

Acknowledgments E. van Riet is a recipient of a Postdoctoral Fellowship for Foreign Researchers from the Japan Society for the Promotion of Science. Our research is supported by grants from the Ministry of Health, Labour and Welfare, "H23-Shinkou-Ippan-015". We also would like to acknowledge all the scientists whose work we could not cite due to restrictions on the number of references.

References

- Ainai A, Ichinohe T et al (2010) Zymosan enhances the mucosal adjuvant activity of poly(I:C) in a nasal influenza vaccine. *J Med Virol* 82(3):476–484
- Ainai A, Tamura S et al (2013) Intranasal vaccination with an inactivated whole influenza virus vaccine induces strong antibody responses in serum and nasal mucus of healthy adults. *Hum Vaccin Immunother* 9(9):1962–1970
- Aldridge JR Jr, Moseley CE et al (2009) TNF/ α /NOS-producing dendritic cells are the necessary evil of lethal influenza virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(13):5306–5311
- Amorij JP, Hinrichs W et al (2010) Needle-free influenza vaccination. *Lancet Infect Dis* 10(10):699–711
- Asahi-Ozaki Y, Yoshikawa T et al (2004) Secretory IgA antibodies provide cross-protection against infection with different strains of influenza B virus. *J Med Virol* 74(2):328–335
- Asahi Y, Yoshikawa T et al (2002) Protection against influenza virus infection in polymeric Ig receptor knockout mice immunized intranasally with adjuvant-combined vaccines. *J Immunol* 168(6):2930–2938
- Bachmann MF, Jennings GT (2010) Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nat Rev Immunol* 10(11):787–796
- Bekeredjian-Ding I, Jego G (2009) Toll-like receptors—sentinels in the B-cell response. *Immunology* 128(3):311–323
- Berkowska MA, Driessen GJ et al (2011) Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -independent maturation pathways. *Blood* 118(8):2150–2158
- Bessa J, Jegerlehner A et al (2009) Alveolar macrophages and lung dendritic cells sense RNA and drive mucosal IgA responses. *J Immunol* 183(6):3788–3799
- Brandtzaeg P (2007) Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. *Vaccine* 25(30):5467–5484
- Caskey M, Lefebvre F et al (2011) Synthetic double-stranded RNA induces innate immune responses similar to a live viral vaccine in humans. *J Exp Med* 208(12):2357–2366
- Cerutti A (2008) The regulation of IgA class switching. *Nat Rev Immunol* 8(6):421–434
- Chen K, Cerutti A (2010) Vaccination strategies to promote mucosal antibody responses. *Immunity* 33(4):479–491
- Couch RB, Kasel JA (1983) Immunity to influenza in man. *Annu Rev Microbiol* 37:529–549
- Diebold SS, Kaisho T et al (2004) Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303(5663):1529–1531
- Douagi I, Gujer C et al (2009) Human B cell responses to TLR ligands are differentially modulated by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 182(4):1991–2001
- Greenbaum E, Engelhard D et al (2004) Mucosal (SIgA) and serum (IgG) immunologic responses in young adults following intranasal administration of one or two doses of inactivated, trivalent anti-influenza vaccine. *Vaccine* 22(20):2566–2577
- Honjo T, Muramatsu M et al (2004) AID: how does it aid antibody diversity? *Immunity* 20(6):659–668
- Hoskins TW, Davies JR et al (1976) Influenza at Christ's Hospital: March, 1974. *Lancet* 1(7951):105–108
- Hoskins TW, Davies JR et al (1979) Assessment of inactivated influenza-A vaccine after three outbreaks of influenza A at Christ's Hospital. *Lancet* 1(8106):33–35

