

図1 ワクチン接種によるウイルス増殖抑制効果

全粒子ワクチンおよびスプリットワクチン接種後A/Narita/1/2009株を感染させ、3日目の肺中のウイルス価を測定した。ワクチン接種群では肺中ウイルス価の減少が認められ、その効果は全粒子ワクチンの方がスプリットワクチンよりも強いことが確認された。

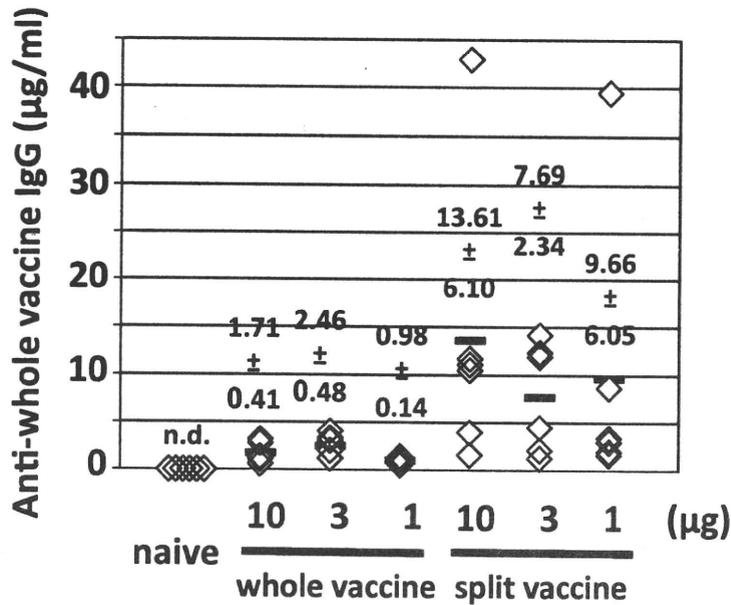


図2 ワクチン接種後チャレンジウイルス感染により誘導されたワクチン特異的抗体

全粒子ワクチンおよびスプリットワクチンを2回皮下接種後A/Narita/1/2009株を感染させ、3日目の血清中のワクチン特異的IgGをELISA法にて測定した。n.d.は検出限界以下を示す。スプリットワクチン接種群の方が全粒子ワクチン接種群よりも高い抗体価を示した。

新型インフルエンザワクチンの品質管理に必要な物理化学試験の開発に関する研究

研究分担者 笠井 道之 国立感染症研究所・血液安全性研究部

**研究要旨**

インフルエンザ全粒子ワクチンおよび HA ワクチンの性状・形状はワクチンの抗原提示細胞へのデリバリーとそのプロセッシングをコントロールする上で重要なファクターである。本年度は両者ワクチン製剤の蛍光標識方法を確立し、ついで、抗原提示細胞が両者ワクチンを取り込む様子の時間変化を調べ、免疫担当細胞への取り込み方が両者ワクチンの間で異なることを明らかにした。

**A. 研究目的**

国内で生産されるインフルエンザワクチンはウイルス粒子をホルムアルデヒドで固定した全粒子型と全粒子型をさらにエーテルで処理し脂質膜や核酸成分を除去し部分的に HA 成分を精製した HA 型の 2 種類の剤型のワクチンが生産される。しかし、両者の剤形がワクチン接種後所属リンパ節への移行過程や抗原提示細胞への取り込みとプロセッシング過程にどのような違いを生じ、最終的に免疫誘導能力にどのような影響を及ぼすのかに関する理解は不十分である。さらに、そのような理解に基づくワクチンの品質管理はほとんど行われていない。

全粒子型および HA 型ワクチンの間に抗原提示細胞内への取り込みとプロセッシング過程にどのような違いがあるのかを解析する目的で両者のワクチンを蛍光物質で標識し、抗原提示細胞への取り込みとプロセッシング過程を解析した。

**B. 研究方法**

**全粒子インフルエンザワクチンおよび HA インフルエンザワクチンの緑色蛍光物質標識：**

両者ワクチンをそれぞれ 0.1M NaHCO<sub>3</sub> 溶液で透析し、ホルムアルデヒドやアミノ基を含む化合物を除くと共にワクチン主要構成成分であるたん白質アミノ酸残基を活性化する。AlexaFlour488 カルボオキシリク酸 TFP エステルを加え、室温で 2 時間反応を行う。AlexaFlour488 カルボオキシリク酸 TFP

