

目次

第1部 総論の部.....	1
第1章 緒言	1
第2章 粘膜投与型ワクチンの安全なアジュバントとしてのテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の設計	11
第1節 テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の合成および物性評価.....	11
1-1) 序論	11
1-2) テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の合成.....	12
1-3) テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の物性評価	12
第2節 テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸のアジュバント活性の実証.....	18
2-1) 序論	18
2-2) アジュバント活性に及ぼすオクタアルギニンの光学活性並びに高分子プラットフォームの変更の影響.....	19
2-3) アジュバント活性に及ぼすテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の投与量の影響	22
2-4) テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の構成成分のアジュバント活性の評価	23
2-5) 異種インフルエンザウイルスに対する鼻粘膜上 IgA の交叉反応性.....	24
第3節 テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の安全性評価	26
3-1) 序論	26
3-2) 細胞毒性試験 (WST-1)	27
3-3) コロニー形成阻害試験	29
3-4) 小核試験	31
3-5) 復帰突然変異試験 (Ames 試験)	33
第4節 小括.....	35

第3章 異種インフルエンザウイルスの感染に対するテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の粘膜アジュバントとしての感染防御および重症化予防効果の実証.....	38
第1節 異種インフルエンザウイルスの感染に対するテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の粘膜アジュバントとしての感染防御および重症化予防効果の実証.....	38
1) 序論.....	38
2) 異種インフルエンザウイルスに対する感染実験のデザイン.....	39
3) PR8株曝露後の生存率の推移.....	40
4) PR8株曝露後の体重の推移.....	41
5) 免疫誘導のために投与されたNCL株に対する抗体価.....	44
6) PR8株に対する抗体価.....	47
7) IgAの交叉反応性.....	49
8) IgGのサブタイプ解析.....	52
9) PR8株への感染の有無に関する考察.....	53
第2節 小括.....	56
第4章 総括.....	58
第2部 実験の部.....	63
謝辞.....	77
引用文献.....	78
論文目録.....	83

第1部 総論の部

第1章 緒言

インフルエンザウイルスは上気道粘膜から感染して季節性の感染症を引き起こすウイルスであり、そのワクチンが広く普及している現代においても、毎年多くの感染報告がある。2018年の世界保健機関（WHO）の報告では、年間で300万～500万人が罹患し、約29万～65万人が死亡している¹⁾。

インフルエンザウイルスはオルトミクソウイルス科に属するRNAウイルスであり、ウイルス粒子のタンパク質の違いでA、B、C型に大別される。A型ウイルスにおいては、膜タンパク質である16種のヘマグルチニン（H）と9種のノイラミニダーゼ（N）の組み合わせの違いによる亜型が多数存在しており（H1N1、H3N2、H7N9、etc…）、同じ亜型であっても遺伝子レベルの違いにより、さらに多くの株に分類される²⁾。

臨床で用いられている注射型インフルエンザワクチンは、WHOの流行予測に基づき、A型インフルエンザウイルスのH1N1株およびH3N2株を1株ずつ、B型インフルエンザウイルスの系統が異なる2株の計4株のインフルエンザウイルスからヘマグルチニン（HA）を抽出したスプリットワクチンである。過去10年間のインフルエンザワクチンに使用された株をTable 1に示す。ワクチン接種により血液中に産生された免疫グロブリンG（IgG）は、呼吸器系粘膜を介して体内に侵入したウイルスを排除し、感染に伴う症状の重症化を抑える。しかし、Figure 1に示すように、同IgGは、ワクチンに含まれているウイルス株への反応性は高いものの、ワクチンに含まれていないウイルス株への反応性は低い。このため、WHOの流行予測が外れると、インフルエンザが流行する。2009年、新型インフルエンザのパンデミック（世界的大流行）が起こり、そのときの死者は世界中で30万人弱と見積もられている³⁾。このパンデミックの原因となったウイルス株は、A/California/7/2009として単離されたH1N1株であり、Table 1に示す通り、パンデミック翌年から7年間に渡って、インフルエンザワクチンに組み入れられた。2009年以降、インフルエンザのパンデミックは起きていないが、新型ウイルスに対する注射型ワクチンの脆弱性は依然として改善されていない。また、前述の通り、IgGはワクチンに含まれるウイルス株への感染に伴う重症化を抑えるものの、ウイルスの侵入部位である粘膜上に分泌されないため、注射型ワクチンを接種しても感染自体を予防することはできない。

Table 1. WHO-recommended virus strains for vaccines.

Influenza season	Influenza virus strains			
	A/H1N1	A/H3N2	B	
2008-2009	A/Brisbane /59/2007	A/Brisbane/10/2007	B/Florida/4/2006	
2009-2010			A/Perth/16/2009	
2010-2011	A/Victoria/361/2011	B/Wisconsin /1/2010		
2011-2012			A/Texas/50/2012	
2012-2013	A/Switzerland /9715293/2013	B/Phuket /3073/2013		
2013-2014			A/Hong Kong /4801/2014	
2014-2015	A/Singapore /INFIMH-16-0019/2016	B/Colorado /06/2017		
2015-2016			A/Brisbane /02/2018	
2016-2017	A/California /7/2009	A/Michigan /45/2015		
2017-2018			A/Brisbane /59/2007	
2018-2019	A/Victoria/361/2011	A/Texas/50/2012		
2019-2020			A/Switzerland /9715293/2013	A/Hong Kong /4801/2014

※H、N はそれぞれヘマグルチニンとノイラミニダーゼの型を表し、ウイルス株の名称は、「型/ウイルス株が分離された地域/ウイルス株の番号/ウイルスが分離された年」で表わされる。

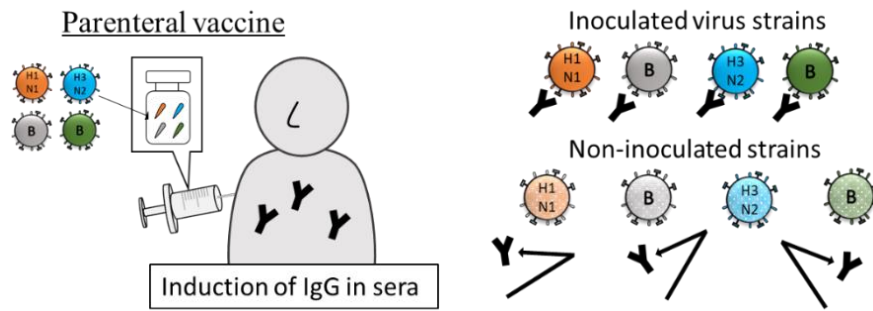


Figure 1. Reactivity to viruses of IgG induced by parenteral influenza vaccines.

この問題を解決する手法として、粘膜投与型ワクチンが研究されてきた。Figure 2 に示すように、粘膜にワクチンを接種した場合、血液中に IgG が誘導されるだけでなく、粘膜上に Joining 鎖と Secretory Component により結合された二量体の免疫グロブリン A (IgA) が分泌される。IgA は粘膜上においてウイルスの侵入をブロックすることから、感染自体を防止することができる。さらに、IgA は、投与されたウイルス株だけでなく、異なるウイルス株へも反応する。IgA による交叉反応性の詳細な作用機序は未だ不明な点が多いが、二量体を形成することにより交叉反応性が向上することが知られている。長谷川らによれば、免疫後の鼻粘膜上には、二量体だけでなく三量体や四量体といった多量体の IgA も分泌されていることが確認されており⁴⁾、モノクローナルな IgG、モノクローナルな IgA およびその多量体 IgA の交叉反応性を比較したところ、IgA は多量体を形成することで交叉反応性が向上することが確認されている⁵⁾。WHO の予測と異なるウイルス株の流行やウイルス変異に対して、IgA の交叉反応性は極めて有効な特性である。しかし、ウイルス抗原のみを粘膜上に投与しても、その免疫原性は乏しく、予防に十分な IgA は産生されないため、免疫原に対する反応を増強するアジュバントや抗原キャリアの共投与は不可欠である。

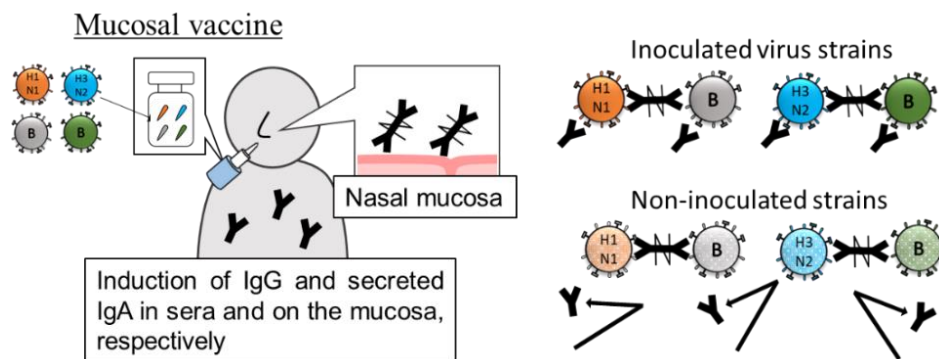


Figure 2. Reactivity of IgG and IgA to viruses induced by mucosal vaccines. (example: nasal vaccination)

世界で初めて臨床で使用されたインフルエンザの経鼻投与型の粘膜ワクチンである Nasalflu[®]は、Berna Biotech 社により開発され、2000年10月、スイスで上市された。イ

インフルエンザウイルスから RNA を取り除いたピロソームを抗原としている本ワクチンには、大腸菌易熱性毒素 (LT) がアジュバントとして含まれている⁶⁾。しかし、上市以降 2001 年 4 月までの間にベル麻痺 (顔面麻痺) が 46 例報告され⁷⁾、現在は臨床使用されていない。本インフルエンザワクチンとは別に、アミノ酸配列を変えて無毒化された LT を用いた HIV (ヒト免疫不全ウイルス) あるいは結核に対するワクチンの Phase 1 試験においてもベル麻痺が認められたことから⁸⁾、この副作用は LT が原因であると考えられている。Nasalflu[®]に代わる粘膜投与型のインフルエンザワクチンとして、2003 年、Flumist[®]が FDA により承認され、現在、欧米諸国で使用されている (日本では第一三共 (株) が 2016 年に承認申請を行っている)⁹⁻¹¹⁾。本ワクチンは、低温馴化した弱毒化インフルエンザウイルスを抗原とする生ワクチンであり (低温下で増殖するように変異したウイルスであり、人の体内温度では増殖しない)、WHO が推奨する 4 種類のウイルス株を含む。注射型ワクチンと異なり、ワクチンに含まれている株以外のウイルス株に対しても感染予防効果が高く、例えば、6 ヶ月から 5 歳の子供を対象に実施された臨床試験において、Flumist[®]投与群の感染者数は注射型ワクチン投与群の約半数であったことが報告されている¹²⁾。しかし、生ワクチンは潜在的に危険性を有することから、Flumist[®]の適応は 2~49 歳に限定され、乳幼児や高齢者といった免疫力が弱いハイリスクパーソンに使用することができない。

安全な粘膜投与型ワクチンの抗原として、熱や薬剤で死滅処理した不活化ウイルスやウイルスから抽出した成分を用いることが望まれるが、前述の通り、生きたウイルスに比べて免疫原性が低いため、アジュバントとの共投与が不可欠になる。古典的には、コレラトキシン B サブユニット (CTB) のアジュバントとしての開発が進められていたが¹³⁾、毒性が強く、現在では動物実験のポジティブコントロールに留まっている。長谷川らは、二本鎖 RNA の poly(I:C) のアジュバントとしての可能性を精査し、インフルエンザ HA 抗原 (臨床で用いられているスプリットワクチン) とマウスに共投与した結果、抗原に用いたウイルス株に対する防御効果のみならず、同一亜型内の異なるウイルス株に対しても防御効果があることを見出した¹⁴⁾。また、長谷川らは、poly(I:C) の類縁体で、副作用がより少ない Ampligen[®]についても同様に検討し、抗原として用いたスプリットワクチンに含まれていない亜型である H5N1 の重症化を予防すること、つまり、亜型を超えて交叉防御することを報告している^{15,16)}。

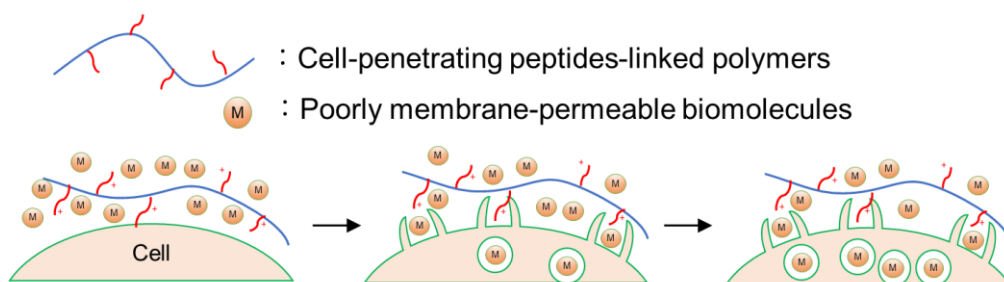
これまでに研究されているアジュバントは、その活性においては十分な効果を発揮している。一方、poly(I:C) や Ampligen をアジュバントとして用いた粘膜投与型ワクチンは臨床応用に至っておらず、poly(I:C) から Ampligen への切り替えを行っていたことから、いずれも毒性の問題を抱えていると類推される。LT などの細菌系毒素で見られた毒性に限らず、アジュバントの開発においては、優れた安全性の獲得が大命題であると考えられる。

免疫力を高めるアジュバントとは異なり、粘膜細胞への抗原の吸収量を向上させる抗原キャリアも粘膜ワクチンとして研究されている。主な抗原キャリアとして、リポソームやエマルジョン、NasalFlu[®]に使用されたピロソームなどが挙げられる。古くから研究されてき

たりポソームは、化粧品や医薬品として販売されており、脂質膜の組成を変えることで様々な物性を付与できる多様性が大きな利点である¹⁷⁾。粘膜ワクチンの抗原キャリアとして用いる場合、汎用されているリポソーム組成ではデリバリー効率が低いため、正電荷を付与したカチオン性リポソームがよく用いられる。しかし、その強い正電荷は、毒性の原因となる。正電荷以外の手法でデリバリー効率を改善したリポソームとして、インフルエンザウイルスのエンベロープを利用したビロソームがあり、インフルエンザウイルス同様、シアル酸を介して細胞内にデリバリーされる。粒子自体にヘマグルチニンやノイラミニダーゼが含まれているため、抗原としても機能し、アジュバントを内包することで免疫効率を向上させることができる¹⁸⁾。インフルエンザワクチンでの利用に有効なキャリアであるが、インフルエンザウイルスの成分からなるため、高純度の成分抽出に対する生産コストがかかる。安価で調製が簡便なキャリアとしてはエマルジョンが挙げられ、皮下投与型ワクチンのアジュバントとしても臨床使用されている（2009年のパンデミックインフルエンザに対する措置として緊急輸入されたワクチンには、MF59 アジュバントというオイルエマルジョンが含まれている）¹⁹⁾。しかし、エマルジョンの低い安定性、調製時における抗原の構造の破壊等、いくつかの問題を抱えている。抗原キャリアを用いた臨床試験に関して、Hadassah Medical Organization によるリポソーム製剤の経鼻ワクチンの試験が報告されている。Phase 2 試験まで進んだようであるが、その後の進展の報告はない²⁰⁾。抗原キャリアについても一長一短があり、製剤研究者を中心に、その改善が進められていると思われる²¹⁾。

一方、著者が所属する研究室ではこれまで、ペプチド、タンパク質、抗体などのバイオ医薬に代表される低膜透過性分子の経粘膜吸収を促進する新規の吸収促進剤として、膜透過ペプチド固定化高分子の研究を行ってきた。膜透過ペプチドとは、アルギニンやリジンなどの塩基性アミノ酸に富む 10 残基程度のカチオン性オリゴペプチドである。HIV の研究において、1988 年、HIV 由来の Transactivator of transcription (Tat) protein が細胞膜を効率的に透過することが見いだされ²²⁾、同タンパク質の一次構造をもとにさまざまな膜透過ペプチドが開発されている。ペネトラチンやオリゴアルギニンなどが代表例であり^{23,24)}、膜透過ペプチドは、マクロピノサイトーシス（細胞が本来備えている貪食作用の一つであり、負電荷を有する細胞膜表面に静電的相互作用により濃縮された正電荷の分子が細胞内に取り込まれる現象）により細胞内へ取り込まれることが報告されている^{25,26)}。著者が所属する研究室の代表者は、Figure 3 に示す「細胞膜上に滞留することによりマクロピノサイトーシスを繰り返し誘導し、共存する低膜透過性分子の細胞内取り込み/経粘膜吸収を飛躍的に促進する」という独自のコンセプトに基づき、オリゴアルギニンを高分子に固定化した新規の膜透過促進剤の研究を開始した。オリゴアルギニンとして D-オクタアルギニン、支持体として合成高分子の N-ビニルアセトアミドとアクリル酸の共重合体（poly(N-vinylacetamide-co-acrylic acid): PNVA-co-AA）を用いて、共同研究先の（株）ADEKA と協力し、第一世代の膜透過ペプチド固定化高分子である D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA (Figure 4a) を創製した。D-オクタアルギニンの末端アミノ基と PNVA-co-AA のカ

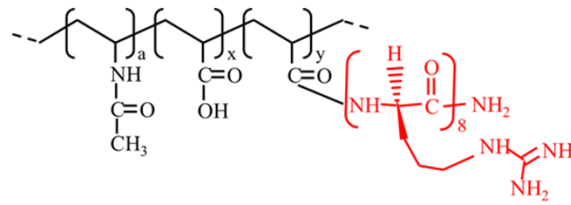
ルボキシル基との間にグリシンスペーサーを導入することにより、D-オクタアルギニンの固定化率を上げることに成功している（例えば、テトラグリシン-D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA では、PNVA-co-AA のすべてのカルボキシル基が D-オクタアルギニンによって化学修飾されている）。マウス経鼻投与でのバイオアベイラビリティ（BA）が1%に満たないタンパク質医薬のエキセンジン-4（GLP-1 アナログ）の吸収性が、D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA と混合して共投与することにより約 25 倍に改善されるなど、膜透過ペプチド固定化高分子の膜透過促進剤としての有用性は既に確認されている²⁷⁻³⁰。



1. The membrane surface of cells is exposed to a mixture of biomolecules and cell-penetrating peptide-linked polymers.
2. Recognition of peptidyl branches conjugated to polymers triggers off macropinocytosis on cell membranes.
3. Since macropinocytosis proceeds extensively in the multiple peptide access points of the single-stranded polymers, cells fail in uptake of peptides anchored chemically to the polymeric platform.
4. Instead, a series of macropinocytotic processes results in the incidental uptake of biomolecules located in the periphery of the cell membrane-recognized peptidyl branches.
5. The unaccomplished uptake of cell-penetrating peptides anchored to the polymeric platform occur again and again as long as cell-penetrating peptide-linked polymers remain on cell membranes.
6. A significant amount of biomolecules is consequently internalized into cells through repeated cellular uptake.

Figure 3. An enhancement mechanism on membrane penetration of biomolecules by cell-penetrating peptides-linked polymers.

(a) D-Octaarginine-linked PNVA-co-AA



(b) Tetraglycine-D-octaarginine PNVA-co-AA

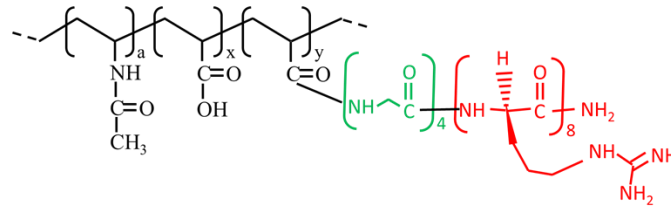


Figure 4. Chemical structure of D-octaarginine-linked PNVA-co-AA (a) and tetraglycine-D-octaarginine-linked PNVA-co-AA (b).

不活化ウイルスやウイルス抽出成分を用いたワクチンが生ワクチンよりも免疫原性が劣る要因として、投与部位である粘膜の透過性や免疫細胞への取り込みが低いことが想定される。そこで、著者が所属する研究室の代表者は、粘膜投与型ワクチンのアジュバント/抗原キャリアとしての D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA の有用性についても、並行して研究してきた。これまでの研究から、①抗原としてのインフルエンザウイルス HA ワクチンと D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA の混合物をマウス鼻腔内に 7 日間隔で 4 回投与すると、抗原特異的な IgG および IgA がそれぞれ、血液中および鼻粘膜上に産生されること（最終投与から 1 週間後に抗体価測定）(Figure 5a,b)³¹、②抗原としての不活化 H1N1 インフルエンザウイルスと D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA の混合物をマウス鼻腔内に①と同様に毎週 4 回投与すると、鼻粘膜上に分泌された IgA は、同じ亜型の投与株と異なるウイルス株の HA タンパク質だけでなく、H3N2、H5N1 などの異なる亜型のウイルス株の HA タンパク質にも交叉反応すること（最終投与から 1 週間後に抗体価測定）

(Figure 5c)³²、③不活化した H1N1 A/Puerto Rico/8/34 と D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA の混合物をマウス鼻腔内に①と同様に毎週 4 回投与すると、血中および鼻粘膜上に十分量の IgG および IgA が産生され、マウス馴化した感染性の H1N1 A/Puerto Rico/8/34 に曝露してもマウスはウイルス感染しないこと（最終投与から 1 週間後に抗体価測定およびウイルス曝露）(Figure 5d~f)³³、が明らかとなっている。また、D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA による免疫誘導機構の検討も進め、本高分子は、ヒト気管支腺由来細胞株や樹状細胞株へのタンパク抗原の *in vitro* での取り込みを促進すること、タンパク抗原の *in vivo* での鼻粘膜上の滞留性を向上させることを明らかにしている³⁴。D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA がアジュバントとして機能しているのか、抗原キャリアとして機能しているのか、については、ウイルス学や免疫学を専攻する共同研究者（馬場

昌範 教授（鹿児島大学ヒトレトロウイルス学共同研究センター抗ウイルス化学療法研究分野）および宇都 倫史 准教授（宮崎大学医学部感染症学講座免疫学分野）との間でも議論があったが、樹状細胞株へのタンパク抗原の取り込みを促進することから、アジュバントと定義することが妥当との結論に至っている。

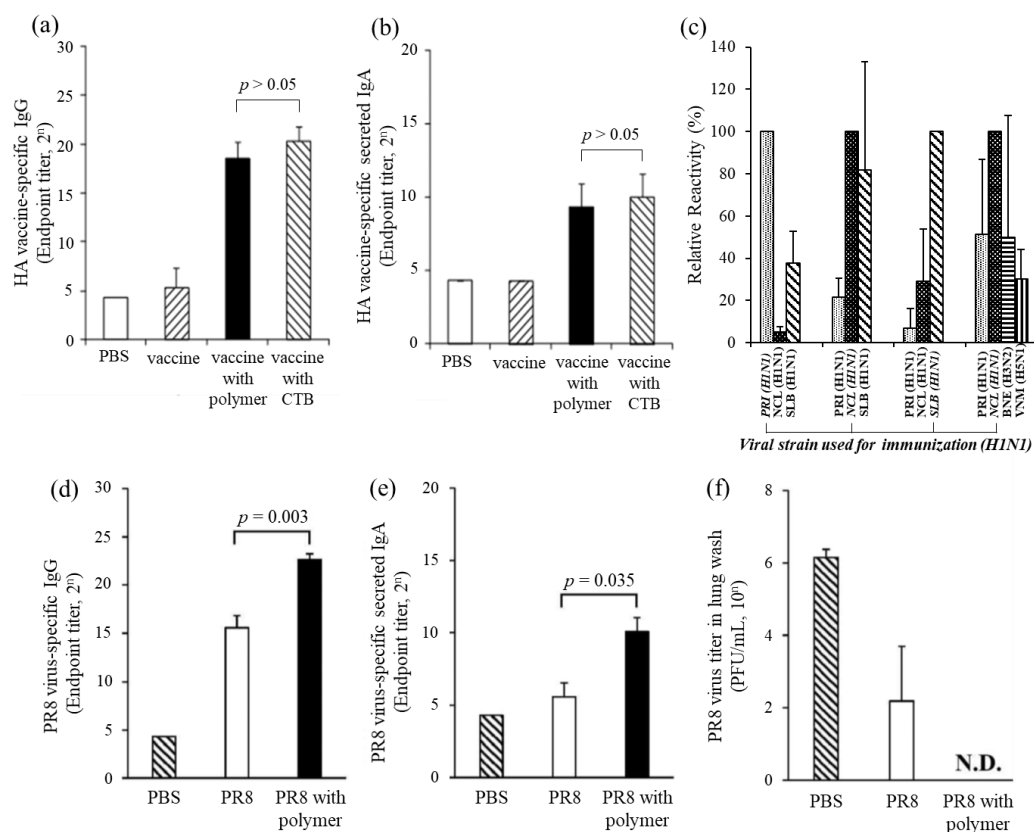


Figure 5. Past researches on D-octaarginine-linked PNVA-co-AA as a mucosal adjuvats. (a, b) Levels of influenza virus HA vaccine-specific IgG in sera and the vaccine-specific secreted IgA in nasal wash fluids, modified from reference 31. (c) Cross-reactivity of intranasal secreted IgA induced by each of inactivated H1N1 influenza viruses in the presence of D-octaarginine-linked PNVA-co-AA, modified from reference 32. (d, e, f) Endpoint titers of PR8 virus-specific IgG in sera and PR8 virus-specific secreted IgA in nasal wash fluids, and virus titers in bronchoalveolar lavage fluids, modified from reference 33.

