

2008/000/A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

新興・再興感染症に対するヒトM細胞標的型粘膜ワクチン開発

平成20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 清野 宏

平成21(2009)年3月

—目次—

I. 構成員名簿	1
II. 総括研究報告書	
新興・再興感染症に対するヒト M 細胞標的型粘膜ワクチン開発 東京大学医科学研究所 感染・免疫部門 炎症免疫学分野 清野宏	3
III. 分担研究者報告書	
i) ヒト M 細胞標的型粘膜ワクチン開発 東京大学医科学研究所 清野宏	5
ii) カニクイザルを用いたコレラ毒素粘膜ワクチンの安全性および有効性評価 (独) 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター 寺尾 恵治	9
iii) インフルエンザワクチンの免疫原性に関する研究 (財) 阪大微生物病研究会観音寺研究所 奥野良信	13
iv) B 細胞亜集団の文化・活性化機構の研究 (独) 医薬基盤研究所 免疫応答制御プロジェクト 紅露 拓	17
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	21
V. 研究成果の刊行物・別冊 (主なもの)	25

I. 構成員名簿

平成 20 年度 創薬基盤推進研究事業

新興・再興感染症に対するヒト M 細胞標的型粘膜ワクチン開発

構成員名簿

	氏名	職名	所属	所属施設の所在地
主任	清野 宏	教授	東京大学医科学研究所 感染・免疫部門炎症免疫学分野	〒108-8639 東京都港区白金台 4-6-1
分担	寺尾 恵治	特別 研究員	(独) 医薬基盤研究所 壺長類医科学研究センター	〒305-0843 茨城県つくば市八幡台 1-1
分担	奥野 良信	所長	(財) 阪大微生物病研究会 観音寺研究所	〒768-0061 香川県観音寺八幡町 2-9-41
分担	紅露 拓	プロジェクト リーダー	(独) 医薬基盤推進研究所 基礎的研究部 免疫応答制御 プロジェクト	〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ 7-6-8

Ⅱ. 総括研究報告書

研究課題：新興・再興感染症に対するヒトM細胞標的型粘膜ワクチン開発

ヒトM細胞標的型粘膜ワクチン開発

主任研究者：清野 宏（東京大学医科学研究所 教授）

分担研究者：寺尾恵治（医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター 特別研究員）

分担研究者：紅露 拓（医薬基盤研究所 基礎的研究部 免疫応答制御 プロジェクトリーダー）

分担研究者：奥野良信（阪大微生物病研究会 観音寺研究所 所長）

研究目的：

粘膜ワクチンが粘膜感染症の予防ワクチンとして最適であると謳われているが、粘膜ワクチンのヒトでの実用化に向けた基盤技術は未だ確立されておらず、中でも粘膜ワクチンのM細胞への効果的な標的送達システムの技術開発は、粘膜ワクチンの具現化に必要な不可欠とされている。これまで、マウスM細胞のマーカーとして、レクチンの一つであるUEA-1が汎用され、UEA-1をデリバリー分子としたM細胞標的型粘膜ワクチン開発に関する報告が多数発表されたが、UEA-1は実際にはM細胞のみならず杯細胞にも特異性を有しており、ワクチン抗原のM細胞への送達効果はそれほど高くはない。我々は、この現状を打破すべく、世界に先駆けてM細胞特異的モノクローナル抗体（NKM 16-2-4）を樹立し、それをデリバリー分子としたM細胞標的型粘膜ワクチンを開発することで、UEA-1をデリバリー分子とした場合よりも効果の優れた粘膜ワクチン開発に最近成功した（*J. Exp. Med.*, 204: 2789-2796, 2007）。一方で、NKM 16-2-4はUEA-1同様、ヒトM細胞に対する特異性が低く、また国内外問わず、これまでヒトM細胞特異的モノクローナル抗体に関する報告は皆無である。つまり、ヒトM細胞特異的モノクローナル抗体を樹立し、それをキャリアー分子としてワクチン抗原を効果的にヒトM細胞への標的投与することは、粘膜ワクチンを具現化する上で非常に重要といえる。本課題はヒトに応用可能なM細胞標的型粘膜ワクチン開発をすすめていくことを目的とする。

方法：

ヒトに応用可能なM細胞標的型粘膜ワクチン開発するために、東大医科研清野班では霊長類（カニクイザル）のバイエル板およびヒトの扁桃を実験材料とし、カニクイザルとヒトのM細胞に反応性を有するモノクローナル抗体の作製を並列的に進め、特異性を詳細に検討していく。基盤研寺尾及び紅露班ではカニクイザルを用いたM細胞標的型粘膜ワクチンの免疫学的評価と同時に、粘膜免疫に重要なヒト・サルのB細胞の解析に必要なB細胞亜集団の分析マーカー確立のための基礎的研究を行う。また阪大微研奥野班ではM細胞標的ワクチンに用いるインフルエンザウイルス抗原を新規開発中のMDCK細胞由来ワクチンと従来の発育鶏卵由来ワクチンの抗原性の比較研究を実施する。三者綿密なる連帯のもとに、M細胞標的型粘膜ワクチン開発を目指す。

