

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 板村繁之

平成22(2010)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. 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 ----- 7  
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 ----- 12  
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 ----- 15  
笠井 道之

総括研究報告書

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

研究代表者 板村繁之 国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター 第3室長

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。本年度は、以下のような研究成果を得た。

(1) ワクチン製剤における粘膜アジュバントの品質管理上、ワクチンに添加される粘膜アジュバントは単一成分であることが望ましい。メシマコブ菌糸体の抽出液に含まれる経鼻接種型インフルエンザワクチンにおける粘膜アジュバント活性をモデルとして、どの成分によりもたらされるのかを探索し、熱湯抽出段階の上清に高いアジュバント活性が認められ分子量 12,000 以上の分子であることを明らかにした。

(2) H5 亜型 HA 特異的なモノクローナル抗体を組み合わせる H5 亜型特異的な HA 含量を定量検出するサンドイッチ ELISA を特殊なアビジン吸着繊維を使用する系を用いて、ワクチンの有効成分の含量測定をより高感度にする事ができた。

(3) TLR リガンド感受性を有する指示細胞を使用して IL-1 $\beta$ 、IFN- $\beta$  および IL-18 産生を指標としてスプリット、全粒子、アラムアジュバント添加インフルエンザワクチンについて測定したところ、ワクチンの剤形による免疫原性の指標として有用であることが示唆された。

研究組織

笠井道之 国立感染症研究所血液・安全性研究部

研究代表者

主任研究官

板村繁之 国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター 室長

佐藤佳代子 国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター 研究員

分担研究者

谷本武史（財）阪大微生物病研究会観音寺研究所

長谷川秀樹 国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター 室長

課長補佐

横田恭子 国立感染症研究所免疫部 室長

A. 研究の目的と背景

従来のワクチンの多くは皮下などの接種経路で実施されている。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) キノコ菌糸体抽出液に含有される粘膜アジュバント活性分子の同定

メシマコブ (学名 *Phellinus linteus*, PL) の菌糸体抽出液から、段階的に抽出された5つの分画サンプルを用いた。さらに抽出液から分子量サイズにより分画したサンプルを用いた。マウスの骨髄細胞から樹状細胞を分化・誘導して、この細胞にメシマコブに由来する分画したサンプルを添加して、培養上清の各サイトカインの発現量を定量した。

### 2) 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) 株を免疫して作製した 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 法によって HA 抗原が検出できることを昨年度までに示した。本年度は得られたモノクローナル抗体の特性としてウイルス中和活性について解析した。また検出感度を高めるために特殊なアビジン吸着繊維を使用する系にモノクローナル抗体を組み合わせる化学発光法による HA 抗原検出系の感度向上を図った。

### 3) 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- $\kappa$ 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) を指示細胞として免疫誘導能についてスプリット、全粒子、アラムアジュバント添加インフルエンザワクチンと異なるワクチンの剤形で解析した。

## C. 研究結果・考察

### 1) キノコ菌糸体抽出液に含有される粘膜アジュバント活性分子の同定

ワクチン製剤における粘膜アジュバントとしての品質管理上、ワクチンに添加される粘膜アジュバントは精製された単一成分であることが望ましい。本研究では、メシマコブ菌糸体の抽出液に含まれる経鼻接種型インフルエンザワクチンにおける粘膜アジュバント活性が、どの成分によりもたらされるのかを探索した。この分子の性質を明らかにすることを目的として、各抽出段階におけるサンプルと分子量サイズで分画したサンプルを用いて検討を行った。マウス骨髄細胞から誘導した樹状細胞に対し、メシマコブ菌糸体から得られる抽出液を添加して刺激することで、TNF- $\alpha$ の産生が認められた。本活性を指標にアジュバント活性を有する分画を同定した。その結果、熱湯抽出段階の上清に高いアジュバント活性が認められ分子量 12,000 以上の分子であることを明らかにした。このように、アジュバント活性を有する物質について物質の特性を明らかにすることは経鼻接種粘膜ワクチンの品質管理を実施する上で重要である。今後、アジュバント活性を有する物質を同定することで粘膜アジュバントとしての実用上の有用性が期待される。

### 2) HA 含量測定によるワクチン力価試験法の開発

これまでに作製したモノクローナル抗体の中和抗体価を測定したところ、H5N1 ウイルスの遺伝的、抗原的に異なるクレードに属するウイルスに対して異なる反応性を有することがわかった。これらを組み合わせることによって異なるクレードに属するウイルス株で製造されたワクチンの力価を測定できるだけでなく、ウイルス株の抗原性の特異性を検証できる試験法となると考えられる。

昨年度検討したサンドイッチ ELISA 法では、バキ

ュロ組換え HA 蛋白にして 100 ng/ml、ウイルス全粒子の場合、ベトナム (NIBRG-14) 株で 50 ng/ml、インドネシア (Indo-RG) 株で 20 ng/ml 程度の抗原が限界で、ワクチン抗原 (RT-PCR で  $1\sim 3\times 10^{10}$ ) を 1000 倍希釈すると全く検出できなかった。しかしながら、特殊なアビジン吸着繊維を使用する系を用いて検討した結果、同じワクチン抗原を 20000~40000 倍に希釈しても陽性と判定できた。より高感度な測定法としてワクチンの力価測定に有用である。

### 3) 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

粘膜投与等の新投与経路型ワクチンのモデルとしては、TLR リガンド (合成二重鎖 RNA) などのアジュバントが添加されたワクチンである。このようなワクチンは、抗原提示細胞における抗原提示能力やタイプ I 型インターフェロン産生能力などの免疫誘導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 (免疫抗原の質・量および免疫誘導能力) に関する評価と管理が求められる。しかしながら、アジュバント含有ワクチンの免疫原性についての評価は、不活化全粒子インフルエンザワクチンのたん白質、脂質及び核酸に由来する免疫誘導能力や TLR リガンドに由来する免疫誘導能力についての評価は未だ不十分である。そこで、本研究ではこれまでに転写因子 (NF- $\kappa$ B) の下流にレポーター遺伝子 (SEAP: secreted embryonic alkaline phosphatase) を組み込んだヒト由来モノサイト (THP 細胞) 細胞株を用いて、ヒト培養細胞に対する不活化型全粒子インフルエンザウイルス由来の免疫誘導能力と様々な TLR リガンドの免疫誘導能力を評価してきた。本年度は、スプリット、全粒子、アラムアジュバント添加インフルエンザワクチンの NF- $\kappa$ B 活性化と IL-1 $\beta$ 、IFN- $\beta$  および IL-18 産生について

解析した。不活化型全粒子新型インフルエンザワクチンおよびスプリットインフルエンザワクチンでは、共に IL-1 $\beta$  と IFN- $\beta$  の産生を認めた。これにアルミニウムアジュバントが加えられた製剤の場合は IL-18 の産生も認められ、inflammasome (NALP3) を介する IL-1 $\beta$  の産生も付け加えられていると考えられた。予備実験ではこれに様々なアジュバントを加えた場合、NF- $\kappa$ B 活性化を介した IL-1 $\beta$  産生が増強される場合と inflammasome (NALP3) を介する IL-1 $\beta$  産生が誘導される場合とがあることを示唆する結果が得られた。

