

201123062A

厚生労働科学研究費補助金  
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

体表面サイトカインクロストークならびに抗原  
動態の最適制御による新規インフルエンザ粘膜  
ワクチンアジュバントの開発

平成 23 年度 研究報告書

研究代表者 吉川友章

平成 24 (2012) 年 5 月

## 目次

<b>I. 研究報告書</b>		
1. 研究統括および経鼻ワクチンアジュバントシステムの有効性・安全性評価		1
大阪大学大学院薬学研究科 毒性学分野	研究代表者	吉川友章
2. ナノマテリアルの抗原送達能および免疫制御活性の評価		13
大阪大学臨床医工学融合研究教育センター	研究分担者	吉岡靖雄
3. 各種サイトカインの精製と供給あるいはその改良		19
(独) 医薬基盤研究所バイオ創薬プロジェクト	研究分担者	阿部康弘
<b>II. 研究成果の刊行に関する一覧表</b>		25
<b>III. 研究成果の刊行物・別冊</b>		26

## 経鼻ワクチンアジュバントシステムの有効性・安全性評価

研究代表者 吉川 友章 大阪大学大学院薬学研究科 毒性学分野

昨今の新型インフルエンザの大流行に見られるように、新興・再興ウイルスのパンデミックに対する根本的な予防手段として、ワクチンの予防接種が必要不可欠となっている。経鼻ワクチンは、侵襲性が低く二次感染の恐れが無い上、あらゆるウイルス株に対して交叉防御能を有する分泌型 IgA を全身粘膜表面に誘導できる。即ち経鼻ワクチンはパンデミックに対応出来るのみならず高病原性鳥インフルエンザに対しても有効性を示す可能性を秘めたワクチンシステムである。しかし、現状の経鼻インフルエンザワクチン（flumist<sup>®</sup>）は、弱毒ウイルスを含むため、安全性の観点からはサブユニット経鼻ワクチンが理想的である。一方で、サブユニット経鼻ワクチンは抗原送達効率や免疫賦活活性、さらには安全性に関して致命的な課題があるため実用化されていない。そこで本課題では、ナノマテリアル（生体適合性が高く抗原の体内吸収性を高める効果を持つ）を抗原送達担体として利用し、炎症性サイトカイン（粘膜表面上において感染防御系を制御している）をアジュバントとして利用することで上記課題の克服を目指す。本課題で目指す経鼻ワクチンは、生体由来のサイトカインを用いる点で極めて独創的であり、既に申請者らは TNF- $\alpha$  や IL-1 ファミリー等が優れた経鼻ワクチン効果を発揮することやナノマテリアルの安全性を担保する方法論を独自に見出しており、本事業の基盤となるプロトタイプ経鼻ワクチンの構築に成功している。本事業では、H23 年度にプロトタイプの有効性及び安全性を評価し、H24-25 年度にかけて、プロトタイプの最適化および新たな経鼻ワクチンのスクリーニングを試みる。本研究を通して、有効性や安全性、更に免疫記憶の長期化をも達成できる経鼻ワクチンが開発出来れば、インフルエンザを含めた新興・再興感染症の撲滅、さらにはワクチン投与量の削減や投与回数の削減を通じて医療費抑制等の厚生労働行政に資する。従って、**本研究の成果は、我が国の知的財産の確保に資するだけでなく、「健康立国」としての我が国の国際的地位の向上にも繋が**り、国内外を通じて数多くの人類の健康と福祉に貢献可能である。

### 研究要旨

#### A. 研究目的

近年、インフルエンザ感染に対する根本的な予防手段としてワクチンに期待が寄せられている。しかし、現行の注射型ワクチンは、①ウイルス感染後の発症・重症化を予防できるが感染は防げない、②ワクチン株と流行株が一致しない場合には効果が低い、③消化管感染する高病原性鳥インフルエンザには全く効果が無い、などの致命的な問題点を抱えている。それに対して、経鼻ワクチンは、侵襲性が極めて低く二

次感染の恐れが無い上、あらゆるウイルス株に対して交叉防御能を有する分泌型 IgA を全身粘膜表面に誘導できるため、上述の①～③の課題を一挙に克服できる。しかし、唯一上市されている経鼻インフルエンザワクチン（flumist<sup>®</sup>）は、弱毒ウイルスを含むため、安全性の観点からはサブユニット経鼻ワクチンが圧倒的に望ましい。しかしながら、サブユニット経鼻ワクチンは、①ウイルス抗原を免疫担当細胞へ効率よく送達する方法、②免疫系を効率よく活性化させる技術、が未発達な上、⑤安全性を担保する

方法が皆無であるため、実用化には至っていない。特に安全性に関して、毒素系アジュバントを用いた経鼻ワクチンの治験で、顔面神経麻痺等の重篤な副作用が認められており、最も重要な検討課題である。そこで本課題では、ナノマテリアル（生体適合性が高く抗原の体内吸収性を高める効果を持つ）を抗原送達担体として利用し、炎症性サイトカイン（粘膜表面上において感染防御系を制御している）をアジュバントとして利用することで①②③を一挙に克服する。本課題で目指すサイトカインアジュバントは、現在開発中である Toll 様受容体等を標的としたものと比較して、生体由来の成分を用いる点で決定的に独創的である。さらに申請者は、TNF- $\alpha$ や IL-1 ファミリー等が優れた経鼻ワクチン効果を発揮することやナノマテリアルの安全性を担保する方法論を独自に見出しており、経鼻ワクチンのプロトタイプ構築に先駆けて成功している。即ち本事業を進める上で必須の研究基盤・環境・設備・人材は完備出来ている。本研究の成果は、我が国の知的財産の確保や健康立国としての本邦の国際的地位の向上にも繋がり、国内外を通じて数多くの人類の健康と福祉に貢献可能である。本研究によって得られる成果を活用することで、ワクチン投与量の削減や投与回数の削減を達成することが出来るかもしれない。昨今の厚生労働行政においては医療費を押さえ込むための施策が積極的に進められており、結果として患者の自己負担が高くなっている。また、自己負担額の増大は各種任意接種ワクチンの接種率低下の主な原因となっており、Hib や肺炎球菌といった Vaccine Preventable Diseases (VPD) の発症率増加を招いており、これは健康先進国を目指す本邦における重大な課題である。その点、本成果で得られる有効かつ効果が持続する経鼻ワクチンは、医療費の抑制と患者の負担額の抑制達成でき、その結果任意接種ワクチンの接種率の向上、牽いては Hib や肺炎球菌といった VPD の予防をも一挙に達成出来る可能性を秘

めている。従って、本研究のアウトプットとして得られる新たな方法論・基盤技術・医療体系は、我が国の知的財産の確保に資するだけでなく、「健康立国」としての我が国の国際的地位の向上にも繋がり、国内外を通じて数多くの人類の健康と福祉に貢献可能と考えられる。

## B. 研究方法

### 1. ナノマテリアル

本検討では、非晶質シリカは Micromod Partikeltechnologie 社 (Germany)、snPt は polytech-net 社 (Germany) より購入した。シリカは、一次粒子径が 100 nm (nSP100、濃度 : 50 mg/ml)、70 nm (nSP70、濃度 : 25 mg/ml)、30 nm (nSP30、濃度 : 25 mg/ml) のものを使用した。さらに対照として、1000 nm (mSP1000、濃度 : 50 mg/ml)、300 nm (nSP300、濃度 : 50 mg/ml) のサブミクロンサイズ以上の従来型シリカを用いた。シリカのロットに関しては以降に適宜記載する。以後の検討では、使用直前に粒子分散液を ULTRA SONIC CLEANER SINGLE FREQUENCY (AS ONE) で 5 分間超音波処理し、更に 1 分間ボルトックスミキサーで攪拌した。尚、以降の実験では、特記しない限り、蛍光色素等で標識されていない未標識のサンプルを実験に供した。

### 2. サイトカイン

Ovalbumin (OVA) は Sigma より、cholera toxin (CT) は List Biological Laboratories より、Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ )、R&D systems より、Biotin 標識 goat anti-mouse IgA Ab、Horseradish peroxidase (HRP) 標識 goat anti-mouse IgG Ab、HRP 標識 goat anti-mouse IgG1 Ab、HRP 標識 goat anti-mouse IgG2a Ab は Southern Biotech より、それぞれ購入した。

### 3. 実験動物

BALB/c マウス (6-8 週齢、雌性)、は、日本 SLC より購入した。また、本研究における動物実験の飼育および実験は医薬基盤研究所の実

験動物施設において行い、医薬基盤研究所・大阪大学動物実験規定に準じた。

#### 4. 免疫および解剖

BALB/c マウスへの経鼻免疫は、非麻酔条件下で、個々の TNFsf、直径 30 nm のナノシリカ (nSP30)、および CT を 1  $\mu\text{g}/\text{mouse}$  でニワトリ卵白アルブミン (OVA ; 1  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ) と共に混合投与した。尚、投与スケジュールは 1 週間間隔で 3 回行った。最終免疫から一週間後にマウスを解剖し、鼻腔洗浄液、膣洗浄液、糞便抽出液を採取した。また、ヘパリンで湿らせたシリンジを用いて、心臓採血により全血を採取した。