エステルはたん白質のアミノ酸残基とカップリング反応する。反応後 0.1M NaHCO<sub>3</sub> 溶液で透析し、未反応の試薬を除いた後、PBS 溶液に透析した。

**リソソーム蛍光たん白質標識マクロファージ様細胞の作成：**

マウス H2-DMb 分子細胞質ドメインの C 末端に赤色蛍光標識たん白質 (DsRed I) を結合させたキメラたん白質 (DM-DsRed) を発現する遺伝子をマクロファージ様細胞株に導入し、キメラたん白質を恒常的に発現する細胞株選択した。これにより細胞内に取り込んだ抗原がペプチド化され、MHC クラス II 分子と複合体を形成するリソソーム性コンパートメントを可視化した。

**Alexa488 (緑色蛍光分子) 標識全粒子インフルエンザワクチンおよび HA インフルエンザワクチンのリソソーム赤色蛍光たん白質標識 (DM-DsRed) マクロファージ様細胞への取り込みの解析：**

$2 \times 10^5$  個の標識マクロファージ細胞を 35mm グラススペースディッシュにまき、マクロファージ専用培地 (GIBCO, Macrophage-SFM, cat no. 12065) で 2 日間培養する。50  $\mu$ g/mL 濃度のワクチンを添加した培地 1mL で 10 分間細胞を培養した後、培地で 1 回リンスした後に新たに培地 2mL を加え培養する。培養を開始してから 10 分後、20 分後、40 分後、30 分後、60 分後、80 分後、および 120 分後に培地を

取り除き、3.8%PFA 溶液を加えて反応を停止する。TBS でシャーレを1回リンスし、退色防止剤添加無蛍光グリセリン (invitrogen, P36935) で封入する。

封入サンプルを用いて共焦点レーザー顕微鏡で蛍光画像を取得する。さらに、赤色部分 (DM-DsRed の存在するリソソーム部分) に対する緑色部分 (細胞内に取り込まれた Alexa488 標識ワクチンの量) の面積比および赤色部分に対する黄色部分 (ワクチンとリソソームが共存する量) の面積比を計算した (解析ソフト MetaMorph、Molecular Devices 社)。

### C. 研究結果

**Alexa488 標識全粒子および HA ワクチンのマクロファージ細胞内への取り込みと細胞内デリバリー様式の違い：**

マクロファージ細胞を 10 分間ワクチン存在下で培養した後、これを除いて 20 分間培養した場合の共焦点レーザー顕微鏡画像を図 1 に示す。左側の図に示すように全粒子ワクチン存在下で培養した場合、細胞内に取り込まれた緑色標識ワクチンは、一部は細胞膜直下のコンパートメントに存在するが、大部分は細胞質のコンパートメントに存在し、その中の一部は DM-DsRed の存在するリソソーム様コンパートメント (赤色) に存在した (共存する場合は黄色になる)。一方、右側の HA ワクチン存在下で培養した場合、細胞内に取り込まれたワクチンの大部分は細胞膜直下のコンパートメントに存在した。細胞質のコンパートメントにも存在し、さらにその一部は DM-DsRed の存在するリソソーム様コンパートメントに存在した。全粒子ワクチンおよび HA ワクチンは共に細胞内に取り込まれた後、細胞膜直下から細胞質コンパートメントを経由して、DM-DsRed の存在するリソソーム様コンパートメントへ移行することが推察された。しかしながら、HA ワクチンは全粒子ワクチンと比べた場合、細胞膜直下のコンパートメントに一旦蓄積する傾向が認められた。

**Alexa488 標識全粒子および HA ワクチンのマクロファージ細胞内への取り込みと細胞内デリバリーの時間経過の解析：**

方法に示したようにマクロファージ細胞を両者

ワクチン存在下で 10 分間培養した後、10 分間、20 分間、40 分間、30 分間、60 分間、80 分間、および 120 分間の間隔で画像を取得し、赤色標識されたリソソーム様コンパートメントに対する細胞膜直下および細胞質のコンパートメント内に存在する緑色標識ワクチンの量比 (緑色/赤色の量比) および赤色標識されたリソソーム様コンパートメントに輸送され共存する緑色標識ワクチンの量比 (黄色/赤色の量比) を画像解析ソフトで解析した。

