

201407015B

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24～26年度 総合研究報告書

研究代表者 幸 義和

平成27(2015年)3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 16
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 28
III. 研究成果に関する一覧	33
IV. 研究成果の刊行物・別刷(主要なもの)	42

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）

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）

片貝祐子（予防衛生協会 研究支援企画部）

福山賀子（東京大学医科学研究所 炎症免疫分野）

研究要旨： 本課題は経鼻ワクチンを開発する上での効果および安全性を試験する方法の確立を目指した。そのために、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行動への影響及び嗅球での嗅覚神経の活動イメージング (Odor mapping) 解析を、マウスを使って実施するために、不活化インフルエンザウイルスワクチンに用いられ顔面麻痺を誘発した LT と同じタイプのアジュバントであるコレラトキシン (CT) を用いて実施した。その結果、(1) CT は嗅球に移行し嗅覚や Odor map に傷害を与える (2) コレラトキシン B 鎖 (CTB) は嗅球に移行するが、嗅覚や Odor map に傷害を与えない (3) 嗅覚や Odor map による傷害には A 鎖の ADP リボース転位酵素により最終的にネクロシスが起これることにより傷害される、ことを検証できた。また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、サルでワクチン効果の確認及び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) 試験をマウス及びサルを用いて試験可能な ¹⁸F-PET イメージング技術を使って解析した。その結果 (1) 肺炎球菌経鼻ワクチンはサルでもワクチン特異的血清 IgG 及び粘膜 IgA 及び Th17 T 細胞を誘導して、肺炎球菌の防御免疫を誘導すること、(2) ワクチン自身は鼻腔上皮に長時間滞留するが、嗅球に移行しないことをマウス及びサルを用いて検証できた。以上、これらの結果から、経鼻投与されたワクチン/アジュバントの脳内移行を含む体内動態と鼻腔上皮・嗅覚神経細胞に吸着したワクチンの嗅覚への影響及び嗅覚神経の脳への情報伝達の影響を評価できるシステムを開発することで、経鼻ワクチンの安全性評価の解析ツールを開発した。

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水溶性多糖特にプルランにコレステリル基を部分的に導入したコレステロール置換カチオン化プルラン (cCHP ナノゲル) を用いた経鼻ワクチンデリバリーシステムが、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が、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。そこで (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。そこで本課題では (1) 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 を用いて実施する。(2) ナノゲル肺炎球菌経鼻ワクチンのサルでの免疫効果並びに (3) 肺炎球菌経鼻ワクチンの 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の検討を行った。

B. 研究方法

1) 材料

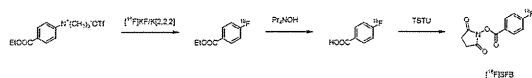
肺炎球菌ワクチンは東大医科研で、肺炎球菌の表面抗原の大腸菌発現組換え PspA を高純度に精製して用いた。嗅球への移行実験に用いるコレラトキシン B 鎖 CTB は枯草菌発現系を用いて発現精製した。コレラ毒素 CT は List 社から購入した。

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。

Synthesis of [^{18}F]SFB and conjugation with PspA

Synthesis of [^{18}F]SFB



Conjugation with PspA

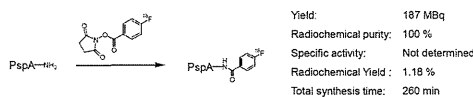


図 1 ^{18}F -PspA の合成法

3) 経鼻ワクチンナノゲル PspA の調製

サルー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 $^{\circ}\text{C}$ 、1 時間反応させて調製した。

4) 組織観察

C T または C T B (30 μg) 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 C T B 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

嗅球糸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 (3C00H) と valeric acid (5C00H) 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においの入力があって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 (3C00H) と valeric acid (5C00H) 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。

7) 免疫応答の評価

初回免疫の前、各免疫の 1 週間後、最終免疫から 2, 4, 6 及び 8 カ月後、追加免疫から 2 週間後の計 11 回、血清、鼻腔洗浄液および気管支肺胞洗浄液を採取した。これらの PspA 特異的抗体価は ELISA 法にて測定した。

中和抗体価測定 (感染防御効果の判定) では、最終初回免疫の血清 (10 μl) に 90 μl の肺炎球菌 (Xen10: 7.5 x 10³ CFUs) を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分培養した後 BALB/c マウスに腹腔内投与し、1 週間生死判定を行った。

