

ルスに対する IgG 抗体が血液中のみに誘導され、気道粘膜上の分泌型 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阻止効果が高いこと（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、現行ワクチンより有効性の高いワクチンであると考えられる。

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介入試験を実施し、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。さらに、現在、ヒトで認可され使用されている経鼻噴無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ため、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、その体内動態を科学的に明らかにすることを

目的としている。そこで本研究では、標識製剤作成のための精製条件の検討、不活化全粒子インフルエンザワクチンの  $^{18}\text{F}$  標識条件の検討を行った後に  $^{18}\text{F}$  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) の製剤体内動態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新型インフルエンザ不活化全粒子ワクチン H5N1 (NIBRG-14 株)、3 価不活化全粒子インフルエンザワクチン (A(H1N1)株として A/California/7/09 由来のワクチン製造株 X-179A、A(H3N2)株として A/Victoria/361/11 由来の IVR-165、B 型株として B/Wisconsin/1/10 由来の BX-41A を含む)、ならびに濃縮単価不活化全粒子インフルエンザワクチン A-179A 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  $0.45\ \mu\text{m}$  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  $\mu$ m 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を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。

### 6) HA 含量の定量

分画前後のサンプルに含まれる A(H1N1)、A(H3N2)および B 型ウイルスの HA 含量を一元放射免疫拡散試験 (Single Radial Immunodiffusion, SRD 試験) にて測定した。SRD 試験は、現行季節性インフルエンザ HA ワクチンに関する国家検定の手順に従い実施した。SRD 試験直前に、各サンプルに関して界面活性剤 Zwittergent 処理を実施し、希釈を行った (希釈倍率; 1.0、0.75、0.5 および 0.25 倍)。各ウイルスに対する参照抗血清を含む 1% アガロースゲルに直径 4mm の穴をあけ、界面活性剤処理済みのサンプルを添加した。サンプルがゲルに吸収されたのを確認し、ゲルを洗浄後、20°C で 18 時間インキュベートした。ゲルを乾燥させ Coomassie Brilliant Blue 染色を行い、沈降輪の直径を測定した。測定した沈降輪の直径をもとに平行線定量法により、各サンプルに含まれる HA 量を算出した。なお、HA 含量既知の各ウイルス抗原を標準抗原として使用した。

### 7) 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、上述の通り、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、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。

#### 8) PET 及び $\gamma$ 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 $\mu$ L、両鼻で計 5 $\mu$ L)、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  $\gamma$  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。

#### 9) 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 $\mu$ L、両鼻で計 500 $\mu$ 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

