

201208032A

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

経鼻ワクチンの挙動と安全性評価技術の開発

平成24年度 研究報告書

研究代表者 幸 義和

平成25(2013年)5月

目 次

I. 構成員名簿	1
II. 統括研究報告	
経鼻ワクチンの挙動と安全性評価技術の開発	研究代表者 幸 義和 2
インフルエンザ経鼻ワクチンの体内動態評価に関する研究 –不活化全粒子インフルエンザワクチン PET プローブ精製の条件検討 –	研究分担者 長谷川 秀樹 8
経鼻ワクチンの挙動と安全性評価技術の開発	研究分担者 奥野良信 14
III. 研究成果に関する一覧	16
IV. 研究成果の刊行物・別刷(主要なもの)	17

I . 構成員名簿

I. 構成員名簿

	氏名	職名	所属	所属施設の所在地
研究代表者	幸 義和	助教	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
研究分担者	長谷川 秀樹	部長	国立感染症研究所 感染病理部	〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1
研究分担者	奥野 良信	所長	一般財団法人 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

II. 統括研究報告

経鼻ワクチンの挙動と安全性評価技術の開発

研究代表者:幸 義和(東京大学医科学研究所 炎症免疫分野 助教)

研究要旨: 経鼻ワクチンは上気道感染症病原体であるウイルス、細菌の防御免疫を誘導するもっとも有効な方法の一つであり、上気道感染症病原体の制圧に経鼻ワクチンの開発が不可欠であるが、同時に中枢神経系への影響等の安全性を評価する方法も開発する必要がある。そこで本課題では、上気道感染症病原体ワクチンとして新たに開発中の肺炎球菌の経鼻ワクチンを使って(1)経鼻投与されたワクチンの中枢神経系等への挙動を含めた吸収、分布、代謝、排泄(ADME) 試験をマウス及び大動物であるサルを用いて試験可能な ^{18}F -PET イメージング技術を使って解析するため、本年度は ^{18}F -PspA 標識法を浜松ホトニックスの協力で開発した。次に(2)経鼻投与されたワクチンが嗅覚上皮の神経細胞に吸着した際の嗅覚への影響及び嗅球での嗅覚神経の活動イメージング解析を、マウスを使って実施するためまず、経鼻投与で嗅球への移行が知られているコレラトキシン(CT)とその B 鎖 (CTB) で嗅球での嗅覚神経の活動イメージング解析を実施した。その結果 CT30 μg は嗅覚上皮及び嗅球の糸球体を破壊し、投与 2 4-7 2 時間での嗅球の活動イメージングが誘導できなくなるが、CTB にはそのような作用はなかった。またこの濃度で CT は、CTB と違って嗅覚上皮、嗅球の嗅覚神経を破壊し、4 8-7 2 時間でマウスの嗅覚行動を完全に抑制することを確認した。今後経鼻投与された抗原/アジュバントの嗅覚神経系への影響を見るための陽性/陰性コントロールとして CT と CTB を用い、ウイルス及び細菌感染症経鼻ワクチンの嗅覚神経系への影響を調べるのが可能になった。

A. 研究目的

経鼻投与は最も効果的な粘膜ワクチン投与方法の一つとして知られ、実際弱毒型インフルエンザ経鼻ワクチンである FluMist は現在米国をはじめ世界で使用されている。しかし一方で、2004 年スイスで不活化インフルエンザワクチンに経鼻アジュバントとして大腸菌易熱性毒素(LT)を含む製剤が投与された被験者のなかに顔面麻痺が現れたことから(N Engl J Med, 350: 896-903, 2004)、製造販売が中止になった。これに関連して我々は 2000 年にワクチン

である破傷風トキソイド(TT)を粘膜アジュバントであるコレラ毒素(CT)と同時に経鼻投与すると、TT は嗅球には移行しないが CT は一部(1%以下)が嗅球に移行することを報告し、中枢神経系への影響を懸念していた(J. Immunol. 165: 4778-4782, 2000)。その際興味深いことに、CT には共投与されたワクチンである TT を鼻粘膜の上皮細胞に長時間保持させる効果があることが確認できた。この効果は最近我々が開発した経鼻ワクチンデリバリーシステムであるカチオン化ナノゲルが、鼻腔上皮細胞にワク

