

2009/0001A

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 21 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 清野 宏

平成 22 (2010) 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	2
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ワクチン実験 (独) 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター 保富 康宏	10
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	14
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	16
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	19
V. 研究成果の刊行物・別冊 (主なもの)	22

I. 構成員名簿

平成 21 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	保富 康宏	センター長	(独) 医薬基盤研究所 霊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：保富康宏（医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター センター長）

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：

過去約 30 年以上におよぶ粘膜組織での免疫システムに関する基礎研究の積み重ねにより、粘膜免疫学が確立され、その理論的背景を基盤とした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、効果、安全性の高い粘膜ワクチンのヒトでの実用化に向けた基盤技術は、必ずしも明確に確立されていない。今回我々は、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効果の優れた粘膜ワクチン開発に成功した（*J. Exp. Med.*, 204: 2789-2796, 2007）。一方で、理化学研究所との共同研究で、マウス M 細胞の遺伝子発現レベルの研究から発見した GP2 分子はマウスのみならずヒト及びサルでの発現が認められ、その抗体（10F5-9-2）はヒト・サルでの M 細胞標的ワクチンへの使用の可能が考えられている（*J. Immunol.* 180: 7840, 2008; *Nature* 462: 226,2009）。これらの成果を基盤として、本研究計画ではヒト・サル M 細胞特異的モノクローナル抗体の樹立を試み、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方向で研究を進めている。

つまり、本研究計画では、粘膜ワクチン開発へ向けて、よりヒトに近いサルでの実験を進めるために医薬基盤研霊長類医科学研究センター（保富班）との共同研究を進め、更に、ヒトへ向けた検討の基盤作りを（財）阪大微生物病研究会（奥野班）と連携してその体制を構築していく。さらに、粘膜ワクチン開発の鍵を握っていると考えられる新規粘膜アジュバント開発へ向けた基礎研究として、分泌型IgA誘導メカニズムを解明し、同抗体の有する交叉反応性等についても明らかにする（医薬基盤研・紅露班）。つまり、粘膜ワクチン開発の理論基礎となる粘膜免疫の基礎的解明から、M細胞標的型粘膜ワクチンの実現化に向けた応用研究を体系的に推進する。

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）の腸管等を実験材料としM細胞に反応性を有するモノクローナル抗体の作製及びマウスをもちいて、マウス、サル・ヒトに共通のM細胞特異抗原に対する抗体作成も並列的に進め、特異性を詳細に検討していく。医薬基盤研保富及び紅露

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、粘膜免疫に重要な分泌型IgA抗体に関して、その元となるヒト・サルのB細胞の解析、特にB細胞亜集団の活性化機構を検討する実験系を樹立する。また(財)阪大微研奥野班ではM細胞標的ワクチンに用いることが可能なインフルエンザウイルス抗原等を調整し、直接腸管に免疫することで抗原特異的免疫が鼻腔粘膜に誘導可能かを検討した。継続的に三研究機関の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。

本実験で使用するヒト扁桃組織は、東京大学倫理委員会の指針に則り、インフォームド・コンセントのもとで全て採取し、実験材料として調整した(承認番号19-28)。M細胞特異抗体と反応性確認のためヒト腸管粘膜誘導組織を大阪大学消化器科と協力して採取する試験の倫理申請を行い、大阪大学・東京大学で承認を得た(承認番号20-67)。本研究を遂行する上で必要な組み換えDNA実験については、すでに申請済みであり、承認を得ている(東京大学医科学研究所・機関承認04-62)。また遺伝子組み換え動物を使用する施設にも拡散防止措置を施してあり、問題なく研究を遂行することが可能である(東京大学医科学研究所・機関承認04-61, 05-40, 07-30)。実験に供する可能性のある微生物について必要があるものは申請を行い、また主に研究を行う研究室もBio Safety Level (BSL) 2の認定を受けた。実験動物の使用に関しては、ヘルシンキ宣言に従い、日本実験動物協会が定める「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」に記載されている方法により、できるかぎり動物に苦痛を与えない方法により安楽死をさせた後、実験に供した。その他、特定化学物質等の取り扱いについては当研究所の安全衛生管理規定に従い使用した。