#### D. 結論

(1) ワクチン製剤における粘膜アジュバントの品質管理上、ワクチンに添加される粘膜アジュバントは単一成分であることが望ましい。メシマコブ菌糸体の抽出液に含まれる経鼻接種型インフルエンザワクチンにおける粘膜アジュバント活性をモデルとして、どの成分によりもたらされるのかを探索し、熱湯抽出段階の上清に高いアジュバント活性が認められ分子量 12,000 以上の分子であることを明らかにした。

(2) H5 亜型 HA 特異的なモノクローナル抗体を組み合わせる H5 亜型特異的な HA 含量を定量検出するサンドイッチ ELISA を特殊なアビジン吸着繊維を使用する系を用いて、ワクチンの有効成分の含量測定をより高感度にすることができた。

(3) TLR リガンド感受性を有する指示細胞を使用して IL-1 $\beta$ 、IFN- $\beta$  および IL-18 産生を指標としてスプリット、全粒子、アラムアジュバント添加インフルエンザワクチンについて測定したところ、ワクチンの剤形による免疫原性の指標として有用であることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Hasegawa H, Ichinohe T, Aina A, Tamura S, Kurata T. Development of an inactivated mucosal vaccine for H5N1 influenza virus. *Ther Clin Risk Manag.* 2009 Feb;5(1):125-32.
2. Takahashi Y, Hasegawa H, Hara Y, Ato M, Ninomiya A, Takagi H, Odagiri T, Sata T, Tashiro M, Kobayashi K. Protective immunity afforded by H5N1 (NIBRG-14)-inactivated vaccine requires both antibodies against hemagglutinin and neuraminidase in mice. *J Infect Dis.* 2009 Jun 1;199(11):1629-37.
3. Ichinohe T, Aina A, Tashiro M, Sata T, Hasegawa H PolyI:polyC12U adjuvant-combined intranasal vaccine protects mice against highly pathogenic H5N1 influenza virus variants *Vaccine* 2009 Oct 23;27(45):6276-9.
4. Ichinohe T, Aina A, Nakamura T, Akiyama Y, Maeyama J, Odagiri T, Tashiro M, Takahashi H, Sawa H, Tamura S, Chiba J, Kurata T, Sata T, and Hasegawa H Induction of cross-protective immunity against influenza A virus H5N1 by intranasal vaccine with extracts of mushroom mycelia *J Med Virol.* 82:128-137, 2010.
5. Aina A, Ichinohe T, Tamura S, Kurata T, Sata T, Tashiro M and Hasegawa H Zymosan enhances the mucosal adjuvant activity of Poly(I:C) in a nasal influenza vaccine *J*

- Med Virol. J Med Virol. 2010 Mar;82(3):476-84.
6. Tamura S, Hasegawa H, Kurata T. Estimation of the effective doses of nasal-inactivated influenza vaccine in humans from mouse-model experiments. *Jpn J Infect Dis.* 2010 Jan;63(1):8-15.
  7. Yamamoto, T., Samri, A., Mitsuki, Y-Y., Mizukoshi, F., Kobayashi, K., Inoue, J.-I., Autran, B. and Tsunetsugu-Yokota, Y.: siRNA inhibiting HIV-1 reactivation restores function of HIV-specific CD4+ T cells in chronically HIV-infected individuals. *AIDS*, 23:2265-2275, 2009
  8. Konno, H., Yamamoto, T., Yamazaki, K., Gohda, J., Akiyama, T., Semba, K., Goto, H., Kato, A., Yujiri, T., Imai, T., Kawaguchi, Y., Su, B., Takeuchi, O., Akira, S., Tsunetsugu-Yokota, Y., Inoue, J-I.: TRAF6 established innate immune responses by activating NF-kB and IRF7 upon sensing cytosolic viral RNA and DNA. *PLoS One*, 4:e5674, 2009
  9. Terahara, K., Yoshida, M., Taguchi, F., Igarashi, O., Nochi, T., Gotoh, Y., Yamamoto, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Beauchemin, N., Kiyono, H.: Expression of newly identified secretory CEACAM1 isoforms in the intestinal epithelium. *BBRC*, 383:340-346, 2009
  10. Yamamoto, T., Iwamoto, N., Yamamoto, H., Tsukamoto, T., Kuwano, T., Takeda, A., Kawada, M., Tsunetsugu-Yokota, Y., Matano, T.: Polyfunctional T-cell induction in neutralizing antibody-triggered simian immunodeficiency virus control., *J. Virol.*, 83:5514-5524, 2009
  11. Ikeno D, Kimachi K, Kudo Y, Goto S, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Kino Y. A prime-boost vaccination of mice with heterologous H5N1 strains. *Vaccine* 27: 3121-3125 (2009)
  12. 緒方剛、山崎良直、岡部信彦、中村好一、田代真人、永田紀子、板村繁之、安井良則、中島一敏、土井幹雄、泉陽子、藤枝隆、大和慎一、川田論一、一般住民のインフルエンザ予防接種歴とH5N2鳥インフルエンザウイルス中和抗体 厚生省の指標 56: 33-38 (2009)
  13. 板村繁之: インフルエンザワクチン. 化学療法領域 25: 1453-1458 (2009)
  14. 板村繁之: インフルエンザワクチンの現状と課題. 診断と治療 97: 2073-2077 (2009)
  15. 影山努、板村繁之: 新型インフルエンザウイルス. 臨床と微生物 36: 193-198 (2009)
  16. 信澤枝里、板村繁之: 新型インフルエンザに対するワクチン開発. 呼吸器内科 17:51-57 (2010)
2. 学会発表
1. 相内章、一戸猛志、田村慎一、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹 経鼻インフルエンザワクチンによおける Zymosan 添加によるアジュバント活性の亢進 第 13 回日本ワクチン学会学術集会 2009 年 9 月札幌
  2. 長谷川秀樹、相内章、網康至、永田典代、田村慎一、谷本武史、真鍋貞夫、石川豊数、宮崎隆、小田切孝人、田代真人、倉田毅、佐多徹太郎 経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンの剤形と効果検討 第 13 回日本ワクチン学会学術集会 2009 年 9 月札幌
  3. 相内章、伊藤良、岸田典子、小淵正次、高下恵美、小田切孝人、千葉丈、田村慎一、倉田毅、佐多徹太郎、田代真人、長谷川秀樹 経鼻インフルエンザワクチンの新型インフルエンザウイルスに対する交叉防御能の検討 第 57 回日本ウイルス学会学術集会 2009 年 10 月東京
  4. 長谷川秀樹、相内章、永田典代、岩田奈緒子、網康至、小淵正次、岸田典子、小田切孝人、佐多徹太郎、田代真人 新型インフルエンザ