#### 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)。

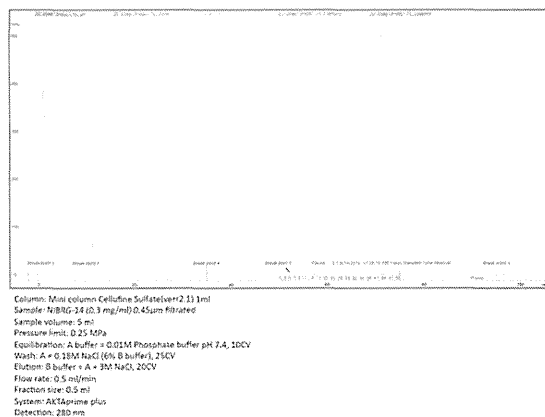


図 1. Cellufine sulfate を用いたインフルエンザウイルスの精製

#### 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

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。

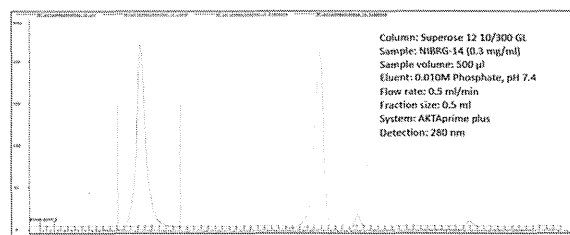


図 2. ゲル濾過クロマトグラフィーによるワクチン製剤の精製

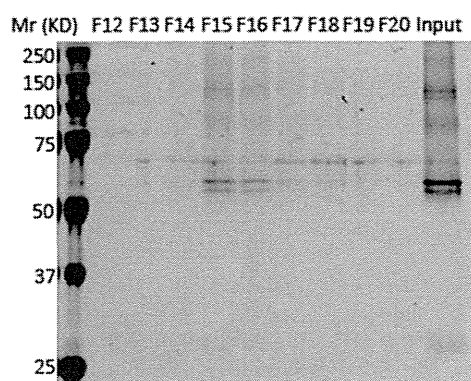


図 3. ゲル濾過分画の SDS-PAGE

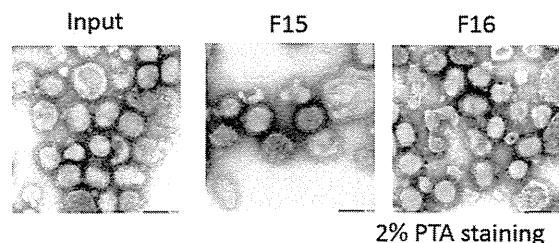


図 4. ゲル濾過分画の電子顕微鏡解析

### 3) ワクチンの 18F 標識

上述の精製方法を用いて PET に用いる全粒子不活化インフルエンザワクチンに対する標識の検討をおこなった。最初に、現行の季節

性インフルエンザワクチンと同じく 3 種類のインフルエンザワクチン (A(H1N1), A(H3N2) および B 型) を含む 3 価全粒子不活化ワクチンに関して、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し、void volume に溶出されるサンプルに関して、SRD 試験を実施し A(H1N1)、A(H3N2) および B 型の HA 含量を測定した。その結果、各ウイルス HA 量として 90  $\mu\text{g}$  をゲルろ過カラムに添加した時、溶出される void volume ピークフラクション (No. 15 と 16 の計 1mL) に関して、A(H1N1) および A(H3N2) の HA 量はそれぞれ 39.6  $\mu\text{g}$  と 59.6  $\mu\text{g}$  となり、44~63%の回収率で分画できることが明らかになった。しかしながら、B 型ウイルスに関しては、かなりの損失が見られた。B 型ウイルスに関しては十分な HA 量を回収できないものの、A(H1N1) および A(H3N2) に関しては、現行インフルエンザワクチンの接種量 (15  $\mu\text{g}$  HA/500  $\mu\text{L}$ /dose) と同等の HA 量を回収できることが明らかになった。そこで、この 3 価不活化全粒子ワクチンに関して 18F 標識を試みたが、標識されたワクチンを得ることが出来たものの PET を行うには不十分な回収率となることが判明した。

ゲルろ過操作により回収できる HA 量がウイルスにより異なってしまうこと、また濃度が薄く PET 実施には不十分であることが判明したため、A(H1N1) 単身不活化全粒子ワクチンでの PET 実施に切换え、濃縮することで 1.5 mg HA/mL とした不活化全粒子ワクチンの 18F 標識を試みた。その結果、放射線量ならびに回収タンパク量として、PET 実施に十分な 18F 標識 X-179A ワクチンを回収できることが明らかに

なった（想定値として約 300 MBq/0.3 mg HA/1 mL）。

#### 4) PET 及び $\gamma$ 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

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。 $\gamma$  カウンターを用いた動態解析（図 5）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。

#### 5) 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

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变化を観察できた。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。

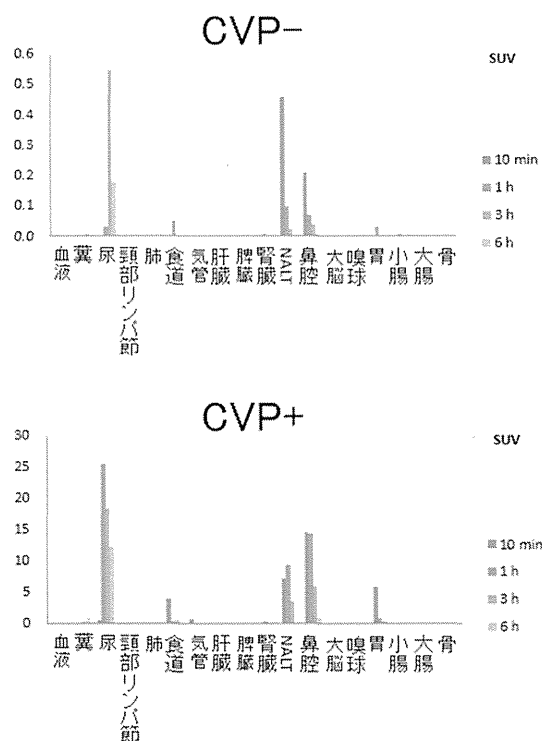


図 5.  $\gamma$  カウンターを用いたマウスにおける 18F 標識ワクチンの動態解析

#### D. 考察

経鼻インフルエンザワクチンは鼻腔内にワクチンを接種するワクチンであるため、嗅球ならびに嗅神経をへて脳への影響を危惧する意見がある。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。研究期間の 3 年間で不活化全粒子ワクチンの 18F 標識および精製に関する検討と、マウス、サルを用いた試験を実施した。