結果：

- (1) 霊長類（カニクイザル）のバイエル板およびヒトの扁桃を実験材料とし、カニクイザルとヒトのM細胞に反応性を有するモノクローナル抗体の作製を並列的に進め、5種類のモノクローナル抗体の樹立に成功した。
- (2) 東大医科研(清野班)で開発された経口ワクチンである CTB 発現米をカニクイザルに投与することで CTB と同程度の免疫原性を示すとともに安全性の高い優れた次世代型経口粘膜ワクチンであることが実証した。
- (3) 普遍的なB-1, B-2細胞マーカーを確立するため、マウスを用いてB-1およびB-2の前駆細胞の同定を試み、成獣では共通リンパ球前駆細胞とされるLin⁻ IL-7R α ⁺細胞が胎児においてもB-1細胞に分化決定していることがわかった。
- (4) M細胞標的型粘膜ワクチンの抗原として季節性インフルエンザウイルス抗原を用いる場合には、MDCK細胞及び発育鶏卵を基質としたインフルエンザワクチンのいずれを用いても同等の結果が得られることを実証した。

考察：

本研究を通して、医薬基盤研究所と（財）阪大微生物研究会と連携し、ヒトM細胞標的型粘膜ワクチンの効果を、カニクイザルを用いた霊長類レベルで評価を行うことで、ヒトでの応用実用化を見据えたトランスレーショナルリサーチを実施することが可能であることが示された。

結論：

本計画を推進する4研究者による研究はヒトに応用可能なM細胞標的型粘膜ワクチンの開発と評価に向けて、順調な滑り出しをした。

Ⅲ.分担研究報告書

研究課題：新興・再興感染症に対するヒトM細胞標的型粘膜ワクチン開発

ヒトM細胞標的型粘膜ワクチン開発

研究者氏名：清野 宏
東京大学医科学研究所 教授

研究要旨

粘膜感染症に対する効果的な予防ワクチンを注射型ワクチンとしてではなく「粘膜ワクチン」としてヒトで開発するために、マウスで得られた理論的背景を基盤とした、ヒトM細胞へのワクチン抗原の送達技術を開発することは非常に重要である。本研究では、研究初年度（平成20年度）に霊長類（カニクイザル）のバイエル板およびヒトの扁桃を実験材料とし、カニクイザルとヒトのM細胞に反応性を有するモノクローナル抗体の作製を並列的に進め、5種類のモノクローナル抗体の樹立に成功した。現在も、ヒト及びサルM細胞特異的モノクローナル抗体の作製を目的とした研究を継続中であり、より特異性の高い抗体の樹立を目標とした集約的研究を進めている。今後、これから樹立するモノクローナル抗体を加えた全ての抗体の特異性ならびに反応性を総合的に評価し、M細胞標的粘膜ワクチンの効果を、カニクイザルを用いた霊長類レベルでの評価を行う。

A. 研究目的

我々は、最近、マウスM細胞に特異的なモノクローナル抗体（NKM 16-2-4）の作製に成功し、本抗体をデリバリー分子としたM細胞標的型粘膜ワクチンを開発することで、粘膜ワクチンの効果を大幅に向上させることに成功した（*J. Exp. Med.*, 204: 2789-2796, 2007）。一方で、本抗体はヒトM細胞に対する特異性は低く、粘膜感染症に対する効果的な予防ワクチンを注射型ワクチンとしてではなく「粘膜ワクチン」としてヒトで開発するためにも、マウスで得られた理論的背景を基盤とした、ヒトM細胞へのワクチン抗原の送達技術を開発する目的で霊長類（カニクイザル）のバイエル板およびヒトの扁桃を実験材料としM細胞特異的モノクローナル抗体の樹立を試みた。

B. 研究方法

研究初年度（平成20年度）は、東京大学大学院医学系研究科外科学専攻感覚・運動機能医学講座耳鼻咽喉科学分野の山嵜達也教授との共同研究のもと、慢性扁桃炎や扁桃肥大の患者より扁桃組織を採取し、M細胞が豊富に存在する陰窩部の上皮層をレーザーマイクロダイセクション法により回収し、それをマウスに免疫することで、ヒトM細胞特異的モノクローナル抗体の樹立を試みた。また、医薬基盤研究所霊長類センターの協力を得て、カニクイザルのM細胞が豊富に存在するバイエル板の濾胞上皮層からもレーザーマイクロダイセクション法で細胞を回収しそれを免疫することで、同様にモノクローナル抗体の樹立を試みた。

