

ブタ毒素原性大腸菌下痢症予防食べるワクチンの開発研究

東京大学医科学研究所

幸 義和

目的:

コレラトキシンB鎖 (CTB) 発現米の経口投与によって誘導された抗体の交差免疫を利用したブタ毒素原性大腸菌下痢症予防食べるワクチンのコンセプトを確立する。そのために、(1) 均一高発現ワクチン米とその遺伝子を用いたマーカーフリー米の開発し、(2) ワクチン米を用いた母ブタ及び子ブタでの防御免疫の誘導を示す。

結果:

- ① ワクチン米を均一かつ高発現でき原薬に必要な品質をもつマーカーフリー米を開発することに成功し、発現されたワクチンの構造を決定した。
- ② このワクチン米をマウス、サルに経口免疫することで、細菌性腸管下痢に対する防御免疫が誘導できた。
- ③ 20 日齢、2 か月齢ブタにワクチン米を胃内強制経口投与または混餌投与により、抗原特異的全身系 IgG 抗体及び筋肉注射免疫では誘導できない腸管粘膜 IgA 抗体が誘導でき、毒素病原性大腸菌の腸管ループレンジ試験で有意に下痢予防が達成された。
- ④ 妊娠母ブタへの混餌投与で、抗原特異的血清 IgG 及び IgA のほか、分娩後でのミルクに抗原特異的 IgA が誘導できた。

結論:

以上のことから、妊娠母ブタへの経口免疫により生後直後及びほ乳期は母ブタからの血清及びミルクからの受動免疫により、その後離乳期は経口能動免疫

により防御する戦略が考えられる。

公表論文:

Nochi T. et al. Rice-based mucosal vaccine: a new global strategy for cold-chain and needle free vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104: 10986-10991 (2007)

Yuki Y. et al. Oral MucoRice expressing double-mutant cholera toxin A and B subunits induces toxin-specific neutralising immunity. *Vaccine*. 27:5982-5988 (2009).

Nochi T. et al. A rice-based oral cholera vaccine induces macaque-specific systemic neutralizing antibodies but does not influence pre-existing intestinal immunity. *J.Immunol*. 183:6538-6544 (2009).

Tokuhara D. et al. Secretory IgA-mediated protection against *V. cholerae* and heat-labile enterotoxin-producing enterotoxigenic *Escherichia coli* by rice-based vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 107: 8794-8799 (2010).

Yuki Y. et al. RNAi suppression of rice endogenous storage proteins enhances the production of rice-based Botulinum neurotoxin type A vaccine. *Vaccine*. 30:4160-4166 (2012).

in silico およびナノ粒子を用いた新しい牛白血病ワクチン開発

竹嶋伸之輔¹・金智潤¹・蛇島武久¹・萩原恭二¹・松本有生¹・多田誠一²・Pallavi Ananda²・伊藤嘉浩²・沖本憲明³・山岸純也³・弓場英司⁴・河野健司⁴・大森崇司⁵・布谷鉄夫⁵・的場和弘⁶・間陽子¹

¹理研 分子ウイルス

²理研 伊藤ナノ医工

³理研 計算分子設計

⁴阪府大院 工

⁵日生研

⁶畜草研 草地管理

牛白血病ウイルス(BLV)は悪性 B リンパ腫である地方病性牛白血病(EBL)を惹起するレトロウイルスである。BLV 感染牛は長い潜伏期間の後に約5%が白血病発症に至るが、有効な治療法は無く発症すると必ず死の転帰をとることから畜産界に与える打撃は深刻である。しかも、EBL の予防法・治療法は未だ確立されておらず、BLV は全世界に蔓延し、感染率・発症率は増加の一途を辿っており、被害は拡大する一方である。最近、我々は EBL の発症に対して感受性・抵抗性を規定するウシ主要組織適合遺伝子(MHC)クラス II の対立遺伝子を同定した。さらに興味深いことに、感受性対立遺伝子を有する個体はプロウイルス量が有意に高く、感染源となり易いことを明らかにした。