緑色標識全粒子ワクチン存在下で培養した場合、細胞内に取り込まれた全粒子ワクチンは、時間経過と共に細胞質内コンパートメントに存在する量を増加させる (図 2 左側、緑色で示した)。それに相関して全粒子ワクチンが DM-DsRed の存在するリソソーム様コンパートメントと共存する量も時間経過と共に増加した (図 2 左側、黄色で示した)。

緑色標識 HA ワクチン存在下で培養した場合、細胞内に取り込まれた HA ワクチンは全粒子ワクチンと比べてほぼ 2 倍量取り込まれる。細部内に存在する HA ワクチンは時間経過と共に一度急激に減少し、その後も徐々に減少する傾向が見られた。HA ワクチンが DM-DsRed の存在するリソソーム様コンパートメントと共存する量は時間経過と共に増加し、その後減少する傾向が見られた。この一時的な増加は、細胞内に取り込まれ HA ワクチンが時間経過と共に減少することを考え合わせると、細胞内に取り込まれた HA ワクチンは全粒子ワクチンと比べると速やかに DM-DsRed の存在するリソソーム様コンパートメントに移行すると考えられた。

### D. 考察

**インフルエンザワクチンの蛍光標識について：**

ホルムアルデヒドで固定した全粒子ワクチン、あるいは HA ワクチンでも十分にアルカリ性の状態にすれば、カップリング反応により蛍光標識が可能であった。さらに、蛍光標識物質である Alexa は従来の蛍光標識物質よりも蛍光強度が強いので、少量のカップリングでも蛍光観察が可能であった。

**インフルエンザワクチンの抗原提示細胞**

## 内取り込みと細胞内デリバリーについて：

全粒子ワクチンも HA ワクチンも細胞内に取り込まれた後、H2-DM 存在リソソームコンパートメントへの輸送される一連の過程は同じであった。しかし、HA ワクチンは短時間に取り込まれ、H2-DM 存在リソソームコンパートメントへ輸送されるのに対して、全粒子ワクチンは時間経過と共に取り込み量と H2-DM 存在リソソームコンパートメントへの輸送量が増加した。この取り込みと輸送の動態に関する時間経過の違いがワクチンの形状とどのような関係にあるのか、さらにこの違いがアジュバントの存在でどのような変化を受けるのかについては今後の研究課題である。

## E. 結論

1. 全粒子ワクチンおよび HA ワクチンを Alexa で蛍光標識することができ、蛍光顕微鏡で観察可能であった
2. 全粒子ワクチンおよび HA ワクチンは取り込みと輸送の過程は同じであるが、時間経過に対して動態の違いがみられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Y. Tanaka, M. Taneichi, M. Kasai, T. Kakiuchi, and T. Uchida.

Liposome-Coupled Antigens Are Internalized by Antigen-Presenting Cells via Pinocytosis and Cross-Presented to CD8 T Cells.

Plos One, 5(12):e15225, 2010.

### 2. 学会発表

笠井道之、池田通

マクロオートファジーは胸腺内 MHC クラス II 抗原提示過程に関与する

第20回 Kyoto T Cell Conference 2010年6月

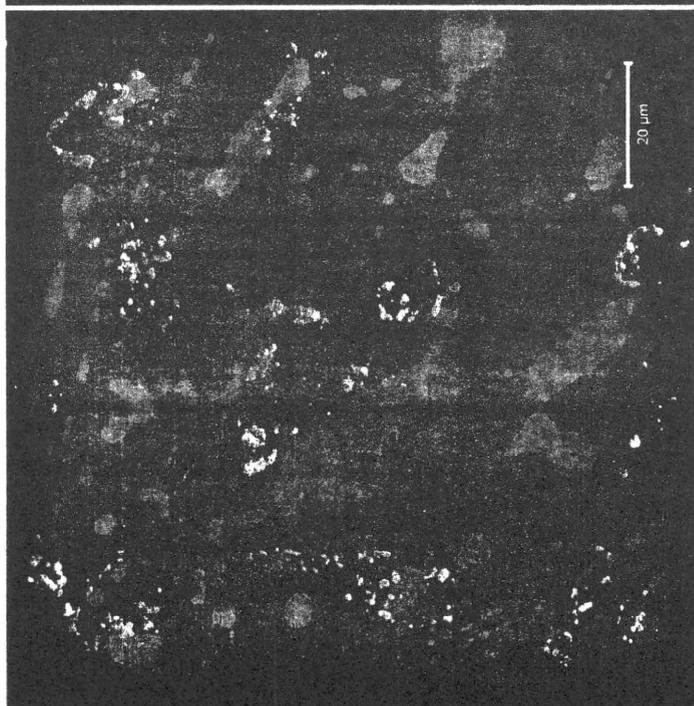
## G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

