

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

平成 26 年度 分担者研究報告書

インフルエンザ経鼻ワクチンの体内動態評価

分担研究者：長谷川秀樹（国立感染症研究所 感染病理部）

協力研究者：原田典弘（浜松ホトニクス株式会社 中央研究所 PET センター）

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）

鈴木忠樹（国立感染症研究所 感染病理部）

齊藤慎二（国立感染症研究所 感染病理部）

研究要旨： 現行のインフルエンザ HA ワクチンは皮下接種されるため、全身性の IgG 抗体を誘導できるが、インフルエンザ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。インフルエンザウイルスの感染防御には、粘膜免疫の中でも上気道粘膜上へ分泌型 IgA 抗体の誘導が特に有効であることが、マウスを用いたモデル実験等で明らかにされている。この粘膜免疫は、インフルエンザワクチンを鼻腔領域内に噴霧する経鼻インフルエンザワクチンにより効率的に誘導される。我々は、経鼻不活化インフルエンザワクチンの実用化に向けた研究を行っているが、経鼻インフルエンザワクチンの実用化を考えた場合、ワクチン接種により誘導される抗体応答の評価と共に、その安全性を証明する必要がある。本研究課題では、経鼻インフルエンザワクチンの安全性を評価するために PET を用いて噴霧したワクチンの動態を明らかにすることを目標とする。今年度は 18F 標識を行った経鼻インフルエンザワクチンを使用して、アカゲザル及びマウスを用いたモデル実験を実施した。

A. 研究目的

インフルエンザの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、変異を繰り返し毎年のように抗原性を変化させ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乖離することで、ワクチン効果が著しく低くなる事が知られている。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ニーズは高い。

有効性の高いワクチンを開発するためには、生体内における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正しく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、感染防御に最も寄与する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。注射により皮下に接種される現行の季節性インフルエンザ HA ワクチン（エーテルおよび界面活性剤処理によりインフルエン

ザウイルスを破砕し、ヘマグルチニンを主要抗原とするワクチン)では、血液中にウイルスに対する 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。経鼻インフルエンザワクチンは、血液中の IgG 抗体に加えて感染の場となる上気道粘膜上に分泌型 IgA 抗体を誘導することが明らかになっている。さらにこの分泌型 IgA 抗体は、抗原性が変化したウイルスに対しても感染防御効果が高いこと(交叉防御能)がマウスを用いた実験から明らかになっており、経鼻インフルエンザワクチンは現行のワクチンより有効性の高いワクチンであると期待される。

我々は、不活化全粒子インフルエンザウイルスを抗原とした経鼻インフルエンザワクチンの開発研究を行っている。近年では、健康成人ボランティアを募った臨床試験を実施し、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。しかしながら、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困難である。また、これまでにヒトで認可された経鼻噴霧により接種される不活化ワクチンは存在しないことから、この投与経路における安全性評価の指標も存在しない。一般的に医薬品の安全性を評価する上で、薬物体内動態を研究することは非常に重要である。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及びサルに経

鼻投与し、その体内動態を科学的に明らかにすることを目的としている。本年度は、18F 標識を行った経鼻インフルエンザワクチンを使用して、アカゲザル及びマウスを用いたモデル実験を実施した。同時に、臨床試験に用いている添加剤カルボキシビニルポリマー(CVP)のワクチン製剤への影響も検討した。

B. 研究方法

1) 材料

不活化全粒子インフルエンザワクチンは、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頂いた濃縮単身不活化全粒子インフルエンザワクチン X-179A を用いた。なお、濃縮単身不活化全粒子ワクチン X179-A の HA 濃度は、1500 µg HA/mL である。

2) ワクチンの 18F 標識

不活化全粒子インフルエンザワクチンを 18F 標識するための、[18F]SFB 標識体の合成を行った。その後、不活化ワクチンとのカップリング反応を行い、18F 標識を行った。標識された不活化ワクチンは、FPLC クロマトグラフィーシステム AKTAprime plus によりゲルろ過クロマトグラフィー精製を実施した。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。500µl 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、未反応の[18F]SFB 標識体を除去した標識ワクチンを void volume

