

平成26年度 厚生労働科学研究費 創薬基盤推進研究事業  
分担研究報告書

ワクチン開発における霊長類を用いた基盤技術の開発

研究分担者：保富康宏 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター センター長

研究要旨

経鼻投与ワクチンにおける解析はヒトと抗原認識機構が異なるマウス等以外ではほとんど行われていない。本研究では現在新規粘膜ワクチンとして期待されているヒトパラインフルエンザ2型ウイルス（HPIV2）をカニクイザルに経鼻投与し、そのリンパ球を免疫染色にて病理変化を解析した。鼻粘膜では投与後 CD3 陽性細胞、CD20cy 陽性細胞、CD163 細胞の浸潤が認められ、リンパ組織が粘膜局所に形成されていることが判明した。鼻粘膜投与における鼻粘膜局所での免疫組織学的検索はマウス等の小動物以外ではほとんど報告が無く、ヒトにおける毒性評価等には反映できるものと考えられた。

A. 研究目的

粘膜免疫を誘導する粘膜ワクチンでは抗原を粘膜に直接運ぶ必要があり、全身的な影響はもとより、粘膜局所における解析は重要である。しかしながらその局所反応や免疫系の認識機構の解明はヒトと構造や抗原認識機構が異なるマウス等で行われているのが大半である。カニクイザルはヒトに極めて近い鼻腔内の構造をもっており、ヒトと同様マウス等で抗原認識に重要な組織である NALT も保持していない。本研究では規粘膜ワクチンとして期待されているヒトパラインフルエンザ2型ウイルス（HPIV2）を用いて、ヒトに類似の構造を持つカニクイザルにおいて粘膜ワクチン投与時における病理学的変化と抗原の認識について検討した。

B. 研究方法

カニクイザル（6～11歳、2.8～3.5kg）を麻酔投与下、仰臥位で固定後、鼻腔より HPIV2 を滴下し、10分間保持した。投与後0時間（コントロール）24時間後に解剖を行い、ホルマリン固定の後、HE染色にて鼻粘膜の病理解析を行った。また、リンパ

球抗原に対するモノクローナル抗体による免疫組織化学染色を行った。

（倫理面への配慮）

本研究では動物実験申請等の必要な委員会での承認は既に得ており、ヒトサンプル、情報等は一切用いていない。

C. 研究結果

鼻粘膜に HPIV2 滴下後24時間でT細胞（CD3 陽性）およびB細胞（CD20cy）がリンパ組織を軽視していることが認められた（Fig. 1）。

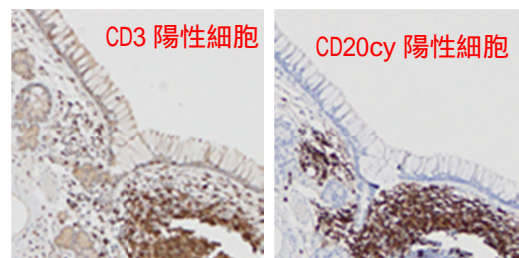
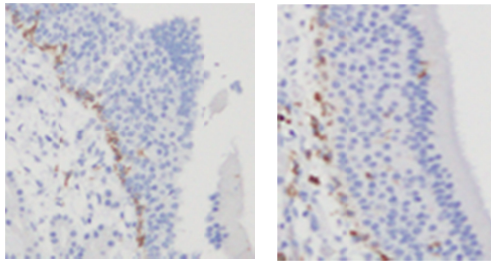


Fig. 1 粘膜下織におけるリンパ系組織の構築

単球（CD163 陽性細胞）浸潤は投与後6時間で粘膜基底層集約して認められたが、24時間ではこの様な集積は認められな

った。( Fig. 2 )



投与後 6 時間 投与後 24 時間

Fig. 2HPIV2 投与後の粘膜における CD163 陽性細胞の浸潤

以上の事より HPIV2 経鼻投与において短時間で探究浸潤が認められ、その後 24 時間でリンパ系組織の形成が認められた。

#### D. 考 察

経鼻投与ワクチンは呼吸器等の粘膜免疫誘導に優れていることから研究、開発が急速に進歩している。実験動物を用いた解析も同様に急速に進歩し多くの報告がなされている。しかしながら、マウス等の実験動物は呼吸器粘膜における抗原の認識機構および組織構造が異なり、ヒトとの比較が困難である。全身的な反応はもとより粘膜局所における反応は極めて重要であるが、マウス等での検証は困難である。カニクイザルはヒトと類似の構造をもち、抗原認識機構および構造学的においても、極めて類似の機構であると考えられる。本研究ではヒトでは知見を得ることが出来ない粘膜局所の変化がカニクイザルにおいて検討され、呼吸器等の粘膜感染の病態研究や今後も開発が進むであろう粘膜投与ワクチンにおいて多くの治験を与えると考えられた。

