

**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24 - 26年度 総合研究報告書

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	16
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	28
. 研究成果に関する一覧	33
. 研究成果の刊行物・別刷(主要なもの)	42

. 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)**

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

平成 24-26 年度 代表研究者報告書

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： 本課題は経鼻ワクチンを開発する上での効果および安全性を試験する方法の確立を目指した。そのために、経鼻投与されたワクチンが嗅覚上皮の神経細胞に吸着した際の嗅覚行動への影響及び嗅球での嗅覚神経の活動イメージング（Odor mapping）解析を、マウスを使って実施するために、不活化インフルエンザウイルスワクチンに用いられ顔面麻痺を誘発した LT と同じタイプのアジュバントであるコレラトキシン(CT)を用いて実施した。その結果、（1）CT は嗅球に移行し嗅覚や Odor map に傷害を与える（2）コレラトキシン B 鎖（CTB）は嗅球に移行するが、嗅覚や Odor map に傷害を与えない（3）嗅覚や Odor map による傷害には A 鎖の ADP リボース転位酵素により最終的にネクローシスが起こることにより傷害される、ことを検証できた。また上気道感染症病原体ワクチンとして新たに開発中の肺炎球菌の経鼻ワクチンを使って、サルでワクチン効果の確認及び経鼻投与されたワクチンの中樞神経系等への挙動を含めた吸収、分布、代謝、排泄（ADME）試験をマウス及びサルを用いて試験可能な ¹⁸F-PET イメージング技術を使って解析した。その結果（1）肺炎球菌経鼻ワクチンはサルでもワクチン特異的血清 IgG 及び粘膜 IgA 及び Th17 T 細胞を誘導して、肺炎球菌の防御免疫を誘導すること、（2）ワクチン自身は鼻腔上皮に長時間滞留するが、嗅球に移行しないことをマウス及びサルを用いて検証できた。以上、これらの結果から、経鼻投与されたワクチン/アジュバントの脳内移行を含む体内動態と鼻腔上皮・嗅覚神経細胞に吸着したワクチンの嗅覚への影響及び嗅覚神経の脳への情報伝達の影響を評価できるシステムを開発することで、経鼻ワクチンの安全性評価の解析ツールを開発した。

A. 研究目的

経鼻投与は最も効果的な粘膜ワクチン投与方法の一つとして知られ、実際弱毒型インフルエンザ経鼻ワクチンである FluMist は現在米国をはじめ世界で使用されている。しかし一

方で、2004 年スイスで不活化インフルエンザワクチンに経鼻アジュバントとして大腸菌易熱性毒素（LT）を含む製剤が投与された被験者のなかに顔面麻痺が現れたことから（N Engl J Med, 350: 896-903, 2004）、製造販売が中

止になった。これに関連して我々は2000年にワクチンである破傷風トキソイド(TT)を粘膜アジュバントであるコレラ毒素(CT)と同時に経鼻投与すると、TTは嗅球には移行しないがCTは一部(1%以下)が嗅球に移行することを報告し、中枢神経系への影響を懸念していた(J. Immunol. 165: 4778-4782, 2000)。その際興味深いことに、CTには共投与されたワクチンであるTTを鼻粘膜の上皮細胞に長時間保持させる効果があることが確認できた。この効果は最近我々が開発した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カチオン化プルラン(cCHP ナノゲル)を用いた経鼻ワクチンデリバリーシステムが、鼻腔上皮細胞にワクチンを長時間吸着保持させ効率よく上皮細胞から取り込まれ、直下の樹状細胞に抗原提示させることと同じ効果があると考えられる(Nat. Mater. 9: 572-578, 2010)。経鼻投与されたワクチンやアジュバントの挙動は鼻腔を覆う上皮細胞においてマウスとヒトの解剖学的差異に依存すると考えられるが、嗅覚系上皮細胞は嗅覚受容体を発現する一種の神経細胞であり、それらが嗅球内にある糸球体へと投射され、シナプスを介して大脳に嗅覚情報を伝えている。したがって経鼻ワクチンやアジュバントのヒト臨床試験のための吸収、分布、代謝、排泄(ADME)に関する安全性薬理試験はげっ歯類のみならず、サル等の高等動物での試験も必要と考えられる。我々は最近PETを用いて生きたまま中枢神経へのワクチンの移行を追跡するシステムを開発し、サルのような大動物にも適応した(J. Immunol. 185:

5436-5443, 2010)。さて一方で、投与された経鼻ワクチンが鼻腔の嗅覚上皮・神経に吸着することでの嗅覚へ影響も懸念されるが、この点での研究は皆無である。そこで(1)PETイメージングによるADMEを含む中枢神経移行試験を行うと同時に、(2)鼻腔の嗅覚神経に結合していると考えられる経鼻ワクチンの嗅覚への影響及び嗅覚神経の大脳への情報伝達の影響を最近開発された活動イメージング解析技術(Nature 450: 503-508, 2007)等を使って試験することで、経鼻ワクチンの安全性の基準・方法の確立を目指す。そこで本課題では(1)細菌感染症経鼻ワクチンの嗅覚神経系への影響を嗅覚神経の活動イメージングで解析評価する技術とマウス嗅覚行動により評価する技術の開発を嗅球に移行することが知られているコレラ毒素CT及びコレラトキシンB鎖CTBを用いて実施する。(2)ナノゲル肺炎球菌経鼻ワクチンのサルでの免疫効果並びに(3)肺炎球菌経鼻ワクチンのPETによるマウス/サルを用いたリアルタイムイメージングによる体内動態の検討を行った。

B. 研究方法

1) 材料

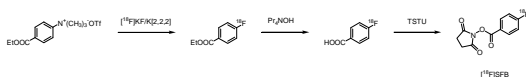
肺炎球菌ワクチンは東大医科研で、肺炎球菌の表面抗原の大腸菌発現組換えPspAを高純度に精製して用いた。嗅球への移行実験に用いるコレラトキシンB鎖CTBは枯草菌発現系を用いて発現精製した。コレラ毒素CTはList社から購入した。

2) ¹⁸F-PspAの合成法

浜松ホトニクス社の協力を得て、肺炎球菌の組換え PspA のアミノ基を介して ^{18}F -PspA を合成する方法を図 1 に示す。

Synthesis of [^{18}F]SFB and conjugation with PspA

Synthesis of [^{18}F]SFB



Conjugation with PspA

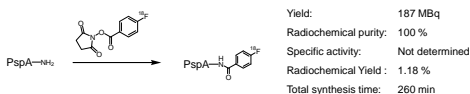


図 1 ^{18}F -PspA の合成法

3) 経鼻ワクチンナノゲル PspA の調製

サル一頭あたりに投与したナノゲル PspA は、分子あたり平均 20 のアミノ基を有する 20 mg/ml ナノゲル 55.5 μl に濃度 6.3mg/ml の組換え PspA 3.95 μl (最終濃度 25 μg)を加えて 46、1 時間反応させて調製した。

4) 組織観察

C T または C T B (30 μg) をマウスに経鼻投与後、鼻腔組織(嗅上皮 = 嗅神経)及び嗅球組織を C T B 抗体、嗅上皮に特異的な OMP (Olfactory marker protein) 抗体で染色して観察した。

5) 嗅球の活動イメージング解析

嗅球系球体の嗅覚神経の活動イメージングは 2 種類の匂い物質 propionic acid (3C00H) と valeric acid (5C00H) を嗅がせ嗅球を外科的に露出させ、赤色光を照射するとこれらのおいへの入力があって活性化された系球は酸素の消費量が違うため眼(カメラ)で違いを確認

できることを利用して画像解析(Nature 450: 503-508, 2007)を行う。

経鼻投与後のマウスの嗅覚異常を視覚的に評価するため、2 種類の匂い物質 propionic acid (3C00H) と valeric acid (5C00H) を嗅がせた際に活性化される嗅球の背側表面上の系球の動きを観察する光学イメージング法 (Optical imaging) を行った。マウスの嗅球を外科的に露出させ赤色光を照射すると、これらの匂いに対し活性化された系球は酸素を消費するので、その消費量の違いを視覚的に確認できることを利用して画像解析 (Nature 450: 503-508, 2007) を行った。

6) マウス嗅覚行動検討実験

ミネラルオイル、チーズ、エビなどのにおいをマウスに 3 回ずつ嗅がせ、それらのおいを嗅ぐ時間をカウントして測定することで嗅覚が正常かを評価する。

7) 免疫応答の評価

初回免疫の前、各免疫の 1 週間後、最終免疫から 2, 4, 6 及び 8 カ月後、追加免疫から 2 週間後の計 11 回、血清、鼻腔洗浄液および気管支肺胞洗浄液を採取した。これらの PspA 特異的抗体価は ELISA 法にて測定した。