結果：

- (1) M細胞を含むカニクイザルの上皮細胞に共通で且つ特異的反応し、さらにFAE上皮細胞にワクチンを標的可能なモノクローナル抗体(3F11-7-1)の樹立に成功した。
- (2) マウスM細胞に特異的に発現する蛋白GP2はサル・ヒトにも発現しているためこの抗体がM細胞への標的分子として使える可能性を示唆する事が出来た。
- (3) B-1細胞が産生する自然抗体はすべての型のインフルエンザウイルスに中和活性を示すので経鼻免疫による抗原特異的抗体誘導にB-1細胞の関与していることが考えられる。そこでマウス
B-1細胞を精製・培養し、B-1細胞の活性化機構を試験管内で調べる系を樹立した。
- (4) インフルエンザHAワクチンをマウスの直接腸管に免疫することにより、インフルエンザウイルス特異的な鼻粘膜IgAや血中IgG抗体を誘導することを実証した。
- (5) アカゲザルとSIV、SHIVの感染系はエイズウイルス感染症研究には非常に重要であり、世界中で用いられているが、今回カニクイザルにおけるエイズウイルス感染症研究の可能性を検討し、ワクチン開発におけるカニクイザルの基盤的研究を試みた。

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・サルM細胞標的型粘膜ワクチンに使用可能なサルFAE特異的モノクローナル抗体が樹立できた。この抗体をM細胞標的に使うことで、カニクイザルを用いた霊長類レベルで評価を行うことが可能であることが示された。またヒトM細胞に特異的に発現している分子GP2の抗体を用いたヒト・サルM細胞標的型粘膜ワクチンの可能性も示すことができた。粘膜ワクチン抗原として、（財）阪大微生物研究会ではインフルエンザHA抗原を試験し、医薬基盤研究所霊長類センターでは通常のアカゲザルではなく、カニクイザルでのウイルス感染モデルを研究した。

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系確立に向けて、順調に連携した研究が進展している。

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

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）のパイエル板およびヒトの扁桃を実験材料とし、上皮細胞層をレーザー マイクロダイセクションで切り取り、これを抗原として カニクイザルとヒトの M 細胞を含む上皮細胞に反応性を有する 6 種類のモノクローナル抗体の樹立に成功したが、これらはすべて個体特異的抗体であった。そこで、サル腸管から上皮細胞を精製して、再度モノクローナル抗体を樹立して得た抗体はサルの上皮細胞・FAE 特異的で且つ各個体間で共通な抗原を認識する抗体が 2 種得られた。このうち 1 種 3F11-7-1 は腸管組織培養下の FAE 上皮細胞にも反応性を示した。現在もサルとヒト M 細胞特異的モノクローナル抗体の作成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も含め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

本研究の目的はマウスで成功した M 細胞特異的抗体をデリバリー分子として用いる技術基盤を応用したヒトで使える M 細胞標的型粘膜ワクチンを開発することを目的としている。そこで、ヒト扁桃やサルの腸管を用いて 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、ヒトまたはサルの M 細胞特異的モノクローナル抗体の樹立を試みてきた。しかし、これらの抗体を本年度上半期に解析する過程で、この方法ではヒト扁桃やサルの腸管とも各個体特異的抗体しかとれないことが判明したため、より豊富な検体が得られるサル腸管から上皮細胞を精製し、個体共通

覚・運動機能医学講座耳鼻咽喉科学分野の山唄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、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腸管を用いて、抗体を樹立した個体以外のから組織切片を作製し、抗体の特異性を検討した。また複数のサルの腸管からコラーゲナーゼ・ヘアルロニダーゼ処理、さらにパンクレチニン処理後、パーコールでリンパ系細胞を除き、マウスに免疫することで、上皮細胞・FAE 特異的な各個体間で共通な抗原を認識する抗体の検討を行った。サル腸管組織切片は DMEM-2% FCS 下