- H1N1 のフェレットにおける病原性の検討 第 57 回日本ウイルス学会学術集会 2009 年 10 月東京
5. 光木裕也、水越文徳、渋沢謙太郎、寺原和孝、竹田誠、柳雄介、森川裕子、山岡昇司、横田(恒次) 恭子：HIV-1 感染と麻疹ウイルス感染が相互の及ぼす影響およびその機構の解析、第 57 回ウイルス学会、東京、平成 21 年 11 月。
  6. 岩田奈織子、永田典代、辻隆裕、長谷川秀樹、佐藤由子、横田恭子、水谷哲也、西條政幸、森川茂、佐多徹太郎：SARS-CoV 感染動物モデルを用いた UV 不活化 SARS-CoV の免疫効果と副反応について、第 57 回ウイルス学会、東京、平成 21 年 11 月。
  7. 森一泰、杉本知恵、横田恭子、鈴木康夫、山本直樹、永井美之：糖鎖修飾による組織・細胞指向性はエイズウイルスの病原性・感染防御免疫誘導を決定する、第 57 回ウイルス学会、東京、平成 21 年 11 月。
  8. 渋沢謙太郎、光木裕也、寺原和孝、柳雄介、小林和夫、横田(恒次) 恭子：樹状細胞を標的とした HIV-1 増殖抑制 shRNA 発現レンチウイルスの開発、第 39 回日本免疫学会、大阪、平成 21 年 12 月。
  9. 土屋貴嗣、光木裕也、寺原和孝、渋沢謙太郎、小林和夫、渡邊俊樹、横田(恒次) 恭子：CD4 標的レンチウイルスベクターの開発、第 32 回日本分子生物学会、横浜、平成 21 年 12 月。
  10. 原田勇一、高橋仁、佐藤佳代子、信澤枝里、河野直子、板村繁之、田代真人、奥野良信、佐々木学、庵原俊昭、小田切孝人：沈降 H5N1 インフルエンザワクチン接種者の野生型ウイルス株に対する抗体応答の評価 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月
  11. 河野直子、板村繁之、小田切孝人、田代真人：インフルエンザワクチンの力価測定に用いる一元放射免疫拡散 (SRD) 試験法の精度評価 第 13 回日本ワクチン学会学術集会、札幌、2009 年 9 月
  12. 高橋仁、原田勇一、佐藤佳代子、河野直子、板村繁之、田代真人：インフルエンザワクチンの力価測定に使用する標準抗原の HA 含量決定に重要な HA 含有率のエンドグリコシダーゼを用いた測定法の検討 第 13 回日本ワクチン学会学術集会、札幌、2009 年 9 月
  13. 池野大介、来海和彦、工藤康博、後藤修郎、板村繁之、小田切孝人、田代真人、城野洋一郎：マウスを用いた H5N1 株インフルエンザワクチンのプライムブースト効果の検討 第 13 回日本ワクチン学会学術集会、札幌、2009 年 9 月
  14. 原田勇一、河野直子、板村繁之、小田切孝人、城野洋一郎、五反田亨、多田善一、池田富夫、田代真人：沈降新型インフルエンザワクチン (H5N1 株) 接種者の血清ウイルス中和抗体の交差反応性の検討 第 13 回日本ワクチン学会学術集会、札幌、2009 年 9 月
  15. 板村繁之：シンポジウム「インフルエンザワクチン」パンデミックワクチンの現状と課題 第 13 回日本ワクチン学会学術集会、札幌、2009 年 9 月
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
1. 特許取得
 

出願中 特許 2010-122480



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  
に関する研究

分担研究者： 長谷川 秀樹（国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター）

研究協力者： 相内 章（国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター）

研究要旨：インフルエンザワクチンの経鼻接種は、インフルエンザウイルスの感染の場となる気道粘膜上に分泌型 IgA 抗体を誘導し、感染自体を阻止する。この免疫応答を誘導するためには、免疫系を活性化する目的でワクチンに粘膜アジュバントを添加する必要がある。新規粘膜アジュバントの探索過程で、キノコ菌糸体抽出液に粘膜アジュバント活性があることが示され、中でもメシマコブ（学名 *Phellinus linteus*）菌糸体の抽出液がその活性が優れていることを明らかにした。菌糸体抽出物は天然由来で安定性に優れており活性成分の同定により安定した品質のワクチン開発が期待される。本研究では、メシマコブ菌糸体抽出液において粘膜アジュバント活性を示す分子の同定を試みた。その結果、熱湯抽出で得られる分子量 12,000 以上の分子にアジュバント活性があることが示唆された。

A. 研究目的

これまでの経鼻噴霧型インフルエンザワクチン接種に必要とされる粘膜アジュバントの探索の過程で、キノコ菌糸体抽出液に粘膜アジュバント活性があることを明らかにした。また、これらの物質は、マウス骨髄細胞から誘導した樹状細胞に添加することで、TNF- $\alpha$  の産生を強く誘導することも明らかにした。

ワクチン製剤における粘膜アジュバントとしての品質管理上、ワクチンに添加される粘膜アジュバントは精製された単一成分であることが望ましい。本研究では、メシマコブ菌糸体抽出液中の粘膜アジュバント活性を示す分子を明らかにすることを目的とし、抽出法を変えて得られるサンプル、あるいは分子量サイズで分離したサンプルに関してマウス骨髄細胞由来の樹状細胞からの TNF- $\alpha$  産生能を指標とし

て、もつとも効果の高い分画を同定することを目的とした。

B. 研究方法

材料と方法：

キノコ抽出液

メシマコブ（学名 *Phellinus linteus*, PL）の菌糸体抽出液を用いた。菌糸体からの総抽出液として定法により抽出された PL-2C、および高温高圧下で抽出された PL-2T を用いた。

また、段階的に抽出された分画サンプルとして、以下の 5 サンプルを用いた。エタノール抽出で得られる上清（①；PL-EtOH）。この沈殿に関して滅菌水で抽出を行い得られる上清（②；PL-WA）とこの抽出液に対してエタノール沈殿法により得られた沈殿物（③；PL-WA-Ppt.）。滅菌水抽出で得られた沈殿物に

関して、熱湯抽出を行い得られた上清 (④ ; PL-BW) とこの抽出液に対してエタノール沈殿法により得られた沈殿物 (⑤ ; PL-BW-Ppt.)。

さらに抽出液において分子量サイズにより分画した、PL-2 MW $\geq$ 12,000 と PL-2 MW $<$ 12,000 を用いた。

#### 樹状細胞の誘導と刺激の添加

6-12 週齢の BALB/c マウス (雌) の大腿骨および脛骨から骨髓細胞を回収し、10 ng/ml の GM-CSF を添加した RPMI1640 培地で培養することで樹状細胞を分化・誘導した。培養開始 3 日目に GM-CSF を含む培地を添加し、6、8 および 10 日目に培養上清を半量交換した。培養開始 10 あるいは 11 日目に細胞を回収し、樹状細胞 (BMDCs) として利用した。