に回収した。全ての送液は 0.5ml/min で行った。

3) PET 及び カウンターを用いたマウスにおける 18F 標識ワクチンの動態解析

上述 2)の手順で回収された 18F 標識不活化全粒子インフルエンザワクチンを CVP 添加・非添加の条件にてマウス鼻腔領域内に滴加し（片鼻 2.5 域内、両鼻で計 5 両鼻）接種直後より小型動物用 PET によりその動態を継時的に測定し解析を行った。また、接種したマウスの解剖を継時的に行い、摘出した各臓器の放射線量を カウンターにより測定した。マウスは 6 週齢の雌 BALB/c マウスを用いた。動物への処置は国立感染症研究所および浜松ホトニクス株式会社の定める動物実験実施規定に則り、苦痛を与えないように考慮した。

4) PET を用いたアカゲザルにおける 18F 標識ワクチンの動態解析

上述 2)の手順で回収された 18F 標識不活化全粒子インフルエンザワクチンを CVP 添加・非添加の条件にてアカゲザルの鼻腔領域内に噴霧し（片鼻 250 μ l、両鼻で計 500 μ l）接種直後より PET を用いてその動態を解析した。アカゲザルは浜松ホトニクス株式会社により飼育されているサルを用いた。動物への処置は国立感染症研究所および浜松ホトニクス株式会社の定める動物実験実施規定に則り、苦痛を与えないように考慮した。

C. 研究結果

昨年度の検討において、Superose 12 10/300 GL を用いたゲルろ過クロマトグラフィーを実

施することにより、効率的に[18F]標識された実験用全粒子不活化インフルエンザワクチンを精製できることを明らかにしている。今年度は実際に、マウス及びサルにおいて[18F]標識全粒子不活化インフルエンザワクチンの動態解析を行った。

最初に、マウスにおいて[18F]標識全粒子不活化インフルエンザワクチンの動態解析及び CVP の添加による影響の評価を実施した。PET を用いた動態解析はワクチン接種後 6 時間までデータを採取した。ワクチンは接種 10 分後において鼻腔、咽頭及び胃で、1 時間以降 6 時間まで、鼻腔、腸及び膀胱で検出された。鼻腔及び腸におけるシグナルは時間と共に減衰した。測定時間内においては肺で検出されることはなかった。また、CVP 非添加と比較して CVP 添加ワクチンは 6 時間後において鼻腔で高いシグナルが確認された。カウンターを用いた動態解析（図 1）では、鼻腔、NALT、尿において強いシグナルが検出された。鼻腔及び NALT では接種直後の 10 分をピークとし、経時的に減少した。一方、尿では接種後 3 時間まではシグナルが増加し、その後減少に転じた。嗅球及び大脳において、シグナルは確認できなかった。また、CVP 非添加ワクチンと比較して CVP 添加ワクチンは経時的なシグナル減少が遅くなった。

次に、アカゲザルにおいて[18F]標識全粒子不活化インフルエンザワクチンの動態解析及び CVP の添加による影響の評価を実施した。PET を用いた動態解析は、マウスと同様にワクチン接種後 6 時間までデータを採取した。ヒトに近縁の霊長類において、鼻腔内に存在す

るワクチンの経時的変化を観察できた。マウスと同様に、経時的にシグナルは減少するが、CVP の添加によりその減少は抑えられた。CVP の有無にかかわらず、鼻前庭でのシグナルは測定時間内において変化が見られなかった。