で抗体と2時間培養後、FAEを含む組織をFITC-2次抗体で染色し観察した。

本実験で使用するヒト扁桃組織は、東京大学倫理委員会の指針に則り、インフォームド・コンセントのもとで全て採取し、実験材料として調整した（承認番号19-28）。M細胞特異抗体と反応性確認のためヒト腸管粘膜誘導組織を大阪大学消化器科と協力して採取する試験の倫理申請を行い、大阪大学・東京大学で承認を得た（承認番号20-67）。本研究を遂行する上で必要な組み換えDNA実験については、すでに申請済みであり、承認を得ている（東京大学医科学研究所・機関承認04-62）。また遺伝子組み換え動物を使用する施設にも拡散防止措置を施してあり、問題なく研究を遂行することが可能である（東京大学医科学研究所・機関承認04-61, 05-40, 07-30）。実験に供する可能性のある微生物について必要があるものは申請を行い、また主に研究を行う研究室もBio Safety Level (BSL) 2の認定を受けた。実験動物の使用に関しては、ヘルシンキ宣言に従い、日本実験動物協会が定める「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」に記載されている方法により、できるかぎり動物に苦痛を与えない方法により安楽死をさせた後、実験に供した。その他、特定化学物質等の取り扱いについては当研究所の安全衛生管理規定に従い使用した。

C: 研究成果

研究初年度（平成20年度）に作製した抗体はすべて（ヒト扁桃組織に反応する抗体3種、サル腸管上皮細胞に反応する抗体3種）、抗体を樹立した組織以外の個

体からの上皮細胞には反応せず、個体特異的であった。そこで数種のサルの腸管から精製した上皮細胞画分から再度抗体を樹立したところ、サル腸管上皮細胞FAEに共通の特異的2種の抗体を得た。このうちの1種3F11-7-1は腸管組織切片培養2時間で、空腸及び回腸のFAE上皮細胞にも反応することが判明し、FAEにワクチンを標的する抗体として最適であると考えられた。

本研究は現在も継続中であり、よりM細胞に特異性の高いサルモノクローナル抗体樹立に向けて研究を進めている。

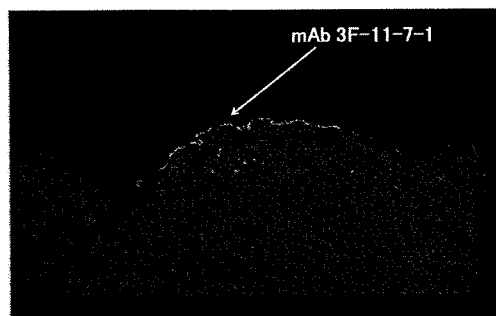
D. 考察

我々はここ数年間、経口ワクチンの研究開発を進めてきた。その方向性には2つの戦略があり、一つは抗原を安定な形状に発現し胃腸へ運び、腸管のM細胞等を介して効果的に粘膜誘導組織に送達させるためにコメにワクチンを発現し経口投与方法（*PNAS* **104**: 10986-10991, 2007）とマウスM細胞に特異的発現する分子に対する抗体を用い、M細胞に直接標的するために「抗体結合ワクチン」を経口投与方法である（*J. Exp. Med.* **204**: 2335-2348, 2007）。前者は最近、サルに米型ワクチン（MuocRice-CTB）を経口投与方法で、抗原（例；コレラ毒素）特異的免疫応答の誘導およびその中和効果の有効性を証明した。さらに、サルでの試験を通じて経口MucoRice-CTBにより誘導されたコレラ毒素に対する中和抗体の持続性について、初回経口免疫完了後6ヶ月間は維持される事が確認されている。さらに、追加免疫効果についても確認した（*J. Immunol.* **183**;

6538-6544,2009)。

後者に関してはマウスM細胞に特異的に発現する分子の DNA-chip 解析を行い、GP2 という分子がM細胞表層に発現していることを同分子特異的抗体を用いた発現レベルで証明した(*J. Immunol.* **180**; 7840-7846, 2008)。さらに最近、理研免疫・アレルギー総合研究センター(大野グループ)との共同研究で、このGP2分子を標的にサルモネラ菌がM細胞から特異的に侵入することを解明した(*Nature* **462**;

抗体添加組織片培養下(2時間後の回腸)



