

**厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業**

経鼻ワクチンの挙動と安全性評価技術の開発

平成26年度 研究報告書

研究代表者 幸 義和

平成27(2015年)5月

目 次

. 構成員名簿	1
. 統括研究報告	
経鼻ワクチンの挙動と安全性評価技術の開発 研究代表者 幸 義和	2
インフルエンザ経鼻ワクチンの体内動態評価に関する研究 - 不活化全粒子インフルエンザワクチン PET プローブ精製の条件検討 - 研究分担者 長谷川 秀樹	8
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	15
. 研究成果に関する一覧	18
. 研究成果の刊行物・別刷(主要なもの)	21

. 構成員名簿

. 統括研究報告

. 研究成果の刊行に関する一覧表

**・ 研究成果の刊行物・別冊
(主要なもの)**

経鼻ワクチンの挙動と安全性評価技術の開発

研究代表者： 幸 義和（東京大学医科学研究所 炎症免疫分野）

協力研究者： 原田典弘（浜松ホトニクス株式会社 中央研究所 PET センター）

片貝祐子（予防衛生協会 研究支援企画部）

福山賀子（東京大学医科学研究所 炎症免疫分野）

研究要旨： 経鼻ワクチンは上気道感染症病原体であるウイルス、細菌の防御免疫を誘導するもっとも有効な方法の一つであるが、スイスでの不活化インフルエンザワクチンとアジュバントである大腸菌易熱性毒素(LT)の同時経鼻投与で、一部の被験者に現れた顔面麻痺による中枢神経系への影響が問題になった。加えて、毒素系アジュバントの嗅覚神経系への影響、嗅球への沈着がマウスで知られており、経鼻ワクチンの開発にはワクチン効果のほかに、ヒトに近い霊長類での安全性評価の試験方法の確立が急務となっている。本研究課題では、ナノゲル P s p A 肺炎球菌経鼻ワクチンのサルでのワクチン投与において誘導された免疫応答と防御効果と並びに安全性を評価するために PET を用いてワクチンの動態を明らかにすることを目標とする。今年度は ^{18}F 標識を行った経鼻肺炎球菌ワクチンを使用して、アカゲザルを用いたモデル実験を実施した。

A. 研究目的

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ている。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、さらに、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。実際に、CHP にアミノ基を 100 単糖あたり 10-20 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 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 (Nat. Mater. 9: 572-578, 2010)。このナノゲル型経鼻ワクチンデリバリーシステムを肺炎球菌の P s P A 抗原を用いた経鼻ワクチンに応用することで、マウスのみならず、サルでも防御免疫を誘導できるこ

とを昨年までに報告した。

さてこのようなワクチン効果の以外に、経鼻ワクチンの場合には特に開発において候補ワクチン及びアジュバント又はデリバリーシステムにおいてワクチンまたはアジュバント自身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%を覆っているのにたいして、ヒトを含む霊長類のそれは10%未満である。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 ^{125}I や ^{111}In 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。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。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。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。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。我々は最近、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、 ^{18}F -BoHcの合成、経鼻投与されたマウスで全身PET解析、及び ^{18}F -BoHcを用いたサルでのBoHc経鼻ワクチンの脳内移行否定試験法を開発した(J. Immunol. 185: 5436-5443, 2010)。

そこで、昨年までにワクチン抗原であるPspAを ^{18}F 標識したPETを開発しマウスを用いてADME試験を行ったので、今年サルを用いてPspA PET試験を行ったので報告する。

B. 研究方法

1) 材料

肺炎球菌ワクチンは東大医科研で、肺炎球菌の表面抗原の大腸菌発現組換えPspAを高純度に精製して用いた。

CHPにアミノ基を100単糖あたり20個程度導入したカチオン性CHP(cCHP)は京大工学部秋吉研究室で合成された。

2) 物性

ナノゲル化PspAの物性は、2重蛍光標識して、FRET解析、大きさ(DH解析)、荷電(Zeta-potential)で評価した。

3) PspA ワクチンの ^{18}F 標識

浜松ホトニクス社の協力を得て、昨年度報告した方法で肺炎球菌の組換えのアミノ基(^{18}F -Lys)を介して ^{18}F -PspAを合成した。

4) PET を用いたサルにおける ^{18}F 標識ワクチンの動態解析

上述 2)の手順で回収された ^{18}F 標識 PspA を cCHP (20mg/ml) で、PspA:cCHP = 1:5 モル比で、ナノゲル化 (45C、30分) したものの、及び ^{18}F -PspA をアカゲザルの鼻腔領域内に投与 (片鼻 250 μl 、両鼻で計 500 μl)、接種直後より PET を用いてその動態を解析した。ナノゲル用いたアカゲザル 3 頭は浜松ホトニクス株式会社により飼育されているサルを用いた。動物への処置は国立感染症研究所および浜松ホトニクス株式会社の定める動物実験実施規定に則り、苦痛を与えないように考慮した。

C. 研究結果

1. ナノゲル PspA 物性

Fluorescence resonance energy transfer (FRET) は二重蛍光標識したナノゲル PspA にのみ観測され、FITC 標識した PspA またはローダミン標識したナノゲル自身には観測されなかった (図 1)。