回収した樹状細胞を  $5 \times 10^5$  細胞ずつ 24 穴プレートに播き込み、キノコからの抽出分画液を 500  $\mu$ g 添加した。培養 24 時間後の培養上清を回収し、各サイトカインの発現量を定量した。

#### 各サイトカインの定量

培養上清中の TNF- $\alpha$  濃度は、ELISA により測定した。

#### C. 研究結果

これまでの実験から明らかになった PL 抽出液の経鼻接種型インフルエンザワクチンにおける粘膜アジュバント活性が、PL 菌糸体中のどの成分によりもたらされるのかを探索するため、本実験では PL 菌糸体から段階的な抽出により得られる抽出液を用いた。マウス骨髓細胞から誘導した樹状細胞に対し、メシマコブ菌糸体から得られる抽出液を添加により刺激することで、TNF- $\alpha$  の産生を測定した (図 1)。

キノコ菌糸体から総抽出液を得る場合においては、高温高圧下で抽出した改変法よりも通常の抽出法により得られるサンプルの方が TNF- $\alpha$  の誘導効率が高いことが明らかになった (図 1)。また段階的な抽出法においては、熱湯抽出段階にて得られる上清に TNF- $\alpha$  誘導能があることが明らかになった (図 1)。

次に、PL-2C 抽出液を分子量サイズで分離したサンプルを用いて TNF- $\alpha$  の産生を測定した (図 2)。この結果、分子量 12,000 以上のフラクションにおいて、TNF- $\alpha$  産生の誘導効率が高いことが示された (図 2)。

#### D. 考 察

ワクチン製剤における粘膜アジュバントとしての品質管理上、ワクチンに添加される粘膜アジュバントは精製された単一成分であることが望ましい。我々はキノコ菌糸体抽出液に高い粘膜アジュバント活性があることを明らかにした。この抽出液を粘膜アジュバントとしてワクチンに応用することを考える場合には、まずアジュバント活性に寄与する分子を同定することが必要である。本研究では、この分子の性質を明らかにすることを目的として、各抽出段階におけるサンプルと分子量サイズで分画したサンプルを用いて検討を行った。高圧下での抽出では BMDCs からの TNF- $\alpha$  産生を誘導することはできなかったが、通常法における熱湯抽出段階の上清に高い TNF- $\alpha$  産生能が認められた。加熱に対して非常に安定であることが示唆され、冷蔵施設がない地域へのワクチン供給の際には非常に有効なアジュバントになりうることが期待できる。また分子量サイズで分画したサンプルの比較からは、分子量 12,000 以上の分子であることが明らかになった。今後、さらに解析を行い、分子を同定することができ

れば、熱に安定で有効な粘膜アジュバントになると期待できる。

#### E. 結論

マウス骨髄細胞由来樹状細胞を用いた実験系により、メシマコブ菌糸体の総抽出液が示した高い粘膜アジュバント活性は、熱湯抽出により得られる分子量 12,000 以上の成分であることが明らかになった。

#### F. 健康危険情報

とくになし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Hasegawa H, Ichinohe T, Ainai A, Tamura S, Kurata T. Development of an inactivated mucosal vaccine for H5N1 influenza virus. *Ther Clin Risk Manag.* 2009 Feb;5(1):125-32.
2. Takahashi Y, Hasegawa H, Hara Y, Ato M, Ninomiya A, Takagi H, Odagiri T, Sata T, Tashiro M, Kobayashi K. Protective immunity afforded by H5N1 (NIBRG-14)-inactivated vaccine requires both antibodies against hemagglutinin and neuraminidase in mice. *J Infect Dis.* 2009 Jun 1;199(11):1629-37.
3. Ichinohe T, Ainai A, Tashiro M, Sata T, Hasegawa H PolyI:polyC12U adjuvant-combined intranasal vaccine protects mice against highly pathogenic H5N1 influenza virus

variants *Vaccine*2009 Oct 23;27(45):6276-9.

4. Ichinohe T, Ainai A, Nakamura T, Akiyama Y, Maeyama J, Odagiri T, Tashiro M, Takahashi H, Sawa H, Tamura S, Chiba J, Kurata T, Sata T, and Hasegawa H Induction of cross-protective immunity against influenza A virus H5N1 by intranasal vaccine with extracts of mushroom mycelia *J Med Virol.* 82:128-137, 2010.
5. Ainai A, Ichinohe T, Tamura S, Kurata T, Sata T, Tashiro M and Hasegawa H Zymosan enhances the mucosal adjuvant activity of Poly(I:C) in a nasal influenza vaccine *J Med Virol. J Med Virol.* 2010 Mar;82(3):476-84.
6. Tamura S, Hasegawa H, Kurata T. Estimation of the effective doses of nasal-inactivated influenza vaccine in humans from mouse-model experiments. *Jpn J Infect Dis.* 2010 Jan;63(1):8-15.

7.

##### 2. 学会発表

1. 相内章、一戸猛志、田村慎一、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹 経鼻インフルエンザワクチンによおける Zymosan 添加によるアジュバント活性の亢進 第 13 回日本ワクチン学会学術集会 2009 年 9 月札幌
2. 長谷川秀樹、相内章、網康至、永田典代、田村慎一、谷本武史、真鍋貞夫、石川豊数、宮崎隆、小田切孝人、田代真人、倉田毅、佐多徹太郎 経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンの剤形と効果検討

第 13 回日本ワクチン学会学術集会 2009  
年 9 月札幌

3. 相内章、伊藤良、岸田典子、小渕正次、  
高下恵美、小田切孝人、千葉丈、田村慎  
一、倉田毅、佐多徹太郎、田代真人、長  
谷川秀樹 経鼻インフルエンザワクチ  
ンの新型インフルエンザウイルスに対  
する交叉防御能の検討 第 57 回日本ウ  
イルス学会学術集会 2009 年 10 月東京
4. 長谷川秀樹、相内章、永田典代、岩田奈  
緒子、網康至、小渕正次、岸田典子、小  
田切孝人、佐多徹太郎、田代真人 新型