226-230, 2009)。GP2はサル・ヒトにも発現しているため、この抗体がM細胞への標的分子として使える可能性がある。

一方で、我々が昨年来レーザーマイクロダイセクションを駆使して目的とする細胞を切り取り、これを抗原として樹立してきたサルの上皮細胞に対するモノクローナル抗体はサルの個体特異的であることが判明し、本年度に再度、今度はM細胞を含む上皮細胞を分離して、これを抗原として、カニクイザル一般の上皮細胞に対するモノクローナル抗体の樹立に成功した。さらにこの抗体が実際カニクイザルの腸管のM細胞を含むパイエル板上皮細胞に特異的に反応する抗体であることが確認できた。現在、サルならびに

ヒトのパイエル板M細胞に特異的な抗体の樹立を進めており、平成22年度には、本研究で開発された抗体を用い、実際にカニクイザルを用いた経口免疫を実施できる準備が整いつつある。

E. 結論

M細胞を含むサルのパイエル板上皮細胞に共通で且つ特異的反応し、さらにFAE上皮細胞にワクチンを標的可能なモノクローナル抗体(3F11-7-1)の樹立に成功した。

F. 研究発表

1. 論文

Nochi, T., Yuki, Y., Katakai, Y., Shibata, H., Tokuhara, D., Mejima, M., Kurokawa, S., Takahashi, Y., Nakanishi, U., Ono, F., Mimuro, H., Sasakawa, S., Takaiwa, F., Terao, K., and Kiyono, H. A Rice-based oral cholera vaccine induces macaque-specific systemic neutralizing Abs but does not influence pre-existing intestinal immunity. *J. Immunol.* 2009; 183: 6538-6544.

Takahashi, T., Nochi, T., Yuki, Y. and Kiyono, H. New Horizon of mucosal immunity and vaccine. *Curr. Opin. Immunol.* 2009; 21: 352-358.

Yuki, Y., and Kiyono, H. Mucosal vaccines: novel advances in technology and delivery. *Expert Rev. Vaccines.* 2009; 8: 1083-1079.

Hase, K., Kawano, K., Nochi, T., Pontes, GS., Fukuda, S., Ebisawa, M., Kadokura, K., Tobe, T., Fujimura, Y., Kawano, S., Yabashi, A., Waguri, S., Nakato, G., Kimura, S., Murakami, T., Iimura, M., Hamura, K., Fukuoka, S., Lowe, AW., Itoh, K., Kiyono, H., and Ohno, H. Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature*. 2009:462:226-230.

Yuki, Y., Tokuhara, D., Nochi, T., Yasuda, H., Mejima, M., Kurokawa, S., Takahashi, Y., Kataoka, N., Nakanishi, U., Hagiwara, Y., Fujihashi, K., Takaiwa, F., and Kiyono, H. Oral MucoRice expressing double-mutant cholera toxin A and B subunits induces toxin-specific neutralising immunity. *Vaccine*. 2009:27:5982-5988.

Nagatake, T., Fukuyama, S, Kim. D-Y., Goda, K., Igarashi.O., Sato,S., Nochi, T., Sagara,H.,Yokota,Y.,Jetten, AM., Kaisho,T., Akira,A., Mimuro,H., Sasakawa,C., Fukui, Y.,Fujihashi,K., Akiyama,T., Inoue,J., Penninger, JM., Kunisawa, J., and Kiyono, H. Id2-, ROR γ t-, and LT β R-independent lymphoid organogenesis in ocular immunity. *J. Exp. Med.* 2009:206:2351-2364.

Knoop, KA., Kumar, N., Butler, BR., Sakthivel, SK., Taylor, RT., Nochi, T., Akiba, H., Yagita, H., Kiyono, H., and Williams, IR. RANKL is necessary and sufficient to initiate development of antigen-sampling M cells in the intestinal epithelium. *J. Immunol.*

2009:183:340-346.

Terahara, K., Yoshida, M., Taguchi,F.,igarashi,O., Nochi,T., Gotoh,Y.,Yamamoto, T., Tsunetsugu-Yokota, Y.,Beauchemin,N., and Kiyono,H. Expression of newly identified secretory CEACAM1(a) isoforms in the intestinal epithelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009:383:340-346.

Suzuki, R., Nourani, M.R., Saino-Saito, S., Abe, H., Nochi, T., Kiyono, H., Spener, F., Kondo, H., Owada, Fujihashi, K. and Kiyono, H. Localization of fatty acidbinding protein of epidermal type common to dendritic cells and presumptive macrophages in Peyer's patches and epithelial M cells of mouse intestine. *Histochem CellBiol.* 2009: 132:577-584.

