

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
（分担）研究報告書

パラインフルエンザ2型ウイルスベクターの病理学的安全性に関する研究

研究分担者 伊奈田 宏康 鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授

研究要旨

新規結核ワクチンでベクターとして用いられるパラインフルエンザ2型ウイルス(hPIV2)の病理学的安全性を検討するために、hPIV2 投与後の鼻粘膜組織標本及び嗅球の経時的変化を病理学的・免疫組織学的に解析した。hPIV2 投与後 24 時間では、いわゆる風邪症候群に伴う鼻炎と類似の像と考えられた。今後は、実際に準じた投与に応じて局所あるいは主な臓器のより詳細な解析を行い、hPIV2 ワクチンの安全性の包括的な検討を行う。

A．研究目的

新規結核ワクチンにおいてベクターとして用いられるパラインフルエンザ2型ウイルス(hPIV2)を経鼻投与し、ワクチンの安全性について病理組織学的に検討することが目的である。前回の報告では、病理学的検討の汎用性を高めるために、骨で囲まれている鼻粘膜を骨膜とともに周囲骨組織から丁寧に剥離し、脱灰処理を行わずに HE 染色を行った。特殊染色、免疫組織学的検討により、より詳細に検討を行った。

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(1x10⁷ TCID₅₀)を滴下し、10分間保持した。投与後0時間(コントロール)6時間、12時間、24時間後に解剖を行い、ホルマリン固定の後、鼻粘膜を骨膜とともに周囲骨組織から丁寧に剥離し、脱灰処理を行わずにHE染色にて、鼻粘膜の病理解析を行った。また、鼻粘膜嗅部を構成する細胞を区別するため、鼻粘膜上皮細胞の染色には抗ケラチン18抗体、嗅細胞の染色には抗 Olfacto

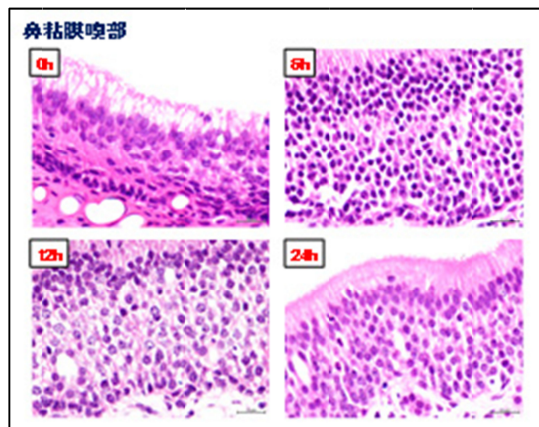
ry Marker Protein 抗体、支持細胞の染色には抗サイトケラチン抗体、基底細胞の染色には抗チン17抗体を用いた。また、鼻粘膜基底膜の染色をPAM染色法で行った。

(倫理面への配慮)

特に問題ない。

C．研究結果

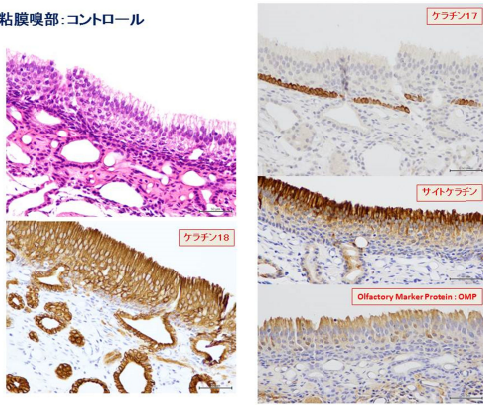
hPIV2 投与 6 時間後では鼻粘膜嗅部の鼻粘膜上皮の肥厚、12 時間後では上皮下固有層への明らかな好中球の浸潤、24 時間後では好中球主体の炎症細胞浸潤の増加がみられた(図1)。



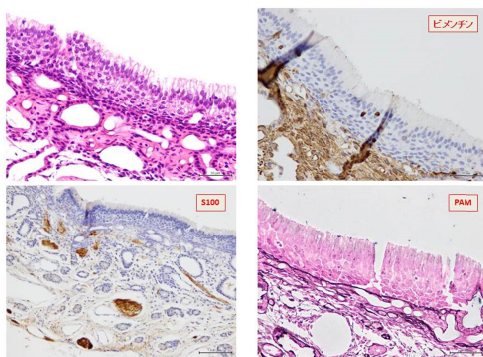
(図1：投与後の鼻粘膜嗅部の HE 染色)