### 1. 特許取得

なし

# Incorporation and intracellular delivery of whole -vaccine or HA-vaccine in macrophage cell line

Whole-vaccine



HA-vaccine

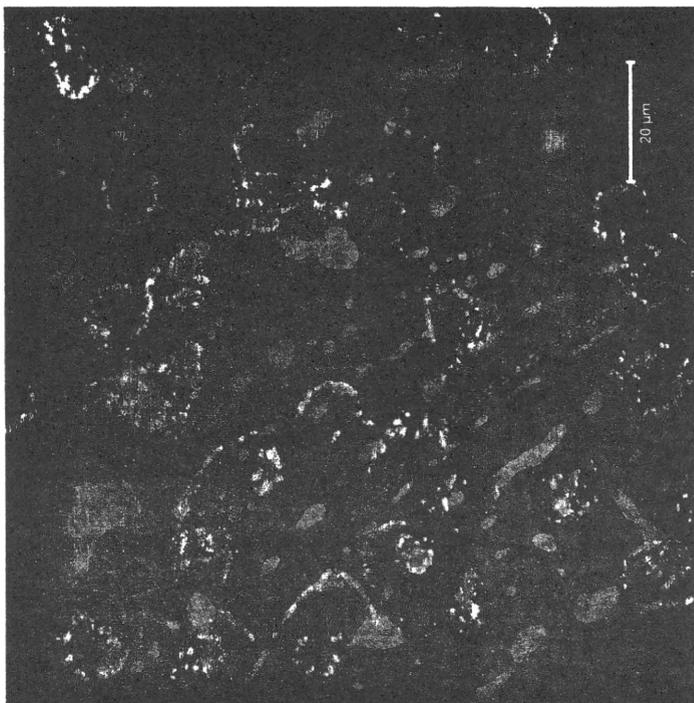


図1

リソソームに輸送される分子 (H2-DM分子) とDsRed分子 (赤色) とのキメラ分子で標識されたリソソーム様コンパートメントを細胞質内に有するマクロファージ様細胞 (#39細胞) にAlexa499 (緑色) で標識したインフルエンザ全粒子ワクチンまたはHAワクチンを添加し10分間培養する。その後、標識ワクチンを除いた培地培養する。20分後に3.5%PFAで固定し、無蛍光グリセリンで封入した後、共焦点顕微鏡で画像を得た。

緑色標識された全粒子ワクチンは細胞質の小胞コンパートメントに輸送される (緑色の小胞コンパートメント)。うち一部は赤色標識のリソソーム様コンパートメントに輸送される (黄色の小胞コンパートメント)。

緑色標識されたHAワクチンも大部分は緑色標識された全粒子ワクチンの場合と同様な分布を示す。さらに、HAワクチンの場合は、細胞膜あるいはその細胞膜直下の小胞コンパートメントに多く局在する。