チンを長時間吸着保持させ効率よく上皮細胞から取り込まれ、直下の樹状細胞に抗原提示させることと同じ効果があると考えられる(Nat. Mater. 9: 572-578, 2010)。経鼻投与されたワクチンやアジュバントの挙動は鼻腔を覆う上皮細胞においてマウスとヒトの解剖学的差異に依存すると考えられる。嗅覚系上皮細胞は嗅覚受容体を発現する一種の神経細胞であり、それらが嗅球内にある糸球体へと投射され、シナプスを介して大脳に嗅覚情報を伝えている。したがって経鼻ワクチンやアジュバントのヒト臨床試験のための吸収、分布、代謝、排泄(ADME)に関する安全性薬理試験はげっ歯類のみならず、サル等の高等動物での試験も必要と考えられる。我々は最近 PET を用いて生きたまま中枢神経へのワクチンの移行を追跡するシステムを開発し、サルのような大動物にも適応した(J. Immunol. 185: 5436-5443, 2010)。さて一方で、投与された経鼻ワクチンが鼻腔の嗅覚上皮・神経に吸着することでの嗅覚へ影響も懸念されるが、この点での研究は皆無である。本課題では3年間で、阪大微研会と国立感染症研が共同で臨床試験を予定している不活化インフルエンザ経鼻ワクチンや東大医科研で開発中のナノゲル型肺炎球菌ワクチンを用いて(1)PET イメージングによる ADME を含む中枢神経移行試験を行うと同時に、(2)鼻腔の嗅覚神経に結合していると考えられる経鼻ワクチンの嗅覚への影響及び嗅覚神経の大脳への情報伝達の影響を最近開発された活動イメージング解析技術(Nature 450: 503-508, 2007)等を使って試験することで、経鼻ワクチンの安全性の基準・方法の確立を目指す。本年度は(1)肺炎球菌感染症経鼻ワクチンのPET によるマウス/サルを用いたリアルタイムイメージングによる体内動態技術の開発の予備検討及び

(2)ウイルス及び細菌感染症経鼻ワクチンの嗅覚神経系への影響を嗅覚神経の活動イメージングで解析評価する技術とマウス嗅覚行動により評価する技術の開発を嗅球に移行することが知られているコレラ毒素CT及びコレラトキシンB鎖 CTBを用いて行った(J. Immunol. 165: 4778-4782, 2000)。

B. 研究方法

1) 材料

肺炎球菌ワクチンは東大医科研で、肺炎球菌の表面抗原の大腸菌発現組換え PspA を高純度に精製して用いた。嗅球への移行実験に用いるコレラトキシンB鎖 CTBは枯草菌発現系を用いて発現精製した。コレラ毒素CTはLIST社から購入した。

2) ^{18}F -PspA の合成法

浜松ホトニクス社の協力を得て、肺炎球菌の組換え PspA のアミノ基を介して ^{18}F -PspA を合成する方法を図 1 に示す。

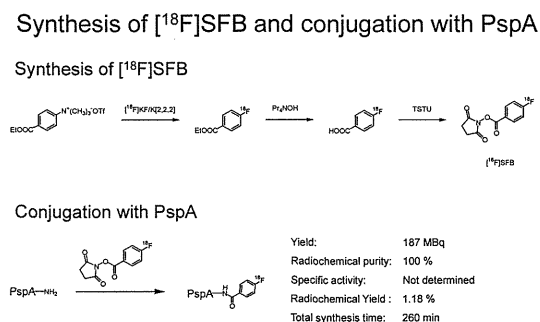


図 1 ^{18}F -PspA の合成法

3) 経鼻ワクチンナノゲル PspA の調製

サル一頭あたりに投与したナノゲル PspA は、分子あたり平均 20 のアミノ基を有する 20 mg/ml ナノゲル 55.5 μl に濃度 6.3mg/ml の組換え PspA 3.95 μl (最終濃度 25 μg)を加えて 46°C、1 時間反応させて調製した。

4) 組織観察

CTまたはCTB(30 μ g)をマウスに経鼻投与後、鼻腔組織(嗅上皮=嗅神経)及び嗅球組織をCTB抗体、嗅上皮に特異的なOMP(Olfactory marker protein)抗体で染色して観察した。

5) 嗅球の活動イメージング解析

嗅球系球体の嗅覚神経の活動イメージングは2種類の匂い物質 propionic acid (3COOH)と valeric acid (5COOH)を嗅がせ嗅球を外科的に露出させ、赤色光を照射するとこれらのおいへの入力があった活性化された糸球は酸素の消費量が違うため眼(カメラ)で違いを確認できることを利用して画像解析(Nature 450: 503-508, 2007)を行う。

経鼻投与後のマウスの嗅覚異常を視覚的に評価するため、2種類の匂い物質 propionic acid (3COOH)と valeric acid (5COOH)を嗅がせた際に活性化される嗅球の背側表面上の糸球の動きを観察する光学イメージング法(Optical imaging)を行った。マウスの嗅球を外科的に露出させ赤色光を照射すると、これらの匂いに対し活性化された糸球は酸素を消費するので、その消費量の違いを視覚的に確認できることを利用して画像解析(Nature 450: 503-508, 2007)を行った。

6) マウス嗅覚行動検討実験

ミネラルオイル、チーズ、エビなどのおいをマウスに3回ずつ嗅がせ、それらのおいを嗅ぐ時間をカウントして測定することで嗅覚が正常かを評価する。

C. 研究結果

1) 経鼻ワクチンナノゲル PspA-PET に用いる

^{18}F -PspA の合成

PspA-PET に用いる ^{18}F -PspA の合成に成功した。分離精製された ^{18}F -PspA のパターンを示す。カラムSuperose12 を用いた。最終生成物の放射能濃

度は 187MBq/0.5mL だったので、2.67 μ L/MBq となり、経鼻実験可能な濃度であった。合成された ^{18}F -PspA を用いて、PET を行うことが可能になった。 ^{18}F -NanogelPspA を調製するためのナノゲル化反応は 46 $^{\circ}\text{C}$ 、30 分で行うことになる。