#### 5. OVA 特異的抗体産生能の評価

10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  OVA (in 50 mM Bicarbonate Buffer) を ELISA プレートに加え、4°C で一晩放置し固相した。PBS で 2 倍希釈したブロックエースを室温で 1 時間反応させることでブロッキング後、各濃度に調製したサンプルを加えて反応させた (IgG ; 室温、2 時間、IgA ; 37°C、2 時間)。これらのプレートを 0.05% Tween 含有 PBS あるいは、0.05% Tween 含有 TBS (Tris-buffered saline) で洗浄後、各濃度に調製した HRP 標識 IgG 抗体およびビオチン標識 IgA 抗体を加えて反応させた (IgG ; 室温、2 時間、IgA ; 37°C、2 時間)。IgA の測定では、プレート洗浄後、1/2500 に希釈した HRP 標識ストレプトアビジンを加え、室温で 1 時間反応させた。再度、洗浄操作を行い最後に蒸留水で洗浄した後、TMBZ (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) 基質液を添加した。2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  を添加することにより発色反応を停止させ、測定波長 450 nm、参考波長 690 nm における吸光度を測定した。

#### 6. インフルエンザ HA 特異的抗体産生能の評価

2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  HA (in 50 mM Bicarbonate Buffer) を ELISA プレートに加え、4°C で一晩放置し固相した。PBS で 2 倍希釈したブロックエースを室温で 1 時間反応させることでブロ

ッキング後、各濃度に調製したサンプルを加えて反応させた (IgG ; 室温、2 時間、IgA ; 37°C、2 時間)。これらのプレートを 0.05% Tween 含有 PBS あるいは、0.05% Tween 含有 TBS (Tris-buffered saline) で洗浄後、各濃度に調製した HRP 標識 IgG 抗体およびビオチン標識 IgA 抗体を加えて反応させた (IgG ; 室温、2 時間、IgA ; 37°C、2 時間)。IgA の測定では、プレート洗浄後、1/2500 に希釈した HRP 標識ストレプトアビジンを加え、室温で 1 時間反応させた。再度、洗浄操作を行い最後に蒸留水で洗浄した後、TMBZ (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) 基質液を添加した。2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  を添加することにより発色反応を停止させ、測定波長 450 nm、参考波長 690 nm における吸光度を測定した。

#### 7. サイトカインの大腸菌発現

mouse TNF- $\alpha$  (mTNF- $\alpha$ ) は、大腸菌による蛋白質発現系にて、発現・精製した。蛋白質発現プラスミドにより大腸菌 BL21-CodonPlus ( $\lambda$ DE3) -RIL 株 (Stratagene Inc.) を形質転換し、1 L の 0.4% glucose、1.68 mM  $\text{MgSO}_4$ 、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ampicillin (Sigma-Aldrich Corp.) 含有 Terrific Broth 培地 (Invitrogen Corp.) 中で  $\text{OD}_{600}=3.0-3.5$  になるまで 37°C、250 rpm にて振盪培養した。その後、終濃度 1 mM となるように IPTG を加え、さらに 4 時間培養することで、リコンビナント蛋白質を inclusion body として誘導した。

#### 8. Inclusion body の回収、可溶化

培養した大腸菌を 3000 rpm、10 分間遠心を行うことにより回収し、TES buffer (50 mM Tris、40 mM EDTA、250 mM NaCl、pH 8.0) で懸濁し、終濃度 0.23 mg/mL となるように Lysozyme (Roche Diagnostics Corp.) を加え、室温で 1 時間反応させた。その後、終濃度 0.5 M となるように NaCl を、2.5% となるように Triton X-100 (Sigma-Aldrich Corp.) を添加し、室温で 1 時間振盪した後、4°C、10000 rpm、40 分間遠心した。得られた沈殿

に対し、先ほどと同様に 0.5 M NaCl、2.5% Triton X-100 含有 TES buffer に懸濁し遠心するという操作を 2 回繰り返す、さらに、NaCl、Triton X-100 非含有 TES buffer で同様の操作を 3 回繰り返すことで、TNF の inclusion body を精製した。得られた inclusion body を秤量し、湿重量 1.8 g あたり 10 mL の GTE buffer (6 M Guanidine、100 mM Tris、2 mM EDTA、pH 8.0) に懸濁し、2 時間室温にて静置した。その後、4°C、12000 rpm、40 分間遠心し、その上清を可溶性 inclusion body とした。上清に含まれる蛋白質量は、Coomassie-Blue Plus Protein Assay Reagent Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いた Bradford 法により定量し、終濃度 10 mg/mL となるように GTE buffer を用いて希釈した。その後 Dithioerythritol (Sigma-Aldrich Corp.) を終濃度 65 mM となるように添加し、4 時間室温で静置した。

## 9. Refolding 及び精製

pH 9.5 に調製した Refolding buffer (100 mM Tris、2 mM EDTA、1 M Arginine) を氷冷し、酸化型グルタチオン (Sigma-Aldrich Corp.) を 0.9 mM になるように添加後、激しく攪拌しながら可溶性 inclusion body 溶液を加えることで inclusion body を 100 倍に希釈した。4°C で 30 時間静置することで refolding を行った後、SPECTRA/POR Membrane MWCO 6-8000 (Spectrum laboratories Inc.) を用い、40 倍量の Dialysis buffer (20 mM Tris pH 7.4、100 mM Urea) に対し 4°C で 12 時間透析を行った。この透析操作をさらに 1-2 回繰り返すことで透析内膜の液を置換し、得られた透析液を、孔径 0.45  $\mu\text{m}$  の Cellulose Acetate Membrane Filter (Advantec MFS, Inc.) を用いて清透化した。

得られた蛋白質溶液は、HPLC 高圧グラジエントシステム LC-8020 Model II (TOSOH Corp.) を用いて精製した。陰イオン交換樹脂; Q-sepharose Fast Flow (GE Healthcare) を

充填した Tricorn カラム (GE Healthcare) を Buffer A (20 mM Tris、1 mM EDTA、pH 7.4) により平衡化し、そこへ蛋白質溶液をアプライした。カラムに吸着した蛋白質は、Buffer A により洗浄した後、Buffer B (20 mM Tris、1 mM EDTA、300 mM NaCl、pH 7.4) により溶出させた。得られた溶出液は、Amicon Ultra-4 (Millipore Corp.) を用いた限外ろ過により濃縮し、20 mM Tris buffer、pH 7.4 で平衡化した Superose 12 10/300 GL カラム (GE Healthcare) へとアプライすることでゲル濾過を行った。

## 10. L-M 細胞を用いた生物活性の評価

マウス繊維芽細胞である L-M 細胞は 1% ウシ胎児血清 (FCS (fetal calf serum; GIBCO BRL)) 及び、抗生物質 (1% Antibiotic-Antimycotic (100 U) liquid; GIBCO BRL) を含む Eagle's minimum essential medium (MEM; Sigma-Aldrich, Inc.) で継代培養し、サブコンフルエント状態のものを実験に供した。96 穴培養プレートにて 1% FCS 含有 MEM で  $1.5 \times 10^4$  cells/100  $\mu\text{L}$ /well に希釈した L-M 細胞を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5% 炭酸ガス気相下で 2 時間培養した後、予め、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  actinomycin-D (acti-D; Wako Pure Chemical Industries) 含有培地にて段階希釈した mTNF- $\alpha$  100  $\mu\text{L}$  を加えた。24 時間培養を行った後、25% グルタルアルデヒドで生細胞を固定した。洗浄後 0.05% メチレンブルー溶液で細胞を染色し、プレートを洗浄・風乾した後、0.33 N HCl によりメチレンブルーを溶出させた。吸光度 (測定波長 655 nm、対照波長 415 nm) を測定し、活性を評価した。

## C. 研究結果 (次項 D にまとめて記載する)

### D. 考察

これまでに我々の研究グループでは、強力な炎症性サイトカインファミリーである 16 種類の TNFsf の中から、粘膜ワクチンアジュバント効果に優れたサイトカインの選抜を実施し、