サイトカイン測定には追加免疫後サルの末梢血から Ficoll により分離された末梢血単核

細胞 (PBMC) を用いた。PBMC から CD4+ T 細胞を分離し、抗原提示細胞 (CD4-CD8- T 細胞に・照射で処理したもの) ならびに PspA 5 µg/ml を加え、37°C、5 % CO₂ の条件下のもと 5 日間培養した。培養後、上清を回収し、Monkey Singleplex Bead Kit にて IFN- γ 、IL-4、IL-17 の濃度を測定した。

8) マイクロRNA (miRNA) の定量

追加免疫後、血清、鼻腔粘膜組織および肺組織を回収し、miRNA の抽出を行った。免疫原性に関与する miR-181a ならびに miR-326 の発現量を real-time PCR 法にて測定した。

9) ナノゲル経鼻ワクチンの物性

ナノゲル化 PspA の物性は、2 重蛍光標識して、FRET 解析、大きさ (DH 解析)、荷電 (Zeta-potential) で評価した。

10) PET を用いたサルにおける ¹⁸F 標識ワクチンの動態解析

¹⁸F 標識 PspA を cCHP (20mg/ml) で、PspA : cCHP = 1:5 モル比で、ナノゲル化 (45°C、30 分) したもの、及び ¹⁸F-PspA をアカゲザルの鼻腔領域内に投与 (片鼻 250µl、両鼻で計 500µl)、接種直後より PET を用いてその動態を解析した。ナノゲル用いたアカゲザル 3 頭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

1) 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 30µg 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 2)、CT は投与 24 時間から OMP の発現が極端低下した (図 3)。