HPLC analysis of [^{18}F]PspA

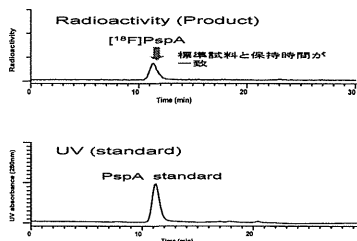


図 2 ^{18}F -PspA の合成

2) 経鼻ワクチンナノゲルPspAの効果

ナノゲル PspA を用いたPETによる体内動態、特に中枢神経への影響を見る前に、ナノゲル PspA 免疫効果の検討を行った。マウスに関してはすでに確認済み(Kong et.al. Infect. & Immun. 2013 in press). で、本年度からサルで経鼻免疫効果を確認する。すでに免疫応答は誘導できることは確認しており、詳細な解析を来年度に報告する予定。

3) CTまたはCTBの経鼻投与での組織学的観察

CTやCTBは嗅球に移動することが知られているので、それぞれ 30 μ g を経鼻投与したあとの嗅上皮(嗅神経)の影響をCTB抗体と嗅神経に特異的発現しているOMP抗体で観察した。その結果、CTBは投与 72 時間でのOMPの発現に変化はなかったが(図3)、CTは投与 24 時間からOMPの発現が極端低下した(図 4)。

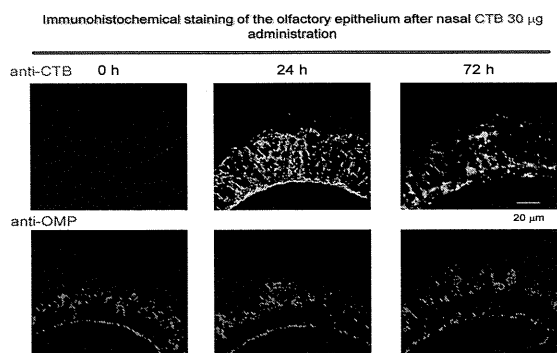


図3. CTBの経鼻投与の影響

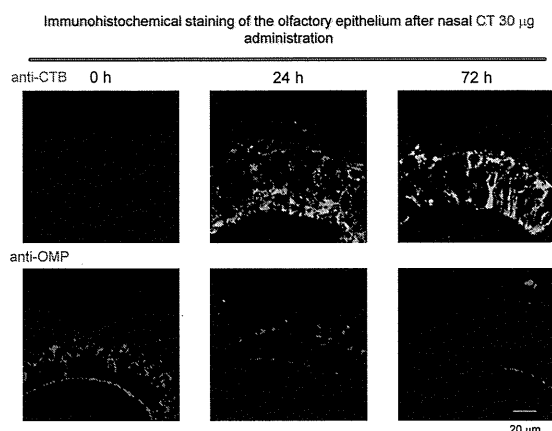


図4. CTの経鼻投与の影響

4) CTまたはCTBの経鼻投与での嗅球の活動イメージング解析

CTの経鼻投与はCTBに比較して、嗅上皮でのOMPの発現が極端に低下していたので、CTの嗅球の影響を調べるために活動イメージング解析を行った。propionic acid (3COOH)での結果を図5に示す。

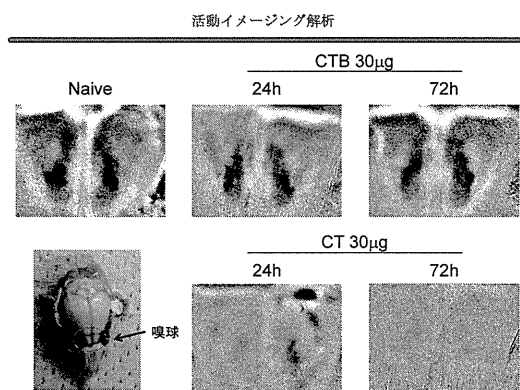


図5 propionic acid (3COOH)の活動イメージング

でのCT又はCTB経鼻投与の影響

同様の結果は valeric acid (5COOH)でも得られ、CTは嗅球の活動イメージングの誘導を低下させた。

5) マウス嗅覚行動の検討実験

CTまたはCTBの投与におけるマウス嗅覚行動の変化を調べたところ、期待どおり、CT投与で嗅覚行動の極端に低下が認められた。

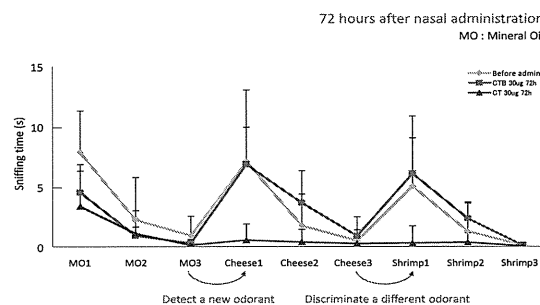


図6. CTまたはCTB経鼻投与でのマウス嗅覚行動

D. 考察

経鼻ワクチンの安全性を評価する上で必要な2つの技術、体内動態解析のための蛋白PET及びワクチンの嗅上皮または嗅球へ影響の評価法の開発を進めた。

(1) 経鼻投与されたワクチンの中樞神経系等への挙動を含めた体内動態をマウス及び大動物であるサルを用いて試験可能な技術を開発するため、本年度は肺炎球菌経鼻ワクチン用の PspA-PET イメージングに用いる ^{18}F -PspA 標識法を浜松ホトニックスの協力で開発した。また肺炎球菌経鼻ワクチンとして用いるナノゲル PspA のサルでの免疫試験を開始した。次年度はこれを用いて、マウス、及びサルでの動態試験、及び効果確認試験を実施する。