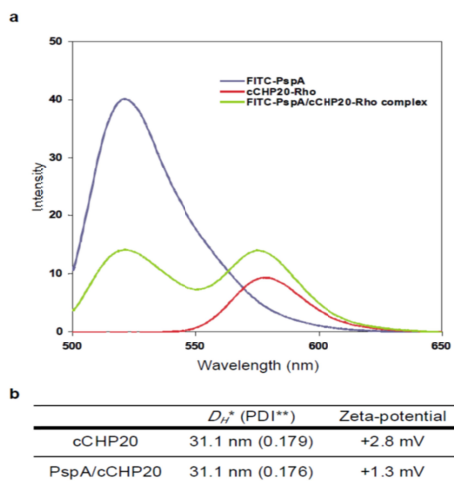


図 1. ナノゲル PspA の FRET (a) と大きさ と荷電

Dynamic light scattering 解析は PspA を被覆した後も、していないものもナノゲルは単一の形態の直径 31.1 nm の大きさを維持していた (図 1 表)。zeta-potential で測定したナノゲル及びナノゲル PspA の荷電は +2.8mV 及び +1.3 mV で陽電荷をもち大きな変化はなかった。

2. ナノゲル PspA PET 解析

3 頭のアカゲザルを用いて、同一のアカゲザルに 1 週間以上空けて交互に ^{18}F -PspA または ^{18}F -PspA を経鼻投与して頭部 PET 解析を実施した。3 頭ともほぼ同一の結果が得られたので、ここでは代表的な 1 頭の頭部 PET 及び MRI データを示す (図 2)。

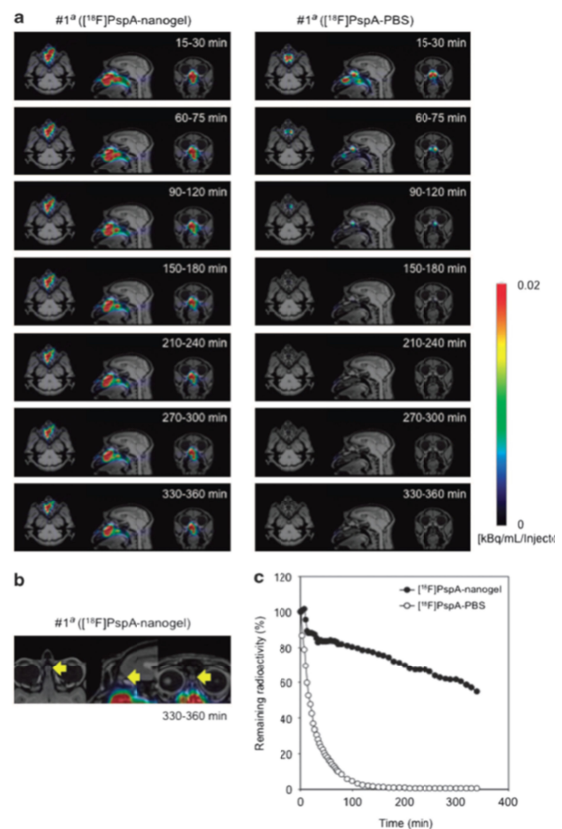


図 2. ナノゲル PspA の PET 解析 頭部(a,c)と嗅球(b)

サル頭部のPET スキャナーの中に置かれ、6時間 real-time で測定された。脳の正確な位置を確認するため MRI イメージングを重ねた。real-timePET は経鼻投与されたナノゲル PspA は効果的に鼻腔上皮にデリバリーされ、6時間以上にわたって、鼻腔上皮に滞留した。一方、ナノゲル化されていない PspA は経鼻投与後3時間以内に鼻腔内から消失された。その上、ナノゲル PspA 経鼻投与において、脳及び嗅球への PspA の沈着は6時間後でも認められなかった。これらの結果は、ナノゲル PspA はサルに於いても脳神経系への安全性の評価に問題は見つからなかった。

D. 考察

ナノゲルそれ自身は抗原性のない物質で、中性のナノゲルは注射用ガンワクチン(例: Her2)として GMP レベルで製造可能である。ここで我々は経鼻ワクチンとして、カチオン性ナノゲルを用いて、肺炎球菌ワクチン抗原 PspA をナノゲル化して、その物性を FRET (fluorescence resonance energy transfer) や DSL (dynamic light scattering) を用いて解析し、その品質的均一性を証明した。またナノゲル PspA のもつ positive zeta-potential は、PET/MRI により、PspA 単独に比して、効果的に鼻腔上皮に吸着し、長時間保持できることを in vivo 試験において証明することができた。この結果は、カチオン化ナノゲルの経鼻ワクチンデリバリーとして有効であることを示した。実際、経鼻ナノゲル化ワクチンはマウスの実験において、鼻腔上皮細胞に保持され、endocytosis により、上

皮細胞から取り込まれて、細胞内で、ナノゲルのもつシャペロン活性によりナノゲルからワクチンが native な形で放出され、exocytosis にて上皮細胞から基底膜下に達して、樹状細胞に取り込まれることが証明されている。

経鼻ワクチンの最近の研究では、ワクチン抗原または同時に投与されたアジュバントが嗅球を経由して嗅覚上皮から脳へ移行する可能性が議論されている。この研究では経鼻投与されたナノゲル ^{18}F -PspA は、投与6時間では嗅球、脳への移行がないことがサルにおいて証明された。我々は以前の研究でサルにおいて CTB/CT は投与6時間で嗅球へ移行することを PET 研究で証明しており、PET での ^{18}F の感度限界は 0.05 SUV 以下であることを確認している (J. Immunol. 185: 5436 2010)。それ故、今回の我々の結果は PspA 経鼻ワクチンに用いられるナノゲルデリバリーシステムはマウスのみならず、サルのような高等動物においても、中枢神経系への移行、沈着はなく、安全な経鼻デリバリーシステムであることを示している。