免疫染色により、嗅細胞、支持細胞、基底細胞からなる鼻粘膜嗅部の鼻粘膜上皮細胞を区別することを可能とし、検討を行った(図2)。

鼻粘膜嗅部:コントロール



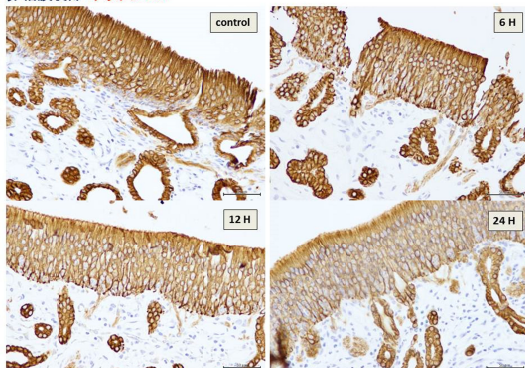
鼻粘膜嗅部:コントロール



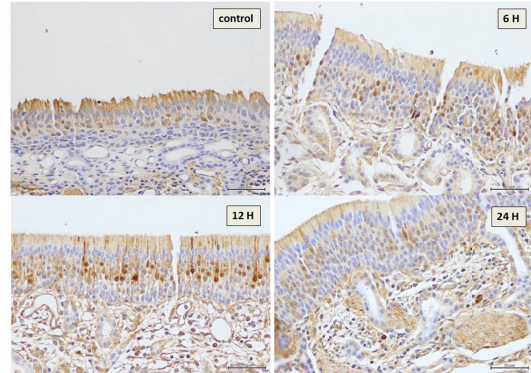
(図2: 正常鼻粘膜嗅部の免疫染色)

投与6時間後より、通常は支持細胞を染色する抗サイトケラチン抗体によって染色される領域(細胞数)が拡大し基底部まで広がった。また、嗅細胞と基底細胞の抗体染色には大きな変化は見られなかった(図3)。