(2) 経鼻投与されたワクチンが嗅覚上皮の神経細胞に吸着した際の嗅覚への影響及び嗅球での嗅覚神経の活動イメージング解析を、マウスを

使って実施するためまず、経鼻投与で嗅球への移行が知られているコレラトキシン(CT)とそのB鎖(CTB)で嗅球での嗅覚神経の組織観察及び活動イメージング解析を実施した。その結果CT30 μ gは嗅覚上皮及び嗅球の糸球体を破壊し、投与24-72時間での嗅球の活動イメージングが誘導できなくなることが、CTBにはそのような作用はなかった。またこの濃度でCTは、CTBと違って嗅覚上皮、嗅球の嗅覚神経を破壊し、48-72時間でマウスの嗅覚行動を完全に抑制することを確認できた。次年度は、CTの作用が可逆的なのかどうかも含めて解析を進め、ナノゲルPspA経鼻ワクチンの影響をCT/CTBをコントロールとして試験していく。

E. 結論

(1)PspA ナノゲル経鼻ワクチンのマウス・サルPET解析・免疫解析の準備が整った。(2)嗅上皮へのワクチン投与での神経細胞の影響を調べる技術を確認した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Fukuyama Y, Tokuhara D, Kataoka K, Gilbert RS, McGhee JR, Yuki Y, Kiyono H, Fujihashi K. Novel vaccine development strategies for inducing mucosal immunity *Expert Rev. Vaccines* 11: 376-79 (2012)

(2) Y. Yuki, M. Mejima, S. Kurokawa, T. Hiroiwa, IG. Kong, M. Kuroda, Y. Takahashi, T. Nochi, D. Tokuhara, T. Kohda, S. Kozaki, H. Kiyono. RNAi

suppression of rice endogenous storage proteins enhances the production of rice-based Botulinum neurotoxin type A vaccine. *Vaccine* 30: 4160-4166 (2012)

(3) S. Sato, S. Kaneto, N. Shibata, Y. Takahashi, H. Okura, Y. Yuki, J. Kunisawa and H. Kiyono. Transcription factor Spi-B-dependent and -independent pathways for the development of Peyer's patch M cells. *Mucosal Immunol.* 2012 Dec 5.

(4) IG. Kong, A. Sato, Y. Yuki, T. Nochi, H. Takahashi, S. Sawada, M. Mejima, S. Kurokawa, K. Okada, S. Sato, D. Briles, J. Kunisawa, Y. Inoue, M. Yamamoto, K. Akiyoshi, and H. Kiyono. Nanogel-based PspA intranasal vaccine prevents invasive disease and nasal colonization by Pneumococcus. *Infect. & Immun.* 2013 Mar 4.

(5) Y. Fukuyama, D. Tokuhara, S. Sekine, K. Aso, K. Kataoka, J. Davydova, M. Yamamoto, RS Gilbert, Y. Tokuhara, K. Fujihashi, J. Kunisawa, Y. Yuki, H. Kiyono, JR McGhee, K. Figihashi. Potential roles of CCR5+CCR6+ dendric cells induced by nasal ovalbumin plus Flt3 ligand expressing adnovirus for mucosal IgA responses. *PloS One* 2013 , 8:e60453

2. 学会発表

(1) Y. Yuki, IG. Kong, A. Sato, T. Nochi, M. Mejima, S. Kurokawa, T. Hiroiwa, Y. Fukuyama, S. Sawada, H. Takahashi, K. Akiyoshi, H. Kiyono: Adjuvant-free nanogel-based PspA nasal vaccine for the induction of protective immunity against Pneumococcus. The American Association of Immunologists (AAI) Boston, USA (2012)

(2) 幸 義和:ブタ大腸菌性下痢症予防食べるワクチンの開発研究. 動物ワクチン—バイオ医薬研究会 盛岡 (2012). 招待講演

(3) N. Takeyama, K. Oroku, D. Tokuhara, S. Nagai, H. Kiyono, Y. Yuki. MucoRice-CTB as an oral vaccine for the prevention of enterotoxigenic E. coli-mediated diarrhea in pigs. 日本ワクチン学会 東京 (2012)

(4) E.J. Park, S. Joo, S. Kurokawa, H. Kiyono, Y.