E. 結論

サルに於いて、我々は、昨年経鼻投与されたナノゲル PspA は全身系のみならず、粘膜免疫系においても効果的に肺炎球菌の防御免疫を誘導できることを証明したが、本年度は脳神経系への PspA の輸送・沈着もないことを証明した。この結果は、経鼻 PspA ワクチンの効果と安全性をサルで確認した最初の報告であり、ナノゲル PspA ワクチンのヒトへの試

験を期待できる結果である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) D. Tokuhara, T. Nochi, A. matsumura, M. mejima, Y. Takahashi, S. Kurokawa, H. Kiyono, Y. Yuki*: Specific Expression of Apolipoprotein A-IV in the Follicle-Associated Epithelium of the Small Intestine *Dig. Dis. Sci.* 59: 2682-2692 (2014).
- 2) T. Azegami, Y. Yuki, H. Kiyono: Challenges in Mucosal Vaccines for the Control of Infectious Diseases. *Int. Immunol* 26:517-526 (2014)
- 3) M. Mejima, K. Kashima, M. Kuroda, N. Takeyama, S. Kurokawa, Y. Fukuyama, H. Kiyono, K. Itoh, T. Mitsui, Y. Yuki*: Development of selection marker-free rice-based oral cholera toxin B-subunit vaccine and characterization of location and structure of transgene by using whole genome resequencing analysis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 120: 35-48 (2015)
- 4) K. Kashima, M. Mejima, S. Kurokawa, M. Kuroda, H. Kiyono, Y. Yuki*. Comparative whole-genome analyses of selection marker-free rice-based cholera toxin B-subunit vaccine lines

with wild-type lines. *BMC Genomics* 16:48 (2015)

- 5) Y. Fukuyama, Y. Yuki*, Y. Katakai, N. Harada, H. Takahashi, S. Takeda, M. Mejima, S. Joo, S. Kurokawa, S. Sawada, H. Shibata, EJ. Park, K. Fujihashi, D. Briles, Y. Yasutomi, H. Tsukada, K. Akiyoshi, H. Kiyono: Nanogel-based pneumococcal surface protein A nasal vaccine induces microRNA-associated Th17 cell responses with neutralizing antibodies against *Streptococcus pneumoniae* in macaques. *Mucosal Immunol.* 63: 87-99 (2015)
 - 6) T. Azegami, H. Itoh, H. Kiyono, Y. Yuki*: A Novel Transgenic Rice-based Vaccine: *Arch. Immunol. Ther. Ex.* in press doi: 10.1007/s00005-014-0303-0 (2015)
 - 7) 鹿島光司、幸 義和、清野 宏 : 次世代ワクチン開発への課題と挑戦 経口ワクチンー Bio Industry 31:4-10 (2014)
 - 8) 幸 義和 : 注射剤・経口製剤に代る新しい薬剤投与デバイスの開発 「経鼻ワクチンのマウス・サルにおける分子イメージング」(技術情報協会) 145-149 (2014)
 - 9) 福山賀子、幸 義和 : 粘膜ワクチンの現状 経鼻ワクチンを中心に 医学のあゆみ 253:15033-15038 (2015)
- ### 2. 学会発表
- 1) Yoshikazu Yuki, Mio Mejima, Koji Kashima, Masaharu Kuroda, Toshiaki

- Mitsui, Hiroshi Kiyono: Establishment of selection marker-free rice-based oral cholera toxin B-subunit vaccine and characterization of location and structure of transgene by using whole genome resequencing analysis. International Association for Plant Biotechnology Congress 2014 (Melbourne, Australia)
- 2) Koji Kashima, Mio Mejima, Masaharu Kuroda, Hiroshi Kiyono and Yoshikazu Yuki: Whole genome analysis of selection marker-free MucoRice-CTB, a rice-based oral cholera vaccine. International Association for Plant Biotechnology Congress 2014 (Melbourne, Australia)
 - 3) 鹿島光司、目島未央、黒田昌治、竹山夏実、黒河志保、福山賀子、清野 宏、幸 義和: 次世代シーケンサーを用いたマーカーフリーコメ型経口ワクチン MucoRice-CTB の複数系統及び野生型の変異解析及び比較 日本農芸化学会 東京 (2014)
 - 4) 目島未央、鹿島光司、黒田昌治、竹山夏実、黒河志保、福山賀子、清野 宏、三ツ井敏明、幸 義和 コメ型経口ワクチン Marker Free MucoRice-CTB のイネゲノム導入部位と導入配列について 日本農芸化学会 東京 (2014)
 - 5) 幸 義和、清野宏: アジュバントフリーナノゲル型肺炎球菌経鼻ワクチンのサルでの免疫効果と安全性 日本ワクチン学会 福岡 (2014)
 - 6) J. Sunyi, Y. Fukuyama, Y. Yuki, Y. Kurashima, SF. Ziegler, EJ. Park, H. Kiyono: Critical role of TSLP-TSLPR interaction in inducing secretory IgA responses after mucosal immunization 日本免疫学会 京都 (2014)

H. 知的財産権の出願、登録状況

- 1) K. Akiyoshi, H. Kiyono, Y. Yuki, T. Nochi: Mucosal vaccine using cationic nanogel 2015年2月24日登録 米国特許 # 8961983