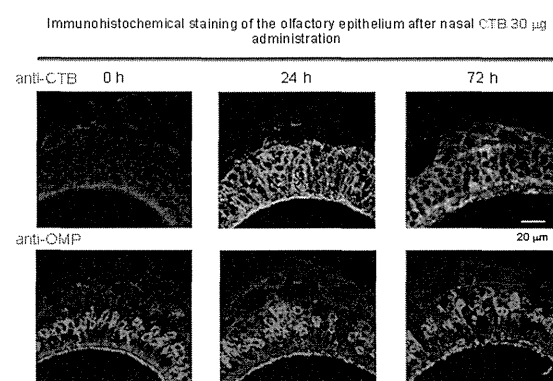


図 2. CTB の経鼻投与の影響

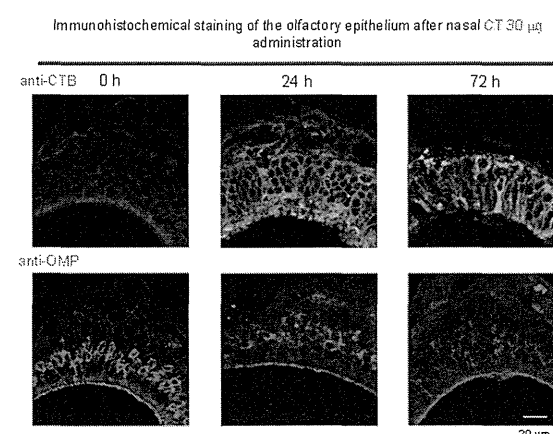


図 3. CT の経鼻投与の影響

2) 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 4 に示す。

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。

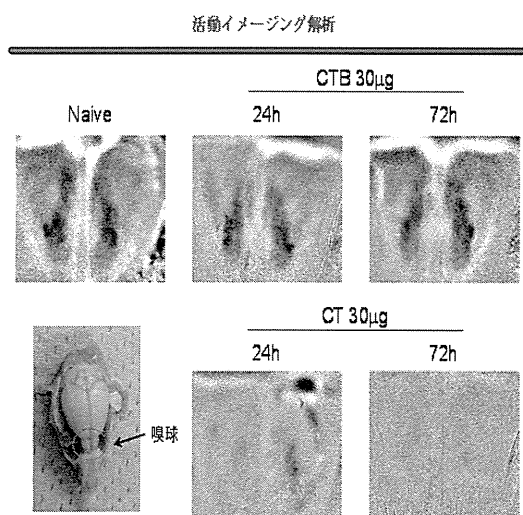


図 4 propionic acid (3COOH) の活動イメージングでの CT 又は CTB 経鼻投与の影響

3) 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。

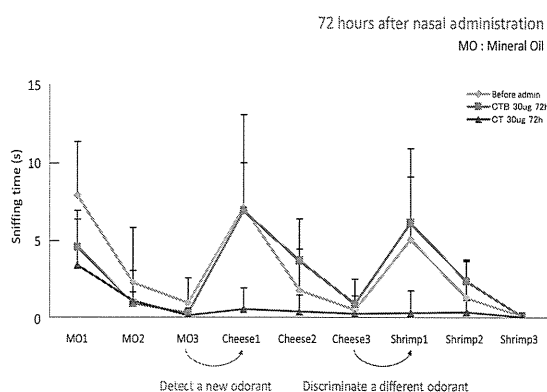


図 5. CT または CTB 経鼻投与でのマウス嗅覚行動

4) ナノゲル化 PspA 経鼻ワクチンの免疫応答誘導

ナノゲル化 PspA 免疫群では、血清中の PspA 特異的 IgG 抗体価が有意に増加し、さらに気管支肺胞洗浄液中の PspA 特異的 IgG 抗体価及び鼻腔洗浄液中の PspA 特異的分泌型 IgA 抗体価もコントロール群に比べはるかに高いレベルを示した。これらの抗体価は徐々に下がる傾向にあったが、追加免疫を行うと、初回最終免疫後のレベルまで回復した (図 5A)。

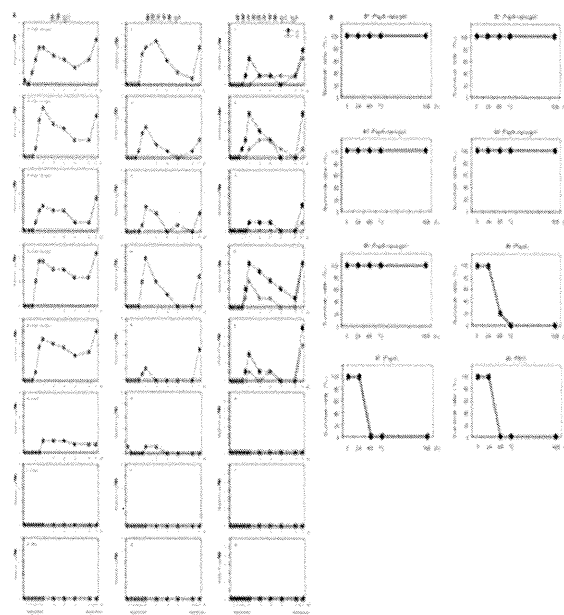


図 5 A) PspA 特異的抗体価の測定結果 B) 中和抗体価の測定結果

抗体価の上昇が認められたことから、追加免疫後の PMBC を用いてサイトカイン測定を行った結果、ナノゲル化 PspA 群において IL-4 ならびに IL-17 の産生が有意に認められ、Th2 ならびに Th17 細胞の免疫応答が誘導されること

が確認できた (図 6)。

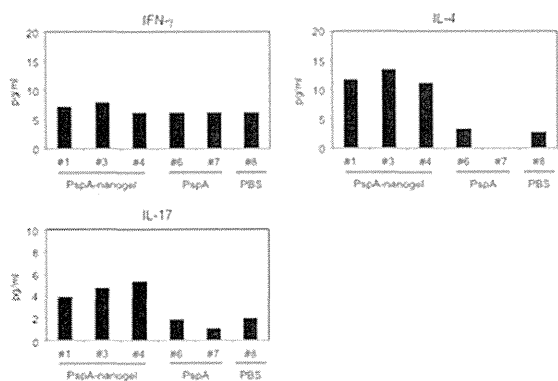


図 6. サイトカイン測定結果

(#2, #5 のサルでは PMBC が分離出来なかった。)

また、ナノゲル化 PspA 群の血清と肺炎球菌を混合させてマウスに腹腔内投与すると、全てのマウスが生存し完全に感染防御効果を示したが、PspA 群や PBS 群の血清を肺炎球菌と混合させてマウスに腹腔内投与すると、マウスは 3 日以内に全て死亡した (図 5B)。

さらに免疫前と追加免疫後の血清中における miRNA の発現量を調べたところ、追加免疫後のナノゲル化 PspA 投与群の血清中で miR-181a や miR-326 の発現が有意に増加した (図 4)。また、追加免疫後の鼻腔粘膜組織および肺組織でも、ナノゲル化 PspA 投与群において miR-181a や miR-326 の発現が有意に増加した (図 7)。