- Ichinohe T, Ainal A et al (2009) PolyI:polyC12U adjuvant-combined intranasal vaccine protects mice against highly pathogenic H5N1 influenza virus variants. *Vaccine* 27(45):6276–6279
- Ichinohe T, Pang IK et al (2011) Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(13):5354–5359
- Ichinohe T, Tamura S et al (2007) Cross-protection against H5N1 influenza virus infection is afforded by intranasal inoculation with seasonal trivalent inactivated influenza vaccine. *J Infect Dis* 196(9):1313–1320
- Ichinohe T, Watanabe I et al (2005) Synthetic double-stranded RNA poly(I:C) combined with mucosal vaccine protects against influenza virus infection. *J Virol* 79(5):2910–2919
- Jacobs BL, Langland JO (1996) When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA. *Virology* 219(2):339–349
- Koyama S, Aoshi T et al (2010) Plasmacytoid dendritic cells delineate immunogenicity of influenza vaccine subtypes. *Sci Transl Med* 2(25):25ra24
- La Gruta NL, Kedzierska K et al (2007) A question of self-preservation: immunopathology in influenza virus infection. *Immunol Cell Biol* 85(2):85–92
- Lee BO, Rangel-Moreno J et al (2005) CD4 T cell-independent antibody response promotes resolution of primary influenza infection and helps to prevent reinfection. *J Immunol* 175(9):5827–5838
- Londrigan SL, Turville SG et al (2011) N-linked glycosylation facilitates sialic acid-independent attachment and entry of influenza A viruses into cells expressing DC-SIGN or L-SIGN. *J Virol* 85(6):2990–3000
- Lund JM, Alexopoulou L et al (2004) Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(15):5598–5603
- MacLennan IC, Toellner KM et al (2003) Extrafollicular antibody responses. *Immunol Rev* 194:8–18
- Macpherson AJ, McCoy KD et al (2008) The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol* 1(1):11–22
- Massacand JC, Kaiser P et al (2008) Intestinal bacteria condition dendritic cells to promote IgA production. *PLoS ONE* 3(7):e2588
- Matzinger P, Kamala T (2011) Tissue-based class control: the other side of tolerance. *Nat Rev Immunol* 11(3):221–230
- McKinstry KK, Strutt TM et al (2011) Hallmarks of CD4 T cell immunity against influenza. *J Intern Med* 269(5):507–518
- Nayak JL, Richards KA et al (2010) Analyses of the specificity of CD4 T cells during the primary immune response to influenza virus reveals dramatic MHC-linked asymmetries in reactivity to individual viral proteins. *Viral Immunol* 23(2):169–180
- Pang IK, Iwasaki A (2011) Inflummasomes as mediators of immunity against influenza virus. *Trends Immunol* 32(1):34–41
- Puga I, Cols M et al (2010) Innate signals in mucosal immunoglobulin class switching. *J Allergy Clin Immunol* 126(5): 889–895, quiz 896–887
- Renegar KB, Jackson GD et al (1998) In vitro comparison of the biologic activities of monoclonal monomeric IgA, polymeric IgA, and secretory IgA. *J Immunol* 160(3):1219–1223
- Renegar KB, Small PA Jr et al (2004) Role of IgA versus IgG in the control of influenza viral infection in the murine respiratory tract. *J Immunol* 173(3):1978–1986
- Rothausler K, Baumgarth N (2010) B-cell fate decisions following influenza virus infection. *Eur J Immunol* 40(2):366–377
- Seo SU, Kwon HJ et al (2010) MyD88 signaling is indispensable for primary influenza A virus infection but dispensable for secondary infection. *J Virol* 84(24):12713–12722
- Song W, Vaerman JP et al (1995) Dimeric and tetrameric IgA are transcytosed equally by the polymeric Ig receptor. *J Immunol* 155(2):715–721
- Stokes CR, Soothill JF et al (1975) Immune exclusion is a function of IgA. *Nature* 255(5511):745–746

- Takada A, Matsushita S et al (2003) Intranasal immunization with formalin-inactivated virus vaccine induces a broad spectrum of heterosubtypic immunity against influenza A virus infection in mice. *Vaccine* 21(23):3212–3218
- Tamura S, Funato H et al (1991) Cross-protection against influenza A virus infection by passively transferred respiratory tract IgA antibodies to different hemagglutinin molecules. *Eur J Immunol* 21(6):1337–1344
- Taylor HP, Dimmock NJ (1985) Mechanism of neutralization of influenza virus by secretory IgA is different from that of monomeric IgA or IgG. *J Exp Med* 161(1):198–209
- Tezuka H, Abe Y et al (2007) Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/ iNOS -producing dendritic cells. *Nature* 448(7156):929–933
- Wang BZ, Xu R et al (2010) Intranasal immunization with influenza VLPs incorporating membrane-anchored flagellin induces strong heterosubtypic protection. *PLoS ONE* 5(11):e13972
- Weiser JN, Bae D et al (2003) Antibody-enhanced pneumococcal adherence requires IgA1 protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(7):4215–4220
- Yel L (2010) Selective IgA deficiency. *J Clin Immunol* 30(1):10–16
- Yoo JK, Galligan CL et al (2010) Identification of a novel antigen-presenting cell population modulating antiinfluenza type 2 immunity. *J Exp Med* 207(7):1435–1451
- Zaheen A, Martín A (2010) Induction and assessment of class switch recombination in purified murine B cells. *J Vis Exp* (42). pii: 2130. doi:10.3791/2130