試験の結果、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。 $\gamma$  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、 $\gamma$  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、 $\gamma$  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。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。

以上の結果より、経鼻不活化全粒子インフルエンザワクチンは、経鼻投与後に脳内に移行することはなく、数時間で体内に吸収され代謝されていると考えられた。

## 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 18F 標識の検討を行った。マウス及びサルを用いた試験により経鼻不活化全粒子インフルエンザワクチンは、経鼻投与後に脳内に移行することはなく、数時間で体内に吸収され代謝されていると考えられ、皮下接種では起こらない経鼻接種特異的な安全性に関わる問題が起こる可能性は低いと考えられた。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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, Ainai 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 Dec 6;120(24):4733-43. Epub 2012 Oct 11.
- 2) van Riet E, Ainai 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.
- 3) Senchi K, Matsunaga S, Hasegawa H, Kimura H, Ryo A. Development of oligomannose-coated liposome-based nasal vaccine against human parainfluenzavirus type 3. *Front Microbiol*. 2013 Nov 26;4:346.
- 4) Ainai A, Tamura S, Suzuki T, van Riet E, Ito R, Odagiri T, Tashiro M, Kurata T, Hasegawa H. Intranasal vaccination with an inactivated whole influenza virus vaccine induces strong antibody responses in serum and nasal mucus of healthy adults. *Hum Vaccin Immunother*. 2013 Sep;9(9):1962-70.
- 5) Niikura K, Matsunaga T, Suzuki T, Kobayashi S, Yamaguchi H, Orba Y, Kawaguchi A, Hasegawa H, Kajino K, Ninomiya T, Ijiro K, Sawa H. Gold nanoparticles as a vaccine platform: influence of size and shape on immunological responses in vitro and in vivo. *ACS Nano*. 2013 May 28;7(5):3926-38.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) Hasegawa H, van Riet E, Kida H. Mucosal immunization and adjuvants. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015;386:371-80.