MHC クラス II 遺伝子のコードするクラス II 分子は樹状細胞や B 細胞、マクロファージなどの抗原提示細胞の表面に、プロセッシングされた外来抗原と共に発現し、CD4 陽性 T 細胞を活性化して液性免疫や細胞傷害性免疫を制御する。クラス II 分子の多型性は MHC-抗原-T 細胞受容体の 3 者複合体の結合親和力の多様性を生じさせ、結果的に免疫応答の多様性の原因となっている。我々は、この多型性がワクチン応答性の個体差を生じる原因となっていると予測し、感受性 MHC を有する個体で免疫誘導可能なペプチドワクチンの開発を行うこととした。

始めに感受性 MHC を有する BLV 感染牛を用いて、BLV Env 蛋白質および Gag 蛋白質を用いて抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞刺激試験を行ったところ、Gag 蛋白質で良好な結果が得られたことから、始めに Gag 蛋白質のオーバーラッピングペプチドを作製し、CD4 エピトープの探索を行い、p12-4 ペプチドを同定した。さらに BLV 抗原を用いて 1 ヶ月間刺激培養を行った BLV 反応性 T 細胞を用いて Env 蛋白質のエピトープマッピングを行った結果、Gp51 配列の 12 番目から 39 番目までの残基由来の

gp51p12～gp51p20 の 9 種類のアミノ酸配列がいずれも効果的に免疫を誘導できるペプチドとして同定された。

続いて、得られたエピープと感受性 MHC 分子との結合様式を、ホモロジーモデリング技法と分子動学的解析を駆使して予測し、p12-4 および Gp51p7-p27 を感受性 MHC に結合しやすいように改変し、ワクチン候補ペプチドとして p12-4A、p12-4R1、p12-4R2、Gp51pep、Gp51pepR1、Gp51pepR2 および Gp51pepR3 の 6 種類を設計した。これらのペプチドを用いて再度 CD4 細胞刺激試験を行った結果、p12-4R1 および Gp51pepR1 が最も成績が良かったことから、これら 2 種類をワクチン投与試験に用いることとした。

一方、ペプチドは血清中で安定性が低く、容易に分解されてしまうことから、何らかのペプチドワクチン抗原輸送担体が必要であると考えられた。その候補として我々は、炭酸アパタイト、コレステロール修飾ゼラチン、3-メチルグルタリル化高分枝ポリグリシドール (MGIu-HPG) 修飾リポソームの 3 種類のナノ粒子を選択し、これらのワクチン輸送担体としての能力を評価した。具体的には、樹状細胞によるマウス骨髄由来樹状細胞を用いて細胞内の取り込みを評価するとともに、マウスを用いた免疫実験により抗体産生と *in vitro* での抗原再刺激に対する免疫応答能を比較検討した。その結果、抗原をナノ粒子で抱合することにより、抗原単独よりもはるかに効率的に樹状細胞に取り込まれ、マウスに効果的に抗原特異的免疫応答を誘導する事が明らかとなった。また、その程度の差異から、炭酸アパタイトがペプチドワクチンの抗原輸送担体として最も効果的であると考えられた。さらに、炭酸アパタイトに内包した OVA で免疫したマウスをもちいて遅延型アレルギー応答を測定したところ、明らかな足蹠の腫脹が見られた事から、Th1 型免疫応答を誘導する事が強く示唆された。これらのことから、炭酸アパタイトがワクチン輸送担体として非常に可能性を秘めていることが示唆された。今後、p12-4R1 および Gp51pepR1 を内包させた炭酸アパタイトのワクチンとしての効果を、マウスおよびウシを用いた感染実験により検証してゆく予定である。

MHC が規定する高発症リスク個体を標的にしたワクチン開発の手法は、同様な特徴を持つ乳房炎や成人 T 細胞白血病など様々な感染症の治療の道を拓くと期待される。また、炭酸アパタイト等の pH 応答性生分解性ナノ粒子は、抗原の安定性の向上や、細胞内での効果的な抗原の放出を通してワクチン効果の増強や、Th1/Th2 バランスの制御など、様々な応用が期待される。

