

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を作製し、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 μ 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., Leungwutiwong, 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 -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