インフルエンザ H1N1 のフェレットにお  
ける病原性の検討 第 57 回日本ウイル  
ス学会学術集会 2009 年 10 月東京

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

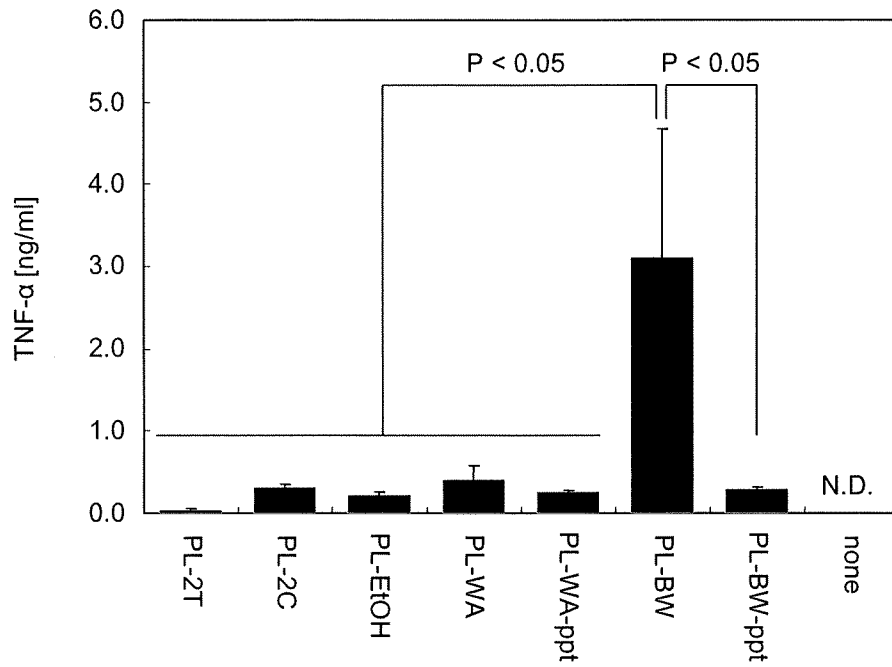


図 1. *Phellinus linteus* の各抽出段階サンプルによる BM-DCs からの TNF- $\alpha$  産生の比較

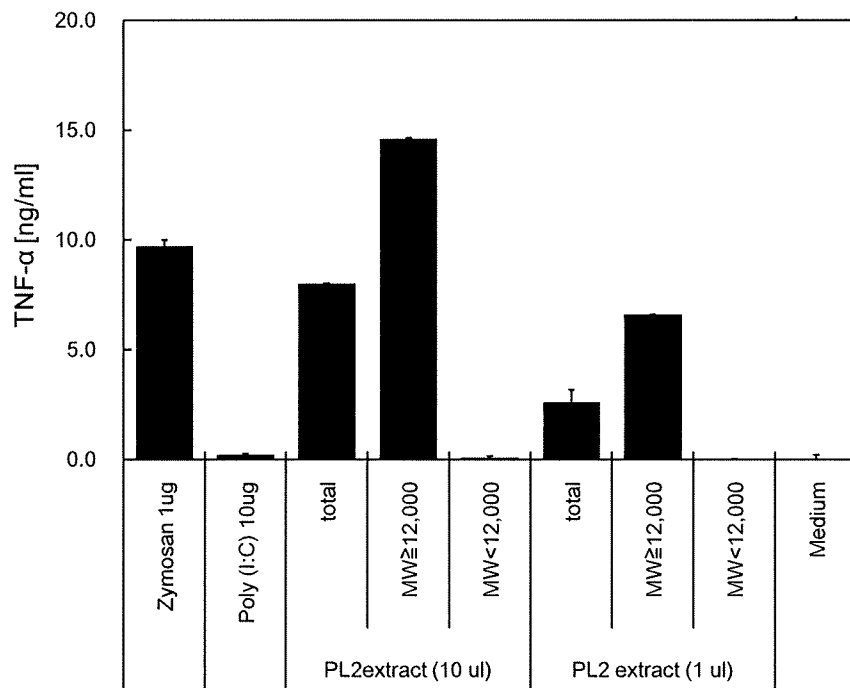


図 2. *Phellinus linteus* 抽出液における分子量の違いによる BM-DCs からの TNF- $\alpha$  産生の比較

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

協力研究者 高橋 宜聖 免疫部・主任研究官

協力研究者 三澤 修平 東洋紡(株)・敦賀バイオ研究所

**研究要旨** 免疫部で確立したH5N1 ワクチン株(NIBRG-14)のHAに反応するモノクローナル抗体6つはそれぞれ特徴を持ち、全てのクレードのウイルスを中和するものもあった。また、今年度開発した化学発光検出系は更に感度を高めることにより、現場での鑑別診断やワクチンの品質管理にも役立てることが可能と思われた。

#### 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. モノクローナル抗体の作成

抗HA抗体を産生するハイブリドーマを無血清培地(GIBCO-Invitrogen)で増殖させ、その培養上清に産生するモノクローナル抗体をプロテインAアフィニティーカラムで精製した。

##### 2. 抗原検出

1次抗体として1A1と2C2を組合わせて様々な濃度に調整し、ビオチン化した2次抗体(OM-b)を用いるエライザの系はTMB(+)基質を加え、エライザリーダーのOD<sub>450</sub>で検出した。東洋紡の装置を用いる系はビオチン化した抗体(OM-b)ともう一つの抗体をalkaline phosphatase標識して抗原と同時に混合し、アビジン付着フィルター上で反応させるもので、検出は化学発光である。

##### 3. 抗体の中和活性

段階希釈した抗体を100TCID<sub>50</sub>のウイルス液と37度で30分反応させ、MDCK細胞に接種した。3日~5日培養し、細胞のCPEを観測判定した。

#### C. 研究結果

作成したモノクローナル抗体の中和抗体力価を測定した結果、表1にあるようにYH-1A1は免疫したNIBRG-14に対する中和活性が最も高く、次いでAY-2C2であった。AY-2C2はウエスタンブロットでは抗原に反応しないことがわかっており、この抗体はHAの立体構造を認識すると考えられる。エライザの系でクレード1と2.1の

H5HAに反応していたのはAY-2C2, OM-a, OM-bの3つであったが、AY-2C2とOM-bはそれ以外のクレード2.2と2.3のウイルスも中和可能であった。YH-1A1はクレード1に特異的と考えていたが、クレード2.2のウイルスも中和した。

1A1と2C2をcapture抗体とし、ビオチン化したOM-bを用いたサンドイッチエライザでは、バキュロ組換えHA蛋白にして100ng/ml、ウイルス全粒子の場合、ベトナム(NIBRG-14)株で50ng/ml、インドネシア(Indo-RG)株で20ng/ml程度の抗原が限界で、ワクチン抗原(RT-PCRで1~3x10<sup>10</sup>)を1000倍希釈すると全く検出できなかった。感度を更に高めるため、マイクロビーズの系を試したが、改善できなかった。しかしながら、東洋紡の開発した特殊なアビジン吸着繊維を使用する系に我々の作成したOM-bを用いて共同で検討した結果、同じワクチン抗原を20000~40000倍に希釈しても陽性と判断可能であった。これは既存の簡易診断キットよりも40~100倍高感度であり、高感度簡易診断キットとして有望である。

#### 考察。

作成した抗H5HA抗体はそれぞれ異なった特徴を有していた。これらの抗体が認識するエピトープが立体構造として明らかとなれば、どういふエピトープを認識すればクレードの差に関係なく診断に利用できるのかが確認でき、今後の高感度簡易診断キットの開発に有用な情報を提供するであろう。