Yuki. Characterization of effector/memory CD4 T cells expanded in the mice vaccinated with MucoRice-CTB 日本ワクチン学会 東京 (2012)

(5) K. Kashima, H. Hiroiwa, Y. Yuki, H. Kiyono. Heat tolerance evaluation of the rice type oral cholera vaccine, MucoRice-CTB, for a clinical study 日本ワクチン学会 東京 (2012)

H. 知的財産権の出願、登録状況
なし。

インフルエンザ経鼻ワクチンの体内動態評価に関する研究
—不活化全粒子インフルエンザワクチン PET プローブ精製の条件検討—

分担研究者:長谷川秀樹(国立感染症研究所 感染病理部 部長)

協力研究者: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第六室 研究員)

鈴木忠樹(国立感染症研究所 感染病理部第二室 研究員)

研究要旨: 現行インフルエンザワクチンは皮下に注射されるため、全身性の IgG 抗体を誘導できるが、ウイルスの侵入部位である気道に粘膜免疫を誘導できない。一方、インフルエンザウイルスの気道での感染防御に、粘膜免疫特に分泌型 IgA 抗体の有用性がマウスを用いたモデル実験等で明らかにされて久しい。この分泌型 IgA 抗体は、ウイルスの侵入部位で感染を阻止するだけでなく変異ウイルスに対する交叉防御も可能であることから、変異ウイルスの流行にも有効であることが示されている。我々はインフルエンザワクチンを経鼻投与することによって呼吸気道上に IgA 抗体を誘導し、ワクチン株と異なる変異ウイルスが流行した場合にも防御効果のある次世代ワクチンの開発を行っている。しかしながら、不活化抗原を鼻粘膜に投与するワクチンは、インフルエンザワクチンに限らず未だにヒトでは実用化されておらず、その安全性については十分な評価がされていない。そこで本研究では、PET を用いて次世代ワクチンである経鼻不活化インフルエンザワクチンの体内動態を明らかにし、その安全性を評価することを目的としている。

A. 研究目的

インフルエンザの大流行を抑制するには効果的なワクチンが必要不可欠である。しかしながら、毎年のように抗原性の変化するインフルエンザウイルスにおいては、ワクチン株と実際に流行するウイルス株の抗原性が大きく異なる場合があり、その場合はワクチン効果が著しく低いことが知られている。そのため、現行のワクチンより有効性の高いインフルエンザワクチンの開発が求められている。

有効性の高いワクチンを開発するためには、生体内でインフルエンザウイルスの感染様式と感染防御に寄与する免疫を理解する必要がある。インフル

エンザウイルス感染の標的細胞は気道粘膜上皮細胞であり、感染防御に最も効果的なのは気道粘膜上に多量に存在する分泌型 IgA 抗体であると考えられている。現行のインフルエンザワクチンは不活化スプリットワクチンの皮下接種が用いられているが、このワクチンではウイルスに対する IgG 抗体のみが誘導され、分泌型 IgA 抗体の誘導は認められない。経鼻投与型インフルエンザワクチンは分泌型 IgA 抗体を誘導でき、さらに抗原性が変化したウイルスに対しても感染阻止効果が高いこと(交叉防御能)が実験的に確認されており、現行のワクチンより有効性の高いワクチンとなることが考えられる。

我々は、不活化抗原を用いた安全な経鼻投与型不活化インフルエンザワクチンの開発研究を行っている。この研究の中でワクチンの有効性と分子機構については動物モデル実験により明らかにされている。さらに、現在は、健康成人ボランティアを用いた臨床研究を行っており、経鼻不活化インフルエンザワクチンの実用化に向けて着実に研究を進めている。現在までの所、動物やヒトにおいてワクチン接種に伴う重大な副反応は見られておらず、このワクチンの安全性も高いと考えられるが、多人数に接種されて初めて露見する副反応を事前に適切に評価することは非常に難しい。また、これまでにヒトで認可された経鼻不活化ワクチンは存在しないことから、この投与ルートにおける安全性評価の指標も存在しない。一般に医薬品の安全性を評価する上では、製剤の体内動態を把握しておくことが非常に重要である。そこで、本研究では経鼻不活化ワクチンの安全性評価の基礎を築くためにPET 検査用に放射性同位体で標識したワクチン製剤をマウスもしくはサルに経鼻投与し、その体内動態を明らかにすることを目的としている。本年度は、標識製剤作成のための精製条件の検討を行った。

B. 研究方法

1) 材料

ワクチン製剤は一般財団法人阪大微生物病研究会観音寺研究所より供与していただいた不活化インフルエンザワクチン H5N1 (NIBRG-14 株)を用いた。

2) Cellufine Sulfate カラムを用いたアフィニティー精製

ワクチン製剤のアフィニティー精製は FPLC クロマ

トグラフィーシステム AKTAprime plus を用いた。サンプルを 0.45 μm フィルターでろ過することにより清澄化を行った。500ul のサンプルを結合バッファー(0.01M リン酸バッファーpH7.4)で平衡化した Mini column Cellufine Sulfate (ver2.1) 1ml にアプライし、25ml の洗浄バッファー(0.01M リン酸バッファー pH7.4、0.18M NaCl)で洗浄を行った。その後、20ml の溶出バッファー(0.01M リン酸バッファーpH7.4、3M NaCl)を送液し、溶出液を 0.5ml ずつ分取した。全ての送液は 0.5ml/min で行った。