D. 考察

経鼻インフルエンザワクチンは現行のワクチンと異なり鼻腔内にワクチンを接種するため、嗅神経ならびに嗅球をへて脳への影響を危惧する意見等安全性において議論がある。本研究課題では、経鼻インフルエンザワクチン接種に伴う安全性を検証することを目標とし、PET を用いて鼻腔領域内に噴霧したワクチンの動態を明らかにすることを目的とした。今年度は、18F 標識を行った経鼻インフルエンザワクチンを使用して、アカゲザル及びマウスを用いたモデル実験を実施した。同時に、臨床試験に用いている添加剤 CVP のワクチン製剤への影響も検討した。近年、現行のインフルエンザ HA ワクチンと比較して、精製ウイルスを不活化して作製される不活化全粒子ワクチンは、免疫原性が高いことが科学的に証明されている。そこで我々は、現行の HA ワクチンと同様に、3 種類のウイルスから作製される不活化全粒子ワクチンを含む経鼻インフルエンザワクチンの開発・実用化を目指している。

昨年度の検討により確立した標識ワクチン精製法を用いて準備したワクチンをマウス及びサルに経鼻接種し、種々の解析を実施した。

マウスに経鼻接種された標識ワクチンは、接種 10 分後において鼻腔、咽頭及び胃のみで

検出され、1 時間以降では、腸及び膀胱でも確認された。ワクチンは生体内において、まず主要な量が鼻腔内に貯留し、経時的に飲み込まれ消化器系に分布し、代謝され排泄系に移行するものと考えられる。また、測定時間内において肺でワクチンが検出されることはなかったため、上気道に接種する経鼻ワクチンにおいて懸念される呼吸器系への蓄積の可能性が非常に低いことを示唆する。カウンターを用いた動態解析においても、同様に肺においてワクチンの蓄積は認められなかった。そして、カウンターを用いた動態解析において、嗅球及び大脳でのワクチンの検出は出来なかった。経鼻ワクチンにおいて、脳を含む中枢神経系への影響が最も危惧されているが、ワクチンが中枢神経系へ影響を及ぼす可能性は低いことを裏付ける科学的知見と考えられる。以上の結果を纏めると、カウンターを用いた従来の動態解析法と比較して、PET を用いた動態解析法は同様の結果が得られた。故に、本方法は安全性を評価する上で従来法において不可能であったリアルタイムの変化という時間的情報を得ることができ、非常に有用であると考えられる。

アカゲザルに経鼻接種された標識ワクチンは、主要な免疫応答の場である鼻腔に注目し解析された。接種後鼻腔に存在するワクチンは、マウスと同様に経時的にシグナルは減少した。CVP をワクチンに添加した場合、鼻腔内での貯留性に改善が認められた。同様の結果が、マウスにおいても得られた。近年、鼻腔粘膜上に接種したワクチンの流動性を抑え保持時間を長くすることで、ワクチン効果が増

強することが示されている (Yuki Y *et al.*, *Biotechnol Genet Eng Rev.* 2013 Oct;29 (1-2):61-72.). これらをまとめると既に市販薬において使用されている CVP は、経鼻ワクチンにおいてもワクチンの保持時間を長くすることでワクチン効果の増強に寄与することが期待できる。鼻前庭でのシグナルは測定時間内において変化が見られなかった。これは鼻前庭の上皮細胞は繊毛運動を行わないために起こったものと考えられる。

今後、マウス及びサルを用いてより詳細に検討する予定である。

E. 結論

次世代ワクチンである経鼻不活化全粒子インフルエンザワクチンの安全性を評価することを目標とし、PET を用いてその動態を明らかにするための検討を行った。マウスにおいて、PET を用いた動態解析法は カウンターを用いた動態解析法と同様の結果が得られ、リアルタイムに情報の得られる優れた手法であることを示した。マウス及びサルを用いた動物実験において、ワクチンの全身性の動態とヒトに近い頭部での動態の両方を検討出来ることを示した。また、粘調剤 CVP のワクチンへの添加が鼻腔内での貯留性の改善に寄与することを示した。本研究から得られた結果は、経鼻ワクチンにおいて懸念されている事項に対して、安全性を証明するものと示唆される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakai K, Ami Y, Tahara M, Kubota T, Anraku M, Abe M, Nakajima N, Sekizuka T, Shirato K, Suzaki Y, Ainai A, Nakatsu Y, Kanou K, Nakamura K, Suzuki T, Komase K, Nobusawa E, Maenaka K, Kuroda M, Hasegawa H, Kawaoka Y, Tashiro M, Takeda M. The host protease TMPRSS2 plays a major role in in vivo replication of emerging H7N9 and seasonal influenza viruses. *J Virol.* 2014 May;88(10):5608-16. Epub 2014 Mar 5.
- 2) van Riet E, Ainai A, Suzuki T, Kersten G, Hasegawa H. Combatting infectious diseases; nanotechnology as a platform for rational vaccine design. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014 Jul 30;74:28-34. Epub 2014 May 23.
- 3) Hasegawa H, van Reit E, Kida H. Mucosal immunization and adjuvants. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2015;386:371-80.