前述の結果は、免疫活性の観点から、膜透過ペプチド固定化高分子をアジュバントとして用いた経鼻インフルエンザワクチンの実現の可能性を示している。膜透過ペプチド固定化高分子はウイルス抗原の細胞内取り込みを促進しており、その作用は粘膜アジュバントのポジティブコントロールとして汎用されている細胞膜上の GM1 レセプターを介して抗原を取り込む CTB に類似している。不活化ウイルスやウイルス抽出成分を用いたワクチンが

生ワクチンよりも免疫原性が劣る要因として、投与部位である粘膜の透過性や免疫細胞への取り込みが低いことを想定し、膜透過ペプチド固定化高分子を用いた粘膜ワクチンの研究を開始したが、この点において我々の期待した効果が得られたことになる。CTB が示さない粘膜上における抗原の滞留性の向上作用は、活性面においてのさらなる有利な特性である。一方、多くのアジュバントが超えることができなかつた安全性に関する知見は限定的である。膜透過ペプチド固定化高分子は細菌系毒素ではないため、CTB とは異なる毒性プロファイルを示すことが予想されるが、詳細は不明である。また、製剤・DDS 技術系の抗原キャリアとの比較において、例えば正電荷の強さが毒性の原因となるリポソームは、中性付近のゼータ電位が約+10 mV のものを用いた報告もあるが³⁵⁾、+40 mV 付近のものが多く検討されていると思われる^{36,37,38)}。D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA の中性付近のゼータ電位は約+20 mV であり、より弱い正電荷でアジュバント活性を示す可能性があることから、電荷に起因する毒性面で優位性となり得ると考えられる。膜透過ペプチド固定化高分子のアジュバント活性が確認された今、優れた安全性が期待される材料設計が求められる。

D-オクタアルギニンを固定化するプラットフォームの PNVA-co-AA は、昭和電工（株）が貼付剤の基剤として開発した高分子であり、生体適合性はあるものの生体内では分解されない。非分解性の材料であることから、生体内への蓄積による毒性の潜在的なリスクが懸念される。加えて、膜透過ペプチドも非分解性の D 体のアミノ酸を用いている。そこで、本技術の安全性向上の観点から、著者が所属する研究室の代表者は、（株）ADEKA と共同して、非分解性から生分解性への切り替えを実行し、ヒアルロン酸を支持体とする第二世代の生分解性の膜透過ペプチド固定化高分子の創製に成功した。同高分子は、Figure 6 に示すように、テトラグリシンをスペーサーとして介して、ヒアルロン酸のカルボキシル基に L-オクタアルギニンを固定化した多糖誘導体である。他方、D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA を用いて行ってきたこれまでの研究は、臨床応用を目指す上において、もう 1 つの問題を抱えている。すなわち、臨床応用が困難な投与回数（毎週 4 回投与）である。臨床で用いられている注射型インフルエンザワクチンは、1 シーズンに 1 回または 2 回投与である。さらには、未検討の課題も残っている。アジュバントして D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA を用いて実施した感染実験においては、抗原として投与された株と同じウイルス株に対する感染予防効果が実証されたに過ぎない。粘膜投与型ワクチンの最大の利点と期待される投与回数と異なるウイルス株に対する感染予防効果や重症化抑制効果は不明である。

本論文では、第一に、投与回数を削減した投与スケジュール下でのテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸のアジュバント活性を実証したうえで、その安全性を精査した（第 2 章）。検討においては、D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA あるいはテトラグリシン-D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA を比較対象として用いた。第二に、粘膜投与型ワクチンの最大の利点と期待される異種ウイルス株に対する感染防御や重症化

予防効果におけるテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸のアジュバントとしての有用性を実証した（第3章）。

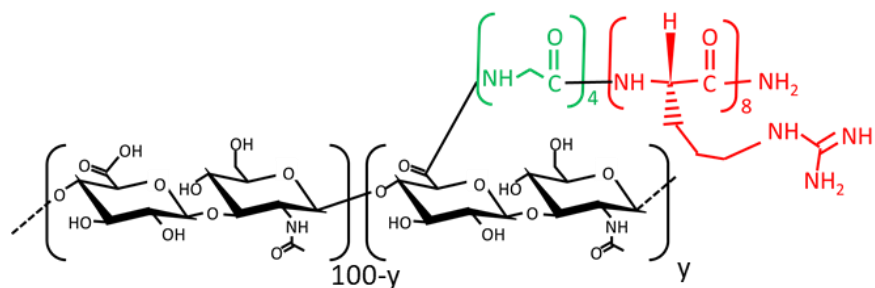


Figure 6. Chemical structure of tetraglycine-L-octaarginine-linked hyaluronic acid.

第2章 粘膜投与型ワクチンの安全なアジュバントとしてのテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の設計

第1節 テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の合成および物性評価

1-1) 序論

我々は、膜透過ペプチドを固定化する高分子プラットフォームとして、Figure 7 に示すヒアルロン酸に着目した。ヒアルロン酸は、グリコサミノグリカンに分類され、N-アセチルグルコサミンと D-グルクロン酸が β 1,3-グリコシド結合を介して結合した二糖を構成単位としている。この二糖が β 1,4-グリコシド結合を介して直鎖状に重合して得られた多糖がヒアルロン酸であり、生体由来のヒアルロン酸の分子量は 1000 kDa を超える。

ヒアルロン酸は、ヒアルロニダーゼにより分解される生分解性の多糖である³⁹⁾。ヒアルロン酸は人の体に広く分布する細胞外マトリックスであり、皮膚や軟骨に多く分布している。ヒアルロン酸の高い保水力により皮膚の機能は正常に保たれ、関節軟骨に水分子を引き寄せることにより荷重圧に耐えうる柔軟性を関節に付与している⁴⁰⁾。保湿剤としてヒアルロン酸を含む化粧品が市販され、変形性膝関節症の治療においては、ヒアルロン酸の関節内注射が臨床で行われている⁴¹⁾。

第一世代の D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA においては、D 体のオクタアルギニンを用いていたが、生分解性を担保するため、L 体に変更した⁴²⁾。L-オクタアルギニンを直接ヒアルロン酸に固定化するのではなく、固定化率の向上を図るため⁴³⁾、グリシンスペーサーを導入し、その末端アミノ基とヒアルロン酸のカルボキシル基との間のアミド結合を介して L-オクタアルギニンをヒアルロン酸に固定化したテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸を設計した (Figure 6)。

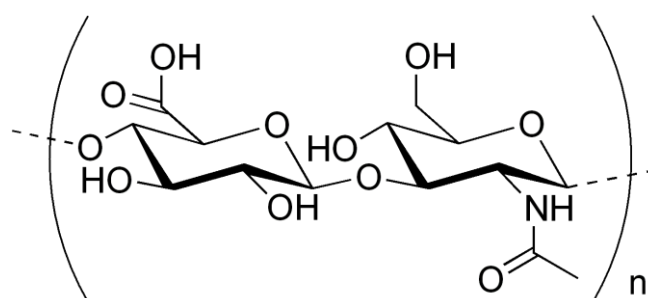


Figure 7. Chemical Structure of hyaluronic acid.

1-2) テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の合成

ヒアルロン酸のカルボキシル基へのテトラグリシン-L-オクタアルギニンの導入は、D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA と同様の方法で行った。Figure 8 に示すように、まず、*N,N'*-ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) を用いてヒアルロン酸のカルボキシル基を活性化させた後、*N*-ヒドロキシスクシイミド (NHS) を同カルボキシル基に導入した。次に、得られたヒアルロン酸 *N*-ヒドロキシスクシイミドエステルをテトラグリシン-L-オクタアルギニンと置換させ (テトラグリシン-L-オクタアルギニンの末端アミノ基をヒアルロン酸のカルボキシル基に導入)、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸を得た。出発原料として今回用いた市販のヒアルロン酸の分子量は 27 kDa であり、これまで用いていた PNVA-co-AA (350 kDa) の分子量の約 10 分の 1 である。ヒアルロン酸のフリー体は不安定であり、27 kDa のヒアルロン酸は市販されている中では最も分子量が大きい。ヒアルロン酸はナトリウム塩として安定化されるため、ヒアルロン酸ナトリウムについては、分子量が 1000 kDa を超える市販品もある。高分子量のヒアルロン酸ナトリウムを出発原料として、脱塩処理により PNVA-co-AA と同程度の分子量のフリー体を得ることを試みたが、脱塩過程でヒアルロン酸が分解し、市販品より分子量が大きいフリー体は得られたものの、同程度の分子量のフリー体が安定して得られなかった。そのため、本論文においては、分子量 27 kDa の市販のヒアルロン酸を用いて、2 ロットのテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸を合成した。

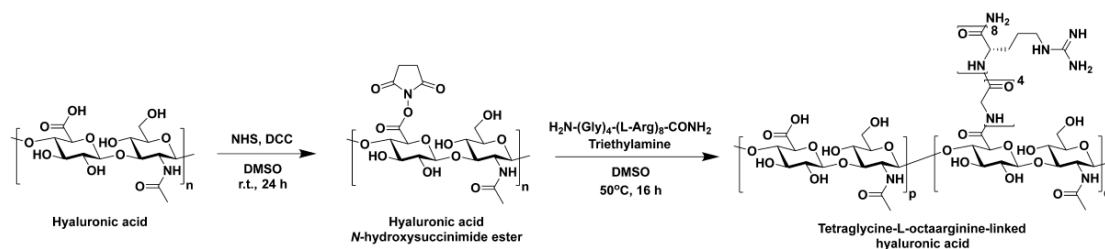


Figure 8. Synthesis of tetraglycine-L-octaarginine-linked hyaluronic acid.

1-3) テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の物性評価

各種分析機器を用いて、得られたテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の物性を評価した。まず、プロトン核磁気共鳴スペクトル分析 (^1H NMR) を通して、テトラグリシン-L-オクタアルギニンのヒアルロン酸への固定化率を求めた。本検討では、ジメチルスルホン (DMSO_d_6) を内部標準物質として用いた。Figure 9 (2 ロット合成した run 2 のデータ) のピーク (a) およびピーク (b) は、それぞれテトラグリシン-L-オクタアルギニンのアルギニンの δ 位に結合したプロトン (16 プロトン当量) およびジメチルスルホンのメチル基のプロトン (6 プロトン当量) のピークを示す。両者のピーク値を比較し、テトラグリシン-L-オクタアルギニンの固定化率を求めた。テトラグリシン-L-オクタアルギニン

は、ヒアルロン酸を構成するユニットの 1 つであるグルクロン酸のカルボキシル基に導入されていることから、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸は、N-アセチルグルコサミン、テトラグリシン-L-オクタアルギニンが固定化されたグルクロン酸およびフリーのグルクロン酸の 3 つのユニットから構成される（グルクロン酸のすべてのカルボキシル基にテトラグリシン-L-オクタアルギニンが導入されれば、フリーのグルクロン酸ユニットは存在しないことになる）。同固定化率は、テトラグリシン-L-オクタアルギニンが固定化されたグルクロン酸ユニットの全ユニットに占める割合およびテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸 1 g に占める L-オクタアルギニンの質量パーセントとして計算した。その結果、Table 2 に示す通り、グルクロン酸ユニットの 54% にテトラグリシン-L-オクタアルギニンが導入されており、同様に固定化率を求めた run 1 との間のロット差は小さいことが確認された。また、同固定化率およびテトラグリシン-L-オクタアルギニンとヒアルロン酸の分子量をベースに計算されたテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の分子量は、いずれも 90 kDa 程度であった。本論文では、著者が所属する研究室で過去に合成された D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA およびテトラグリシン-D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA を比較対象に用いており、同様に解析した結果を Table 2 に併記した。合成量の都合上、以降の分析および安全性評価においては run 2 を使用し、免疫活性評価および感染実験には run 1 を使用した。

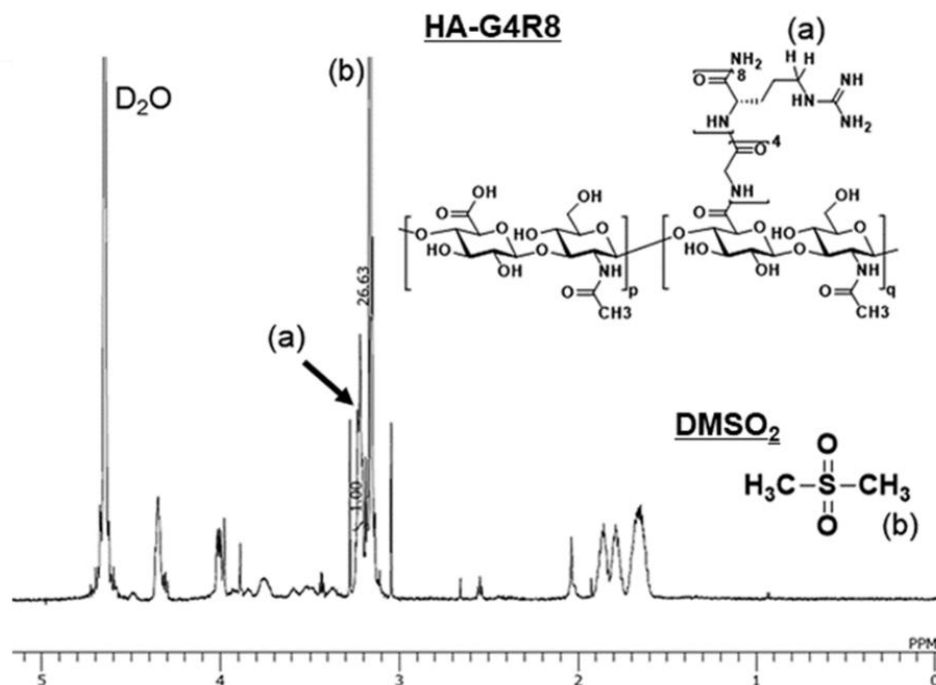


Figure 9. ¹H NMR spectrum of tetraglycine-L-octaarginine-linked hyaluronic acid (run 2 in Table 2 was used). The peaks (a) and (b) were assigned to the 16 equivalent protons in octaarginine and six equivalent protons in dimethyl sulfone, respectively.

Table 2. Characterization of oligoarginine-linked polymers.

		content of the respective units in backbone of hyaluronic acid ^b				
		N-Acetyl-D-glucosamine	D-glucuronic acid	D-glucuronic acid grafting oligoarginines	oligoarginine weight % ^c	calculated Mw(kDa) ^d
tetraglycine-L-octaarginine-linked hyaluronic acid	run 1	50	17	33	61	95
	run 2	50	23	27	58	83
		content of the respective units in the backbone of PNVA-co-AA ^b				
		N-vinylacetamide	acrylic acid	acrylic acid grafting oligoarginines	oligoarginine weight % ^c	calculated Mw(kDa) ^d
D-octaarginine-linked PNVA-co-AA ^a		70	14	16	75	1210
tetraglycine-D-octaarginine-linked PNVA-co-AA ^a		70	0	30	76	2260

^aBoth oligoarginine-linked PNVA-co-AAs were characterized in the previous study (weight-average molecular weight (Mw) of PNVA-co-AA, 350 kDa; NVA units/AA units of PNVA-co-AA, 70/30).⁴³⁾ ^bPercentage of the number of the respective monomer units to the total number of monomer units. ^cWeight percentage of oligoarginines grafted onto polymers (oligoarginines excluding glycine segments/oligoarginine-linked polymers). ^dMw of oligoarginine-linked polymers calculated on the basis of Mw of original polymers (hyaluronic acid, 27 kDa; PNVA-co-AA, 350 kDa), Mw of oligoarginines, and the grafting degree.

¹H NMR のデータは、正しくは合成の結果得られた物質中に含まれるテトラグリシン-L-オクタアルギニンの比率を示しているだけであり、テトラグリシン-L-オクタアルギニンがヒアルロン酸に化学的に固定化されていることを担保するためにはゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) による分析が必要である。示唆屈折 (RI) 検出器および紫外 (UV) 検出器で分析したヒアルロン酸、テトラグリシン-L-オクタアルギニンおよびテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸 (run 2) の GPC のクロマトグラムを Figure 10a および 10b に示す。Figure 10a から、ヒアルロン酸は保持時間 (RT) 10~13 分付近にブロードなピークを、テトラグリシン-L-オクタアルギニンは RT 12~13 分付近にシャープなピークを示すことが確認された。テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸は、RT 10 分付近からヒアルロン酸と重なるようにブロードなピークを示した後、RT 12 分付近から急に立ち上がり、シャープなピークとなった。異質なクロマトグラムを示したことから、未反応のテトラグリシン-L-オクタアルギニンの合成物への混在が懸念されたが、データに基づく以下の考察から、そのことは否定された。すなわち、①両者のピークは近いものの重なっていないこと (Figure 10a)、②テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸で確認されたシャープなピークはテトラグリシン-L-オクタアルギニンよりも RT が短いことから (テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸のピークトップの

RT: 12.3 分、テトラグリシン-L-オクタアルギニンのピークトップの RT: 12.6 分)、ヒアルロン酸への固定化により分子量が大きくなったと考えられること (Figure 10a)、③UV 検出器による解析においても両者のピーク位置はずれており、ピークはあるもののテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の UV 検出によるクロマトグラムはそれほど異質でなく、前述の異質性は RI 検出特有であること (Figure 10b、矢印で示す RT 13.4 分のシャープなピークは不純物として *N*-ヒドロキシスクシイミド (NHS) が 5 ppm 混じっていることに起因していることを別に確認済み)、④シャープなピークに相当するテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸は、分画分子量 3 kDa の限外ろ過膜をまったく透過せず、分画分子量 10 kDa の限外ろ過膜を一部透過した程度であり、その分子量はテトラグリシン-L-オクタアルギニン (Mw: 1496) より十分に大きいと推察されること (Figure 10c)、が、テトラグリシン-L-オクタアルギニンの混在を否定するデータに基づく考察である。RI 検出で見られたクロマトグラムの異質性については、ヒアルロン酸の RI 感度に比べ、テトラグリシン-L-オクタアルギニンの RI 感度が極めて高いことに起因しているのかもしれない。シャープなピーク付近のテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の分子量は、それより前のブロードなピーク付近の同ヒアルロン酸誘導体に比べて小さい。ブロードなピーク付近では、主鎖のヒアルロン酸の分子鎖が十分に長いため、その低い RI 感度が支配的に検出されたのに対して、シャープなピーク付近では、ヒアルロン酸の分子鎖が十分に長くない、テトラグリシン-L-オクタアルギニンの高い RI 感度が支配的に検出されたのかもしれない。突然現れるシャープなピーク、すなわち、クロマトグラムの不連続な変化は、この考察の妥当性を支持していると思われる。

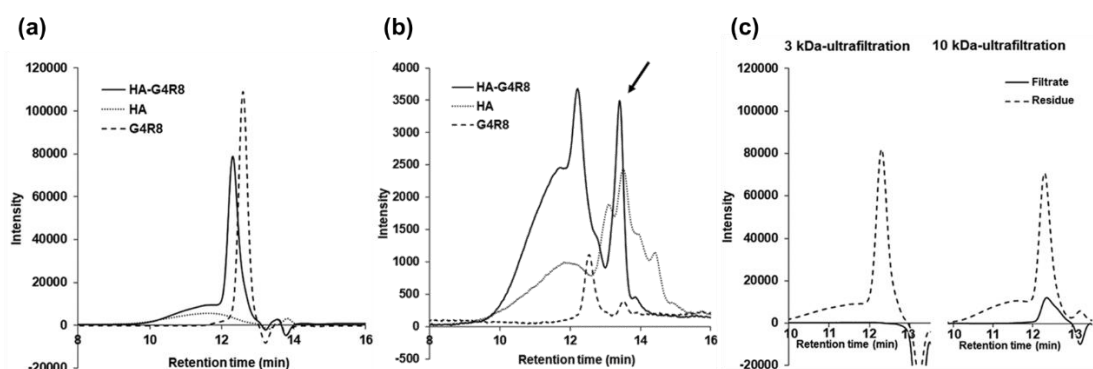


Figure 10. GPC chart of tetraglycine-L-octaarginine-linked hyaluronic acid (run 2 in Table 2 was used). (a) An RI-based GPC chart. Tetraglycine-L-octaarginine-linked hyaluronic acid (HA-G4R8), hyaluronic acid (HA), and tetraglycine-L-octaarginine (G4R8) were assigned to solid, dotted, and dashed lines, respectively. (b) An UV (254 nm) absorption-based GPC chart. All compounds were assigned as described in (a). An arrow indicated a peak of *N*-hydroxysuccinimide. (c) An RI-based GPC chart of filtrates (solid line) and residues (dashed line) obtained through ultrafiltration. Aqueous solution containing tetraglycine-L-octaarginine-linked hyaluronic acid was filtrated using a centrifugal filter device with a nominal molecular weight limit of either 3 or 10 kDa before GPC analysis.

テトラグリシン-L-オクタアルギニンがヒアルロン酸に化学的に結合されていることをさらに担保するため、Figure 11 に示すように、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸 (run 2) のゼータ電位を測定し、ヒアルロン酸単体のゼータ電位およびヒアルロン酸とテトラグリシン-L-オクタアルギニンの混合物のゼータ電位と比較した。ヒアルロン酸は生理的 pH において負に帯電しているため、同 pH において正に帯電するテトラグリシン-L-オクタアルギニンと静電的に相互作用すると考えられる。この相互作用は、ヒアルロン酸のカルボキシル基の解離を抑制することにより消失すると推測される。ヒアルロン酸の pKa は 3.56 であることから⁴⁴⁾、溶媒の pH を 2.82 に設定してヒアルロン酸のゼータ電位を測定したところ、平均で -3.6 mV とほぼ中性付近の電荷を示した。ここにテトラグリシン-L-オクタアルギニンを加えてゼータ電位を測定すると、平均で 0.154 mV の値が得られた。わずかに負に帯電したヒアルロン酸と正に帯電したテトラグリシン-L-オクタアルギニンが静電的に相互作用し、ヒアルロン酸の負電荷が打ち消されたと考えられた。一方、同じ酸性条件下、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸のゼータ電位は 10 mV を超えており、ヒアルロン酸に化学的に結合された L-オクタアルギニンに由来する正電荷と考えられた。

Pollockらは、ペプチドやタンパク質により化学修飾されたヒアルロン酸のようなバイオコンジュゲートの物性評価は非常に難しいと報告している⁴⁵⁾。今回の徹底した分析により、

テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸が目的通りに得られていることが結論付けられたが、合成の再現性を考慮した同ヒアルロン酸誘導体の完全な同定には、分子量とその分布等、さらなる情報が必要と考えられ、今後の課題である。

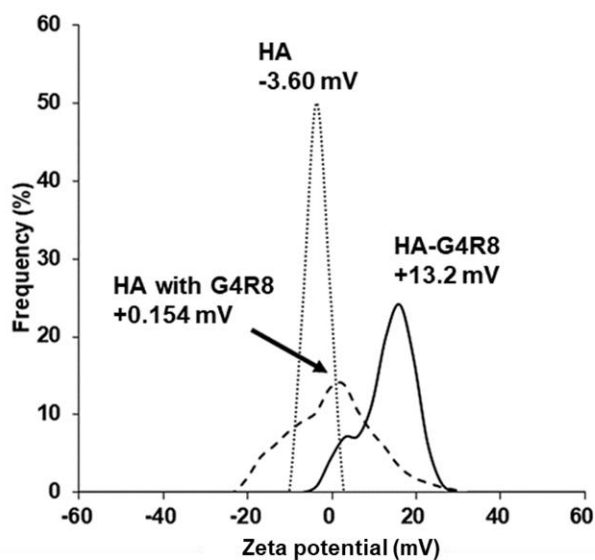


Figure 11. Zeta potentials of tetraglycine-L-octaarginine-linked hyaluronic acid (run 2 in Table 2 was used). Tetraglycine-L-octaarginine-linked hyaluronic acid (solid line, HA-G4R8) was compared with intact hyaluronic acid (dotted line, HA) and hyaluronic acid mixed with tetraglycine-L-octaarginine (dashed line, HA with G4R8).

第2節 テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸のアジュバント活性の実証

2-1) 序論

著者が所属する研究室が(株) ADEKA と共同で開発した第一世代の膜透過ペプチド固定化高分子である D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA に関して、①インフルエンザウイルス HA ワクチンや不活化インフルエンザウイルスなどのタンパク質抗原とマウス鼻腔内に共投与することにより、血中に IgG、鼻粘膜上に分泌型 IgA が誘導されること³¹⁾、②誘導された IgA は投与抗原として用いた A 型インフルエンザウイルスの同一亜型内の異なるウイルス株だけでなく亜型の異なるウイルス株にも交叉反応性を示すこと³²⁾、③D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA 共投与下、不活化ウイルスで免疫した場合、感染力のある同じウイルス株の感染を完全防御できること³³⁾、がこれまでの研究で既に確認され、免疫活性の面から、粘膜投与型ワクチンのアジュバントとしての D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA の有用性は実証されている。しかし、高分子骨格である PNVA-co-AA が非分解性であるため、臨床で使用する際、蓄積性などの毒性に関する潜在的リスクを抱えている。この問題を解決することを目的として、膜透過ペプチドを固定化するプラットフォームを生分解性かつ生体由来のヒアルロン酸に変更したテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸を設計した。また、これまでの研究では、毎週(7日間隔)4回投与で免疫しており、臨床で用いられている注射型インフルエンザウイルス HA ワクチンが1回投与あるいは1ヵ月間隔2回投与であることを考慮すると⁴⁶⁾、投与回数の削減は必須である。

本章では、免疫活性の面から、粘膜アジュバントとしてのテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の有用性を D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA (あるいはテトラグリシン-D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA) と比較検証するとともに、投与回数の削減を含めた投与スケジュールの最適化を行った。なお、本検討では、Table 2 に示す run 1 のテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸を用いた。

2-2) アジュバント活性に及ぼすオクタアルギニンの光学活性並びに高分子プラットフォームの変更の影響

本検討では、臨床で用いられているインフルエンザウイルス HA ワクチンを抗原として使用し、Figure 12 に示す 3 通りの投与スケジュールにおけるテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸およびテトラグリシン-D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA のアジュバント活性を比較検証した。投与スケジュール 1 はこれまで同様の「7 日間隔 4 回投与/最終投与から 1 週間後の抗体価測定」、投与スケジュール 2 は投与間隔を変えずに投与回数を半分にした「7 日間隔 2 回投与/最終投与から 1 週間後の抗体価測定」、投与スケジュール 3 は投与回数を半分にするるとともに投与間隔と最終投与から抗体価測定までの期間を延長した「28 日間隔 2 回投与/最終投与から 2 週間後の抗体価測定」である。

米国の疾病予防センターは、インフルエンザウイルス HA ワクチンなどのワクチンの接種間隔を 4 週間以上にすることを推奨している⁴⁶⁾。体内で認識した抗原に対する抗体産生の誘導には数週間かかることが知られており、粘膜アジュバントとして合成二本鎖 RNA の poly(I:C)を使用した一戸らのマウス経鼻免疫実験でも、初回ワクチン接種から 1 ヶ月後に 2 回目の投与を行っている¹⁴⁾。これらのことを参考にして、投与スケジュール 3 をデザインした。膜透過ペプチド固定化高分子の投与量は 100 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{回}$ に統一し、抗原の投与量はトータル 0.2 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ となるようにした。つまり、4 回投与の場合はこれまで同様の 0.05 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{回}$ 、2 回投与の場合は 0.1 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{回}$ とした。また、 2^n 乗系列で希釈したサンプル（血清あるいは鼻腔内洗浄液）中の抗体レベルは、Figure 13 に示すように ELISA で見積もられた endpoint titer で示した（titer が大きいほど抗体が多く誘導されていることを表している）。サンプル中の抗体の検出には IgG および IgA の定常領域（それぞれ γ 鎖および α 鎖）を認識する抗体を使用した。鼻腔内 IgA の検出に α 鎖を認識する抗体を使用すると、鼻腔内に分泌される 2 量体 IgA と単量体 IgA の区別は出来ないが、鼻腔内の IgA はほとんど 2 量体で存在しているとの報告があることから、本法を採用した⁴⁷⁾。

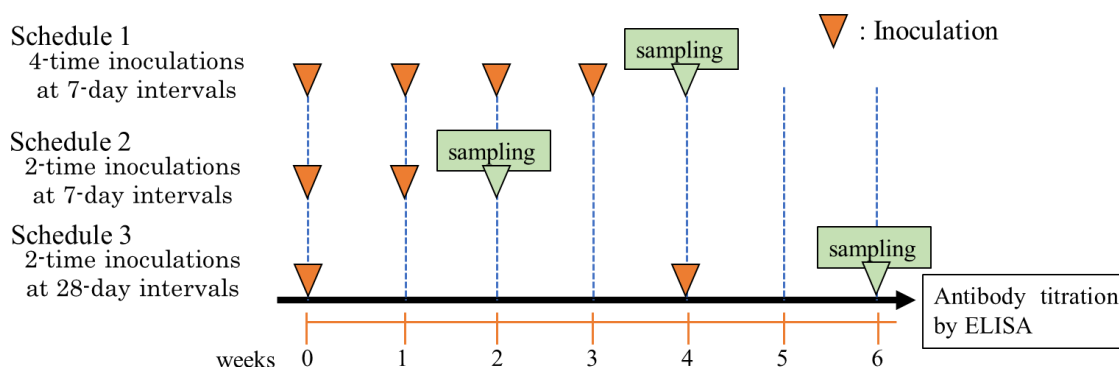


Figure 12. Vaccination schedules evaluated in this study.