第7章 薬剤の経鼻デリバリーのメカニズムとデバイス開発

第4節 経鼻ワクチンのマウス・サルにおける 分子イメージング

東京大学 医科学研究所 炎症免疫学 助教 博士
幸義和

(株)技術情報協会
書籍「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」(2014.7.31 発刊)
抜刷

第4節 経鼻ワクチンのマウス・サルにおける分子イメージング

はじめに

経鼻投与は、最も効果的に全身系及び粘膜系に抗原特異的防御免疫を誘導するワクチン投与方法である。弱毒型インフルエンザ経鼻ワクチンである FluMist が、米国で承認されているが¹⁾、不活化インフルエンザワクチンにアジュバントとして大腸菌容易熱性毒素 (LT) を加えた経鼻ワクチンはスイスでのヒトへの投与において顔面麻痺を起こす副作用が頻発し、承認を取り下げた²⁾。LT と同様の構造をもつ毒素ベースのアジュバンド、コレラトキシン (CT) やその B 鎖 (CTB) は経鼻投与された時、中枢神経系に含まれる嗅球に輸送されることが知られている³⁾。この結果はワクチンやアジュバンドの中枢神経系への蓄積は副作用を起こす可能性を示唆している。従って、経鼻ワクチンの開発において候補ワクチン及びアジュバンドが中枢神経系へ移行するかどうかは重要な課題である。ここで、経鼻投与されたワクチン等の挙動を研究する上でマウスとヒトの鼻腔粘膜上皮細胞における解剖学的差異には注意を払う必要がある。鼻腔粘膜上皮細胞は呼吸器上皮細胞と嗅覚上皮細胞からなっているが、嗅覚上皮細胞は嗅覚受容体を発現している嗅覚神経細胞であり、マウスや犬は嗅覚上皮細胞がよく発達し鼻腔粘膜上皮細胞の 70-80% を覆っているのに対して、ヒトを含む霊長類のそれは 10% 未満である⁴⁾。そのため、経鼻ワクチンの安全性を評価する上での吸収、分布、代謝、排泄 (ADME) 試験にはサルを含む 2 種類以上の動物種で実施する必要がある。

従来、タンパク医薬の ADME には ¹²⁵I や ¹¹¹In 標識放射性物質を用いたオートラジオグラフィや摘出臓器の放射能測定法が用いられてきた⁵⁾。しかし最近の分子イメージング技術は生きたままの動物での可視化とリアルタイムでの定量を可能にしている⁶⁾。特に PET (Positron-Emission Tomography) のような放射能ベースの分子イメージングはヒトで非侵襲的に中枢神経の活動や癌の体内検出を可能にしている⁷⁾。従来からの CT (Computerized Tomography) や MRI (Magnetic Resonance Imaging) のような構造イメージング技術を組み合わせることで PET の特異性と感度を高めることができる⁸⁾。今まで、PET イメージングにはブドウ糖誘導体のような低分子トレーサーが用いられてきたが、タンパクをトレーサーにした PET はほとんど報告されていない⁹⁾。ここでは、経鼻ワクチンとして、マウス及びサルで有効性が証明されているボツリヌス毒素に対するワクチン (BoHc) を用いて、¹⁸F-BoHc の合成、経鼻投与されたマウスで全身 PET 解析、我々開発中のナノサイズゲル被覆型経鼻ワクチンで応用例、サルでの BoHc 経鼻ワクチンの脳内移行否定試験等について我々の最近のデータ^{10,11)} を用いて概説する。