TNF- $\alpha$ や IL-1 $\alpha$ が優れた有効性を発揮することを見出している。しかしながら、サイトカインを抗原と共に混合投与するワクチンシステムでは、マウス一匹あたり 1  $\mu$ g ものサイトカインを必要とするため、鼻粘膜面に過剰な炎症を誘発し、場合によっては副作用の誘導に繋がるかも知れない。事実、非常に強力な粘膜ワクチンアジュバント活性を発揮する CT は、鼻粘膜投与後に嗅神経を介して嗅球へと到達し、炎症反応を誘導することでベル麻痺を誘発することが知られている。副作用軽減やコスト低減の観点からも、何らかの方法でサイトカインの投与量を減量する必要がある。そこでまず、H23 年度は、研究代表者の吉川が独自に見出した経鼻薬物ナノキャリアである nSP30 を抗原キャリアとして併用し、サイトカイン単独適用群とサイトカイン/nSP30 適用群の粘膜ワクチン効果を比較することとした。

モデル抗原である OVA (100  $\mu$ g/mouse) を、CT (1  $\mu$ g)、0.1  $\mu$ g の TNF- $\alpha$ あるいは IL-1 $\alpha$  と共に投与する群を陽性比較対象とした。各混合液を 1 週間間隔で 3 回、経鼻免疫し、血清および鼻腔洗浄液、糞便抽出液、膣洗浄液中における抗原特異的 IgG 産生ならびに IgA 産生を指標に、全身と局所における抗原特異的な免疫誘導能を比較検討した。まず、血中の抗原特異的 IgG 産生量を比較検討した (図 1)。その結果、CT 適用群、TNF- $\alpha$ を適用した群では、OVA 特異的 IgG 産生量が経日的に増大し、28 日目にピークに達した。一方で、サイトカインと共に nSP30 を適用した群では、総じて、同量のサイトカイン単独適用群よりも有意に強力な IgG 抗体産生誘導が認められ、その効果はサイトカイン濃度に依存して強くなった。非常に興味深い事に、0.1  $\mu$ g の TNF- $\alpha$ を単独で投与した群では OVA 特異的抗体の産生は殆ど認められなかったのに対して、同量の TNF- $\alpha$ と nSP30 を併用すると、陽性対照である CT 適用群を上回るほどのワクチン効果が得られた。続いて、粘膜面 (鼻腔・膣・消化管・口腔) における OVA

特異的 IgA 産生量を比較した (図 2)。その結果、サイトカインと nSP30 を併用した群において最も強い IgA 誘導効果が認められ、その効果は、TNF- $\alpha$  (0.1  $\mu$ g) > TNF- $\alpha$  (0.3  $\mu$ g & 1  $\mu$ g) であった。CT 単独あるいはサイトカイン単独を適用した群は nSP30 併用群よりも総じて効果が低かった。以上の結果から、nSP30 を併用することで、従来型のサイトカイン粘膜ワクチンアジュバントシステムの有効性を 10 倍以上増強出来る可能性を示唆している。

次に、インフルエンザ HA 抗原と nSP30、nSP70、nSP300、nSP1000 の混合溶液を調製し、マウス鼻腔に投与した。一週間隔で 3 回免疫したのちに、血中 IgG、鼻腔洗浄液・膣洗浄液・唾液・糞便抽出液中の HA 特異的 IgA 産生量を ELISA により評価した。今回、ポジティブコントロールとして、CTB を適用した (図 3, 4)。尚、フィギュアにはシリカ適用群のみを抽出した図を右側に示す。その結果、CTB 適用群では、極めて強力な HA 特異的 IgG ならびに IgA の産生が認められた。また、CTB による HA 特異的 IgA の産生は、鼻腔洗浄液・膣洗浄液・唾液・糞便抽出液中いずれにおいても認められた。それに対して、シリカを適用した群においては、総じて CTB 適用群よりは効果が弱まるものの、nSP30 あるいは nSP300 を適用した群において有意な HA 特異的 IgG・IgA の産生が認められた。その効果は、nSP30 > nSP300 > nSP70 = nSP1000 の順であり、この傾向は鼻腔洗浄液・膣洗浄液・唾液・糞便抽出液においてほぼ同様であった。これらの結果から、CTB ほどでは無いものの、シリカが優れた経鼻粘膜ワクチンシステムとして適用できる可能性が示された。アジュバントは、これまで数十年の研究開発にも関わらず、全身投与型のアジュバントである Alum (水酸化アルミニウムゲル) が唯一米国で承認されたにすぎず、粘膜アジュバントは皆無である。さらに、実用化が有望視されてきた細菌毒素を素材とした粘膜アジュバント開発は、2000 年 スイスでのヒト死亡例が報告されたのを契機に、その臨床への応用は

極めて困難な状況にある。その一方で、ナノシリカのような抗原送達キャリアを用いることによって、アジュバントの投与量の低減に繋がりが、アナフィラキシーショックなどの有害事象を最低限に抑えることが出来るものと考えられる。

さらに、将来的な大量生産を見据えて、サイトカインの作製条件を検討した。mTNF- $\alpha$ の遺伝子を、T7 プロモーター下に発現するベクターに組み込み、大腸菌 BL21-CodonPlus (DE3) -RIL に導入することにより、mTNF- $\alpha$ を大腸菌内に大量誘導し、inclusion body として回収した。IPTG で mTNF- $\alpha$ の発現を誘導した後、回収した inclusion body を SDS-PAGE を用いて解析し、その誘導を確認した。その結果、17kDa の蛋白質のバンドとして観察された。次に、回収した inclusion body を可溶化させ、条件検討の結果を参考に pH9.5 に調製した Refolding buffer (100 mM Tris, 2 mM EDTA, 1 M Arginine) にて refolding した後にイオン交換クロマトグラフィー及びゲルろ過クロマトグラフィーによって精製した。その結果、約 50kDa の溶出ピーク (25 分) を示したことから、FB1 はホモ三量体を形成していることが示唆された (図 5)。また、L-M 細胞に対する細胞傷害活性を指標に、mTNF- $\alpha$ の mTNFR1 を介した生物活性を評価したところ、mTNF- $\alpha$ の添加濃度依存的に L-M 細胞の細胞死が認められた。このことから、今回作製した mTNF- $\alpha$ は、mTNFR1 を介した生物活性を有することが判明した (図 6)。なお、その EC<sub>50</sub> 値は 0.3 ng/ml であり、過去の報告例と同等の比活性を保持していることを確認している。

また、mTNFR2 を介した生物活性については、これまでマウス T 細胞である CT6 細胞に対する増殖活性が唯一報告されている。しかし、CT6 細胞は mTNFR2 だけでなく、mTNFR1 も発現しているため純粋に mTNFR2 のみを介した生物活性を評価できない。そのため、今後は、mTNFR1 が欠損した細胞株を樹立することで、

新たな生物活性評価系を構築する予定である。

現在、nSP30 併用によるサイトカイン粘膜ワクチンの有効性増強機構の解析を目指して、経鼻投与後の抗原や nSP30 の局在等の解析を推進している。

## E. 結論

以上、nSP30 を併用することで、従来型のサイトカイン粘膜ワクチンアジュバントシステムの有効性を 10 倍以上増強出来る可能性を先駆けて見出した。従って、本研究によって得られる成果を利活用することで、ワクチン投与量の削減や投与回数の削減を達成することが出来るかもしれない。昨今の厚生労働行政においては医療費を押さえ込むための施策が積極的に進められており、結果として患者の自己負担が高くなっている。また、自己負担額の増大は各種任意接種ワクチンの接種率低下の主な原因となっており、Hib や肺炎球菌といった Vaccine Preventable Diseases (VPD) の発症率増加を招いており、これは健康先進国を目指す本邦における重大な課題である。その点、本成果で得られる有効かつ効果が持続する経鼻ワクチンは、医療費の抑制と患者の負担額の抑制達成でき、その結果任意接種ワクチンの接種率の向上、牽いては Hib や肺炎球菌といった VPD の予防をも一挙に達成出来る可能性を秘めている。従って、本研究のアウトプットとして得られる新たな方法論・基盤技術・医療体系は、我が国の知的財産の確保に資するだけでなく、「健康立国」としての我が国の国際的地位の向上にも繋がりが、国内外を通じて数多くの人類の健康と福祉に貢献可能と考えられる。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### ① 論文発表

(なお、下記論文は全て査読有りである。また、



申請者が **Corresponding author** の場合、右に \* を付した。さらに、**Each author contributed equally** の場合、右に # を付した。）

1. Nabeshi H., **Yoshikawa T.\***, Akase T., Yoshida T., Tochigi S., Hirai T., Uji M., Ichihashi K., Yamashita T., Higashisaka K., Morishita Y., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Itoh N., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Effect of amorphous silica nanoparticles on in vitro RANKL-induced osteoclast differentiation in murine macrophages., *Nanoscale Res. Lett.*, 6(1):464-468, 2011.
2. Hirai T., **Yoshikawa T.\***, Nabeshi H., Yoshida T., Tochigi S., Uji M., Ichihashi K., Akase T., Yamashita T., Yamashita K., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Yoshioka Y., Itoh N., Tsutsumi Y. : Size-dependent immune-modulating effect of amorphous nanosilica particles., *Pharmazie.*, 66: 727-728, 2011.
3. Abe Y., **Yoshikawa T.**, Inoue M., Nomura T., Furuya T., Yamashita T., Nagano K., Nabeshi H., Yoshioka Y., Mukai Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Fine tuning of receptor-selectivity for tumor necrosis factor- $\alpha$  using a phage display system with one-step competitive panning., *Biomaterials.*, 32(23):5498-504, 2011.
4. Nabeshi H., **Yoshikawa T.\***, Matsuyama K., Nakazato Y., Tochigi S., Kondoh S., Hirai T., Akase T., Yamashita T., Yamashita K., Yoshida T., Nagano K., Abe Y., Yoshioka Y., Kamada H., Imazawa T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Amorphous nanosilica induce endocytosis-dependent ROS generation and DNA damage in human keratinocytes., *Part. Fibre. Toxicol.*, 8(1): 1-10, 2011.