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

平成 26 年度 分担者研究報告書

インフルエンザ経鼻ワクチンの体内動態評価

分担研究者：長谷川秀樹（国立感染症研究所 感染病理部）

協力研究者：原田典弘（浜松ホトニクス株式会社 中央研究所 PET センター）

相内 章（国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター）

鈴木忠樹（国立感染症研究所 感染病理部）

齊藤慎二（国立感染症研究所 感染病理部）

研究要旨： 現行のインフルエンザ HA ワクチンは皮下接種されるため、全身性の IgG 抗体を誘導できるが、インフルエンザウイルスの侵入部位である気道に粘膜免疫を誘導できない。インフルエンザウイルスの感染防御には、粘膜免疫の中でも上気道粘膜上へ分泌型 IgA 抗体の誘導が特に有効であることが、マウスを用いたモデル実験等で明らかにされている。この粘膜免疫は、インフルエンザワクチンを鼻腔領域内に噴霧する経鼻インフルエンザワクチンにより効率的に誘導される。我々は、経鼻不活化インフルエンザワクチンの実用化に向けた研究を行っているが、経鼻インフルエンザワクチンの実用化を考えた場合、ワクチン接種により誘導される抗体応答の評価と共に、その安全性を証明する必要がある。本研究課題では、経鼻インフルエンザワクチンの安全性を評価するために PET を用いて噴霧したワクチンの動態を明らかにすることを目標とする。今年度は 18F 標識を行った経鼻インフルエンザワクチンを使用して、アカゲザル及びマウスを用いたモデル実験を実施した。

A. 研究目的

インフルエンザの流行を抑制するには効果的なワクチンが必要不可欠である。しかしながら、変異を繰り返し毎年のように抗原性を变化させるインフルエンザウイルスにおいては、ワクチン株と実際に流行するウイルス株の抗原性が大きく乖離することで、ワクチン効果が著しく低くなる事が知られている。そのため、現行のワクチンより有効性の高いインフルエンザワクチンの開発ニーズは高い。

有効性の高いワクチンを開発するためには、生体内におけるインフルエンザウイルスの感染様式と感染防御に寄与する免疫を正しく理解する必要がある。インフルエンザウイルス感染の標的細胞は気道粘膜上皮細胞であり、感染防御に最も寄与するのは気道粘膜上に多量に存在する分泌型 IgA 抗体であると考えられている。注射により皮下に接種される現行の季節性インフルエンザ HA ワクチン（エーテルおよび界面活性剤処理によりインフルエン

ザウイルスを破碎し、ヘマグルチニンを主要抗原とするワクチン)では、血液中にウイルスに対する IgG 抗体のみが誘導され、分泌型 IgA 抗体の誘導は認められない。経鼻インフルエンザワクチンは、血液中の IgG 抗体に加えて感染の場となる上気道粘膜上に分泌型 IgA 抗体を誘導することが明らかになっている。さらにこの分泌型 IgA 抗体は、抗原性が変化したウイルスに対しても感染防御効果が高いこと(交叉防御能)がマウスを用いた実験から明らかになっており、経鼻インフルエンザワクチンは現行のワクチンより有効性の高いワクチンであると期待される。

我々は、不活化全粒子インフルエンザウイルスを抗原とした経鼻インフルエンザワクチンの開発研究を行っている。近年では、健康成人ボランティアを募った臨床試験を実施し、経鼻不活化インフルエンザワクチンの実用化に向けて着実に研究を進めている。現在までの所、動物やヒトにおいてワクチン接種に伴う重大な副反応は見られておらず、このワクチンの安全性も高いと考えられる。しかしながら、多人数に接種されて初めて露見する副反応を事前に適切に評価することは非常に困難である。また、これまでにヒトで認可された経鼻噴霧により接種される不活化ワクチンは存在しないことから、この投与経路における安全性評価の指標も存在しない。一般的に医薬品の安全性を評価する上で、薬物体内動態を研究することは非常に重要である。本研究では経鼻不活化ワクチンの安全性評価の基礎を築くために PET 検査用に放射性同位体で標識したワクチン製剤をマウス及びサルに経

鼻投与し、その体内動態を科学的に明らかにすることを目的としている。本年度は、18F 標識を行った経鼻インフルエンザワクチンを使用して、アカゲザル及びマウスを用いたモデル実験を実施した。同時に、臨床試験に用いている添加剤カルボキシビニルポリマー(CVP)のワクチン製剤への影響も検討した。

B. 研究方法

1) 材料

不活化全粒子インフルエンザワクチンは、一般財団法人阪大微生物病研究会観音寺研究所より供与して頂いた濃縮単身不活化全粒子インフルエンザワクチン X-179A を用いた。なお、濃縮単身不活化全粒子ワクチン X179-A の HA 濃度は、1500 μg HA/mL である。

2) ワクチンの 18F 標識

不活化全粒子インフルエンザワクチンを 18F 標識するための、[18F]SFB 標識体の合成を行った。その後、不活化ワクチンとのカップリング反応を行い、18F 標識を行った。標識された不活化ワクチンは、FPLC クロマトグラフィーシステム AKTAprime plus によりゲルろ過クロマトグラフィー精製を実施した。サンプルを 0.45 μm フィルターでろ過することにより清澄化を行った。500 μl のサンプルを溶出バッファー(0.01M リン酸バッファー pH7.4)で平衡化したゲルろ過クロマトグラフィーカラム(Superose 12 10/300 GL, GE)にアプライし、さらに 36ml の溶出バッファーを送液し、溶出液を 0.5ml ずつ分取し、未反応の[18F]SFB 標識体を除去した標識ワクチンを void volume

