

細胞で観察される T 細胞非依存性の B 細胞の IgA クラススイッチ促進機序が関与していることが明らかになった。さらに抗原提示された樹状細胞から、MHC class I と MHC class II を介する抗原シグナル伝達系が共に作用して、液性免疫と細胞性免疫の両方を誘導している実態が明らかになった。このような作用を示す SF-10 アジュバントであるが、抗原の非存在下では樹状細胞の刺激作用は全くなく、抗原との共存下に樹状細胞の抗原の取り込みを促進していることが判明した。

D. 結論

安全で有効な生体成分粘膜アジュバント SF-10 の作用機序の一端が明らかになってきた。今後さらなる詳細な解析を通じて、SF-10 の安全性が代謝以外の点にもあるのか、強力な抗体誘導効果が、何に由来するかをさらに絞り込んで解析を進める。

E. 健康危険情報

なし。

F. 研究発表

<論文発表>

- 1) Horimukai K, Morita K, Narita M, Kondo M, Kitazawa H, Nozaki M, Shigematsu Y, Yoshida K, Niizeki H, Motomura K, Sago H, Takimoto T, Inoue E, Kamemura N, Kido H, Hisatsune J, Sugai M, Murota H, Katayama I, Sasaki T, Amagai M, Motita H, Matsuda A, Matsumoto K, Saito H, Ohya Y. Application of moisturizer to neonates prevents development of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 134(4): 824-830, (2014)