C: 研究成果

慢性扁桃炎や扁桃肥大の患者よりインフォームド・コンセントのもとで扁桃組織を採取し、レーザーマイクロディセクション法により M 細胞を摘出する。また医薬基盤研究所の協力のもとカニクイザルパイエル板からも同様の手法で M 細胞を摘出し、それらをマウスにそれぞれ免疫する。ヒトおよびカニクイザルを実験材料としたアプローチを同時進行することで、両種の M 細胞に特異性を示すモノクローナル抗体を平成 20 年度中に作製する。ヒト扁桃やカニクイザルパイエル板組織からの M 細胞の摘出およびモノクローナル抗体の作製は当研究室で実施し、その後の電子顕微鏡を駆使した特異性解析は東京大学医科学研究所内の共同施設を利用する。研究申請時の段階で、ヒト M 細胞を含む扁桃上皮細胞特異的モノクローナル抗体 (3-D2-1, Mouse IgM) および、カニクイザルの M 細胞を含む腸管上皮細胞特異的モノクローナル抗体 (6B-7-11, Mouse IgG1) の樹立に既に成功しており、また今年度さらに 3 種のモノクローナル抗体 (3-D2-1, 1D8-16-7, 2F5-7-1、すべて Mouse IgM) の作製に成功している。本研究は現在も継続中であり、特異性の高いモノクローナル抗体が樹立できるとを期待している。



D. 考察

現在、これらのモノクローナル抗体のヒトもしくはサル M 細胞への交叉反応を組織学的に解析中である。研究申請時の計画では、平成 20 年度にヒト M 細胞特異的モノクローナル抗体を樹立することを目標として掲げたが、計画通り、5 種のモノクローナル抗体の樹立にこれまで成功した。現在も、ヒト M 細胞特異的モノクローナル抗体の作製を目的とした研究を継続中であり、より特異性の高い抗体の樹立を目標とした集約的研究を進めている。またこれまでに樹立したヒト扁桃組織に対するモノクローナル抗体はすべて IgM クラスであったことから、アフィニティーの高い IgG クラスの抗体の樹立に焦点を当てた研究を進めている。今後、これから樹立するモノクローナル抗体を加えた全ての抗体の特異性ならびに反応性を総合的に評価し、ヒト扁桃組織やサル腸管を用いた組織培養法を次年度 (平成 21 年度) に実施するための研究準備を進めていく。

E. 結論

M 細胞を含むヒトの扁桃上皮層に反応する 4 種類のモノクローナル抗体 (3-D2-1, 1D8-16-7, 2F5-7-1, 1D12-3-4、すべて Mouse IgM) および、サルの M 細胞を含むパイエル板上皮層に反応する 1 種類のモノクローナル抗体 (6B-7-11, Mouse IgG1) の樹立に成功した。

F. 研究発表

1. 論文

Terahara, K., Yoshida, M., Igarashi, O.,

Nochi, T., Pontes, G. S., Hase, K., Ohno, H., Kurokawa, S., Mejima, M., Takayama, N., Yuki, Y., Lowe, A. W., and Kiyono, H. Comprehensive Gene Expression Profiling of Peyer's Patch M Cells, Villous M-Like Cells, and Intestinal Epithelial Cells. *J. Immunol.* 180: 7840-7846, 2008.

2. 学会発表

Nochi T, Yuki Y, Matsumura A, Mejima M, Kohda T, Kozaki S, Kiyono H. New generation of mucosal vaccine: Novel M cell-targeted oral vaccination is effective for the induction of antigen-specific immune responses, Annual Joint Meeting on Immunology Teaching and Research, Hanoi, Vietnam, 2008

野地 智法, 清野 宏、M 細胞の免疫生物学的基礎解明とそれを基盤としたM細胞標的型粘膜ワクチン開発、日本食品免疫学会、東京、2008年

書籍 :

Kiyono, H., Kunisawa, J., McGhee, J. R., and Mestecky, J. The mucosal immune system. In *Fundamental Immunology* (Edited by William E. Paul). Lippincott-Raven, Philadelphia, pp. 983-1030, 2008

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

カニクイザルを用いたコレラ毒素粘膜ワクチンの
安全性および有効性評価

分担研究者 寺尾 恵治（医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター）
研究協力者 柴田 宏昭（医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター）
研究協力者 幸 義和（東大・医科研炎症免疫）
研究協力者 野地 智法（東大・医科研炎症免疫）

研究要旨

分担研究者により経口ワクチンとして開発された、コレラ毒素Bサブユニット（CTB）を発現させたCTB発現米の実用化を目的として、カニクイザルにCTB（3頭）およびCTB発現米（3頭）を2週間隔で5回経口投与した。CTB経口投与の安全性の指標として、供試個体の活動性、食欲および便性状を毎日観察した結果、経口投与に起因すると考えられる下痢、食欲不振、活動性の低下などの異常は認められなかった。また、経口投与前後で定期的に採血および新鮮便を採取し、抗CTB抗体のレベルを指標として経口ワクチンの有効性を評価した結果、CTB発現米はCTBと同程度の抗体産生を誘導することが明らかとなった。このことから、今回開発したCTB発現米は安全性及び有効性の観点から優れた経口ワクチンであることが実証された。

