoto, T., Tachikawa-Kawana, A., Iwamoto, A., Kobayashi, K., Inoue, J-I, Autran, B., and Yokota-Tsunetsugu, Y.: Development of a novel IFN-gamma detection system of virus-specific T cell activation by flow cytometry. 第37回免疫学会、東京、平成19年11月。

9) Konno, H., Yamamoto, T., Yamazaki, K., Qin J., Ghoda, J., Akiyama, T., Yokota-Tsunetsugu, Y., Inoue, J-I.: ウイルス感染時のインターフェロン及び炎症性サイトカイン産生に対するTRAF6の役割。第37回免疫学会、東京、平成19年11月。

10) 横田(恒次)恭子、山本拓也、Brigitte Autran: HIV慢性感染期におけるHIV特異的CD4陽性T細胞の機能障害—ワクチン開発に向けての考察。第21回日本エイズ学会、広島、平成19年11月。

11) 水越文徳、山本拓也、立川(川名)愛、岩本愛吉、森川裕子、横田(恒次)恭子: 抗原の糖鎖による樹状細胞のcross-presentationの影響。第21回日本エイ

ズ学会、広島、平成19年11月。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし

合成二本鎖 RNA 粘膜アジュバントの安全性試験に関する研究

分担研究者：長谷川 秀樹（国立感染症研究所感染病理部）

研究要旨：感染防止を目的としたインフルエンザワクチンの開発には従来の投与経路では限界があり新しい接種経路でのワクチン接種が必要である。実用化に最も近いワクチンとしてアジュバント併用経鼻ワクチンが開発されているが実際にヒトに使用できるようにするには安全性及び品質管理に関する研究が必須である。経鼻粘膜ワクチンとしての合成二本鎖 RNA アジュバントの安全性評価の為、経鼻反復投与及び鼻腔に接する脳内への直接投与での安全性を体重減少及び病理学的に解析を行った。

A. 研究目的

本研究では、感染防止を目指したアジュバント併用粘膜投与型経鼻インフルエンザワクチンの開発にあたり安全性が高く高品質のワクチンを製造するために必要な基礎的検討のため、ワクチンの新規接種ルートとしての経鼻経路での接種に対する安全性を調べる事を目的とする。そのために、ワクチン投与による生体反応を実験動物で病理学的に解析しその評価法の開発を目的とする。

B. 研究方法

粘膜アジュバント

経鼻投与の粘膜アジュバントとして実験的に用いられてきた僅かな holotoxin を含む cholera toxin B

subunits (CTB*) は CTB (Sigma, St. Louis, MO) に 0.1% の cholera toxin (CT) (Sigma, St. Louis, MO) を加えて作製した。

合成二本鎖 RNA, poly (I:C) は東レ株式会社 (Kamakura, Kanagawa, Japan) より分与された。

poly (I:C)、CTB* の頭蓋内接種

7 週齢のメス、BALB/c マウスに poly(I:C) 及び CTB* を様々な濃度 [0.25, 2.5, or 25 µg for poly (I:C) and 2.5, 10, or 25 µg for CTB*] を PBS 25 µl に溶解しエーテル麻酔下に二段針を用いて頭蓋内接種を行った。

poly (I:C)、CTB* の鼻腔内接種

7 週齢のメス、BALB/c マウスに poly(I:C) 及び CTB* を濃度 10 µg PBS

に溶解しエーテル麻酔下連続9日間鼻腔内接種を行った。

病理学的検索

解剖で得られたマウスの脳、鼻部の検体をいずれも10%ホルマリン緩衝液による固定後、常法どおりパラフィン包埋切片を作製した。脱パラフィン後、一部はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を実施した。