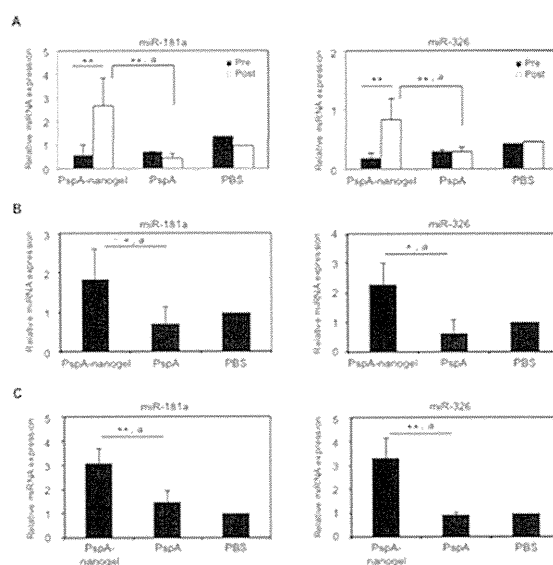


図 7. miRNA 発現量の測定結果

A) 血清 B) 鼻腔粘膜組織 C) 肺組織

Pre: 初回免疫前、Post: 追加免疫後、

a : PspA-nanogel vs PspA/PBS, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

5) 経鼻ワクチンナノゲル PspA-PET に用いる ^{18}F -PspA の合成

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 Superose 12 を用いた。最終生成物の放射能濃度は $187\text{MBq}/12/0.5\text{mL}$ だったので、 $2.67\text{uL}/\text{MBq}$ 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°C 、30 分で行うことになる。

HPLC analysis of [^{18}F]PspA

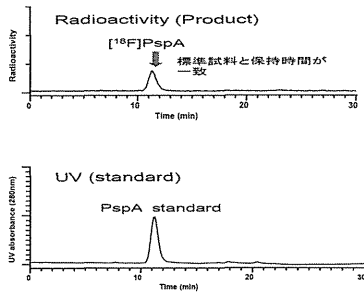


図 8 ^{18}F -PspA の合成

6) ナノゲル PspA 物性

Fluorescence resonance energy transfer (FRET) は二重蛍光標識したナノゲル PspA にのみ観測され、FITC 標識した PspA またはローダミン標識したナノゲル自身には観測されなかった (図 9)。

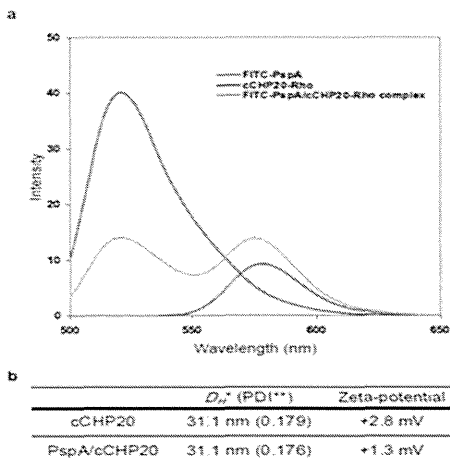


図 9. ナノゲル PspA の FRET (a) と大きさと荷電

7) ^{18}F -PspA ならびにナノゲル化 ^{18}F -PspA 経鼻投与後の PET によるマウス体内動態解析

^{18}F -PspA 単独をマウスに経鼻投与後、 ^{18}F -PspA は鼻腔内には保持されず、すぐに排泄されるが、ナノゲル化された ^{18}F -PspA の経鼻投与を

行くと、

^{18}F -PspA は鼻腔内に 6 時間以上保持された (図 10)。経鼻投与された ^{18}F -PspA の一部は鼻腔から食道、胃を経由して排泄された。 ^{18}F の排泄の主な経路は ^{18}F -Lys と推定される低分子分解体が血中を介して尿に排泄されることが確認された。