キーワード：カニクイザル、コレラ毒素Bサブユニット（CTB）、CTB発現米、経口ワクチン

A. 研究目的

共同研究者により開発された新規の経口粘膜ワクチンであるコレラ毒素のBサブユニット（CTB）を発現させたCTB発現米は、注射針を必要とせず、常温で安定かつ消化酵素耐性のすぐれたワクチン特性を有する。このNeedle- & Cold-chain-freeの経口ワクチンの実用化を目的として、ヒトでの臨床研究に先立ちカニクイザルを用いて安全性および有効性を評価することを目的とする。

B. 研究方法

実験1として5歳齢の雌カニクイザル3頭に1mgの組み換えCTBを5mlの生理食塩水に懸濁後、カテーテルで胃内に直接投与した。対照として1頭のカニクイザルに同量の生理食塩水のみを胃内投与した。投与は2週間隔で5回おこなった。

実験2として5歳齢の雌カニクイザル3頭

に1mgのCTBを含むCTB発現米粉（667mg）を5mlの生理食塩水に懸濁した液をカテーテルで胃内に直接投与した。対照として1頭のカニクイザルに野生米粉（667mg）を懸濁した生理食塩水を胃内に直接投与した。投与は2週間隔で5回おこなった。

実験1、実験2ともに投与前日午後から絶食させ、ケタラル麻酔下で経口投与した。

投与1ヶ月前から投与後2ヶ月の間、毎日供試個体の活動性、食欲、便性状を観察し、異常の有無（安全性）の指標とした。投与前および投与後2週間隔で採血および新鮮便を採取し、経口ワクチンで誘導されるIgAおよびIgG抗体のレベルを調査し、有効性の指標とした。

C. 研究結果および考察

1. 安全性評価：

図1にCTBを経口投与した3頭（#001, #002, #003）および対照として生理食塩水を経口投与した1頭（#004）のカニクイザルについて、投与前後の下痢の発生頻度を示す。CTBを投与した#001で一日だけ（45日目）泥状便が

観察されたが、この個体は投与前にも下痢が認められることから、CTB 経口投与による影響とは判断しがたい。CTB を投与した他の 2 頭 (#002, #003) および対照個体 (#004) では観察期間中に下痢の発生は認められなかった。この 4 頭では観察期間中に活動性の低下や食欲不振などの所見は認められなかった。

図 2 に CTB 発現米を経口投与した 3 頭 (#005, #006, #007) と対照として野生米を投与した 1 頭 (#008) での下痢の発生頻度を示す。CTB 発現米を投与した 1 頭 (#005) で経口投与開始後に泥状便が頻繁に観察された。特に第 4 回目の投与 (42 日目) 後に下痢が頻発する傾向が認められたが、最終免疫後では下痢の発生は観察されていないことから、CTB 発現米の投与に付随する実験処置 (捕獲麻酔、採血、経口投与など) のストレスに起因する下痢の可能性が高い。CTB 発現米を投与した他の 2 頭 (#006, #007) では、#006 で観察期間中に一日だけ下痢が観察された。さらに図に示す 4 頭では観察期間中に活動性の低下や食欲不振などの異常所見は観察されていないことから、CTB 発現米の腸管機能に及ぼす影響は極めて低いと判断される。

コレラ毒素は毒素産生型のコレラ菌が菌体外に分泌する外毒素であり、水溶性の下痢を引き起こす毒素活性を示す A サブユニットと腸管上皮細胞膜表面の GM1 ガングリオシドとの結合能を有する B サブユニットで構成されている。今回カニクイザルに経口投与した CTB は毒素活性を示さない B サブユニットであり、毒性は極めて低いと考えられるが、腸管上皮細胞との結合能を有することから、投与に起因する安全性は十分に評価しておく必要がある。今回の結果から、CTB および CTB 発現米の投与により重篤な下痢や食欲不振などの異常が生じる可能性は極めて低いことが実証された。

CTB 発現米の免疫原性については、CTB 発

現米を経口投与した 3 頭 (#005, #006, #007) 全ての血清において、高いレベルの CTB 特異的 IgG 産生が認められ、さらには、それらはコレラ毒素の GM1 ガングリオシドに対する結合阻止効果を有していることも、GM1-ELISA 法を用いた *in vitro* での解析により確認された。

以上から、共同研究者により開発された CTB 発現米は注射針不要かつ常温安定という優れた特性に加え、CTB と同程度の免疫原性を示すとともに安全性の高い優れた次世代型経口粘膜ワクチンであることが実証された。

E. 結論

注射針不要かつ常温安定の新規経口ワクチンとしての CTB 発現米の安全性と有効性をカニクイザルを用いて評価した。その結果、投与個体における活動性、食欲、下痢の発生を指標とした安全性評価では特記すべき異常は認められなかった。さらに、CTB 発現米の経口投与で誘導される CTB 特異的抗体 (血清中 IgG) のレベルも CTB を経口投与した場合とほぼ同程度であることから、CTB 発現米が安全性、有効性ともに優れた経口ワクチンであることが実証された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Terao K, Dynamic changes in early development of immune system in macaque monkeys -The significance from standpoint of the preclinical toxicity test using nonhuman primates-. Journal of Toxicological Science, -in press-