1. 経鼻ワクチン PET に用いる ¹⁸F-タンパクの合成

経鼻ワクチンとして A 型ボツリヌス毒素の無毒の C 末領域 (45kDa, BoHc) をコードする遺伝子を大腸菌に組み込み遺伝子組換え BoHc を合成し、大腸菌から PBS で抽出し、ゲル濾過を含む各種クロマトグラフィーを用いて高純度に精製した¹⁰⁾。¹⁸F-BoHc の合成は浜松ホトニクス社 PET センターのサイクロトロン内の核反応から生成した ¹⁸F-fluoride から合成した N-succinimidyl-¹⁸F-fluorobenzoate (¹⁸F-SFB) を用いて BoHc のアミノ基に標識した¹⁰⁾。N 末端アミノ基及び Lys の ε-アミノ基に標識された ¹⁸F-BoHc は Superose12 カラムを用いて ¹⁸F-SFB から分離された。非放射能は 1.91-2.85MBq/μg であった。同様に、コレラ毒素 CT (LIST 社) も標識され、その非放射能は 1.42MBq/μg であった。

2. 経鼻ワクチン投与マウスの全身 PET 分子イメージング

2.1 プラナー分子イメージング

¹⁸F-BoHc をマウスに経鼻投与後、リアルタイムで全身の分子イメージングを肉眼で確認したい場合、プラナー分子イメージング (planar positron whole-body imaging system, PPIS) が便利である¹⁰⁾。マウスをアクリルプレートに固定し、¹⁸F-BoHc (20μ, 0.5-1.0MBq) を経鼻投与後、マウスを 2 つの PPIS の間に置き、10 分間隔でスキャンすることで、投与されたワクチンの挙動を 2 次元写像としてリアルタイムで確認できる (図 1)。無麻酔でマウスに経鼻投与された

^{18}F -BoHc ワクチンに一部は鼻腔にとどまり、一部は飲み込み食道、胃、腸に移動し、急速に尿に排泄されていることがわかる。尿への排泄が早いことから、胃から血中をへて尿に移行しているのは低分子である可能性が示唆される。この PPIS を用いて麻酔をかけた場合には、経鼻投与の大半は食道ではなく、肺に移行することも判明した。

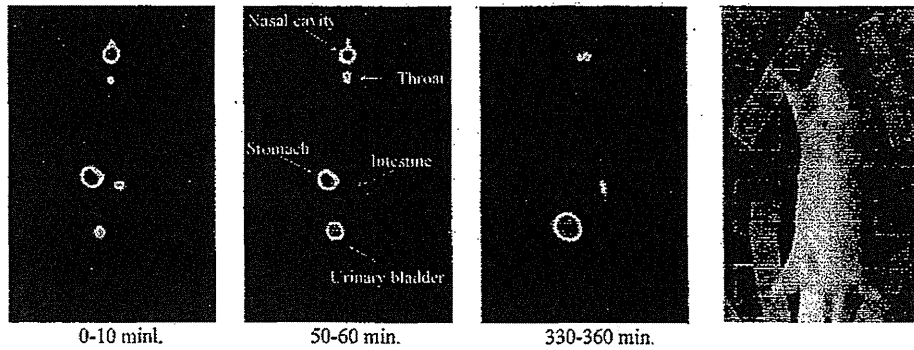


図1 経鼻投与された ^{18}F -BoHc ワクチンのマウスでのプランナーイメージング
※カラーの図は巻頭ページを参照

2.2 PET-CT 分子イメージング

^{18}F -PET を用いるイメージング技術を用いて、経鼻ワクチン ^{18}F -BoHc をマウスに経鼻投与し、その挙動を 10 時間に

わたり追跡した⁹⁾。図 2a に各時間における ^{18}F -BoHc-PET 画像全身イメージと CT スキャン画像を同時に示し、各時間の PET から計算された ^{18}F の各臓器の貯留量を Time-activity curve として図 2b に示す。組換え BoHc は経鼻投与された場合、従来から考えられてきた鼻腔上皮細胞に貯留し徐々に減数する以外に、一部は食道に入り、消化機関に運ばれ、分解を受け、最終的に膀胱から尿として排泄されていることがわかる。この PET 解析の結果を従来からの時間おきでの各臓器を抽出し、そのアイソトープの蓄積量を測定と比較した結果を