中和抗体価測定(感染防御効果の判定)では、最終初回免疫の血清(10 μl)に 90 μl の肺炎球菌 (Xen10: 7.5 x 10³ CFUs) を加え、37 で 30 分培養した後 BALB/c マウスに腹腔内投与し、1 週間生死判定を行った。

サイトカイン測定には追加免疫後サルの末梢血から Ficoll により分離された末梢血単核

細胞 (PBMC) を用いた。PBMC から CD4+ T 細胞を分離し、抗原提示細胞 (CD4-CD8- T 細胞に \square 照射で処理したもの) ならびに PspA 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ の条件下のもと 5 日間培養した。培養後、上清を回収し、Monkey Singleplex Bead Kit にて IFN- \square 、IL-4、IL-17 の濃度を測定した。

8) マイクロRNA (miRNA) の定量

追加免疫後、血清、鼻腔粘膜組織および肺組織を回収し、miRNA の抽出を行った。免疫原性に関与する miR-181a ならびに miR-326 の発現量を real-time PCR 法にて測定した。

9) ナノゲル経鼻ワクチンの物性

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。

10) PET を用いたサルにおける ¹⁸F 標識ワクチンの動態解析

¹⁸F 標識 PspA を cCHP (20mg/ml) で、PspA : cCHP = 1:5 モル比で、ナノゲル化 (45 $^{\circ}\text{C}$ 、30 分) したものの、及び ¹⁸F-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) CT または CTB の経鼻投与での組織学的観察

CT や CTB は嗅球に移動することが知られているので、それぞれ 30 μg を経鼻投与したあとの嗅上皮 (嗅神経) の影響を CTB 抗体と嗅神経に特異的発現している OMP 抗体で観察した。その結果、CTB は投与 72 時間での OMP の発現に変化はなかったが (図 2)、CT は投与 24 時間から OMP の発現が極端低下した (図 3)。

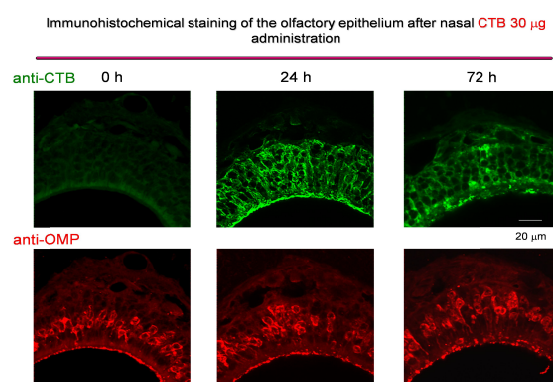


図 2 . CTB の経鼻投与の影響

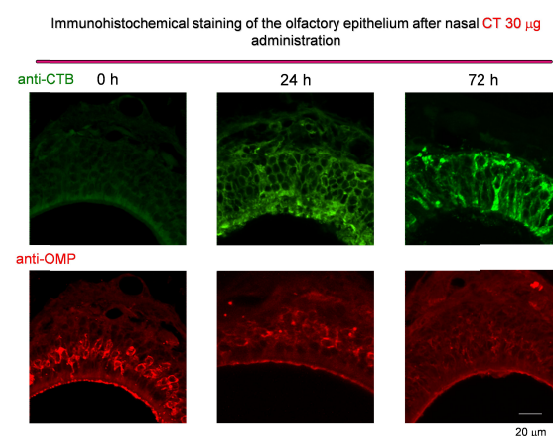


図 3 . CT の経鼻投与の影響

2) CT または CTB の経鼻投与での嗅球の活動イメージング解析

CT の経鼻投与は CTB に比較して、嗅上皮での

OMP の発現が極端に低下していたので、CT の嗅球の影響を調べるために活動イメージング解析を行った。propionic acid (3C00H)での結果を図4に示す。

同様の結果は valeric acid (5C00H)でも得られ、CT は嗅球の活動イメージングの誘導を低下させた。

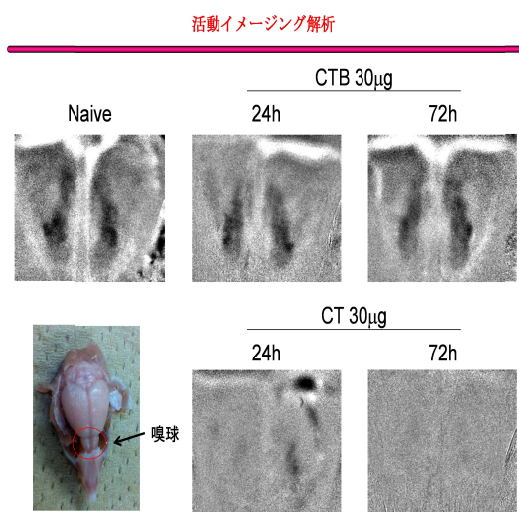


図4 propionic acid (3C00H)の活動イメージングでのCT又はCTB経鼻投与の影響

3) マウス嗅覚行動の検討実験

CTまたはCTBの投与におけるマウス嗅覚行動の変化を調べたところ、期待どおり、CT投与で嗅覚行動の極端に低下が認められた。

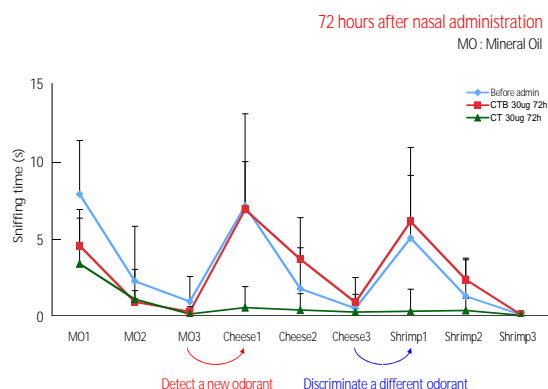


図5. CT または CTB 経鼻投与でのマウス嗅覚行動

4) ナノゲル化 PspA 経鼻ワクチンの免疫応答誘導

ナノゲル化 PspA 免疫群では、血清中の PspA 特異的 IgG 抗体価が有意に増加し、さらに気管支肺胞洗浄液中の PspA 特異的 IgG 抗体価及び鼻腔洗浄液中の PspA 特異的分泌型 IgA 抗体価もコントロール群に比べはるかに高いレベルを示した。これらの抗体価は徐々に下がる傾向にあったが、追加免疫を行うと、初回最終免疫後のレベルまで回復した(図5A)。

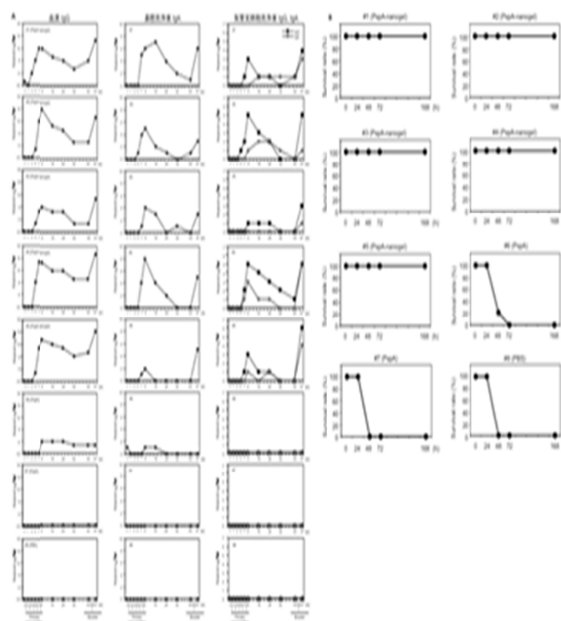


図5 A) PspA 特異的抗体価の測定結果 B) 中和抗体価の測定結果

抗体価の上昇が認められたことから、追加免疫後の PMBC を用いてサイトカイン測定を行った結果、ナノゲル化 PspA 群において IL-4 ならびに IL-17 の産生が有意に認められ、Th2 ならびに Th17 細胞の免疫応答が誘導されること

が確認できた (図 6)。

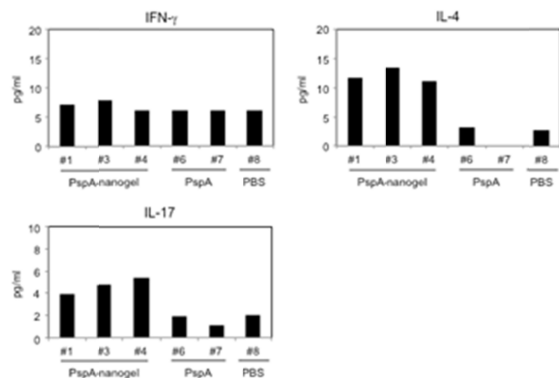


図 6 . サイトカイン測定結果

(#2, #5 のサルでは PMBC が分離出来なかった。)