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

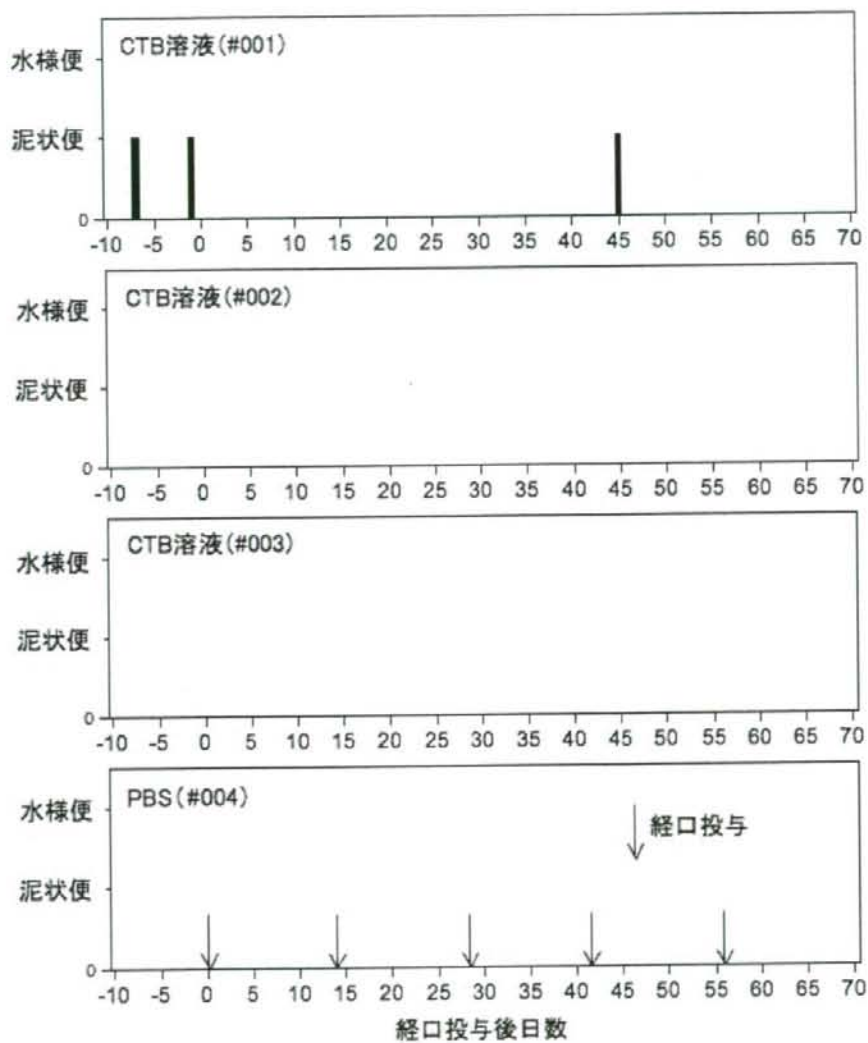


図 1: CTB 溶液(1mg/ml)を経口投与したカニクイザルでの下痢の発生
無表示はすべて正常便を示す。

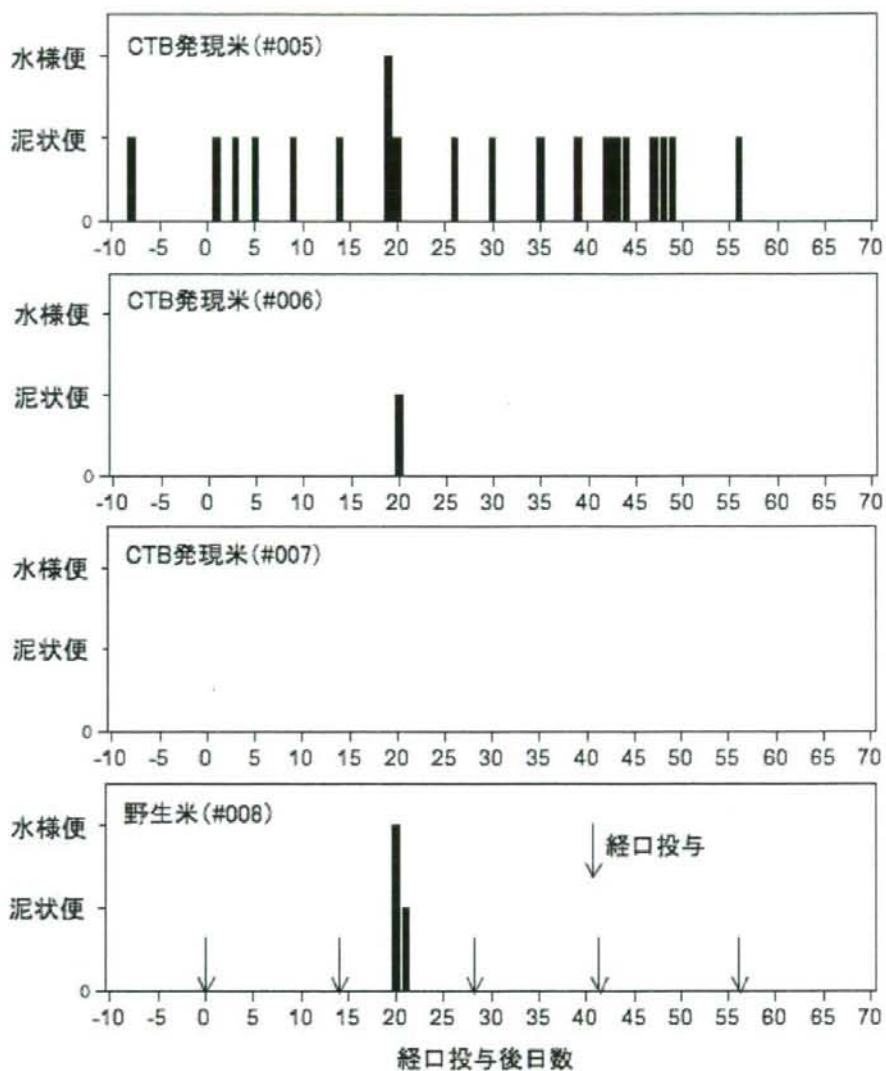


図 2:CTB 発現米粉末懸濁液(5ml;含 CTB1mg)を経口投与したカンクイザルでの下痢の発生
無表示はすべて正常便を示す

厚生労働科学研究費補助金 (創薬基盤推進研究事業)
分担研究報告書

インフルエンザワクチンの免疫原性に関する研究

研究分担者：奥野良信

(財) 阪大微生物病研究会観音寺研究所 所長

研究要旨

MDCK 細胞または発育鶏卵を基質とし、3 種類のインフルエンザウイルスのリファレンス株 (A/Solomon Islands/3/2006 (H1N1), A/Hiroshima/52/2005 (H3N2), B/Malaysia/2506/2004) を培養して、それぞれのスプリットワクチンと不活化全粒子ワクチンを作製した。これら 12 種類のワクチンを BALB/c マウスに皮下投与し、血清 HI 抗体価を測定した結果、MDCK 細胞由来ワクチンと発育鶏卵由来ワクチンの免疫原性は、スプリットワクチンの間でも、全粒子ワクチンの間でもほぼ同等であると考えられた。

以上の結果から、M 細胞標的型粘膜ワクチンの抗原として季節性インフルエンザウイルス抗原を用いる場合には、MDCK 細胞及び発育鶏卵を基質としたインフルエンザワクチンのいずれを用いても同等の結果が得られると推測された。

A. 研究目的

インフルエンザワクチンの至適抗原の検索を目的とし、MDCK 細胞培養と発育鶏卵で増殖させた季節性インフルエンザウイルス抗原の免疫原性の比較を行う。

B. 研究方法