今回検出感度が増強できた理由として、我々の作製した、OM-b抗体がUV不活化したH5N1

ワクチン株 NIBRG-14 粒子を免疫原として作成されたのに対し、組み合わせた抗体は他施設で確立された H5N7 鳥インフルエンザ抗原に対する抗 H5 抗体である、更に、検出系が化学発光であることが考えられる。この系はワクチンの品質管理だけでなく、臨床現場での感染者の簡易鑑別診断にも応用できると期待される。

#### E. 結論

我々が確立した H5 型 HA 特異的なモノクローナル抗体はそれぞれ特徴を持ち、全てのクレードのウイルスを中和するものもあった。また、今年度開発した化学発光検出系は更に感度を高めることにより、現場での鑑別診断やワクチンの品質管理にも役立てることが可能となった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yamamoto, T., Samri, A., Mitsuki, Y.-Y., Mizukoshi, F., Kobayashi, K., Inoue, J.-I., Autran, B. and Tsunetsugu-Yokota, Y.: siRNA inhibiting HIV-1 reactivation restores function of HIV-specific CD4+ T cells in chronically HIV-infected individuals. *AIDS*, 23:2265-2275, 2009
- 2) Konno, H., Yamamoto, T., Yamazaki, K., Gohda, J., Akiyama, T., Semba, K., Goto, H., Kato, A., Yujiri, T., Imai, T., Kawaguchi, Y., Su, B., Takeuchi, O., Akira, S., Tsunetsugu-Yokota, Y., Inoue, J.-I.: TRAF6 established innate immune responses by activating NF-kB and IRF7 upon sensing cytosolic viral RNA and DNA. *PLoS One*, 4:e5674, 2009
- 3) Terahara, K., Yoshida, M., Taguchi, F., Igarashi, O., Nochi, T., Gotoh, Y., Yamamoto, T.,

Tsunetsugu-Yokota, Y., Beauchemin, N., Kiyono, H.: Expression of newly identified secretory CEACAM1 isoforms in the intestinal epithelium. *BBRC*, 383:340-346, 2009

- 4) Yamamoto, T., Iwamoto, N., Yamamoto, H., Tsukamoto, T., Kuwano, T., Takeda, A., Kawada, M., Tsunetsugu-Yokota, Y., Matano, T.: Polyfunctional T-cell induction in neutralizing antibody-triggered simian immunodeficiency virus control. *J. Virol.*, 83:5514-5524, 2009

##### 2. 学会発表

- 1) 光木裕也、水越文徳、渋沢謙太郎、寺原和孝、竹田誠、柳雄介、森川裕子、山岡昇司、横田(恒次) 恭子：HIV-1感染と麻疹ウイルス感染が相互の及ぼす影響およびその機構の解析、第57回ウイルス学会、東京、平成21年11月。
- 2) 岩田奈織子、永田典代、辻隆裕、長谷川秀樹、佐藤由子、横田恭子、水谷哲也、西條政幸、森川茂、佐多徹太郎：SARS-CoV感染動物モデルを用いたUV不活化SARS-CoVの免疫効果と副反応について、第57回ウイルス学会、東京、平成21年11月。
- 3) 森一泰、杉本知恵、横田恭子、鈴木康夫、山本直樹、永井美之：糖鎖修飾による組織・細胞指向性はエイズウイルスの病原性・感染防御免疫誘導を決定する、第57回ウイルス学会、東京、平成21年11月。
- 4) 渋沢謙太郎、光木裕也、寺原和孝、柳雄介、小林和夫、横田(恒次)恭子：樹状細胞を標的としたHIV-1増殖抑制shRNA発現レンチウイルスの開発、第39回日本免疫学会、大阪、平成21年12月。
- 5) 土屋貴嗣、光木裕也、寺原和孝、渋沢謙太郎、小林和夫、渡邊俊樹、横田(恒次)恭子：CD4 標的レンチウイルスベクターの開発、第32回日本分子生物学会、横浜、平成21年12月。

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得  
出願中 特許 2010-122480
2. 実用新案登録  
なし

表1 免疫部で確立した抗 H5HA 抗体の遺伝子構造と中和力価

抗 H5HA 抗体名	IgG 遺伝子構造*		中和抗体価 (ng/0.05 mL)**			
	VH gene	JH gene#	NIBRG-14	Indo-RG2	NIBRG-23	Anhui-RG5
AY-2C2	1023210	2 (7)	313	313	156	2500
YH-1A1	102478	4 (4)	78	>10000	625	>10000
OM-a	1023210	4 (10)	625	625	313	>10000
OM-b	1023210	4 (8)	625	625	313	5000
OM-c	ND	ND	625	>10000	>10000	>10000
YH-2F11	356707	4 (5)	ND	ND	ND	ND

\*抗体遺伝子データベース番号 (number of point mutations)

\*\*ウイルス 3 部での試験結果



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 主任研究官

研究要旨：人由来モノサイト細胞株（THP-1細胞株）およびマウス脾臓組織切片を用いて不活化全粒子型新型インフルエンザワクチンおよびHAワクチンの免疫誘導能力をIL-1 $\beta$ 産生を指標に調べた。

笠井道之、国立感染症研究所、血液・安全性研究部、主任研究官

A. 研究目的：不活化型全粒子型インフルエンザワクチンおよびHA型インフルエンザワクチンの免疫誘導能力の評価は一次が抗体産生誘導によるHA抗原量の評価のみであり、ワクチンに含まれる脂質及び核殻などのTLRリガンドなどに由来する免疫誘導能力の評価は未だ不十分である。それらのワクチンに由来する免疫誘導能力を評価し、アジュバントの含有量を管理することを目的として、人由来モノサイト（THP細胞）細胞株のIL-1 $\beta$ 産生を指標に不活化型全粒子型インフルエンザワクチンとHAワクチンの免疫誘導能力を評価した。さらに、マウス組織標本を用いてIL-1 $\beta$ 産生量と反応細胞を調べ、免疫誘導能力の評価系がマウスを用いたin vivoにおいても有用であることを示した。

B. 研究方法：転写因子（NF- $\kappa$ B）の下流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invivogenより購入し、manufacture's protocolに従い培養した。この細胞はTLR2, 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。c1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- $\kappa$ B因子の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- $\kappa$ B因子の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IL-1 $\beta$ とIFN- $\beta$ の産生をELISAにて測定した。また、様々なワクチンにおけるIL-1 $\beta$ 、IFN- $\beta$ およびIL-18の産生量をPMAによりマクロファージ化したTHP-1細胞を用いた。In vivoでのIL-1 $\beta$ 産生を指標とした免疫誘導能力を調べるために、マウス腹腔内にHAワクチンを0.5ml投与し、一日後に脾臓などの臓器をホルマリン固定後、組織切片を作成し、組織の賦活化した後、免疫組織染色を行った。（倫理面への配慮）特になし。