2. 学会発表

- 1) Hideki Hasegawa Pathology of influenza virus infection and the role of secretory-IgA antibodies in influenza virus infection. 第62回日本ウイルス学会学術集会 横浜 2014.11
- 2) Tadaki Suzuki, Hideki Hasegawa Pathology and pathogenesis of emerging

- and re-emerging viral infections. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 横浜 2014.11
- 3) 齊藤 慎二、Elly van Riet、相内 章、鈴木 忠樹、池田 千将、伊藤 良、泉地 恭輔、高橋 宜聖、浅沼 秀樹、小田切 孝人、田代 真人、田村 慎一、竹山 春子、長谷川 秀樹 高病原性鳥インフルエンザ A(H5N1) ウイルスの経鼻不活化全粒子ワクチンにより誘導されたヒトモノクローナル抗体の特性解析 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 横浜 2014.11
 - 4) 大原 有樹、鈴木 忠樹、中野 哲郎、齊藤 慎二、相内 章、秋元 和憲、長谷川 秀樹 低毒性型合成二重鎖 RNA uPIC を用いた経鼻インフルエンザワクチンの開発 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 横浜 2014.11
 - 5) 長谷川 秀樹、相内 章、鈴木 忠樹、川口 晶、田村 慎一、小田切 孝人、田代 真人、倉田 毅 経鼻不活化全粒子インフルエンザワクチンと現行皮下接種ワクチンの抗体応答の比較 第 18 回日本ワクチン学会学術集会 福岡 2014.12
 - 6) 齊藤 慎二、van Riet Elly、相内 章、鈴木 忠樹、大原 有樹、池田 千将、伊藤 良、泉地 恭輔、高橋 宜聖、浅沼 秀樹、小田切 孝人、田代 真人、田村 慎一、竹山 春子、長谷川 秀樹 経鼻インフルエンザワクチンにより誘導されたヒトモノクローナル抗体の特性解析 第 18 回日本ワクチン学会学術集会 福岡 2014.12
 - 7) 相内 章、鈴木 忠樹、齊藤 慎二、田村 慎一、幸 義和、小田切 孝人、田代 真人、清野 宏、長谷川 秀樹 経鼻インフルエンザワクチンの動態と抗体応答 第 18 回日本ワクチン学会学術集会 福岡 2014.12
 - 8) 森山 美優、竹山 春子、長谷川 秀樹、一戸 猛志 インフルエンザウイルス特異的 CTL 誘導のための経鼻ワクチン投与方法の検討 福岡 2014.12
 - 9) 鈴木 忠樹、大原 有樹、中野 哲郎、齊藤 慎二、寺内 芳彦、相内 章、長谷川 秀樹 合成二本鎖 RNA uPIC をアジュバントとする経鼻不活化インフルエンザワクチンの開発 第 18 回日本ワクチン学会学術集会 福岡 2014.12
 - 10) Hideki Hasegawa Induction of Neutralizing Antibodies by Inactivated Intranasal Influenza Vaccine and Characteristic of Induced Secretory-IgA Antibodies in Human. Third isirv Antiviral Group Conference, Tokyo, Japan, June 2014
 - 11) Hideki Hasegawa Mucosal Influenza Vaccines. The 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID), Taipei, Taiwan January 2015
- H. 知的財産権の出願、登録状況
なし。