5. Nabeshi H., **Yoshikawa T.\***, Arimori A., Yoshida T., Tochigi S., Kondoh S., Hirai T., Akase T., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Itoh N., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Effect of surface properties of silica nanoparticles on their cytotoxicity and cellular distribution in murine macrophages., *Nanoscale Res. Lett.*, 6(1): 93-98, 2011.
6. Nabeshi H., **Yoshikawa T.\***, #, Matsuyama K., Nakazato Y., Matsuo K., Arimori A., Isobe M., Tochigi S., Kondoh S., Hirai T., Akase T., Yamashita T., Yamashita K., Yoshida T., Nagano K., Abe Y., Yoshioka Y., Kamada H., Imazawa T., Nakagawa S., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Systemic distribution, nuclear entry and cytotoxicity of amorphous nanosilica following topical application., *Biomaterials.*, 32(11):2713-2724, 2011.

#### 【総説・その他】

該当なし

#### ② 学会発表

##### 【国内学会発表：合計 34 件】

1. 宇高麻子, 吉川友章, 吉田徳幸, 宇治美由紀, 三里一貴, 森 宣瑛, 平井敏郎, 市橋宏一, 高橋秀樹, 赤瀬貴憲, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 鍋師裕美, 吉岡靖雄, 伊藤徳夫, 堤 康央:非晶質ナノシリカの経鼻免疫毒性に関する基礎情報の収集., 日本薬学会第 132 年会., 札幌 (北海道), 2012 年 3 月.
2. 高橋秀樹, 吉川友章, 平井敏郎, 市橋宏一, 吉田徳幸, 宇治美由紀, 三里一貴, 宇高麻子, 森 宣瑛, 赤瀬貴憲, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 鍋師裕美, 吉岡靖雄, 伊藤徳夫, 堤 康央:非晶質ナノシリカの経皮曝露がアトピー性皮膚炎に与え

る影響., 日本薬学会第 132 年会., 札幌 (北海道), 2012 年 3 月.

3. 平井敏郎, 吉川友章, 市橋宏一, 高橋秀樹, 吉田徳幸, 宇治美由紀, 三里一貴, 宇高麻子, 森 宣瑛, 赤瀬貴憲, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 鍋師裕美, 吉岡靖雄, 堤 康央: 非晶質ナノシリカの経皮曝露がアトピー性皮膚炎に与える影響., 日本薬学会第 132 年会., 札幌 (北海道), 2012 年 3 月.

**【国際学会発表: 合計 13 件】**

1. Yamashita, K., Yoshioka Y., Fujimura M., Higashisaka K., Morishita Y., Pan H., Ogura T., Nabeshi H., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Baba T., Yamaguchi N., Nasu M., Itoh N., Yoshikawa T., Tsutsumi Y. : Fundamental assessment for clarification of Relationship between Asian dust and influenza infection-2; Biodistribution and inflammatory effects of Asian dust for the future risk-analysis., SETAC North America 32nd Annual Meeting, Boston (MA, USA), 12-17 November, 2011.
2. Yoshida T., Yoshioka Y., Fujimura M., Tochigi S., Hirai T., Uji M., Misato K., Takahashi H., Udaka A., Ichihashi K., Mori T., Akase T., Nabeshi H., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Itoh N., Yoshikawa T., Tsutsumi Y. : Promotion of antigen-specific IgE production by intranasally-administrated nanosilica particles in mice., SETAC North America 32nd Annual Meeting, Boston (MA, USA), 12-17 November, 2011.

**H. 知的財産権の出願・登録状況**

**①特許取得**

該当無し

**②実用新案登録**

該当無し

**その他**

該当無し

**研究協力者**

**大阪大学薬学研究科毒性学分野** (職員 4 名・大学院生/学生 14 名): 伊藤徳夫、吉川友章、橋野修代、鍋師裕美、赤瀬貴憲、山下琢矢、山下浩平、吉田徳幸、金崎聡一郎、平井敏郎、古屋剛、森下裕貴、潘 慧燕、宇治美由紀、小椋健正、前田祐香、市橋宏一、三浦直樹

**大阪大学臨床医工学融合研究教育センター** (職員 1 名): 吉岡靖雄

**独立行政法人医薬基盤研究所バイオ創薬プロジェクト** (職員 8 名): 角田慎一、鎌田春彦、今澤孝喜、阿部康弘、長野一也、森功美子、井上雅己

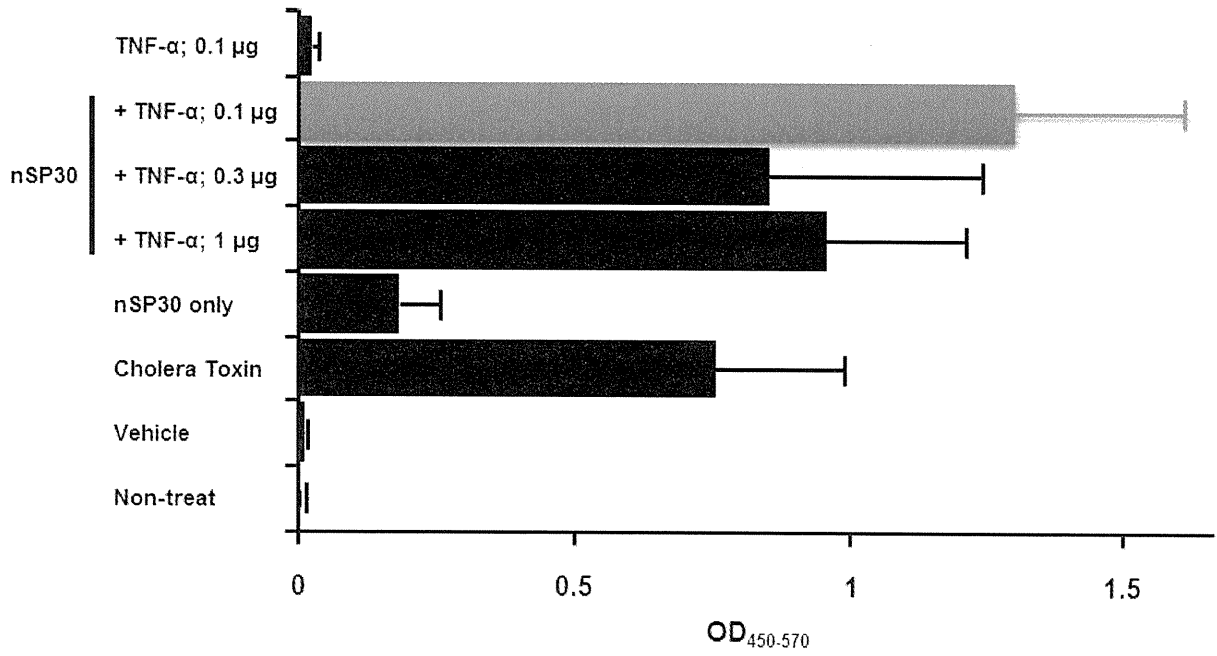


図1. TNF-αとナノシリカの混合溶液を経鼻免疫した際の抗原特異的IgG誘導効果.