MIF を分子標的にした DNA ワクチンの開発と臨床応用に向けて

北海道情報大学医療情報学科 西平 順

北海道大学大学院運動機能再建医学分野 小野寺 伸

北海学園大学工学部 小山 芳一

サイトカインは免疫細胞をはじめとする種々の細胞から産生される生理活性物質である。一つのサイトカインは多様な生理活性を示し、リンパ球、マクロファージ、NK細胞、好中球など免疫系の細胞の増強により、抗ウイルス作用や抗腫瘍作用など生体防御に関わることも知られている。さらにサイトカインどうしが相互に作用するという特徴をもち、生体防御の恒常性維持に貢献している。一方、炎症性サイトカインは炎症惹起作用を有し、関節リウマチなどの自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患、悪性腫瘍、動脈硬化など様々な疾患の病態形成への関与が明らかにされている。抗原感作により活性化したモルモットのリンパ球培養上清中でマクロファージの遊走を抑制するサイトカインとして 1966 年に発見されたマクロファージ遊走阻止因子(以下、MIF と略記)は、炎症性サイトカインとして上記のさまざまな病態に関与することが報告されている。また、MIF は自然免疫と獲得免疫の両方にわたって関与することや、複数の酵素活性を同一分子にもつ特殊なペプチド性の生理活性物質であることも知られている。

MIF が生体防御反応の最初の段階で役割を果たすゲートキーパーであるという仮説の元に、鋭意自己免疫疾患を含む炎症性疾患の患者の解析研究を進めてきた結果、アトピー性皮膚炎患者、関節リウマチ患者および潰瘍性大腸炎患者の血液中に存在する MIF に対してその活性を中和する能力をもつ抗体の量が有意に少ないという現象を見出した。そこで、我々は MIF に対する DNA ワクチンを開発することにより、

患者自身に抗体を作らせる治療戦略を考案した。遺伝子工学技術の進歩により DNA ワクチンが開発されているが、DNA ワクチンとしては組み換えプラスミドを用いたものが一般的であり、目的の抗原をコードする DNA を含む組み換えプラスミドを生体内に投与することによって、生体内で当該 DNA によってコードされる抗原性を有するアミノ酸配列が発現し、このアミノ酸配列により免疫反応が生体内で惹起される。ある特定のプラスミド DNA ワクチンを生体に投与しても、喚起される免疫反応の程度は一定ではなく、試験動物の種類、DNA の種類、並びに接種方法などにより免疫反応の程度は多様であり、DNA プラスミドが DNA ワクチンとして有用であるかどうかを予測することは一般に困難である。本研究では、敢えて MIF の産生を調整するポリペプチドの一部または全部を発現するベクターからなる DNA ワクチンを用いた炎症性疾患の予防または治療方法の開発に着手し、これまで関節リウマチやアトピー性皮膚炎などの疾患モデル動物でその有用性を明らかにしてきた。

これらの研究成果は、MIF が関与する様々な炎症性疾患や難治性疾患に治療薬として活用される可能性を示唆しており、DNA ワクチンの有効性と安全性が確認された場合、その臨床応用の意義は極めて大きい。本シンポジウムでは、MIF の分子機能と疾患の病態形成への関与を紹介し、MIF を標的にした DNA ワクチンの開発と有効性についてアトピー性皮膚炎や関節リウマチの疾患モデル動物を対象にした研究データを紹介し、将来の臨床応用の可能性について述べる。

鶏大腸菌症不活化ワクチン(点眼接種用不活化ワクチン)

株式会社 微生物化学研究所(京都微研)

矢口 和彦

鶏大腸菌症は呼吸器病や敗血症及び滲出性深層性皮膚炎の原因となる経済的被害が大きな疾病である。しかしその血清型の多様性や病性の複雑さから、鶏大腸菌症は予防が困難な感染症として全国的に問題となっている。