### 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  
2012.11
- 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 2012.11
  - 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 2012.11
  - 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 2012.11
  - 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 2012.11
  - 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 2012.11
  - 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 2012.11
  - 8) Elly van Riet, Ainai 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 2012.11
  - 9) Hasegawa H, Ainai 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 2012.11
  - 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 2012.11
  - 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 丈 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 2012.11
- 12) 岡田 清吾、長谷川 俊史、長谷川 秀樹、相内 章、池本 健三、佐々木 功典、戸田 昌一、調 恒明、市山 高志 インフルエンザ A/H1N1 2009 感染による気管支喘息モデルマウスの気管支肺胞洗浄液解析 日本小児科学会学術集会 広島 2013.4
  - 13) 長谷川 秀樹 ワクチン研究の最前線 次世代ワクチンとしての経鼻インフルエンザワクチンの開発 日本薬剤学会 第28年会 名古屋 2013.5
  - 14) 長谷川 秀樹 良く効くインフルエンザワクチンを目指して. 第54回日本臨床ウイルス学会 倉敷 2013.6
  - 15) 長谷川 俊史、岡田 清吾、脇口 宏之、市山 高志、長谷川 秀樹、相内 章、調 恒明、戸田 昌一、熱田 了 喘息モデルマウスを用いたインフルエンザ感染による気管支喘息発作重症化の病態解析 新型と季節性インフルエンザの比較 第45回日本小児感染症学会総会・学術集会 札幌 2013.10.
  - 16) 脇口 宏之、岡田 清吾、長谷川 秀樹、相内 章、戸田 昌一、調 恒明、長谷川 俊史 気管支喘息(病態)・免疫不全喘息モデルマウスを用いた新型インフルエンザ感染における気管支肺胞洗浄液中ケモカインの検討 第45回日本小児感染症学会総会・学術集会 札幌 2013.10
  - 17) 中島 典子、佐藤 由子、片野 晴隆、佐多 徹太郎、長谷川 秀樹 重症インフルエンザウイルス肺炎におけるサイトカイン・ケモカインの発現 第61回日本ウイルス学会学術集会 神戸 2013.11
  - 18) 泉地 恭輔、相内 章、鈴木 忠樹、浅沼 秀樹、梁 明秀、長谷川 秀樹 母子免疫によるインフルエンザウイルス感染防御効果の解析 第61回日本ウイルス学会学術集会 神戸 2013.11
  - 19) 池田 千将、伊藤 良、相内 章、鈴木 忠樹、田村 慎一、荒尾 雄二郎、田代 真人、浅沼 秀樹、長谷川 秀樹 経鼻インフルエンザワクチンで誘導される抗体応答に基礎免疫が与える影響 第61回日本ウイルス学会学術集会 神戸 2013.11
  - 20) 相内 章、浅沼 秀樹、鈴木 忠樹、原田 勇一、田村 慎一、田代 真人、長谷川 秀樹 経鼻インフルエンザワクチンにおけるワクチンの組み合わせが抗体応答に与える影響 第61回日本ウイルス学会学術集会 神戸 2013.11
  - 21) 川口 晶、鈴木 忠樹、相内 章、佐藤 由子、永田 典代、田代 真人、長谷川 秀樹 Nc/Nga マウスを用いた喘息発作によるインフルエンザ感染症重症化モデルの炸裂 第61回日本ウイルス学会学術集会 神戸 2013.11
  - 22) Hideki Hasegawa, Akira Ainai, Tadaki Suzuki, Elly van Riet, Shi-ichi Tamura, Kazuyuki, Ikeda, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Takeshi Kurata. Antibody responses in serum and nasal mucus induced by the intranasal vaccination with a whole-virion

- inactivated vaccine of A(H5N1) virus in healthy naïve human adults. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology. Keystone, Colorado USA, January 2014.
- 23) Kazuyuki Ikeda, Ryo Ito, Akira Ainai, Tadaki Suzuki, Shin-ichi Tamura, Yujiro Arao, Masato Tashiro, Hideki Asanuma, Hideki Hasegawa. Antibody responses induced by intranasal vaccination of a whole inactivated influenza virus in mice previously infected or vaccinated. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology. Keystone, Colorado USA, January 2014.
- 24) Tadaki Suzuki, Akira Kawaguchi, Akira Ainai, Shin-ichi Tamura, Ryo Ito, Masato Tashiro, Hideki Hasegawa. Impact of the quaternary structure of human Secretory-IgA on neutralization potency to Influenza A virus in upper respiratory tract. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology. Keystone, Colorado USA, January 2014.
- 25) 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
- 26) 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
- 27) 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
- 28) 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
- 29) 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
- 30) 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

- 31) 相内 章、鈴木 忠樹、齊藤 慎二、田村慎一、幸 義和、小田切 孝人、田代眞人、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
- 32) 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
- 33) 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
- 34) 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
- 35) 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。

## 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（一財）阪大微生物病研究会 観音寺研究所長

### 研究要旨

経鼻ワクチンの投与時のウイルス由来抗原の検出のため、in vitro 実験系の構築を試みた。NP 抗原については曝露された細胞内及び表面に抗原を検出する系を構築した。さらに、HA 抗原については曝露された表面に抗原を検出する系を構築したほか、組換え蛋白質を作出し、株特異的なウイルス及び抗原を検出する系の陽性対照材料とすることが可能であることを確認した。また、安全性試験に用いるための不活化インフルエンザ全粒子ワクチン原液を作製した。

### 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

### 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

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

の 3 株を用い、ホルマリンにより不活化した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、2014/2015 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

- ・ A/California/7/2009 (H1N1) pdm

- ・ A/Victoria/361/2011 (H3N2)
  - ・ B/Massachusetts/2/2012 (山形系統)
- の 3 株についても、ホルマリンにより不活化した全粒子ワクチン原液を作製した。

### 参照用ウイルス液

経鼻投与用インフルエンザワクチン製剤の安全性の比較対照用として、ワクチン製剤の原料である A/Victoria/210/2009 (H3N2) ウイルス浮遊液を用いた。