## Time-profiles of incorporation and intracellular delivery of whole -vaccine or HA-vaccine

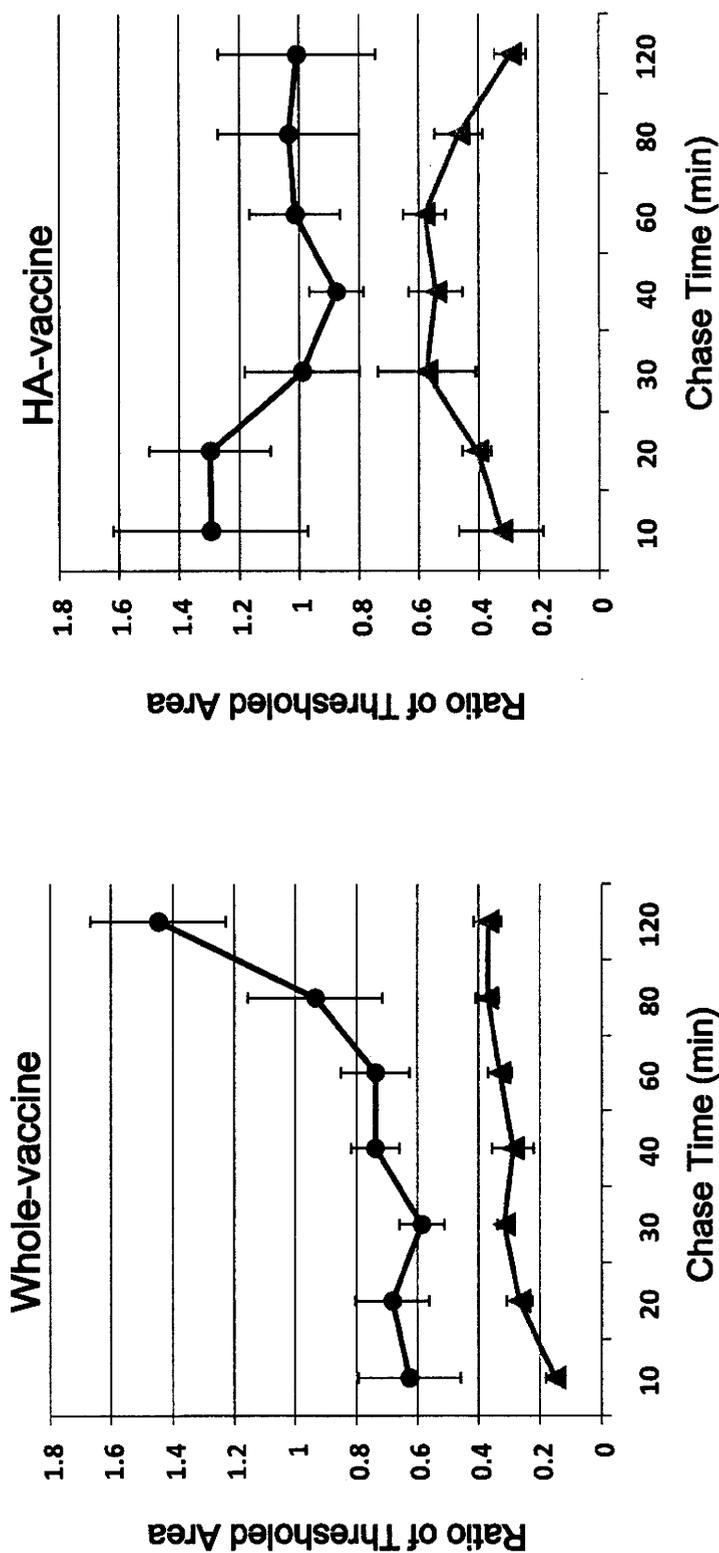


図2. リソソームに輸送される分子 (H2-DM分子) とDsRed分子 (赤色) とのキメラ分子で標識されたリソソーム様コンパートメントを細胞質内に有するマクロファージ様細胞 (#39細胞) にAlexa499 (緑色) で標識したインフルエンザ全粒子ワクチンまたはHAワクチンを添加し10分間培養する。その後、標識ワクチンを除いた培地培養する。図に示した時間ごとに3.5%PFAで固定し、無蛍光グリセリンで封入した後、共焦点顕微鏡で各時間における画像を得る。  
 各画像において、赤色にラベルされたリソソーム様コンパートメントに対する細胞質内に取り込まれた緑色標識ワクチンの量比 (緑色/赤色の量比) と赤色にラベルされたリソソーム様コンパートメントに輸送され共存する緑色標識ワクチンの量比 (黄色/赤色の量比) とを画像解析ソフト (メタモルフ、モレキュラーデバイス社) でそれぞれ計測し、その時間変化をグラフにした。