また、ナノゲル化 PspA 群の血清と肺炎球菌を混合させてマウスに腹腔内投与すると、全てのマウスが生存し完全に感染防御効果を示したが、PspA 群や PBS 群の血清を肺炎球菌と混合させてマウスに腹腔内投与すると、マウスは 3 日以内に全て死亡した (図 5B)。

さらに免疫前と追加免疫後の血清中における miRNA の発現量を調べたところ、追加免疫後のナノゲル化 PspA 投与群の血清中で miR-181a や miR-326 の発現が有意に増加した (図 4)。

また、追加免疫後の鼻腔粘膜組織および肺組織でも、ナノゲル化 PspA 投与群において miR-181a や miR-326 の発現が有意に増加した (図 7)。

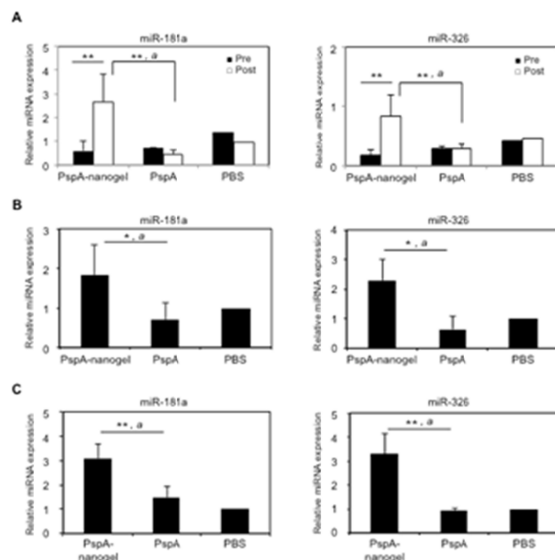


図 7. miRNA 発現量の測定結果

A) 血清 B) 鼻腔粘膜組織 C) 肺組織

Pre: 初回免疫前、Post: 追加免疫後、

a : PspA-nanogel vs PspA/PBS, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

5) 経鼻ワクチンナノゲル PspA-PET に用いる ^{18}F -PspA の合成

PET に用いる ^{18}F -PspA の合成に成功した。分離精製された ^{18}F -PspA のパターンを示す。カラム Superose 12 を用いた。最終生成物の放射能濃度は $187\text{MBq}/12/0.5\text{mL}$ だったので、 $2.67\text{uL}/\text{MBq}$ となり、経鼻実験可能な濃度であった。合成された

^{18}F -PspA を用いて、PET を行うことが可能になった。 ^{18}F -NanogelPspA を調製するためのナノゲル化反応は 46、30 分で行うことになる。

HPLC analysis of [^{18}F]PspA

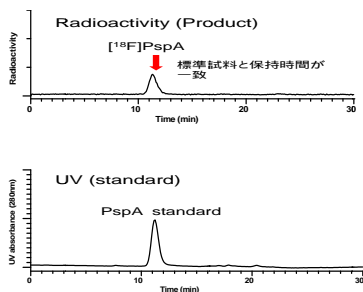


図 8 ^{18}F -PspA の合成

6) 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 9)。

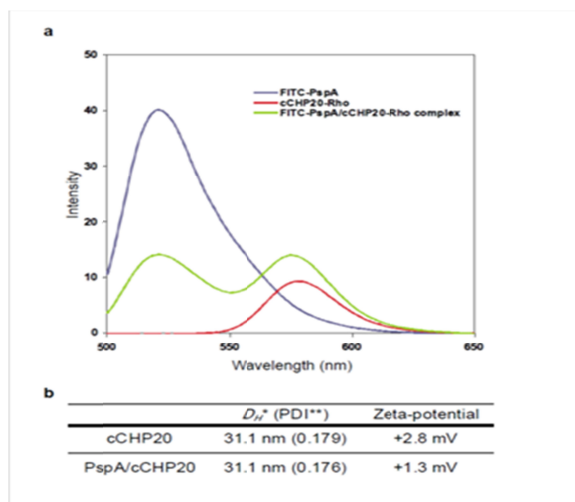


図 9. ナノゲル PspA の FRET (a) と大きさと荷電

7) ^{18}F -PspA ならびにナノゲル化 ^{18}F -PspA 経鼻投与後の PET によるマウス体内動態解析

^{18}F -PspA 単独をマウスに経鼻投与後、 ^{18}F -PspA は鼻腔内には保持されず、すぐに排泄されるが、ナノゲル化された ^{18}F -PspA の経鼻投与を

行くと、

^{18}F -PspA は鼻腔内に 6 時間以上保持された(図 10)。経鼻投与された ^{18}F -PspA の一部は鼻腔から食道、胃を経由して排泄された。 ^{18}F の排泄の主な経路は ^{18}F -Lys と推定される低分子分解体が血中を介して尿に排泄されることが確認された。

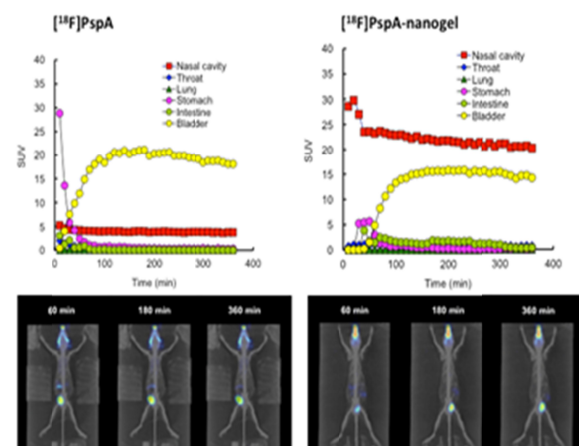


図 10. ^{18}F -PspA ならびにナノゲル化 ^{18}F -PspA 経鼻投与後の PET による体内動態解析

8) ナノゲル PspA サル 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 11)。サルの頭部は 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。

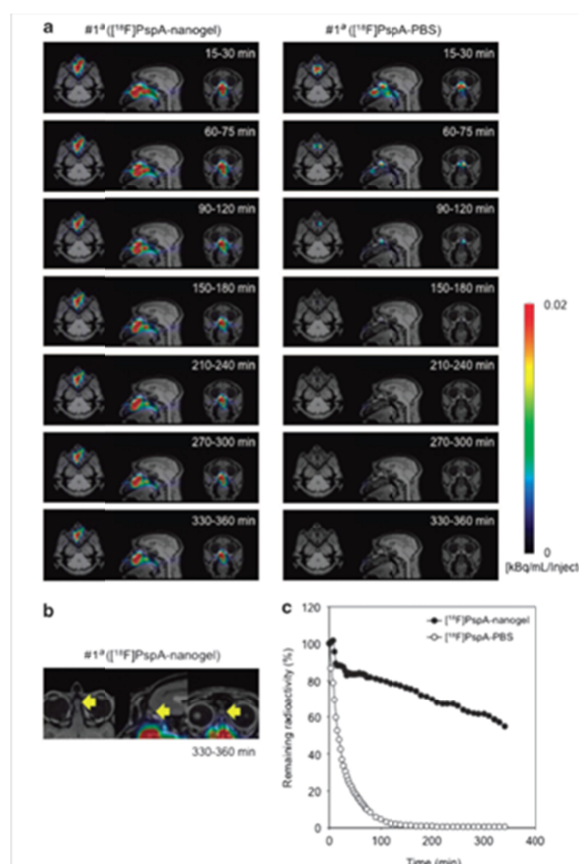


図 11. ナノゲル PspA の PET 解析
頭部(a, c)と嗅球(b)

D. 考察

経鼻ワクチンの安全性を評価する上で必要な 2 つの技術、ワクチンの嗅上皮または嗅球へ影響の評価法及びサルにも適応できる体内動態解析のための蛋白 PET の開発を進めた。経鼻投与されたワクチンが嗅覚上皮の神経細胞に吸着した際の嗅覚への影響及び嗅球での嗅覚神経の活動イメージング解析を、マウス

を使って実施するためまず、経鼻投与で嗅球への移行が知られているコレラトキシン(CT)とその B 鎖 (CTB) で嗅球での嗅覚神経の組織観察及び活動イメージング解析を実施した。その結果 CT30 μ g は嗅覚上皮及び嗅球の糸球体を破壊し、投与 24-72 時間での嗅球の活動イメージングが誘導できなくなることが、CTB にはそのような作用はなかった。またこの濃度で CT は、CTB と違って嗅覚上皮、嗅球の嗅覚神経を破壊し、48-72 時間でマウスの嗅覚行動を完全に抑制することを確認できた。