C. 研究結果

合成二本鎖 RNA, poly(I:C) アジュバントの安全性

合成二本鎖 RNA アジュバントである poly(I:C) の経鼻ルートでの投与時の安全性を調べる為に、過剰量の poly(I:C) と実験的に使われて来た細菌性毒素由来のアジュバントである CTB* を経鼻で連続9日間投与した。それぞれのアジュバントを経鼻連続投与したマウスの経時的体重変化を測定し、また投与終了後、安楽死させた後解剖を行い鼻腔領域の組織を採取し病理学的に解析を行った。結果を図1に示す。10 μ g の poly(I:C) を9日間連続投与したマウスにおいてはコントロール群である PBS 投与群と比較して体重減少は認められなかった。一方細菌由来の毒素系アジュバントである CTB* を9日間連続投与した群ではコントロール群と比較して体重減少が認められた。解剖時の病理写真を図1B~Dに示す。Poly(I:C) 連続投与群では PBS 投与群と同様に病理学

的变化は認められなかった。一方 CTB* 連続投与群では鼻腔内に炎症細胞を伴った粘液の滲出が認められた (図1C)。

鼻腔領域は解剖学的に脳と嗅神経を介して接している為、経鼻粘膜アジュバントの神経毒力を調べる目的で poly(I:C) 及び CTB* を頭蓋内接種した時の体重変化及び生存、病理組織を調べた。1群5匹のマウスを用い CTB* を 2.5 μ g, 10 μ g, 25 μ g 投与 poly(I:C) を 0.25 μ g, 2.5 μ g, 25 μ g、二段針を用いて頭蓋内に直接投与した。コントロールとして PBS 投与群をそれぞれおいた。CTB* 10 μ g 及び 25 μ g 投与群のマウスは投与3日目までに15%の体重減少を示し10 μ g 投与群の1匹及び25 μ g 投与群のマウス2匹が頭蓋内投与から4日目で死亡した。一方 0.25 to 25 μ g の poly(I:C) を頭蓋内投与した群においてはいずれも7日間体重減少がみられず生存した。脳の組織を病理組織学的に解析した結果、CTB* を 10 μ g 頭蓋内投与したマウスでは脳出血が認められた。(図2C) ところが、poly(I:C) を頭蓋内投与した群においては PBS 投与群と同様にいずれの量を投与した群においても病理学的な変化は認められ無かった。(図2B,D)

これらから粘膜アジュバントとしての poly(I:C) は経鼻的にも神経毒力の観点からも害の無いものであると考えられる。

D. 考察

ワクチン等の予防医薬は十分に安全性が確保されたものでなくてはならない。ワクチンの経鼻接種法は現行の皮下接種ワクチンに代わり粘膜感染ウイルスの防御にはその感染防御能力が高く実用化が待たれるが、経鼻接種特有の安全性を調べる必要がある。本研究において経鼻粘膜アジュバントの候補である poly(I:C)の安全性について調べた。鼻腔は嗅神経を介して脳と接している為、鼻腔周辺組織に対する影響を鼻連続投与でまた神経毒力を頭蓋内投与した時の病理学的変化で調べた。いずれの投与方法においても実験的にもちいられてきた粘膜アジュバントである CTB*と比較し poly(I:C)は局所及び脳組織において安全性が高い事が示された。

E. 結論

経鼻接種ワクチンのアジュバントの安全性について経鼻連続投与及び頭蓋内直接投与の方法で粘膜アジュバント候補である合成二本鎖 RNA, poly(I:C)の安全性を調べた。その安全性においてコントロールの PBS と同等であった。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. Hasegawa H*, Ichinohe T, Tamura S, Kurata T Development of a mucosal vaccine for influenza viruses: preparation for a

potential influenza pandemic. Expert Review of Vaccines, April 2007, Vol. 6, No. 2, Pages 193-201.

2. Ichinohe T, Nagata N, Strong P, Tamura SI, Takahashi H, Ninomiya A, Imai M, Odagiri T, Tashiro M, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H*. Prophylactic effects of chitin microparticles (CMP) on highly pathogenic H5N1 influenza virus. J Med Virol. 2007 Jun;79(6):811-819
3. Ichinohe T, Kawaguchi A, Tamura S, Ninomiya A, Imai M, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Chiba J, Sata T, Kurata T and Hasegawa H*. Intranasal immunization with H5N1 vaccine plus Poly I:Poly C12U, a Toll-like receptor agonist, protects mice against homologous and heterologous virus challenge. Microbes and Infection 2007 Sep;9(11):1333-40.