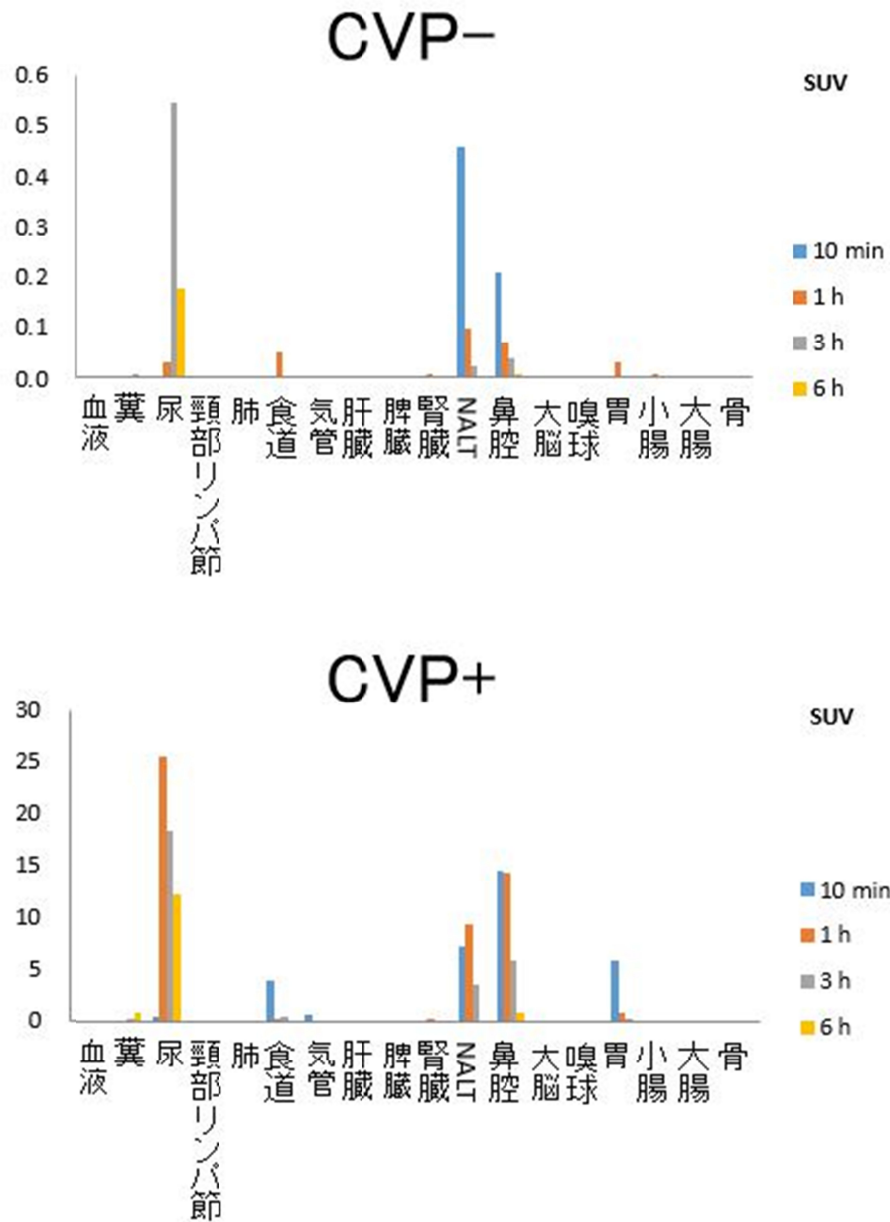


図1. カウンターを用いたマウスにおける 18F 標識ワクチンの動態解析

全粒子インフルエンザワクチンを 18F で標識した後、CVP 添加・非添加の製剤を用意し、マウスへ経鼻接種を実施した。継時的にマウスを解剖し、摘出した各臓器の放射線量をカウンターにより測定し、SUV として示した。鼻腔領域におけるワクチンの貯留性の向上が認められた。また、中枢神経系での蓄積は検出されなかった。