図 3a に示す。臓器抽出した場合のデータも PET 解析データと同様に鼻腔、食道、胃、腸、尿、糞に ^{18}F の貯留がみられる。また、 ^{18}F -BoHc は嗅球と中枢神経には貯留を認めないが (図 3b)、別に投与された ^{18}F -コレラ毒素は 1 時間から嗅球への貯留がみられた (図 3c)。また各臓器から抽出された ^{18}F を大ま

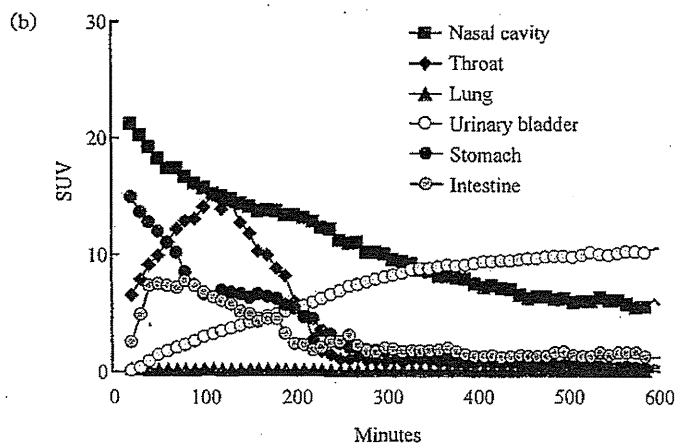
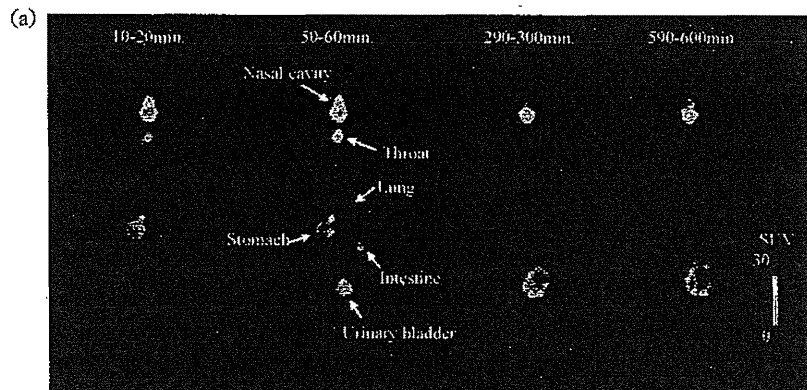


図2 経鼻投与された ^{18}F -BoHc ワクチンのマウスでの ^{18}F -PET と CT スキャンイメージ (a) 及び各臓器での Time-activity Curve (b)

※カラーの図は巻頭ページを参照

かにゲル濾過で解析した結果から (図 3d), 経鼻投与された ^{18}F -BoHc は鼻腔には低分子化は見られず, 食道, 胃, 腸と徐々に低分子化し, 尿では完全に低分子化したものが観測された。ここで, 多くの ^{111}In - 標識蛋白の排出データから低分化物は ^{111}In -Lys であることが知られており ¹²⁾, ^{18}F も Lys を介して標識されていることから, ^{18}F -BoHc の低分子化合物は ^{18}F -Lys である可能性が高い。すなわち, 鼻腔では徐々に鼻腔上皮細胞に取り込まれて, その直下の樹状細胞に取り込まれて抗原提示され, 粘膜免疫を誘導し, その一部は食道, 胃, 腸に運ばれ, ^{18}F -Lys まで分解され, 胃または腸で血中に取り込まれて急速に膀胱, 尿へと排出されていると考えられる。