学会発表

1. Kawaguchi A, Orba Y, Sawa H, Sata T, Hall WW, Hasegawa H, Adult T cell leukemia/lymphoma(ATLL): Exploitation of transgenic mouse model to understand disease pathogenesis and for the development of rational therapeutics. 13th International Conference on Human Retrovirology 21th-25th May 2008 Hakone
2. 長谷川秀樹、一戸猛志、田村慎一、板村繁之、小田切孝人、田代真人、佐多徹太郎、倉田毅 2005/2006 シーズナルインフルエンザワクチンの経鼻接種による高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) 感染の交叉防御効果の検討 第

11 回日本ワクチン学会学術集会(2007
年 11 月横浜)

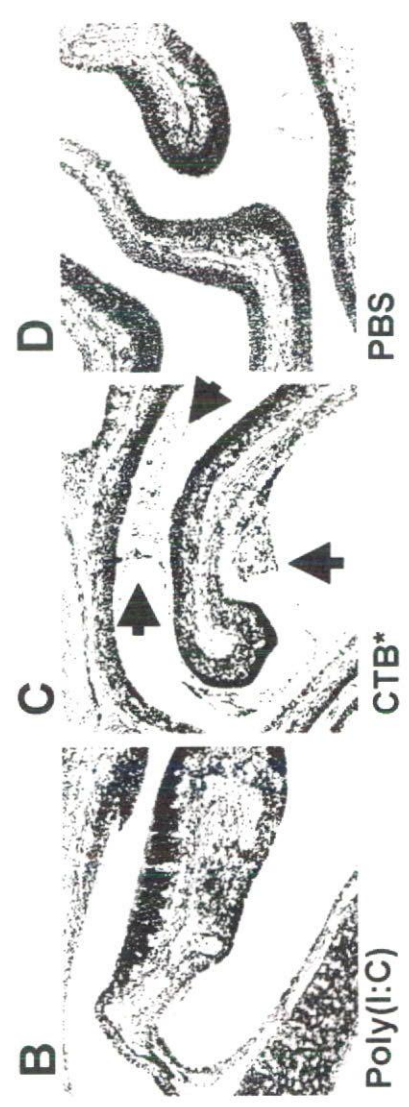
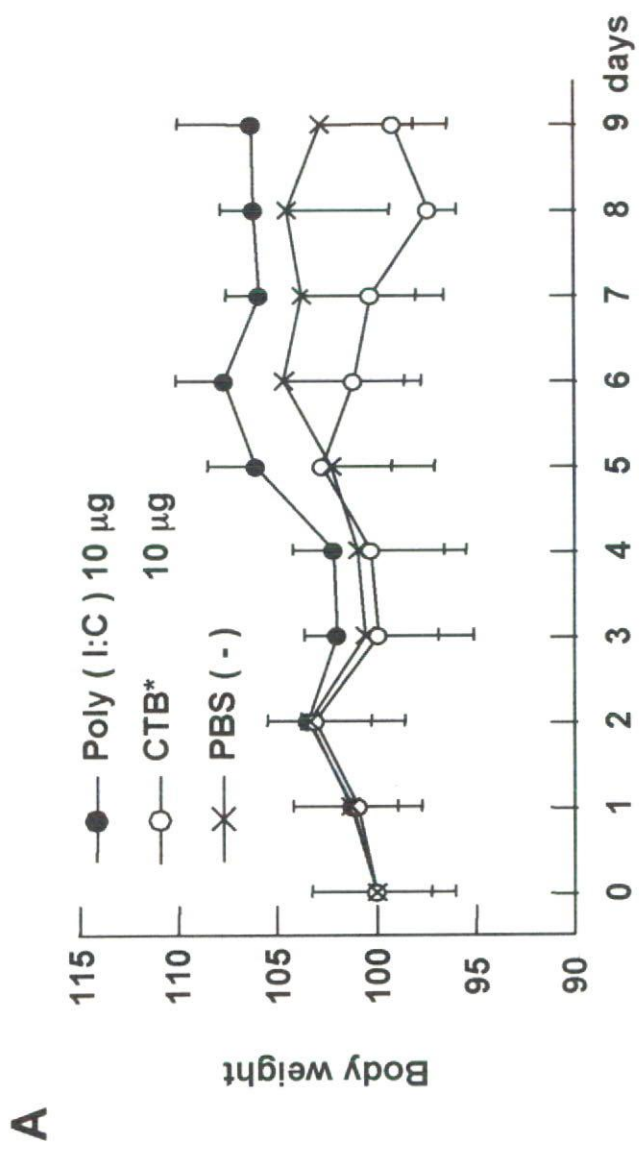
H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得（出願）