Fujihashi, K. and Kiyono, H. Mucosal immunosenescence: New developments and vaccines to control infectious diseases. *Trends Immunol.* 2009: 30: 334-343.

2. 学会発表 (国内)

幸 義和、野地智法、徳原大介、清野 宏 コレラ毒素Bサブユニット(CTB)発現米はカニクイザルへの経口投与により血清中にCT特異的IgG抗体を誘導するが、自然抗体として腸管に存在するCT特異的SIgA抗体の免疫応答には影響を与えない
日本ワクチン学会 9月27日、札幌 2009

(国際)

Yuki Y., Nochi T., Katakai Y., Shibata H., Tokuhara D., Mejima M., Kurokawa S., Takahashi Y., Nakanishi U., Ono, Takaiwa F., Terao K., Kiyono H. Oral MucoRice-CTB induces toxin-protective serum antibodies but does not influence natural intestinal immunity in nonhuman primates. Bangkok, Thailand, Oct. 5, 2009

厚生労働省科学研究補助金（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ワクチン実験

研究者分担者 保富康宏 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター センター長

研究要旨

感染症研究における実験動物としての霊長類は極めて重要である。また、ワクチン研究においては霊長類を用いた検討は必須となっている。霊長類において最も汎用されているのはカニクイザルであり、ヒトへの治験を行う前臨床として用いられる動物となっている。しかしながら、その産地や家系により、実験結果が左右されることは数多く認められる。医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターは30年以上にわたり、原産地を明確にしたコロニーを維持繁殖させてきた。本研究では産地が特定されており、系統が明らかで、かつ計画的に生産されているSPFカニクイザルを用いて新たな霊長類感染・ワクチン評価モデルとして最初にサルエイズウイルス(SIV)とカニクイザルの感染系を検討した。SIVmac239分子クローンをCOS-1にトランスフェクトさせ、培養上清のウイルスをカニクイザル胎児胸腺リンパ球由来の細胞HSC-Fに対するTCID₅₀を測定した。このウイルスをカニクイザル由来末梢血単核球細胞(PBMC)で増殖させSIVストックを作製した。このSIVストックをインドネシア産、フィリピン産、マレーシア産のカニクイザルそれぞれから分離したCD8除去リンパ球に感染/増殖させ、HSC-Fに対するTCID₅₀を測定したところ、インドネシア産は10^{5.42}/ml、フィリピン産は10^{6.47}/ml、マレーシア産は10^{6.10}/mlであった。さらにこれらのウイルスをカニクイザルに接種したところ、慢性的な感染を示した。

A.研究目的

多くの感染症研究、特に病態やワクチン開発においては有効な動物モデルが必要である。例えば、ヒトエイズウイルス(HIV)はヒト以外ではチンパンジーに感染するが、エイズを発症することはない。このためにヒトと同様な病態を示すサルエイズウイルス(SIV)とアカゲザルの系を用いての研究が広く行われている。しかしながらアカゲザルの産地による病態の差異が認められること、安定的な供給を確保することが困難であるために、新たな動物モデルの開発が望まれている。このような状況下でアカゲザル以上に汎用されているカニクイザルを用いてのエイズウイルス研究が興味をもたれているが、未だ詳細な実験結果は示されていない。

本研究では最初にサルDタイプレトロウイルス(SRV/D)等の感染が無く、産地、系統が判明しているカニクイザルにおけるエイズウイルス感染症研究の可能性を検討し、ワクチン開発におけるカニクイザルの基盤的研究を試みた。

B.研究方法

1) SIVmac239の調製

SIVmac239 cDNAを含むpBR233ベクターを霊長類由来株化細胞COS-1にトランスフェクトさせ、培養上清のウイルスを回収した。ウイルスの感染価を測定するために、カニクイザル胎児胸腺リンパ球由来の細胞HSC-Fに対するTCID₅₀を測定した。