そこで我々は、肉用鶏にも適用可能であり接種反応がほとんど認められないワクチンを開発して鶏大腸菌症防遏に貢献するため、点眼接種用の不活化ワクチンの開発を試みた。

ワクチン株の作出過程は次のとおりである。平成 11 年 11 月宮崎県下で敗血症を呈した 30 日齢の肉用鶏の心外膜から分離した大腸菌を継代しワクチン用抗原株とした。当株を培養後破碎、不活化した抗原にリン脂質を主成分とするアジュバントを加えたワクチンを鶏に点眼接種したところ、本ワクチンの有効性(抗体応答、強毒株攻撃時の大腸菌症の発症軽減効果)および安全性が認められたため開発に至った。

野外においても本ワクチンの有効性および安全性が確認され、平成 18 年に本ワクチンの製造が承認された(“京都微研, ポールセーバーEC、一般的名称:鶏大腸菌症(078 全菌体破碎処理)(脂質アジュバント加)不活化ワクチン)。

そこで当シンポジウムでは、本ワクチンの鶏における室内試験成績及び野外における使用成績を中心に報告する。

鶏サルモネラ症に対するリポソーム点眼ワクチン

大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科

渡来 仁

要旨

感染症の多くは粘膜を介して感染する。そのため粘膜感染を防止できる粘膜ワクチンは感染症を予防する上で特に有効である。従来から行われている注射によるワクチンは、全身免疫を効率よく誘導できるが、病原微生物の感染部位である粘膜局所には免疫応答を誘導できない。鶏サルモネラ症においても、感染のほとんどが腸管や卵管などの粘膜に限られるため、粘膜免疫を誘導出来ない従来のワクチンでは感染防御が不十分であり、持続感染を起こしてしまう。またサルモネラは、細胞内寄生菌であるため、細胞性免疫を効率よく誘導できるワクチンが鶏サルモネラ症を防ぐ上で重要である。ワクチン接種により細胞性免疫を誘導するためには、投与したワクチン抗原が生ワクチンの様に細胞質内へ内在化されなければならない。これまで開発されている鶏サルモネラ症に対するワクチンは、不活化ワクチンであるため細胞性免疫を誘導できない。そのため、十分な防御効果が得られず、容易にサルモネラの感染を許してしまう。鶏サルモネラ症の予防を確実なものにする免疫応答を誘導するためには、経粘膜的に粘膜免疫誘導組織へ効率よくワクチン抗原をデリバリーし、抗原提示細胞である樹状細胞内に抗原を内在化できるシステムの構築が重要となる。

近年、ドラッグデリバリーシステム(DDS)としての機能を持つリポソームが、粘膜免疫誘導組織にワクチン抗原を送達させるシステムとして注目されている。リポソームは脂質二重層から成る人工マイクロカプセルであるため、種々の病原体の抗原決定基をもつ物質をその膜上に再構成することができるだけでなくカプセル内に封入

することもできる。この様なリポソームは、免疫担当細胞への抗原の提示をより有効なものとするように働く。そのため、ワクチンキャリアとしてのリポソームの応用研究が多くなされている。しかしながら、これまでのワクチンキャリアとしてのリポソームでは免疫応答の誘導が不十分であり問題があった。そこで我々は、効率の良い免疫誘導能をリポソームに持たせるために、新たに pH 感受性膜融合高分子を構築した。pH 感受性膜融合高分子を修飾したリポソーム (pH 感受性膜融合リポソーム) は樹状細胞に対して指向性を持ち、封入抗原を樹状細胞の細胞質内に出来る。そのため、高い免疫応答 (細胞性免疫応答 (Th1 免疫) ならびに液性免疫応答 (Th2 免疫)) を誘導できる事が示された。また、pH 感受性膜融合リポソームは経粘膜投与においても Th1・Th2 免疫応答の誘導が可能であり、感染症予防のための新規のリポソーム粘膜ワクチンとして有用である事が明らかとなった。

本シンポジウムにおいては、pH 感受性膜融合リポソームが、鶏のサルモネラ予防に効果的な免疫応答を誘導できる粘膜ワクチン (リポソーム点眼ワクチン) として機能すること、さらに、野外類似環境下で飼育した試作ポソーム点眼ワクチン免疫鶏においては、サルモネラの自然感染を防御できる事を明らかにしたので、その研究成果について紹介したい。