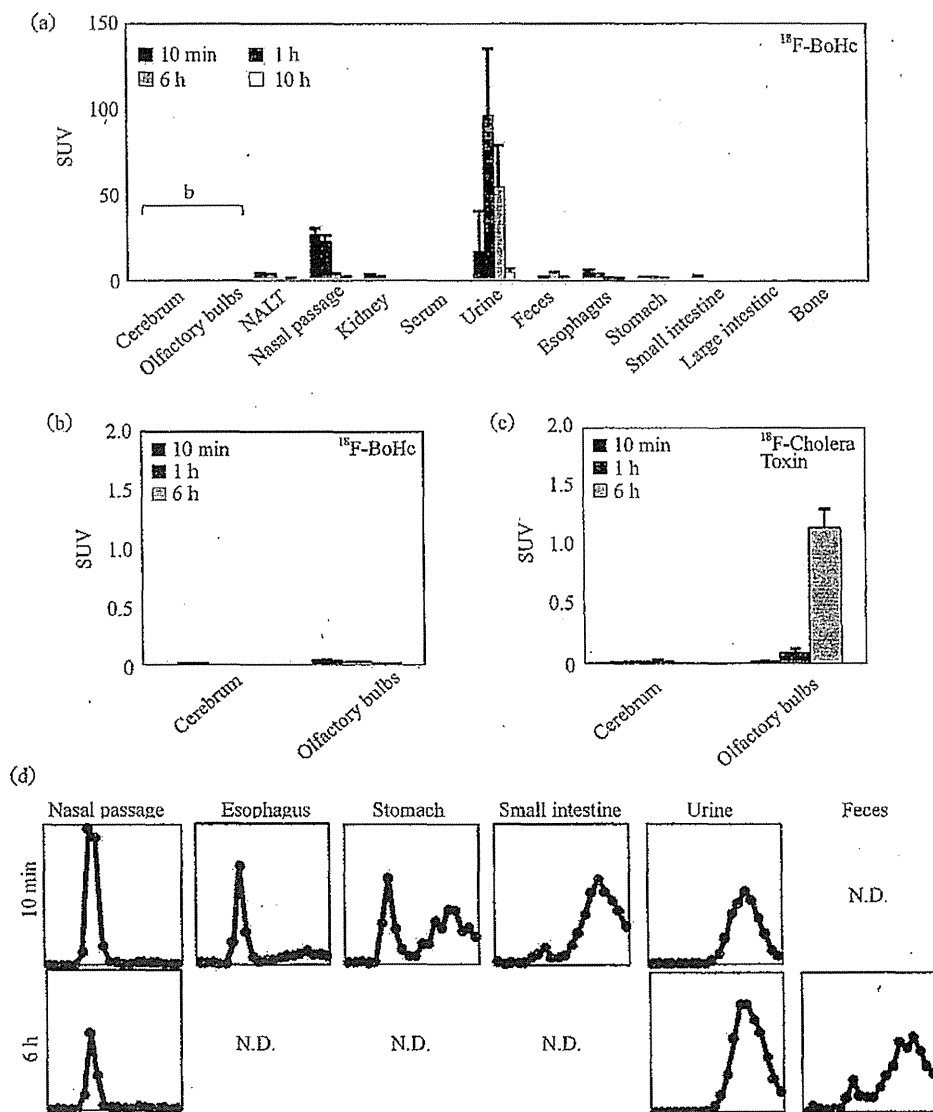


図3 経鼻ワクチン投与された ^{18}F -BoHc ワクチンのマウス各臓器への分布 (a) と中枢神経系への分布拡大図 (b) 並びに ^{18}F -コレラ毒素を経鼻投与したマウスの嗅球への移行 (c) 及び ^{18}F -BoHc ワクチン投与マウスの各臓器での ^{18}F -BoHc の低分子化 (d)

2.3 ナノゲル化経鼻ワクチンの分子イメージング

最近, 我々は人工分子シャペロン機能を持つナノサイズゲルを経鼻ワクチンの DDS キャリアとして使う試みを行った。一般に, 生体においては, 蛋白質のフォールディングを制御し, その機能を制御する役割として分子シャペロン蛋白質が知られており, デリバリーキャリアにおいても蛋白質を安定に保持し, 目的部位に活性を維持した状態で輸送する機能が不可欠である。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プルラ

ン (CHP) ナノゲルは、疎水的な会合力により、そのゲルは球状構造をとり、その内部空間に容易に蛋白質をトラップすることができる。さらには、ナノゲル内の疎水基をシクロデキストリンで包接、可溶化することでナノゲル構造を破壊させる手法や過剰な他の蛋白質との交換反応により、内部にトラップされた蛋白質を遊離して機能を再生できる¹¹⁾。実際に、CHP にアミノ基を 100 単糖あたり 12-15 個程度導入したカチオン性 CHP (cCHP) を調製し、この cCHP ナノゲルと大腸菌で作成した組換えボツリヌス A 型毒素ワクチン BoHc を、45°C 1 時間の温度処理することにより、効果的にナノゲルに取り込まれることを確認した。ナノゲル化 BoHc の経鼻ワクチンとしての経鼻粘膜への保持効果を調べるために ¹⁸F-BoHc を用いて cCHP でナノゲル化した ¹⁸F-BoHc-cCHP を作製し、マウスに経鼻投与した。図 4a に示すように ¹⁸F-BoHc-cCHP ナノゲルは ¹⁸F-BoHc 単独と比較して、10 時間の時点でも長期間にわたって、鼻腔粘膜に貯留することが判明した。この PET と CT を組み合わせたデータを ¹⁸F-BoHc の Time-activity curve として表したのを図 4b に示す。これにより cCHP がカチオン化されているため、アニオンである粘膜上皮に静電的に結合するナノゲル化効果をイメージング技術で確認することができた¹¹⁾。