2) カニクイザル由来末梢血単核球細胞(PBMC)への SIV mac239 の感染

SIV 感染実験で用いる同一の動物種を用いてウイルスを増殖させた。カニクイザルの末梢血から密度勾配遠心法で分離した PBMC を CD8 除去し、マイトジェンの PHA-P で 2 日間刺激し、IL-2 で 3 日間増殖させたのち、ウイルスに感染させ 6 日後の培養液を SIV のストックとして保存した。この SIV ストックをインドネシア産、フィリピン産、マレーシア産のカニクイザルそれぞれから分離した CD8 除去リンパ球に感染/増殖させ、HSC-F に対する TCID₅₀ を測定した。

3) カニクイザルに対する SIVmac239 感染

インドネシア産、フィリピン産カニクイザル各 2 頭に 10⁴ TCID₅₀ 接種し、血漿中のウイルス量を Real-Time PCR にて測定した。

4.) 倫理面への配慮

本研究では動物実験申請等の必要な委員会での承認は既に得ており、ヒトサンプル、情報等は一切用いていない。

C. 研究結果

1) SIVmac239 の感染価

Cos-1 にトランスフェクトさせ、回収したウイルスの HSC-F に対する TCID₅₀ は 10³-10⁴/ml であった。

2) カニクイザル由来 PBMC への SIVmac239 の感染

Gag P27 は感染 6 日目に最大値となった。カニクイザル由来 PBMC の原産地の違いによる SIVmac239 の感染価への影響は、HSC-F に対する TCID₅₀ においてインドネシア産は 10^{5.42}/ml、フィリピン産は 10^{6.47}/ml、マレーシア産は 10^{6.10}/ml であった。

3) カニクイザルに対する SIVmac239

感染

インドネシア産、フィリピン産カニクイザル各 2 頭に SIVmac239 を接種したところ、インドネシア産、フィリピン産カニクイザル各 1 頭で非常に高いウイルス量が維持された持続感染が認められた。

D. 考察

各種ウイルス感染症に対する病態解明やワクチン開発では未だ多くの不明な点が残されており、ワクチン開発においても実用化されているものはない。このような視点からの研究、開発には有用な動物モデルが必要であることは自明である。

アカゲザルと SIV、SHIV の感染系はエイズウイルス感染症研究には非常に重要であり、世界中で用いられている。しかしながら、アカゲザルの系統差による病態の差違や、この系のみで研究を行うことによる資源の安定的供給の問題、さらには生物学的な質の向上、維持においても問題が生じている。このような状況で、近年カニクイザルと SIV を用いた研究が行われ始めた。これら研究では主にモーリシャス産のカニクイザルが用いられており、モーリシャスにはスマトラ島近辺からカニクイザルが持ち込まれたとされている。しかしながらこのカニクイザルを用いた研究では現在までに明確な病態は報告されていない。

医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターでは麻疹、EBV、CMV 等のヘルペスウイルスおよびマカク属で問題となる SRV/D の感染がないカニクイザルを繁殖育成している。また、これらのカニクイザルはフィリピン、インドネシア、マレーシアの各地域で産出されたものであり、交雑せずに系統を保っている。このことから本研究で行う系統維持された SPF コロニーでのカニクイザルを用いた研究で

は新たな生物資源活用になる病原微生物研究を行える可能性が示唆される。また、本研究ではインドネシア産、フィリピン産カニクイザル各 1 頭で非常に高いウイルス量が維持されていることが認められた。このウイルス量は感受性が高いとされているインド産アカゲザル以上であり、さらにアカゲザルで認められるような一過性のウイルスの上昇ではなく維持されていることから、今後さらに感染実験を行い、新たな生物資源としてエイズも含めたウイルス研究におけるカニクイザルの検証を行う。

E. 結論

カニクイザルを用いたエイズも含めたウイルス感染研究の基盤を構築した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Mori, H., Yamanaka, K., Matsuo, K., Yasutomi, Y. And Mizutani, H. Administration of Ag85B showed therapeutic effects to Th2-type cytokine-mediated acute phase atopic dermatitis by inducing regulatory T cells. *Arch Dermatol. Res.* 2009 : 301 ; 151-157.

Okabayashi, S., Ohno, C. and Yasutomi, Y. Acute megakaryocytic leukemia (AMKL)-like disease in a Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *J. Comp. Pathol.* 2009 : 140 ; 212 -216.