に回収した。全ての送液は 0.5ml/min で行った。

3) PET 及び カウンターを用いたマウスにおける 18F 標識ワクチンの動態解析

上述 2)の手順で回収された 18F 標識不活化全粒子インフルエンザワクチンを CVP 添加・非添加の条件にてマウス鼻腔領域内に滴加し（片鼻 2.5 域内、両鼻で計 5 両鼻）接種直後より小型動物用 PET によりその動態を継時的に測定し解析を行った。また、接種したマウスの解剖を継時的に行い、摘出した各臓器の放射線量を カウンターにより測定した。マウスは 6 週齢の雌 BALB/c マウスを用いた。動物への処置は国立感染症研究所および浜松ホトニクス株式会社の定める動物実験実施規定に則り、苦痛を与えないように考慮した。

4) PET を用いたアカゲザルにおける 18F 標識ワクチンの動態解析

上述 2)の手順で回収された 18F 標識不活化全粒子インフルエンザワクチンを CVP 添加・非添加の条件にてアカゲザルの鼻腔領域内に噴霧し（片鼻 250 μ l、両鼻で計 500 μ l）接種直後より PET を用いてその動態を解析した。アカゲザルは浜松ホトニクス株式会社により飼育されているサルを用いた。動物への処置は国立感染症研究所および浜松ホトニクス株式会社の定める動物実験実施規定に則り、苦痛を与えないように考慮した。

C. 研究結果

昨年度の検討において、Superose 12 10/300 GL を用いたゲルろ過クロマトグラフィーを実

施することにより、効率的に[18F]標識された実験用全粒子不活化インフルエンザワクチンを精製できることを明らかにしている。今年度は実際に、マウス及びサルにおいて[18F]標識全粒子不活化インフルエンザワクチンの動態解析を行った。

最初に、マウスにおいて[18F]標識全粒子不活化インフルエンザワクチンの動態解析及び CVP の添加による影響の評価を実施した。PET を用いた動態解析はワクチン接種後 6 時間までデータを採取した。ワクチンは接種 10 分後において鼻腔、咽頭及び胃で、1 時間以降 6 時間まで、鼻腔、腸及び膀胱で検出された。鼻腔及び腸におけるシグナルは時間と共に減衰した。測定時間内においては肺で検出されることはなかった。また、CVP 非添加と比較して CVP 添加ワクチンは 6 時間後において鼻腔で高いシグナルが確認された。カウンターを用いた動態解析（図 1）では、鼻腔、NALT、尿において強いシグナルが検出された。鼻腔及び NALT では接種直後の 10 分をピークとし、経時的に減少した。一方、尿では接種後 3 時間まではシグナルが増加し、その後減少に転じた。嗅球及び大脳において、シグナルは確認できなかった。また、CVP 非添加ワクチンと比較して CVP 添加ワクチンは経時的なシグナル減少が遅くなった。

次に、アカゲザルにおいて[18F]標識全粒子不活化インフルエンザワクチンの動態解析及び CVP の添加による影響の評価を実施した。PET を用いた動態解析は、マウスと同様にワクチン接種後 6 時間までデータを採取した。ヒトに近縁の霊長類において、鼻腔内に存在す

るワクチンの経時的変化を観察できた。マウスと同様に、経時的にシグナルは減少するが、CVP の添加によりその減少は抑えられた。CVP の有無にかかわらず、鼻前庭でのシグナルは測定時間内において変化が見られなかった。

D. 考察

経鼻インフルエンザワクチンは現行のワクチンと異なり鼻腔内にワクチンを接種するため、嗅神経ならびに嗅球をへて脳への影響を危惧する意見等安全性において議論がある。本研究課題では、経鼻インフルエンザワクチン接種に伴う安全性を検証することを目標とし、PET を用いて鼻腔領域内に噴霧したワクチンの動態を明らかにすることを目的とした。今年度は、18F 標識を行った経鼻インフルエンザワクチンを使用して、アカゲザル及びマウスを用いたモデル実験を実施した。同時に、臨床試験に用いている添加剤 CVP のワクチン製剤への影響も検討した。近年、現行のインフルエンザ HA ワクチンと比較して、精製ウイルスを不活化して作製される不活化全粒子ワクチンは、免疫原性が高いことが科学的に証明されている。そこで我々は、現行の HA ワクチンと同様に、3 種類のウイルスから作製される不活化全粒子ワクチンを含む経鼻インフルエンザワクチンの開発・実用化を目指している。

昨年度の検討により確立した標識ワクチン精製法を用いて準備したワクチンをマウス及びサルに経鼻接種し、種々の解析を実施した。

マウスに経鼻接種された標識ワクチンは、接種 10 分後において鼻腔、咽頭及び胃のみで

検出され、1 時間以降では、腸及び膀胱でも確認された。ワクチンは生体内において、まず主要な量が鼻腔内に貯留し、経時的に飲み込まれ消化器系に分布し、代謝され排泄系に移行するものと考えられる。また、測定時間内において肺でワクチンが検出されることはなかったため、上気道に接種する経鼻ワクチンにおいて懸念される呼吸器系への蓄積の可能性が非常に低いことを示唆する。カウンターを用いた動態解析においても、同様に肺においてワクチンの蓄積は認められなかった。そして、カウンターを用いた動態解析において、嗅球及び大脳でのワクチンの検出は出来なかった。経鼻ワクチンにおいて、脳を含む中枢神経系への影響が最も危惧されているが、ワクチンが中枢神経系へ影響を及ぼす可能性は低いことを裏付ける科学的知見と考えられる。以上の結果を纏めると、カウンターを用いた従来の動態解析法と比較して、PET を用いた動態解析法は同様の結果が得られた。故に、本方法は安全性を評価する上で従来法において不可能であったリアルタイムの変化という時間的情報を得ることができ、非常に有用であると考えられる。