### 経鼻投与用試作ワクチン製剤の安全性評価

上記安全性評価用 2011/2012 シーズンのワクチン製剤およびウイルス浮遊液を被験薬とし、カニクイザルを被験動物として経鼻投与時の粘膜および嗅神経・中枢神経への影響を調査する試験を実施した。投与後 3 時間、6 時間又は 12 時間を経過した時点で被験動物を安楽死させ、固定された検体から病理組織標本を作製した。投与部位からのウイルスあるいはウイルス由来蛋白の移行、および組織への影響を調べるため、

A型インフルエンザウイルスのHA蛋白とNP蛋白を認識するモノクローナル抗体およびマクロファージやミクログリア細胞のマーカー蛋白である Iba1 を認識するモノクローナル抗体等を用いた病理組織観察、および電子顕微鏡による観察を行った。

(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った。

#### ウイルス由来抗原の検出検討

検討用ウイルスとしては、2010/2011 シーズン用インフルエンザワクチン株ウイルスである下記3株、及びこれらの株由来の不活化全粒子ワクチンを用いた。

A/California/7/2009(H1N1)

A/Victoria/210/2009(H3N2)

B/Brisbane/60/2008

In vitro でのウイルス抗原検出の材料としては、MDCK 細胞に上記のウイルスまたは不活化全粒子ワクチン液を上層し、固定したものを用いた。それに対し、抗インフルエンザウイルス由来抗原に特異性を持つマウスモノクローナル抗体と反応させ、FITC 標識した2次抗体によりウイルス抗原と反応した抗体を検出した。用いたモノクローナル抗体は以下の通りである。

(抗 NP 抗体)

A 型 : Anti-A/NC NP mAb (IgG2a) #A7

B 型 : Anti-B/山東 NP mAb (IgG2a) #B1

(抗 HA 抗体)

A 型 : Anti-A/Brisbane (H1N1) mAb

(IgG2b) B2-7、

Anti-A/ソロモン諸島(H1N1) mAb(IgA)

S1-5、及び

Anti-A/Uruguay (H3N2) mAb (IgG1、腹水) U1-37

B 型 : Anti-B/Malaysia mAb (IgA) M1-19

#### インフルエンザウイルス由来組換え抗原の作製

ウイルス由来 HA 抗原検出のための陽性対象として、組換え抗原の取得を試みた。由来ウイルスとしては、2014/2015 シーズン用インフルエンザワクチン株ウイルスである、A/California/7/2009 (H1N1) pdm09 を用いた。ウイルス由来 RNA から cDNA を作製し、C 末に FLAG タグを持つバキュロウイルス系発現ベクターに組み込んで、発現用プラスミドを作製した。このプラスミドを投与したカイコ幼虫が蛹になった段階で、発現された HA 蛋白をそのホモジネートからアフィニティ精製した。

#### インフルエンザウイルス由来組換え抗原の評価

前述の抗原を用い、A/California/7/2009 (H1N1) pdm09 株由来ワクチンを投与したマウスの血清または鼻腔洗浄液との反応性を ELISA 法により確認した。反応の特異性を確認するため、対照用の抗原として、A/California/7/2009 (H1N1) pdm09 株、及び A/Texas/50/2012 (H3N2) 株の不活化全粒子ウイルスとの反応性も確認した。さらに、インフルエンザウイルス A/Texas/50/2012 (H3N2) pdm09 株由来ワクチンを投与したマウスの血清または鼻腔洗浄液との反応性についても確認した。

#### 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

2012/2013 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

- ・ A/California/7/2009 (H1N1) pdm
  - ・ A/Victoria/361/2011 (H3N2)
  - ・ B/Wisconsin/1/2010 (山形系統)
- の 3 株を用い、ホルマリンにより不活化した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、2014/2015 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

- ・ A/California/7/2009 (H1N1) pdm
- ・ A/Victoria/361/2011 (H3N2)
- ・ B/Massachusetts/2/2012 (山形系統)

の 3 株についても、ホルマリンにより不活化した全粒子ワクチン原液を作製した。

## 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は、設定した規格値の範囲内、あるいは設定した規格基準に合格した。これにより、作製したワクチン原液は安全性評価試験に用いる材料に出来ると判断した。