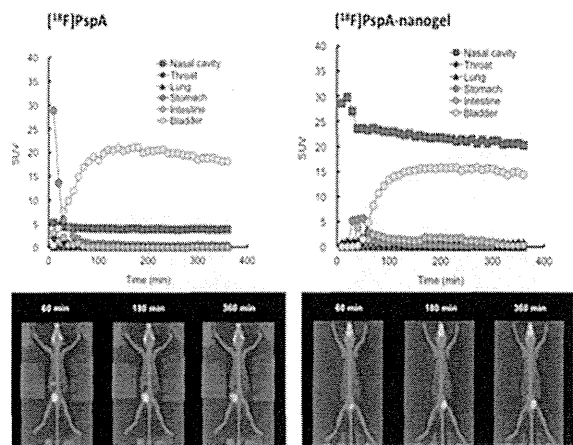


図 10. ^{18}F -PspA ならびにナノゲル化 ^{18}F -PspA 経鼻投与後の PET による体内動態解析

8) ナノゲル PspA サル PET 解析

3 頭のアカゲザルを用いて、同一のアカゲザルに 1 週間以上空けて交互に ^{18}F -PspA または ^{18}F -PspA を経鼻投与して頭部 PET 解析を実施した。3 頭ともほぼ同一の結果が得られたので、ここでは代表的な 1 頭の頭部 PET 及び MRI データを示す (図 11)。サルの頭部は PET スキャナーの中に置かれ、6 時間 real-time で測定された。脳の正確な位置を確認するため MRI イメージングを重ねた。real-time PET は経鼻投与されたナノゲル PspA は効果的に鼻腔上皮にデリバリーされ、6 時間以上にわたって、鼻腔上皮に滞留した。一方、ナノゲ化されていない PspA は経鼻投与後 3 時間以内に鼻腔内から消

失された。その上、ナノゲル PspA 経鼻投与において、脳及び嗅球への PspA の沈着は 6 時間後でも認められなかった。これらの結果は、ナノゲル PspA はサルに於いても脳神経系への安全性の評価に問題は見つからなかった。

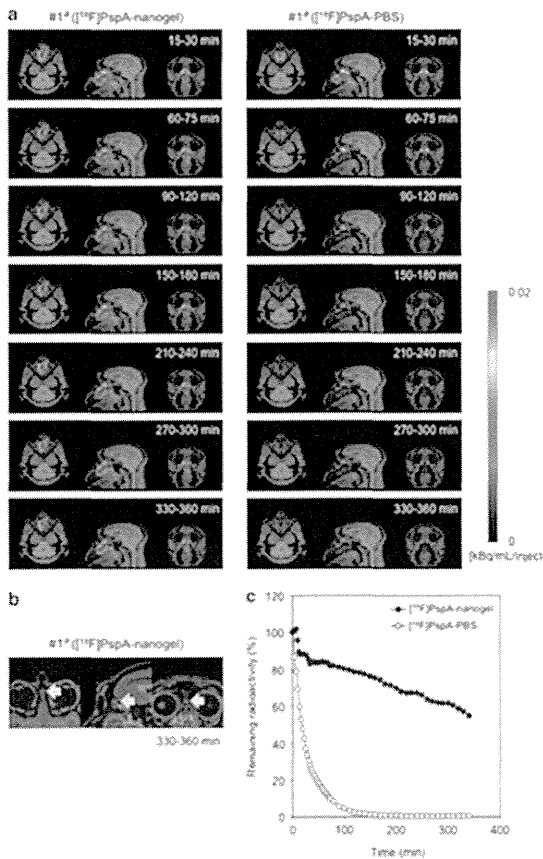


図 11. ナノゲル PspA の PET 解析
頭部 (a, c) と嗅球 (b)

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、ワクチンの嗅上皮または嗅球へ影響の評価法及びサルにも適応できる体内動態解析のための蛋白 PET の開発を進めた。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。

ナノゲル化 PspA の経鼻投与により、マウス以外でサルでも血清中ならびに気道粘膜中の PspA 特異的抗体産生を誘導出来ることが明らかとなった。さらに血清中の PspA 特異的 IgG 抗体により感染防御効果を示すことがわかった。この抗原特異的な抗体産生は IL-4 産生による Th2 細胞の免疫応答の誘導であることが確認できた。また、肺炎球菌の増殖抑制には IL-17 の産生による好中球やマクロファージの活性が必要であることが報告されており、ナノゲル化 PspA をサルに経鼻投与後 IL-17 の産生が上昇したことは、肺炎球菌ワクチンを開発していく上で非常に重要である。一方で、T 細胞や B 細胞の分化に関連性のある miR-181a、Th17 細胞の分化に関連性のある miR-326 の発現量がナノゲル化 PspA 免疫群で上昇されたことから、Th2 細胞ならびに Th17 細胞の免疫応答をサポートしており、今後、経鼻ワクチンの免疫応答に対するバイオマーカーとなることが期待される。ここで我々は経鼻ワクチンとして、カチオン性ナノゲルを用いて、肺炎球菌ワクチン抗原 PspA をナノゲ