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含

む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

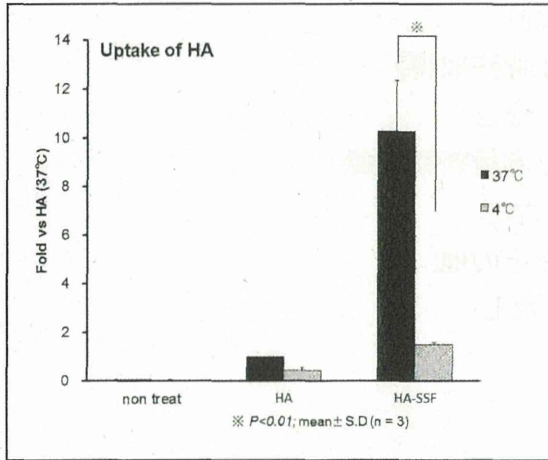


図 1. HA-SSF による樹状細胞への温度依存性取り込み促進効果

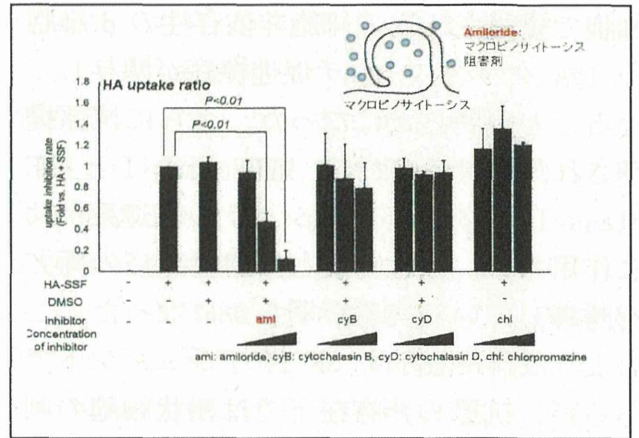


図 4. マクロピノサイトーシスによる HA-SSF の取り込み促進効果

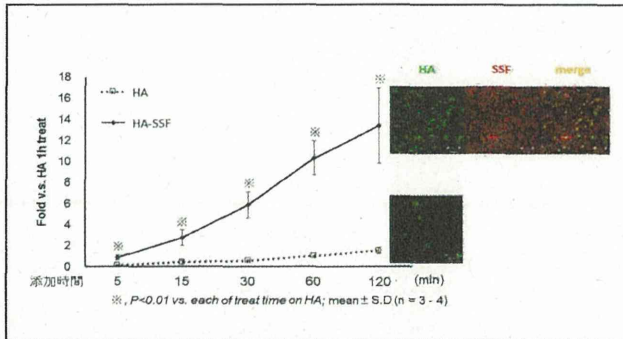


図 2. SSF による樹状細胞への HA 抗原の取り込み促進機序

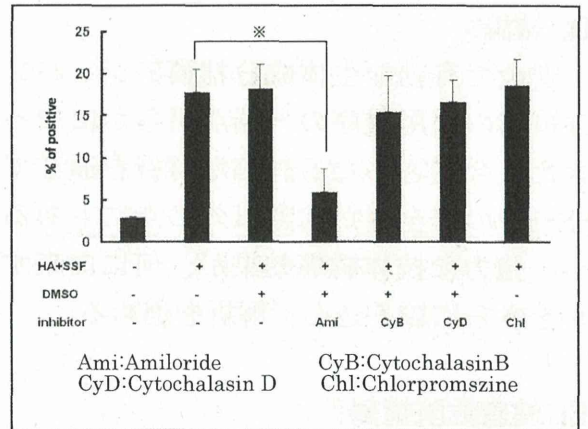


図 5. CD86 陽性細胞の割合で表示した各種エンドサイトーシス阻害剤の影響

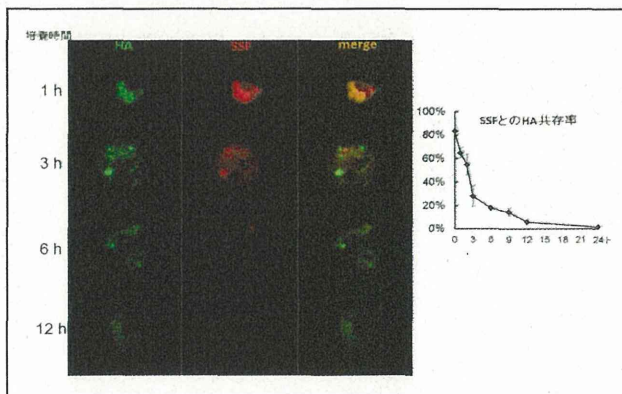


図 3. 細胞内での HA-SSF の共存性の継時的変化

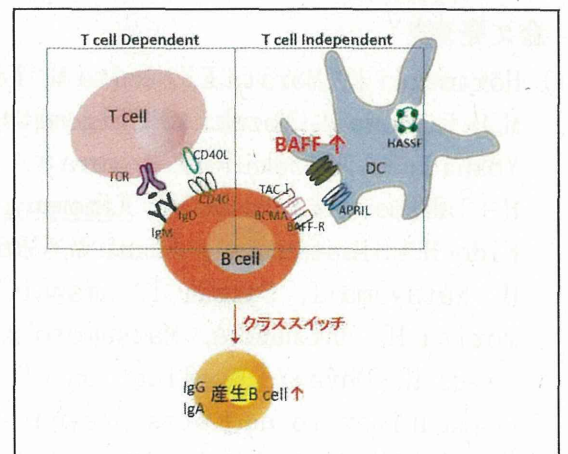


図 6. T 細胞非依存性経路を経由した粘膜局所の IgA 産生のクラススイッチ促進機序

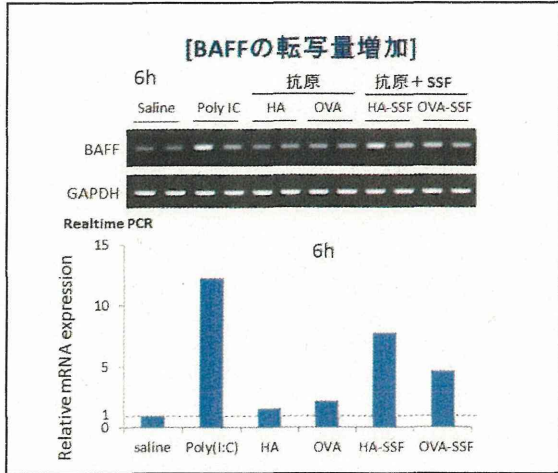


図 7. 鼻腔粘膜局所の樹状細胞の BAFF の転写促進効果

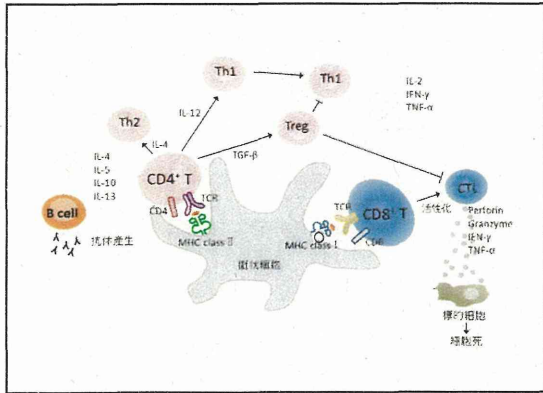


図 8. CD4+、CD8+ T 細胞を経由する抗原のシグナル伝達系

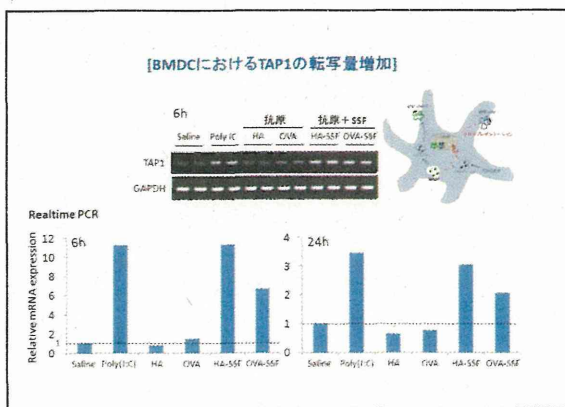


図 9. HA-SSF、OVA-SSF を処理した樹状細胞の TAP1 の発現増加

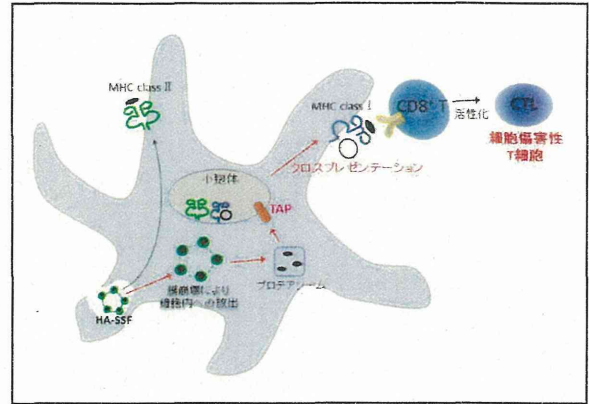


図 10. HA-SSF による MHC class I を介する CD8+ T 細胞の活性化

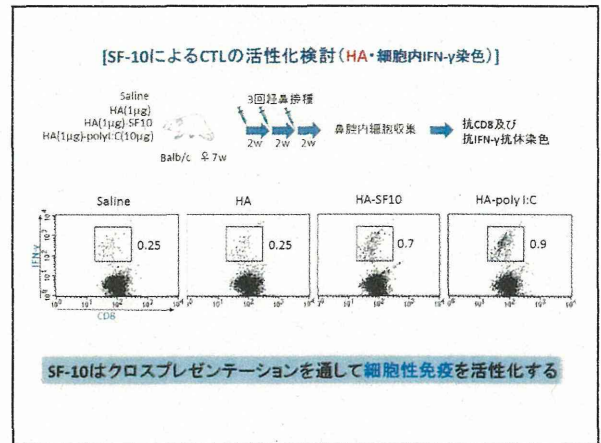


図 11. HA-SF-10 の経鼻投与による細胞性免疫の活性化の確認

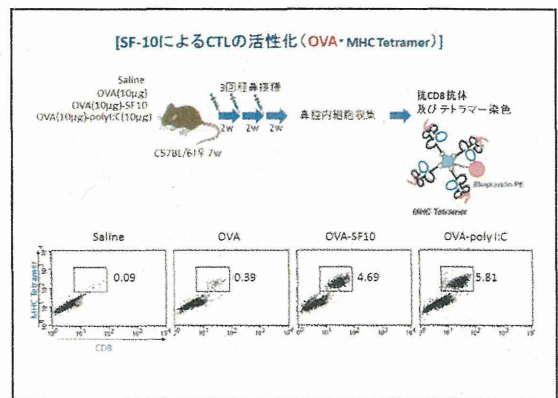


図 12. OVA-SF-10 の経鼻投与による細胞性免疫の HA-SF-10 による抗体活性化と細胞障害性 T 細胞、CTL の出現

厚生労働科学研究委託費（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）
委託業務成果報告

分担研究報告書

SF-10アジュバントの安全性に関する研究

研究分担者 遠藤 淳（第一三共株式会社・ワクチン事業本部 主任研究員）
篠田 香織（第一三共株式会社・ワクチン事業本部 副主任研究員）
井上 和恵（第一三共株式会社・ワクチン事業本部 副主任研究員）

研究要旨

アジュバント添加ワクチンは、一般にアジュバントによるワクチン効果の増強に伴って安全性が問題になることが多く、本研究における生体成分類似のアジュバント SF-10 についてもこの視点から安全性についての検討を行っている。SF-10 を構成する人工合成肺サーファクタント製剤の SSF は、主な GLP 試験を既に実施して安全性の確認が取れており、これに医薬品添加物として承認されている Carboxy vinyl polymer (CVP) を既定の濃度加えて、SF-10 ができている。しかし、SSF と SF-10 (SSF+CVP) のアジュバント効果が、鼻腔の IgA 抗体誘導効果において SF-10 で約 10 倍程度増強されることから、安全性に対する評価をこれらの視点から詳細に実施する必要がある。