アカゲザルに経鼻接種された標識ワクチンは、主要な免疫応答の場である鼻腔に注目し解析された。接種後鼻腔に存在するワクチンは、マウスと同様に経時的にシグナルは減少した。CVP をワクチンに添加した場合、鼻腔内での貯留性に改善が認められた。同様の結果が、マウスにおいても得られた。近年、鼻腔粘膜上に接種したワクチンの流動性を抑え保持時間を長くすることで、ワクチン効果が増

強することが示されている (Yuki Y *et al.*, *Biotechnol Genet Eng Rev.* 2013 Oct;29 (1-2):61-72.). これらをまとめると既に市販薬において使用されている CVP は、経鼻ワクチンにおいてもワクチンの保持時間を長くすることでワクチン効果の増強に寄与することが期待できる。鼻前庭でのシグナルは測定時間内において変化が見られなかった。これは鼻前庭の上皮細胞は繊毛運動を行わないために起こったものと考えられる。

今後、マウス及びサルを用いてより詳細に検討する予定である。

E. 結論

次世代ワクチンである経鼻不活化全粒子インフルエンザワクチンの安全性を評価することを目標とし、PET を用いてその動態を明らかにするための検討を行った。マウスにおいて、PET を用いた動態解析法は カウンターを用いた動態解析法と同様の結果が得られ、リアルタイムに情報の得られる優れた手法であることを示した。マウス及びサルを用いた動物実験において、ワクチンの全身性の動態とヒトに近い頭部での動態の両方を検討出来ることを示した。また、粘調剤 CVP のワクチンへの添加が鼻腔内での貯留性の改善に寄与することを示した。本研究から得られた結果は、経鼻ワクチンにおいて懸念されている事項に対して、安全性を証明するものと示唆される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakai K, Ami Y, Tahara M, Kubota T, Anraku M, Abe M, Nakajima N, Sekizuka T, Shirato K, Suzaki Y, Aina A, Nakatsu Y, Kanou K, Nakamura K, Suzuki T, Komase K, Nobusawa E, Maenaka K, Kuroda M, Hasegawa H, Kawaoka Y, Tashiro M, Takeda M. The host protease TMPRSS2 plays a major role in in vivo replication of emerging H7N9 and seasonal influenza viruses. *J Virol.* 2014 May;88(10):5608-16. Epub 2014 Mar 5.
- 2) van Riet E, Aina A, Suzuki T, Kersten G, Hasegawa H. Combatting infectious diseases; nanotechnology as a platform for rational vaccine design. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014 Jul 30;74:28-34. Epub 2014 May 23.
- 3) Hasegawa H, van Reit E, Kida H. Mucosal immunization and adjuvants. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2015;386:371-80.

2. 学会発表

- 1) Hideki Hasegawa Pathology of influenza virus infection and the role of secretory-IgA antibodies in influenza virus infection. 第62回日本ウイルス学会学術集会 横浜 2014.11
- 2) Tadaki Suzuki, Hideki Hasegawa Pathology and pathogenesis of emerging

- and re-emerging viral infections. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 横浜 2014.11
- 3) 齊藤 慎二、Elly van Riet、相内 章、鈴木 忠樹、池田 千将、伊藤 良、泉地 恭輔、高橋 宜聖、浅沼 秀樹、小田切 孝人、田代 真人、田村 慎一、竹山 春子、長谷川 秀樹 高病原性鳥インフルエンザ A(H5N1) ウイルスの経鼻不活化全粒子ワクチンにより誘導されたヒトモノクローナル抗体の特性解析 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 横浜 2014.11
 - 4) 大原 有樹、鈴木 忠樹、中野 哲郎、齊藤 慎二、相内 章、秋元 和憲、長谷川 秀樹 低毒性型合成二重鎖 RNA uPIC を用いた経鼻インフルエンザワクチンの開発 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 横浜 2014.11
 - 5) 長谷川 秀樹、相内 章、鈴木 忠樹、川口 晶、田村 慎一、小田切 孝人、田代 真人、倉田 毅 経鼻不活化全粒子インフルエンザワクチンと現行皮下接種ワクチンの抗体応答の比較 第 18 回日本ワクチン学会学術集会 福岡 2014.12
 - 6) 齊藤 慎二、van Riet Elly、相内 章、鈴木 忠樹、大原 有樹、池田 千将、伊藤 良、泉地 恭輔、高橋 宜聖、浅沼 秀樹、小田切 孝人、田代 真人、田村 慎一、竹山 春子、長谷川 秀樹 経鼻インフルエンザワクチンにより誘導されたヒトモノクローナル抗体の特性解析 第 18 回日本ワクチン学会学術集会 福岡 2014.12
 - 7) 相内 章、鈴木 忠樹、齊藤 慎二、田村 慎一、幸 義和、小田切 孝人、田代 真人、清野 宏、長谷川 秀樹 経鼻インフルエンザワクチンの動態と抗体応答 第 18 回日本ワクチン学会学術集会 福岡 2014.12
 - 8) 森山 美優、竹山 春子、長谷川 秀樹、一戸 猛志 インフルエンザウイルス特異的 CTL 誘導のための経鼻ワクチン投与方法の検討 福岡 2014.12
 - 9) 鈴木 忠樹、大原 有樹、中野 哲郎、齊藤 慎二、寺内 芳彦、相内 章、長谷川 秀樹 合成二本鎖 RNA uPIC をアジュバントとする経鼻不活化インフルエンザワクチンの開発 第 18 回日本ワクチン学会学術集会 福岡 2014.12
 - 10) Hideki Hasegawa Induction of Neutralizing Antibodies by Inactivated Intranasal Influenza Vaccine and Characteristic of Induced Secretory-IgA Antibodies in Human. Third isirv Antiviral Group Conference, Tokyo, Japan, June 2014
 - 11) Hideki Hasegawa Mucosal Influenza Vaccines. The 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID), Taipei, Taiwan January 2015
- H. 知的財産権の出願、登録状況
なし。