ル化して、その物性を FRET (fluorescence response energy transfer) や DSL (dynamic light scattering) を用いて解析し、その品質の均一性を証明した。またナノゲル PspA のもつ positive zeta-potential は、PET/MRI により、PspA 単独に比して、効果的に鼻腔上皮に吸着し、長時間保持できることを in vivo 試験において証明することができた。この結果は、カチオン化ナノゲルの経鼻ワクチンデリバーとして有効であることを示した。実際、経鼻ナノゲル化ワクチンはマウスの実験において、鼻腔上皮細胞にの保持され、endocytosis により、上皮細胞から取り込まれて、細胞内で、ナノゲルのもつシャペロン活性によりナノゲルからからワクチンが native な形で放出され、exocytosis にて上皮細胞から基底膜下に達して、樹状細胞に取り込まれることが証明されている。

マウスにおける PET での体内動態解析により、ナノゲル化を行うことで PspA ワクチンの鼻腔内での保持効果があることが確認できた。また、ナノゲル化 ^{18}F -PspA を経鼻投与後各臓器を摘出し SUV (standardized uptake value) を測定したところ、嗅球および脳への移行が認められなかった。このことから、ナノゲル化 PspA は安全性の高い経鼻ワクチンであることが証明された。さらに経鼻投与されたナノゲル ^{18}F -PspA は、投与 6 時間では嗅球、脳への移行がないことがサルにおいて証明された。我々は以前の研究でサルにおいて CTB/CT は投与 6 時間で嗅球へ移行することを PET 研究で証明しており、PET での ^{18}F の感度限界は 0.05 SUV 以下であることを確認し

ている (J. Immunol. 185: 5436 2010)。それ故、今回の我々の結果は PspA 経鼻ワクチンに用いられるナノゲルデリバリーシステムはマウスのみならず、サルのような高等動物においても、中枢神経系への移行、沈着はなく、安全な経鼻デリバリーシステムであることを示している。

E. 結論

次世代ワクチンであるアジュバンドを含まないナノゲル型経鼻肺炎球菌 PspA ワクチンの効果と安全性を評価することを目標とし、(1) 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開発した。また (2) PET を用いてその動態を明らかにするためのナノゲル化 ^{18}F -PspA 及び ^{18}F -PspA のマウス及びサルでの PET 解析を行いそのデリバリー効果、嗅球・脳等への移行有無から安全性を評価した。加えて、サルを用いナノゲル化 PspA 経鼻ワクチンの血清、上気道、下気道での抗体の誘導、肺炎球菌中和効果、サイトカインの誘導、及び miRNA による誘導制御効果を検討し、ナノゲル化 PspA 経鼻ワクチンのサルでの有効性が評価できた。

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.* 6: 838–846 (2013)
 - 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.* 81: 1625–1634 (2013)
 - 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. Fijihashi. 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
 - 6) D. Tokuhara, B. Álvarez, M. Mejima, Y. Takahashi, S. Kurokawa, T. Hiroiwa, M. Kuroda M. Oyama, H. Kozuka-Hata, T. Nochi, H. Sagara, F. Aladin, H. Marcotte, L. Frenken, M. Iturriza-Gómara, H. Kiyono, L. Hammarström, Y. Yuki. Rice-based orally administered antibody fragment prophylaxis and therapy against rotavirus infection. *J. Clin. Invest.* 123: 3829–3838, (2013)
 - 7) S. Kurokawa, R. Nakamura, M. Mejima, H. Kozuka-Hata, M. Kuroda, N. Takeyama, M. Oyama, S. Satoh, H. Kiyono, T. Masumura, R. Teshima, Y. Yuki. MucoRice-cholera toxin B-subunit, a rice-based oral cholera vaccine, down-regulates the expression of α -amylase/trypsin inhibitor-like protein family as major rice allergens. *J. Proteome Res.* 12:3372–3382 (2013)
 - 8) S. Kurokawa, M. Kuroda, M. Mejima, R. Nakamura, Y. Takahashi, H. Sagara, N. Takeyama, S. Satoh, H. Kiyono, R. Teshima, T. Masumura, Y. Yuki. Change in localization of cholera toxin B-subunit expressed in rice upon RNAi-mediated suppression of endogenous storage proteins leads to down-regulation of the rice allergen protein RAG2. *Plant Cell Reports* 33:75–87 (2014)
 - 9) M. Abe, Y. Yuki, S. Kurokawa, M. Mejima,