SF-10 の安全性検討について本年度は、マウスを用いた病理学的リスク因子の解析を実施しており、病理標本を作製して解析を進めている。結果が出次第、本プロジェクトの全体計画に反映させる。

A. 研究目的

これまでに世界で開発された主要な粘膜アジュバントは、図 1 に示すように Poly(I:C)、CpG、Cholera Toxin (CT) 等のように、アジュバント自体で樹状細胞を直接刺激して免疫系を活性化させるアジュバント群と、樹状細胞への抗原の運搬効率を増強させる抗原運搬体としてのアジュバントの 2 グループに分類できる。これまでは一般に、前者のグループでは、アジュバントの有効性が強くなればなる程、自己免疫疾患等のアジュバント病のリスクが高まって安全性に問題が現れ、安全性と有効性を同時に達成させることは困難であった。この

問題を解決するために、本プロジェクトではアジュバントを代謝回転の速いヒトの生体成分に限定して検索し、過剰な樹状細胞の刺激を回避することで、安全性を確保する方法を探索してきた。このような条件を満足する生体成分粘膜アジュバントは、図 1 に示す抗原運搬体としての肺サーファクタントのみである。

SF-10 は、アジュバント単独では細胞への刺激性が無いことから、アジュバント自体による投与局所の炎症性反応は認められていない。しかし鼻腔内投与であることから、嗅神経を介した中枢神経系への影響を詳細に調査する必要がある。また経鼻投与法は、

極めて効果的に全身の免疫系に影響して、生体防御機能を総動員することから、全身の免疫系をも視野に入れて安全性を評価して行く必要がある。

B. 研究方法

SF-10の安全性の検討は、マウスを用いた病理学的リスク因子の解析を計画している。本年度は、高用量経鼻接種時の鼻腔組織の病理学的解析の予備検討を、マウスを用いて検討した。詳細を図2に示した。

(倫理面への配慮)

本研究は、第一三共株式会社の実験動物委員会の承認を受け、その指針に従い実施した。

C. 研究結果

SF-10の安全性の検討は、マウスを用いた病理組織学的なリスク因子の解析を実施中である。具体的には、図2に記載した実験計画に基づいて病理組織学的解析を進めている。ここで記載している Level 1, 2, 3 については、図3に示す部位に相当する。現在実験は進行中で、病理標本の解析過程にある。

D. 考察

代謝回転の速い生体成分に類似した粘膜アジュバント SF-10 の安全性の評価を進めている。世界トップレベルの抗体誘導効果を示すアジュバントでありながら、単独では樹状細胞の刺激効果を示さず、炎症性反応も示さないことから、安全性情報と作用機序解析の全容解明が待たれる。これらの情報は、今後世界における安全で有用なアジュバント開発に極めて有用な情報を提供することが期待される。

D. 結論

生体成分粘膜アジュバント SF-10 の安全性検討として、マウスを用いた病理学的リスク因子の解析が進行中である。

E. 健康危険情報

なし。

F. 研究発表

<論文発表>

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

これまでに開発された主要な粘膜アジュバント

Mucosal adjuvant and Delivery system Route Systemic response Mucosal responses

1) 粘膜の樹状細胞刺激物質

Toxin-based adjuvants

CT	ON	+	+
mutant CT	N	+	+
HLT	ON	+	+
mutant HLT	N	+	+
CTA/HLTB	ON	+	+
mutant CTA/HLTB	N	+	+
mutant PTX	N	+	+
mutant STX	N	+	+
STXB	N	+	+

Cytokine-based adjuvants

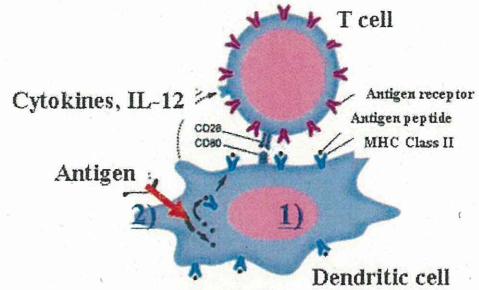
IL-1	N	+	+
IL-6	N	+	-
IL-12	N	+	+
Type I IFN	N	+	+

Innate immunity associated adjuvants

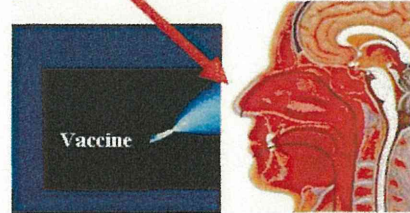
Lpfa	N	+	+
RANTES	N	+	+
Defensin	N	+	-
CoG DNA	ON	+	+
Poly(I:C)	ON	+	+
Saponin(QS-21)	O	+	+

2) 粘膜の樹状細胞への抗原運搬体

ISCOM	ON	+	+
Liposome	N	+	+
Live attenuated vectors			
rSalmonella	O	+	+
rBCG	N	+	-
Chitosan	N	+	+
Mucosal DNA vaccine	ON	+	+
Edible vaccine	ON	+	+
Pulmonary Surfactant (SF-10)	N	*	*



Unexpected antigen exposures Side effects



アジュバント単独で樹状細胞を刺激すること無く、抗原共存下でのみ樹状細胞を刺激する代謝回転（体内分解）の早い生体成分アジュバントが、安全性確保の上で最適である

図 1. これまでに開発された主要な粘膜アジュバント

高用量頻回投与後の病理学的所見

被検動物: Balb/C mouse female 6-week-old
N = 3
vaccine conc.: PBS cont. ugHA/μL
接種法: 3 μL x 2 (each cavity) を1週間隔で3回経鼻投与

3回投与翌日に採材、頭部を10%中性ホルマリンにて固定
(鼻腔内に10%中性ホルマリンを還流後)

脱灰処理後にパラフィンブロックを作成し、切片作成、HE染色し鼻腔内の病理学的解析を行う

解剖学的検査	採材	組織学的検査
鼻腔 (Nasal cavity)	頭部 (鼻腔含む) (Head [including nasal cavity])	Nasal cavity (level 1) Nasal cavity (level 2) Nasal cavity (level 3) Nasopharynx

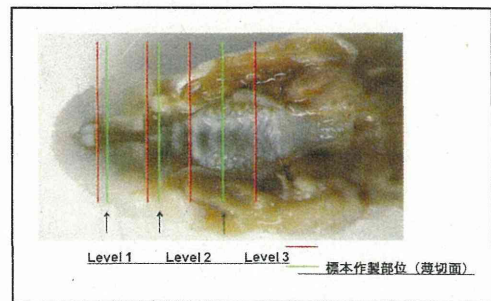


図 2. マウスを用いた病理学的リスク因子の把握実験計画

図 3. 標本切り出し部位と薄切面 (ラットの例)