鶏大腸菌症生ワクチンの投与経路について

一般財団法人 日本生物科学研究所

研究開発部 永野 哲司

鶏大腸菌症は養鶏産業において経済的損耗の大きい重要な疾病であり、その発生羽数は年々増加の一途を辿っている。ブロイラーにおける被害は深刻で、本症が農場で発生した場合、急性や亜急性の病態によって育成率の低下や増体率の減少などを招く。さらに、出荷された処理場での食鳥検査では、蜂窩織炎や多発性漿膜炎のような大腸菌症によって解体禁止や全廃棄の措置が取られる事例が著しく増加している。近年はレイヤーでも発生事例が報告され、産卵成績への影響が懸念されている。このような鶏大腸菌症への対策について様々な手法が検討されてきたが、未だ決定的な対応策を見つけきれないのが現状である。

我々は、鶏大腸菌症を予防あるいはその症状を少しでも軽減することを目的として、遺伝子組換え操作により弱毒株を作出し、生ワクチンとして応用することを試みた。ワクチン株の親株として抗生物質に感受性を示すだけでなく鶏に対する病原性が比較的弱い株を選出し、その染色体 DNA 上にあるサイクリック AMP レセプタータンパク質 (CRP) 遺伝子を部分的に欠損させることで、免疫原性を維持したまま病原性が減弱したワクチン株である鶏大腸菌 AESN1331 株を作出することに成功した。この株は CRP 遺伝子の欠損により、各種の生化学的な性状が喪失し、鶏に対する LD50 が上昇した上に鶏体内での生残性も減衰していた。

本株を 4 日齢のヒナに噴霧、散霧あるいは点眼用法で 4 週間隔 2 回投与した場合、投与鶏に臨床的な異常は認められず、2 回投与後 2 週における野外強毒株の静脈内攻撃に対して強固な防御免疫が付与されていることが明らかとなった。また、免疫鶏には菌体抗原に対する血中抗体が上昇していることも確認された。噴霧投与につ

いてさらに検討した結果、2 回投与後 3 日の時点で免疫が成立していることが確認され、投与間隔については 3 週間隔以上であれば有効な防御免疫を付与できることが判明した。

これらの結果をふまえて、本株の投与方法についていくつかの検討を行った。まず始めに、本株を 19 日目の発育鶏卵に卵内接種した場合、発育鶏卵からヒナは正常に孵化しただけでなく、4 週齢時における野外強毒株の静脈内攻撃に対して強固な防御免疫が付与されていることが明らかとなった。これら卵内免疫鶏においても攻撃時点では菌体抗原に対する血中抗体が確認された。一方、孵化直後のヒナに対して、本株を皮下投与した鶏では臨床症状を発現することはなかったものの、防御免疫は付与されなかった。また、本株を経口で 2 回投与した場合、臨床的な異常を示すことはなかったが、有効な防御免疫を付与することはできなかった。しかし、初回噴霧投与後に第 2 回目の投与を飲水で行った場合は、強毒株の攻撃に対する防御免疫を付与することができた。

鶏大腸菌症生ワクチンは、噴霧・散霧といった用法で有効な防御免疫を鶏に付与するものであるが、注射を除きその他いくつかの投与方法も適用できる可能性が示された。これは、本株が死菌とは異なり、生きた状態で粘膜あるいは免疫細胞に刺激を与えていることによるものと推察している。本株投与後に菌体に対する抗体が産生されていることは確認できたものの、その他にどのようなメカニズムが働いているかは未だ不明であり、今後の解析が必要である。

要旨

ワクチンの投与方法として広く一般的に用いられているのは注射によるものである。

しかしながら、注射による投与方法の欠点は、痛みや出血を伴うことなどである。

それらの欠点を克服するものとして、経口ワクチン、経鼻ワクチン、経皮(貼る)ワクチンがあり、それぞれの利点を活かした研究開発が進んでいる。

経皮ワクチンには、針を用いないものと短く細い針(マイクロニードル)を用いたものがある。

そのマイクロニードルの材質としては、金属やプラスチックなどが利用されている。

ここではマイクロニードルワクチンの研究開発の状況について紹介する。