ナノゲル化 PspA の経鼻投与により、マウス以外でサルでも血清中ならびに気道粘膜中の PspA 特異的抗体産生を誘導出来ることが明らかとなった。さらに血清中の PspA 特異的 IgG 抗体により感染防御効果を示すことがわかった。この抗原特異的な抗体産生は IL-4 産生による Th2 細胞の免疫応答の誘導であることが確認できた。また、肺炎球菌の増殖抑制には IL-17 の産生による好中球やマクロファージの活性が必要であることが報告されており、ナノゲル化 PspA をサルに経鼻投与後 IL-17 の産生が上昇したことは、肺炎球菌ワクチンを開発していく上で非常に重要である。一方で、T 細胞や B 細胞の分化に関連性のある miR-181a、Th17 細胞の分化に関連性のある miR-326 の発現量がナノゲル化 PspA 免疫群で上昇されたことから、Th2 細胞ならびに Th17 細胞の免疫応答をサポートしており、今後、経鼻ワクチンの免疫応答に対するバイオマーカーとなることが期待される。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 response 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、鼻腔上皮細胞にの保持され、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。

マウスにおける PET での体内動態解析により、ナノゲル化を行うことで PspA ワクチンの鼻腔内での保持効果があることが確認できた。また、ナノゲル化 ^{18}F -PspA を経鼻投与後各臓器を摘出し SUV (standardized uptake value) を測定したところ、嗅球および脳への移行が認められなかった。このことから、ナノゲル化 PspA は安全性の高い経鼻ワクチンであることが証明された。さらに経鼻投与されたナノゲル ^{18}F - P s p A 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 C T B / C T は投与 6 時間で嗅球へ移行することを P E T 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 P s p A 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

次世代ワクチンであるアジュバンドを含まないナノゲル型経鼻肺炎球菌 PspA ワクチンの効果と安全性を評価することを目標とし、(1) 嗅上皮へのワクチン投与での神経細胞の影響を調べる技術を開発した。また (2) PET を用いてその動態を明らかにするためのナノゲル化 ^{18}F -PspA 及び ^{18}F -PspA のマウス及びサルでの PET 解析を行いそのデリバリー効果、嗅球・脳等への移行有無から安全性を評価した。加えて、サルを用いナノゲル化 PspA 経鼻ワクチンの血清、上気道、下気道での抗体の誘導、肺炎球菌中和効果、サイトカインの誘導、及び miRNA による誘導制御効果を検討し、ナノゲル化 PspA 経鼻ワクチンのサルでの有効性が評価できた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fukuyama Y, Tokuhara D, Kataoka K, Gilbert RS, McGhee JR, Yuki Y, Kiyono H, Fujihashi K. Novel vaccine development

- strategies for inducing mucosal immunity
Expert Rev. Vaccines 11: 376-79 (2012)
- 2) Y. Yuki, M. Mejima, S. Kurokawa, T. Hiroiwa, IG. Kong, M. Kuroda, Y. Takahashi, T. Nochi, D. Tokuhara, T. Kohda, S. Kozaki, H. Kiyono. RNAi suppression of rice endogenous storage proteins enhances the production of rice-based Botulinum neurotoxin type A vaccine. *Vaccine* 30: 4160- 4166 (2012)
 - 3) S. Sato, S. Kaneto, N. Shibata, Y. Takahashi, H. Okura, Y. Yuki, J. Kunisawa and H. Kiyono. Transcription factor Spi-B-dependent and -independent pathways for the development of Peyer's patch M cells. *Mucosal Immunol.* 6: 838-846 (2013)
 - 4) IG. Kong, A. Sato, Y. Yuki, T. Nochi, H. Takahashi, S. Sawada, M. Mejima, S. Kurokawa, K. Okada, S. Sato, D. Briles, J. Kunisawa, Y. Inoue, M. Yamamoto, K. Akiyoshi, and H. Kiyono. Nanogel-based PspA intranasal vaccine prevents invasive disease and nasal colonization by Pneumococcus. *Infect. & Immun.* 81: 1625-1634 (2013)
 - 5) Y. Fukuyama, D. Tokuhara, S. Sekine, K. Aso, K. Kataoka, J. Davydova, M. Yamamoto, RS Gilbert, Y. Tokuhara, K. Fujihashi, J. Kunisawa, Y. Yuki, H. Kiyono, JR McGhee, K. Fijihashi. Potential roles of CCR5+CCR6+ dendric cells induced by nasal ovalbumin plus Flt3 ligand expressing adnovirus for mucosal IgA responses. *PLoS One* 2013 , 8:e60453
 - 6) D. Tokuhara, B. Álvarez, M. Mejima, Y. Takahashi, S. Kurokawa, T. Hiroiwa, M. Kuroda M. Oyama, H.Kozuka-Hata, T.Nochi, H. Sagara, F.Aladin, H. Marcotte, L. Frenken, M.Iturriza-Gómara, H. Kiyono, L. Hammarström, Y. Yuki. Rice-based orally administered antibody fragment prophylaxis and therapy against rotavirus infection. *J. Clin. Invest.* 123: 3829-3838, (2013)
 - 7) S. Kurokawa, R. Nakamura, M. Mejima, H. Kozuka-Hata, M. Kuroda, N. Takeyama, M.Oyama, S. Satoh, H. Kiyono, T. Masumura, R. Teshima, Y. Yuki. MucoRice-cholera toxin B-subunit, a rice-based oral cholera vaccine, down-regulates the expression of -amylase/trypsin inhibitor-like protein family as major rice allergens. *J. Proteome Res.*12:3372-3382 (2013)
 - 8) S. Kurokawa, M. Kuroda, M. Mejima, R. Nakamura, Y. Takahashi, H. Sagara, N. Takeyama, S. Satoh, H. Kiyono, R. Teshima, T. Masumura, Y. Yuki. Change in localization of cholera toxin B-subunit expressed in rice upon RNAi-mediated suppression of endogenous storage proteins leads to down-regulation of the rice allergen protein RAG2. *Plant Cell Reports* 33:75-87 (2014)
 - 9) M. Abe, Y. Yuki, S. Kurokawa, M. Mejima,

- M. Kuroda, E.J. Park, J. Scheller, U. Nakanishi, H. Kiyono: A rice-based soluble form of a murine TNF-specific II_{ama} variable domain of heavy-chain antibody suppresses collagen-induced arthritis in mice. *J. Biotechnol.* 175: 45-52 (2014)
- 10) Y. Yuki, T. Nochi, I.G. Kong, H. Takahashi, S. Sawada, K. Akiyoshi, & H. Koyono. Nanogel-based antigen delivery system for nasal vaccines. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 29:61-72 (2013)
- 11) **幸 義和**: 経口ワクチン 日本統合医療学会誌 6: 44-49 (2013)
- 12) **幸 義和**: 粘膜ワクチン製剤のDDS技術の動向と実用化の可能性
「DDS製剤の開発・評価と実用化手法」(技術情報協会) 178-185(2013)
- 13) 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).
- 14) T. Azegami , Y. Yuki , H. Kiyono: Challenges in Mucosal Vaccines for the Control of Infectious Diseases. *Int. Immunol* 26:517-526 (2014)
- 15) 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)
- 16) 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)
- 17) 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 doi:10.1038/mi.2015.5 (2015)
- 18) 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)
- 19) 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)
- 20) 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)
- 21) 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) Y. Yuki, IG. Kong, A. Sato, T. Nochi, M. Mejima, S. Kurokawa, T. Hiroiwa, Y. Fukuyama, S. Sawada, H. Takahashi, K. Akiyoshi, H. Kiyono: Adjuvant-free nanogel-based PspA nasal vaccine for the induction of protective immunity against Pneumococcus. The American Association of Immunologists (AAI) Boston, USA (2012)
- 2) **幸 義和**：ブタ大腸菌性下痢症予防食べるワクチンの開発研究．動物ワクチンーバイオ医薬研究会 盛岡 (2012)．招待講演
- 3) N. Takeyama, K. Oroku, D. Tokuhara, S. Nagai, H. Kiyono, Y. Yuki. Mucorice-CTB as an oral vaccine for the prevention of enterogenic E. coli-mediated diarrhea in pigs. 日本ワクチン学会 東京 (2012)
- 4) EJ. Park, S. Joo, S. Kurokawa, H. Kiyono, Y. Yuki. Characterization of effector/memory CD4 T cells expanded in the mice vaccinated with Mucorice-CTB 日本ワクチン学会 東京 (2012)
- 5) K. Kashima, H. Hiroiwa, Y. Yuki, H. Kiyono. Heat tolerance evaluation of the rice type oral cholera vaccine, Mucorice-CTB, for a clinical study 日本ワクチン学会 東京 (2012)
- 6) Y. Yuki, M. Mejima, S. Kurokawa, T. Hiroiwa, Y. Takahashi, Y. Takatai, M. Kuroda, N. Takeyama, K. Kashima, H. Kiyono. Molecularly Uniform Rice-based Oral Cholera Toxin B Subunit Vaccine without Plant-associated Sugar Modification induces toxin-specific neutralizing immunity in mice and macaques. *15th International congress of immunology*, Milan, Italy (2013)
- 7) Y. Fukuyama, Y. Yuki, Y. Katakai, S. Takahashi, S. Sawada, H. Shibata, M. Mejima, S. Kurokawa, K. Akiyoshi, H. Kiyono. Nanogel-based PspA nasal vaccine induces S. pneumoniae-specific neutralizing antibody immune responses in non-human primates. *15th International congress of immunology*, Milan, Italy (2013)
- 8) I. Kong, A. Sato, Y. Yuki, T. Nochi, H. Takahashi, S. Sawada, M. Mejima, K. Okada, K. Akiyoshi, H. Kiyono. Nanogel-based pneumococcal surface protein A (PspA) intranasal vaccine prevents invasive disease and nasal colonization by pneumococcus. *15th International congress of immunology*, Milan, Italy (2013)
- 9) N. Takayama, Y. Chen, Y. Tohya, K.