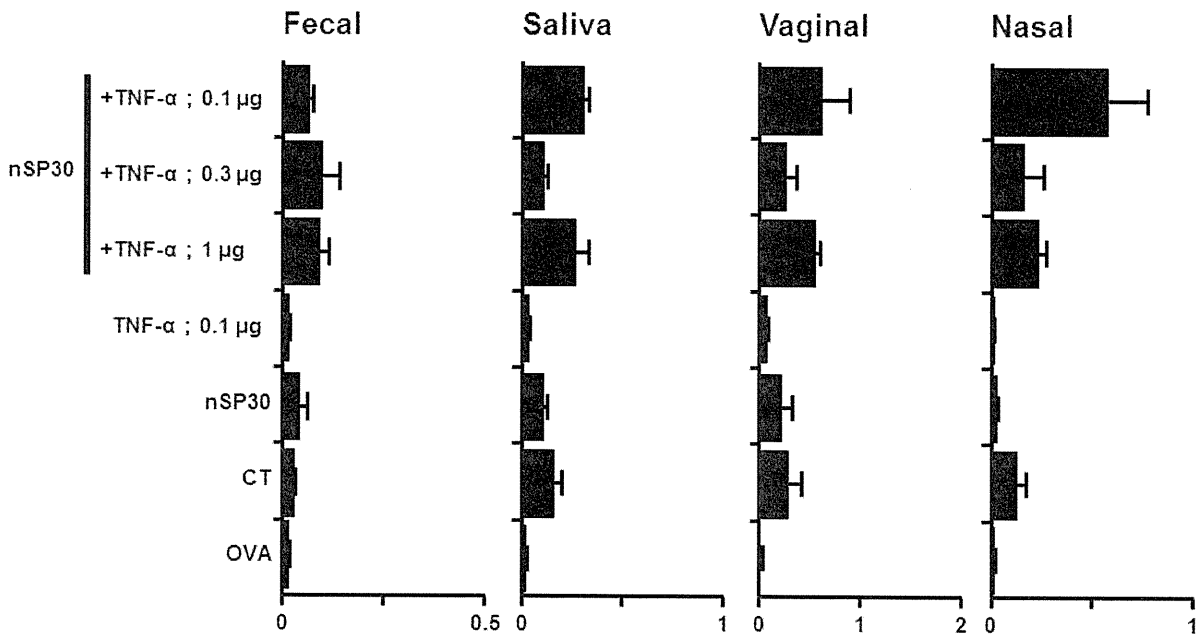


図2. TNF-αとナノシリカの混合溶液を経鼻免疫した際の抗原特異的IgA誘導効果.