Morioka, T., Yamanaka, K., Mori, H., Omoto, Y., Tokime, K., Kakeda, M., Kurokawa, I., Gabazza, E., Tsubura A., Yasutomi, Y. and Mizutani, H, IL-4/IL-13 antagonist DNA vaccination successfully

suppresses Th2 type chronic dermatitis. *Br.J.Dermatol.* 2009 : 160 ; 1172-1179.

Takano, J.I., Tachibana, H., Kato, M., Narita, T., Yanagi, T., Yasutomi, Y. and Fujimoto, K. DNA characterization of simian *Entamoeba histolytica*-like strains to differentiate them from *Entamoeba histolytica*. *Parasitol. Res.* 2009 : 105 ; 929-937.

Yasuhiro Yasutomi. Establishment of specific pathogen-free macaque colonies in Tsukuba Primate Research Center of Japan for AIDS research. *Vaccine* 2010 *in press*

Fujimoto, K., Takano, J., Narita, T., Hanari, K., Shimozawa, N., Sankai, T., Yoshida T., Terao, K., Kurata, T. and Yasutomi, Y. Simian Retrovirus type D infection in a colony of cynomolgus monkeys. *Comp. Med.* 2010 *in press*

Cueno, M.E., Karamatsu, K., Yasutomi, Y., Laurena, A.C. and Okamoto, T. Preferential expression and immunogenicity of HIV-1 Tat fusion protein expressed in tomato plant. *Transgenic Res.* 2010 *in press*

2. 学会発表

「国内」

岡林佐知、大野智恵子、保富康宏：実験用カニクイザルに認められた急性巨核芽球性白血病(AMKL)の一例 第 147 回日本獣医病理学会、栃木、2009 年 4 月 2 日～4 日

岡林佐知、小野文子、羽成光二、大野智恵子、加藤美代子、保富康宏：実験用カニクイザルに見られた下垂体腫瘍の一例 第 56 回日本実験動物学会総会、埼玉県、2009 年 5 月 14 日

松原明弘、高村史記、加藤翔太、保富康宏：SIVmac239 Env gp120 アスパラギン(N)結合型糖鎖の宿主免疫応答に対する

影響 第 57 回日本ウイルス学会、東京、
2009 年 10 月 25 日～27 日

松原明弘、高村史記、草川茂、武部豊、
森一泰、永井美之、保富康宏 : SIVmac239
Env gp120 アスパラギン結合型糖鎖の宿
主免疫応答に対する影響 第 23 回日本エ
イズ学会、名古屋、2009 年 11 月 26 日～
28 日

Yusuke TSUJIMURA, Yasuhiro
YASUTOMI : Administration of Ag85B
showed therapeutic effects to allergic asthma
by inducing Th1 response and Interleukin-17
第 38 回日本免疫学会、大阪、2009 年 12
月 1 日～3 日

「国際」

Nienke E. van Houten, Yasuhiro Yasutomi,
and Masahiro Niikura : Protective Mucosal
Immunity against a Model Viral Enteric
Infection by a Generic Chimeric Hepatitis E
Virus-like Particle Vaccine System. The
American Society for Virology 28th Annual
Meeting, Vancouver, 2009, July 11-15.

Yusuke TSUJIMURA, Yasuhiro
YASUTOMI : Administration of Ag85B
showed therapeutic effects to allergic asthma
by inducing Th1 response and Interleukin-17.
9th International Conference on New trends
in Immunosuppression & Immunotherapy
2010. February. 4-6.

H.知的財産の出願・登録状況
本年度新規は無し

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

インフルエンザ HA ワクチンをマウスの腸管に直接免疫した場合に、インフルエンザウイルス特異的な鼻粘膜 IgA や血中 IgG 抗体を誘導することが可能か調査した。その結果、鼻粘膜 IgA や血中 IgG 抗体が誘導され、HA ワクチンが腸管免疫における至適抗原となり得ることが明らかになった。

今後、腸管へのデリバリーシステムが構築できれば、インフルエンザ HA ワクチンを抗原とする粘膜ワクチンの開発に結びつくと考えられた。

A. 研究目的

腸管粘膜に存在する M 細胞を標的とするインフルエンザワクチンの開発を目的とし、インフルエンザウイルスの至適抗原の検索を行っている。今回は、インフルエンザ HA ワクチンを直接腸管に免疫した場合に、インフルエンザウイルス特異的な鼻粘膜 IgA や血中 IgG 抗体を誘導することが可能か調査した。