- Oroku, H. Kiyono, Y. Yuki. Establishment of murine norovirus S7 infection system for vaccine development. *15th International congress of immunology*, Milan, Italy (2013)
- 10) Michiyo Abe, Y. Yuki, M. Mejima, S. Kurokawa, E. Park, J. Schellr, U. Nakanishi, H. Kiyono. Production of TNF-specific monovalent and bivalent variable domain of llama heavy-chain antibody fragment in transgenic rice. *15th International congress of immunology*, Milan, Italy (2013)
- 11) Y. Yuki, Y. Fukuyama, H. Kiyono: Cholera toxin as a mucosal adjuvant impairs olfactory nerve system when administered via nasal route in mice. 日本免疫学会 千葉 (2013)
- 12) EJ Park, Y. Yuki, H. Kiyono: Regional T memory and miRNA biomarkers revealed by oral vaccination with MucoRice-CTB 日本免疫学会 千葉 (2013)
- 13) Y. Fukuyama, Y. Yuki, H. Kiyono: Nanogel-based PspA nasal vaccine induces *S. pneumoniae* -specific neutralizing antibody immune responses in nonhuman primates 日本免疫学会 千葉 (2013)
- 14) N. Takayama, Y. Yuki, H. Kiyono: In vivo evaluation of murine norovirus mucosal vaccine against challenge with Japan isolated strain S7 日本免疫学会 千葉 (2013)
- 15) 幸 義和、清野 宏 : 経鼻投与された粘膜アジュバントであるコレラトキシンは嗅覚神経を破壊する 日本ワクチン学会 津、三重 (2013)
- 16) 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)
- 17) 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)
- 18) 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)
- 19) 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)

- 20) 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)
- 21) J. Sunyi, Y. Fukuyama, Y. Yuki, Y.
Kurashima, SF. Ziegler, EJ. Park, H.
Kiyono: Criical role of TSLP-TSLPR
interaction in inducing secretory IgA
responses after mucosal immunization 日
本免疫学会 京都 (2014)
- 1) 幸 義和, 野地 智法, 秋吉一成, 清野
宏：カチオン性ナノゲルを用いる粘膜ワク
チン特許第 5344558 (登録日 平成 25 年 8
月 23 日)
- 2) 幸 義和、清野 宏、澤田晋一、秋吉一成：
肺炎球菌経鼻ワクチン 特願 2014- 27205
(出願日 平成 26 年 2 月 17 日)
- 3) K. Akiyoshi, H. Kiyono, Y. Yuki, T. Nochi
Mucosal vaccine using cationic nanogel
平成 27 年 2 月 24 日登録 米国特許 #
8961983

H. 知的財産権の出願、登録状況

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： 現行インフルエンザワクチンは皮下に注射されるため、全身性の IgG 抗体を誘導できるが、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の分泌型 IgA 抗体誘導が特に重要であることが、マウスを用いたモデル実験等で明らかにされている。この粘膜免疫を誘導するためには、インフルエンザワクチンを鼻腔領域内に噴無する経鼻インフルエンザワクチンが有効である。我々は、経鼻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。しかしながら、不活化抗原を鼻粘膜に投与するワクチンは、インフルエンザワクチンに限らず未だにヒトでは実用化されておらず、その安全性については十分な評価がされていない。そこで本研究では、PET を用いて次世代ワクチンである経鼻不活化インフルエンザワクチンの体内動態を明らかにし、その安全性を評価することを目的としている。

A. 研究目的

インフルエンザの大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変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場合がある。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が求められている。

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、感染防御に最も大きな役割を果たす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、ヘマグルチンを主要抗原とするワクチン）では、ウイ

ルスに対する IgG 抗体が血液中のみに誘導され、気道粘膜上の分泌型 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阻止効果が高いこと（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、現行ワクチンより有効性の高いワクチンであると考えられる。

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介入試験を実施し、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。さらに、現在、ヒトで認可され使用されている経鼻噴無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、この投与ルートにおける安全性評価の指標も存在しない。一般に医薬品の安全性を評価する上では、製剤の体内動態を把握しておくことが非常に重要であるため、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もしくはサルに経鼻投与し、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。そこで本研究では、標識製剤作成のための精製条件の検討、不活化全粒子インフルエンザワクチンの¹⁸F 標識条件の検討を行った後に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）の製剤体内動態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新型インフルエンザ不活化全粒子ワクチン H5N1 (NIBRG-14 株) 3 価不活化全粒子インフルエンザワクチン (A(H1N1)株として A/California/7/09 由来のワクチン製造株 X-179A、A(H3N2)株として A/Victoria/361/11 由来の IVR-165、B 型株として B/Wisconsin/1/10 由来の BX-41A を含む) ならびに濃縮単価不活化全粒子インフルエンザワクチン A-179A を用いた。

2) Cellufine Sulfate カラムを用いたアフィニティー精製

ワクチン製剤のアフィニティー精製は FPLC クロマトグラフィーシステム AKTAprime plus を用いた。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。500ul のサンプルを結合バッファー(0.01M リン酸バッファー pH7.4) で平衡化した Mini column Cellufine Sulfate (ver2.1) 1ml にアプライ

し、25ml の洗浄バッファー (0.01M リン酸バッファー-pH7.4、0.18M NaCl) で洗浄を行った。

その後、20ml

の溶出バッファー (0.01M リン酸バッファー-pH7.4、3M NaCl) を送液し、溶出液を 0.5ml ずつ分取した。全ての送液は 0.5ml/min で行った。

3) ゲル濾過クロマトグラフィーカラムを用いたワクチン製剤の精製

ワクチン製剤のゲル濾過クロマトグラフィー精製は FPLC クロマトグラフィーシステム AKTAprius plus により行った。サンプルを 0.45 μ m フィルターでろ過することにより清澄化を行った。500 μ l 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 ずつ分取した。全ての送液は 0.5ml/min で行った。

4) SDS-PAGE

クロマトグラフィー分画後のサンプルを 2-メルカプトエタノールを加えたサンプルバッファーと混ぜ、95 °C、5 分のインキュベーションを行う事で変性させたものをサンプルとし、12%ゲルで SDS-PAGE を行った。

5) 電子顕微鏡観察

分画後のサンプルの固定は 4%グルタルアルデヒド、2%リンタングステン酸によるネガティブ染色を実施した。観察は、透過型電

子顕微鏡 JEM-1400 (日本電子) で行い、撮影は付属の CCD カメラを用いた。

6) HA 含量の定量

分画前後のサンプルに含まれる A(H1N1)、A(H3N2)および B 型ウイルスの HA 含量を一元放射免疫拡散試験 (Single Radial Immunodiffusion、SRD 試験) にて測定した。SRD 試験は、現行季節性インフルエンザ HA ワクチンに関する国家検定の手順に従い実施した。SRD 試験直前に、各サンプルに関して界面活性剤 Zwittergent 処理を実施し、希釈を行った (希釈倍率 ; 1.0、0.75、0.5 および 0.25 倍)。各ウイルスに対する参照抗血清を含む 1% アガロースゲルに直径 4mm の穴をあけ、界面活性剤処理済みのサンプルを添加した。サンプルがゲルに吸収されたのを確認し、ゲルを洗浄後、20 で 18 時間インキュベートした。ゲルを乾燥させ Coomassie Brilliant Blue 染色を行い、沈降輪の直径を測定した。測定した沈降輪の直径をもとに平行線定量法により、各サンプルに含まれる HA 量を算出した。なお、HA 含量既知の各ウイルス抗原を標準抗原として使用した。

7) 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、上述の則り、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、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。

8) 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 2.5µL、両鼻で計 5µL) 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。

9) 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 250µL、両鼻で計 500µL) 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

1) ワクチン製剤のアフィニティー精製

Cellufine sulfate を用いたインフルエンザウイルスの精製については過去に報告があり、その方法に準じて精製を行った。しかしながら、今回用いた不活化全粒子インフルエンザワクチンは、同条件ではカラムへ吸着せず、精製を行うことが出来なかった (図 1)。