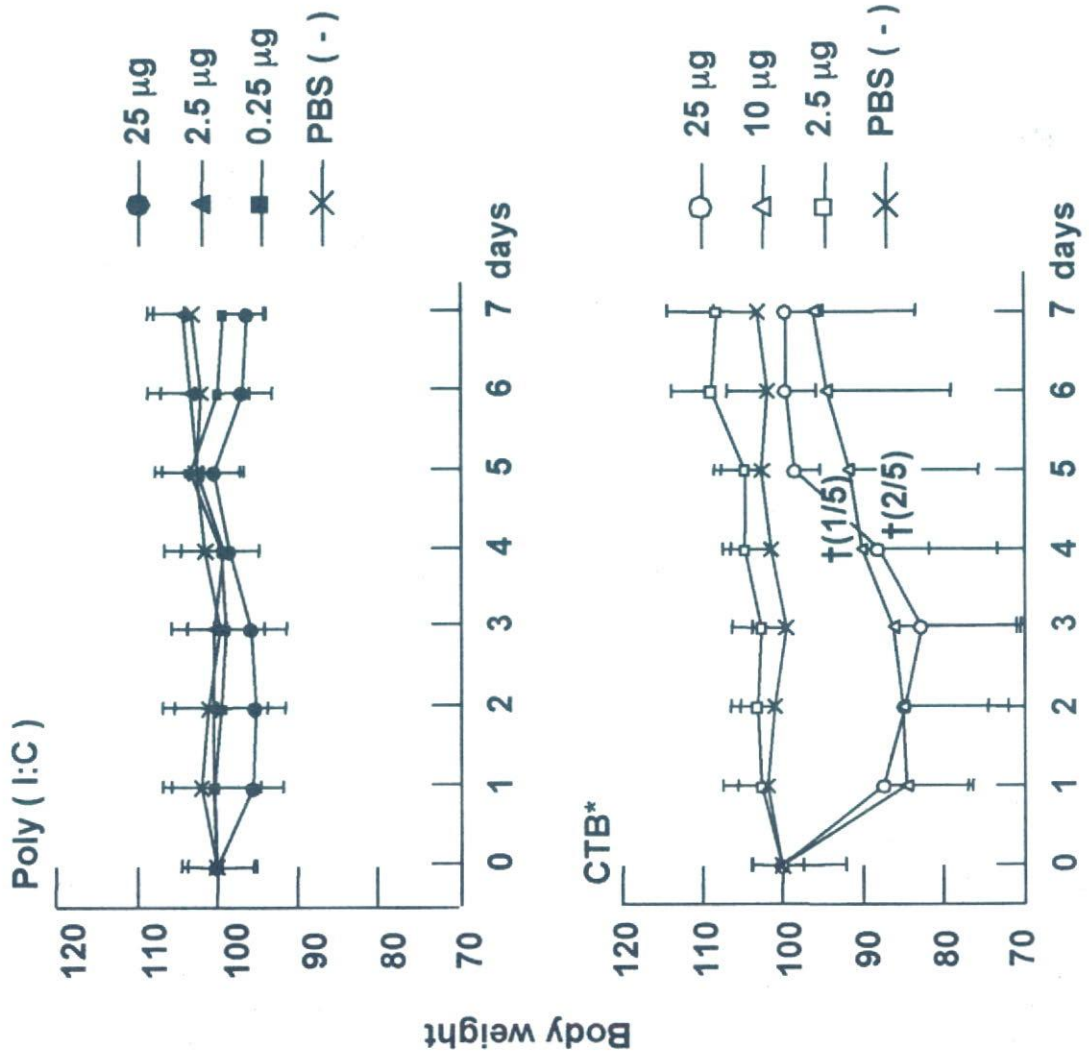
なし

2. 実用新案登録

なし



2
A



粘膜投与等の新投与経路ワクチン研究における品質管理に関する研究

粘膜ワクチンの品質管理に必要な免疫学的試験法の開発

分担研究者 横田 恭子 国立感染症研究所・免疫部・第一室長

研究要旨 H5N1 ワクチン株(NIBRG-14)のHAに反応するモノクローナル抗体を作製し、それらを組み合わせてClade 1 H5 のみ(1A1 系)及びClade 2.1 も同時に検出できる(2C2 系)サンドイッチエライザ測定系を確立した。また、H5 以外のH1-H15 までのHAに対する交叉反応は認められなかったことから、ワクチン中のH5HA 抗原を特異的に検出・定量することが可能となった。

A. 研究目的

粘膜に投与する新型インフルエンザワクチンの品質管理に有用な免疫学的試験法を確立する。

B. 材料と方法

1. 免疫とハイブリドーマの作製

H1N1 型ワクチン PR8 あるいは H5N1 型ワクチン NIBRG-14 (N. Vietnam/1194/2004) を発育鶏卵で増幅した後、ショ糖密度勾配遠心法で精製した。NIBRG-14 ワクチンを UV あるいは 0.05%ホルマリン不活化して 6 週齢の BALB/c マウスに皮下接種し、最終免疫 3 日後のマウスの脾臓細胞を採取した。

マウスの脾臓細胞は Sp2/0-Ag14 ミエローマ細胞と定法どおりポリエチレングリコールで細胞融合させハイブリドーマを作製した。培養上清中の抗体活性測定のため、ウイルス抗原あるいは HA 蛋白に最終濃度 0.5%の Triton-X100 を加え、一晚エライザプレートにコートした。1%BSA/PBS で室温 1 時間ブロッキングした後、ハイブリドーマの培養上清を加え、HRP 標識抗マウス IgG 抗体で検出した。抗 HA 抗体を産生するハイブリドーマの培養上清より抗体を Protein A で精製した。