#### E. 結 論

経鼻投与ワクチンの粘膜での病態解明は霊長類で多くの知見が得られると考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Fukuyama Y., Yuki Y., Katakai Y., Harada N., Takahashi H., Takeda S., Mjima M., Joo S., Kurokawa S., Sawada S., Shibata H., Park EJ., Fujihashi K., Briles DE., Yasutomi Y., Tsukada H., Akiyoshi K. and Kiyono H. Nanogel-based pneumococcal surface protein A nasal vaccine induces microRNA-associated Th17 cell responses with neutralizing antibodies against *Streptococcus pneumoniae* in macaques. *Mucosal Immunology* 2015 E-pub
2. Okabayashi S, Shimozaawa N, Yasutomi Y., Yanagisawa K, Kimura N. Diabetes mellitus accelerates A $\beta$  pathology in brain accompanied by enhanced GA $\beta$  generation in nonhuman primates *PLoS One in press*
3. Onishi M, Ozasa K, Kobiyama K, Ohata K, Kitano M, Taniguchi K, Homma T, Kobayashi M, Sato A, Katakai Y, Yasutomi Y., Wijaya E], Igarashi Y, Nakatsu N, Ise W, Inoue T, Yamada H, Vandenbon A], Standley DM], Kurosaki T, Coban C, Aoshi T, Kuroda E, Ishii KJ. Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin spikes local inflammation that induce Th2 and Tfh responses to the coadministered antigen J. *Immunol.* 2015 *in press*
4. Watanabe K., Matsubara A, Kawano M, Mizuno S, Okamura T, Tsujimura Y, Inada H, Nosaka T, Matsuo K. and Yasutomi Y. Recombinant Ag85B vaccine by taking advantage of characteristics of human parainfluenza type 2 virus vector showed Mycobacteria-specific immune responses by intranasal immunization. *Vaccine* 2014;32:1727-1735.
5. Kobiyama K., Aoshi T., Narita H., Kuroda E., Hayashi M., Tetsutani K., Koyama S., Mochizuki S., Sakurai K., Katakai Y., Yasutomi Y., Saijo S., Iwakura Y., Akira S., Coban C. and Ishii KJ. A non-agonistic Dectin-1 ligand transforms CpG into a multitask nano-particulate TLR9 agonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2014;111;3086-3091.

6. Tsujimura Y, Inada H, Yoneda M, Fujita T, Matsuo K. and Yasutomi Y. Effects of Mycobacteria major secretion protein, Ag85B, on allergic inflammation in the lung. PLoS One 2014;9: E-pub

7. Saito N, Chono H, Shibata H, Ageyama N, Yasutomi Y. and Mineo J. CD4(+) T cells modified by the endoribonuclease MazF are safe and can persist in SHIV-infected rhesus macaques. Mol Ther. Nucleic Acids 2014:E-pub

8. Machino-Ohtsuka T, Tajiri K, Kimura T, Sakai S, Sato A, Yoshida T, Hiroe M, Yasutomi Y. Aonuma K, Imanaka-Yoshida K. Tenascin-C aggravates autoimmune myocarditis via dendritic cell activation and Th17 cell differentiation. J.Am.Heart Assoc. 2014 E-pub

9. Tachibana SI, Kawai S, Katakai Y, Takahashi H, Nakade T, Yasutomi Y. Horii T, Tanabe K. Contrasting infection susceptibility of the Japanese macaques and cynomolgus macaques to closely related malaria parasites, Plasmodium vivax and Plasmodium cynomolgi. Parasitol. Int. 2014 E-pub

## 2.学会発表

1.加藤 誠一、岡村 智崇、張 険峰、向井 徹、井上 誠、五十嵐 樹彦、志田 壽利、松尾 和浩、保富 康宏

BCG ウレアーゼ欠損株を用いたエイズワクチンの評価

第 62 回 日本ウイルス学会学術集会

2014 年 11 月 10 日～12 日パシフィコ横浜会議センター

2.Tsujimura Yusuke, Yasutomi Yasuhiro :

Suppressive effect of Mycobacteria major secretion protein, Ag85B, to innate immune response is depending on the interaction with RIG-I.第 43 回日本免疫学会総会

2014 年 12 月 10 日～12 月 12 日、京都国際会議場

3.藤城(伊藤)康世、鯉江洋、柴田宏昭、岡林佐知、片貝祐子、Boran Osman、金山喜一、保富康宏、揚山直英：再生医療評価系としてのカニクイザル MSC を用いた細胞標識の解析。第 61 回日本実験動物学会学術総会。2014 年 5 月 15～17 日。北海道、札幌市

4.塩釜ゆみ子、小原道法、保富康宏：新規実験動物としての *Tupaia Belangeri* の飼育および繁殖について 第 157 回 日本獣医学会学術集会 平成 26 年 9 月 9 日～9 月 12 日

北海道、札幌

5.塩釜ゆみ子、小原道法、保富康宏：C 型肝炎ウイルスに対する DNA ワクチンと組み換えワクシニアウイルスを用いた Prime/Boost 法による肝炎ウイルス特異的免疫賦活化効果の検討第 18 回 日本ワクチン学会学術集会 平成 26 年 12 月 6 日～12 月 7 日 福岡国際会議場

## G.知的所有権の出願・取得状況

1. 2014 年 11 月 6 日

「NOVEL RECOMBINANT BCG VACCINE」

出願番号: 12832210.4

2. 2014 年 11 月 13 日

特許出願 : 特願 2014-229283

発明の名称：C 型肝炎の治療及びノ又は予防用医薬組成物