本研究に先立ち、国立感染症研究所から平成 19 年度 (2007/2008 シーズン) の 3 種類のインフルエンザワクチンウイルスのリファレンス株 (A/Solomon Islands/3/2006 (H1N1), A/Hiroshima/52/2005 (H3N2), 及び B/ Malaysia/2506/2004) の分与を受けた。

無血清培地及びマイクロキャリアを用いて高密度で培養した MDCK (NBL-2) 細胞 (ATCC Number: CCL-34) に、上記リファレンス株をそれぞれ $moi = 0.0001$ で接種し、3 日間培養した。これらのウイルス培養液を採取し、濃

縮及びショ糖密度勾配遠心等の処理を実施して精製インフルエンザウイルスを得た後、TE 処理、ホルマリン処理及び透析等を実施することにより 3 種類のスプリットワクチンを作製した。また、同じ精製ウイルスをもとにして、ホルマリン処理及び透析等を行うことにより 3 種類の不活化全粒子ワクチンも作製した。一方、発育鶏卵を基質とし、上記ワクチンウイルスのリファレンス株の培養を行い、尿液から精製ウイルスを得た後に、同様の手順でスプリットワクチンと不活化全粒子ワクチンを作製した。

これら 12 種類のワクチンをそれぞれ 6~8 匹の BALB/c マウス (雌、4 週齢) に 1 匹あたり $0.5\mu\text{g-HA}$ (0.5mL) を皮下投与した。初回免疫から 3 週後に追加免疫を行い、さらに 1 週後に血清を得た。対応するワクチン株ウイルスに対する個体別血清 HI 抗体価を測

定した。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた接種試験は、必要最低限と考えられる個体数で実施した。また、全採血はマウスに苦痛を与えないよう麻酔下で行った。

C. 研究結果

無血清培地及びマイクロキャリアを用いて高密度で培養した MDCK 細胞において、3 株のインフルエンザワクチンウイルスの培養を行った結果、培養上清中のウイルス感染価は $10^8 \sim 10^9$ CCID₅₀/mL であり、発育鶏卵を用いた場合とほぼ同等の高い感染価が得られていることが分かった。