2. 抗原検出エライザ

1 次抗体として 1A1 (IgG2a) あるいは 2C2 (IgG1) を PBS で 1 μ g/ml の濃度にしてエライザプレートに一晚コートした。翌日 1%BSA/PBS-0.05%Tween で室温 1 時間ブロッキングした後、洗浄してワクチンあるいは抗原を段階希釈して加え、室温で 2 時間反応させ、ついでビオチン化した 2 次抗体 (OM-b) を 1 μ g/ml の濃度で加えて室温 1 時間反応させた。HRP 標識 Streptoavidin (1:2000) を加えて洗浄後に TMB (+) 基質を加え、エライザリ

ーダーの OD₄₅₀ で検出した。

C. 研究結果

2C2 抗体は conformational epitope を認識すると認められ、免疫に用いた Clade 1: NIBRG-14 だけでなく Clade 2.1: Indo05/PR8-RG2 の H5HA にも強く反応する。OM-b 抗体も両者に反応する。一方、1A1 抗体は NIBRG-14 株 HA に特異的である。これらを組み合わせてサンドイッチエライザ法を確立した。まずこのエライザ法の特異性を検討するため、Clade の異なる H5N1 精製ウイルス抗原ワクチンに対する反応を 2 つの系で測定した (表 1)。1A1 系で 10 倍希釈したワクチン抗原を用いた場合、Clade 1: NIBRG-14 と Clade 2.2: NIBRG-23 を検出したが、残りの 2 つは検出しなかった。一方、2C2 系は反応が強く、100 倍希釈したワクチン抗原全てを検出した。最もタイトルの低い NIBRG-23 の OD 値から類推すると、10⁴ TCID₅₀ 程度がこの系の検出限界であると思われる。また、通常のインフルエンザワクチンに用いられる H1N1 (New Caledonia), H3N2 (Hiroshima), B 株 (Malaysia) や H5 以外の HA: H1-15 には全く反応しないことも確認した。