3) ゲル濾過クロマトグラフィーカラムを用いたワクチン製剤の精製

ワクチン製剤のゲル濾過クロマトグラフィー精製は FPLC クロマトグラフィーシステム AKTAprime plus により行った。サンプルを 0.45 μm フィルターでろ過することにより清澄化を行った。500ul のサンプルを溶出バッファー(0.01M リン酸バッファー pH7.4)で平衡化したゲルろ過クロマトグラフィーカラム(Superose 12 10/300 GL, GE)にアプライし、さらに 36ml の溶出バッファーを送液し、溶出液を 0.5ml ずつ分取した。全ての送液は 0.5ml/min で行った。

4) SDS-PAGE

クロマトグラフィー分画後のサンプルを2-メルカプトエタノールを加えたサンプルバッファーと混ぜ、95°C、5分のインキュベーション行う事で変性させたものをサンプルとし、12%ゲルで SDS-PAGE を行った。

5) 電子顕微鏡観察

分画後のサンプルの固定は 4%グルタルアルデヒド、2%リンタングステン酸によるネガティブ染色

を実施した。観察は、透過型電子顕微鏡 JEM-1400 (日本電子)で行い、撮影は付属の CCD カメラを用いた。

C. 研究結果

1) ワクチン製剤のアフィニティー精製

Cellufine sulfate を用いたインフルエンザウイルスの精製については過去に報告があり、その方法に準じて精製を行った。しかしながら、今回用いた不活化全粒子インフルエンザワクチンは、同条件ではカラムへ吸着せず、精製を行うことが出来なかった (図1)。

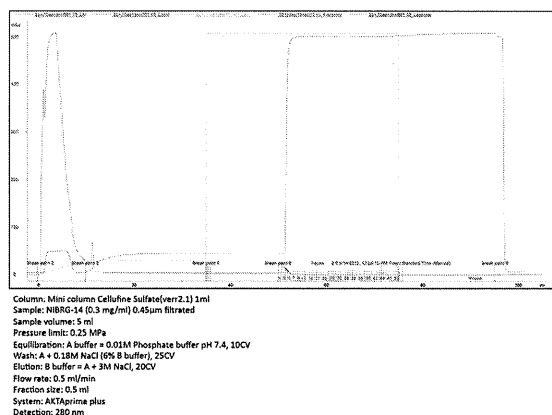


図1 Cellufine sulfate を用いたインフルエンザウイルスの精製

2) ゲル濾過クロマトグラフィーによるワクチン製剤の精製

全粒子不活化ワクチンは、ウイルス粒子の形態が保たれたまま不活化されており、その粒径は 100nm を超え、粒径分布も広い。このような巨大な分子を高速で分画できるゲル濾過クロマトグラフィーカラムは存在しないことから、小分子である放射性同位体を排除することを目的として Superose12 カラムを用いたゲル濾過クロマトグラフィーによる精製を行った。クロマトグラムには、ワクチン製剤と考

えられるピークが Void volume に見られた (図2)。ピーク分画のサンプルを SDS-PAGE により解析したところ、input サンプルと同様のバンドが確認された (図3)。さらにピーク分画の電子顕微鏡観察では、精製前のサンプルと同様に明瞭なオルソミクソウイルス粒子が観察された (図4)。以上の結果より、ワクチン製剤はゲル濾過クロマトグラフィーにより Void volume に分画され、数百 KDa 以下の分子と明瞭に分離できることが明らかになった。