Typical pattern of ELISA data

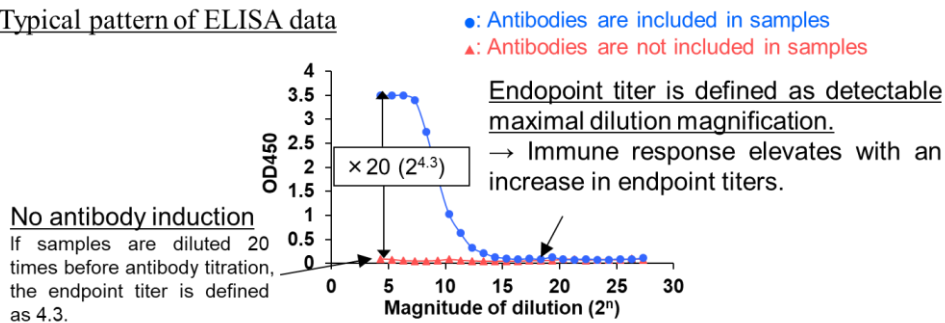


Figure 13. Estimation of antibody level (Endpoint titer).

免疫されたマウスの血中 IgG レベルおよび鼻腔内 IgA レベルを Figure 14 に示す。これまで同様の 4 回投与において、高分子フリーの HA ワクチン投与では、IgG がわずかに誘導されたものの IgA はまったく誘導されなかった。アジュバントとしてテトラグリシン-D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA を共投与すると、IgG、IgA ともに大きく誘導された。これら 2 群のデータは良好な再現性を示した³¹⁾。アジュバントをテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸に変更したとき、誘導された抗体 (IgG および IgA) レベルは、D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA 共投与時と統計学的に同等であった。オクタアルギニンの D 体から L 体への変更並びにプラットフォームの PNVA-co-AA からヒアルロン酸への変更は、量的なアジュバント活性に影響を及ぼさないことが確認された。投与間隔を変えずに投与回数を 2 回に半減したとき、いずれのアジュバントを用いても抗体レベルは低下した。一方、投与回数を 2 回に維持したまま投与間隔を 28 日間隔に延長した結果、米国の疾病予防センターの推奨や一戸らの結果から期待された通り、7 日間隔 4 回投与と同等の抗体レベルに回復し、投与回数よりも投与間隔が重要な因子であることが明らかとなった。以降、「28 日間隔 2 回投与/最終投与から 2 週間後の抗体価測定」のスケジュールで検討を継続した。

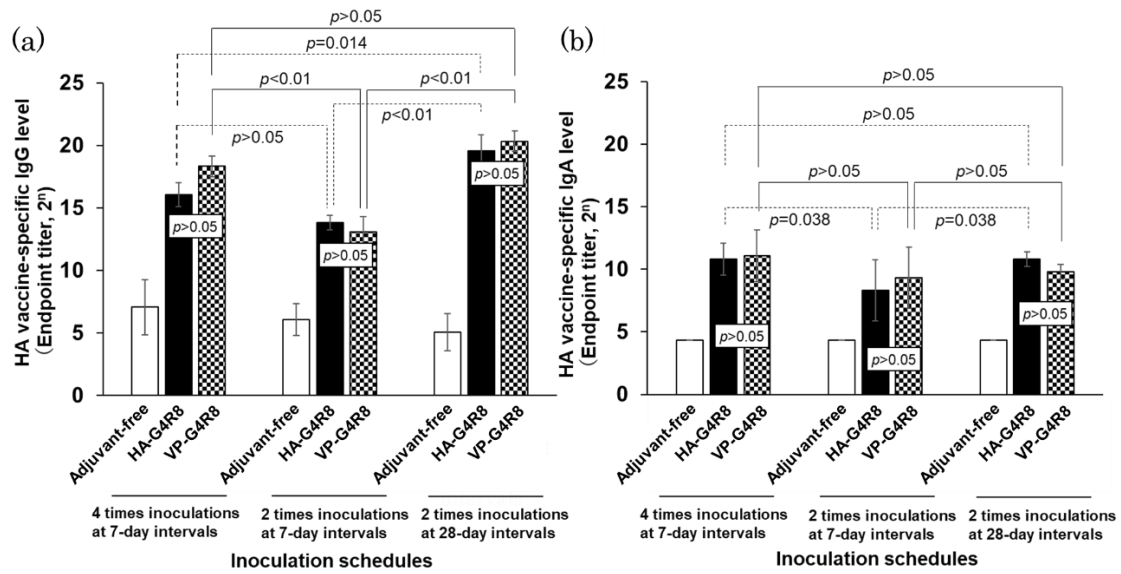


Figure 14. Level of influenza virus HA vaccine-specific IgG in sera (a) and secreted IgA in nasal wash fluids (b) in individual mice (mean \pm SD, n =4). Mice were nasally inoculated with either HA vaccines alone (white bars, adjuvant-free), a mixture of HA vaccines and tetraglycine-L-octaarginine-linked hyaluronic acid (black bars, HA-G4R8), or a mixture of HA vaccines and tetraglycine-D-octaarginine-linked PNVA-co-AA (dotted bars, VP-G4R8) through 3 different schedules, 4-time inoculations at 7-day intervals, 2-time inoculations at 7-day intervals, and 2-time inoculations at 28-day intervals. A dose of HA vaccines was set to 0.05 and 0.1 μ g/mouse/time for 4- and 2-time inoculations, respectively (a total dose of HA vaccines was unified to 0.2 μ g/mouse). The polymers were administered constantly at a dose of 100 μ g/mouse/time, irrespective of the difference in the inoculation schedule. After the final inoculation, mice were maintained for 7 and 14 days for a couple of schedules with 7-day intervals and the remaining one with 28-day intervals, respectively. Sera and nasal wash fluids were collected from sacrificed mice.

2-3) アジュバント活性に及ぼすテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の投与量の影響

次に、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の免疫誘導効果に及ぼす投与量の影響を検討した。HA ワクチンの投与量は 0.1 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{回}$ で固定し、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸を 50~200 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{回}$ の範囲で投与した。免疫されたマウスの血中 IgG レベルおよび鼻腔内 IgA レベルを Figure 15 に示す。IgG については、50 μg 投与群が他の群に比べて低い傾向にあったものの、統計学的な有意差は認められなかった。一方、50 μg 投与群の IgA レベルは他の 2 群に比べて有意に低く、100 μg 投与群と 200 μg 投与群の間で有意差は認められなかった。以降、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の投与量は 100 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{回}$ として検討を継続した。

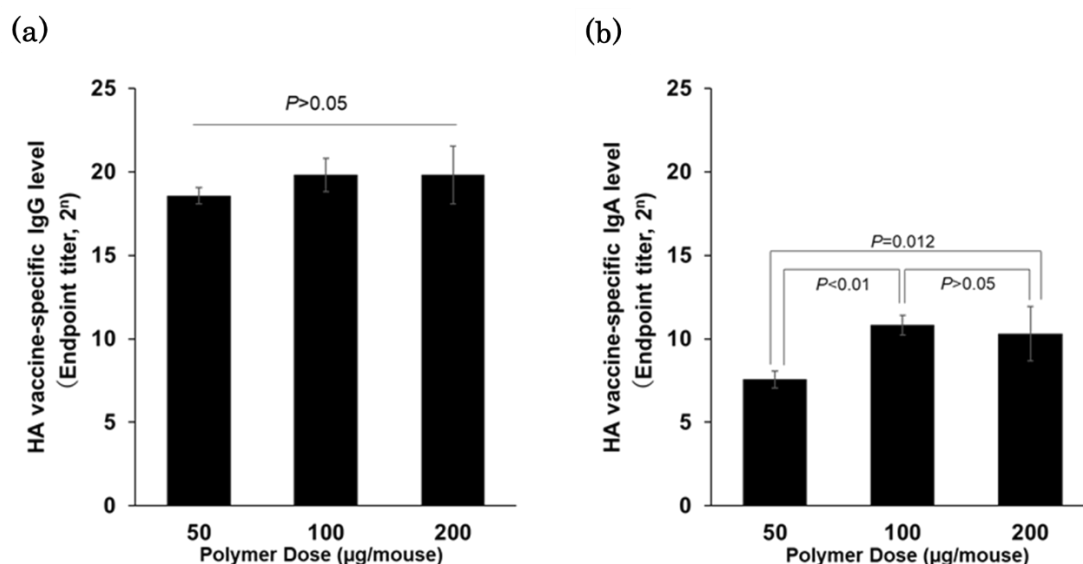


Figure 15. Level of influenza virus HA vaccine-specific IgG in sera (a) and secreted IgA in nasal wash fluids (b) in individual mice (mean \pm SD, n =4). The 2-time nasal inoculations with a mixture of HA vaccines and tetraglycine-L-octaarginine-linked hyaluronic acid were performed at 28-day intervals in mice. HA vaccines were administered constantly at a dose of 0.1 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{time}$, but the polymers were administered in the dose range of 50–200 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{time}$. Mice were sacrificed 14 days after the second inoculation to collect sera and nasal wash fluids.

2-4) テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の構成成分のアジュバント活性の評価

次に、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の構成成分がアジュバント活性を有するか否かを検証した。モデル抗原として汎用され、我々も研究初期に用いた Ovalbumin (OVA) を抗原として用いた。研究初期における OVA の投与量は 1 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{回}$ (7 日間隔 4 回投与) であり、今回、投与回数を 4 回から 2 回に半減したことから、OVA の投与量は 2 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{回}$ とした。免疫されたマウスの血中 IgG レベルおよび鼻腔内 IgA レベルを Figure 16 に示す。アジュバントとしてテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸を OVA と共に投与した場合、いずれの抗体も誘導された。一方、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の構成比にあわせてテトラグリシン-L-オクタアルギニンとヒアルロン酸を混合し、ヒアルロン酸誘導体と同量をアジュバントとして OVA と共投与した場合、抗体誘導レベルは極めて低く、抗原のみ投与のコントロール群と同程度であった。以上の結果から、テトラグリシン-L-オクタアルギニンをヒアルロン酸に化学結合させることによって、アジュバント活性が初めて獲得されることが示された。この結果は、第 2 節で合成により得られた物質は単なる混合物ではないことを側面的に支持する結果でもあると我々は判断した。

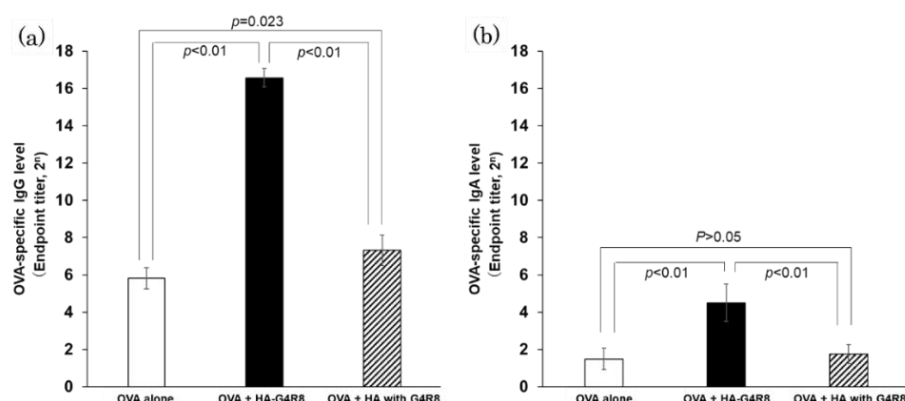


Figure 16. Level of OVA-specific IgG in sera (a) and secreted IgA in nasal wash fluids (b) in individual mice (mean \pm SD, n = 4). The 2-time nasal inoculations with either OVA alone (white bars, adjuvant-free); a mixture of OVA and tetraglycine-L-octaarginine-linked hyaluronic acid (black bars, OVA + HA-G4R8), or a mixture of OVA, tetraglycine-L-octaarginine, and hyaluronic acid (left hashed bars, OVA + HA with G4R8) were performed at 28-day intervals in mice. OVA and tetraglycine-L-octaarginine-linked hyaluronic acid were administered at a dose of 2 and 100 μg , respectively, /mouse/time. Tetraglycine-L-octaarginine was separately mixed with hyaluronic acid at a weight ratio of 80:20. The mixture was administered at a dose of 100 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{time}$ along with OVA (2 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{time}$). Mice were sacrificed 14 days after the second inoculation to collect sera and nasal wash fluids.

2-5) 異種インフルエンザウイルスに対する鼻粘膜上 IgA の交叉反応性

最後に、誘導された鼻腔内 IgA の交叉反応性を検証した。これまでの検討において、H1N1 A/Puerto Rico/8/34 (PR8) 株および H1N1 A/New Caledonia/20/99 (NCL) 株の不活化ウイルス全粒子 (PR8 株は β -プロピオラクトン、NCL 株はチメロサルおよび β -プロピオラクトンにより不活化) をウイルス抗原として用いた実績があり (1 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{回}$ で 7 日間隔 4 回投与)、誘導された抗体レベルから、免疫誘導能は NCL 株 > PR8 株と推測している。ここでは、免疫誘導能が強い不活化 NCL 株を投与抗原として用いて、投与スケジュールとアジュバントの投与量は前述の通りとした。なお、不活化ウイルスの投与量は、1 回当たりの投与量を合わせた 1 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{回}$ とトータルの投与量を合わせた 2 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{回}$ (トータルの投与量: 4 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) の 2 通りで検討した。さらに、NCL 株と同じ H1N1 に分類される PR8 株と H1N1 A/California/07/2009 (CA) 株、異なる亜型の H3N2 A/Brisbane/10/2007 (BNE) 株と H5N1 A/Viet Nam/1194/2004 (VNM) 株 (いずれも A 型インフルエンザウイルス) の組み換え HA タンパク質 (rHA) に対する鼻腔内 IgA の反応性を NCL 株の rHA に対する反応性で除すことにより、交叉反応性を評価した (計算により得られる百分率の数値が大きいほど交叉反応性が強いことを示す)。免疫されたマウスの鼻腔内 IgA の交叉反応性を Figure 17 に、NCL 株の rHA に対する反応性の強さを表す吸光度値を Table 3 に示す。アジュバントとしてテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸を用いて抗原投与量を 1 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{回}$ としたとき、投与抗原の NCL 株と同じ H1N1 に属する PR8 株や CA 株、異なる亜型の H3N2 に属する BNE 株に交叉反応したが、H5N1 に属する VNM 株に対する交叉反応性は低かった。この低い交叉反応性は投与抗原量を 2 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{回}$ に増やすことにより改善された。アジュバントを D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA に変更しても、交叉反応性のプロファイルは同じであった。一方、抗原投与量が 1 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{回}$ のとき、アジュバントとしてテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸を用いたときの方が NCL 株に対する反応性が強く、投与量を 2 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{回}$ に増量すると、両アジュバントの差は消失した (Table 3)。D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA に比べて、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸は、少ない抗原投与量でも安定して抗体誘導することが示唆された。

以上の結果から、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸のアジュバント活性は、D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA と量的・質的に同等であることが実証された。また、1 および 2 回目の投与間隔を 4 週間と長くして、ブースティング効果を最適化することにより、投与回数を 4 回から 2 回に削減しても抗体レベルを同程度に維持できたことから、臨床応用が見込まれる投与スケジュールの設計が可能となった。なお、Figure 14~17 に示す今回の検討においては、 α 鎖を認識する抗体を使用したため、1 量体 IgA と 2 量体 IgA が同時に検出されている。鼻腔内に存在している IgA はほとんど 2 量体であることが報告されているが、膜透過ペプチド固定化高分子を使用したときも同様であるか、今後、2 量体 IgA の Secretory Component 部分を認識する抗体を用いて確認する予定である。

Table 3. Absorbance of the well containing rHA proteins of the NCL strain used for immunization (mean \pm SD of 4 experiments).

adjuvant	antigen dose (/mouse/time)	
	1 μ g	2 μ g
tetraglycine-L-octaarginine-linked hyaluronic acid	0.65 \pm 0.25	0.75 \pm 0.53
D-octaarginine-linked PNVA-co-AA	0.37 \pm 0.25	0.75 \pm 0.21

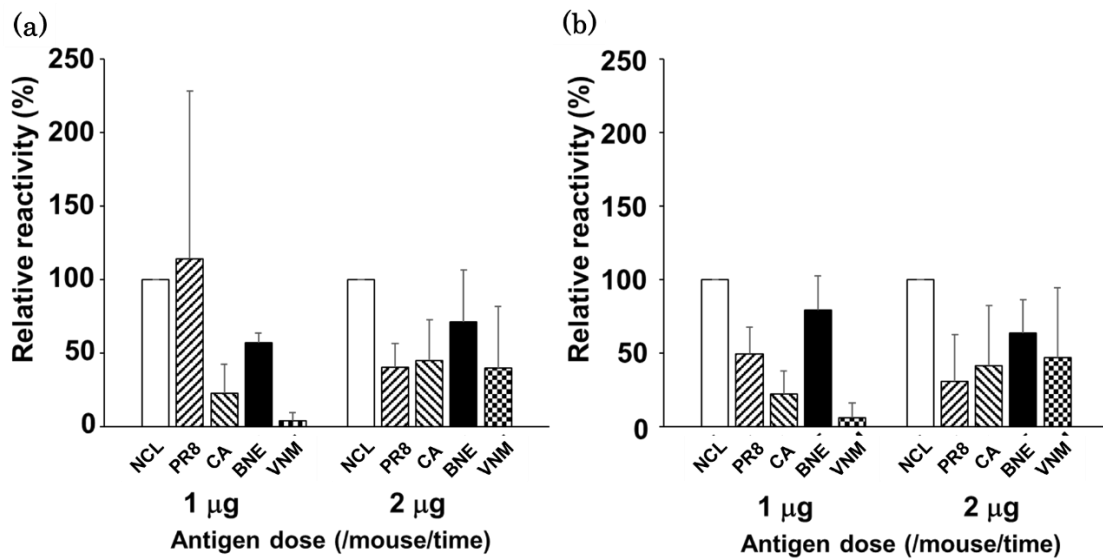


Figure 17. Cross-reactivity of intranasally secreted IgA induced by inactivated viral particles of the H1N1 A/New Caledonia/20/99 (NCL) strain in the presence of either tetraglycine-L-octaarginine-linked hyaluronic acid (a) or D-octaarginine-linked PNVA-co-AA (b) in individual mice (mean \pm SD, n = 4). The 2-time nasal inoculations with a mixture of viral antigens and polymers were performed at 28-day intervals in mice. Viral antigens were administered in the dose range of 1–2 μ g/mouse/time under a constant polymer dose of 100 μ g/mouse/time. Mice were sacrificed 14 days after the second inoculation to collect nasal wash fluids. IgA reactivity to the respective recombinant hemagglutinin (rHA) proteins was measured. Cross-reactivity was expressed as the percentage of homo/heterosubtypic IgA reactivity to rHA proteins of the H1N1 A/Puerto Rico/8/34 (PR8, left hashed bars), the H1N1 A/California/07/2009 (CA, right hashed bars), the H3N2 A/Brisbane/10/2007 (BNE, black bars), and the H5N1 A/Viet Nam/1194/2004 (VNM, dotted bars) strains to IgA reactivity to rHA proteins of the NCL strain (white bars).

第3節 テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の安全性評価

3-1) 序論

現在、臨床で用いられている経鼻投与型インフルエンザワクチンの Flumist®は、低温馴化した弱毒化インフルエンザウイルスからなる生ワクチンである。生ワクチンであることから、免疫機能が低い2歳未満の乳幼児や50歳以上の高齢者は適応外になっている¹²⁾。より安全なワクチンの開発を目指して、現在の注射型ワクチンで用いられているHA抗原、Hemmagglutinin stalksなどのウイルス成分、不活化したウイルスなどを抗原として用いて、その免疫原性を上げるためのアジュバントを添加した経鼻粘膜ワクチンが研究されている。しかし、LT、CTB、poly(I:C)、poly(I:C)の安全性を改善したAmpligen®など、これまで研究されてきたアジュバントは安全性の問題で実用化に至っていない^{48,49)}。

第一世代の膜透過ペプチド固定化高分子であるD-オクタアルギニン固定化PNVA-co-AAは、非分解性のPNVA-co-AAをプラットフォームとして、生体で分解されないD体のオクタアルギニンを固定化したものである。生体適合性はあるものの非分解性であることから、蓄積に伴う毒性のリスクが懸念される。著者が所属する研究室の代表者らは、より安全な膜透過ペプチド固定化高分子の開発を目指して、第二世代のテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸を創製した。本ヒアルロン酸誘導体は、生体由来のヒアルロン酸をプラットフォームとして、生体での分解が担保されているL体のオクタアルギニンを固定化したものであり、D-オクタアルギニン固定化PNVA-co-AAと比較して、安全性が優れることが期待される。

新薬や新規医薬品添加剤の開発において、細胞毒性試験や遺伝毒性試験などのin vitro試験、がん原性試験、生殖発生毒性試験、局所刺激性試験、単回投与毒性試験および反復投与毒性試験などのin vivo試験を通して、その安全性を実証しなければならない⁵⁰⁾。本章では、各種毒性試験を通して、両オリゴアルギニン固定化高分子の安全性を比較検証した。新薬開発時に必須の試験であるコロニー形成阻害試験、小核試験および変異原性試験は、毒性試験の受託研究機関である(株)ボゾリサーチセンターに委託して実施した。なお、Table 2に示すオリゴアルギニン固定化高分子(テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸はrun 2)を用いて、本検討を行った。

3-2) 細胞毒性試験 (WST-1)

まず、WST-1 細胞増殖アッセイを用いて、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸が細胞の生存率に与える影響を検討した。細胞内に存在するジヒドロニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) の働きにより発色する WST-1 は、生存細胞数の指標として用いられる。経鼻投与した際の影響を評価するため、ヒト肺癌上皮由来細胞株 Calu-3 細胞を用いて検討した。各種濃度に調整したテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸あるいはテトラグリシン-D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA を Calu-3 細胞に 1 時間曝露させた後、WST-1 溶液を加えて発色を確認した。Figure 18 に示すように、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸では、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ まで細胞死はまったく観察されなかったが、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において約 50%の生存率となり、濃度がさらに上昇するにつれて生存率は低下した。一方、テトラグリシン-D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA では、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において毒性を示さなかったものの、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において生存率は 20%以下となった。前節において、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸とテトラグリシン-D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA のアジュバント活性は量的・質的に同等であることが示されたが、安全性に関しては、期待した通り、生分解性の膜透過ペプチド固定化高分子は非分解性の高分子よりも毒性が低いことが確認された。

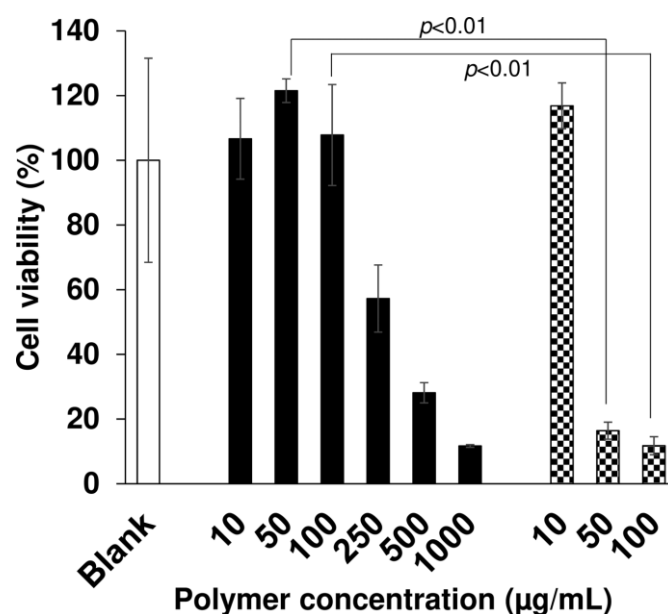


Figure 18. WST-1 assay-based viability of Calu-3 cells in the presence and absence of oligoarginine-linked polymers (mean \pm SD, $n = 3$). Calu-3 cells were incubated for 1 h with either media containing tetraglycine-L-octaarginine-linked hyaluronic acid (black bars), media containing tetraglycine-D-octaarginine-linked PNVA-co-AA (dotted bars), or the polymer-free media (white bars) at 37 °C. Concentrations of the former and latter polymers were adjusted to 10–1000 and 10–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. The media was replaced with WST-1-containing serum-free media, and then incubation was continued for 1 h. WST-1 reduction was monitored calorimetrically in the respective conditions. Cell viability in the polymer-free conditions was regarded as 100% (control). Cell viability in the presence of oligoarginine-linked polymers was expressed as the percentage of WST-1 reduction in each of the conditions to an average one in the control experiment.