上述の系では Triton X100 を detergent として用いている。不活剤による検出感度の違いを野外株の培養上清で比較したのが図 2 である。Kyoto 株 (1 \times 10⁴ TCID)、Ohita 株 (1 \times 10⁴ TCID)、Yokohama 株 (3.5 \times 10³ TCID) に NP40 あるいは Triton X100 を最終濃度 1% になるように加えた培養上清を 2 倍から 2 段階希釈して 2C2 系エライザで精製 NIBRG-14 ワクチンを対照として吸光度を測定した。これら野外株は日本で分離された株で感染研・バイオセーフティー管理室・高木弘隆先生より培養上清の供与を受けた。ウ

ウイルス不活剤としては Triton X100 の方がどのウイルス株に対しても優れていた。ここでは 10^3 TCID₅₀ が検出限界であったが、用いた培養上清中の TCID 値とエライザの値には相関がなかった(データ省略)ことから、検体には感染性を失った粒子も数多く含まれていると思われる。

D. 考察

確立されたエライザシステムはさらに改良を重ねる必要があるが、これらの系はワクチンの品質管理だけでなく、感染者の診断にも応用できるであろう。今後エライザ測定を標準化するためには NIBRG-14 の濃度と rec HA の濃度の対比も必要である。

E. 結論

我々は H5 型 HA 特異的なモノクローナル抗体を組み合わせてクレード特異的な H5HA あるいは全てのクレード H5HA を検出するサンドイッチエライザシステムを確立した。これらの抗体は新型インフルエンザワクチンの品質管理に有用であると思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tsunetsugu-Yokota, Y., Ishige, M., Murakami, M.: Attenuated *Salmonella* Typhimurium expressing codon-optimized HIV-1 Gag potentiated Gag-specific CD8+ T cell-response in intestinal mucosa. *Aids Res. Hum. Retro.* 23:278-286, 2007
- 2) Tsunetsugu-Yokota, Y., Ato, M., Takahashi, Y., Hashimoto, S-I., Kaji, T., Kuraoka, M., Yamamoto, K-I., Mitsuki, Y-Y., Yamamoto, T., Ohshima, M., Ohnishi, K., Takemori, T. Formalin-treated UV-inactivated SARS coronavirus vaccine retains its immunogenicity and promotes Th2-type immune responses. *Jap. J. Infect. Dis.*, 60:106-112, 2007
- 3) Nitahara-Kasahara, Y., Kamata, M., Zhang, X., Muneta, K., Miyamoto, Y., Yamamoto, T., Iijima, S., Yoneda, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y., Aida, Y. A novel nuclear import of Vpr promoted by importin α is crucial for HIV-1 replication in macrophage. *J. Virol.* 81:5284-5293, 2007
- 4) Takayanagi, R., Ohashi, T., Yamashita, E., Kurosaki, Y., Tanaka, K., Hakata, Y., Komoda, Y., Ikeda, S., Tsunetsugu-Yokota, Y., Tanaka, Y., H. Shida. Enhanced replication of human T-cell leukemia virus type 1 in T cells from transgenic rats expressing human CRM1 that is regulated in a natural manner. *J. Virol.*, 81:5908-5918, 2007
- 5) Takuya, Y and Tsunetsugu-Yokota, Y. Prospects for the therapeutic application of lentivirus-mediated gene therapy to HIV-1 infection. *Curr. Gene Therapy*, in press, 2008
- 6) 寺原和孝 横田(恒次) 恭子: 粘膜ワクチンの研究開発、ワクチンの展望4、ワクチン感染症のコントロールに向けて、*治療学* 4: 67-70, 2007