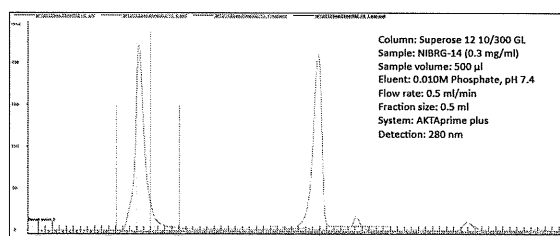


図2 ゲル濾過クロマトグラフィーによるワクチン製剤の精製

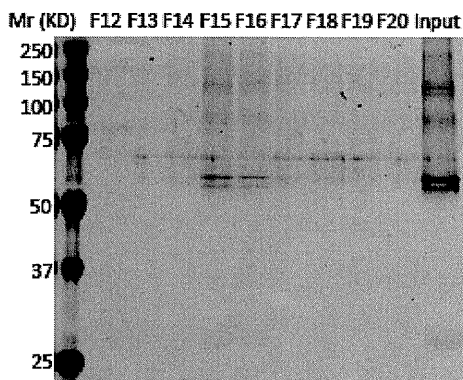


図3 ゲル濾過分画の SDS-PAGE

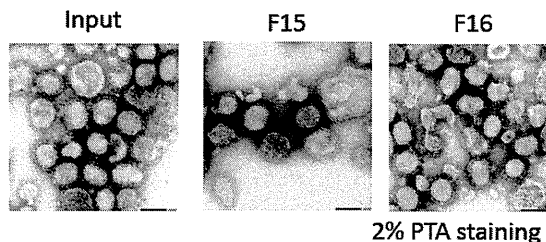


図4 ゲル濾過分画の電子顕微鏡解析

D. 考察

PET 検査を行うためにはサンプルを放射性同位体で標識することが必要不可欠であるが、PET に用いる放射性同位体の半減期は短く、精製プロセスには迅速性が求められる。通常のインフルエンザワクチンの精製には、超遠心法が用いられるが、迅速性の観点から PET プローブの精製には適さない。そこで、本研究ではクロマトグラフィーによるプローブ精製を試みた。過去にインフルエンザウイルスのアフィニティー精製の担体として報告のある Cellufine sulfate を用いた精製は非不活化ウイルス粒子にしか用いる事が出来ず、不活化全粒子ワクチンの精製には不適であることが明らかになった。一方、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いた精製では、不活化全粒子インフルエンザワクチンは Void フラクションに溶出され、数 KDa 以下である放射性同位体と明瞭に分離できると考えられた。この Void フラクションに溶出された粒子は、精製前粒子と同様の形状を保っており、精製過程によるワクチン製剤の変質の可能性は低いと考えられる。インフルエンザウイルス粒子は均一な形状をしておらず、不活化全粒子インフルエンザワクチンも様々な形状の粒子の混合物からなる。不活化全粒子ワクチンにおいて、主にワクチン効果を担っているのは 100nm 程度の粒子形状を有した抗原であると考えられており、ゲル濾過クロマトグラフィーで Void フラクションに溶出される粒子の体内動態を PET により解析する事により、本研究目的は達成されることが考えられる。

E. 結論

PET を用いて次世代ワクチンである経鼻不活化インフルエンザワクチンの体内動態を明らかにし、その安全性を評価するために放射性同位体標識した

不活化全粒子インフルエンザワクチンの PET プローブ精製の条件検討を行った。PET プローブの精製には Superose12 カラムを用いたゲル濾過クロマトグラフィーによる精製が適していることが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakajima N, Van Tin N, Sato Y, Thach HN, Katano H, Diep PH, Kumasaka T, Thuy NT, Hasegawa H, San LT, Kawachi S, Liem NT, Suzuki K, Sata T. Pathological study of archival lung tissues from five fatal cases of avian H5N1 influenza in Vietnam. *Mod Pathol*. 2012 Nov 23. doi: 10.1038/modpathol.2012.193. [Epub ahead of print]
- 2) Sasaki I, Hoshino K, Sugiyama T, Yamazaki C, Yano T, Iizuka A, Hemmi H, Tanaka T, Saito M, Sugiyama M, Fukuda Y, Ohta T, Sato K, Aina A, Suzuki T, Hasegawa H, Toyama-Sorimachi N, Kohara H, Nagasawa T, Kaisho T. Spi-B is critical for plasmacytoid dendritic cell function and development. *Blood*. 2012 Oct 11. [Epub ahead of print]
- 3) van Riet E, Aina A, Suzuki T, Hasegawa H. Mucosal IgA responses in influenza virus infections; thoughts for vaccine design. *Vaccine*. 2012 Aug 31;30(40):5893-900. Epub 2012 Jul 24.
- 4) Yanagita H, Yamamoto N, Fuji H, Liu X, Ogata M, Yokota M, Takaku H, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Hoshino T. Mechanism of Drug Resistance of

Hemagglutinin of Influenza Virus and Potent Scaffolds Inhibiting Its Function. ACS Chem Biol. 2012 Jan 13.

5) Aina A, Tamura S, Suzuki T, Ito R, Asanuma H, Tanimoto T, Gomi Y, Manabe S, Ishikawa T, Okuno Y, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Kurata T, Hasegawa H. Characterization of neutralizing antibodies in adults after intranasal vaccination with an inactivated influenza vaccine. J Med Virol. 2012 Feb;84(2):336-44.

2. 学会発表

1) 長谷川秀樹: 次世代ワクチンとしての経鼻インフルエンザワクチン。第 60 回日本ウイルス学会学術集会(大阪)2012 年 11 月

2) 山本典生、浅沼秀樹、佐藤佳代子、中内美奈、高橋 仁、許斐奈美、相内 章、長谷川秀樹、田代眞人: 細胞培養もしくは鶏卵で製造されたインフルエンザワクチンの品質管理試験および免疫応答への影響。第 60 回日本ウイルス学会学術集会(大阪)2012 年 11 月

3) 川口 晶、鈴木忠樹、相内章、佐藤由子、信澤枝里、田代眞人、長谷川秀樹: 喘息発作誘発モデルを用いたインフルエンザウイルス感染症の病態解析。第 60 回日本ウイルス学会学術集会(大阪)2012 年 11 月

4) 池田千将、伊藤 良、相内 章、鈴木忠樹、田村慎一、田代眞人、浅沼秀樹、長谷川秀樹: 基礎免疫を有する個体に対する経鼻投与型インフルエンザワクチン効果。第 60 回日本ウイルス学会学術集会(大阪)2012 年 11 月

5) 泉地恭輔、相内 章、鈴木忠樹、浅沼秀樹、長谷川秀樹: 経鼻投与型インフルエンザワクチンによ

るマウス母子免疫の解析。第 60 回日本ウイルス学会学術集会(大阪)2012 年 11 月

6) 鈴木忠樹、川口 晶、相内 章、田村慎一、伊藤 良、小田切孝人、田代眞人、長谷川秀樹: インフルエンザワクチン経鼻接種により鼻腔内に誘導される分泌型 IgA 抗体の性状解析。第 16 回日本ワクチン学会学術総会(横浜)2012 年 11 月