3-3) コロニー形成阻害試験

ここでは、チャイニーズハムスター肺線維芽細胞由来株 V79 細胞を用いたコロニー形成阻害試験を行い、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸が細胞増殖能に与える影響を評価した。(株) ポゾリサーチセンターに委託した本項以降の毒性試験では、D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA を比較対象として用いた。各種濃度に調整したテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸あるいは D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA を V79 細胞に 6 日間曝露させた後、培養後のコロニー数を計測し、ポリマーを処置していないコントロール群を 100%としたときのコロニー数の比率を算出した。Figure 19 に示すように、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸では、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度において増殖障害が認められ、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上になるとコロニー形成は認められなくなり、 IC_{50} は 99.21 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と算出された。一方、D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA では、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において既にコロニー形成は認められておらず、 IC_{50} は 6.93 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と算出された。前項の WST-1 細胞増殖アッセイにおいても定性的に確認されていたが、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の安全性は D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA より約 10 倍優れていることが示された。

製薬企業の安全性部門の専門家から、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の IC_{50} をもとに、その細胞障害性の絶対値は強くもなく弱くもないレベルとの見解を得ており、今回の構造変更のコンセプトは一定の成功を収めたと著者らは考えている。一方、今回の結果は、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸自体の安全性を示したものである。本ヒアルロン酸誘導体は、Figure 3 の作業仮説が示す通り、その近傍に存在する物質の細胞内への取り込みを促進する。選択性が付与されていないため、適用部位で想定される共存物を含めた安全性評価も求められる。その結果によっては、抗原とテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸を含有する製剤を無菌的に調製する、適用部位の洗浄後に投与する、投与領域の気密性を高めるデバイスを含めた製剤設計を行う等の対策を講じる必要性も指摘される。今回、膜透過ペプチドを固定化するプラットフォームの安全性に着目した材料設計を行ったが、ペプチド鎖に着目した材料設計でも安全性を改善できるかもしれない。Figure 16 に示す通り、テトラグリシン-L-オクタアルギニンとヒアルロン酸を混合しただけでは、アジュバント活性を示さない。テトラグリシンの代わりに、より分解されやすいペプチドスペーサーを用いることによって、アジュバントとしての役割を果たしたヒアルロン酸誘導体が速やかに分解されるならば、同誘導体自体の毒性や共存物の取り込みによる毒性も軽減できることが期待される。酵素が封入された時限放出型マイクロカプセルなどを同時投与し、ある時点でスペーサーを切断してテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸を無効化することも一つのアイディアである。一方、最善策は、選択性の付与である。医薬品添加剤として使用されている水溶性高分子を加えて粘度を高める製剤的工夫は、一つの方策として挙げられる。適用部位の水分による希釈を遅らせることにより、同部位に常在する物質のペプチド鎖への接近を妨げ、かつ、ペプチ

ド鎖近傍に抗原を高濃度で長く局在化させることにより、取り込み効率と取り込む物質の選択性が向上することが期待される。前述の酵素封入時限放出型マイクロカプセルもあわせて添加し、水分の希釈による製剤の崩壊が始まる時点で酵素が放出され、膜透過ペプチド固定化高分子を無効化するなど、より複雑な製剤設計を通して選択性を高める工夫も考えられる。また、現時点で具体策があるわけではないが、ある化学構造を持つ物質のみの取り込みを促進するセンサー機能を膜透過ペプチド固定化高分子が持つことができれば、その化学構造を抗原（あるいはバイオ医薬）に導入することにより、ほぼ完全な選択性を付与することができる（適用部位に存在し得る物質がその化学構造を持たず、その化学構造が抗原等の活性に有意に影響しないことが前提条件であるが）。アイデアの着想に取り掛かった段階ではあるが、今後、選択性の観点からの検討も始める予定である。

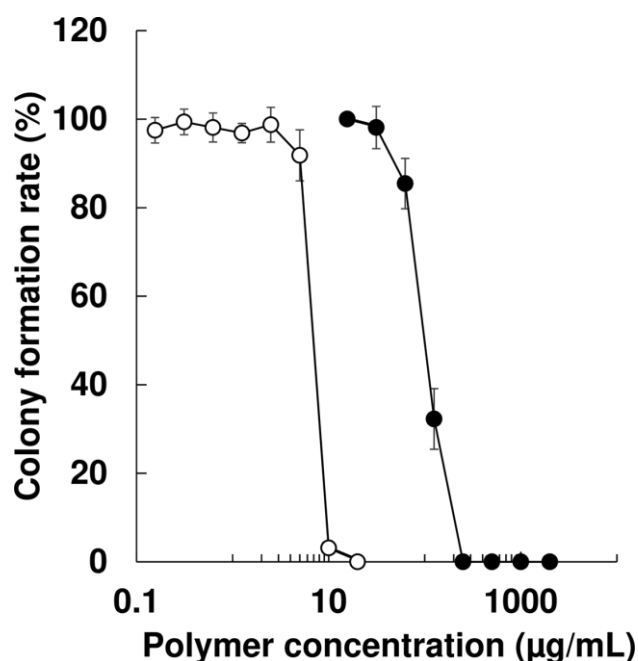


Figure 19. Colony formation rates of V79 Chinese hamster lung fibroblast cells in the presence and absence of oligoarginine-linked polymers (mean \pm SD, $n = 3$). V79 cells were incubated for 6 days in either media containing tetraglycine-L-octaarginine-linked hyaluronic acid (●), media containing D-octaarginine-linked PNVA-co-AA (○), or the polymer-free media at 37 °C. Concentrations of the former and latter polymers were adjusted to 15.6–2000 and 1.56–20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. Cells were stained with Giemsa, and colonies in which 50 or more cells were included were counted. A colony formation ability was calculated as the ratio of the number of colonies to the number of seeded cells. A colony formation rate in the polymer-free conditions was regarded as 100% (control). The rate in the presence of oligoarginine-linked polymers was expressed as the percentage of the colony formation ability in the presence of the polymers to that in the control experiment.

3-4) 小核試験

次に、オリゴアルギニン固定化高分子の染色体異常に及ぼす影響を評価するため、ヒトリンパ芽球由来細胞の TK6 細胞を用いた小核試験を行った。代謝活性作用を持つ S9mix の共存/非共存下 (S9mix 共存下では代謝物の評価が可能)、各種濃度に調整したテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸あるいは D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA の溶液中において TK6 細胞を培養し、細胞の増殖率測定と形態観察を行った。S9mix 非共存下の短時間処理法 (4 時間インキュベート→培地交換後 20 時間インキュベート)、S9mix 共存下の短時間処理法、S9mix 非共存下の連続処理法 (24 時間インキュベート) の 3 通りの条件で TK6 細胞を培養した。オリゴアルギニン固定化高分子の上限濃度は 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ として、細胞生存率を考慮した上で観察に供する濃度範囲を決定した。Table 4 に示す通り、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の上限濃度は、S9mix 非共存下では処理法に関わらず 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、S9mix 共存下の短時間処理法では 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。これに対して、D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA の上限濃度は、それぞれ 15.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、31.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、この濃度の違いからもテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の安全性は D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA よりも優れていることが示された。テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸存在下で培養された TK6 細胞を顕微鏡で観察した結果、小核を有する細胞の発現率は、短時間処理法および連続処理法のいずれの濃度においても、陰性対照群 (生理食塩水群) と比較して統計学的に有意な増加は認められず、濃度依存性も見られなかった。短時間処理法においては、S9mix の添加による代謝物の有無の影響は認められなかった。また、小核を有する細胞の出現率は、いずれの処理法のいずれの濃度においても、陰性対照群の背景データの 95% 確率分布の範囲内であった。以上のことから、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸およびその代謝物の染色体異常誘発性は陰性と判断された。また、上限濃度は低下したものの、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸と同様、D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA およびその代謝物の染色体異常誘発性は陰性と判断された。なお、すべての処理法において、陰性対照群では小核を有する細胞の出現率は背景データの 95% 確率分布の範囲内であった。これに対して、陽性対照群では、陰性対照群と比較すると、小核を有する細胞の出現率において統計学的に有意な増加が認められた。以上、本試験は適切に実施されており、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸および D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA は、本試験条件下において、染色体異常を誘発しないと結論付けられた。

Table 4. Frequency of micronuclei in TK6 human lymphoblast cells treated with oligoarginine-linked polymers ^{a, b, c}.

polymer	incubation time (h)	S9Mix	polymer conc. (µg/mL)	cells with		trend test	cells with polynuclei number of cells (%)	cells in metaphase number of cells (%)	RPD (%)		
				micronuclei (%)							
tetraglycine-L-octaarginine-linked hyaluronic acid	4→20	-	negative control	0.7	N.S.	0.5	1.4	100			
			15.6	0.8					0.8	2.5	100
			31.3	0.8					0.8	1	86
			62.5	0.5					0.5	1.4	34
	4→20	+	negative control	0.7	N.S.	1.1	1.5	100			
			31.3	0.7					0.6	2.7	97
			62.5	0.5					0.8	2.5	101
			125	0.7					1	1.3	31
			positive control	2.0 ^d					2.2	1.8	61
	24	-	negative control	0.7	N.S.	0.7	1.2	100			
			15.6	0.7					0.5	0.8	106
			31.3	0.6					1.1	1.9	85
			62.5	0.6					1.3	2.1	40
			positive control	2.5 ^d					1.8	35.5	74
	D-octaarginine-linked PNVA-co-AA	4→20	-	negative control	0.7	N.S.	0.8	2.6	100		
				3.91	0.6					0.4	1.9
7.81				0.6	0.6					1.3	33
15.6				0.5	1.7					1.4	0
4→20		+	negative control	0.7	N.S.	0.3	1.5	100			
			7.81	0.7					0.4	2.1	97
			15.6	0.7					0.8	1.7	75
			31.3	0.7					0.7	0.9	0
			positive control	1.7 ^d					2.4	2.8	69
24		-	negative control	0.5	N.S.	0.5	1.7	100			
			3.91	0.4					1.6	1.9	71
			7.81	0.5					0.6	1.2	36
			15.6	0.4					0.6	1.2	0
			positive control	3.0 ^d					2.9	35.2	73

^aNegative control, water for injection. ^bPositive control, cyclophosphamide in metabolic-activated conditions (1.5 µg/mL), and colchicine in nonactivated conditions (0.006 µg/mL). RPD, relative cell population doubling number. ^cN.S., not significant, Cochran–Armitage trend test, $p > 0.05$. ^dFisher’s exact test ($p < 0.05$).

3-5) 復帰突然変異試験 (Ames 試験)

最後に、ネズミチフス菌 TA100、TA1535 および大腸菌 WP2 *uvrA* を用いた塩基置換変異と、ネズミチフス菌 TA98 および TA1537 を用いたフレームシフト変異を通して、両オリゴアルギニン固定化高分子の遺伝子突然変異誘発能を評価した。オリゴアルギニン固定化高分子の用量は 19.5~5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の範囲で設定し、S9mix を用いて代謝物の遺伝子突然変異誘発能も評価した。各菌種はプレート上において、増殖を阻害された状態から突然変異を通して増殖可能となり、コロニーを形成する。寒天培地上で各菌株とオリゴアルギニン固定化高分子を 2 日間培養し、コロニー数 (復帰突然変異数) を計測することにより、遺伝子突然変異誘発能を評価した。Table 5 に示す通り、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の用量を 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ に設定した場合、S9mix の添加の有無にかかわらず、沈殿が確認された。D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA では、S9mix を添加した場合は 2500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上で、S9mix を添加しなかった場合は 19.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上で沈殿が確認された。生育阻害は、実体顕微鏡による観察下、菌株に関わらず、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸では、S9mix を添加しなかった場合は 19.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上、S9mix を添加した場合は 1250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で認められた。D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA でも同様に、菌株に依存せず、S9mix を添加しなかった場合は 19.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上、S9mix を添加した場合は 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で生育阻害が観察された。代謝物の存在/非存在下に関わらず、いずれの菌株においても陰性対象値の 2 倍以上になるコロニー数の増加は認められず (2 倍を超えたときに陽性と判定)、用量反応性も認められなかった。以上、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸および D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA は、本試験条件下において、細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有さないと結論付けられた。

Table 5. Frequency of mutation in *Salmonella tryphimurium* and *Escherichia coli* treated with oligoarginine-linked polymers (mean of 2 experiments).

polymer	S9Mix	polymer dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	number of reverse mutation (the number of colonies/plate)				
			base substitution-type			frameshift-type	
			TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
tetraglycine-L- octaarginine-linked hyaluronic acid	–	0 ^c	104	12	21	26	8
		19.5	101 ^a	9 ^a	18 ^a	22 ^a	6 ^a
		78.1	97 ^a	11 ^a	20 ^a	23 ^a	6 ^a
		313	96 ^a	13 ^a	17 ^a	18 ^a	7 ^a
		1250	77 ^a	0 ^a	12 ^a	6 ^a	3 ^a
		2500	92 ^a	0 ^a	5 ^a	5 ^a	0 ^a
		5000 ^b	66 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	+	0 ^c	91	8	25	28	9
		19.5	85	11	25	30	7
		78.1	93	9	30	28	11
		313	107	9	26	24	8
		1250	89 ^a	9 ^a	18 ^a	16 ^a	3 ^a
		2500	89 ^a	4 ^a	15 ^a	19 ^a	3 ^a
		5000 ^b	56 ^a	7 ^a	7 ^a	13 ^a	4 ^a
D-octaarginine- linked PNVA-co-AA	–	0 ^c	98	10	21	18	8
		19.5 ^b	87 ^a	7 ^a	16 ^a	16 ^a	7 ^a
		78.1 ^b	92 ^a	7 ^a	18 ^a	16 ^a	6 ^a
		313 ^b	75 ^a	5 ^a	19 ^a	13 ^a	3 ^a
		1250 ^b	75 ^a	2 ^a	16 ^a	14 ^a	2 ^a
		2500 ^b	82 ^a	4 ^a	19 ^a	7 ^a	4 ^a
		5000 ^b	75 ^a	6 ^a	10 ^a	6 ^a	1 ^a
	+	0 ^c	105	10	23	30	7
		19.5	96	8	20	30	7
		78.1	93	6	25	21	6
		313	95	4	12	22	6
		1250	95	6	16	18	3
		2500 ^b	102	5	18	23	7
		5000 ^b	103 ^a	5 ^a	13 ^a	20 ^a	5 ^a

^aGrowth inhibition of bacteria was observed. ^bPrecipitation of polymers was observed.

^cNegative control (water for injection) TA100, TA1535, TA98, and TA1537. *Salmonella tryphimurium* WP2 *uvrA*, *Escherichia coli*.

第4節 小括

著者が所属する研究室ではこれまで、膜透過ペプチドの D-オクタアルギニンやテトラグリシン-D-オクタアルギニンを PNVA-co-AA に固定化した非分解性の膜透過ペプチド固定化高分子に関して、経鼻投与型インフルエンザワクチンの粘膜アジュバントとしての有用性を検討してきた。インフルエンザウイルス HA ワクチンや不活化 H1N1 インフルエンザウイルスなどのタンパク質抗原と D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA をマウス鼻腔内へ7日間隔で4回共投与することにより、①抗原特異的な IgG および IgA がそれぞれ、血液中および鼻粘膜上に産生されること、②鼻粘膜上に分泌された IgA は、投与抗原として用いた不活化 H1N1 ウイルスの同一亜型内の異なるウイルス株の rHA だけでなく、H3N2、H5N1 などの異なる亜型のウイルス株の rHA にも交叉反応性を示すこと、③投与抗原として用いた不活化 H1N1 ウイルスに対する十分量の抗体（血中 IgG および鼻腔内 IgA）が産生され、マウス馴化した感染力のある同じウイルス株に曝露しても感染は完全に防御されること、がこれまでの研究で既に確認されている。膜透過ペプチド固定化高分子をアジュバントとして用いた経鼻投与型インフルエンザワクチンの可能性が免疫活性面から示される一方、本ワクチンの臨床応用には、これまでの研究が残した 2 課題と未検討の 1 課題の解決が不可欠であることも示された。前者の 2 課題の 1 つ目は、膜透過ペプチド固定化高分子の安全性であり、D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA の非分解性を改善することが強く望まれる。PNVA-co-AA は、生体適合性はあるものの生体内で分解されない。膜透過ペプチドも非分解性の D 体のアミノ酸から構成されており、D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA の蓄積による毒性の潜在的なリスクが懸念される。前者の 2 課題の 2 つ目は、投与スケジュールである。注射型インフルエンザワクチンの投与スケジュールは、1 シーズンに 1 回投与あるいは 1 ヶ月間隔 2 回投与であり、マウス実験で採用された毎週 4 回投与のような頻回投与の臨床適用は現実的でない。さらに、粘膜投与型ワクチンに期待される最大の利点は、異種ウイルス株に対する感染防御や重症化予防効果である。投与株と異なるウイルス株に対する感染実験は実施されておらず、異種ウイルス株への感染防御や重症化予防に対する膜透過ペプチド固定化高分子のアジュバントとしての有用性は、現在のところ不明である。これが未検討の 1 課題である。

本章では、D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA のこれまでの研究が残した前者の 2 課題の解決に向けて、検討を行った。まず、膜透過ペプチド固定化高分子を生分解性にするため、膜透過ペプチドを構成するアミノ酸は L 体とし、膜透過ペプチドを固定化する高分子プラットフォームを PNVA-co-AA からヒアルロン酸に変更した。ヒアルロン酸は、N-アセチルグルコサミンと D-グルクロン酸からなる二糖が直鎖状に重合した多糖である。ヒアルロン酸は人体に広く分布する細胞外マトリックスであり、ヒアルロニダーゼによって分解される。非分解性の膜透過ペプチド固定化高分子においては、アミド結合を介して D-オクタアルギニンの末端アミノ基を PNVA-co-AA のアクリル酸ユニットのカルボキシル基に

固定化している。また、両官能基の間にテトラグリシンをスペーサーとして導入することにより、固定化率が上昇し、アジュバント活性が増強することが確認されている。そこで、生分解性の膜透過ペプチド固定化高分子においては、最初からテトラグリシンスペーサーを介して、ヒアルロン酸の D-グルクロン酸ユニットのカルボキシル基に L-オクタアルギニンを固定化することを試みた。各種機器分析を通して、得られたヒアルロン酸誘導体の物性を評価した結果、D-グルクロン酸ユニットの約 60%にテトラグリシン-L-オクタアルギニンが固定化されていることが確認された。

目的とする生分解性の膜透過ペプチド固定化高分子であるテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の合成に成功したことから、次に、同ヒアルロン酸誘導体のアジュバント活性を量的および質的観点から検証した。本検討においては、D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA あるいはテトラグリシン-D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA を比較対象として用いた。インフルエンザウイルス HA ワクチンとテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の混合物をマウス鼻腔内へ 7 日間隔で 4 回共投与することにより、抗原特異的な血中 IgG および鼻腔内 IgA が産生された。両抗体価は、アジュバントとしてテトラグリシン-D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA を用いた場合と統計学的に同等であった。投与間隔を変えずに投与回数を 2 回に削減したところ、アジュバントとして用いた膜透過ペプチド固定化高分子の種類に関わらず、抗体価は同程度減少した。米国の疾病予防センターは、インフルエンザウイルス HA ワクチンなどのワクチンの接種間隔を 4 週間以上にすることを推奨している。体内で認識した抗原に対する抗体産生の誘導に数週間かかるためであり、注射型インフルエンザワクチンの投与スケジュールも実際、1 シーズンに 1 回投与あるいは 1 ヶ月間隔 2 回投与である。この事実を参考に、投与間隔を 28 日に延長して 2 回投与で免疫したところ、両抗体価は毎週 4 回投与と統計学的に同等なレベルに回復した。いずれの膜透過ペプチド固定化高分子を用いても同じ結果であり、両高分子の量的なアジュバント活性は同等であることが実証された。引き続き、不活化 H1N1 NCL 株を投与抗原として用いて、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸あるいは D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA の共投与下、28 日間隔 2 回投与のスケジュールで誘導された鼻腔内 IgA の交叉反応性を検討した。IgA は、NCL 株と同じ H1N1 に属する PR8 株や CA 株の rHA だけでなく、異なる亜型の H3N2 に属する BNE 株や H5N1 に属する VNM 株の rHA にも交叉反応性を示した。そのプロファイルに膜透過ペプチド固定化高分子間の違いは認められず、両高分子の質的なアジュバント活性は同等であることが実証された。

テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸は、生体由来のヒアルロン酸をプラットフォームとして、生体内での分解が担保されている L 体のオクタアルギニンを固定化したものであり、非分解性の合成高分子をプラットフォームとする D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA と比較して、安全性が優れることが期待される。最後に、新薬開発時に必須の試験であるコロニー形成阻害試験、小核試験および Ames 試験を通して、両膜

透過ペプチド固定化高分子の安全性を比較検証した。同検証は、毒性試験の受託研究機関である(株)ボゾリサーチセンターに委託することにより、専門的かつ客観的に安全性を評価した。チャイニーズハムスター肺線維芽細胞由来株 V79 細胞を用いたコロニー形成阻害試験において、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の IC₅₀ は 99.21 µg/mL、D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA の IC₅₀ は 6.93 µg/mL と見積もられ、前者の毒性は後者の毒性の約 1/10 であることが示された。製薬企業の安全性部門の専門家から、絶対値としてのテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の細胞障害性は強くもなく弱くもないレベルとの見解を得ており、今回の構造変更のコンセプトは一定の成功を収めたと考えられた。小核試験ではヒトリンパ芽球由来細胞の TK6 細胞を用いて膜透過ペプチド固定化高分子の染色体異常誘発能について、Ames 試験ではネズミチフス菌 TA100、TA1535 および大腸菌 WP2 uvrA を用いた塩基置換変異と、ネズミチフス菌 TA98 および TA1537 を用いたフレームシフト変異を通して、膜透過ペプチド固定化高分子の遺伝子突然変異誘発能を評価した。両試験においては、代謝活性化した系もあわせて検討し、膜透過ペプチド固定化高分子の代謝物の影響も評価した。小核試験および Ames 試験の結果を通して、両膜透過ペプチド固定化高分子は、それらの代謝物ともに、染色体異常および遺伝子突然変異を誘発しないことがそれぞれ証明された。他の毒性試験による評価の必要性はあるものの、本毒性試験の結果をもとに、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸は、医薬品添加剤として開発可能な一定の安全性を有していると考えられた。一方、今回の結果は、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸自体の安全性を示したものである。膜透過ペプチド固定化高分子による細胞内取り込み促進のメカニズムを鑑みると、抗原や適用部位に常在する共存物を含めた安全性評価も求められる。また、今回は、膜透過ペプチドを固定化するプラットフォームの安全性に着目した材料設計を行ったが、分解速度を速めるなど、ペプチド鎖に着目した化学構造の最適化でも安全性を改善できるかもしれない。最善策は、膜透過ペプチド固定化高分子による取り込み促進能に選択性が付与されることであり、膜透過ペプチド固定化高分子の化学構造だけでなく製剤的手法も加味して、この問題に取り組む予定である。

以上、本章での検討を通して、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸のアジュバント活性は、D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA と量的・質的に同等であることが実証された。1 および 2 回目の投与間隔を 4 週間と長くして、ブースティング効果を最適化することにより、投与回数を 4 回から 2 回に削減しても抗体レベルを同程度に維持できたことから、臨床応用が見込まれる投与スケジュールの設計が可能となった。また、生分解性への変更を通して、期待通り、安全性は大きく改善された。

第3章 異種インフルエンザウイルスの感染に対するテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の粘膜アジュバントとしての感染防御および重症化予防効果の実証

第1節 異種インフルエンザウイルスの感染に対するテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の粘膜アジュバントとしての感染防御および重症化予防効果の実証

1) 序論

これまでの検討から、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸は、D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA と同等のアジュバント活性を有し、D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA よりも優れた安全性を示すことが確認された。誘導された IgA の量的および質的特性に差はなく、免疫に用いる投与株に対する感染防御効果は、D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA 同様、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸でも獲得できることが予想された。一方、経鼻インフルエンザウイルスワクチンに最も期待される特性は、予測と異なる株が流行したときの IgA の交叉反応性に基づく感染防御および重症化予防効果である。第2章の検討において、不活化インフルエンザウイルス A 型 H1N1 の NCL 株とテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の混合物をマウス鼻腔内に28日間隔で2回投与することにより誘導された鼻粘膜上の IgA は、同一亜型内の異なるウイルス株や亜型を超えたウイルス株由来の組み換え HA タンパク質に交叉反応することが確認された。しかし、その反応が、実際の感染防御や感染した場合の重症化の予防を可能にするか否かは不明である。

本章では、不活化 H1N1 NCL 株とテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の共投与により免疫されたマウスを用いて、マウスに馴化され、その体内で増殖する感染性の H1N1 PR8 株に対する感染実験を実施した。亜型を超えた異種インフルエンザウイルスに対する感染防御および重症化予防効果については、研究としては非常に興味深いものの、臨床で用いられているインフルエンザウイルス HA ワクチンには、ヒトへの感染が問題となる H1N1 および H3N2 に分類されるウイルス株がそれぞれ含まれている。このことから、同一亜型内の異なるウイルス株に対する感染防御や重症化予防を達成することにより季節性インフルエンザの臨床的課題は実質的に解決できると判断し、同一亜型内の異種インフルエンザウイルス間の感染実験をデザインした。なお、本感染実験は、D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA をアジュバントとして用いた同種インフルエンザウイルス間の感染実験を過去に委託した経緯のある北里環境科学センターに今回も委託し、北里大学北里生命科学研究所（前述の H1N1 PR8 株を保有し、その取扱いに十分なノウハウと経験を持つ）において、同研究所のスタッフによる技術サポート下で実施された。

2) 異種インフルエンザウイルスに対する感染実験のデザイン

感染実験の概略を Figure 20 に示す。本感染実験は、本研究の共同研究者であり、ウイルス学の専門家である馬場昌範教授（鹿児島大学ヒトレトロウイルス学共同研究センター抗ウイルス化学療法研究分野）との十分な討議を通してデザインした。抗原として不活化 NCL 株、アジュバントとしてテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸を用いた。マウスは 3 群、すなわち、Group A (PBS 投与、n = 8)、Group B (抗原投与 (PBS に溶解)、n = 12) および Group C (抗原およびアジュバント投与 (PBS に溶解)、n = 12)) に分類された。各群のマウスは、28 日間隔で 2 回、投与液を経鼻接種された。2 回目投与から 2 週間後、抗体価を測定するため、Group B および C から 4 匹ずつをランダムに取り出し、と殺した。なお、抗原を投与していない Group A のマウスは、理論上、免疫誘導されることはなく、前回実施した同種インフルエンザウイルス株に対する感染実験においても、同コントロール群での非誘導は実証されているので、今回、同群のウイルス曝露前の抗体価の測定は割愛した。同日、Group A~C の残りのマウス (n = 8、各群) は、マウス馴化された感染力のある PR8 株に曝露された (8.0×10^5 PFU/マウス、LD₅₀ の 2 倍量のウイルスを経鼻接種)。曝露量は、他の感染実験の報告を参考に^{14,33)}、免疫していないコントロール群の大半のマウスが 7~10 日程度で死亡する量に設定した。曝露後 21 日間、マウスの生死と体重をモニタリングした後、最後まで生存していたマウスについては、抗体価を測定した。施設の所属員以外は担当できないモニタリングを含めたマウスの管理および専門的知識や技術を必要とするウイルス経鼻投与は北里生命科学研究所のスタッフがを行い、投与液の調製や ELISA による抗体価の測定 (摂南大学にて実施)、2 回の経鼻投与やあらかじめ決められた時点でのマウスのと殺並びにサンプリングは、著者が北里大学に出張して (計 4 回)、実験を行った。

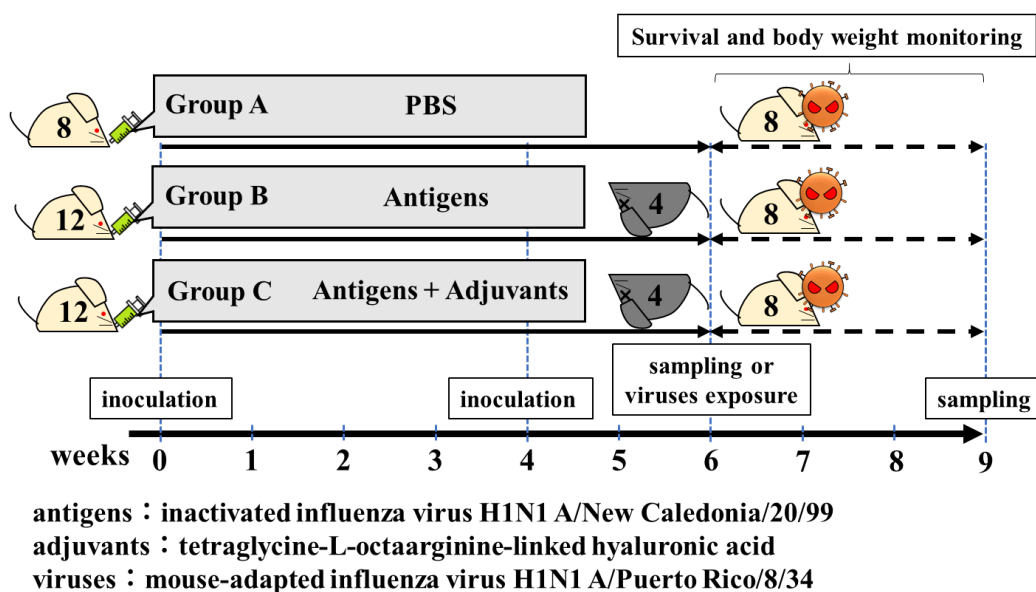


Figure 20. Outline of infection experiments against heterologous influenza viruses.