2. 学会発表

- 1) Tsunetsugu-Yokota, Y. and Yamamoto, T. Immune control of HIV-1 by restoring HIV-specific CD4+ T-cell function: a vaccine strategy against chronic HIV/SIV infection. The 8th Seminar in Kumamoto, Kumamoto, September, 2007
- 2) 光木裕也、山本拓也、水越文徳、山岡昇司、山本直樹、横田(恒次) 恭子: マクロファージにおける Nef 蛋白質発現に伴う自然免疫機構異常に関する解析。第55回ウイルス学会、札幌、平成19年10月。
- 3) 光木裕也、山本拓也、水越文徳、寺原和孝、稲垣好雄、山岡昇司、山本直樹、横田(恒次) 恭子: EGFP と DsRed を発現する X4 型及び R5 型 HIV-1 の作製とその応用。第55回ウイルス学会、札幌、平成19年10月。
- 4) 石井孝司、横田恭子、長谷川秀樹、永田典代、森川茂、福土秀悦、水谷哲也、鈴木哲郎、田代真人、田口文広: 高度弱毒化ワクチニアウイルス株 DIs の組換え SARS ワクチンとしての検討。第55回ウイルス学会、札幌、平成19年10月。
- 5) 山本拓也、光木裕也、水越文徳、小林和夫、井上純一郎、横田(恒次) 恭子: HIV 特異的な免疫担当細胞に HIV 抵抗性を賦与する RNAi 誘導型エイズワクチンの開発。第55回ウイルス学会、札幌、平成19年10月。
- 6) Yamamoto, T., Tachikawa-Kawana, A., Iwamoto, A., Kobayashi, K., Inoue, J-I, Autran, B., and Yokota-Tsunetsugu, Y.: Development of a novel IFN-gamma detection system of virus-specific T cell activation by flow cytometry. 第37回免疫学会、東京、平成19年11月。
- 7) Konno, H., Yamamoto, T., Yamazaki, K., Qin J., Ghoda, J., Akiyama, T., Yokota-Tsunetsugu, Y., Inoue, J-I.: ウイルス感染時のインターフェロン及び炎症性サイトカイン産生に対する TRAF6 の役割。第37回免疫学会、東京、平成19年11月。

- 8) 横田(恒次)恭子、山本拓也、Brigitter Autran: HIV 慢性感染期における HIV 特異的 CD4 陽性 T 細胞の機能障害—ワクチン開発に向けての考察。第 21 回日本エイズ学会、広島、平成 19 年 11 月。
- 9) 水越文徳、山本拓也、立川(川名)愛、岩本愛吉、森川裕子、横田(恒次)恭子: 抗原の糖鎖

による樹状細胞の cross-presentation の影響。第 21 回日本エイズ学会、広島、平成 19 年 11 月。

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表 1

Sample No.	Virus Strain	Clade	TCID50*	(1:10 dilution)	(1:100 dilution)
				1A1 系	2C2 系
1	A/Vietnam/1194/2004 (NIBRG-14)	1	7	1.795/1.642	0.551/0.923
2	A/Indonesia/5/2005 (PR8-IBCDC-RG2)	2.1	7.4	0.110/0.115	0.426/0.773
3	A/turkey/Turkey/1/2005 (NIBRG-23)	2.2	5.9	0.798/1.806	0.228/0.266
4	A/Anhui/01/2005 (PR8-IBCDC-RG5)	2.3	8.3	0.107/0.308	0.992/1.109

OD₄₅₀

*Log10 (TCID50/50uL)