B. 研究方法

2007/2008 シーズンのインフルエンザ HA ワクチンである A/Solomon Islands/3/2006(H1N1), A/Hiroshima/52/2005(H3N2), 及び B/ Malaysia/2506/2004 を、それぞれ単味で BALB/c マウス(雌、10~11 週齢) に投与した。投与量は、総蛋白質量で 500 μ g/匹、HA 抗原量としては、A/Solomon Islands ワクチンで 208 μ g/匹、A/Hiroshima ワクチンで 391 μ g/匹、B/ Malaysia ワクチンで 214 μ g/匹であった。これらのワクチンをゾンデを用いて胃内に直接投与する方法によって 2~3 週間隔で 4 回免疫を行った。

なお、最初の 3 回の免疫には、これらのワクチンにアジュバントとして精製百日咳毒素を添加した。

4 回目の免疫から 3 日後に、鼻腔洗浄液と血清を回収し、鼻腔洗浄液からはインフルエンザウイルス特異的 IgA-ELISA 抗体価を、血清からは特異的 IgG-ELISA 抗体価を調べた。

(倫理面への配慮)

本研究の目的のために実施される動物実験計画は、(財) 阪大微生物病研究会観音寺研究所の動物実験委員会への申請をもとに、倫理面を含む審査・承認を受けた。また、本実験は「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(文部科学省告示第 71 号平成 18 年 6 月 1 日) に基づく研究施設の動物実験ガイドラインに則り、動物の保定法・麻酔の方法・接種法・飼育観察法など、実験動物に対しての苦痛を可能な限り軽減できる方法で実施した。

C. 研究結果

インフルエンザ HA ワクチン A/Solomon Islands, A/Hiroshima, 及び B/Malaysia で腸管免疫されたマウスのインフルエンザウイルス特異的な鼻粘膜 IgA 抗体価と血清 IgG 抗体価を測定した。その結果、A/Solomon Islands ワクチン免疫群の鼻腔洗浄液の幾何平均 IgA-ELISA 抗体価は 2^7 、A/Hiroshima ワクチン免疫マウスでは 2^8 、B/Malaysia ワクチン免疫マウスでは 2^7 であった (図)。いずれの抗体価も、我々が経験的に感染防御レベルとしている 2^5 の抗体価を超えていた。

また、A/Solomon Islands ワクチン免疫群の血清の幾何平均 IgG-ELISA 抗体価は $2^{9.5}$ 、A/Hiroshima ワクチン免疫マウスでは 2^{12} 、B/Malaysia ワクチン免疫マウスでは 2^{11} であった。

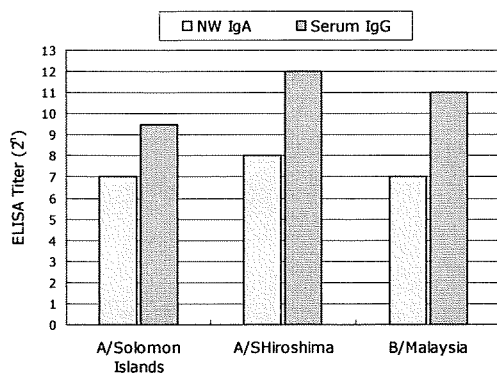


図. 鼻粘膜 IgA と血清 IgG 抗体価の測定結果

D. 考察

インフルエンザ HA ワクチンを直接腸管に免疫することにより、インフルエンザウイルス特異的な鼻粘膜 IgA や血中 IgG 抗体を誘導することができた。今回の試験においては、アジュバントとして精製百日咳毒素を添加したものの、HA ワクチンが腸管免疫における至適抗原となり得ることが明らかになった。

今後、腸管へのデリバリーシステムが構築できれば、インフルエンザ HA ワクチンを抗原とする粘膜ワクチンの開発に結びつくと考えられた。

E. 結論

インフルエンザ HA ワクチンを直接腸管に免疫することにより、インフルエンザウイルス特異的な鼻粘膜 IgA や血中 IgG 抗体を誘導することができた。

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
なし

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