3) PR8 株曝露後の生存率の推移

PR8 株曝露後の生存率の推移を Figure 21 に示す。ウイルス曝露から 7 日目、PBS のみを投与し、免疫が誘導されていない Group A のマウス 1 匹が死亡し、その後 11 日以内に同群のマウスの計 7 匹が死亡した。モニター最終日の 21 日目まで生存した残りの 1 匹は、ウイルス感染に伴い重症化したものの、獲得免疫が誘導されて体内のウイルスが排除され、生命の危機を脱して回復したと推測された。不活化ウイルスのみで免疫された Group B、不活化ウイルスとテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸で免疫された Group C においては、モニター最終日の 21 日目まで、全マウスが生存した。今回実施した抗原の投与量であれば、粘膜アジュバントを共投与しなくても、不活化ウイルス（抗原）の経鼻投与を通して、死を免れるのに必要な免疫は獲得できていることが示された。

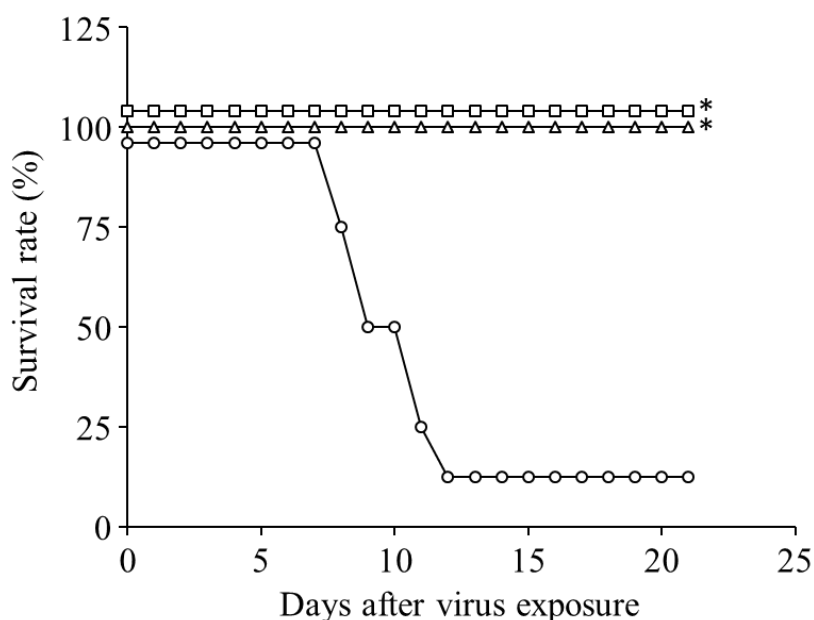


Figure. 21. Survival rate after virus exposure. Mice were nasally inoculated twice with either 20 μ L PBS (Group A, \circ), 20 μ L PBS containing 2 μ g inactivated H1N1 A/New Caledonia/20/99 (NCL) viruses (group B, \triangle), or 20 μ L PBS containing 2 μ g inactivated NCL viruses and 100 μ g tetraglycine-L-octaarginine-linked hyaluronic acid (group C, \square) at 28-day intervals. Fourteen days after the second inoculation, mice ($n = 8$, each group) were exposed to mouse-adapted infectious H1N1 A/Puerto Rico/8/34 viruses at a dose of 8.0×10^5 PFU/mouse (day 0). After virus exposure, survival of each mouse was monitored for 21 days. *: significant difference from group A analyzed by the Log-rank test.

4) PR8 株曝露後の体重の推移

PR8 株曝露日の体重を 100%としたときのモニター期間内の体重の推移（経日変化）を Figure 22 に示す（Figure 22a～c：各群の個別データ、Figure 22d：各群の平均値）。免疫が誘導されていない Group A では、ウイルス曝露後 3 日目辺りから体重が減少し始め、約 5%/日の速度でほぼ直線的に減少し続けた。曝露後 10 日目に死亡あるいは生存していたマウスの体重は、ウイルス曝露日の 70%に満たなかった（Figure 22a）。同群においては、全例が明らかにウイルス感染し、おそらくウイルス増殖に伴う致命的な肺炎のため、11 日以内に 8 例中 7 例が死亡した。モニター期間最終日まで生存した残りの 1 匹は、ウイルス感染に伴って重症化したものの、誘導された免疫の作用により生命の危機を脱した。ウイルス曝露後 15 日目以降、ウイルスが体内から排除され、体重増加に転じたものの、ウイルス感染に伴って生死をさまようほどのダメージを受けたことから、モニター最終日の 21 日目までに、体重は初期値まで回復しなかった。

抗原のみで免疫された Group B では、7 匹のマウスで Group A と同様の体重減少が観察されたが、残りの 1 匹の体重減少は比較的軽微であった（Figure 22b）。ウイルス曝露後 8 日間の体重減少の推移が Group A と B でほぼ一致していたことから（Figure 22d）、Group B のマウスも全例がウイルス感染し、そのうち 7 匹は Group A のマウスと同様に重症化し、急激な体重減少が観察されたと考えられた。しかし、Group A のマウスと異なり、Group B のマウスでは、PR8 株に対する免疫が相対的に早く誘導され、体内のウイルスが排除されたため、最悪の事態である死を全例が免れることができたと推測された。Aiguo らは、あらかじめ免疫を施されたアヒルは、施されていないアヒルに比べて、免疫に用いられたウイルス株と同じ亜型の異なるウイルス株に暴露されたとき、HA 阻害活性を相対的に早く獲得できることを報告している⁵¹⁾。Group B のマウスは、H1N1 に分類される NCL 株で免疫され、同じ亜型の PR8 株に暴露された。Group A のマウスでは、あらかじめ免疫を施されることなく PR8 株に暴露された。Aiguo らの報告と同じ現象を我々も観察したということと思われた。しかし、Group B のマウスもウイルス感染に伴う相当なダメージを受けたため、モニター最終日の 21 日目までに、半数のマウスの体重は初期値まで回復しなかった。

抗原とテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸で免疫された Group C では、ウイルス感染に伴う深刻な体重減少はまったく観察されなかった（Figure 22c）。8 匹中 4 匹のマウスの体重はほとんど減少しておらず、これらのマウスはウイルスへの感染防御が成立したことを強く示唆した。1 匹のマウスは、ウイルス曝露後 6 日目に体重減少のピーク（曝露日と比較して約 10%の減少）を示したが、ピーク後 7 日以内に体重は完全に回復した。残り 3 匹のマウスにおいて、体重のわずかな減少が観察されたが、いずれの体重も速やかに回復した。

我々は、Figure 23a に示すデータ処理を通して、体重減少、すなわち重症化の定量化を試みた。ウイルス曝露時点の体重を 100%として、その体重からの減少分 (%) を日に対して積分 (%・day) した各群の個別マウスのデータを Figure 23b に示す。我々は、ウイルス

感染に伴う症状の重症化の指標として、この値、すなわち体重減少面積を用いた（体重減少面積が大きいほど症状が深刻化していることを意味する）。Group A で生存した 1 匹のマウスの体重減少面積は約 400%・day であり、この数値は死のリスクを抱えた最も深刻なケースに相当すると考えられた。全例が生存した Group C のマウスの体重減少面積は平均で 15%・day であり、ばらつきも小さく、50%・day を超える個体は観察されなかった。一方、同様に全例が生存した Group B のマウスの体重減少面積のばらつきは大きく、最大および最小の体重減少面積はそれぞれ、Group A で唯一生存したマウスおよび Group C で検出可能レベルの体重減少を示したマウスの体重減少面積にほぼ一致していた。また、Group B と C の体重減少面積の差は統計学的に有意であった。以上の定量的解析から、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸は、同一亜型内の異なるウイルス株に対する感染から宿主を防御する、あるいは同ウイルス感染に伴う重症化を予防する上において、重要な役割を担っていることが示された。

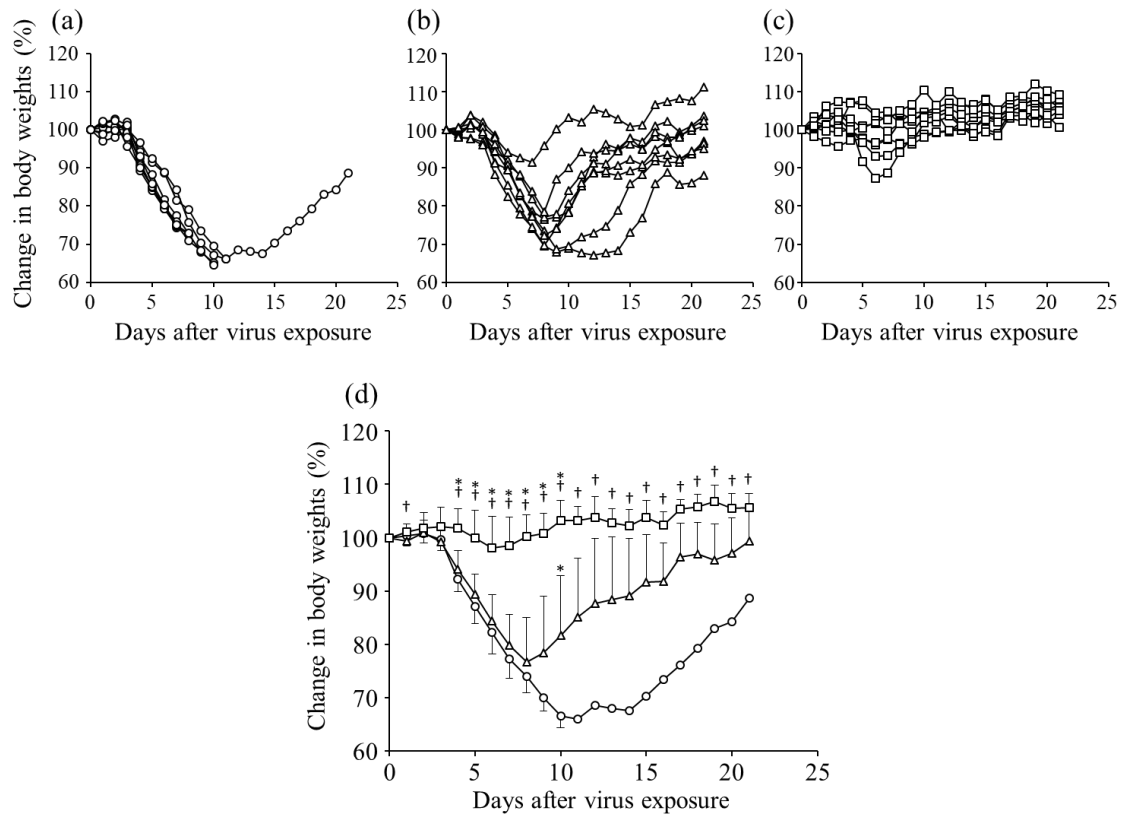


Figure. 22. Change in body weights (a-d) observed for each of mice after virus exposure. Mice were nasally inoculated twice with either 20 μ L PBS (Group A, \circ), 20 μ L PBS containing 2 μ g inactivated H1N1 A/New Caledonia/20/99 (NCL) viruses (group B, \triangle), or 20 μ L PBS containing 2 μ g inactivated NCL viruses and 100 μ g tetraglycine-L-octaarginine-linked hyaluronic acid (group C, \square) at 28-day intervals. Fourteen days after the second inoculation, mice ($n = 8$, each group) were exposed to mouse-adapted infectious H1N1 A/Puerto Rico/8/34 (PR8) viruses (day 0) at a dose of 8.0×10^5 PFU/mouse. After virus exposure, body weights were monitored until either death or the end of monitor period (day 21). Body weights after virus exposure were expressed as the percentage of weights on day 0. (a)-(c) and (d) represent data of individual mice in groups A-C and mean \pm SD in each group, respectively. †: significant difference between groups B and C analyzed by the Student's t-test. *: significant difference from group A analyzed by the Tukey-Kramer test.

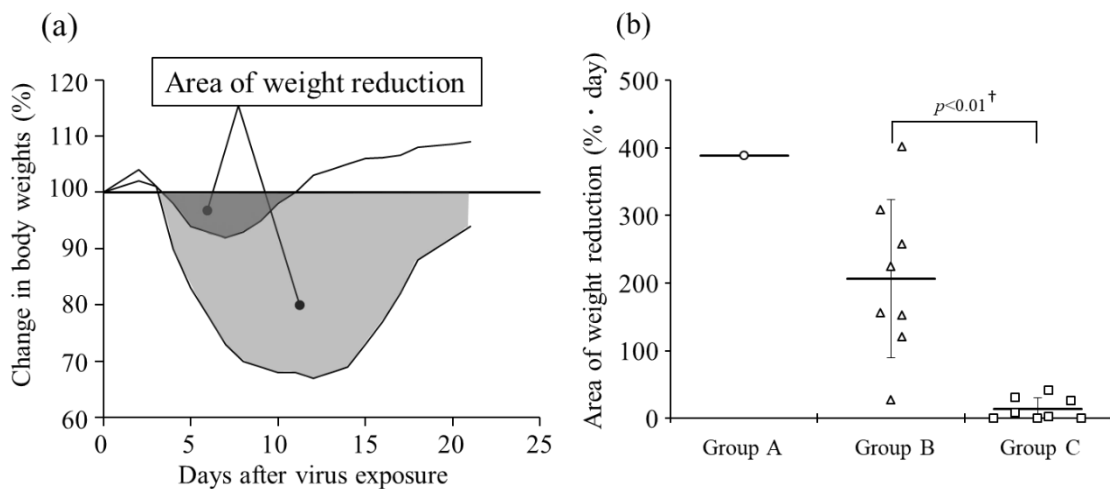


Figure 23. Area of weight reduction observed for each of mice after virus exposure. (a) The area between the curve defining the weight change versus day and the horizontal line indicating 100% (body weights on day 0) was calculated by the trapezoidal method until either restoration of body weights to those on day 0 or the end of monitor period (day 21). Dead mice were excluded from the calculation. Each dot in (b) represents area of weight reduction in individual mice (n = 1 in group A, n = 8 in groups B, n = 8 in group C), and horizontal lines and vertical bars represent means and SD, respectively. †: significant difference between groups B and C analyzed by the Student's t-test.

5) 免疫誘導のために投与された NCL 株に対する抗体価

PR8 株への曝露直前のマウス（ウイルス曝露日、曝露前にランダムに取り出した Group B および C の各群 4 匹）および曝露後 21 日目まで生存していたマウス（Group A : 1 匹、Group B : 8 匹、Group C : 8 匹）の抗体価を測定した。Group B および C の個々のマウスについて、抗原として投与された不活化 NCL 株に対する血液中の IgG および鼻粘膜上の IgA の反応性を Figure 24 に示す。NCL 株を経鼻投与すると、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の共投与の有無に関わらず、IgG が誘導され、Group B と C の間の IgG レベルに統計学的な有意差は認められなかった (Figure 24a, closed symbols)。以前に実施した不活化 PR8 株を抗原として用いた同種インフルエンザウイルスに対する感染実験においても、アジュバントとしての D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA の共投与の有無に関わらず、IgG が誘導されたが、抗原のみの投与で誘導された IgG レベルは、抗原とアジュバントの共投与により誘導された IgG レベルよりも統計学的に低かった³³⁾。今回の感染実験では、免疫原性が PR8 株よりも強い NCL 株が抗原として用いられたため、アジュバントがなくても IgG 誘導がより加速されたと考えられた。一方、不活化 NCL 株投与による IgA 誘導は、前回の感染実験と同様に、アジュバントの共投与により有意に促進された (Figure 24b, closed symbols)。以上の結果から、粘膜アジュバントの本質は有意な IgA 誘導であることが示された。

Group B および C において、PR8 株への曝露は、NCL 株への IgG の反応性を高める結果となった (Figure 24a, opened symbols)。①免疫株 (NCL 株) と感染株 (PR8 株) が異なること、②IgG の交叉反応性は一般的に低いこと⁵²⁾、③前回の感染実験において、不活化 PR8 株の経鼻投与で誘導された IgG は NCL 株にほとんど交叉反応しなかったこと³³⁾、から、我々は、PR8 株への曝露を通して NCL 株に対する IgG の反応性は上昇しないと予測していた。予測に反して IgG レベルは有意に上昇したが、その上昇の程度は、特に PR8 株への感染から防御されたと推測された Group C では小さかった。NCL 株と PR8 株の間の HA 遺伝子のヌクレオチドシーケンスに基づく相同性は 88.3%と高いため、特に PR8 株への感染が確実に起こった Group B において、IgG 誘導が促進されたのかもしれない。一方、Group B において、PR8 株への曝露後 21 日目の IgA の NCL 株への反応性は、曝露日に比べて有意に低下した。Group C では、IgA レベルの有意な変化は観察されなかった (Figure 24b, opened symbols)。Group B のように、PR8 株への感染が確実に起こったケースにおいても、PR8 株の免疫原性が低いため、NCL 株へ交叉反応する IgA の誘導は有意に促進されないことが示唆された。この示唆は、抗原もアジュバントも投与せず、PR8 株曝露後に唯一死を免れた Group A のマウスの抗体価によって支持されるかもしれない。同マウスにおいて、NCL 株に対する血中 IgG の反応性 (endpoint titer) は 19.3 であり、この値は PR8 株曝露後に観察された Group B および C のマウスにおける IgG レベルと同等であった。一方、IgA 誘導はほとんど観察されなかった (endpoint titer は検出限界の 2.3 未満)。

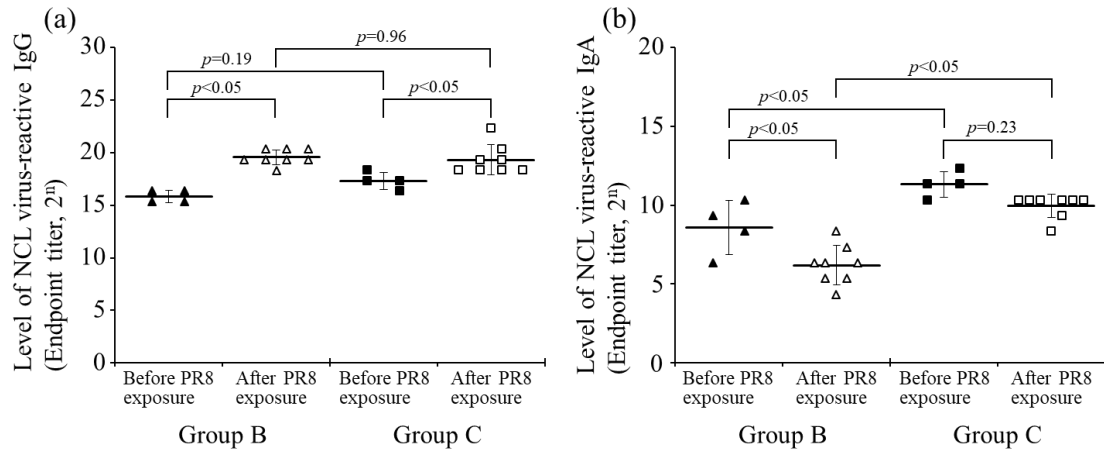


Figure. 24. Level of H1N1 A/New Caledonia/20/99 (NCL) virus-reactive IgG in sera (a) and secreted IgA in nasal wash fluids (b) in individual mice. Mice were nasally inoculated twice with 20 μ L PBS containing 2 μ g inactivated NCL viruses with (group C) or without (group B) 100 μ g tetraglycine-L-octaarginine-linked hyaluronic acid at 28-day intervals ($n = 12$, each group). Fourteen days after the second inoculation, mice were sacrificed to collect sera and nasal wash fluids ($n = 4$, each group, closed symbols). Residual 8 mice in each group were simultaneously exposed to mouse-adapted infectious H1N1 A/Puerto Rico/8/34 (PR8) viruses at a dose of 8.0×10^5 PFU/mouse. Twenty-one days after virus exposure, survived mice were sacrificed to collect the same biological samples ($n = 8$, each group, opened symbols). Each dot represents endpoint titers of antibodies in individual mice, and horizontal lines and vertical bars represent means and SD, respectively. Statistical significance was assessed with the Tukey-Kramer test.

6) PR8 株に対する抗体価

前項と並行して、PR8 株への曝露直前のマウスおよび曝露後 21 日目まで生存していたマウスの PR8 株への抗体価を測定した。Group B および C の個々のマウスについて、PR8 株に対する血液中の IgG および鼻粘膜上の IgA の反応性を Figure 25 に示す。テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の共投与の有無に関わらず、不活化 NCL 株により誘導された IgG は PR8 株に交叉反応し、Group C において、Group B よりも有意に高い抗体価が観察された (Figure 25a、closed symbols)。この IgG の交叉反応性は、前述した NCL 株と PR8 株との間の高い相同性によるものと考えられた。しかし、Group B において、IgG の PR8 株への反応性は同 IgG の NCL 株への反応性に比べて著しく低く (Figure 24a と Figure 25a の Group B の closed symbols の比較)、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸は、IgG の交叉反応性のさらなる促進など、免疫反応の質的变化にも寄与していることが示唆された。IgA については、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸を共投与した Group C では PR8 株への明確な交叉反応性が観察されたのに対して、同ヒアルロン酸誘導体を共投与していない Group B ではほとんど観察されなかった (Figure 25b、closed symbols)。これらの結果は、我々の過去の報告の結果と一致した^{32,33,43)}。

PR8 株への曝露により、抗原のみで免疫されたマウスの血中 IgG の PR8 株への反応性は著しく上昇した (Figure 25a、opened symbols、Group B)。Group B のマウスは PR8 株に感染し、体内に侵入したウイルスを排除するため、PR8 株に反応する IgG が大量に誘導された結果と考えられた。Group B では IgA の抗体価も有意に上昇しており (Figure 25b、opened symbols、Group B)、このことから Group B のマウスがウイルス感染したことが支持された。以上、Group B のマウスは、インフルエンザウイルスへの自然感染と同様のパターンで、PR8 株への免疫を後天的に獲得したと考えられた。テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸を共投与した Group C においても、PR8 株曝露後、同ウイルス株に対する IgG の反応性が有意に上昇したが (Figure 25a、opened symbols、Group C)、Group B で観察された上昇幅よりも著しく小さかった。IgA については、PR8 株曝露前後で有意な変化は認められず、PR8 株に対する高い反応性は維持されたままであった (Figure 25b、opened symbols、Group C)。Group C において観察された抗体価のデータは、不活化 NCL 株とテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の共投与を通して獲得された免疫が、マウスの PR8 株への感染を防御し、たとえウイルス感染しても感染に伴う重症化を予防したことを強く示唆した。ウイルス曝露前後における抗体価の変化が小さかった理由として、おそらく粘膜上でのウイルスの侵入を IgA が防ぎ、有意な炎症が起きなかったことが挙げられた。なお、免疫を施していない Group A で生存した唯一のマウスのウイルス曝露後の IgG および IgA の抗体価はそれぞれ、20.3 および 4.3 であった。ウイルス感染に伴う重症化を経験することで、IgG は著しく誘導されたが、IgA の誘導は検出域に入る程度の低いレベルであった。

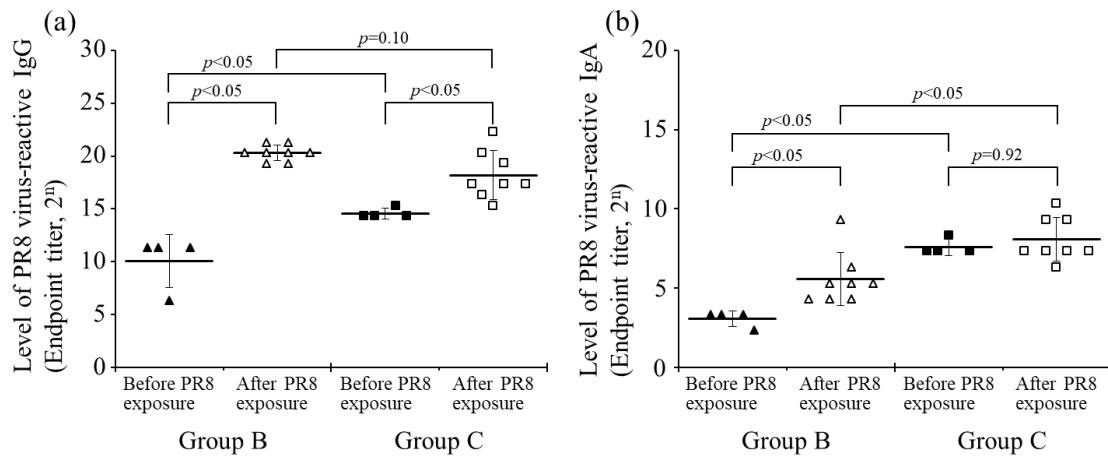


Figure. 25. Level of H1N1 A/Puerto Rico/8/34 (PR8) virus-reactive IgG in sera (a) and secreted IgA in nasal wash fluids (b) in individual mice. Mice were nasally inoculated twice with 20 μ L PBS containing 2 μ g inactivated H1N1 A/New Caledonia/20/99 (NCL) viruses with (group C) or without (group B) 100 μ g tetraglycine-L-octaarginine-linked hyaluronic acid at 28-day intervals ($n = 12$, each group). Fourteen days after the second inoculation, mice were sacrificed to collect sera and nasal wash fluids ($n = 4$, each group, closed symbols). Residual 8 mice in each group were simultaneously exposed to mouse-adapted infectious PR8 viruses at a dose of 8.0×10^5 PFU/mouse. Twenty-one days after virus exposure, survived mice were sacrificed to collect the same biological samples ($n = 8$, each group, open symbols). Each dot represents endpoint titers of antibodies in individual mice, and horizontal lines and vertical bars represent means and SD, respectively. Statistical significance was assessed with the Tukey-Kramer test.