7) 相内 章、池田千将、伊藤 良、鈴木忠樹、泉地恭輔、田村慎一、田代眞人、浅沼秀樹、長谷川秀樹: 感染あるいはワクチン接種歴が経鼻投与型インフルエンザワクチンにより誘導される抗体応答に対して与える影響。第 16 回日本ワクチン学会学術総会(横浜)2012 年 11 月

8) Elly van Riet, Aina A, Ito R, Senchi K, Suzuki T, Tamura S-I, Tashiro M, Hasegawa H: Characteristics of IgA versus IgG human monoclonal antibodies cloned from human plasma cells induced upon intranasal H5N1 vaccination. 第 16 回日本ワクチン学会学術総会(横浜)2012 年 11 月

9) Hasegawa H, Aina A, Suzuki T, Tamura S-I, Tashiro M, Kurata T: Analysis of protective immune responses after intranasal administration of an inactivated whole-virion influenza vaccine in human. 第 16 回日本ワクチン学会学術総会(横浜)2012 年 11 月

10) 浅沼秀樹、相内 章、佐藤佳代子、許斐奈美、岸田典子、長谷川秀樹、山本典生、田代眞人: 野外株より細胞培養インフルエンザワクチンの種候補株を選定する基準の検討。第 16 回日本ワクチン学会学術総会(横浜)2012 年 11 月

11) 山崎達也、二宮大輔、長島麻里亜、荒井由佳、手嶋保智、長谷川秀樹、相内 章、藤本 陽、千葉

文: インフルエンザ中和抗体発現プラスミドを用いた受動免疫法の応用研究～長期的なウイルス防御効果と免疫不全マウスへのウイルス防御効果の検討～第 16 回日本ワクチン学会学術総会(横浜)

2012 年 11 月 2. 学会発表

H. 知的財産権の出願、登録状況
なし。

経鼻ワクチンの挙動と安全性評価技術の開発

研究分担者 奥野良信（財阪大微生物病研究会 観音寺研究所長）

研究要旨

2011-2012 シーズン用季節性インフルエンザウイルスからヒトへの経鼻投与を想定した安全性評価用の試作ワクチンを作製した。作製したワクチンについては、その品質管理試験を行った結果、本目的に使用できることを確認した。比較対照として、ワクチンと同じウイルスを含む生ウイルス液も準備した。現在、カニクイザルを用いた経鼻投与実験により、鼻粘膜および嗅神経・中枢神経系への影響を調査する実験を計画中である。

A. 研究目的

- (1)鼻粘膜における経鼻インフルエンザワクチンの安全性を評価するための材料の作製
- (2)安全な経鼻インフルエンザワクチンの開発に寄与する

ワクチン製剤の原料として用いた生ウイルスである A/Victoria/210/2009 (H3N2) ウイルス浮遊液を用いることとした。

経鼻投与用試作ワクチン製剤の安全性評価
上記のワクチン又はウイルス液をカニクイザルに投与し、投与部位の粘膜組織および嗅神経・中枢神経系への影響を調べる試験を計画している。

B. 研究方法

安全性評価用経鼻投与型インフルエンザワクチンの作製

2011/2012 シーズンの季節性インフルエンザワクチン株ウイルスである下記の 3 株の精製ウイルス浮遊液をワクチン抗原の原料とした。

- ・ A/California/7/2009 (H1N1) pdm
- ・ A/Victoria/210/2009 (H3N2)
- ・ B/Brisbane/60/2008 (Victoria 系統)

これら 3 株のウイルスを、個別にホルマリンにより不活化し、全粒子ワクチン原液を作製した。この原液に、人体への経鼻投与型剤型とするために粘稠剤を添加し、安全性評価用の 3 混ワクチン原液を調製した。また、比較対照用として、ワ

(倫理面への配慮)

「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）に基づいた試験を行う予定である。

C. 研究結果

安全性評価用経鼻投与型インフルエンザワクチンの作製

調製したワクチン原液について、HA 含量試験を行なったところ、ワクチン原液の HA 含量は、設定値±15%の範囲内であった。また、無菌試験も適合したため、こ

のワクチンを経鼻投与実験に用いること
とした。

3. その他
なし

D. 考察

インフルエンザウイルス不活化全粒子に、
粘稠剤を添加した剤型の製剤を経鼻投与型
ワクチン候補と想定している。今回は季節
性インフルエンザを予防することを想定し
た三混ワクチン製剤を作製した。この経鼻
投与型ワクチンを用い、鼻粘膜および嗅神
経・中枢神経系への影響の調査を計画して
いる。経鼻投与実験において炎症の発生な
ど、投与部位への影響やウイルスまたはウ
イルス由来蛋白の局在を調査し、経時的な
変化も含め、中枢神経系への移行や免疫担
当細胞との関係を確認していく予定である。

E. 結論

本研究に用いた経鼻投与用季節性インフ
ルエンザワクチン製剤は、人体投与用を想
定した新規の剤型である。経鼻投与実験に
よる安全性評価を通して、投与部位周辺お
よび神経系への影響を確認していくことに
より、安全な経鼻投与型製剤を開発するた
めのデータを集積していく計画である。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表