厚生労働科学研究委託費（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）
委託業務成果報告

分担研究報告書

SF-10アジュバントの抗体誘導臓器の調査に関する研究

研究分担者 高橋 悦久（徳島大学疾患酵素学研究センター 特任助教）

研究協力者 堺 聡子（徳島大学疾患酵素学研究センター 研究員）

研究要旨

経鼻接種ワクチンは、気道感染症と同じルートで抗原提示され、免疫系が作動することから、接種部位である鼻腔のみならず、気道全体の粘膜、さらに膣粘膜、消化管粘膜にも分泌型 IgA 抗体を誘導すると言われていた。しかし、その抗体誘導効果の程度、詳細についてはこれまで不明な点が多かった。本年度のプロジェクトでは、鼻腔接種用に最適化された SF-10 とインフルエンザ抗原を混合して鼻腔に噴霧することで、血液中の抗インフルエンザ HA 抗体、気管支肺胞洗浄液、膣液、腸管粘膜の抗インフルエンザ HA 分泌型 IgA 抗体の分泌量を測定した。その結果、ワクチン接種部位の鼻腔とほぼ同等の濃度の IgA 抗体が膣分泌液中に含まれており、また腸管分泌液中には鼻汁濃度の約 60% であるが抗体総量では、便に含まれる量を入れると鼻汁の約 10 倍量の大量の抗体が分泌されていることが判明した。以上のことから、今後腸管感染症、膣感染症のみならず、腸管免疫を標的にした食物アレルギーワクチンや、膣粘膜免疫を標的にした HIV ワクチン、避妊用ワクチン等の開発へ、経鼻接種が有用と推定された。

A. 研究目的

インフルエンザワクチンを始めとした各種ワクチンの多くは、通常感染ルートでは無く、皮下注射か筋肉注射型のワクチンが多く、この場合抗体誘導は TH2 タイプの液性免疫系のみが発動され、TH1 タイプの細胞性免疫系の作用は極めて弱い。さらに、初感染部位の気道粘膜の IgA 抗体の誘導は全く期待されない。次世代型のワクチン開発には、より予防効果の強いワクチンが望まれており、そのためには自然感染ルートの経鼻接種ワクチンである必要がある。経鼻接種ワクチンの場合、気道粘膜の分泌型 IgA を誘導して感染予防効果を誘導するだ

けでなく、血液中の IgG 抗体を誘導して肺炎防止効果を発現する。絶えず異物にさらされて異物排除機能の優れた鼻腔粘膜の免疫系を刺激して抗体誘導を導くためには、抗原単独では不十分で免疫増強作用を示すアジュバントが不可欠である。

本プロジェクトでは、以上を背景として経鼻接種ワクチンに最適化した SF-10 を使用して、接種部位以外の全身の粘膜、具体的には気管支肺胞洗浄液、腸管粘膜洗浄液、膣洗浄液に含まれる抗体濃度を測定して、SF-10アジュバントの抗体誘導臓器の調査に関する研究を実施した。

B. 研究方法

SF-10 アジュバントは、図 1 に示す肺サーファクタントの成分の中から、粘膜アジュバント作用に必要な成分として、dipalmytoyl phosphatidylcholine (DPPC)、Phosphatidyl glycerol (PG)、Phosphatidic acid (PA)、Surfactant protein C (SP-C) を同定し、強い疎水性のために工業生産が困難な SP-C に代わって K6L16 ペプチドが発明されて、肺サーファクタントに類似した人工合成アジュバント (SSF) が完成した。さらに噴霧された抗原と SSF の鼻腔内での滞留効果を増強させるための増粘剤として Carboxy vinyl polymer (CVP) を加え、SF-10 が完成した。図 2 は肺サーファクタントと HA 抗原を混合した電子顕微鏡写真 (A) と、HA 抗原と SF-10 を混合した電子顕微鏡写真 (B) を示す。SF-10+HA 抗原の場合、CVP のポリマー鎖に HA 抗原が絡め取られて、樹状細胞に HA 抗原が効果的に運搬されて抗原提示されると期待される。このように SF-10 アジュバントと抗原との効果的な結合が重要で、そのための各製造工程でのパラメーターが検討され、再現性の良い抗原と SF-10 の安定結合が得られるようになった。

この検体を使用して鼻汁以外の気管支肺胞洗浄液、腸管粘膜洗浄液、膣洗浄液に含まれる抗原特異的抗体量を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、徳島大学動物実験委員会の承認を受け、その指針に従い実施した。

C. 研究結果

本実験で使用したインフルエンザ haemagglutinin (HA) の抗体誘導効果を図 3 に示す。8 週齢の Balb/C マウス (雌)、各群 5 匹に、生理食塩水投与群、Influenza A

California/07/2009(H1N1) HA (0.4 $\mu\text{g}/\text{匹}$) 群、HA (0.4 $\mu\text{g}/\text{匹}$)+SSF(4 $\mu\text{g}/\text{匹}$)+0.5%CVP (HA-SF-10 群)、HA (0.4 $\mu\text{g}/\text{匹}$)+Poly(I:C) (4 $\mu\text{g}/\text{匹}$) (HA-Poly(I:C) 群) を、2 週間間隔で 3 回経鼻投与 (片鼻に 3 μL ずつ) して、最終投与から 2 週後に、血液と鼻腔洗浄液を採取して、抗インフルエンザ HA 抗体の濃度を ELISA で測定して平均値と中央値で示している。その結果、生理食塩水のバックグラウンド値で、鼻汁、血液の抗 HA 抗体は、それぞれ 2-3 ng/mL、10-20 ng/mL を示したのに対して、HA 単独の 3 回投与で鼻汁、血液の抗 HA 抗体はそれぞれ 5-10 ng/mL、30-40 ng/mL 程度の増加は見られたが、SF-10 アジュバント添加の 1/1000 程度で、図に表示した $\mu\text{g}/\text{mL}$ のスケールではほぼ 0 に近い値として表示されている。これに対して、HA-SF-10 群では鼻腔の IgA 値 (中央値) で 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を、血液 IgG 値で 2765 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を示した。この抗体誘導効果は、文献上世界で最も効果的な抗体誘導効果と言える。この抗体誘導効果は、樹状細胞を直接刺激する SSF と同量の Poly(I:C) の添加よりも、中央値で 1.6 倍 (鼻汁)、2.6 倍 (血液) の抗体誘導効果を示した。HA+SSF に比べると、15 倍 (鼻汁)、8.5 倍 (血液) を示し、鼻腔内投与の場合、CVP+SSF (SF-10) の著明な抗体誘導増幅効果を示している。CVP は単に増粘剤としてではなく、図 4 に示すように SSF との共存下に HA 抗原を効率よく樹状細胞に運搬しているためと推定される。

以上のように経鼻接種用の SF-10 に最適化したアジュバントを用いて、鼻汁の IgA と血液の IgG 以外の全身粘膜の分泌型 IgA の分泌量を測定した。具体的には、マウスの鼻腔洗浄液、気管支肺胞洗浄液、膣液、消化管洗浄液、便中の抗 HA 分泌型 IgA の定量を実施した。