- M. Kuroda, E.J. Park, J. Scheller, U. Nakanishi, H. Kiyono: A rice-based soluble form of a murine TNF-specific llama variable domain of heavy-chain antibody suppresses collagen-induced arthritis in mice. *J. Biotechnol.* 175: 45-52 (2014)
- 10) Y. Yuki, T. Nochi, IG. Kong, H. Takahashi, S. Sawada, K. Akiyoshi, & H. Koyono. Nanogel-based antigen delivery system for nasal vaccines. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 29:61-72 (2013)
- 11) 幸 義和: 経口ワクチン 日本統合医療学会誌 6: 44-49 (2013)
- 12) 幸 義和: 粘膜ワクチン製剤のDDS技術の動向と実用化の可能性—
「DDS製剤の開発・評価と実用化手法」(技術情報協会) 178-185(2013)
- 13) D. Tokuhara, T. Nochi, A. matsumura, M. mejima, Y. Takahashi, S. Kurokawa, H. Kiyono, Y. Yuki*: Specific Expression of Apolipoprotein A-IV in the Follicle-Associated Epithelium of the Small Intestine *Dig. Dis. Sci.* 59: 2682-2692 (2014).
- 14) T. Azegami , Y. Yuki , H. Kiyono: Challenges in Mucosal Vaccines for the Control of Infectious Diseases. *Int. Immunol* 26:517-526 (2014)
- 15) M. Mejima, K. Kashima, M. Kuroda, N. Takeyama, S. Kurokawa, Y. Fukuyama, H. Kiyono, K. Itoh, T. Mitsui, Y. Yuki*: Development of selection marker-free rice-based oral cholera toxin B-subunit vaccine and characterization of location and structure of transgene by using whole genome resequencing analysis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 120: 35-48 (2015)
- 16) K. Kashima, M. Mejima, S. Kurokawa, M. Kuroda, H. Kiyono, Y. Yuki*. Comparative whole-genome analyses of selection marker-free rice-based cholera toxin B-subunit vaccine lines with wild-type lines. *BMC Genomics* 16:48 (2015)
- 17) Y. Fukuyama, Y. Yuki*, Y. Katakai, N. Harada, H. Takahashi, S. Takeda, M. Mejima, S. Joo, S. Kurokawa, S. Sawada, H. Shibata, E.J. Park, K. Fujihashi, D. Briles, Y. Yasutomi, H. Tsukada, K. Akiyoshi, H. Kiyono: Nanogel-based pneumococcal surface protein A nasal vaccine induces microRNA-associated Th17 cell responses with neutralizing antibodies against *Streptococcus pneumoniae* in macaques. *Mucosal Immunol.* in press doi:10.1038/mi.2015.5 (2015)
- 18) T. Azegami , H. Itoh H. Kiyono , Y. Yuki*: A Novel Transgenic Rice-based Vaccine: *Arch. Immunol. Ther. Ex.* in press doi: 10.1007/s00005-014-0303-0 (2015)
- 19) 鹿島光司、幸 義和、清野 宏 : 次世代

- ワクチン開発への課題と挑戦—経口ワクチン— Bio Industry 31:4-10 (2014)
- 20) 幸 義和：注射剤・経口製剤に代る新しい薬剤投与デバイスの開発—「経鼻ワクチンのマウス・サルにおける分子イメージング」(技術情報協会) 145-149 (2014)
- 21) 福山賀子、幸 義和：粘膜ワクチンの現状—経鼻ワクチンを中心に— 医学のあゆみ 253:15033-15038 (2015)
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) EJ. 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)
- 6) Y. Yuki, M. Mejima, S. Kurokawa, T. Hiroiwa, Y. Takahashi, Y. Takatai, M. Kuroda, N. Takeyama, K. Kashima, H. Kiyono. Molecularly Uniform Rice-based Oral Cholera Toxin B Subunit Vaccine without Plant-associated Sugar Modification induces toxin-specific neutralizing immunity in mice and macaques. *15th International congress of immunology*, Milan, Italy (2013)
- 7) Y. Fukuyama, Y. Yuki, Y. Katakai, S. Takahashi, S. Sawada, H. Shibata, M. Mejima, S. Kurokawa, K. Akiyoshi, H. Kiyono. Nanogel-based PspA nasal vaccine induces S. pneumoniae-specific neutralizing antibody immune responses in non-human primates. *15th International congress of immunology*, Milan, Italy (2013)
- 8) I. Kong, A. Sato, Y. Yuki, T. Nochi, H. Takahashi, S. Sawada, M. Mejima, K. Okada, K. Akiyoshi, H. Kiyono. Nanogel-based pneumococcal surface protein A (PspA) intranasal vaccine prevents invasive disease and nasal colonization by pneumococcus. *15th International congress of immunology*, Milan, Italy (2013)
- 9) N. Takayama, Y. Chen, Y. Tohya, K.