A/Solomon Islands 株ワクチン免疫群血清の幾何平均 HI 抗体価は、MDCK 細胞由来スプリットワクチンで 180/発育鶏卵由来スプリットワクチンで 390、MDCK 細胞由来全粒子ワクチンで 88/発育鶏卵由来全粒子ワクチンで 110 であった。A/Hiroshima 株ワクチン免疫群血清の幾何平均抗体価はそれぞれ 160/310, 80/24 であった。B/Malaysia 株ワクチン免疫群血清の幾何平均抗体価はそれぞれ 150/110, 44/28 であった (図 1)。

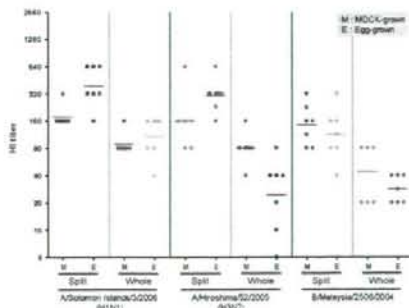


図 1. マウスでの免疫原性試験の結果

また、亜型間での免疫原性を比較してみると、A/Solomon Islands 株免疫群での幾何平均 HI 抗体価と A/Hiroshima 株免疫群の抗体価はほぼ同等で、B/Malaysia 株免疫群の抗体価よりも高かった。

一方、全般的にスプリットワクチンの方が全粒子ワクチンに比べて免疫原性が高い傾向にあったが、その理由はよく分かっていない。

D. 考 察

MDCK 細胞由来ワクチン免疫群の平均 HI 抗体価を発育鶏卵由来ワクチン免疫群の平均抗体価で除した値は、スプリットワクチンで 0.46~1.4, 全粒子ワクチンで 0.80~3.3 であった。全ての値が 0.25~4 の間 (HI 価上下 2 管以内) に収まっていたことから、MDCK 細胞由来ワクチンと発育鶏卵由来ワクチンのマウスにおける免疫原性は、スプリットワクチンの間でも、全粒子ワクチンの間でもほぼ同等であると考えられた。

以上のことから、M 細胞標的型粘膜ワクチンの抗原として季節性インフルエンザウイルス抗原を用いる場合には、MDCK 細胞及び発育鶏卵を基質としたインフルエンザワクチンのいずれを用いても同等の結果が得られるのではないかと考えられた。

E. 結 論

MDCK 細胞由来インフルエンザワクチンと発育鶏卵由来インフルエンザワクチンの免疫原性は、ほぼ同等であると考えられた。

F. 健康危機情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

山本貴仁、谷本武史、五味康行、真鍋貞夫、石川豊数、奥野良信：付着性 MDCK 細胞を用いた細胞培養インフルエンザワクチンの開発 第 12 回日本ワクチン学会学術集会、熊本、2008 年 11 月

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

B 細胞亜集団の分化・活性化機構の研究

研究分担者：紅露 拓

(独) 医薬基盤研究所

免疫応答制御プロジェクト・プロジェクトリーダー

研究要旨

B リンパ球は自然抗体産生に関与する B-1 細胞と獲得免疫応答に関与する B-2 細胞に分けられ、両者が粘膜免疫に関わっている。マウスにおいては CD5 を始めとする細胞表面マーカーでそれぞれを区別することができるが、ヒト B 細胞亜集団のマーカーは確立されていない。そこで普遍的な B-1、B-2 細胞マーカーを確立するため、マウスを用いて B-1 および B-2 の前駆細胞の同定を試みた。SCID マウスへの移植により現在報告されている B-1 前駆細胞である CD19⁺ B220⁺ 細胞のみならず、成獣では共通リンパ球前駆細胞とされる Lin⁻ IL-7Rα⁺ 細胞も胎児においては B-1 細胞に分化決定していることがわかった。また、CD19⁺ B220⁺ B-1 前駆細胞を試験管内で分化させることに成功し、B-1 細胞分化決定機構の解析手段を得た。腹腔 B 細胞の亜集団により抗原受容体刺激時の細胞内カルシウムイオンの濃度変化に違いがあることを見いだした。

A. 研究目的

B リンパ球はその機能や局在から大きく B-1 細胞と B-2 細胞に分けられる。B-2 細胞が T 細胞依存性に抗原特異的な免疫グロブリンの産生を行なうのに対して、B-1 細胞は感染の有無にかかわらず存在する自然抗体の産生や、T 細胞非依存性の抗体産生に関わるとされる。自然抗体は様々な病原体に広範な交叉反応性を示すことから、未知、あるいは変異型の病原体に対する防御としての有効性が注目される。また、腸管における抗体産生細胞の約半分が B-1 細胞由来であり、腸管免疫におけるエフェクター細胞としても重要であるがその役割については不明な点も多い。さらにヒトでの B-1 細胞の表現型や機能については詳しく調べられていない。本研究ではヒト粘膜ワクチンの実用化に向けて、エフェクター細胞となる B-1 および B-2 細胞の同定および機能