8週齢のBalb/Cマウス(雌)、各群5匹に、生理食塩水投与群、Influenza A California/07/2009(H1N1) HA (0.4 µg/匹)群、HA (0.4 µg/匹)+SSF(4 µg/匹)+0.5%CVP (HA-SF-10群)、HA (0.4 µg/匹)+Poly(I:C) (4 µg/匹) (HA-Poly(I:C)群)を、2週間間隔で3回経鼻投与(片鼻に3 µLづつ)して、最終投与から2週後に、血液と鼻腔洗浄液(0.1% BSA/saline, 1mL)、肺洗浄液(0.1% BSA/saline, 2mL)、膣洗浄液(0.1% BSA/saline, 1mL)、腸管洗浄液(0.1% BSA/saline, 2mL)、糞便(盲腸内の糞便100 mgを500 µLのプロテアーゼインヒビターカクテルを含むPBS)を採取した。なお糞便を溶解する溶液に含まれるプロテアーゼインヒビターを含む各試薬の最終濃度は、10 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、0.1 mM leupeptin、0.1 mM bestatin、0.1 mM E-64c、0.3 M KCl、15% dimethyl sulfoxide、0.05% Tween 20である。

図5に経鼻接種したインフルエンザHA抗原特異的分泌型IgAの鼻汁液、気管支肺胞洗浄液、腸管粘膜洗浄液、便、膣洗浄液中の濃度を示している。マウス1匹当たりの分泌総量を図6に示す。各臓器のHA抗原特異的分泌型IgA総量は、いずれの臓器においてもPoly(I:C)に比べてSF-10の誘導効果は高かった。膣液中に分泌される量は、鼻腔に分泌される総量の約半分を、さらに腸管洗浄液中には鼻腔洗浄液とほぼ同量のインフルエンザHA抗原特異的分泌型IgAが検出された。なお、糞便中には比較的大量の抗体が含まれており、生体内で最も多量の特異抗体が含まれることが判明した。これらの事は、腸管感染症、膣感染症ワクチンに経鼻接種ワクチンが有効であることを示唆している。

D. 考察

アジュバントの投与を自然感染ルートにすることで、生体が持つ様々な生体防御機能をフル動員することで、極めて有効な抗体誘導効果を実験した。

その結果、ワクチン接種部位の鼻腔とほぼ同等の濃度のIgA抗体が膣分泌液中に含まれており、腸管分泌液の抗体総量は最高で、鼻汁の抗体総量の約10倍をしめした。このことから、今後気道感染症以外に、膣感染症、腸管感染症、さらには食物アレルギーワクチンや、膣粘膜免疫を標的としたHIVワクチン、避妊用ワクチン開発への応用が期待される。

E. 結論

SF-10アジュバントの抗体誘導臓器の調査では経鼻接種の条件下で、血液中のIgG以外に気道粘膜のIgA、膣粘膜のIgA、腸管粘膜のIgAを多量の産生していることが判明したことから、腸管粘膜ワクチン、膣粘膜ワクチンの開発に応用できることが判明した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

<論文発表>

- 1) Maekawa T, Kimoto T, Mizuno D, Furukawa Y, Ida M, Takahashi E, Izumo T, Ono Y, Shibata H, Kido H. Oral administration of *Lactobacillus pentosus* strain S-PT84 enhances anti-influenza virus-specific IgG production in plasma after limited doses of influenza virus vaccination in mice. *J Vaccine Immunotechnology* (2015) 2(1):5.

- 2) Hiyoshi M, Indalao IL, Yano M, Takahashi E, Kido H. Influenza A virus infection of vascular endothelial cells induces GSK-3 β -mediated β -catenin degradation in adherens junctions, with a resultant increase in membrane permeability. Arch Virol (2015) 160(1): 225-234.

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

〈特許取得〉

1. 特許番号:特許第 5473899 号
登録日：平成 26 年 2 月 14 日
出願番号：特願 2010-505901
出願日：平成 21 年 3 月 30 日
発明の名称：合成ペプチドを含有する抗原薬物ビークルとこれを用いる粘膜ワクチン
発明者：木戸博、武井恒知、水野大

〈特許出願〉

なし

〈実用新案登録〉

なし

厚生労働科学研究委託費（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）
委託業務成果報告

分担研究報告書

SF-10アジュバントが適用可能な抗原の解明

研究分担者 木戸 博 （徳島大学疾患酵素学研究センター 特任教授）
研究協力者 堺 聡子 （徳島大学疾患酵素学研究センター 研究員）

研究要旨

SF-10 アジュバントは抗原運搬体として作用して、抗原を樹状細胞に効率良く運搬して免疫増強機能を発揮する。そのために、SF-10 アジュバントを構成する人工合成肺サーファクタント SSF の脂質膜に、抗原蛋白が結合する必要がある。結合できない抗原には、全くアジュバント効果を示さないため、如何に SSF と抗原蛋白を安定に結合させるかが重要である。本研究では、SSF と抗原との結合の可能性を検証する方法として、カロリメーターを用いた熱力学的分子間相互作用から、結合性を評価できることを明らかにした。典型的実施例として、肺炎球菌と SSF との結合性の検証データを示す。

A. 研究目的

本プロジェクトで用いる SF-10 アジュバントの主要な構成成分である人工合成アジュバント (SSF) は、ヒト肺サーファクタントの中からアジュバント活性に必要な成分として、dipalmytoyl phosphatidylcholine (DPPC)、Phosphatidyl glycerol (PG)、Phosphatidic acid (PA)、Surfactant protein C (SP-C) を同定し、強い疎水性のために工業生産が困難な SP-C に代わって K6L16 ペプチドを発明して、肺サーファクタントに類似した人工合成アジュバント SSF が完成している。さらに、SSF の鼻腔内の滞留効果を増強させるための増粘剤として Carboxy vinyl polymer (CVP) を加え、SF-10 が完成している。抗原は、図 1 に示すように SSF と結合して、樹状細胞に運ばれなければ抗原情報は免疫系に伝えることはできない。

本研究では、SSF と抗原との結合性を評価するシステムとして、分子間相互作用を熱力学的パラメータで測定する方法を検討した。

B. 研究方法

分子間相互作用を熱力学的パラメータで測定する測定機として、GE Healthcare の MicroCal iTC₂₀₀（等温滴定型カロリメーター）を用いて検討した。SSF は、これまでの報告した方法に順じて、dipalmytoyl phosphatidylcholine (DPPC)、Phosphatidyl glycerol (PG)、Phosphatidic acid (PA)、K6L16 ペプチドを混合して作成した。肺炎球菌は、ワクチン用に市販されている薬剤を購入して用いた。

（倫理面への配慮）

本研究においては、倫理的配慮は該当しな

い。

C. 研究結果

SF-10 アジュバントによる抗体誘導の増強効果は、SSF の脂質膜に抗原が結合して樹状細胞に運ばれて、粘膜 IgA と血液 IgG 誘導を引き起こすことから、SSF の脂質膜に抗原が結合しなくてはならない。SSF の脂質膜と抗原との結合をモニターする方法の検索と、今後に向けた SSF 結合抗原の検索を実施した。