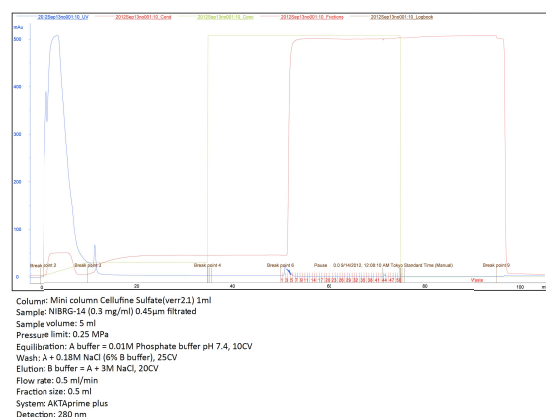


図 1. Cellufine sulfate を用いたインフルエンザウイルスの精製

2) ゲル濾過クロマトグラフィーによるワクチン製剤の精製

全粒子不活化ワクチンは、ウイルス粒子の形態が保たれたまま不活化されており、その粒径は 100nm を超え、粒径分布も広い。このような巨大な分子を高速で分画できるゲル濾過クロマトグラフィーカラムは存在しないことから、小分子である放射性同位体を排除することを目的として Superose12 カラムを用いたゲル濾過クロマトグラフィーによる精製を行った。クロマトグラムには、ワクチン製剤と考えられるピークが Void volume に見られた (図 2)。ピーク分画のサンプルを SDS-PAGE により解析したところ、input サンプルと同様のバンドが確認された (図 3)。さらにピーク分画の電子顕微鏡観察では、精製前のサン

ルと同様に明瞭なオルソミクソウイルス粒子が観察された（図 4）。以上の結果より、ワクチン製剤はゲル濾過クロマトグラフィーにより Void volume に分画され、数百 KDa 以下の分子と明瞭に分離できることが明らかになった。

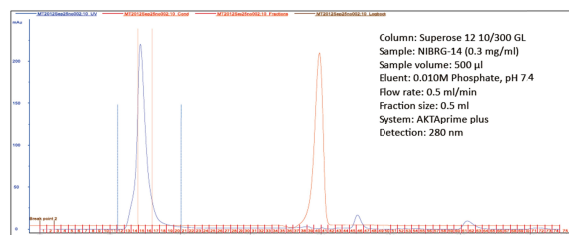


図 2. ゲル濾過クロマトグラフィーによるワクチン製剤の精製

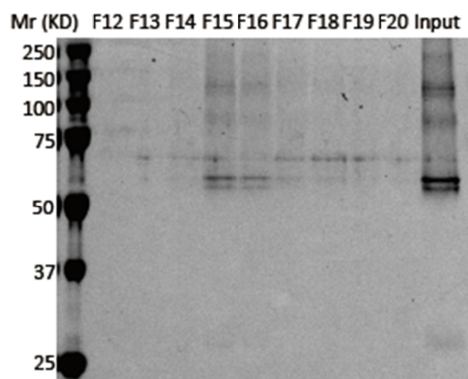


図 3. ゲル濾過分画の SDS-PAGE

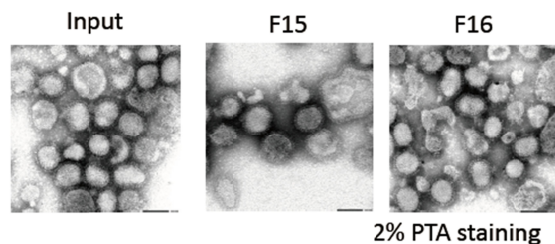


図 4. ゲル濾過分画の電子顕微鏡解析

3) ワクチンの 18F 標識

上述の精製方法を用いて PET に用いる全粒子不活化インフルエンザワクチンに対する標識の検討をおこなった。最初に、現行の季節

性インフルエンザワクチンと同じく 3 種類のインフルエンザワクチン（A(H1N1), A(H3N2) および B 型）を含む 3 価全粒子不活化ワクチンに関して、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し、void volume に溶出されるサンプルに関して、SRD 試験を実施し A(H1N1)、A(H3N2) および B 型の HA 含量を測定した。その結果、各ウイルス HA 量として 90 µg をゲルろ過カラムに添加した時、溶出される void volume ピークフラクション（No. 15 と 16 の計 1mL）に関して、A(H1N1) および A(H3N2) の HA 量はそれぞれ 39.6 µg と 59.6 µg となり、44～63%の回収率で分画できることが明らかになった。しかしながら、B 型ウイルスに関しては、かなりの損失が見られた。B 型ウイルスに関しては十分な HA 量を回収できないものの、A(H1N1) および A(H3N2) に関しては、現行インフルエンザワクチンの接種量（15 µg HA/500 µL/dose）と同等の HA 量を回収できることが明らかになった。そこで、この 3 価不活化全粒子ワクチンに関して 18F 標識を試みたが、標識されたワクチンを得ることが出来たものの PET を行うには不十分な回収率となることが判明した。

ゲルろ過操作により回収できる HA 量がウイルスにより異なってしまうこと、また濃度が薄く PET 実施には不十分であることが判明したため、A(H1N1) 単身不活化全粒子ワクチンでの PET 実施に切换え、濃縮することで 1.5 mg HA/mL とした不活化全粒子ワクチンの 18F 標識を試みた。その結果、放射線量ならびに回収タンパク量として、PET 実施に十分な 18F 標識 X-179A ワクチンを回収できることが明らかに

なった（想定値として約 300 MBq/0.3 mg HA/1 mL）。

4) 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

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 5）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。嗅球及び大脑において、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。

5) 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

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变化を観察できた。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。

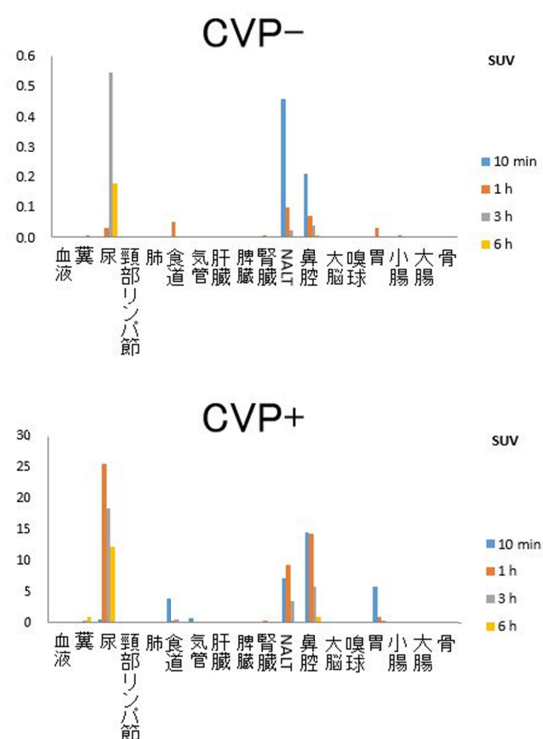


図 5. カウンターを用いたマウスにおける 18F 標識ワクチンの動態解析

D. 考察

経鼻インフルエンザワクチンは鼻腔内にワクチンを接種するワクチンであるため、嗅球ならびに嗅神経をへて脳への影響を危惧する意見がある。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。研究期間の 3 年間で不活化全粒子ワクチンの 18F 標識および精製に関する検討と、マウス、サルを用いた試験を実施した。

試験の結果、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。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。

以上の結果より、経鼻不活化全粒子インフルエンザワクチンは、経鼻投与後に脳内に移行することはなく、数時間で体内に吸収され代謝されていると考えられた。

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 18F 標識の検討を行った。マウス及びサルを用いた試験により経鼻不活化全粒子インフルエンザワクチンは、経鼻投与後に脳内に移行することはなく、数時間で体内に吸収され代謝されていると考えられ、皮下接種では起こらない経鼻接種特異的な安全性に関わる問題が起こる可能性は低いと考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sasaki I, Hoshino K, Sugiyama T, Yamazaki C, Yano T, Iizuka A, Hemmi H, Tanaka T, Saito M, Sugiyama M, Fukuda Y, Ohta T, Sato K, Aina A, Suzuki T, Hasegawa H, Toyama-Sorimachi N, Kohara H, Nagasawa T, Kaisho T. Spi-B is critical for plasmacytoid dendritic cell function and development. *Blood*. 2012 Dec 6;120(24):4733-43. Epub 2012 Oct 11.
- 2) van Riet E, Aina A, Suzuki T, Hasegawa H. Mucosal IgA responses in influenza virus infections; thoughts for vaccine design. *Vaccine*. 2012 Aug 31;30(40):5893-900. Epub 2012 Jul 24.
- 3) Senchi K, Matsunaga S, Hasegawa H, Kimura H, Ryo A. Development of oligomannose-coated liposome-based nasal vaccine against human parainfluenzavirus type 3. *Front Microbiol*. 2013 Nov 26;4:346.
- 4) Aina A, Tamura S, Suzuki T, van Riet E, Ito R, Odagiri T, Tashiro M, Kurata T, Hasegawa H. Intranasal vaccination with an inactivated whole influenza virus vaccine induces strong antibody responses in serum and nasal mucus of healthy adults. *Hum Vaccin Immunother*. 2013 Sep;9(9):1962-70.
- 5) Niikura K, Matsunaga T, Suzuki T, Kobayashi S, Yamaguchi H, Orba Y, Kawaguchi A, Hasegawa H, Kajino K, Ninomiya T, Ijiro K, Sawa H. Gold nanoparticles as a vaccine platform: influence of size and shape on immunological responses in vitro and in vivo. *ACS Nano*. 2013 May 28;7(5):3926-38.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) Hasegawa H, van Riet E, Kida H. Mucosal immunization and adjuvants. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015;386:371-80.