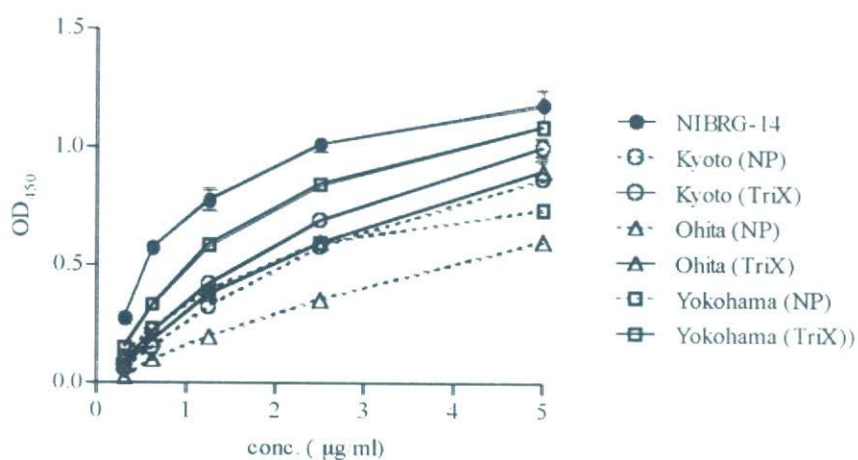


図1 野外株 H5N1 のエライザによる検出感度

日本で採取された H5N1 培養上清に NP40 (NP)あるいは Triton X100 (TriX)を加えてウイルスを不活化し、2C2 系エライザで測定した。横軸の濃度は標準となる精製 NIBRG-14 ワクチン株 (●) の濃度を示す。

粘膜投与等の新投与経路ワクチン研究における品質管理に関する研究

分担研究者 笠井道之 国立感染症研究者 主任研究官

研究要旨

新型インフルエンザ経鼻投与型ワクチンの主体である不活化全粒子型新型インフルエンザワクチンの脂質・核酸成分に由来する免疫原性をNF- κ Bに対するレポーター遺伝子を組み込んだ人由来モノサイト（THP細胞）株を用いて調べた。

A. 研究目的

新型インフルエンザ経鼻投与型ワクチンは、不活化型全粒子型新型インフルエンザワクチンにアジュバントとしてTLRアゴニスト（合成二重鎖RNA）を加え、抗原提示細胞の抗原提示能力とタイプI型インターフェロン産生能力を高めた製剤である。従って、これまで以上に精緻な免疫原性に関する有効性・安全性の評価およびその管理が求められる。そのためには主体となる不活化型全粒子型新型インフルエンザワクチンとTLRアゴニストの免疫原性がそれぞれ独立に評価される必要がある。しかしながら、不活化型全粒子型新型インフルエンザワクチンの免疫原性の評価は現在のところインフルエンザHAワクチンの場合と同様に一次放射免疫拡散法によるHA抗原量の評価のみであり、脂質及び核酸に由来する免疫原性の評価は未だ不十分である。そこで、不活化型全粒子型インフルエンザワクチンの、脂質及び核酸に由来する免疫原性を評価し、TLRアゴニスト投与量を管理することを目的として、転写因子（NF- κ B）活性化に反応するレポーター遺伝子を組み込んだ人由来モノサイト（THP細胞）細胞株を用い

て不活化型全粒子型新型インフルエンザワクチンの、脂質及び核酸に由来する免疫原性をインフルエンザHAワクチンのそれと比較しながら評価した。

B. 研究方法

転写因子（NF- κ B）に対するレポーター遺伝子を組み込んだ人由来モノサイト（THP-Blue-CD14）は invitrogen より購入し、manufacture's protocol に従い培養した。この細胞はTLR 2, 4, 6, 7, 8, 9 とCD14 を強く発現する。PMAによりマクロファージ様細胞へと分化し、TLRに対する感受性が高まる。NF- κ B 因子活性化に対するレポーター遺伝子は secreted embryonic alkaline phosphatase (SEAP) をコードする遺伝子を組み込んである。NF- κ B 因子に活性化に伴い培養上清中に分泌されるSEAP活性を測定しNF- κ B 因子に活性化の度合いを調べた。同時にその培養上清中に分泌されるIFN- α , β , γ およびTNF- α の量をELISAにて測定した。

（倫理面への配慮）

特になし。