これまでに SSF と結合して、抗体誘導を導くことがわかっている抗原に、RSV ウイルス膜たんぱく質抗原、食物アレルギーワクチン抗原として OVA を明らかにしている。ここでは新たに、肺炎球菌ワクチンの開発に使用できないかを検討した。結合条件の検索には、市販の肺炎球菌ポリサッカライド抗原を溶解し、SSF を加え相互作用をカロリメーターで測定した。図 2 に示す結果から、結合定数(K_d)、結合熱力学量(ΔH , ΔS , ΔG)、結合サイト数が計算できるため、最も結合し易い条件を検索できると推定している。

D. 考察

今回の実験では、分子間相互作用を熱力学的に解析することで結合性を検証したが、この結果が抗体誘導効果にどのように反映されるかについては未だ検証されていない。今後、動物実験による抗体誘導効果と熱力学的分子間相互作用の結果の摺り合わせを実施して、その有効性を検証する。

D. 結論

SF-10 アジュバントが適用可能な抗原のスクリーニングとその条件を、カロリメーターで検索できることを明らかにした。

E. 健康危険情報

なし。

F. 研究発表

<論文発表>

- 1) Maekawa T, Kimoto T, Mizuno D, Furukawa Y, Ida M, Takahashi E, Izumo T, Ono Y, Shibata H, Kido H. Oral administration of *Lactobacillus pentosus* strain S-PT84 enhances anti-influenza virus-specific IgG production in plasma after limited doses of influenza virus vaccination in mice. *J Vaccine Immunotechnology* (2015) 2(1):5.
- 2) Hiyoshi M, Indalao IL, Yano M, Takahashi E, Kido H. Influenza A virus infection of vascular endothelial cells induces GSK-3 β -mediated β -catenin degradation in adherens junctions, with a resultant increase in membrane permeability. *Arch Virol* (2015) 160(1): 225-234.
- 3) Pan HY, Sun HM, Xue LJ, pan M, Wang YP, Kido H, Zhu JH. Ectopic trypsin in the myocardium promotes dilated cardiomyopathy after influenza A virus infection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 307(6): H922-932, (2014)
- 4) Yamane K, Indalao IL, Chida J, Yamamoto Y, Hanawa M, Kido H. Diisopropylamine dichloroacetate, a novel pyruvate dehydrogenase kinase 4 inhibitor, as a potential therapeutic agent for metabolic disorders and multiorgan failure in severe influenza. *PLoS ONE* 9(5): e98032. (2014)
- 5) Horimukai K, Morita K, Narita M, Kondo M, Kitazawa H, Nozaki M, Shigematsu Y, Yoshida K, Niizeki H,

Motomura K, Sago H, Takimoto T, Inoue E, Kamemura N, Kido H, Hisatsune J, Sugai M, Murota H, Katayama I, Sasaki T, Amagai M, Motita H, Matsuda A, Matsumoto K, Saito H, Ohya Y.

<特許出願>

なし

Application of moisturizer to neonates prevents development of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 134(4): 824-830, (2014)

<実用新案登録>

なし

6) Yano M, Endo H, Okumura Y, Kido H. Ibuprofen enhances the anti-cancer activity of cisplatin in lung cancer cells by inhibiting the heat shock protein 70. *Cell Death Dis.* 5:e1027, (2014)

7) 木戸博 : 肺サーファクタントの新たな医学応用の可能性、粘膜アジュバントへの応用とワクチン開発 分子呼吸器病 (2014)18(1):171-175.

8) 木戸博 : インフルエンザ感染症における粘膜免疫の重要性 Annual Review 呼吸器 (2014) 24-29.

<学会発表>

1) 木戸博 : インフルエンザ粘膜ワクチン開発の現状. 第88回日本感染症学会学術講演会、第62回日本化学療法学会総会 合同学会 福岡 2014.6.18-20.

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

<特許取得>

1. 特許番号:特許第 5473899 号

登録日:平成 26 年 2 月 14 日

出願番号:特願 2010-505901

出願日:平成 21 年 3 月 30 日

発明の名称:合成ペプチドを含有する抗原薬物ビークルとこれを用いる粘膜ワクチン

発明者:木戸博、武井恒知、水野大

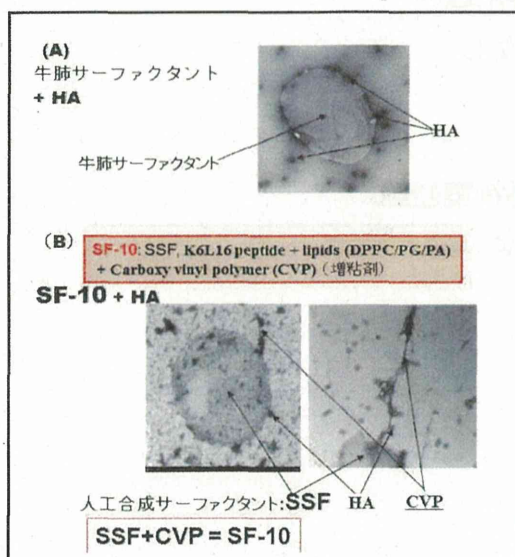


図 1. 肺サーファクタント、SSF と HA との複合体の電顕像

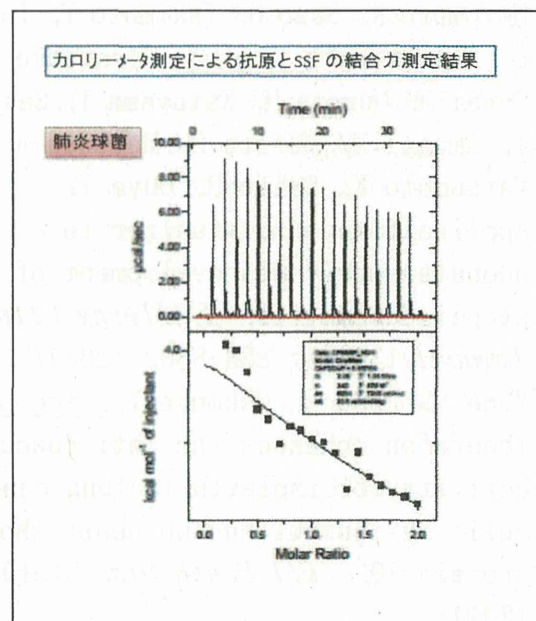


図 2. カロリメーターによる抗原とSSFとの結合力測定 (肺炎球菌の場合)

Ⅲ. 学会等発表実績

様式第 19

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「乳幼児に適用可能な安全性と有効性の高いSF-10アジュバントによるインフルエンザ・RSV感染防御免疫誘導に関する研究」