2. 学会発表

- 1) 長谷川 秀樹 次世代ワクチンとしての経鼻インフルエンザワクチン 第60回日

- 本ウイルス学会学術集会 大阪
2012.11
- 2) 山本 典生、浅沼 秀樹、佐藤 佳代子、中内 美奈、高橋 仁、許斐 奈美、相内 章、長谷川 秀樹、田代 真人 細胞培養もしくは鶏卵で製造されたインフルエンザワクチンの品質管理試験および免疫応答への影響 第60回日本ウイルス学会学術集会 大阪 2012.11
 - 3) 川口 晶、鈴木 忠樹、相内 章、佐藤 由子、信澤 枝里、田代 真人、長谷川 秀樹 喘息発作誘発モデルを用いたインフルエンザウイルス感染症の病態解析 第60回日本ウイルス学会学術集会 大阪 2012.11
 - 4) 池田 千将、伊藤 良、相内 章、鈴木 忠樹、田村 慎一、田代 真人、浅沼 秀樹、長谷川 秀樹 基礎免疫を有する個体に対する経鼻投与型インフルエンザワクチン効果 第60回日本ウイルス学会学術集会 大阪 2012.11
 - 5) 泉地 恭輔、相内 章、鈴木 忠樹、浅沼 秀樹、長谷川 秀樹 経鼻投与型インフルエンザワクチンによるマウス母子免疫の解析 第60回日本ウイルス学会学術集会 大阪 2012.11
 - 6) 鈴木 忠樹、川口 晶、相内 章、田村 慎一、伊藤 良、小田切 孝人、田代 真人、長谷川 秀樹 インフルエンザワクチン経鼻接種により鼻腔内に誘導される分泌型IgA抗体の性状解析 第16回日本ワクチン学会学術総会 横浜 2012.11
 - 7) 相内 章、池田 千将、伊藤 良、鈴木 忠樹、泉地 恭輔、田村 慎一、田代 真人、浅沼 秀樹、長谷川 秀樹 感染あるいはワクチン接種歴が経鼻投与型インフルエンザワクチンにより誘導される抗体応答に対して与える影響 第16回日本ワクチン学会学術総会 横浜 2012.11
 - 8) Elly van Riet, Ainai A, Ito R, Senchi K, Suzuki T, Tamura S-I, Tashiro M, Hasegawa H Characteristics of IgA versus IgG human monoclonal antibodies cloned from human plasma cells induced upon intranasal H5N1 vaccination. 第16回日本ワクチン学会学術総会 横浜 2012.11
 - 9) Hasegawa H, Ainai A, Suzuki T, Tamura S-I, Tashiro M, Kurata T Analysis of protective immune responses after intranasal administration of an inactivated whole-virion influenza vaccine in human. 第16回日本ワクチン学会学術総会 横浜 2012.11
 - 10) 浅沼 秀樹、相内 章、佐藤 佳代子、許斐 奈美、岸田 典子、長谷川 秀樹、山本 典生、田代 真人 野外株より細胞培養インフルエンザワクチンの種候補株を選定する基準の検討 第16回日本ワクチン学会学術総会 横浜 2012.11
 - 11) 山崎 達也、二宮 大輔、長島 麻里亜、荒井 由佳、手嶋 保智、長谷川 秀樹、相内 章、藤本 陽、千葉 丈 インフルエンザ中和抗体発現プラスミドを用いた受動免疫法の応用研究～長期的なウイルス防御効果と免疫不全マウスへのウイルス防御

- 効果の検討～第16回日本ワクチン学会学術総会 横浜 2012.11
- 12) 岡田 清吾、長谷川 俊史、長谷川 秀樹、相内 章、池本 健三、佐々木 功典、戸田 昌一、調 恒明、市山 高志 インフルエンザ A/H1N1 2009 感染による気管支喘息モデルマウスの気管支肺胞洗浄液解析 日本小児科学会学術集会 広島 2013.4
- 13) 長谷川 秀樹 ワクチン研究の最前線 次世代ワクチンとしての経鼻インフルエンザワクチンの開発 日本薬剤学会 第28年会 名古屋 2013.5
- 14) 長谷川 秀樹 良く効くインフルエンザワクチンを目指して. 第54回日本臨床ウイルス学会 倉敷 2013. 6
- 15) 長谷川 俊史、岡田 清吾、脇口 宏之、市山 高志、長谷川 秀樹、相内 章、調 恒明、戸田 昌一、熱田 了 喘息モデルマウスを用いたインフルエンザ感染による気管支喘息発作重症化の病態解析 新型と季節性インフルエンザの比較 第45回日本小児感染症学会総会・学術集会 札幌 2013.10.
- 16) 脇口 宏之、岡田 清吾、長谷川 秀樹、相内 章、戸田 昌一、調 恒明、長谷川 俊史 気管支喘息(病態)・免疫不全喘息モデルマウスを用いた新型インフルエンザ感染における気管支肺胞洗浄液中ケモカインの検討 第45回日本小児感染症学会総会・学術集会 札幌 2013.10
- 17) 中島 典子、佐藤 由子、片野 晴隆、佐多 徹太郎、長谷川 秀樹 重症インフルエンザウイルス肺炎におけるサイトカイン・ケモカインの発現 第61回日本ウイルス学会学術集会 神戸 2013.11
- 18) 泉地 恭輔、相内 章、鈴木 忠樹、浅沼 秀樹、梁 明秀、長谷川 秀樹 母子免疫によるインフルエンザウイルス感染防御効果の解析 第61回日本ウイルス学会学術集会 神戸 2013.11
- 19) 池田 千将、伊藤 良、相内 章、鈴木 忠樹、田村 慎一、荒尾 雄二郎、田代 真人、浅沼 秀樹、長谷川 秀樹 経鼻インフルエンザワクチンで誘導される抗体応答に基礎免疫が与える影響 第61回日本ウイルス学会学術集会 神戸 2013.11
- 20) 相内 章、浅沼 秀樹、鈴木 忠樹、原田 勇一、田村 慎一、田代 真人、長谷川 秀樹 経鼻インフルエンザワクチンにおけるワクチンの組み合わせが抗体応答に与える影響 第61回日本ウイルス学会学術集会 神戸 2013.11
- 21) 川口 晶、鈴木 忠樹、相内 章、佐藤 由子、永田 典代、田代 真人、長谷川 秀樹 Nc/Nga マウスを用いた喘息発作によるインフルエンザ感染症重症化モデルの炸裂 第61回日本ウイルス学会学術集会 神戸 2013.11
- 22) Hideki Hasegawa, Akira Ainai, Tadaki Suzuki, Elly van Riet, Shi-ichi Tamura, Kazuyuki, Ikeda, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Takeshi Kurata. Antibody responses in serum and nasal mucus induced by the intranasal vaccination with a whole-virion

- inactivated vaccine of A(H5N1)virus in healthy naïve human adults. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology. Keystone, Colorado USA, January 2014.
- 23) Kazuyuki Ikeda, Ryo Ito, Akira Ainai, Tadaki Suzuki, Shin-ichi Tamura, Yujiro Arao, Masato Tashiro, Hideki Asanuma, Hideki Hasegawa. Antibody responses induced by intranasal vaccination of a whole inactivated influenza virus in mice previously infected or vaccinated. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology. Keystone, Colorado USA, January 2014.
- 24) Tadaki Suzuki, Akira Kawaguchi, Akira Ainai, Shin-ichi Tamura, Ryo Ito, Masato Tashiro, Hideki Hasegawa. Impact of the quaternary structure of human Secretory-IgA on neutralization potency to Influenza A virus in upper respiratory tract. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology. Keystone, Colorado USA, January 2014.
- 25) 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
- 26) 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
- 27) 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
- 28) 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
- 29) 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
- 30) 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

- 31) 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
- 32) 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
- 33) 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
- 34) Hideki Hasegawa Induction of Neutralizing Antibodies by Inactivated Intranasal Influenza Vaccine and Characteristic of Induced Secretary-IgA Antibodies in Human. Third isirv Antiviral Group Conference, Tokyo, Japan, June 2014
- 35) 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。