の解明を目指す。そのためにまずマウスを用いて B-1 細胞の前駆細胞の同定と分化経路の解明を行ない、より普遍的な B-1 細胞マーカーを見つける。また、B-1 細胞と B-2 細胞の抗原受容体架橋時の細胞内シグナルの差異を利用し、ヒト成熟 B-1 細胞の同定を行なう。B-1 細胞と B-2 細胞を最終的にはヒト検体を用いて B-1 細胞を同定、分離し、B-1 細胞の活性化をもたらす化合物を探索し、粘膜ワクチンアジュバントの開発に役立てる。

B. 研究方法

1. 妊娠 15 日目の BALB/cA マウスのより胎児を採取し、肝臓細胞懸濁液を調製した。赤芽球系細胞を TER-119 抗体マイクロビーズと MACS 磁気カラムにより除去し、蛍光標識抗体で染色後、FACS Aria セルソーターにより血球系列マーカー陰性(Lin⁻) c-kit⁺ IL-7Rα⁺ (CLP)

細胞を分取した。4000 個の CLP を 1Gy の放射線照射を受けた SCID マウスに静脈内投与し、4 週間後に腹腔細胞を採取し、B-1 および B-2 細胞の数をフローサイトメータにより計測した。一部の実験では CLP を BALB/c マウスの IgH コンジェニックマウスである C.B-17+/+ マウス骨髄より同様の手順で採取した。

2. MACS 法あるいは FACS Aria により精製した Lin-胎児肝細胞を 30Gy 放射線照射済 ST2 ストロマ細胞株と IL-7, stem cell factor, flt3-ligand 存在下で共培養し、CD19 と B220 の発現の経時変化をフローサイトメータにより測定した。

3. マウス腹腔細胞にカルシウムイオン蛍光指示薬 Indo-1 を浸透させた後、細胞表面マーカーを染色した。フローサイトメータを用いて抗 IgM 抗体刺激時の細胞内カルシウムイオン濃度の経時変化を測定し、細胞表面マーカーによる各リンパ球集団について解析した。

(倫理面への配慮)

マウスを用いる実験は医薬基盤研究所動物実験委員会の承認を得たプロトコルにより行ない、極力苦痛を与えないように配慮した。

C. 研究結果

1. CLP はすべてのリンパ球に分化するとされている細胞であり、B-1, B-2 共通の前駆細胞であると予想されたが、胎児 CLP を移植した SCID マウス内では主に B-1 細胞が分化した。胎児 CLP と成獣 CLP を IgH のアロタイプキメラとして混合移植すると成獣 CLP からは B-2 細胞が分化したが、同じ個体内で胎児 CLP はやはり B-1 細胞にしか分化しなかった。一方、胎児肝細胞でも Lin-分画や Lin-CD93+細胞からは B-1, B-2 両方の分化が見られた。

2. 分担研究者は CD19+ B220-胎児肝細

胞が B-1 前駆細胞であることを観察しているが(投稿中)、この細胞が作られる過程を観察するため、Lin-胎児肝細胞を ST2 ストロマ細胞上で培養したところ、培養 4 日目に CD19+ B220+細胞が観察され、7 日目に CD19+ B220-細胞が出現した。

3. Indo-1 による細胞内カルシウム濃度の測定がその他 7 色の蛍光染色と同時にこなえることが確認できた。IgM 架橋後 B-1 細胞は B-2 細胞と比べ早期に細胞内カルシウムイオンの上昇が認められた。

D. 考 察

今年度は普遍的 B-1 細胞マーカー探索のための基礎的実験として、マウス B-1 および B-2 前駆細胞の解析を行なった。

胎児 CLP が B-1/B-2 共通の前駆細胞ではないことは予想外の結果であり、CLP を経由しない B-2 細胞分化経路の存在を示唆するものである。今後、B-1/B-2 共通前駆細胞および B-2 分化決定前駆細胞の同定により、B 細胞初期分化の経路図が大きく書き換えられる可能性が出てきた。今後の研究の進展により、B-2 前駆細胞が同定できれば B-1 前駆細胞との比較により、ヒトにも応用できる B-1/B-2 分別マーカーが得られる道筋を作ったと言える。

一方、培養実験からは CD19+ B220- B-1 前駆細胞が一度 B220 を発現した後、その発現を失って作られる可能性が示唆された。培養系で作られた CD19+ B220-細胞が実際に B-1 細胞に分化するか SCID マウスへの移植で確認するほか、CD19+ B220+細胞のうちどの分画から B-1 前駆細胞が作られるのか詳細に検討する必要がある。培養系での B-1 前駆細胞の発生の再現は、B-1 分化決定因子の探索系としても利用価値が高い。

マルチカラー染色による細胞内カルシウムイオン濃度測定は B 細胞亜集団を全く同じ条件で刺激できるメリットがある。