機関名 国立大学法人 徳島大学

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
インフルエンザ粘膜ワクチン開発の現状 口頭	木戸博	第88回日本感染症学術学会学術講演会、第62回日本化学療法学会総会合同学会 福岡	2014.6.18-20.	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所（学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
Oral administration of Lactobacillus pentosus strain S-PT84 enhances anti-influenza virus-specific IgG production in plasma after limited doses of influenza virus vaccination in mice.	Maekawa T, Kimoto T, Mizuno D, Furukawa Y, Ida M, Takahashi E, Izumo T, Ono Y, Shibata H, Kido H.	J Vaccine Immunotechnology (2015) 2(1):5.	2015, January	国外
Influenza A virus infection of vascular endothelial cells induces GSK-3 β -mediated β -catenin degradation in adherens junctions, with a resultant increase in membrane permeability.	Hiyoshi M, Indalao IL, Yano M, Takahashi E, Kido H.	Arch Virol (2015) 160(1): 225-234.	2015, January	国外
Ectopic trypsin in the myocardium promotes dilated cardiomyopathy after influenza A virus infection.	Pan HY, Sun HM, Xue LJ, pan M, Wang YP, Kido H, Zhu JH.	Am J Physiol Heart Circ Physiol (2014) 307(6): H922-932	2014 September	国外
Diisopropylamine dichloroacetate, a novel pyruvate dehydrogenase kinase 4 inhibitor, as a potential therapeutic agent for metabolic disorders and multiorgan failure in severe influenza.	Yamane K, Indalao IL, Chida J, Yamamoto Y, Hanawa M, Kido H.	PLoS ONE (2014) 9(5): e98032.	2014, May	国外
Application of moisturizer to neonates prevents development of atopic dermatitis.	Horimukai K, Morita K, Narita M, Kondo M, Kitazawa H, Nozaki M, Shigematsu Y, Yoshida K, Niizeki H, Motomura K, Sago H, Takimoto T, Inoue E, Kamemura N, Kido H, Hisatsune J, Sugai M, Murota H, Katayama I, Sasaki T, Amagai M, Motita H, Matsuda A, Matsumoto K, Saito H, Ohya Y.	J Allergy Clin Immunol 134(4): 824-830, (2014)	2014, October	国外
Ibuprofen enhances the anti-cancer activity of cisplatin in lung cancer cells by inhibiting the heat shock protein 70.	Yano M, Endo H, Okumura Y, Kido H.	Cell Death Dis. 5:e1027, (2014)	2014, January	国外
肺サーファクタントの新たな医学応用の可能性、粘膜アジュバントへの応用とワクチン開発	木戸博	分子呼吸器病 (2014)18(1):171-175	2014, January	国内
インフルエンザ感染症における粘膜免疫の重要性	木戸博	Annual Review 呼吸器 (2014) 24-29.	2014, January	国内

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Oral Administration of *Lactobacillus pentosus* Strain S-PT84 Enhances Anti-Influenza Virus-Specific IgG Production in Plasma after Limited Dose of Influenza Virus Vaccination in Mice

Keywords: Influenza vaccine; *Lactobacillus pentosus* strain S-PT84; Adjuvant effect; IgG; IgA

Abstract

Background: It has been reported that various *Lactobacillus* species enhance antigen-specific antibody production after viral infection and/or vaccination in animals and humans. In this study, the effect of oral administration of *Lactobacillus pentosus* strain S-PT84 on subcutaneous administration of limited dose of 2.5 ng of influenza A virus (IAV) (H1N1) split hemagglutinin (HA) vaccine was studied in mice.

Methods: Seven-week-old BALB/c female mice were fed the AIN-93M diet with or without 0.186% S-PT84 for 6 weeks ad libitum and then given subcutaneous injection of IAV/California/7/2009 (H1N1) HA vaccine at doses of 2.5–15.0 ng/mice and boosted on day 28. Two weeks after the last vaccination, the mice were sacrificed under anesthesia, and the amount of anti-HA-specific IgG in plasma was measured by ELISA.

Results: The levels of anti-HA-specific IgG in plasma were significantly higher in the S-PT84 group than in the control group without S-PT84 treatment. Anti-HA-specific IgA levels in nasal washes were under the detection level in both groups.

Conclusion: Oral administration of S-PT84 enhanced the production of HA-specific IgG antibody in plasma after subcutaneous vaccination, even at the limited dose of 2.5 ng of IAV (H1N1) HA in mice, suggesting that S-PT84 has a potent adjuvant activity against IAV HA.

Introduction

Influenza is an acute viral infection that results in high morbidity and significant mortality, particularly in infants and the elderly populations [1]. They sometimes have a high risk of fatal influenza pneumonia and thus vaccination is recommended for prevention. The World Health Organization has recommended use of oseltamivir (Tamiflu, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd, Tokyo, Japan) and zanamivir (Relenza, Glaxo Smith Kline K.K., Tokyo, Japan) for the treatment of influenza. These antiviral neuraminidase inhibitors are useful options for seasonal influenza infections in the world [2]. However, Shinahara et al. recently reported that administration of these inhibitors decreases anti-IAV HA-specific IgG and IgA production in plasma and nasopharyngeal secretions, probably



Toshihiro Maekawa^{1*}, Takashi Kimoto², Dai Mizuno³, Yuichi Furukawa¹, Masayuki Ida¹, Etsuhisa Takahashi⁴, Takayuki Izumo¹, Yoshiko Ono¹, Hiroshi Shibata¹ and Hiroshi Kido⁴

¹Institute for Health Care Science, Suntory Wellness Limited, Mishima-gun, Osaka, Japan

²Department of Hygienic Sciences, Kobe Pharmaceutical University, Hyogo, Japan

³Department of Bio Analytical Chemistry, Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Musashino University, Nishitokyo-shi, Tokyo, Japan

⁴Division of Enzyme Chemistry, Institute for Enzyme Research, The University of Tokushima, Tokushima, Japan

Address for Correspondence

Toshihiro Maekawa, Institute for Health Care Science, Suntory Wellness Limited, 1-1-1 Wakayama-dai, Shimamoto-cho, Mishima-gun, Osaka 618-8503, Japan, Tel: +81-75-962-6207; Fax: +81-75-962-1690; E-mail: Toshihiro_Maekawa@suntory.co.jp

Submission: 27 November 2014

Accepted: 23 December 2014

Published: 29 December 2014

Reviewed & Approved by: Dr. Sherven Sharma, Professor of Medicine, David Geffen School of Medicine, University of California, USA

because of inhibition of viral replication and limited production of viral antigens [3]. The limited viral antigens do not induce sufficient acquired immunity in patients treated with anti-viral neuraminidase inhibitors, resulting in a high frequency of influenza virus re-infection in the subsequent year [3].