7) IgA の交叉反応性

前項と並行して、Group B および Group C について、PR8 株への曝露直前のマウスおよび曝露後 21 日目まで生存していたマウスの鼻腔内 IgA の交叉反応性を精査した。20 倍希釈した鼻腔内洗浄液の各種ウイルス株の rHA に対する反応性を Figure 26 に示す。なお、前章では、アジュバント共投与群間の比較であったため、投与株以外のウイルス株に対する反応性 (= 生データとしての吸光度値) を投与株に対する反応性で除した百分率を用いたが (値が大きいほど交叉反応性が高いことを示す)、ここでは、IgA があまり誘導されないアジュバント非投与群のデータも含むため、値が大きいほど当該株への反応性が高いことを示す吸光度値をそのまま用いた。PR8 株への曝露直前、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸を投与抗原の不活化 NCL 株と共投与した Group C では、投与株に対する高い反応性が確認された。また、PR8 株だけでなく、同じ亜型の CA 株、亜型の異なる BNE 株や VNM 株にも交叉反応した。曝露後 21 日目において、反応の強さおよび交叉反応性のプロファイルに有意な変化はなく、IgA の量および質は、少なくとも 21 日間維持されたことが確認された。また、今回の感染実験で用いた PR8 株と同じ H1N1 の CA 株や H5N1 の VNM 株に対する IgA の交叉反応性は、PR8 株に対する交叉反応性よりも高かったことから、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸をアジュバントとして用いた経鼻インフルエンザワクチンは、季節性インフルエンザの流行株の予測違いや遺伝子変異に広く適応するとともに、亜型を超えたウイルス株の感染防御や重症化予防にも対応できる可能性が示された。一方、PR8 株への曝露直前、不活化 NCL 株のみを投与した Group B では、Group C に比べて、投与抗原に対する IgA の反応性は著しく低く、他のウイルス株に対する交叉反応性も、同じ亜型の H1N1 間でわずかに確認された以外、極めて低かった。曝露後 21 日目において、IgA の反応性は全体的にさらに低下した。これらのデータからも、抗原のみで免疫した場合、投与抗原と異なるウイルス株に対する感染防御および重症化予防は期待できないと考えられた。

2019 年 11 月、阪大微生物病研究会がインフルエンザ不活化ウイルスからなる鼻粘膜投与型ワクチンを開発し⁵³⁾、その臨床試験を同年 7 月に終了し、近く国に承認申請する方針であることが、日本経済新聞等により報じられた⁵⁴⁾。本ワクチンには製剤添加物として、カルボキシビニルポリマー (ポリアクリル酸)、濃グリセリンおよび L-アルギニンが添加されている。本ワクチンの開発者の長谷川らの学会発表等から、粘膜滞留性の高いカルボキシビニルポリマーは、不活化ウイルスの鼻粘膜上での滞留時間を延長させることにより、その取り込みが促進されることを期待して添加されていると考えられる。一般的に濃グリセリンは等張化剤として用いられており、本ワクチンでも同様の目的で添加されていると考えられる。L-アルギニンの添加目的は不明であるが、同アミノ酸がアジュバント活性を持つという報告は確認されていない。本ワクチンの特許には、カルボキシビニルポリマーを増粘させるため水溶性塩基物質をさらに含有してもよいと書かれており、L-アルギニンは同水溶性塩基物質として添加されているのかもしれない。以上のことから、本ワクチンにはアジ

ェバントは添加されていないと思われる。以前に行った同種インフルエンザウイルスに対する感染実験の結果から、投与量が多ければ抗原のみの経鼻投与であっても、感染自体は防げないものの、投与株と同じウイルス株に対する感染に伴う重症化は予防できると推測される。一方、今回行った異種インフルエンザウイルスに対する感染実験の結果から、投与株と異なるウイルス株に対しては、感染に伴う症状の悪化が軽微な例も一部あるかもしれないが、ほとんどの個体で感染に伴う重症化を予防できないと推測される。本ワクチンの臨床試験結果の詳細が未公表のため、推測の域を出ないが、不活化ウイルスのみを経鼻投与することにより、投与株と異なるウイルス株に暴露されたときに早期に免疫を獲得し、回復を図ることが今回の我々の感染実験でも確認されていることから、本ワクチンは生体のこの特性を利用しているのかもしれない。我々の推測が正しいのであれば、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸をアジュバントとして本ワクチンに添加することにより、季節性インフルエンザの流行株の予測違いや遺伝子変異に広く適応し、ワクチンとして投与された株と異なるウイルス株が流行しても、その感染防御や感染に伴う重症化予防を実現する新しいワクチンになることが期待される。

また、近年、鼻から脳への薬物デリバリー（Nose-to-Brain）に関する研究が行われている。ワクチンに用いたタンパク抗原が、そのルートを通じて脳へ到達した場合、予期せぬ副作用が起こることが懸念される。予防的に用いるワクチンは健常人を対象とするため、安全性に対するハードルは高い。一方、Flumist[®]が臨床使用され、前述の経鼻不活化インフルエンザワクチンが検討されていることを考え合わせると、遺伝子改変を繰り返して流行する季節性インフルエンザに対する予防法としての経鼻投与型製剤に一定の価値があると市場は判断していると考えられる。先にも書いた通り、膜透過ペプチド固定化高分子をアジュバントとして用いることの安全性に関する懸念は認識している。さらなる毒性試験の実施（レギュレーションに定められた *in vivo* における単回投与毒性試験や反復投与毒性試験の実施も共同研究者と議論していく予定）、並びに膜透過ペプチド固定化高分子の構造最適化や製剤的手法による選択性の付与/向上を目指すこと以外に、より安全な投与ルートの開発も重要である。我々は既に、口腔内投与による粘膜免疫の誘導に着手し、現状、ばらつきは大きいものの抗体が誘導されることを確認している。口腔内に適用する製剤であれば、Nose-to-Brain の問題は解消される。また、選択性が付与されない場合、適用部位の洗浄後の投与の必要性を先に述べたが、口腔内洗浄は日常的に行われていることであり、鼻腔内洗浄に比べてそのハードルは極めて低い。先に述べた投与領域の気密性を高めるデバイスを含めた製剤設計についても、具体的に経口フィルム剤が挙げられる。酵素封入時限放出型マイクロカプセルの添加など、フィルム剤の処方工夫することにより、安全性のさらなる改善も期待される。

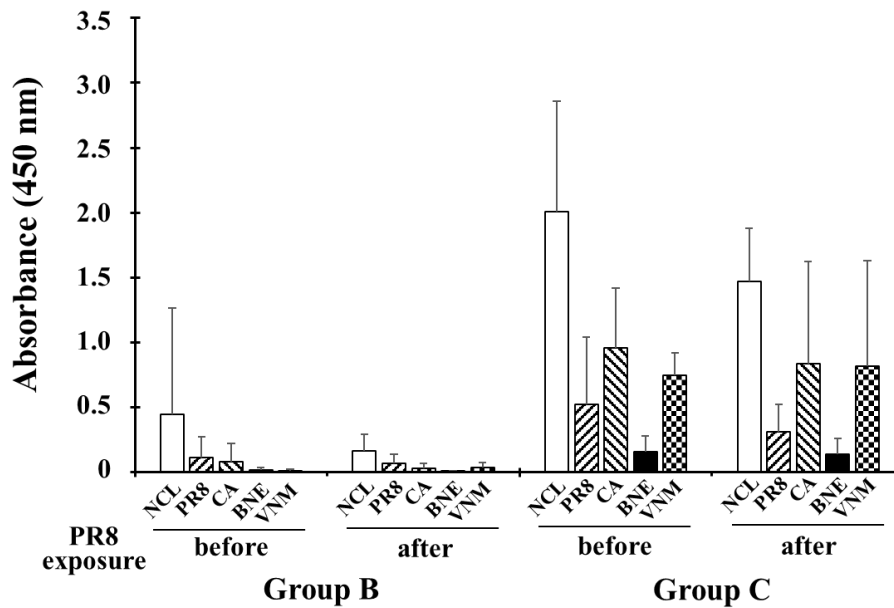


Figure. 26. Cross-reactivity of secreted IgA in nasal wash fluids in mice (mean \pm SD). Mice were nasally inoculated twice with 20 μ L PBS containing 2 μ g inactivated H1N1 A/New Caledonia/20/99 (NCL) viruses with (group C) or without (group B) 100 μ g tetraglycine-L-octaarginine-linked hyaluronic acid at 28-day intervals (n = 12, each group). Fourteen days after the second inoculation, mice were sacrificed to collect nasal wash fluids (n = 4). Residual 8 mice were simultaneously exposed to mouse-adapted infectious H1N1 A/Puerto Rico/8/34 (PR8) viruses at a dose of 8.0×10^5 PFU/mouse. Twenty-one days after virus exposure, survived mice were sacrificed to collect nasal wash fluids (n = 8). IgA reactivity to the respective recombinant hemagglutinin (rHA) proteins was measured and expressed as the absorbance of each well containing viruses at 450 nm from which the absorbance of the virus-free well was previously subtracted. NCL strain: white bars, PR8 strain: left hashed bar, the H1N1 A/California/07/2009 (CA): right hashed bars, the H3N2 A/Brisbane/10/2007 (BNE): black bars, the H5N1 A/Viet Nam/1194/2004 (VNM): dotted bars.

8) IgGのサブタイプ解析

膜透過ペプチド固定化高分子が抗原特異的な血中のIgGと鼻粘膜上のIgAの産生を促進することは前項までに記載の通りであるが、その詳細なメカニズムは明らかになっていない。D-オクタアルギニン固定化PNVA-co-AAを用いて、一部、メカニズムの検討を行っており、同高分子の共存下、マウス鼻粘膜上での抗原の滞留性が向上することや、培養細胞への抗原の取り込みが促進されることが確認されている。テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸においても同様の効果が期待されるが、抗原提示細胞への取り込み促進や、ウイルス感染からの生体防御において重要な役割を果たす細胞性免疫の寄与は評価されていない。ここでは、細胞性免疫の寄与に関する予備的な情報収集を行うことを試みた。IgGのサブタイプであるIgG1およびIgG2aは、体液性免疫と細胞性免疫のバランスを推定する指標として広く認識されている⁵⁵⁾。IgG1がIgG2aより小さい場合、細胞性免疫が主体となってウイルス感染を防御する。そこで、Figure 27に示すように、Group BおよびGroup Cについて、ウイルス曝露前の血清中IgG1およびIgG2aを測定した。抗原のみを投与したGroup Bでは、IgG1はIgG2aよりも大きく、自然感染に近い本群では、体液性免疫が優位であることが示された。テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の共投与により、両方のIgGサブタイプの誘導が促進されたが、Group BとGroup CのIgG1/IgG2aの値から、体液性免疫がより優位に導かれていることが示唆された。膜透過ペプチド固定化高分子の共投与下の免疫誘導メカニズムについては、今後、詳細に検討する予定である。

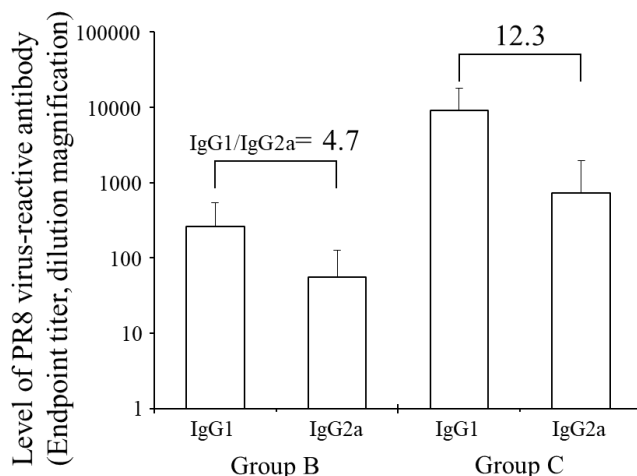


Figure. 27. Level of H1N1 A/Puerto Rico/8/34 (PR8) virus-reactive IgG1 and IgG2a in sera in mice (mean \pm S.D., n = 4). Mice were nasally inoculated twice with 20 μ L PBS containing 2 μ g inactivated H1N1 A/New Caledonia/20/99 (NCL) viruses with (group C) or without (group B) 100 μ g tetraglycine-L-octaarginine-linked hyaluronic acid at 28-day intervals. Fourteen days after the second inoculation, mice were sacrificed to collect sera. Numerical values in the figure represent the ratio of IgG1 to IgG2a.

9) PR8 株への感染の有無に関する考察

ここまでの検討において、我々は、不活化 NCL 株とテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の共投与により、PR8 株の感染に伴う重症化（重篤な体重減少）は完全に回避できることを示してきた。NCL 株と PR8 株は同じ亜型の H1N1 に分類されるが、遺伝的に異なるウイルスである。Figure 25 (closed symbols, Group C) に示すように、投与抗原と異なる PR8 株のマウス体内における排除には、PR8 株に交叉反応する IgA および IgG の高い誘導が寄与していると考えられた。IgA は交叉反応性を示すだけでなく、粘膜上においてウイルスの侵入を防御する。後者の特性は、宿主がウイルスに感染しないことを保証する。今回の異種インフルエンザウイルスに対する感染実験では、ウイルス量を測定していないため、ウイルス感染やそれに伴うウイルス増殖に関する直接的な知見はない。しかし、不活化 NCL 株とテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸が共投与された Group C のマウスにおいて、PR8 株の増殖がほとんど起きていないことは、Figure 25 (opened symbols, Group C) に示すように、PR8 株曝露後に抗体価がほとんど上昇していないことによって強く支持される。

Figure 28 は、Group B および Group C の各 8 匹のマウスについて、PR8 株曝露前後における同株への IgG および IgA の反応性の変化（曝露後 21 日目における個々のマウスの抗体価（ 2^n 乗で表した値）/曝露直前における 4 匹のマウスの抗体価の平均値（ 2^n 乗で表した値）、以降、ウイルス曝露前後の抗体価の比と表記）を Figure 23 で求めた体重減少面積に対してプロットしたものである。今回の感染実験では、肺内ウイルス量の測定もウイルス曝露後の肺の病理検査も行われなかったが、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸共存/非共存下、不活化 NCL 株で免疫されたマウスにおける PR8 株への感染の有無を科学的に推察する代替的手段として、Figure 28 のデータを解析した。Figure 28a に示すように、ウイルス曝露前後の IgG の比（曝露後 21 日目/曝露直前）は、体重減少面積の増加と強い相関を示しながら上昇した。我々は、“ウイルス曝露日において PR8 株に対する IgG の反応性が相対的に低いマウスは PR8 株に感染する” → “マウス体内における PR8 株の増殖は深刻な体重減少を引き起こす” → “回復したマウス体内には十分量の IgG が産生されているため、ウイルス曝露日において PR8 株に対する IgG の反応性が相対的に高いマウスに比べて、ウイルス曝露前後の IgG の比は顕著に大きくなる”、と推測した。Group B の全てのマウスにおいてクリアに観察されたウイルス曝露後の IgG の上昇は、本群のマウスが例外なく感染したことを強く支持した。ウイルス感染に伴う症状の重症度（体重減少面積の大きさ）に大きなばらつきが見られたのは、ウイルス曝露時点における IgG の誘導レベルが個体間で大きく異なったためと考えられた。

Figure 28a 中において ↓ で示した Group C の 1 匹のマウスは、Group B で最も症状が軽かったマウスと同程度のウイルス曝露前後の IgG 比と体重減少面積を示しており、この個体は軽度ながらも PR8 株に感染したと推察された。体重減少面積の推移（Figure 22c で最も大きな体重減少が観察されている個体に該当）から、感染後、速やかにウイルスは排除

され、回復へ向かったと考えられた。一方、Figure 28a の原点付近にいる 4 匹については、ウイルス曝露前後で両パラメーターの変化はほとんど認められなかった。不活化 NCL 株とテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の共投与により誘導された鼻粘膜上の IgA は、これらの個体を PR8 株への感染から完全に防御したと推察された。残り 3 匹のマウスの感染状態は不明であるが、Group B のマウスと比較すると体重減少面積は無視できるレベルであり、たとえウイルス感染しても、あらかじめ体内に誘導された免疫によりウイルスの増殖は抑制され、重症化することなく、早期に回復したと推察された。

一方、Figure 28b に示すように、ウイルス曝露前後の IgA の比（曝露後 21 日目/曝露直前）は、体重減少面積に相関しなかった。インフルエンザウイルスの自然感染を通して、粘膜上に IgA が誘導されることは良く知られている⁵⁶⁾。実際、抗原のみを投与した Group B では、PR8 株への曝露を通して、IgA の同株への反応性は有意に上昇したが、同じマウスで観察された IgG の上昇の程度に比べて、かなり小さかった (Figure 25、Group B)。相関が得られなかった理由として、ウイルスの粘膜感染は粘膜局所における IgA の分泌を促すが、全身性の感染は血中の IgG の誘導に大きく影響することが挙げられた⁵⁷⁾。ウイルス曝露前に免疫されずに唯一生き残った Group A のマウスの抗体価 (IgG:20.3、IgA:4.3) からも、ウイルスの粘膜感染による IgA の誘導の程度は IgG よりも著しく低いことは明らかであった。

著者が所属する研究室では、膜透過ペプチド固定化高分子など、研究室の代表者が中心となって新規の機能性高分子を設計し、それを用いた創薬・創剤技術の開発を目指している。今回の検討を通して、ウイルス抗原とテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸を 2 回経鼻投与することにより、異種ウイルスに対する感染防御あるいは重症化予防に十分な免疫が誘導されることが実証された。粘膜ワクチンについては、著者らが検討しているアジュバントだけでなく、リポソームやエマルジョンといった製剤・DDS 技術も検討されている。著者らは今回、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸をアジュバントとして用いることにより粘膜投与型ワクチンに期待される最大の利点を達成できることを実証した。今後、他のアジュバントだけでなく、製剤・DDS 技術との比較検証も行っていく。例えば、カチオン性リポソームに対する膜透過ペプチド固定化高分子の優位性として、ゼータ電位が低いことによる正電荷に起因する毒性の軽減の可能性を先に言及した。テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の中性付近におけるゼータ電位は約+10 mV であり、D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA よりもさらに低い。我々はさらに、アルギニン鎖を短縮したジグリシン-L-テトラアルギニン固定化ヒアルロン酸のアジュバント活性がテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸と変わらないことを既に確認しており、ジグリシン-L-テトラアルギニン固定化ヒアルロン酸の中性付近のゼータ電位は約+5 mV である。他の技術に対する膜透過ペプチド固定化高分子の優位性や劣性を明らかにし、本技術の臨床応用の可能性を見極める予定である。

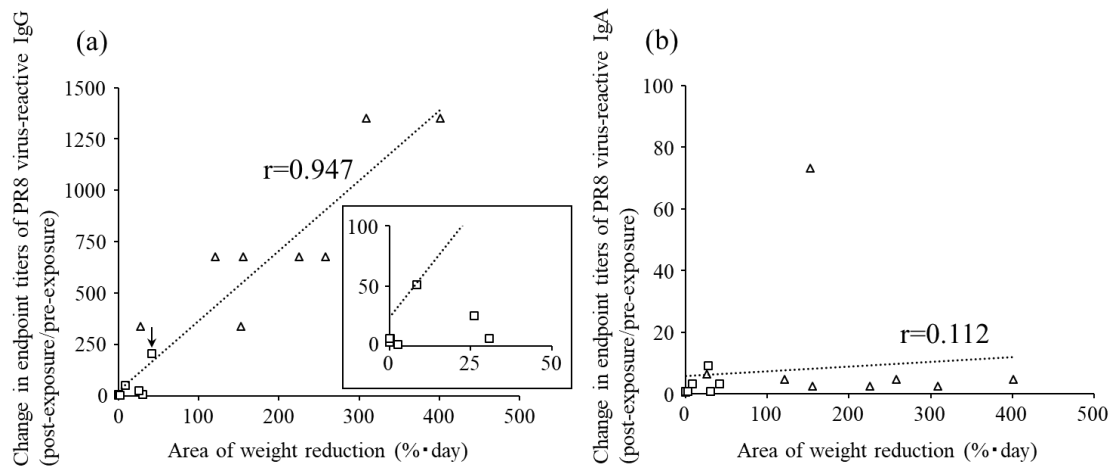


Figure. 28. Correlation between change in endpoint titers of H1N1 A/Puerto Rico/8/34 (PR8) virus-reactive antibodies ((a) IgG; (b) IgA) and weight loss through virus exposure. Mice were nasally inoculated twice with 20 μ L PBS containing 2 μ g inactivated H1N1 A/New Caledonia/20/99 (NCL) viruses with (group C, \square) or without (group B, \triangle) 100 μ g tetraglycine-L-octaarginine-linked hyaluronic acid at 28-day intervals ($n = 12$, each group). Fourteen days after the second inoculation, 4 mice in each group were sacrificed to collect sera and nasal wash fluids. Residual 8 mice in each group were simultaneously exposed to mouse-adapted infectious H1N1 A/Puerto Rico/8/34 (PR8) viruses at a dose of 8.0×10^5 PFU/mouse (day 0). Twenty-one days after virus exposure (day 21), survived 8 mice in each group were sacrificed to collect the same biological samples. Endpoints titers of PR8 virus-reactive IgG in sera and secreted IgA in nasal wash fluids were measured. Each of titers of 8 mice at post-exposure (day 21 after virus exposure) was divided by an average titer of 4 mice at pre-exposure (the day of virus exposure, day 0). The ratio in each mouse was plotted as a function of area of weight reduction in the corresponding one described in Figure 23b.

第2節 小括

前章の検討を通して、我々は、D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA と量的・質的に同等なアジュバント活性を有し、同非分解性の膜透過ペプチド固定化高分子よりも安全性が優れる生分解性のテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の獲得に成功した。また、1 および 2 回目の投与間隔を 28 日間と長くして、ブースティング効果を最適化することにより、投与回数を 4 回から 2 回に削減しても抗体レベルを同程度に維持できることを実証し、臨床応用が見込まれる投与スケジュールの設計を可能とした。一方、粘膜投与型ワクチンに期待される最大の利点である異種ウイルス株に対する感染防御や重症化予防効果については、D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA を用いたこれまでの研究で検討されていない。

本章では、北里大学北里生命科学研究所の支援下、上記の未検討の課題を完遂し、経鼻インフルエンザワクチンのアジュバントとしてのテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の有用性を評価した。抗原として不活化 H1N1 NCL 株、感染株としてマウス馴化された H1N1 PR8 株を用いた。臨床で用いられているインフルエンザウイルス HA ワクチンには、ヒトへの感染が問題となる H1N1 および H3N2 に分類されるウイルス株がそれぞれ含まれていることから、同一亜型内の異なるウイルス株に対する感染防御や重症化予防を達成することにより季節性インフルエンザの臨床的課題は実質的に解決できると判断し、同一亜型内の異種インフルエンザウイルス間の感染実験をデザインした。マウスは 3 群、すなわち、PBS を投与して免疫誘導しないコントロールとしての Group A、抗原のみを投与する Group B、抗原およびアジュバントを投与する Group C、に分類された。28 日間隔で 2 回、投与液をマウスに経鼻投与し、2 回目投与から 2 週間後、各群 8 匹のマウスに対して、LD₅₀ の 2 倍量の PR8 株を経鼻投与（曝露）した。ウイルス曝露後 21 日間、生死と体重をモニタリングした。別に、曝露日において、ウイルス曝露しないマウスを 4 匹ずつ Group B および Group C から取り出し、抗体価を測定した。最後まで生存したマウスも同様に、抗体価を測定した。Group A では、ウイルス曝露後 3 日目以降、感染に伴う著しい体重減少が全例で確認された。ウイルス曝露後 11 日以内に 7 例が死亡し、モニター最終日の 21 日目まで生存した残りの 1 例については、Group B および Group C 同様の高い IgG レベルが検出された。Group B では、死亡例は確認されなかったものの、7 匹のマウスで Group A と同様の重篤な体重減少が観察された。ウイルス曝露後 8 日間の体重減少の平均の推移が Group A と Group B でほぼ一致していたこと、モニター最終日の IgG および IgA のレベルがウイルス曝露当日のそれぞれの抗体レベルに比べて有意に上昇していたことから、Group B のマウス全例がウイルス感染したと推測された。Group B のマウスは、あらかじめ抗原（NCL 株）投与により免疫系が刺激されていたため、異なるウイルス株であっても PR8 株に対する免疫が相対的に早く誘導され、死に至ることなく、全例が回復に向かった。しかし、ウイルス感染に伴う相当なダメージを受けていたため、モニター最終日まで、半数のマウスの体重は初期値まで回復しなかった。Group C では、死亡例が確認され

なかっただけでなく、ウイルス感染に伴う深刻な体重減少はまったく観察されなかった。8匹中4匹のマウスでは、体重はほとんど減少せず、モニター最終日の抗体価がウイルス曝露日の抗体価とほとんど変わらなかったことから、これらのマウスはウイルスへの感染防御が成立したことを強く示唆した。1匹のマウスは、ウイルス曝露後6日目、曝露日と比較して約10%の体重減少のピークを示したが、ピーク後7日以内に体重は完全に回復した。残り3匹のマウスにおいては、体重のわずかな減少が観察されたが、いずれの個体の体重も速やかに回復した。

抗原のみを経粘膜的に投与する免疫法では、免疫株と異なるウイルス株の感染は防御できず、多くは重症化するものの、あらかじめ免疫していない個体よりは感染株に対する免疫を早く獲得し、回復に向かうことが示された。感染を防御できない理由および重症化を予防できない理由として、粘膜上の低いIgAレベルと低い交叉反応性および異なるウイルス株に対するIgGの不十分な反応性が挙げられた。また、抗原のみの投与で誘導された抗体価のばらつきは大きく、そのことがウイルス曝露後の重症化の程度に大きく影響したと考えられた。一方、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸を抗原と経粘膜的に共投与することにより、投与株と異なるウイルス株の感染に伴う重症化は完全に予防された。半数の個体では感染自体も防御されたことが強く示唆された。抗原とアジュバントを経粘膜的に投与する本免疫法では、たとえウイルス感染しても、あらかじめ体内に誘導された免疫によりウイルスの増殖は抑制され、重症化することなく、早期に回復すると考えられた。この感染防御並びに重症化予防効果は、免疫株と異なるウイルス株に対するIgAおよびIgGの高い反応性に起因していると考えられた。テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸は、不活化H1N1インフルエンザウイルスを用いた経鼻粘膜免疫誘導において、同一亜型内の異なるウイルス株に対する感染からホストを防御する、あるいは同ウイルス感染に伴う重症化を予防する上において、重要な役割を担っていることが示された。また、誘導されたIgAは異なる亜型のウイルス株に対しても明らかに交叉反応したことから、亜型を超えての感染防御および重症化予防への期待も示された。