- Oroku, H. Kiyono, Y. Yuki. Establishment of murine norovirus S7 infection system for vaccine development. *15th International congress of immunology*, Milan, Italy (2013)
- 10) Michiyo Abe, Y. Yuki, M. Mejima, S. Kurokawa, E. Park, J. Schellr, U. Nakanishi, H. Kiyono. Production of TNF-specific monovalent and bivalent variable domain of llama heavy-chain antibody fragment in transgenic rice. *15th International congress of immunology*, Milan, Italy (2013)
- 11) Y. Yuki, Y. Fukuyama, H. Kiyono: Cholera toxin as a mucosal adjuvant impairs olfactory nerve system when administered via nasal route in mice. 日本免疫学会 千葉 (2013)
- 12) EJ Park, Y. Yuki, H. Kiyono: Regional T memory and miRNA biomarkers revealed by oral vaccination with Mucorice-CTB 日本免疫学会 千葉 (2013)
- 13) Y. Fukuyama, Y. Yuki, H. Kiyono: Nanogel-based PspA nasal vaccine induces *S. pneumoniae* -specific neutralizing antibody immune responses in nonhuman primates 日本免疫学会 千葉 (2013)
- 14) N. Takayama, Y. Yuki, H. Kiyono: In vivo evaluation of murine norovirus mucosal vaccine against challenge with Japan isolated strain S7 日本免疫学会 千葉 (2013)
- 15) 幸 義和、清野 宏: 経鼻投与された粘膜アジュバントであるコレラトキシンは嗅覚神経を破壊する 日本ワクチン学会 津、三重 (2013)
- 16) Yoshikazu Yuki, Mio Mejima, Koji Kashima, Masaharu Kuroda, Toshiaki Mitsui, Hiroshi Kiyono: Establishment of selection marker-free rice-based oral cholera toxin B-subunit vaccine and characterization of location and structure of transgene by using whole genome resequencing analysis. International Association for Plant Biotechnology Congress 2014 (Melbourne, Australia)
- 17) Koji Kashima, Mio Mejima, Masaharu Kuroda, Hiroshi Kiyono and Yoshikazu Yuki: Whole genome analysis of selection marker-free Mucorice-CTB, a rice-based oral cholera vaccine. International Association for Plant Biotechnology Congress 2014 (Melbourne, Australia)
- 18) 鹿島光司、目島未央、黒田昌治、竹山夏実、黒河志保、福山賀子、清野 宏、幸 義和: 次世代シーケンサーを用いたマーカーフリーコメ型経口ワクチン Mucorice-CTB の複数系統及び野生型の変異解析及び比較 日本農芸化学会 東京 (2014)
- 19) 目島未央、鹿島光司、黒田昌治、竹山夏実、黒河志保、福山賀子、清野 宏、三ツ井敏明、幸 義和 コメ型経口ワクチン Marker Free Mucorice-CTB のイネゲノム導入部位と導入配列について 日本農芸化学会 東京 (2014)

- 20) 幸 義和、清野宏：アジュバントフリー
ナノゲル型肺炎球菌経鼻ワクチンのサルで
の免疫効果と安全性 日本ワクチン学会
福岡(2014)
- 21) J. Sunyi, Y. Fukuyama, Y. Yuki, Y.
Kurashima, SF. Ziegler, EJ. Park, H.
Kiyono: Criical role of TSLP-TSLPR
interaction in inducing secretory IgA
responses after mucosal immunization 日
本免疫学会 京都 (2014)
- 1) 幸 義和, 野地 智法, 秋吉一成, 清野
宏：カチオン性ナノゲルを用いる粘膜ワク
チン特許第 5344558 (登録日 平成 25 年 8
月 23 日)
- 2) 幸 義和、清野 宏、澤田晋一、秋吉一成：
肺炎球菌経鼻ワクチン 特願 2014- 27205
(出願日 平成 26 年 2 月 17 日)
- 3) K. Akiyoshi, H. Kiyono, Y. Yuki, T. Nochi
Mucosal vaccine using cationic nanogel
平成 27 年 2 月 24 日登録 米国特許 #
8961983

H. 知的財産権の出願、登録状況

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。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の分泌型 IgA 抗体誘導が特に重要であることが、マウスを用いたモデル実験等で明らかにされている。この粘膜免疫を誘導するためには、インフルエンザワクチンを鼻腔領域内に噴無する経鼻インフルエンザワクチンが有効である。我々は、経鼻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。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、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場合がある。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、感染防御に最も大きな役割を果たす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、ウイ