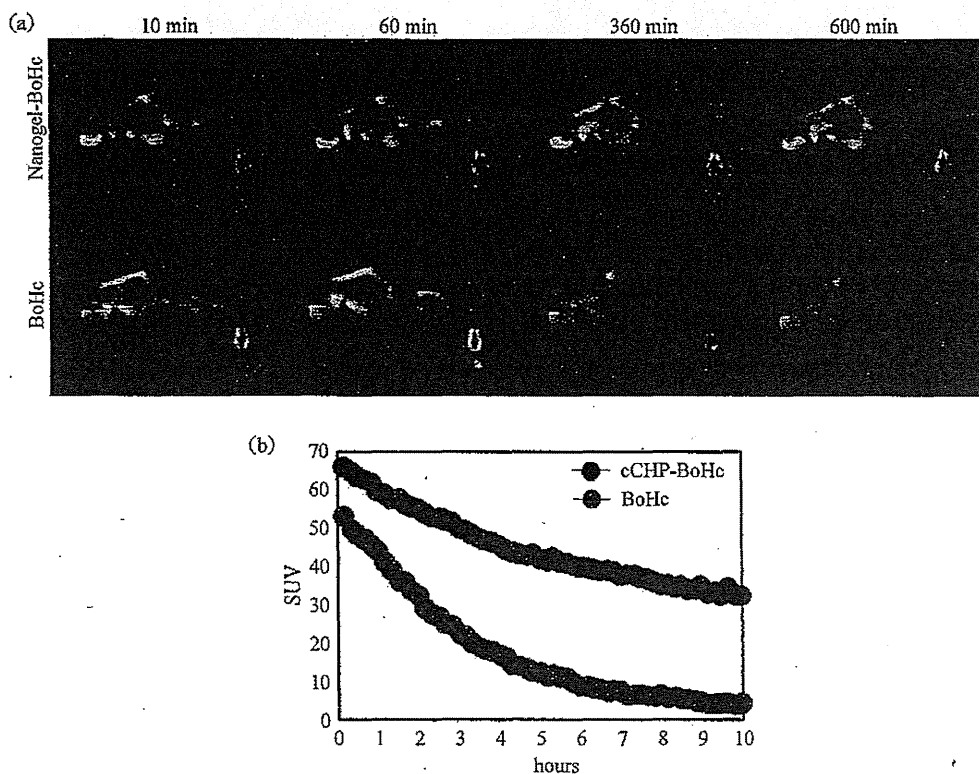


図4 経鼻ワクチン投与されたナノゲル化 ¹⁸F-BoHc ワクチンの経鼻粘膜での PET/CT イメージング (a) と経鼻粘膜での Time-activity curve (b)

※カラーの図は巻頭ページを参照

3. 経鼻投与されたサルの頭部イメージング

さて今回の PET を用いるイメージング技術はげっ歯類であるマウス・ラットのほかに大動物であるサルを用いる試験にも適している。そこで、¹⁸F-BoHc をアカゲザルに投与し、その中枢神経系への挙動を 6 時間 PET で解析した¹⁰⁾。動物用 PET はマウスやラットは全身をスキャンできる装置が開発されているが、サル等の大型動物では頭部を調べる装置しか現行では使用できない。図 5 に ¹⁸F-BoHc を投与された 1 頭の頭部の時間おきの PET を MRI (核磁気共鳴) 画像上に示す。サルの場合は MRI 画像上で直接中枢神経系への挙動を確認したが、嗅球及び脳への蓄積は認められなかった。さらに 6 時間後、確認のため各臓器を摘出し、臓器ごとの ¹⁸F を計測したが、サルの場合も、鼻腔、食道、胃、腸、尿に ¹⁸F が計測され、尿で観測された ¹⁸F は低分子化合物であった (データは示さない)。サルに経鼻投与された