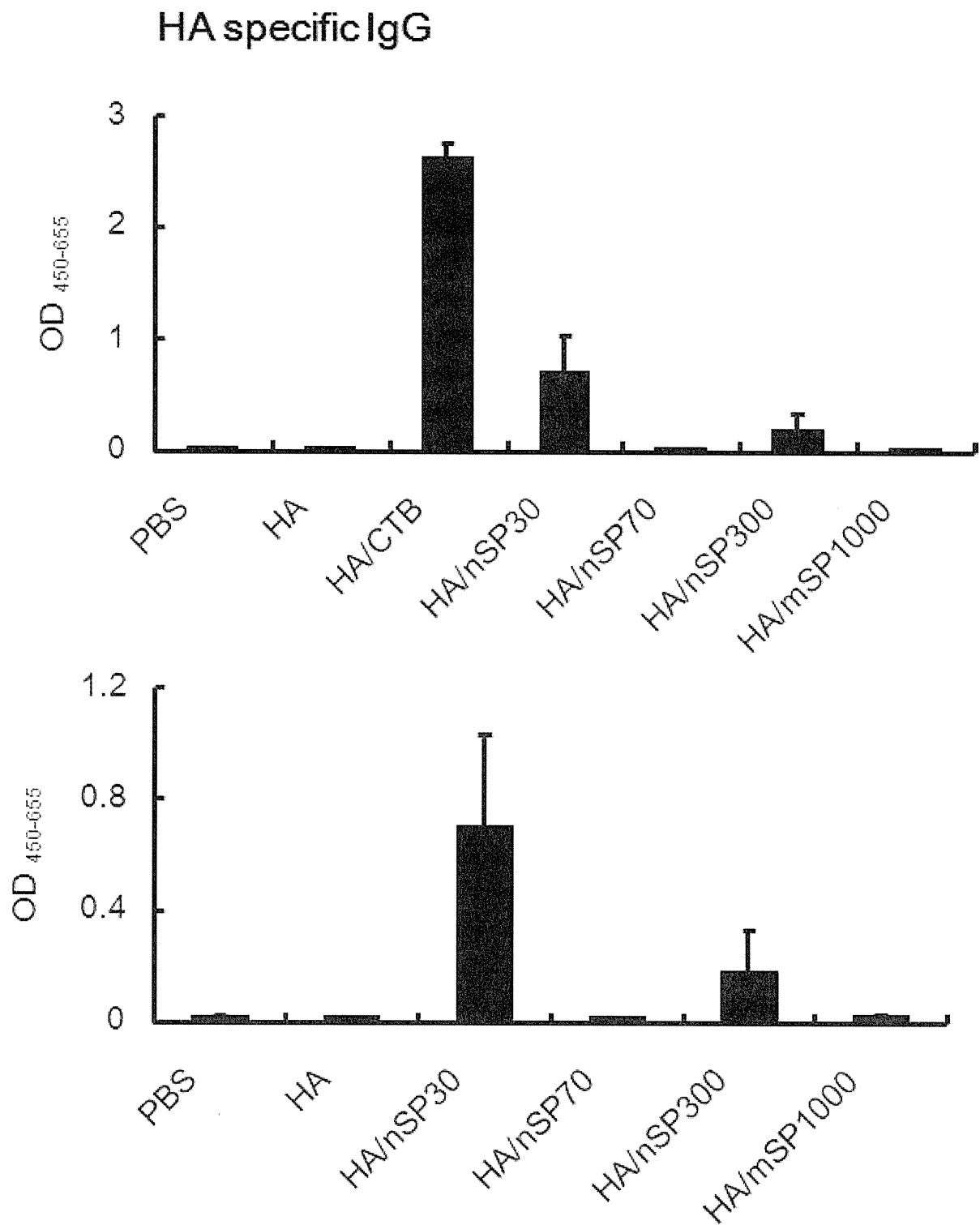


図3. ナノシリカとHA抗原の混合溶液を経鼻免疫した際の抗原特異的IgG誘導効果。

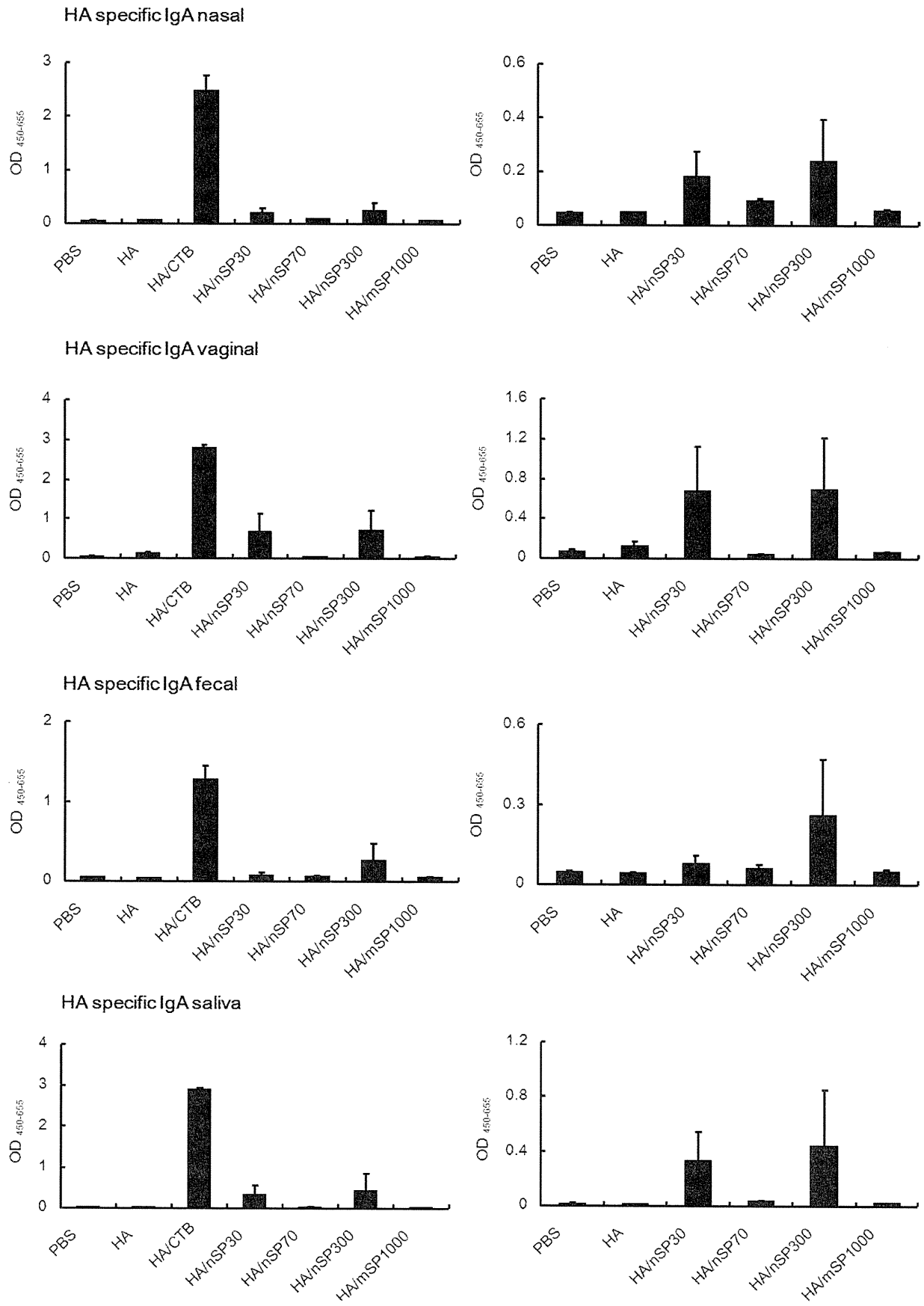


図4. ナノシリカとHAの混合溶液を経鼻免疫した際の抗原特異的IgA誘導効果。

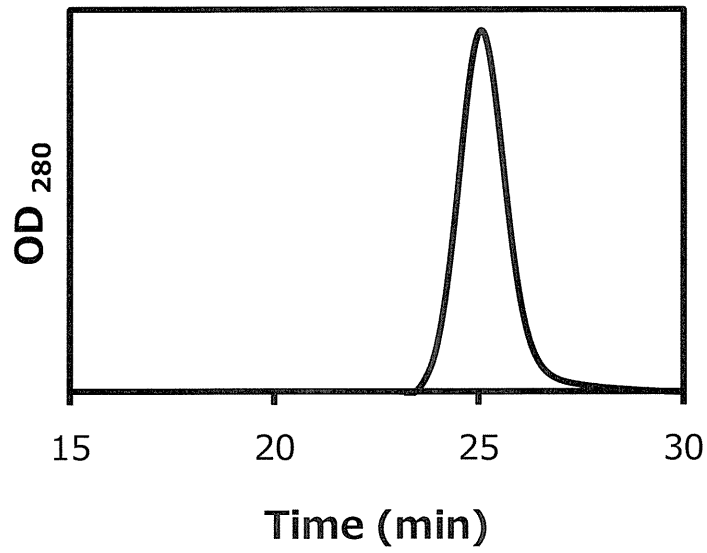


図 5. リコンビナント mTNF- $\alpha$  のゲルろ過-HPLC 解析.

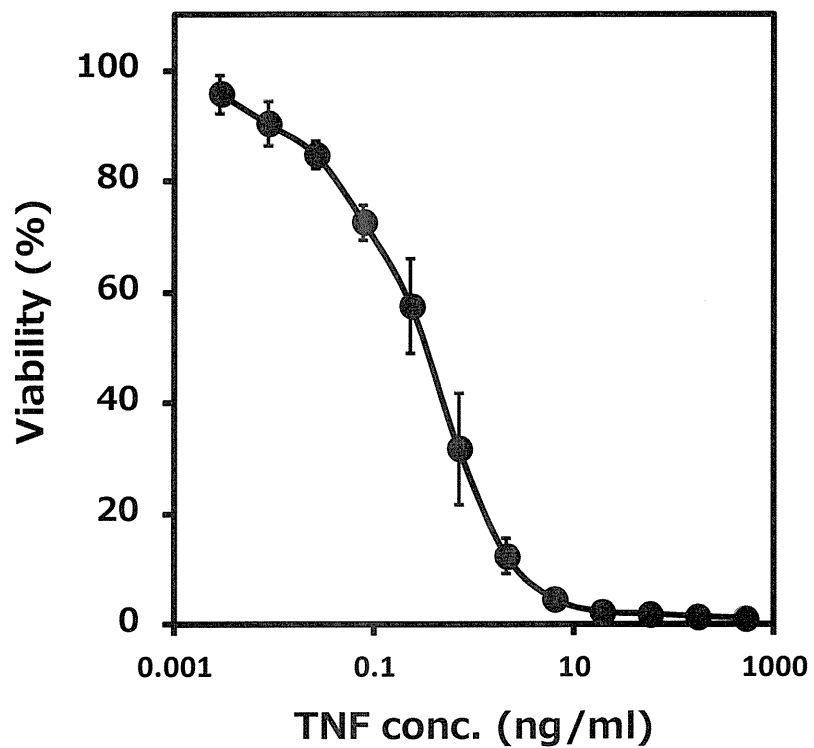


図 6. L-M 細胞を用いた mTNFR1 を介した生物活性の評価.

## 経鼻ワクチンアジュバントシステムの有効性・安全性評価

研究分担者 吉岡 靖雄 大阪大学臨床医工学融合研究教育センター

### 研究要旨

粘膜ワクチンは、ウイルス感染局所近傍の粘膜および遠隔の粘膜、さらには全身性に二段構えの感染防御を達成できることから、ウイルス感染症予防に叶う理想的ワクチンと考えられている。前述のように、その実用化にあたっては、安全性と免疫活性化能を兼ね備えた素材に着目した粘膜アジュバントを開発していく必要がある。そこで著者らは、細菌毒素に代わる新たな素材としてサイトカインを用いることを提案し、医薬価値に優れた粘膜アジュバントの開発を目指して研究に取り組んできた。サイトカインは生体内に存在する自己由来の生理活性タンパク質であり、過去の臨床試験の結果が示すように、抗原性などの点で、外来性異物である病原体構成成分よりも素材としての安全面に優れている。しかし粘膜ワクチンは、抗原単独の投与ではワクチン効果に乏しく、感染症予防・治療に十分な抗原特異的免疫を全く誘導できない。そのため、未だ実用化に耐える現実的な粘膜ワクチンは国内外を問わず、非常に限られている。これは、A) 粘膜面からは抗原が殆ど吸収されないこと、B) ごく僅かに吸収された抗原の体内安定性が極めて低い（体内プロテアーゼ等によって急速に分解される）こと、C) 樹状細胞やマクロファージといった免疫系の司令塔となる細胞への抗原送達効率が低いこと、D) 抗原そのものには T 細胞や B 細胞をはじめとする免疫細胞を活性化作用（所謂アジュバント活性）が無いことなどが原因と考えられている。現在、これらの問題を克服するために、侵襲的に皮膚バリアをこじ開けて抗原送達しようとする試みや、抗原と共に免疫賦活剤としてのアジュバントを併用しようとする試みなどが検討されているものの、皮膚バリアの破壊やアジュバントの頻回投与によってアレルギーや致命的なアナフィラキシーショックを招いてしまうなど、安全性の点で致命的問題を呈してしまい、実用化できていない。このように従来までのワクチン開発研究は、往々にして、有効性（上記①②③）の増強に主眼が置かれ、安全性確保への配慮が欠けていたのが実情である。以上の点を踏まえて当該申請課題では、安全かつ効率よく抗原特異的な体液性・細胞性免疫を誘導できる新規経皮ワクチンの開発を目的に、化粧品・食品基材として実用され、生体適合性にも優れた非晶質ナノシリカ粒子を抗原送達キャリアとして利用することを試みる。

### A. 研究目的

一般に、ウイルスや寄生虫、細菌といった多くの感染性病原体は、皮膚表面や鼻腔、膣腔から体内に侵入し、さらに血液を介して全身に分布、宿主細胞へと感染する。従って、これら感染症に対するワクチンは、少なくとも①皮膚局所や粘膜面といった初発感染部位での抗原特異的な体液性免疫の誘導および自然免疫担当細胞の活性化と、②全身における抗原特異的な体液性免疫の誘導により、病原体の感染や増幅

を安全かつ未然に阻害できねばならない。そのうえ、ウイルスあるいは細胞内寄生菌に感染した場合には、③初発感染部位と全身の両方で、感染細胞を除去できる細胞性免疫の誘導をも求められる。しかし、従来までの注射針を用いて皮下・皮内・筋肉内に接種するワクチンは、痛みや二次感染といった侵襲を伴ううえ、②のみしか誘導出来ず、①③に対する有効性は極めて低いことが知られている。また、最近注目の経鼻粘膜ワクチンは、投与部位である鼻粘膜の