2009年に起きたパンデミックの原因は、CA株(H1N1A/California/07/2009)として後に単離された新型ウイルス株である。注射型のインフルエンザワクチンに含まれている亜型のH1N1であり、当該年次以降7年間、このCA株がワクチンに組み入れられた。今回の我々の研究成果は、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸をアジュバントとして用いた経鼻インフルエンザワクチンは、季節性インフルエンザの流行株の予測違いや遺伝子変異に広く適応するだけでなく、亜型を超えたウイルス株の感染防御や重症化予防にも対応できる可能性を示している。今後、さらなる改良を経て本技術の臨床応用が実現し、新型ウイルス株を含めて、ワクチンとして投与された株と異なるウイルス株が流行しても、その感染や感染に伴う重症化が予防され、インフルエンザのパンデミックから解放された社会が来ることを期待したい。

第4章 総括

インフルエンザウイルスは上気道粘膜から感染して季節性の感染症を引き起こすウイルスであり、ウイルス粒子のタンパク質の違いにより A、B および C 型に大別される。A 型ウイルスは、膜タンパク質である 16 種類のヘマグルチニン (HA) と 9 種類のノイラミニダーゼ (NA) の組み合わせの違いにより、H1N1 などの亜型にさらに分類され、同じ亜型であっても遺伝子レベルの異なる多くの株が存在する。臨床で用いられている注射型インフルエンザウイルス HA ワクチンには、WHO の流行予測に基づき選定されたウイルス株 (A 型の H1N1 および H3N2 の 1 株ずつと B 型の 2 株) から精製された HA タンパク質がウイルス抗原として含まれている。同ワクチンを皮下投与すると、血液中に抗原特異的な IgG が誘導され、同 IgG はワクチンに含まれるウイルス株の感染に伴う重症化を予防する。しかし、IgG は投与株と異なるウイルス株に対する交叉反応性が低いいため、WHO の予測が外れたときや遺伝子改変が起きたときのインフルエンザの流行に対処できない。2009 年のパンデミックは、H1N1 A/California/07/2009 (CA 株) として後に単離された新型ウイルス株が原因である。また、粘膜上に抗体は誘導されないため、ウイルスの感染自体を防御することはできない。

粘膜投与型ワクチンは、血液中に IgG を誘導するだけでなく、粘膜上に分泌型 IgA を誘導する。分泌型 IgA は、粘膜上においてウイルスなどの病原体の体内への侵入を防ぎ、感染自体を防御する。さらに同 IgA は、多量体を形成することにより、亜型の違いを含めて、投与株と異なるウイルス株に交叉反応する質的特性を獲得する。粘膜免疫は、流行株の予測の難しさを含め、遺伝子改変を繰り返して流行する遺伝的に多様なインフルエンザウイルスの感染に対する予防に適した免疫手法である。しかし、ウイルス抗原のみを粘膜上に投与しても免疫反応は効果的に惹起されず、感染防御や重症化予防効果は乏しい。免疫株と異なるウイルス株に対する感染防御や重症化予防を実現する粘膜投与型ワクチンの開発には、経粘膜的に投与された抗原に対する免疫反応を効果的に誘導する粘膜アジュバント等が必要となる。LT、poly(I:C)等のこれまでに研究されてきた多くのアジュバントは、免疫活性は強いものの臨床応用可能な安全性を示すことができず、その研究開発を断念してきた。粘膜ワクチンの成功には、安全性の問題を克服したアジュバントの獲得が不可欠である。

著者が所属する研究室ではこれまで、代表的な膜透過ペプチドである D-オクタアルギニンを非分解性の生体適合性高分子である PNVA-co-AA に側鎖として導入した膜透過ペプチド固定化高分子を創製し、経鼻インフルエンザワクチンのアジュバントとしての同高分子の有用性を明らかにしてきた。先行研究を通して、膜透過ペプチド固定化高分子をアジュバントとして用いた経鼻投与型インフルエンザワクチンの可能性が免疫活性面から示される一方、本ワクチンの臨床応用には、これまでの研究が残した 2 課題の解決が不可欠であることも示された。1 つ目は、膜透過ペプチド固定化高分子の安全性であり、非分解性の D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA には生体内蓄積による毒性の潜在的リスクがある。

2つ目は、臨床応用可能な投与スケジュールでのアジュバント活性の実証である。また、粘膜投与型ワクチンに期待される最大の利点である異種ウイルス株に対する感染防御や重症化予防効果は未検討であり、本効果の実証なくして、粘膜アジュバントとしての膜透過ペプチド固定化高分子の臨床応用は想定できない。著者は、これらの3課題を解決・実証すべく、研究を行った、以下、得られた知見を総括する。

1. 粘膜投与型ワクチンの安全なアジュバントとしてのテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の設計

膜透過ペプチド固定化高分子を生分解性にするため、膜透過ペプチドを構成するアミノ酸はL体とし、同ペプチドを固定化する高分子プラットフォームをPNVA-co-AAからヒアルロン酸に変更した。ヒアルロン酸は、N-アセチルグルコサミンとD-グルクロン酸からなる二糖が直鎖状に重合した多糖であり、細胞外マトリックスとして人体に広く分布し、ヒアルロニダーゼにより分解される。ヒアルロン酸のD-グルクロン酸のカルボキシル基へのL-オクタアルギニンの固定化は、両者の立体障害に起因する反応性の低下を軽減するため、L-オクタアルギニンの末端アミノ基にテトラグリシンをスペーサーとして導入し、同スペーサーの末端アミノ基とアミド結合させることにより行った。得られたヒアルロン酸誘導体を分析した結果、D-グルクロン酸ユニットの約60%にテトラグリシン-L-オクタアルギニンが固定化されていることが確認された。

次に、D-オクタアルギニンあるいはテトラグリシン-D-オクタアルギニンを固定化したPNVA-co-AAを比較対象として、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸のアジュバント活性を量的・質的観点から実証した。インフルエンザウイルスHAワクチンとテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の混合物を先行研究同様に7日間隔で4回、マウスに経鼻投与することにより、抗原特異的な血中IgGおよび鼻腔内IgAが誘導された。両抗体価は、アジュバントとしてテトラグリシン-D-オクタアルギニン固定化PNVA-co-AAを用いた場合と統計学的に同等であった。投与間隔を変えずに投与回数を2回に削減したところ、膜透過ペプチド固定化高分子の種類に関わらず、抗体価は減少した。注射型インフルエンザウイルスHAワクチンの投与スケジュールは、1シーズンに1回投与あるいは1ヵ月間隔で2回投与である。体内で認識した抗原に対する抗体産生の誘導に数週間かかるためであり、投与間隔を28日に延長した2回経鼻投与により免疫した結果、両抗体価は毎週4回投与と統計学的に同等なレベルに回復し、いずれの膜透過ペプチド固定化高分子を用いても同じ結果であった。両高分子の量的なアジュバント活性は同等であることが実証されるとともに、1および2回目の投与間隔を28日に延長してブースティング効果を最適化することにより、臨床応用可能な投与スケジュールの見込みが得られた。引き続き、不活化H1N1 A/New Caledonia/20/99 (NCL)株を投与抗原として、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸あるいはD-オクタアルギニン固定化PNVA-co-AAの共存下、28日間隔2回投与のスケジュールで誘導された鼻腔内IgAの交叉反応性

を精査した。IgA は、NCL 株と同じ H1N1 に属する H1N1 A/Puerto Rico/8/34 (PR8) 株や CA 株の組み換え HA タンパク質 (rHA) だけでなく、異なる亜型の H3N2 に属する H3N2 A/Brisbane/10/2007 (BNE) 株や H5N1 に属する H5N1 A/Viet Nam/1194/2004 (VNM) 株の rHA にも交叉反応した。そのプロファイルに膜透過ペプチド固定化高分子間の違いは認められず、両高分子の質的なアジュバント活性も同等であることが実証された。

生体成分からなるテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の安全性は、非分解性の合成高分子をプラットフォームとする D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA より優れることが期待される。新薬や新医薬品添加剤の開発時に必須の毒性試験であるコロニー形成阻害試験、小核試験および変異原性試験を通して、両膜透過ペプチド固定化高分子の安全性を比較検証した。毒性試験の受託研究機関である(株)ボゾリサーチセンターに委託することによって、専門的かつ客観的に安全性を評価した。コロニー形成阻害試験の結果、チャイニーズハムスター肺線維芽細胞由来株 V79 細胞に対するテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の IC₅₀ は 99.21 µg/mL、同細胞に対する D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA の IC₅₀ は 6.93 µg/mL と見積もられ、前者の毒性は後者の約 1/10 であることが確認された。製薬企業の安全性部門の専門家から、絶対値としてのテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の細胞障害性は強くもなく弱くもないレベルとの見解を得ており、今回の構造変更のコンセプトは一定の成功を収めたと考えられた。ヒトリンパ芽球由来細胞の TK6 細胞を用いた小核試験を通して、両膜透過ペプチド固定化高分子およびそれらの代謝物は、染色体異常を誘発しないことが証明された。ネズミチフス菌 TA100、TA1535 および大腸菌 WP2 uvrA を用いて塩基置換変異を、ネズミチフス菌 TA98 および TA1537 を用いてフレームシフト変異を評価した Ames 試験を通して、両膜透過ペプチド固定化高分子およびそれらの代謝物は、遺伝子突然変異を誘発しないことが証明された。他の毒性試験による評価の必要性はあるものの、本結果をもとに、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸は医薬品添加剤として開発可能な一定の安全性を有していると考えられた。

2. 異種インフルエンザウイルスの感染に対するテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の粘膜アジュバントとしての感染防御および重症化予防効果の実証

北里大学北里生命科学研究所の支援下、異種インフルエンザウイルスの感染に対するテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸のアジュバントとしての有用性を評価した。臨床で用いられているインフルエンザウイルス HA ワクチンには、ヒトへの感染が問題となる型および亜型のウイルス抗原が含まれていることから、同一亜型内の異なるウイルス株に対する感染防御や重症化予防が可能となれば、季節性インフルエンザの臨床的課題は実質的に解決できると考えられる。そこで、免疫誘導するための投与抗原として不活化 H1N1 NCL 株、感染株としてマウス馴化された H1N1 PR8 株を用いた。マウスは、

PBS を接種するコントロールの Group A (8 匹)、抗原のみを接種する Group B (12 匹)、抗原およびアジュバントを接種する Group C (12 匹)、の 3 群に分類された。28 日間隔で 2 回、マウスに投与液を経鼻接種し、2 回目接種から 2 週間後、各群 8 匹のマウスに LD₅₀ の 2 倍量の PR8 株を経鼻的に曝露した。ウイルス曝露後 21 日間、生死と体重をモニターした。別に、曝露当日、Group B および Group C からウイルス曝露していないマウスを 4 匹ずつ取り出し、抗体価を測定した。最後まで生存したマウスも同様に、抗体価を測定した。Group A では、ウイルス曝露後 3 日目以降、感染に伴う著しい体重減少が全例で観察された。ウイルス曝露後 11 日以内に 7 例が死亡し、モニター最終日まで生存したマウスのウイルス曝露後 21 日目における抗体価を測定した結果、高い IgG レベルが検出された。Group B では、死亡例は確認されなかったものの、7 匹のマウスで Group A と同様の重篤な体重減少が観察された。ウイルス曝露後 8 日間の体重減少の平均の推移が Group A と Group B でほぼ一致していたこと、ウイルス曝露後 21 日目の IgG および IgA レベルがウイルス曝露当日のそれぞれの抗体レベルに比べて有意に上昇していたことから、Group B のマウス全例がウイルス感染したと推測された。Group B のマウスは、あらかじめ抗原 (NCL 株) 投与により免疫系が刺激されていたため、異なるウイルス株であっても PR8 株に対する免疫が相対的に早く誘導され、死に至ることなく、全例が回復に向かったと推測された。しかし、ウイルス感染に伴う相当なダメージを受けていたため、モニター最終日まで、半数のマウスの体重は初期値まで回復しなかった。Group C では、死亡例が確認されなかっただけでなく、ウイルス感染に伴う深刻な体重減少はまったく観察されなかった。8 匹中 4 匹のマウスでは、体重はほとんど減少せず、モニター最終日の抗体価がウイルス曝露当日とほとんど変わらなかったことから、これらのマウスはウイルスに感染すらしなかったことが強く示唆された。1 匹のマウスは、ウイルス曝露後 6 日目、曝露日と比較して約 10%の体重減少のピークを示したが、ピーク後 7 日以内に体重は完全に回復した。残り 3 匹のマウスにおいては、体重のわずかな減少が観察されたが、いずれの個体の体重も速やかに回復した。

抗原のみを経粘膜的に投与する免疫法では、免疫株と異なるウイルス株の感染は防御できず、多くは重症化するものの、あらかじめ免疫していない個体よりは感染株に対する免疫を早く獲得し、回復に向かうことが示された。感染を防御できない要因および重症化を予防できない要因は、粘膜上の低い IgA レベルと低い交叉反応性および異なるウイルス株に対する IgG の不十分な反応性と推測された。また、抗原のみの投与で誘導された抗体価のばらつきは大きく、そのことがウイルス曝露後の重症化の程度に大きく影響したと考えられた。一方、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸を抗原と経粘膜的に共投与することにより、投与株と異なるウイルス株の感染に伴う重症化は完全に予防された。半数の個体では感染自体も防御されたことが強く示唆された。抗原とアジュバントを経粘膜的に投与する本免疫法では、たとえウイルス感染しても、あらかじめ体内に誘導された免疫によりウイルスの増殖は抑制され、重症化することなく、早期に回復すると考えられた。この感染防御並びに重症化予防効果は、免疫株と異なるウイルス株に対する IgA および IgG

の高い反応性に起因していると考えられた。テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸は、不活化 H1N1 インフルエンザウイルスを用いた経鼻粘膜免疫誘導において、同一亜型内の異なるウイルス株に対する感染から宿主を防御する、あるいは同ウイルス感染に伴う重症化を予防する上において、重要な役割を担っていることが示された。また、誘導された IgA は異なる亜型のウイルス株に対しても明らかに交叉反応したことから、亜型を超えての感染防御および重症化予防への期待も示された。

2009年に起きたパンデミックは、未だ記憶に新しい。当該年次以降7年間、パンデミックの原因となった H1N1 の CA 株が注射型のインフルエンザワクチンに組み入れられた。今回の我々の研究成果は、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸をアジュバントとして用いた経鼻インフルエンザワクチンは、季節性インフルエンザの流行株の予測違いや遺伝子変異に広く適応するだけでなく、亜型を超えたウイルス株の感染防御や重症化予防にも対応できる可能性を示している。一方、膜透過ペプチドを固定化するプラットフォームを非分解性から生分解性にするにより、安全性の向上に関する一定の成果は得られたが、ペプチドスペーサーの分解を速めるなどの安全性のさらなる改善に向けた構造の最適化、膜透過ペプチド固定化高分子による細胞内取り込み促進のメカニズムを鑑みた毒性試験の実施、製剤的手法等を通じた膜透過ペプチド固定化高分子による細胞内取り込み促進能への選択性の付与/向上など、臨床応用に向けて解決すべき課題は多い。今後、さまざまな改良を経て、本技術の安全性が担保され、臨床応用が実現し、新型ウイルス株を含めて、ワクチンとして投与された株と異なるウイルス株が流行しても、その感染や感染に伴う重症化が予防され、インフルエンザのパンデミックから解放された社会が来ることを期待したい。

第2部 実験の部

第2章

第1節

1-1 実験材料

ヒアルロン酸 (27 kDa) は東京化成工業 (株) から購入した。D-オクタアルギニン、テトラグリシン-D-オクタアルギニン、テトラグリシン-L-オクタアルギニンは国産化学 (株) から購入した。その他特に記載のない試薬については試薬グレードのものを使用した。

1-2 膜透過ペプチド固定化高分子の合成方法

・1-2-1 膜透過ペプチド固定化 PNVA-co-AA

D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA およびテトラグリシン-D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA は既報⁴³⁾にて合成したものを使用した。

・1-2-2 膜透過ペプチド固定化ヒアルロン酸

ヒアルロン酸 100 mg (カルボキシル基当量で 0.264 mmol) を 2 mL のジメチルスルホキシド (DMSO) に溶かした。*N*-ヒドロキシスクシイミド (NHS) 151.78 mg (1.32 mol) を 1 mL の DMSO に溶かし、別に *N,N'*-ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) 272.0 mg (1.32 mol) を 1 mL の DMSO に溶かした。3つの DMSO 溶液を混合し、室温で 24 時間攪拌した後、孔径 7 μm のセルロースフィルターで吸引濾過した。次いで濾過物 0.568 mL (理論上、エステル化されたカルボキシル基当量でヒアルロン酸 *N*-ヒドロキシスクシイミドエステルを 0.0375 mmol 含む) をテトラグリシン-L-オクタアルギニン 164.4 mg (末端アミノ基当量で 0.0685 mmol) とトリエチルアミン 0.053 mL を含む DMSO 溶液 0.362 mL と混合した。混合溶液を 50 °C で 16 時間攪拌した後、分画分子量 3.5 kDa の透析膜を使用し、イオン交換水中で透析した (溶液の伝導率が 1.0 $\mu\text{S}/\text{cm}$ になるまで)。透析後の溶液を凍結乾燥し、白色粉末としてテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸を得た (以上、run 1、収率 : 97.1%)。上述の 3.5 倍スケールでテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の合成を行い、run 2 を得た (収率 : 57.0%)。

1-3 核磁気共鳴 (NMR) 解析

内部標準物質としてのジメチルスルホン (DMSO₂) を含む D₂O にテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸を溶解した。¹H NMR 分析は、Bruker Ascend 400 MHz Spectrometer (Bruker、ビレリカ、マサチューセッツ州) あるいは JEOL ECA-600 (JEOL、東京、日本) を使用して実施した。

run 1 の ^1H NMR 測定は D_2O を溶媒とし、周波数 400 MHz で測定を行った。

δ : 1.74-2.12 (multiplet: m)、2.16-2.24 (broad: br)、3.35-3.44 (m)、3.49-3.98 (m)、4.45-4.56 (m) ppm

run 2 の ^1H NMR 測定は D_2O を溶媒とし、周波数 600 MHz で測定を行った。

δ : 1.65-2.05 (m)、2.06-2.18 (br)、3.26-3.38 (m)、3.41-3.96 (m)、4.37-4.48 (m) ppm
以下の式を用いて、ヒアルロン酸骨格におけるテトラグリシン-L-オクタアルギニンの固定化率を計算した。固定化率は、テトラグリシン-L-オクタアルギニンが固定化されたグルクロン酸ユニットの全ユニットに占める割合およびテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸 1 g に占める L-オクタアルギニンの質量パーセントとして計算した。

$$\text{固定化率(\%)} = 100 \times \frac{\text{ピーク強度}(a)}{\text{ピーク強度}(b)} \\ \times \frac{6 \times n(\text{DMSO}_2)}{16 \times n(\text{Sample, tetraglycine-L-octaarginine eq})}$$

(a)、(b) は Figure 9 のピーク (a)、(b) を示す。n は各化合物の分析に用いられた物質質量を示す。

1-4 赤外分光法 (IR)

FT-IR spectrometer (Nicolet 6700、Thermo Fisher Scientific、ウォルサム、マサチューセッツ州) を用いて、全反射測定法 (ATR 法) によりテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の IR 解析を行った。

IR (ATR) of run 1: ν 3284、1640、1537、1416、1179、1128 cm^{-1}

IR (ATR) of run 2: ν 3182、1636、1538、1419、1179、1128 cm^{-1}

1-5 ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC)

3.0 mg/mL の濃度で精製水に各サンプルを溶解した。GPC 分析は、屈折率 (RI) および UV 検出器が装備された Jasco HPLC EXTREMA (JASCO Co.、東京、日本) を用いて行った。移動相として酢酸緩衝液 (1.0 M、pH 4.0) を使用し、平均粒子径 7 μm のシリカゲルを充填した 300 mm \times 8.0 mm のカラム (KW-804、昭和電工、東京、日本) を使用した。注入量は 50 μL 、流速は 1.0 mL/min、カラム温度は 40°C に設定し、254 nm における UV 吸収を検出した。限外ろ過後のろ液および残渣に対する GPC 分析も同様の方法で行った (ただし、3.0 mg/mL ではろ液が得られなかったため、2.0 mg/mL に希釈して検討した)。ろ過には、3 あるいは 10 kDa の分画分子量の遠心分離型の限外ろ過膜 (Amicon Ultra、Millipore、バーリントン、マサチューセッツ州) を用いた。テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の分子量は、固定化率およびテトラグリシン-L-オクタアルギニンとヒアルロン酸の分子量をベースに計算された。

1-6 ゼータ電位

電気泳動光散乱分光光度計 (Zetasizer Nano ZEN5600、Malvern Instruments、マルバーン、イギリス) を用いて、ヒアルロン酸、ヒアルロン酸とテトラグリシン-L-オクタアルギニンの混合物、およびテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸のリン酸緩衝液 (リン酸/リン酸二水素カリウム; pH 2.82、イオン強度 0.05) 中におけるゼータ電位を測定した。混合物については、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の構成成分の質量比を参考に (質量比 28:72、run 2)、ゼータ電位測定前にテトラグリシン-L-オクタアルギニンとヒアルロン酸を混合して調製した。

第 2 節

2-1 実験動物

7 週齢、雌性の BALB/c マウスを使用した。全てのマウスは 24×17×12 cm³ のケージで飼育し、室温 23±1 °C、日照時間 12 時間（8 時～20 時）、自由摂水、自由摂食下で飼育した。動物実験は摂南大学の動物実験に関する規定に則って実施した。

2-2 実験材料

インフルエンザウイルス HA ワクチン 2015/2016 シーズン (Table 1) は大阪大学微生物病研究所 (観音寺、香川、日本) から購入した。不活化全粒子インフルエンザウイルス A 型 H1N1 New Caledonia/20/99 (β -プロピオラクトン処理) は Prospec-Tany Technogene Ltd.社 (ネスジオナ、イスラエル) から購入した。インフルエンザウイルス A 型の各組換えヘマグルチニンタンパク質 (H1N1:A/New Caledonia/20/99 IVR116 (NCL 株)、A/Puerto Rico/8/34 (PR8 株)、A/California/07/2009 (CA 株)、H3N2:A/Brisbane/10/2007 (BNE 株)、H5N1:A/Viet Nam/1194/2004 (VNM 株)) は eEnzyme 社 (モントゴメリー・ビレッジ、メリーランド州) から購入した。Horseradish peroxidase (HRP) 標識ヤギ抗マウス IgG (γ 鎖) 抗体および HRP 標識ヤギ抗マウス IgA (α 鎖) 抗体は Southern Biotechnology 社 (バーミンガム、アラバマ州) から購入した。TMB 1-Component Microwell Peroxidase Substrate と TMB Stop Solution は Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. (ゲティスバーグ、メリーランド州) から購入した。その他特に記載のない試薬については、富士フィルム-和光純薬あるいはナカライテスクから購入した試薬グレードのものをそのまま使用した。

2-3 マウスへの経鼻免疫・サンプル回収方法

・2-3-1 サンプル投与

イソフルラン吸入装置 (NARCOBIT-E、夏目製作所、東京、日本) を用いてマウスを麻酔し (イソフルラン濃度: 2~3%)、麻酔マスクを介したイソフルラン吸入を維持したまま、マイクロピペットを用いてマウスの片鼻腔に薬液を 20 μ L 投与した。本実験は以下の様に群分けして行われた。

- ・インフルエンザウイルス HA ワクチン (Adjuvant-free)
- ・インフルエンザウイルス HA ワクチン + テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸 (HA-G4R8)
- ・インフルエンザウイルス HA ワクチン + テトラグリシン-D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA (VP-G4R8)

投与サンプル毎に以下に示す 3 通りの投与スケジュールで、上記 3 つのサンプルを投与した。

- ・7 日間隔 4 回投与-最終投与 1 週間後にサンプル回収
- ・7 日間隔 2 回投与-最終投与 1 週間後にサンプル回収
- ・28 日間隔 2 回投与-最終投与 2 週間後にサンプル回収

また、抗原であるインフルエンザウイルス HA ワクチンは投与回数に関わらず総投与量を 0.2 μ g/mouse に設定した (4 回投与: 0.05 μ g/mouse/回、2 回投与: 0.1 μ g/mouse/回)。膜透過ペプチド固定化高分子の投与量は実験内容に応じて 50-200 μ g/mouse/回に設定した。

OVA を抗原として用いた実験では、抗原投与量を 2 μ g/mouse/回に設定し、アジュバントにはテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸、あるいはテトラグリシン-L-オクタアルギニンとヒアルロン酸の混合物を使用した。テトラグリシン-L-オクタアルギニンとヒアルロン酸の投与量はテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の構成比に合わせて設定した。

不活化インフルエンザウイルス H1N1 NCL 株を抗原として用いた実験では、抗原投与量を 1 μ g/mouse/回あるいは 2 μ g/mouse/回に設定し、アジュバントにはテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸あるいは D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA を使用した。

・2-3-2 サンプル採取

イソフルラン吸入装置を用いてマウスを麻酔し (イソフルラン濃度: 2~3%)、麻酔マスクを介したイソフルラン吸入を維持したまま、養生テープを用いてマウスを動物固定版にあおむけに固定した。マウス胸部左側面から注射針を挿入し、ヘパリン処理を施したシリン

ジで心臓から全血を回収した。回収した血液は 4 °C、1200 g で 15 分間遠心処理し、上清（血漿）を回収した。全血回収後に開胸し、結合組織被膜を切開し、気管を露出させた。マイクロ剪刀を用いて気管に切り込みを入れ、切り込み口から鼻腔側に向けてポリエチレン細管を挿入した。ポリエチレン細管にシリンジの針を挿入し、PBS を 0.2 mL 注入し、鼻孔からの漏出液を鼻粘膜洗浄液として回収した。両サンプルは-25 °C で凍結し、以下の抗体価の測定日まで冷凍保存した。