^{18}F -BoHc もマウスと同様に鼻腔では徐々に鼻腔上皮細胞に取り込まれるが、嗅球と中枢神経には貯留は認められず、その一部は食道、胃、腸に運ばれ、 ^{18}F -Lys まで分解され、腸で血中に取り込まれて急速に膀胱、尿へと排出されていると考えられた。

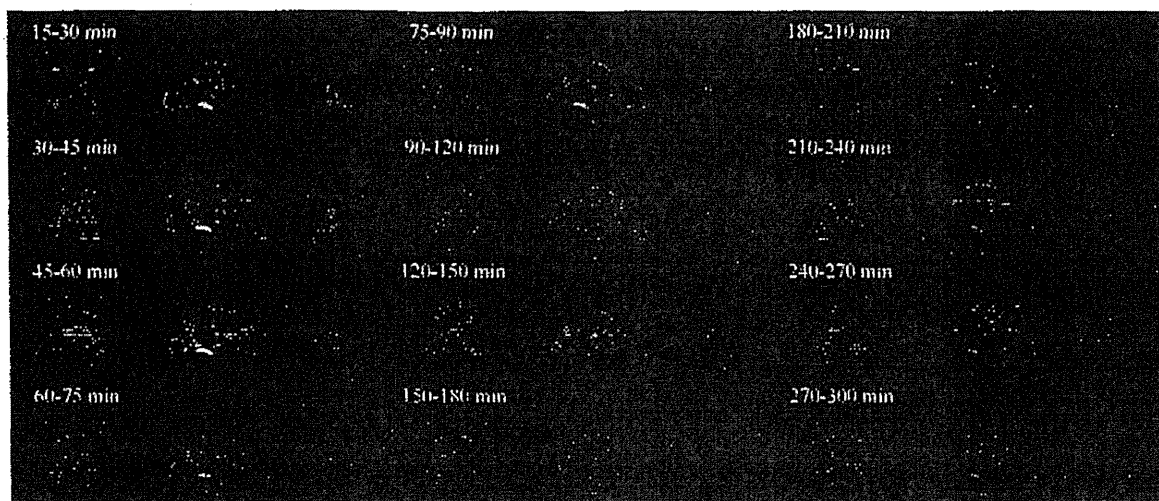


図5 経鼻投与された ^{18}F -BoHc ワクチンのサル頭部の上部、横、正面方向から測定された PET/MRI イメージング
※カラーの図は巻頭ページを参照

おわりに

PET を用いる分子イメージングは、経鼻ワクチンの挙動をマウス等の小動物のみならず、サル等の大動物においても効果的で、脳内移行を含めて有益な情報がリアルタイムで得られ、かつ非侵襲的繰り返し同一動物を使用できる点で、動物試験に用いる個体数を激減させることができると考えられ、経済的かつ動物愛護の観点からも極めて有用だと考えている。

文 献

- 1) Y. Yuki, H. Kiyono. Expert Rev Vaccines 8: 1083-1097 (2009)
- 2) M. Mutsch, et al. N Engl J Med, 350: 896-903 (2004)
- 3) FW. van Ginkel, RJ. Jackson, Y. Yuki, JR. McGhee. J. Immunol. 165: 4778-4782 (2000)
- 4) L. Illum. J. Control. Release 87:187-198 (2003)
- 5) FM. Staud et al. J. Pharm. Sci. 88:577-585 (1999)
- 6) S. Gross et al. Nat. Med. 15: 455-461 (2009)
- 7) S. Vallabhajosula. Semin. Nucl. Med. 37: 400-419 (2007)
- 8) A. May. Nat. Rev. Neurol. 5: 199-209 (2009)
- 9) K. Yagle et.al. J. Nucl. Med. 46: 658-666 (2005)
- 10) Y. Yuki, T. Nochi et.al. J. Immunol. 185: 5436-5443 (2010)
- 11) T. Nochi, Y. Yuki et.al. Nat. Mater. 9: 572-578 (2010)
- 12) FN, Franano et al. Nucl. Med. Biol. 21: 1023-1034 (1994)