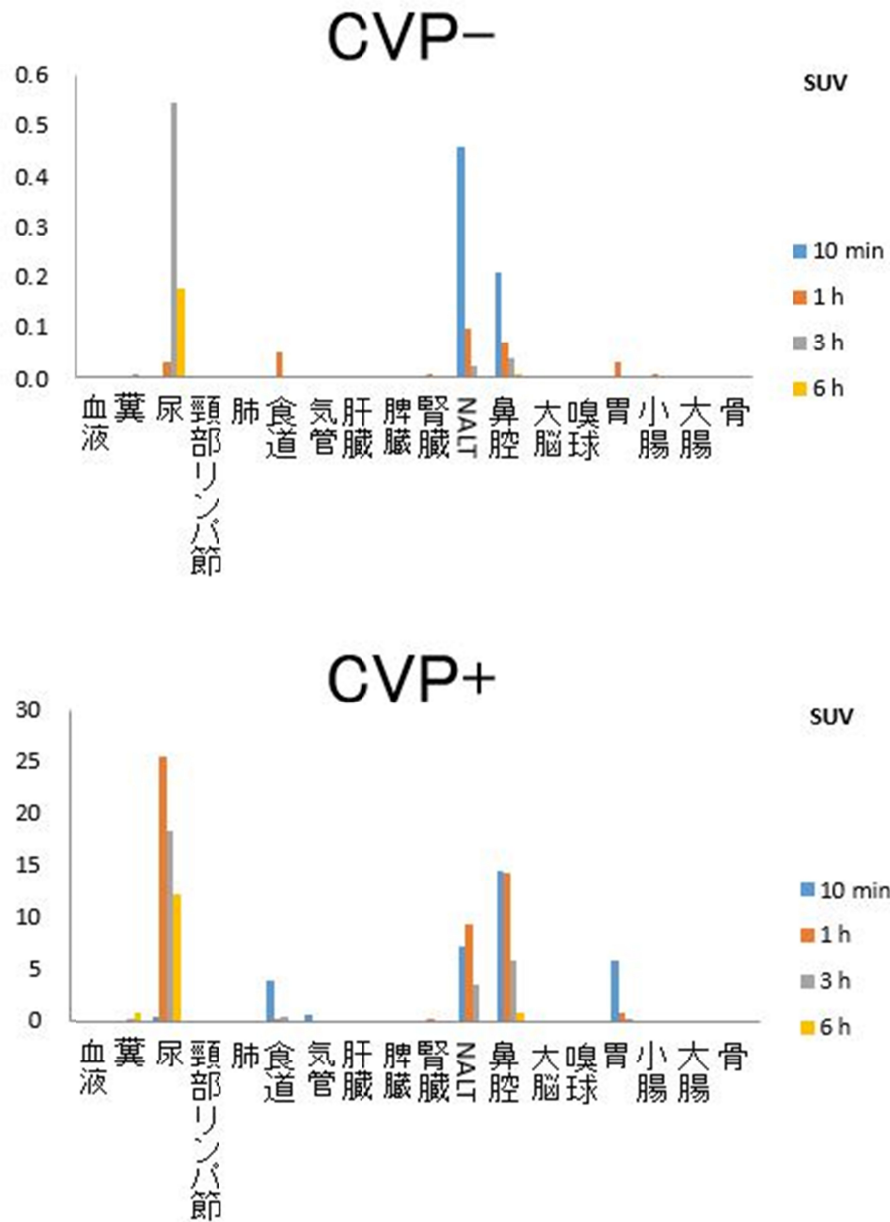


図1. カウンターを用いたマウスにおける 18F 標識ワクチンの動態解析

全粒子インフルエンザワクチンを 18F で標識した後、CVP 添加・非添加の製剤を用意し、マウスへ経鼻接種を実施した。継時的にマウスを解剖し、摘出した各臓器の放射線量をカウンターにより測定し、SUV として示した。鼻腔領域におけるワクチンの貯留性の向上が認められた。また、中枢神経系での蓄積は検出されなかった。

創薬基盤推進研究事業（創薬総合推進研究事業）

平成 26 年度分担研究報告書

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系構築のため、遺伝子組み換えの手法を用い、インフルエンザウイルス由来の組換え HA (hemagglutinin) 抗原を作製した。作製した組換え抗原について、ELISA 法を用い、不活化インフルエンザワクチンを投与した動物の抗血清及び鼻腔洗浄液との反応性を確認したところ、株特異的な反応が認められた。また、今後の安全性試験に用いるための 2014/2015 シーズン用の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

インフルエンザウイルス由来組換え抗原の作製

抗原を取得するためのウイルスとしては、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。ウイルス培養液からウイルス由来 RNA を抽出し、HA 遺伝子をコードする DNA を逆転写法により作出・クローニングした。この遺伝子を用い、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導入し、発現用プラスミドを作製した。このプラスミドをカイコ幼虫に投与し、蛹になった段階で、そのホモジネートから発現された HA 蛋白を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 96 ウェル ELISA プレートに固層化し、インフルエンザウイルス 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反応させた。反応した抗体は HRP 標識した抗マウス IgG 抗体または抗マウス IgA 抗体で検出した。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) 株の不活化ウイルスとの反応性も確認した。また、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