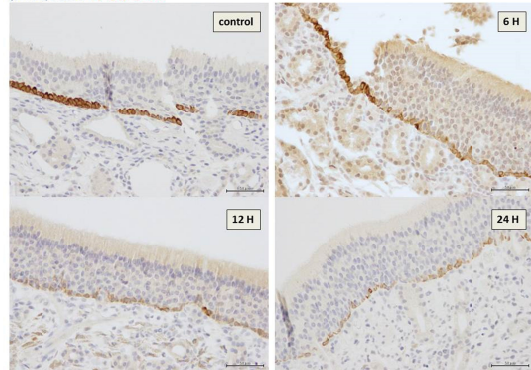
鼻粘膜嗅部:ケラチン18



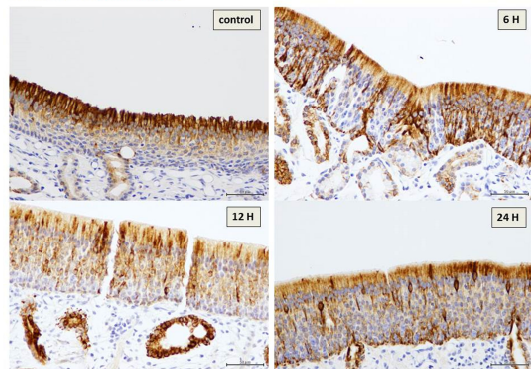
鼻粘膜嗅部: Olfactory Marker Protein: OMP



鼻粘膜嗅部:ケラチン17

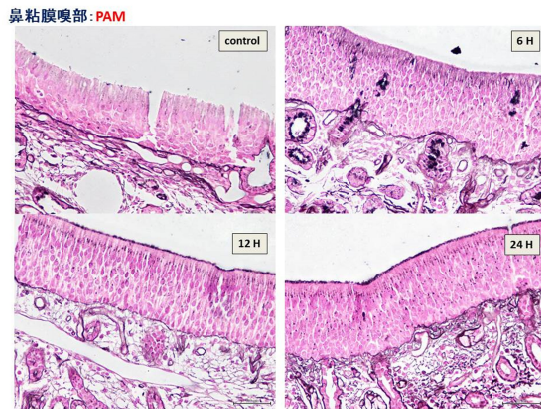


鼻粘膜嗅部: サイトケラチン

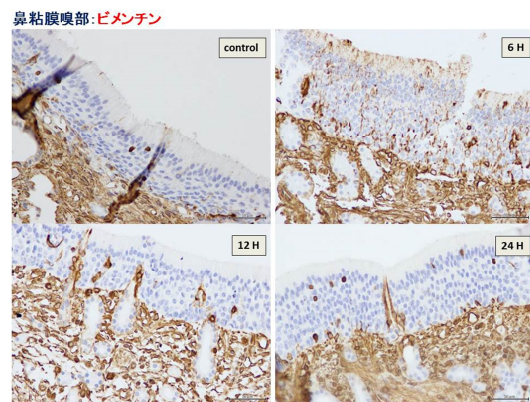


(図3: 鼻粘膜嗅部の経時的変化、各抗体による免疫染色)

また、過ヨウ素酸メセナミン銀染色(PAM染色)では、投与24時間までに明らかな基底膜障害はみられなかった(図4)。更に、上皮細胞内に炎症細胞などの数の著明な増加は見られず(図5)、hPIV2投与により嗅球には明らかな変化はみられなかった。



(図4：鼻粘膜嗅部の経時的変化、PAM染色)

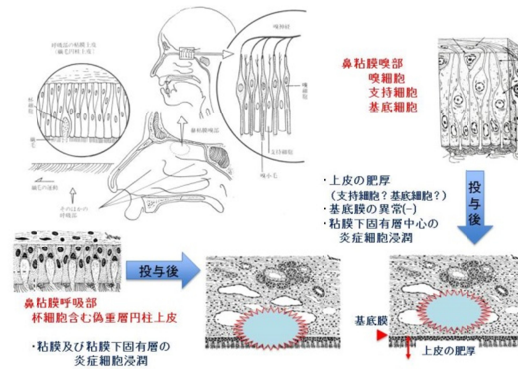


(図5：鼻粘膜嗅部の経時的変化、免疫染色)

D．考察

hPIV2の経鼻投与による鼻粘膜の反応は、少なくとも投与後6時間で生じ、好中球を主体とする急性炎症のピークは24時間頃と考えられた。鼻粘膜呼吸部では、炎症が基底膜を越えて波及しているのに対し、鼻粘膜嗅部では、炎症細胞浸潤により粘膜基底膜の明らかな損傷や粘膜上皮細胞層への炎症細胞浸潤の明らかな増加はみられず、抗サイトケラチン抗体で染色される細胞（正常では支持細胞が染色）の染色域の拡大が認められた。また、嗅球には炎症細胞浸潤などの変化は認められなかったことから、hPIV2投与後24時間では、いわゆる風

邪症候群に伴う鼻炎（他にはアレルギー性鼻炎）と類似の像と考えられた（図6）。



(図6：まとめ)

E．結論

hPIV2の経鼻投与による鼻粘膜の経時的な変化を、脱灰処理を行うことなく、HE染色、免疫組織や特殊染色による解析を行った。その結果、hPIV2投与後24時間の鼻粘膜局所の組織像は、いわゆる風邪症候群にともなう鼻炎に類似すると考えられた。今後は、実際にワクチンの投与スケジュールに合わせ、局所あるいは主な臓器の病理組織学的解析を行い、hPIV2ワクチンの安全性の包括的な検討を行う。また、免疫染色学的検討により、カニクイザルにおけるワクチン投与に伴う免疫動態の評価を行う予定である。

G．研究発表

1．論文発表

1. Tsujimura Y, **Inada H**, Yoneda M, Fujita T, Matsuo K, Yasutomi Y. Effects of mycobacteria major secretion protein, Ag85B, on allergic inflammation in the lung.

PLoS One. 2014 Sep 5;9(9):e106807. doi:
10.1371

2 .Watanabe K, Matsubara A, Kawano
M, Mizuno S, Okamura T, Tsujimura
Y, Inada H, Nosaka T, Matsuo K, Yasu
tomi Y. Recombinant Ag85B vaccine by
taking advantage of characteristics of
human parainfluenza type 2 virus vect
or showed Mycobacteria-specific immun
e responses by intranasal immunization.
Vaccine. 2014 Jan 29. pii: S0264-410X
(14)00087-5.

2 . 学会発表

なし

H . 知的財産権の出願・登録状況

該当なし