C. 研究結果：抗原提示細胞によるIL-1 $\beta$ 産生はNF- $\kappa$ B転写因子を介する場合とinflammasome (NALP3)を介する場合の二通りあることが判明している。

PMAによりマクロファージ化した細胞は、Pam3CSK4 (TLR1/2), HKLM (TLR2), LPS (TLR4), FSL1 (TLR2/6), ssRNA40 (TLR8)各TLRリガンドに反応し、NF- $\kappa$ B活性を検出した。ODN2006 (TLR9)に対しては弱いNF- $\kappa$ B活性を検出した（図1A）。一方、polyI:C (TLR3), CLO87 (TLR7)のTLRリガンドに対してはNF- $\kappa$ B活性を示さなかった。培養上清中のIL-1 $\beta$ とIFN- $\beta$ の量を測定したところ、Pam3CSK4 (TLR1/2), HKLM (TLR2), LPS (TLR4), FSL-1 (TLR2/6), ssRNA40 (TLR8)の各リガンドに対しIL-1 $\beta$ を産生した。

LPS (TLR4) とssRNA40 (TLR8) の場合に限りIFN- $\beta$ 産生を認めた。ODN2006 (TLR9) の場合、IL-1 $\beta$ とIFN- $\beta$ は共にほとんど産生されていなかった（図1B）。TLRを介するIL-1 $\beta$ の産生はNF- $\kappa$ B活性化を介する経路であると考えられた。不活化型全粒子型インフルエンザワクチンおよびHA型インフルエンザワクチンをマクロファージ化したTHP-1細胞に投与した場合、共にIL-1 $\beta$ とIFN- $\beta$ の産生を認めた。これにアルミニウムアジュバントが加えられた製剤の場合にはIL-18の産生が認められ、inflammasome (NALP3)を介するIL-1 $\beta$ の産生も付加えられていると考えられた（図2）。HA型インフルエンザワクチンのIL-1 $\beta$ を指標にした免疫誘導能力をin vivoで確認するため、脾臓におけるIL-1 $\beta$ の免疫組織染色をしたところ、白細胞の間質細胞がIL-1 $\beta$ 陽性であった。さらに、同じ部分においてNF- $\kappa$ Bも陽性であった（図3）。予備実験ではこれに様々なアジュバントを加えた場合、NF- $\kappa$ B活性化を介したIL-1 $\beta$ 産生が増強される場合とinflammasome (NALP3)を介するIL-1 $\beta$ 産生が誘導される場合があることを示唆する結果が得られており、さらに検討を進めている。

D. 考察：PMA処理によりマクロファージ化したTHP-1細胞のIL-1 $\beta$ の産生は、不活化型全粒子型インフルエンザワクチンの場合はその脂質と核殻成分、HA型インフルエンザワクチンの場合はその核殻成分とTLRとの相互作用によりNF- $\kappa$ B活性化を介して行われると考えられる。アジュバントはその作用を増強すると共にアジュバントの組成によりNF- $\kappa$ B活性化を介したIL-1 $\beta$ 産生を増強する場合とそれに加えてinflammasome (NALP3)を介するIL-1 $\beta$ 産生も誘導する場合があることが示唆され、ワクチンの品質管理にはそれぞれの経路を介する活性化のバランスをコントロールすることが必要であると考えられた。

E. 結論：人由来モノサイト細胞株（THP-1細胞株）を用いたIL-1 $\beta$ 産生量の測定およびマウス脾臓組織切片を用いたIL-1 $\beta$ およびIL-18産生細胞の特定と定量を指標にして、不活化全粒子型インフルエンザワクチンおよびHAワクチンの免疫誘導能力を管理することが可能である。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表：

第39回 日本免疫学会総会・学術集会 2009年

12月

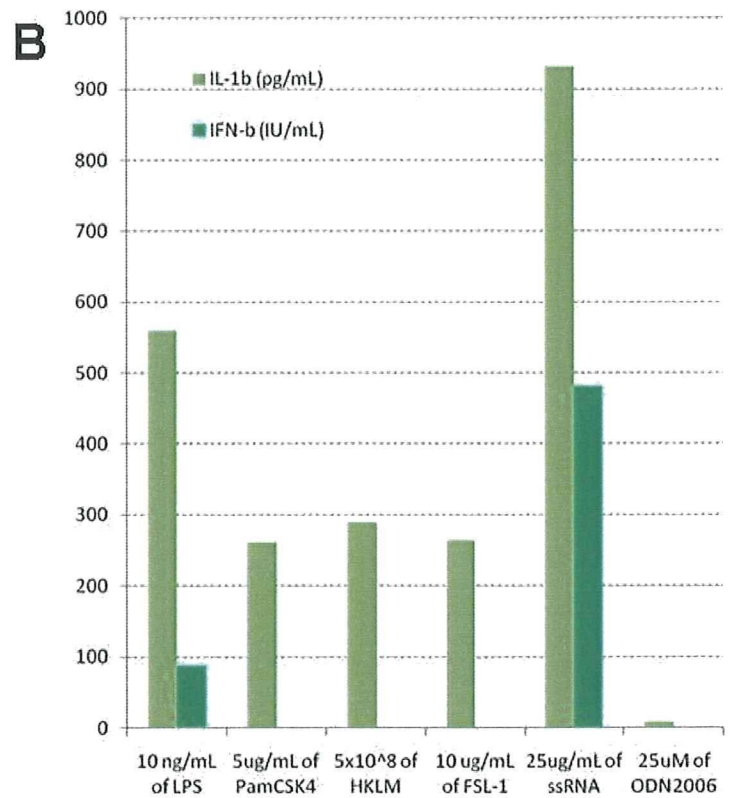
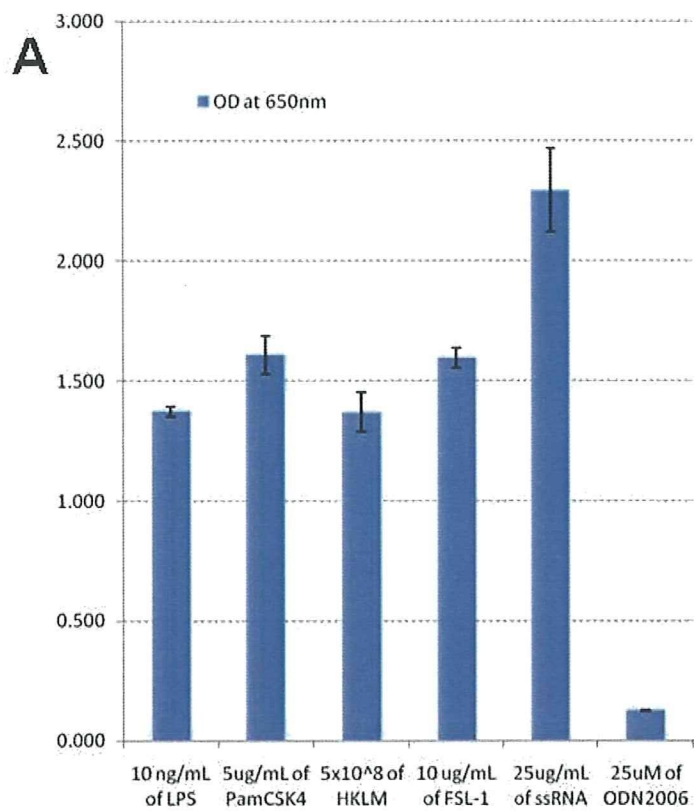
H. 知財権産権の出願・登録状況