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。

C . 研究結果

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 の組換え HA 蛋白を取得した。CBB 染色による SDS-PAGE 泳動像から、純度は 86% と見積もられた。

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、その由来ウイルスである A/California/7/2009 (H1N1) pdm09 株由来ワクチンを投与したマウスの血清及び鼻腔洗浄液との特異的反応が見られ、A/Texas/50/2012 (H3N2) 株由来ワクチンを投与したマウスの血清及び鼻腔洗浄液との反応は認められなかった。一方、A/California/7/2009 (H1N1) pdm09 株及び A/Texas/50/2012 (H3N2) 株の不活化ウイルスは上記の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。

但し、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。このことから、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。

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について、HA 含量試験を行なったところ、ワクチン原液の HA 含量は、設定値 \pm 10% の範囲内であった。また、無菌試験も適合したため、このワクチン原液を次期安全性評価試験用として用いることとした。

D . 考察

作製した組換え蛋白は、その由来株特異的に反応することから、経鼻ワクチン投与時の病理試験の陽性対象として用いることが出来るほか、これをアフィニティーカラムに固定化して特異的抗体を精製し、ワクチンまたはウイルス由来 HA 抗原の検出に利用することが出来ると考えられた。

また、安全性評価用ワクチン原液は次シーズン用に作製したのも問題なく使用できるものと判断された。

E . 結論

昨年度はウイルス由来 NP 蛋白の検出系作出を試みた。これに続き、今年度は HA 蛋白の検出系の材料となる組換え蛋白も取得できた。これらを利用すれば、投与した経鼻ワクチン成分の挙動が特定できると期待される。

また、次シーズン用ワクチン原液も作成できたことから、次シーズン以降も、継続してこれを利用した安全性の評価が可能と考えられる。

F . 研究発表

1 . 論文発表

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.

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

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
幸 義和	経鼻ワクチンのマウス・サルにおける分子イメージング	佐藤章弘	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	技術情報協会	東京	2014	145-149

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
D. Tokuhara, T. Nochi, A. matsumura, M. mejima, Y. Takahashi, S. Kurokawa, H. Kiyono, Y. Yuki	Specific Expression of Apolipoprotein A-IV in the Follicle-Associated Epithelium of the Small Intestine	Dig. Dis. Sci.	59	2682-2692	2014
T. Azegami, Y. Yuki, H. Kiyono	Challenges in Mucosal Vaccines for the Control of Infectious Diseases	Int. Immunol	26	517-526	2014
M. Mejima, K. Kashima, M. Kuroda, N. Takeyama, S. Kurokawa, Y. Fukuyama, H. Kiyono, K. Itoh, T. Mitsui, Y. Yuki	Development of selection marker-free rice-based oral cholera toxin B-subunit vaccine and characterization of location and structure of transgene by using whole genome resequencing analysis.	Plant Cell Tiss. Org. Cult.	120	35-48	2015

K. Kashima, M. Mejima, S. Kurokawa, M. Kuroda, H. Kiyono, Y. Yuki	Comparative whole-genome analyses of selection marker-free rice-based cholera toxin B-subunit vaccine lines with wild-type lines.	BMC Genomics	16	48	2015
Y. Fukuyama, Y. Yuki, Y. Katakai, N. Harada, H. Takahashi, S. Takeda, M. Mejima, S. Joo, S. Kurokawa, S. Sawada, H. Shibata, E.J. Park, K. Fujihashi, D. Briles, Y. Yasutomi, H. Tsukada, K. Akiyoshi, H. Kiyono:	Nanogel-based pneumococcal surface protein A nasal vaccine induces microRNA-associated Th17 cell responses with neutralizing antibodies against Streptococcus pneumoniae in macaques	Mucosal Immunol.		In press	2015
T. Azegami, H. Itoh, H. Kiyono, Y. Yuki*	A Novel Transgenic Rice-based Vaccine	Arch. Immunol. Ther. Ex.	63	87-99	2015
鹿島光司、幸 義和、清野 宏	次世代ワクチン開発への課題と挑戦 経口ワクチン	Bio Industry	31	4-10	2014
福山賀子、幸 義和	粘膜ワクチンの現状 経鼻ワクチンを中心に	医学のあゆみ	253	15033-15038	2015

Sakai K, Ami Y, Tahara M, Kubota T, Anraku M, Abe M, Nakajima N, Sekizuka T, Shirato K, Suzaki Y, Ainai A, Nakatsu Y, Kanou K, Nakamura K, Suzuki T, Komase K, Nobusawa E, Maenaka K, Kuroda M, Hasegawa H, Kawaoka Y, Tashiro M, Takeda M.	The host protease TMPRSS2 plays a major role in in vivo replication of emerging H7N9 and seasonal influenza viruses.	J Virol.	88(10)	5608-16	2014
van Riet E, Ainai A, Suzuki T, Kersten G, Hasegawa H.	Combatting infectious diseases; nanotechnology as a platform for rational vaccine design.	Adv Drug Deliv Rev.	74	28-34	2014
Hasegawa H, van Reit E, Kida H.	Mucosal immunization and adjuvants.	Curr Top Microbiol Immunol.	386	371-80	2015
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., akoda, 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
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