みならず、消化管や膣といった遠隔の粘膜面でも抗原特異的な体液性免疫（IgA 抗体産生）と細胞性免疫が誘導でき、かつ全身面での体液性免疫（IgG 抗体産生）をも誘導し得る。この注射ワクチンとは異なり、所謂貼るだけで有効であり、非侵襲的かつ簡便（医師でなくても投与可能）で皮膚感染性病原体から粘膜感染性病原体まで、あらゆる病原体に対して有効であり、また注射による二次感染の危険性がないことなどから、先進国・新興国・発展途上国を問わず、理論的に、あらゆるニーズを満たす理想的なワクチンになり得るものと期待される。しかし粘膜ワクチンは、抗原単独の投与ではワクチン効果に乏しく、感染症予防・治療に十分な抗原特異的免疫を全く誘導できない。そのため、未だ実用化に耐える現実的な粘膜ワクチンは国内外を問わず、非常に限られている。これは、A) 粘膜面からは抗原が殆ど吸収されないこと、B) ごく僅かに吸収された抗原の体内安定性が極めて低い（体内プロテアーゼ等によって急速に分解される）こと、C) 樹状細胞やマクロファージといった免疫系の司令塔となる細胞への抗原送達効率が低いこと、D) 抗原そのものには T 細胞や B 細胞をはじめとする免疫細胞を活性化する作用（所謂アジュバント活性）が無いことなどが原因と考えられている。現在、これらの問題を克服するために、侵襲的に皮膚バリアをこじ開けて抗原送達しようとする試みや、抗原と共に免疫賦活剤としてのアジュバントを併用しようとする試みなどが検討されているものの、皮膚バリアの破壊やアジュバントの頻回投与によってアレルギーや致命的なアナフィラキシーショックを招いてしまうなど、安全性の点で致命的問題を呈してしまい、実用化できていない。このように従来までのワクチン開発研究は、往々にして、有効性（上記①②③）の増強に主眼が置かれ、安全性確保への配慮が欠けていたのが実情である。以上の点を踏まえて当該申請課題では、安全かつ効率よく抗原特異的な体液性・細胞性免疫を誘導できる新規経皮ワクチンの開発を目的に、化粧品・食品基材として実用され、生体適合性にも優れた非晶質ナノシリカ粒子を抗原送達キャリアとして利用す

ることを試みる。この非晶質ナノシリカは、粒子でありながら容易に経鼻吸収されること、抗原提示細胞を刺激し、アジュバントとして必須とも言えるサイトカイン産生を惹起し得ることを我々は世界に先駆けて見出しているなど、経皮ワクチン用の抗原キャリアとして、またアジュバントとしても有望である。そこで本検討では、ナノシリカの安全性を詳細に追求しつつ、ナノシリカを新規アジュバント・抗原キャリアとして適用し、抗原の経皮吸収性、体内安定性、免疫細胞への到達性などを改善することで、有効性（①～③）と安全性を担保した次世代型ワクチンの開発を試みるものである。即ち本研究の推進は、多岐に渡る新興・再興感染症の克服に資する基盤技術を提供すると共にワクチンの社会受容を促進するものと期待される。

## B. 研究方法

### 1. ナノマテリアル

本検討では、非晶質シリカは Micromod Partikeltechnologie 社（Germany）、snPt は polytech-net 社（Germany）より購入した。シリカは、一次粒子径が 100 nm（nSP100、濃度：50 mg/ml）、70 nm（nSP70、濃度：25 mg/ml）、30 nm（nSP30、濃度：25 mg/ml）のものを使用した。さらに対照として、1000 nm（mSP1000、濃度：50 mg/ml）、300 nm（nSP300、濃度：50 mg/ml）のサブミクロンサイズ以上の従来型シリカを用いた。シリカのロットに関しては以降に適宜記載する。以後の検討では、使用直前に粒子分散液を ULTRA SONIC CLEANER SINGLE FREQUENCY (AS ONE) で 5 分間超音波処理し、更に 1 分間ボルテックスミキサーで攪拌した。尚、以降の実験では、特記しない限り、蛍光色素等で標識されていない未標識のサンプルを実験に供した。

### 2. サイトカイン

Influenza Hemagglutinin (HA) recombinant protein (A/New Caledonia/20/1999) は Protein Sciences より、cholera toxin B subunit (CT-B) は List Biological Laboratories より、Biotin 標



識 goat anti-mouse IgA Ab、Horseradish peroxidase(HRP)標識 goat anti-mouse IgG Ab、HRP 標識 goat anti-mouse IgG1 Ab、HRP 標識 goat anti-mouse IgG2a Ab は Southern Biotech より、それぞれ購入した。

### 3. 実験動物

BALB/c マウス (6-8 週齢、雌性)、は、日本 SLC より購入した。また、本研究における動物実験の飼育および実験は医薬基盤研究所の実験動物施設において行い、医薬基盤研究所・大阪大学動物実験規定に準じた。

### 4. 免疫および解剖

BALB/c マウスへの経鼻免疫は、非麻酔条件下で、個々の TNFsf、直径 30 nm のナノシリカ (nSP30)、および CT を 1  $\mu$ g/mouse で HA (1  $\mu$ g/mouse) と共に混合投与した。尚、投与スケジュールは 1 週間間隔で 3 回行った。最終免疫から一週間後にマウスを解剖し、鼻腔洗浄液、膣洗浄液、糞便抽出液を採取した。また、ヘパリンで湿らせたシリンジを用いて、心臓採血により全血を採取した。

### 5. 抗原特異的抗体産生能の評価

2  $\mu$ g/mL HA (in 50 mM Bicarbonate Buffer) を ELISA プレートに加え、4°C で一晩放置し固相した。PBS で 2 倍希釈したブロックエースを室温で 1 時間反応させることでブロッキング後、各濃度に調製したサンプルを加えて反応させた (IgG; 室温、2 時間、IgA; 37°C、2 時間)。これらのプレートを 0.05% Tween 含有 PBS あるいは、0.05% Tween 含有 TBS (Tris-buffered saline) で洗浄後、各濃度に調製した HRP 標識 IgG 抗体およびビオチン標識 IgA 抗体を加えて反応させた (IgG; 室温、2 時間、IgA; 37°C、2 時間)。IgA の測定では、プレート洗浄後、1/2500 に希釈した HRP 標識ストレプトアビジンを加え、室温で 1 時間反応させた。再度、洗浄操作を行い最後に蒸留水で洗浄した後、TMBZ (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) 基質液を添加した。2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を添加することにより発色反応を停止させ、測定波長 450 nm、参考波長 690 nm における吸光度を測定した。

## C. 研究結果 (結果は D 項にまとめて記載)

### D. 考察

インフルエンザ HA 抗原と nSP30、nSP70、nSP300、nSP1000 の混合溶液を調製し、マウス鼻腔に投与した。一週間隔で 3 回免疫したのちに、血中 IgG、鼻腔洗浄液・膣洗浄液・唾液・糞便抽出液中の HA 特異的 IgA 産生量を ELISA により評価した。今回、ポジティブコントロールとして、CTB を適用した。尚、フィギュアにはシリカ適用群のみを抽出した図を右側に示す。その結果、CTB 適用群では、極めて強力な HA 特異的 IgG ならびに IgA の産生が認められた。また、CTB による HA 特異的 IgA の産生は、鼻腔洗浄液・膣洗浄液・唾液・糞便抽出液中いずれにおいても認められた。それに対して、シリカを適用した群においては、総じて CTB 適用群よりは効果が弱まるものの、nSP30 あるいは nSP300 を適用した群において有意な HA 特異的 IgG・IgA の産生が認められた。その効果は、nSP30 > nSP300 > nSP70 = nSP1000 の順であり、この傾向は鼻腔洗浄液・膣洗浄液・唾液・糞便抽出液においてほぼ同様であった。これらの結果から、CTB ほどでは無いものの、シリカが優れた経鼻粘膜ワクチンシステムとして適用できる可能性が示された。

アジュバントは、これまで数十年の研究開発にも関わらず、全身投与型のアジュバントである Alum (水酸化アルミニウムゲル) が唯一米国で承認されたにすぎず、粘膜アジュバントは皆無である。さらに、実用化が有望視されてきた細菌毒素を素材とした粘膜アジュバント開発は、2000 年 スイスでのヒト死亡例が報告されたのを契機に、その臨床への応用は極めて困難な状況にある。その一方で、ナノシリカのような抗原送達キャリアを用いることによって、アジュバントの投与量の低減に繋がり、アナフィラキシーショックなどの有害事象を最低限に抑えることが出来るものと考えられる。

### E. 結論

Jenner や Pasteur のワクチンの成功により、人類は幾つもの感染症や伝染病を克服してきた。しかし今日においても根絶には至っておら

ず、さらに度重なる人類未曾有のウイルス種の出現により、その度に人類は死の恐怖に脅かされている。近年、ウイルス感染と生体防御機構の解明が著しく進展し、ウイルス感染症予防のための生体免疫システムの重要性、中でも感染局所の粘膜免疫システムを駆使した粘膜ワクチン開発に対する期待が高まっている。粘膜ワクチンは、従来の注射によるワクチンと比べて圧倒的な長所を有していることから、次世代のワクチンとしての実用化が全世界で待望されているものの、未だ十分に開発されていないのが現状である。昨今のワクチン開発においては、全菌体および弱毒性の生ワクチンから、より安全で免疫原性の少ないスプリットおよびサブユニットワクチン開発にシフトしており、ワクチンのためのアジュバント開発の成否がワクチンの成功の鍵を握る最重要課題として認識され始めている。本研究で見出したナノシリカが有効かつ安全な粘膜ワクチン開発の一助となるものと期待している。