特になし。

1. 特許取得

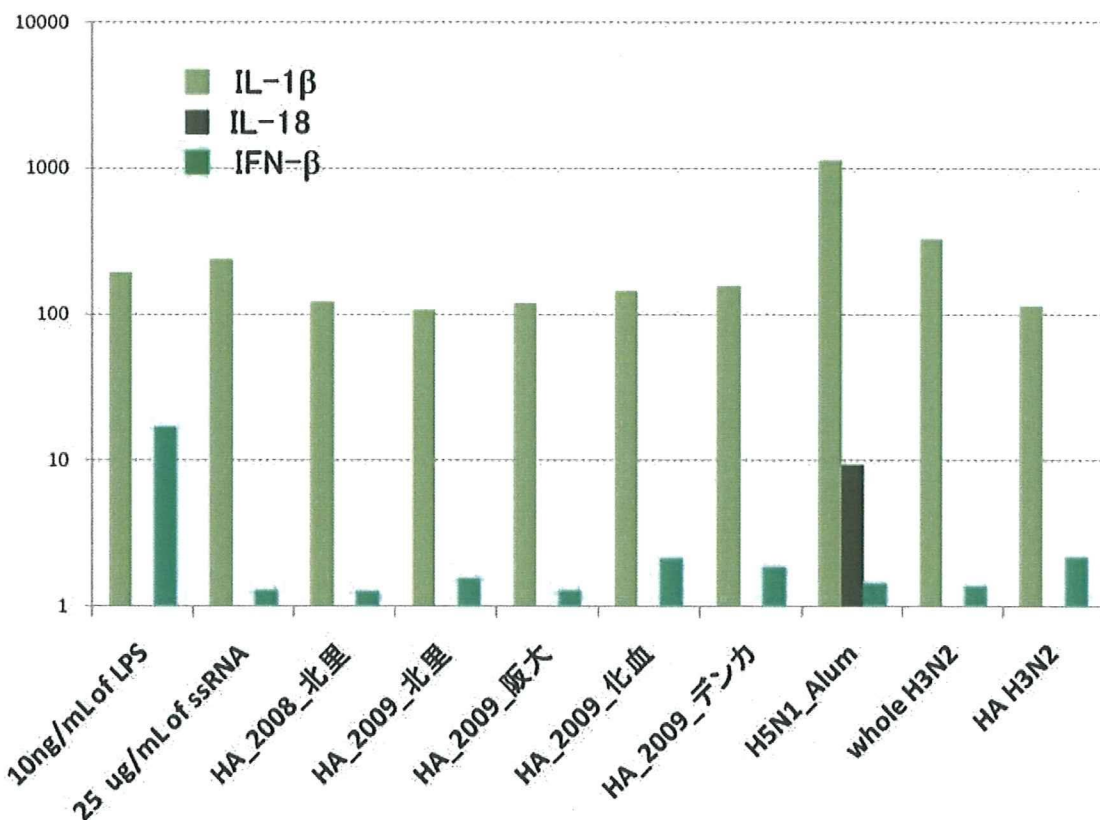
2. 実用新案登録

3. その他



**Figure 1:**

様々なTLRリガンドをPMA刺激によりマクロファージ化したTHP-1細胞に投与後、NF-κB活性測定(A)とサイトカイン(IL-1bおよびIFN-b)定量(B)を行った。

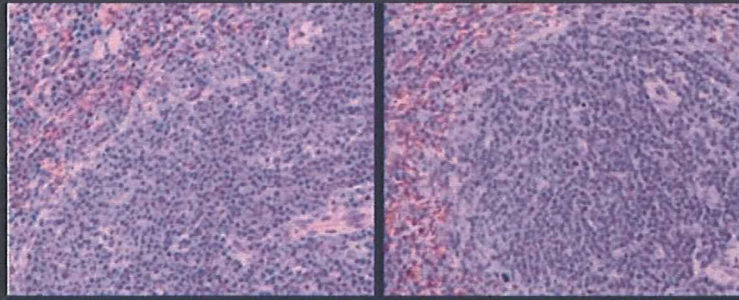


**Figure 2:**

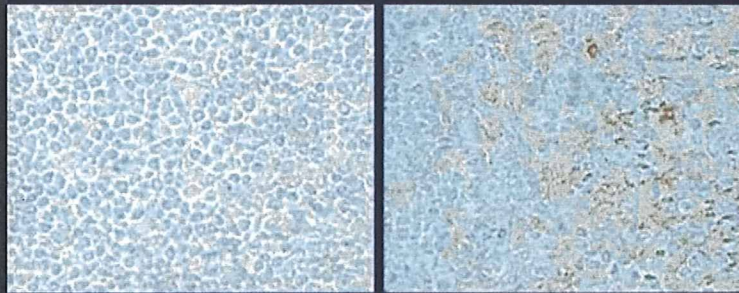
不活化型全粒子新型インフルエンザワクチンおよびHA型インフルエンザワクチンをマクロファージ化THP-1細胞に投与した場合、共にIL-1βとIFN-βの産生を認めた。

これにアルミニウムアジュバントを加えた製剤はIL-18の産生も認められ、inflammasome (NALP3)を介したIL-1β産生場合も付け加えられていることを示唆している。

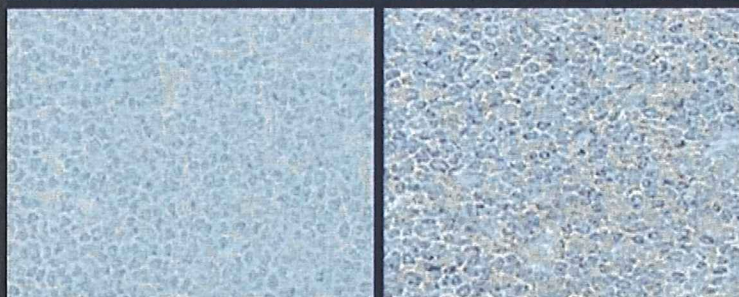
HE



抗IL-1 $\beta$ 抗体



抗NF- $\kappa$ B抗体



Saline

HA vaccine

Figure 3:  
マウス脾臓のHE染色像と白脾髄領域の抗IL-1 $\beta$ 抗体と抗NF- $\kappa$ B抗体の免疫染色