創薬基盤推進研究事業（創薬総合推進研究事業）

平成 24-26 年度総合研究報告書

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

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	粘膜ワクチン製剤のDDS技術の動向と実用化の可能性	佐藤章弘	DDS製剤の開発・評価と実用化手法	技術情報協会	東京	2013	178-185
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
Fukuyama Y, Tokuhara D, Kataoka K, Gilbert RS, McGhee JR, Yuki Y, Kiyono H, Fujihashi K.	Novel vaccine development strategies for inducing mucosal immunity	Expert Rev. Vaccines	11	376-79	2012
Y. Yuki, M. Mejima, S. Kurokawa, T. Hiroiwa, IG. Kong, M. Kuroda, Y. Takahashi, T. Nochi, D. Tokuhara, T. Kohda, S. Kozaki, H. Kiyono	RNAi suppression of rice endogenous storage proteins enhances the production of rice-based Botulinum neurotoxin type A vaccine.	Vaccine	30	4160-4166	2012
S. Sato, S. Kaneto, N. Shibata, Y. Takahashi, H. Okura, Y. Yuki, J. Kunisawa and H. Kiyono	. Transcription factor Spi-B-dependent and -independent pathways for the development of Peyer's patch M cells.	. Mucosal Immunol..	6	838-846	2013

IG. Kong, A. Sato, Y. Yuki, T. Nochi, H. Takahashi, S. Sawada, M. Mejima, S. Kurokawa, K. Okada, S. Sato, D. Briles, J. Kunisawa, Y. Inoue, M. Yamamoto, K. Akiyoshi, and H. Kiyono	Nanogel-based PspA intranasal vaccine prevents invasive disease and nasal colonization by Pneumococcus.	Infect. & Immun. .	81	1625-1634	2013
Y. Fukuyama, D. Tokuhara, S. Sekine, K. Aso, K. Kataoka, J. Davydova, M. Yamamoto, RS Gilbert, Y. Tokuhara, K. Fujihashi, J. Kunisawa, Y. Yuki, H. Kiyono, JR McGhee, K. Fujihashi.	Potential roles of CCR5+CCR6+ dendritic cells induced by nasal ovalbumin plus Flt3 ligand expressing adenovirus for mucosal IgA responses.	. PloS One	8:e60453		2013
D. Tokuhara, B. Álvarez, M. Mejima, Y. Takahashi, S. Kurokawa, T. Hiroiwa, M. Kuroda M. Oyama, H.Kozuka-Hata, T.Nocho, H. Sagara, F.Aladin, H. Marcotte, L. Frenken, M.Iturriza-Gómara, H. Kiyono, L. Hammarström, Y. Yuki.	Rice-based orally administered antibody fragment prophylaxis and therapy against rotavirus infection.	J. Clin. Invest.	123	3829-3838	2013
S. Kurokawa, R. Nakamura, M. Mejima, H. Kozuka-Hata, M. Kuroda, N. Takeyama, M.Oyama, S. Satoh, H. Kiyono, T. Masumura, R. Teshima, Y. Yuki.	MucoRice-cholera toxin B-subunit, a rice-based oral cholera vaccine, down-regulates the expression of -amylase/trypsin inhibitor-like protein family as major rice allergens	J. Proteome Res.	12	3372-3382	2013

S. Kurokawa, M. Kuroda, M. Mejima, R. Nakamura, Y. Takahashi, H. Sagara, N. Takeyama, S. Satoh, H. Kiyono, R. Teshima, T. Masumura, Y. Yuki.	. Change in localization of cholera toxin B-subunit expressed in rice upon RNAi-mediated suppression of endogenous storage proteins leads to down-regulation of the rice allergen protein RAG2.	Plant Cell Reports	33	3375-87	2014
M. Abe, Y. Yuki, S. Kurokawa, M. Mejima, M. Kuroda, E.J. Park, J. Scheller, U. Nakanishi, H. Kiyono	. A rice-based soluble form of a murine TNF-specific II ama variable domain of heavy-chain antibody suppresses collagen-induced arthritis in mice.	J. Biotechnol.	175	45-52	2014
Y. Yuki, T. Nochi, IG. Kong, H. Takahashi, S. Sawada2 K. Akiyoshi, H. Koyono.	Nanogel-based antigen delivery system for nasal vaccines.	Biotechnology and Genetic Engineering Reviews	29	61-72	2013
D. Tokuhara, T. Nochi, A. matsumura, M. mejima, Y. Takahashi, S. Kurokawa, H. Kiyono, Y. Yuki	cific 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
Ainai A, Tamura S, Suzuki T, van Riet E, Ito R, Odagiri T, Tashiro M, Kurata T, Hasegawa H.	Intranasal vaccination with an inactivated whole influenza virus vaccine induces strong antibody responses in serum and nasal mucus of healthy adults.	Hum Vaccin Immunother.	9(9)	1962-70	2013
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.		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
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
Sasaki I, Hoshino K, Sugiyama T, Yamazaki C, Yano T, Iizuka A, Hemmi H, Tanaka T, Saito M, Sugiyama M, Fukuda Y, Ohta T, Sato K, Ainai A, Suzuki T, Hasegawa H, Toyama-Sorimachi N, Kohara H, Nagasawa T, Kaisho T.	Spi-B is critical for plasmacytoid dendritic cell function and development.	Blood.	120(24)	4733-43	2012
van Riet E, Ainai A, Suzuki T, Hasegawa H.	Mucosal IgA responses in influenza virus infections; thoughts for vaccine design.	Vaccine.	30(40)	5893-900	2012
Senchi K, Matsunaga S, Hasegawa H, Kimura H, Ryo A.	Development of oligomannose-coated liposome-based nasal vaccine against human parainfluenzavirus type 3.	Front Microbiol.	4	346	2013

<p>Ainai A, Tamura S, Suzuki T, van Riet E, Ito R, Odagiri T, Tashiro M, Kurata T, Hasegawa H.</p>	<p>Intranasal vaccination with an inactivated whole influenza virus vaccine induces strong antibody responses in serum and nasal mucus of healthy adults.</p>	<p>Hum Vaccin Immunother.</p>	<p>9(9)</p>	<p>1962-70</p>	<p>2013</p>
<p>Niikura K, Matsunaga T, Suzuki T, Kobayashi S, Yamaguchi H, Orba Y, Kawaguchi A, Hasegawa H, Kajino K, Ninomiya T, Ijiri K, Sawa H.</p>	<p>Gold nanoparticles as a vaccine platform: influence of size and shape on immunological responses in vitro and in vivo.</p>	<p>ACS Nano.</p>	<p>7(5)</p>	<p>3926-38</p>	<p>2013</p>
<p>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.</p>	<p>The host protease TMPRSS2 plays a major role in in vivo replication of emerging H7N9 and seasonal influenza viruses.</p>	<p>J Virol.</p>	<p>88(10)</p>	<p>5608-16</p>	<p>2014</p>
<p>van Riet E, Ainai A, Suzuki T, Kersten G, Hasegawa H.</p>	<p>Combatting infectious diseases; nanotechnology as a platform for rational vaccine design.</p>	<p>Adv Drug Deliv Rev.</p>	<p>74</p>	<p>28-34</p>	<p>2014</p>

Hasegawa H, van Reit E, Kida H.	Mucosal immunization and adjuvants.	Curr Top Microbiol Immunol.	386	371-80	2015
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
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	e1003150	2013
Sasaki, T., Setthapramote, C., Kurosu, T., Nishimura, M., Asai, A., Omokoko, MD., Pipattanaboon, C., Pitaksajakul, 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

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	e77892	2013
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 α -sheet epitope region underneath the receptor binding site of influenza A virus.	Biologic: Targets and Therapy	7	233-241	2013
Ohshima, N., Kubota-Koketsu, R., Iba, Y., Okuno, Y., Kurosawa, Y.	Binding near the sialic acid-binding pocket and neutralizing both H1N1 and H5N1 viruses.	PloS One	9	e87305	2014
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	2014

<p>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.</p>	<p>Humoral immune response to influenza A(H1N1)pdm2009 in patients with natural infection and in vaccine recipients in the 2009 pandemic.</p>	<p>Viral Immunology</p>	<p>27</p>	<p>368-374</p>	<p>2014</p>
<p>Haredy, AM., Yamada, H., Sakoda, Y., Okamatsu, M., Yamamoto, N., Omasa, T., Mori, Y., Kida, H., Okamoto, S., Okuno, Y., Yamanishi, K.</p>	<p>Neuraminidase gene homology contributes to the protective activity of influenza vaccines prepared from the influenza virus library.</p>	<p>J Gen Virol</p>	<p>95</p>	<p>2365-2371</p>	<p>2014</p>