#### **F. 健康危険情報**

該当なし

#### **G. 研究発表**

##### **① 論文発表**

該当無し

##### **② 学会発表**

該当無し

#### **H. 知的財産権の出願・登録状況**

##### **① 特許取得**

該当なし

##### **② 実用新案登録**

該当なし

#### **その他**

該当なし

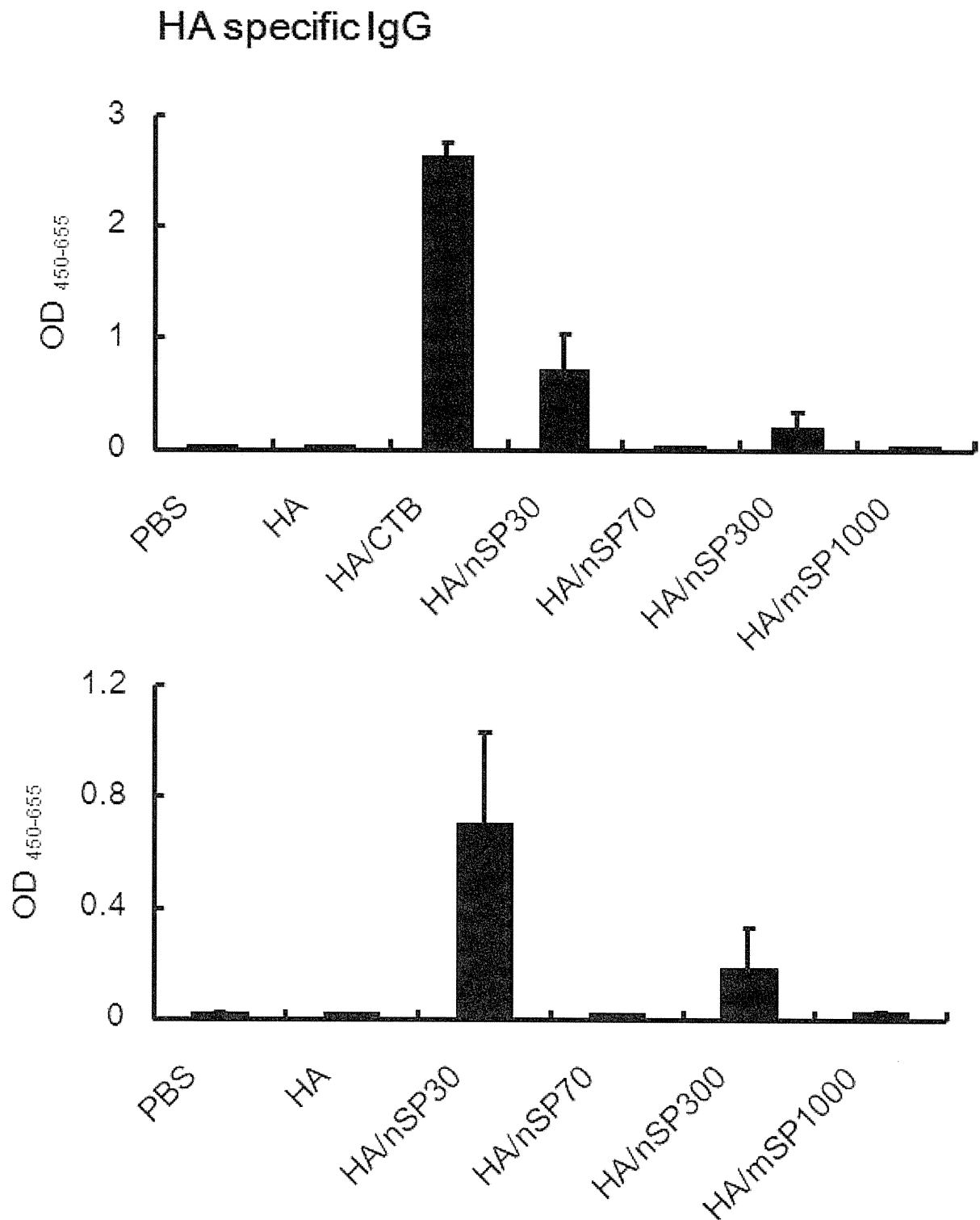


図1. ナノシリカとHA抗原の混合溶液を経鼻免疫した際の抗原特異的IgG誘導効果。

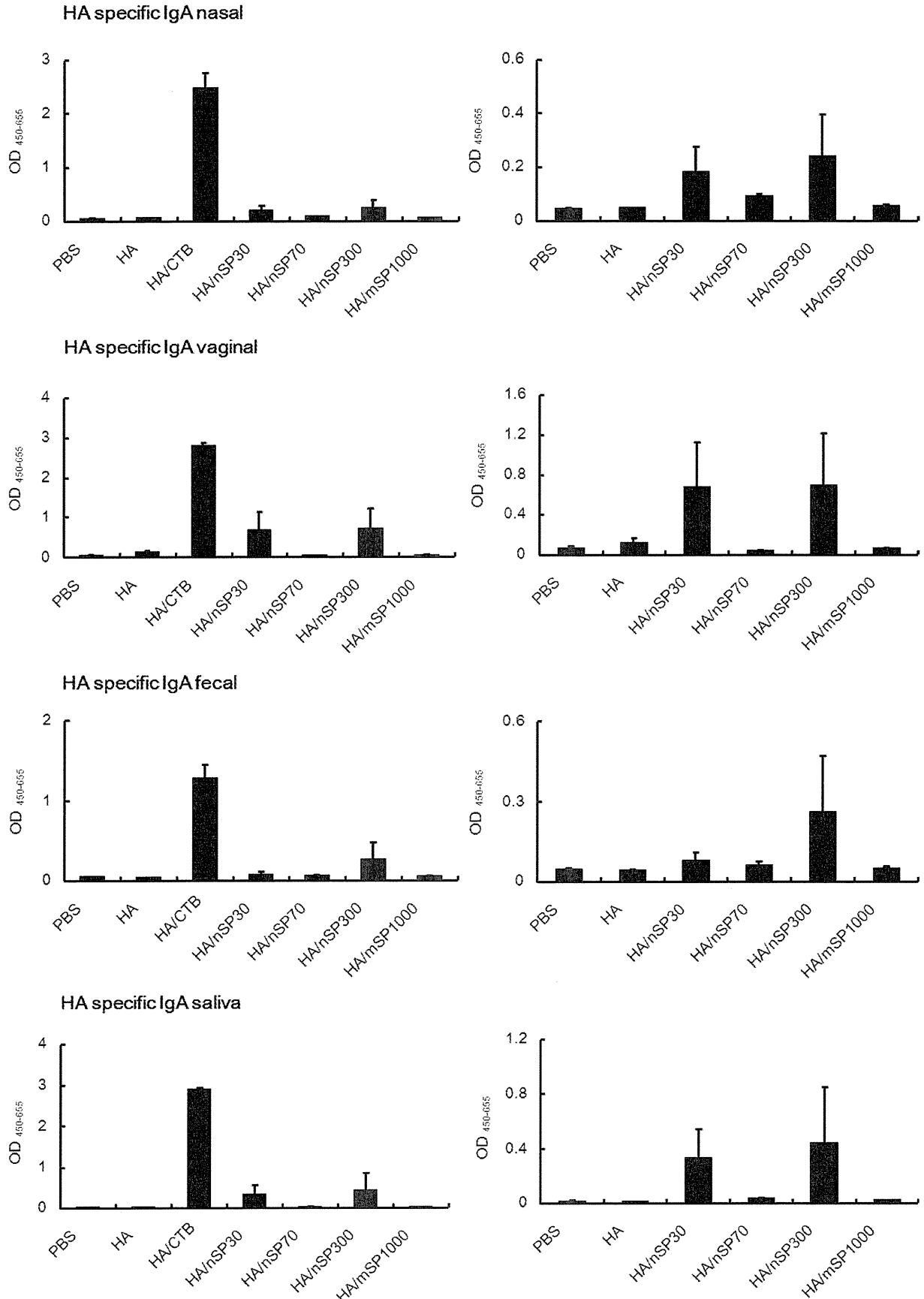


図2. ナノシリカとHAの混合溶液を経鼻免疫した際の抗原特異的IgA誘導効果。