### 経鼻投与用試作ワクチン製剤の安全性評価

投与部位である鼻腔の呼吸部および神経部を中心とした病理組織標本作製し、組織の観察と抗原の検索を行った。ウイルス由来抗原は投与部位周辺にのみ認められ、脳や中枢神経への移行は認められなかった。抗原が免疫担当細胞に囲まれ、取り込まれつつあると見られる像は認められたが、粘膜を著しく損傷するような炎症や神経組織の変性など、被験薬に起因する深刻な有害事象は認められなかった。

### ウイルス由来抗原の検出検討

ウイルスを感染させた MDCK 細胞に対

して抗 NP 抗体を反応させると、細胞内も含めて全体で蛍光が検出された。一方、抗 HA 抗体では細胞表面だけに蛍光が検出された。不活化全粒子ワクチンを曝露させた細胞では、インキュベーション時間を 60 分以内としたところ、細胞表面に HA 蛋白が検出されたが、NP 蛋白は検出されなかった。

### インフルエンザウイルス由来組換え抗原の作製

カイコ 10 頭から約 320  $\mu$ g (純度 86%) の組換え HA 蛋白を取得した。

### インフルエンザウイルス由来組換え抗原の評価

作製した組換え蛋白は、その由来ウイルス株ワクチンを投与したマウス検体だけに特異的な反応が認められた。一方、A/California/7/2009 (H1N1) pdm09 株及び A/Texas/50/2012 (H3N2) 株の不活化全粒子ウイルスは上記いずれの株由来ワクチンを投与したマウスの検体とも反応が認められた。投与されたワクチンの方に強く反応する傾向は認められたことから、株特異的な抗原に対する抗体と、いずれのウイルスにも共通して存在する抗原に反応する抗体の両方が誘導されていると考えられた。

## D. 考察

カニクイザルに不活化した全粒子インフルエンザウイルスワクチンを経鼻投与した *in vivo* の試験系では、投与部位及び中枢神経系への有害な事象は認められなかった。また、*in vitro* の試験系において、インフルエンザウイルスは細胞に取り込まれ、増殖が見られたが、不活化した全粒子ウイルスは細胞内からは検出されず、接触後に表面で短時間検出されるのみで、細胞変性作用や細胞への傷害などの作用は認められなかった。これらのことから、不活化した全粒

子ウイルスには投与部の組織を損傷させるような作用は無いものと考えられる。

また、ウイルス由来抗原を認識する抗体を用いた検出系構築に加え、各株個別のHA蛋白については組換え蛋白質を作製したが、これについては、検出時の陽性対象、あるいは各株特異的な挙動を検出可能な抗体の調製材料として利用出来ると考えられる。

また、作製した安全性評価用ワクチン原液は問題なく使用出来るものと判断された。

## E. 結論

今回開発したインフルエンザウイルス由来抗原を検出する試験系と、それから得られた *in vitro* 及び *in vivo* の実験結果は、経鼻ワクチンの安全性を検証する上で有用な材料、及び知見の蓄積として利用出来ると考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1). Inoue, Y., Kubota-Koketsu, R., Yamashita, A., Nishimura, M., Ideno, S., Ono, K., Okuno, Y., Ikuta, K. Induction of anti-influenza immunity by modified green fluorescent protein (GFP) carrying hemagglutinin-derived epitope structure. *J Biol Chem* 288:4981-4990, 2013.
- 2). Yasugi, M., Kubota-Koketsu, R., Yamashita, A., Kawashita, A., Du, A., Sasaki, T., Nishimura, M., Misaki, R., Kuhara, M., Boonsathorn, N., Fujiyama, K., Okuno, Y., Ikuta, K. Human monoclonal antibodies broadly neutralizing against influenza B virus. *PloS Pathog* 9(2):e1003150, 2013.
- 3). Sasaki, T., Setthapramote, C., Kurosu, T., Nishimura, M., Asai, A., Omokoko, MD., Pipattanaboon, C., Pitaksajjakul, P., Limkittikul, K., Subchareon, A., Chaichana, P., Okabayashi, T., Hirai, I., Leaungwutiwong, P., Misaki, R., Fujiyama, K., Ono, K., Okuno, Y., Ramasoota, P., Ikuta, K. Dengue virus neutralization and antibody-dependent enhancement activities of human monoclonal antibodies derived from dengue patients at acute phase of secondary infection. *Antiviral Res* 98: 423-431, 2013.
- 4). Yasugi, M., Kubota-Koketsu, R., Yamashita, A., Kawashita, A., Du, A., Misaki, R., Sasaki, T., Kuhara, M., Boonsathorn, N., Fujiyama, K., Okuno, Y., Nakaya, T., Ikuta, K. Emerging antigenic variants at the antigenic site Sb in pandemic A(H1N1)2009 influenza virus in Japan detected by a human monoclonal antibody. *PloS One* 8(10):e77892, 2013.
- 5). Ideno, S., Sakai, K., Yunoki, M., Kubota-Koketsu, R., Inoue, Y., Nakamura, S., Yasunaga, T., Okuno, Y., Ikuta, K. Immunization of rabbits with synthetic peptides derived from a highly conserved  $\beta$ -sheet epitope region underneath the receptor binding site of influenza A virus. *Biologic: Targets and Therapy* 7:233-241, 2013.
- 6). Ohshima, N., Kubota-Koketsu, R., Iba, Y., Okuno, Y., Kurosawa, Y. Two types of antibodies A/California/2009pdm virus: Binding near the sialic