Lactic acid bacteria (LAB) are widely used as a health food ingredient and could modulate mucosal and systemic immune responses [4,5]. Oral administration of live *Lactobacillus casei* Shirota significantly increases the survival rate of neonatal and infant mice infected with IAV by stimulating IL-12 production and NK activity in the lung [6]. Oral administration of heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 [7] and *Lactobacillus pentosus* strain b240 [8] enhances type I interferon production and increases the production of anti-IAV IgG in plasma and IgA in bronchoalveolar lavage fluid, respectively, and prolongs the survival period of mice infected with IAV. These studies showed that oral administration of live and nonviable *Lactobacillus* species enhances the protective effects against airway infection of IAV.

It has recently been reported that oral administration of probiotic LAB enhances vaccination-induced antibody production. *Lactobacillus acidophilus* enhances rotavirus-specific antibody after vaccination of rotavirus in the neonatal gnotobiotic pig [9]. Davidson et al. reported that volunteers receiving *Lactobacillus* GG show higher protective titers after administration of live attenuated IAV/H3N2 vaccine compared to a placebo group after vaccination [10]. Moreover, Boge et al. reported that daily consumption of a probiotic drink increases relevant specific antibody responses to influenza

vaccination in healthy volunteers over 70 years of age [11]. Therefore oral administration of *Lactobacillus* species might be effective in preventing influenza virus infection by stimulating antibody production.

We previously reported that *Lactobacillus pentosus* strain S-PT84 enhances splenic natural killer (NK) activity and exhibits anti-allergic effects by modulating T-helper1/T-helper2 (Th1/Th2) balance [12]. Moreover, it has been reported that oral administration of S-PT84 enhances interferon- α production from plasmacytoid dendritic cells against an insufficient dose of hemagglutinating virus of Japan (HVJ) infection [13], and that intranasal administration of S-PT84 protects against influenza infection [14]. However, the effects of S-PT84 ingestion on limited dose of IAV HA vaccination and HA-specific antibody induction have not yet been examined. In this study, the effect of oral administration of S-PT84 on the induction of IAV HA-specific antibody in mice immunized by IAV HA vaccine in the nanogram range was investigated.

Materials and Methods

Animals

BALB/c female mice, 7 weeks old, were obtained from Japan SLC, Inc. (Shizuoka, Japan). Mice were housed and fed a commercial diet (CE-2) and tap water ad libitum for 1 week at 25 ± 1 °C and $60\% \pm 5\%$ humidity under a 12 h light-dark cycle before experimentation. Experiments were performed according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication No. 85-23, 1996).

Bacterial strains and bacteria preparation

S-PT84 was isolated from Kyoto pickles "SHIBAZUKE" [12] and was cultivated in a medium containing glucose and yeast extract (Aromild™, SK yeast extract Hi-K) at 37 °C for 24 hours. Cultured bacteria were collected by centrifugation at $9,190 \times g$ for 5 min, washed twice with sterile saline and once with distilled water, and heat-killed at 95 °C for 5 min. Heat-killed S-PT84 was lyophilized for use in the experiments.

Vaccine

The influenza antigen used in the present studies, IAV/California/7/2009(H1N1) virus processed for HA vaccine (split-product, 0.636 μ g protein/0.341 μ g HA/mL), was purchased from DENKA SEIKEN Co., Ltd. (Tokyo, Japan).

Procedure and sample collection

BALB/c mice were fed on a commercial diet (AIN-93M, Oriental Yeast Co. Ltd., Tokyo, Japan) with or without 0.186% S-PT84 and tap water ad libitum for 6 weeks. Mice were given subcutaneous vaccinations (2.5–15.0 ng HA/100 μ L) and boosted on day 28. Two weeks after the last vaccination, the mice were sacrificed under anesthesia. Blood samples were collected from the vein. Blood was centrifuged (2,500 g, 10 min) at 4 °C, and the supernatant was collected.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Anti-influenza HA-specific antibodies in plasma were measured by ELISA [15]. Briefly, 96-well plates (Nunc, Naperville, IL) were coated with HA vaccine and bovine serum albumin (BSA, 0.1 μ g/well

each) in PBS overnight at 4 °C. After the pre-coating, it was blocked with 1% BSA in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 0.14 M NaCl and 0.05% Tween 20 (TTS) for 1 hour at room temperature. The plasma diluted with TTS containing 1% BSA was added to each well and incubated for 3 hours at room temperature. The plate was washed six times with TTS containing 1% BSA and incubated with goat anti-mouse IgG antibodies conjugated with horseradish peroxidase (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA) for 2 hours at room temperature. Color was developed by the addition of TMB substrate (Bethyl Laboratories), according to the instructions provided by the manufacturer. The chromogen produced was measured at 450 nm using a SPECTRA max PLUS384 AutoReader (Molecular Devices, Tokyo, Japan). Antibody titers were defined as the reciprocal of the highest dilution of sample for which the optical density (OD) was at least twice the OD of the negative control samples before vaccination.

Statistical analysis

The significance of differences in values between the control group and S-PT84 group was determined using Student's t-test. P-values less than 0.05 were considered significant.

Results

Doses of vaccination of IAV/California/7/2009(H1N1)

The induced levels of HA-specific IgG antibody in plasma were analyzed to detect the optimal dose of IAV/California/7/2009(H1N1) to evaluate the effect of *Lactobacillus pentosus* S-PT84 as an adjuvant. HA-specific IgG antibody in plasma was increased by IAV HA vaccination in a dose-dependent manner in the range between 2.5 and 15.0 ng (Figure 1). HA at 2.5 ng, even at the lowest dosage, could induce production of HA-specific IgG in plasma, and that dose may be appropriate for examining the effect of LAB on enhancing HA-specific IgG production in plasma. Therefore, the minimal dose of 2.5 ng HA was used to investigate the adjuvant effect of LAB.

Effect of *Lactobacillus pentosus* S-PT84 on the production of HA-specific IgG in plasma

Mice were fed the AIN-93M diet with or without 0.186% S-PT84 for 6 weeks. In the control group treated with two subcutaneous injections of IAV HA at 2.5 ng alone, a small amount of antigen-specific IgG antibody production was detected in plasma. The S-PT84 group of mice treated with continuous feeding of the AIN-93M diet with 0.186% S-PT84 during the experimental period also received two subcutaneous injections of IAV HA at 2.5 ng. HA-specific IgG antibody levels in plasma were higher in the S-PT84 group than in the control group (Figure 2A). On the other hand, HA-specific IgA in nasal washes was under detection levels in both groups (data not shown). The induced HA-specific IgG titers in plasma were significantly higher in the S-PT84 group than in the control group ($p=0.007$) (Figure 2B).

Discussion

In this study, oral administration of S-PT84 enhanced HA-specific IgG induction in plasma, but not HA-specific IgA induction in nasal wash, after subcutaneous administration of limited dose of IAV (H1N1) HA in mice. The findings suggest that S-PT84 has an adjuvant effect against IAV HA on plasma IgG induction, even at minimal dose. Nonaka et al. reported that S-PT84 induces cytokine