- acid-binding pocket and neutralizing both H1N1 and H5N1 viruses. PloS One 9(2):e87305, 2014.
- 7). Lee, PS., Ohshima, N., Stanfield, RL., Yu, W., Iba, Y., Okuno, Y., Kurosawa, Y., Wilson, IA. Receptor mimicry by antibody F045-092 facilitates universal binding to H3 subtype of influenza virus. Nature Com. 5:3614, DOI:10.1038/ncomms4614, 2014
- 8). Kumagai, T., Nakayama, T., Okuno, Y., Kase, T., Nishimura, N., Ozaki, T., Miyata, A., Suzuki, E., Okafuji, T., Ochiai, H., Nagata, N., Tsutsumi, H., Okamatsu, M., Sakoda, Y., Kida, H., Ihara, T. Humoral immune response to influenza A(H1N1)pdm2009 in patients with natural infection and in vaccine recipients in the 2009 pandemic. Viral Immunology 27:368-374, 2014.
- 9). Haredy, AM., Yamada, H., Sakoda, Y., Okamatsu, M., Yamamoto, N., Omasa, T., Mori, Y., Kida, H., Okamoto, S., Okuno, Y., Yamanishi, K. Neuraminidase gene homology contributes to the protective activity of influenza vaccines prepared from the influenza virus library. J Gen Virol 95:2365-2371, 2014.
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
3. その他  
なし



### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
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	佐藤章弘	DDS製剤の開発・評価と実用化手法	技術情報協会	東京	2013	178-185
幸 義和	経鼻ワクチンのマウス・サルにおける分子イメージング	佐藤章弘	注射剤・経口製剤に代わる新しい薬剤投与デバイスの開発	技術情報協会	東京	2014	145-149

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版
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
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
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

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
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. Fujihashi.	Potential roles of CCR5+CCR6+ dendric cells induced by nasal ovalbumin plus Flt3 ligand expressing adnovirus for mucosal IgA responses.	. PloS One	8:e60453		2013
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
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 $\alpha$ -amylase/trypsin inhibitor-like protein family as major rice allergens	J. Proteome Res.	12	3372-3382	2013

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	3375-87	2014
M. Abe, Y. Yuki, S. Kurokawa, M. Mejima, M. Kuroda, EJ. Park, J. Scheller, U. Nakanishi, H. Kiyono	. A rice-based soluble form of a murine TNF-specific II ama variable domain of heavy-chain antibody suppresses collagen-induced arthritis in mice.	J. Biotechnol.	175	45-52	2014
Y. Yuki, T. Nochi, IG. Kong, H. Takahashi, S. Sawada2 K. Akiyoshi, H. Koyono.	Nanogel-based antigen delivery system for nasal vaccines.	Biotechnology and Genetic Engineering Reviews	29	61-72	2013
D. Tokuhara, T. Nochi, A. matsumura, M. mejima, Y. Takahashi, S. Kurokawa, H. Kiyono, Y. Yuki	cific Expression of Apolipoprotein A-IV in the Follicle-Associated Epithelium of the Small Intestine	Dig. Dis. Sci.	59	2682-2692	2014
T. Azegami , Y. Yuki , H. Kiyono	Challenges in Mucosal Vaccines for the Control of Infectious Diseases	Int. Immunol	26	517-526	2014