2-4 抗体価測定方法

・2-4-1 投与抗原に対する抗体価測定

F8 Nunc-Immuno module plate, Maxisorp にインフルエンザウイルス HA ワクチン 1 µg/mL と牛血清アルブミン (BSA: bovine serum albumin) 1 µg/mL を溶かした PBS 100 µL/well で加え、4 °C で 1 晩静置した。プレートの中の溶液を取り除き、トリス緩衝生理食塩水・Tween (TTS: トリス 0.05 M、塩化ナトリウム 0.14 M、Tween 0.05% (v/v)) を用いて 3 回洗浄した。なお本実験の TTS を用いた洗浄は 1 回当たり 300 µL/well を使用して行った。ブロッキングバッファー (TTS + BSA 1% (w/v)) 200 µL/well を加えた後、室温で 1 時間静置した。ブロッキングバッファーを取り除いた後、TTS で 3 回洗浄した。洗浄後、ブロッキングバッファーを希釈剤として用いて、血漿あるいは鼻粘膜洗浄液の 2 倍希釈系列を 100 µL/well でプレートに取り、室温で 2 時間静置した。プレートの内容物を除去後、TTS で 6 回洗浄し、ブロッキングバッファーで希釈した HRP 標識ヤギ抗マウス抗体 (IgG の希釈倍率: 4000 倍、IgA の希釈倍率: 2000 倍) 100 µL/well を加え、室温で 1 時間反応させた。プレートの内容物を除去後、TTS で 6 回洗浄し、TMB 100 µL/well を加え、室温遮光下で 10 分間反応させ、Stop Solution 100 µL/well を加え、直ぐに波長 450 nm の吸光度を測定した。吸光度の上昇が確認できる最大の希釈倍率を抗体価 (endpoint titer) とした。ただし、サンプルの 2 倍希釈系列は 20 倍希釈から始めたため、20 倍希釈倍率の液で抗体産生が見られない場合、計算上、抗体価は $4.3(20=2^{4.3})$ と見積もられた (endpoint titer が 4.3 の場合、抗体が検出されていないことを意味する)。

OVA を投与抗原とした時の抗体価測定は、F8 Nunc-Immuno module plate, Maxisorp に播く溶液を OVA 1 µg/mL と BSA 1 µg/mL を溶かした PBS 100 µL/well に変更し、後の操作は全て同じ方法で行った。ただし、サンプルの希釈系列は 2 倍希釈から始めたため、2 倍希釈倍率の液で抗体産生が見られない場合、計算上、抗体価は $1(2=2^1)$ と見積もられた。

・2-4-2 交叉反応性

2-4-1 の方法に基本準じて、F8 Nunc-Immuno module plate, Maxisorp に播く溶液を rHA 1 µg/mL と BSA 1 µg/mL を溶かした PBS 100 µL/well に変更し、陰性対象として rHA を含まない溶液も播種した。また、サンプルの希釈系列は作成せずに、20 倍希釈の鼻粘膜洗浄液中の IgA の吸光度を測定した。プレートに固相化した rHA は well ごとに各インフル

エンザウイルス中（H1N1:NCL、PR8 および CA、H3N2:BNE、H5N1:VNM）から1種類を使用し、サンプル毎にそれぞれの rHA および陰性対象に対する吸光度を測定した。得られた各種 rHA に対する吸光度から陰性対象に対する吸光度を引いた値を反応に基づく吸光度とした。交叉反応性は、①投与抗原である NCL に対する吸光度を 100%として各種インフルエンザウイルスの rHA に対する吸光度を百分率で表した相対値百分率、②前述の反応に基づく吸光度、のいずれかの数値で表した。

2-5 統計分析

統計的有意性は Tukey-Kramer 検定で評価し $p<0.05$ を統計学的に有意と見なした。

第3節

コロニー形成阻害試験、小核試験および Ames 試験は、(株) ボゾリサーチセンターに委託して実施した。

3-1 実験材料

Cell Proliferation Reagent WST-1 は Roche (マンハイム、ドイツ) から購入した。小核試験に使用したラット肝ホモジネート (S9) およびコファクターC はオリエンタル酵母工業 (株) (東京、日本) から購入した。S9 とコファクターC を混合し、S9mix とした。小核試験に使用した S9mix の 1 mL 中の組成は以下の通りである：水 0.7 mL、S9 0.3 mL、塩化マグネシウム 5 $\mu\text{mol/mL}$ 、塩化カリウム 33 $\mu\text{mol/mL}$ 、グルコース-6-リン酸 5 $\mu\text{mol/mL}$ 、酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADP) 4 $\mu\text{mol/mL}$ 、HEPES 緩衝液 (pH 7.2) 4 $\mu\text{mol/mL}$ 。

Ames 試験に使用した S9mix はキッコーマンバイオケミファ株式会社 (東京、日本) から購入した S9 とオリエンタル酵母工業 (株) から購入した Cofactor-1 を混合し、調製した。Ames 試験に使用した S9mix 1 mL 中の組成は以下の通りである：水 0.9 mL、S9 0.1 mL、塩化マグネシウム 8 $\mu\text{mol/mL}$ 、塩化カリウム 33 $\mu\text{mol/mL}$ 、グルコース-6-リン酸 5 $\mu\text{mol/mL}$ 、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH) 4 $\mu\text{mol/mL}$ 、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) 4 $\mu\text{mol/mL}$ 、リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) 100 $\mu\text{mol/mL}$ 。N-(2-クロロエチル)-N'-(6-クロロ-2-メトキシアクリジン-9-イル)-1,3-プロパンジアミン・2 塩酸塩 (ICR-191) は Polysciences, Inc. (ワーリントン、ペンシルバニア州) のものを使用した。

3-2 WST-1 細胞毒性評価

牛胎児血清 (FBS) 10% (v/v)、ペニシリン 50 U/mL、ストレプトマイシン 50 $\mu\text{g/mL}$ を含む DMEM 培地を用いて、37°C、CO₂ 濃度 5% の CO₂ インキュベータにおいて、ヒト肺癌上皮由来細胞株 Calu-3 細胞を培養した。75 mL フラスコに Calu-3 細胞を 6 \times 10⁴ cells/mL の濃度で播種し、コンフルエントになる前にトリプシン-EDTA で処理して継代した。実験には継代回数が 10 回未満の細胞を使用した。

Calu-3 細胞を 96-well プレートに 5 \times 10⁴ cells/0.1mL で播種し、2 日間 CO₂ インキュベータ内で培養した。培地を取り除き、PBS で洗浄後、各種膜透過ペプチド固定化高分子の PBS 溶液を Opti-mem で 5 倍希釈し、最終濃度 10~1000 $\mu\text{g/mL}$ となるように調製し、well 中にこれを 0.1 mL 加え、1 時間インキュベートした。PBS で洗浄後、10% WST-1 を含む serum-free DMEM に置換して 1 時間インキュベートし、450 nm の吸光度を測定した。膜透過ペプチド固定化高分子を加えていない well の吸光度を生存率 100% として各 well の細胞生存率を評価した。膜透過ペプチド固定化高分子を含まないサンプルは、膜透過ペプ

チド固定化高分子の PBS 溶液の代わりに PBS を用い、同様に Opti-mem で 5 倍希釈して用いた。

3-3 コロニー形成阻害試験

チャイニーズハムスター肺線維芽細胞由来株 V79 細胞をピルビン酸ナトリウム 110 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、MEM 非必須アミノ酸溶液 ($\times 100$) 1% (v/v)、ウシ胎児血清 5% (v/v) およびペニシリン/ストレプトマイシン/アムホテリシン B 溶液 ($\times 100$) 1% (v/v) を含む MEM 培地で 50 cells/well となるように播種した。18 時間インキュベート後、各種膜透過ペプチド固定化高分子を含む培地に置換し、6 日間培養した。各種膜透過ペプチド固定化高分子の濃度は、D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA が 0.156~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸が 15.6~2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように調製した。6 日間培養後、メチルアルコールを 60% (v/v) 含む生理食塩水で細胞を洗浄し、適量のメチルアルコールを加え、5 分間静置した。生理食塩水で洗浄後、3%ギムザ染色液を加えて 10 分間反応させ、水で細胞がはがれないように慎重に洗浄した。十分に乾燥させた後、コロニー数を計測した。ジブチルジチオカルバミン酸亜鉛と注射用水をそれぞれ陽性対照と陰性対照として使用した。50 個以上の染色細胞が含まれるコロニーをカウントした。膜透過ペプチド固定化高分子が含まれていない培地で増殖したコロニー数を 100%とし、各種膜透過ペプチド固定化高分子存在下におけるコロニー数を評価した。グラフの結果から、陰性対照の 50%のコロニー数となっている濃度を IC_{50} とした。

3-4 小核試験

ヒトリンパ芽球 TK6 細胞を RPMI-1640 培地 (馬血清 10% (v/v)、ピルビン酸ナトリウム 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を含む) に懸濁し、 5×10^5 cells/mL の濃度で調製した。細胞懸濁液に適当な濃度に調整した各膜透過ペプチド固定化高分子を加え、代謝を促すために S9mix を加えた群と加えない群に分け、混合溶液を 4 時間インキュベートした (短時間処理法)。別に細胞懸濁液と適当な濃度に調整した各膜透過ペプチド固定化高分子を加えた溶液を 24 時間インキュベートした (連続処理法)。短時間処理法の S9mix を加えた群には染色体異常を誘発する陽性対照としてシクロホスファミド (1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を使用し、連続処理法の陽性対照にはコルヒチン (0.006 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を使用した。変異を起こさない陰性対照として注射用水を使用した。短時間処理法の群は 4 時間インキュベート後に細胞を RPMI-1640 培地に置換し、再度 20 時間インキュベートした。インキュベート後、細胞濃度を測定した。式 1 および式 2 を用いて、得られた細胞濃度から陰性対照群を 100%とした各群の細胞数の相対細胞集団倍加数 (PRD) を算出した。

[式 1]

$$\text{細胞集団倍加数(PD)} = [\log(\text{処理(培養)終了時の細胞数} \div \text{処理開始時の細胞数})] \div \log 2$$

[式 2]

$$\text{PRD (\%)} = \frac{\text{被験物質処理群における PD}}{\text{(陰性対照群における PD)}} \times 100$$

残りの細胞懸濁液を遠心分離して、収集した細胞を 0.075 M 塩化カリウム溶液で約 10 分間低張処理し、メチルアルコール：酢酸= 3：1 液および 49：1 液で固定した。固定した細胞をスライドガラスに滴下し、約 1 日空気乾燥した後、2%ギムザ液で約 15 分間染色して標本を作製した。染色された細胞（1000 個以上）を顕微鏡で観察し、小核を持つ細胞をカウントした。また、染色体数値異常に関する情報を得るために、多核細胞や分裂中期細胞の数もカウントした。

3-5 復帰突然変異試験 (Ames 試験)

塩基置換変異を検出する TA100、TA1535 のネズミチフス菌株、大腸菌 WP uvrA 株、およびフレームシフト変異を検出する TA98、TA1537 のネズミチフス菌を使用した。各菌株を栄養培地で培養し、 1×10^9 個/mL 以上の濃度の懸濁液を調製した。調製した懸濁液に適当な濃度の膜透過ペプチド固定化高分子および対照溶液と混合し S9mix を加えたもの、加えていないものを調製した。陽性対照として 2- (2-フリル) -3- (5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド (AF-2)、アジ化ナトリウム (SAZ)、N- (2-クロロエチル) -N'- (6-クロロ-2-メトキシアクリジン-9-イル) -1,3-プロパンジアミン・2 塩酸塩 (ICR-191)、2-アミノアントラセン (2AA) およびベンゾ[α]ピレン (B[α]P) を使用し、陰性対象として注射用水を使用した。各種陽性対照の濃度は、Table 6 に示す通りに調製した。振とうしながら短時間インキュベートした後に寒天溶液を加え、グルコース寒天プレート上に均一になるように層状に重ねた。ゲルが固まった後、プレートを上下逆さまにして 2 日間インキュベートした。培養後、自動コロニーカウンター (コロニーアナライザー CA-11D systems、システムサイエンス (株)、東京、日本) を使用してコロニー数を計測し、陰性対照のコロニーと比較して 2 倍以上となった場合、変異陽性であるとみなした。同時に、各種膜透過ペプチド固定化高分子存在下での増殖阻害も観察した。

Table 6. Pathogens used as a positive control in Ames test.

使用菌株	代謝活性しない場合		代謝活性する場合	
	陽性対照物質	調製濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	陽性対照物質	調製濃度 ($\mu\text{g/mL}$)
<i>S. typhimurium</i> TA100	AF-2	0.1	B[α]P	50
<i>S. typhimurium</i> TA1535	SAZ	5	2AA	20
<i>E. coli</i> WP <i>uvrA</i>	AF-2	0.1	2AA	100
<i>S. typhimurium</i> TA98	AF-2	1	B[α]P	50
<i>S. typhimurium</i> TA1537	ICR-191	10	B[α]P	50

第 4 節

感染実験は北里環境科学センターに委託し、北里大学の北里生命科学研究所の施設にて行われた。各作業工程の分担を Figure 29 に示す。実験に用いられたマウスの管理およびマウスに馴化したウイルス (PR8 株) の培養およびマウスへの投与、マウスの生死や体重のモニタリングは委託先にて行われた。投与に用いるワクチンの作製および投与、血清や鼻腔内洗浄液の採取、抗体価測定等は我々が行った。

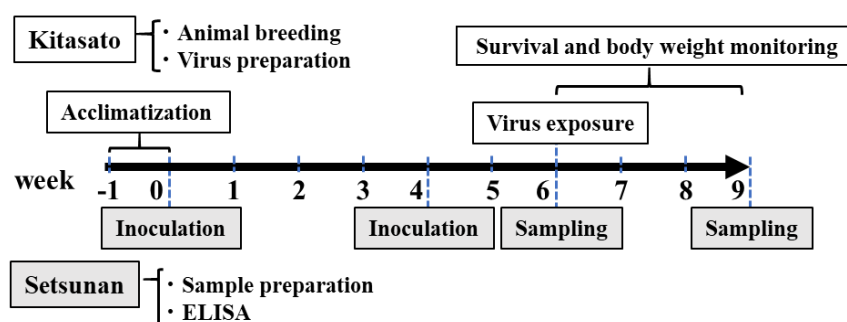


Figure 29. Work flow of infection experiment process.

4-1 実験動物

6 週齢の BALB/cA 雌性マウス (日本クレア (株)、東京、日本) を購入し、検疫および馴化のため 8 日間の予備飼育期間を設け、平均体重が同じになるよう群分けした動物を試験に使用した。飼育環境条件は、 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $55 \pm 5\% \text{RH}$ 、換気数 12 回/時 (オールフレッシュエア供給)、照明 12 時間 (8:00~20:00) に設定した飼育室で飼育した。動物は、実験動物用床敷 (ウッドベディング、日本医科学動物、東京、日本) を敷いた TPX 製ケージ当たり 4 匹収容した。動物には、高圧蒸気滅菌した実験動物用固形飼料 (CE-2、日本クレア (株)、東京、日本) と高圧蒸気滅菌した水道水を自由に摂取させた。

4-2 実験材料

H1N1 A/Puerto Rico/8/34 (PR8 株) のインフルエンザウイルスライセートは ZeptMetrix Corp. (バッファロー、ニューヨーク州) から購入した。HRP 標識ヤギ抗マウス IgG1 ($\gamma 1$ 鎖) 抗体および HRP 標識ヤギ抗マウス IgG2a ($\gamma 2a$ 鎖) 抗体は Southern Biotechnology 社 (バーミングハム、アラバマ州) から購入した。その他特に記載のない試薬については富士フイルム-和光純薬 (株) あるいはナカライテスク (株) から購入した試薬グレードのものを使用した。

4-3 マウスへの経鼻免疫・サンプル回収方法

マウスへの経鼻免疫方法およびサンプル回収方法は 2-3 に準じた。ただし、実験群は以下のように設定した (Figure 20 に概略図を示す)。

- Group A (n=8) : PBS
- Group B (n=12) : 不活化 NCL 2 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{回}$
- Group C (n=12) : 不活化 NCL 2 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{回}$ + テトラグリシン-L-オクタアルギニン
固定化ヒアルロン酸 100 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{回}$

各群 28 日間隔で 2 回経鼻投与を行い、Group B と C は最終投与から 2 週間後に 4 匹ずつサンプル回収を行った。

各群残りの 8 匹は、後述 (4-4) のウイルス曝露に使用した。ウイルス曝露から 3 週間後、生存しているマウスに対しサンプル回収を行った。

4-4 マウス適応型インフルエンザウイルス H1N1 A/Puerto Rico/8/34 の曝露

Mouse-adapted H1N1 influenza virus A/Puerto Rico/8/34 (PR8 株) は、北里大学保有ウイルス株を用いた。ソムノペンチル麻酔下 (生理食塩水で 5 mg/mL になるように希釈し、マウスの体重 10 g 当たり 0.1 mL を腹腔内投与)、4-3 で免疫を施し最終投与から 2 週間後のマウスの片側鼻腔に、0.1% BSA-PBS 懸濁インフルエンザウイルス液 20 μL (8.0×10^5 PFU、 $2 \times \text{LD}_{50}$ に相当) を経鼻接種した。

4-5 生存率および体重のモニタリング

ウイルス曝露日を 0 日として、それ以降 3 週間、マウスの生死と体重をモニターした。各日に測定された体重は、0 日の体重を 100% とした百分率で表し、日ごとに体重をプロットした。ウイルス曝露時点の体重を 100% とし、その体重からの減少分 (%) を日に対して積分 (% \cdot day) し、体重減少面積として算出した (この値をウイルス感染に伴う症状の重症化の指標として用いた)。

4-6 抗体価測定

2-4-1 に準じた。ただし、F8 Nunc-Immuno module plate, Maxisorp に固相化する抗原として、不活化 NCL 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ あるいは PR8 ライセート 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を含む BSA 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を溶かした PBS 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ に変更した。また、HRP 標識ヤギ抗マウス抗体には 4000 倍希釈した IgG、IgG1、IgG2a 抗体あるいは 2000 倍希釈した IgA 抗体を使用した。ただし、PR8 ライセートを固定化した場合はサンプルの 2 倍希釈系列は 5 倍希釈から始めたため、5 倍希釈倍率の液で抗体産生が見られない場合、計算上、抗体価は 2.3 ($5=2^{2.3}$) と見積もられた。

4-7 交叉反応性

2-4-2 に準じた。

4-8 抗体価の変化量と体重減少領域の相関

曝露後 21 日間のモニター期間終了後、生存していた Group B および C のマウスについて、4-6 に従い、PR8 に反応する抗体価 (IgG および IgA) を測定した。個々のマウスの抗体価 (endpoint titer を希釈倍率で表した数値、例えば、 2^7 であれば 128) について、別に測定した Group B および C のウイルス曝露日の別の個体 4 匹の抗体価 (endpoint titer を希釈倍率で表した数値) の平均値で除して、ウイルス感染前後における PR8 に反応する抗体価の変動値を計算した。4-5 で求めた個々のマウスの体重減少面積 (x 軸) に対して、前述の変動値 (y 軸) をプロットし、両者の相関を検証した。

4-9 統計解析

JMP®Pro 13.1.0 (SAS Institute Inc.、ケーリー、ノースカロライナ州) を用いて、統計解析を実施した。マウス生存率はログランク検定、その他の実験の 3 群間以上の比較は Tukey-Kramer 検定、2 群間の比較はスチューデントの t 検定で評価し、 $p < 0.05$ を統計学的に有意と見なした。ウイルス曝露による抗体価の変化と体重減少面積との相関は、ピアソンの積率相関係数によって評価し、 p 値は非相関の検定によって求められた。

謝辞

終わりに臨み、本研究に際して終始ご懇切なるご指導、ご鞭撻を賜りました摂南大学薬学部 薬物送達学研究室 佐久間 信至 教授に衷心より深甚なる誠意を表します。また、様々の有益な御指導と御助言を戴きました摂南大学薬学部 薬物送達学研究室 鵜川 真実 助教、伴野 拓巳 助教に感謝の意を表します。さらに、実験の御指導を戴きました鹿児島大学 ヒトレトロウイルス学共同研究センター 抗ウイルス化学療法研究分野 馬場 昌範 教授並びに宮崎大学 医学部 宇都 倫史 准教授、高分子の合成および物性評価を御担当戴きました(株) ADEKA ライフサイエンス材料研究所 飛田 悦男 博士、滋野 浩一 氏、高日 俊輔 氏、宮田 康平 博士に深く感謝の意を表します。また、感染実験における施設と技術を御提供戴きました北里大学北里生命科学研究所と同所属 永井 隆之 准教授、佐々木 健 氏、社団法人北里研究所 平久 治 氏に感謝いたします。また、実験の一部に御協力戴いた摂南大学薬学部 薬物送達学研究室 八木 晴也 学士、吉田 祐樹 氏、辻岡 拓実 氏をはじめ、当研究室の卒業生および在校生に深く感謝いたします。

最後に、いつも良き理解者として励まし支えてくれた父、母、親族をはじめ、友人、知人一同に心から感謝致します。

引用文献

1. Influenza (Seasonal) [http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)) (accessed Jan 6, 2020).
2. Alexander, D. J. A review of avian influenza in different bird species. *Vet. Microbiol.* 74 (2000) 3-13.
3. Dawood, F. S., Iuliano A. D., Reed C., Meltzer M. I., Shay D. K., Cheng, P. Y., Bandaranayake, D., Breiman, R. F., Brooks, W. A., Buchy, P., et al. Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study. *Lancet Infect. Dis.* 12 (2012) 687-695.
4. Suzuki, T., Kawaguchi, A., Aina, A., Tamura, S., Ito, R., Multihartina, P., Setiawaty, V., Pangesti, K. N., Odagiri, T., Tashiro, M., and Hasegawa, H. Relationship of the quaternary structure of human secretory IgA to neutralization of influenza virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 112 (2015) 7809-7814.
5. Saito, S., Sano, K., Suzuki, T., Aina, A., Taga, Y., Ueno, T., Tabata, K., Saito, K., Wada, Y., Ohara, Y., et al. IgA tetramerization improves target breadth but not peak potency of functionality of antiinfluenza virus broadly neutralizing antibody. *PLoS Pathog.* 15 (2019) e1007427. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007427>
6. Huckriede, A., Bungener, L., Stegmann, T., Daemen, T., Medema, J., Palache, A. M., and Wilschut, J. The virosome concept for influenza vaccines. *Vaccine* 23 (2005) S26-38.
7. Mutsch, M., Zhou, W., Rhodes, P., Bopp, M., Chen, R. T., Linder, T., Spyr, C., and Steffen, R. Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland. *N. Engl. J. Med.* 350 (2004) 896-903.
8. Lewis, D. J., Huo, Z., Barnett, S., Kromann, I., Giemza, R., Galiza, E., Woodrow, M., Thierry-Carstensen, B., Andersen, P., and Novicki, D. Transient facial nerve paralysis (Bell's palsy) following intranasal delivery of a genetically detoxified mutant of Escherichia coli heat labile toxin. *PLoS One* 4 (2009) e6999. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006999>
9. Mossad, S. B. Demystifying FluMist, a new intranasal, live influenza vaccine. *Cleveland Clin. J. Med.* 70 (2003) 801-806.
10. Carter, N. J., and Curran, M. P. Live attenuated influenza vaccine (FluMist®; Fluenz): a review of its use in the prevention of seasonal influenza in children and adults. *Drugs* 71 (2011) 1591-1622.
11. Jackson, L. A., Holmes, S. J., Mendelman, P. M., Huggins, L., Cho, I., and Rhorer, J. Safety of a trivalent live attenuated intranasal influenza vaccine, FluMist, administered in addition to parenteral trivalent inactivated influenza vaccine to seniors with chronic medical conditions. *Vaccine* 17 (1999) 1905-1909.

12. Flumist[®] Product Information
<https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/UCM294307.pdf> (accessed Jan 6, 2020)
13. Bergquist, C., Johansson, E., Lagergard, T., Holmgren, J., and Rudin, A. Intranasal vaccination of humans with recombinant cholera toxin B subunit induces systemic and local antibody responses in the upper respiratory tract and the vagina. *Infect. Immun.* 65 (1997) 2676-2684.
14. Ichinohe, T., Watanabe, I., Ito, S., Fujii, H., Moriyama, M., Tamura, S., Takahashi, H., Sawa, H., Chiba, J., Kurata, T., et al. Synthetic double-stranded RNA poly (I:C) combined with mucosal vaccine protects against influenza virus infection. *J. Virol.* 79 (2005) 2910-2919.
15. Ichinohe, T., Tamura, S., Kawaguchi, A., Ninomiya, A., Imai, M., Itamura, S., Odagiri, T., Tashiro, M., Takahashi, H., Sawa, H., et al. Cross-Protection against H5N1 Influenza Virus Infection Is Afforded by Intranasal Inoculation with Seasonal Trivalent Inactivated Influenza Vaccine. *J. Infect. Dis.* 196 (2007) 1313-1320.
16. Ichinohe, T., Kawaguchi, A., Tamura, S., Takahashi, H., Sawa, H., Ninomiya, A., Imai, M., Itamura, S., Odagiri, T., Tashiro, M., et al. Intranasal immunization with H5N1 vaccine plus Poly I:Poly C12U, a Toll-like receptor agonist, protects mice against homologous and heterologous virus challenge. *Microbes Infect.* 9 (2007) 1333-1340.
17. Henriksen-Lacey, M., Korsholm, K. S., Andersen, P., Perrie, Y., and Christensen, D. Liposomal vaccine delivery systems. *Expert Opin. Drug Deliv.* 8 (2011) 505-519.
18. Madhun, A. S., Haaheim, L. R., Nilsen, M. V., and Cox, R. J. Intramuscular matrix-M-adjuvanted virosomal H5N1 vaccine induces high frequencies of multifunctional Th1 CD4⁺ cells and strong antibody responses in mice. *Vaccine* 27 (2009) 7367-7376.
19. O'Hagan, D. T., Ott, G. S., De Gregorio, E., and Seubert, A. The mechanism of action of MF59 – an innately attractive adjuvant formulation. *Vaccine* 30 (2012) 4341-4348.
20. Bernasconi, V., Norling, K., Bally, M., Höök, F., and Lycke, N. Y. Mucosal Vaccine Development Based on Liposome Technology. *J. Immunol. Res.* 2016 (2016) ID 5482087. <https://doi.org/10.1155/2016/5482087>
21. Corthésy, B., and Bioley, G. Lipid-Based Particles: Versatile Delivery Systems for Mucosal Vaccination against Infection. *Front. Immunol.* 9 (2018) 431. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00431>
22. Frankel, A. D., and Pabo, C. O. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 55 (1988) 1189-1193.
23. Christiaens, B., Grooten, J., Reusens, M., Joliot, A., Goethals, M., Vandekerckhove, J., Prochiantz, A., and Rosseneu, M. Membrane interaction and cellular internalization of penetratin peptides. *Eur. J. Biochem.* 271 (2004) 1187-1197.

24. Gonçalves, E., Kitas, E., and Seelig, J. Binding of oligoarginine to membrane lipids and heparan sulfate: structural and thermodynamic characterization of a cell-penetrating peptide. *Biochemistry* 44 (2005) 2692-2702.
25. Jones, A. T. Macropinocytosis: searching for an endocytic identity and role in the uptake of cell penetrating peptides. *J. Cell. Mol. Med.* 11 (2007) 670-684.
26. Nakase, I., Takeuchi, T., Tanaka, G., and Futaki, S. Methodological and cellular aspects that govern the internalization mechanisms of arginine-rich cell-penetrating peptides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (2008) 598-607.
27. Sakuma, S., Suita, M., Masaoka, Y., Kataoka, M., Nakajima, N., Shinkai, N., Yamauchi, H., Hiwatari, K., Tachikawa, H., Kimura, R., et al. Oligoarginine-linked polymers as a new class of penetration enhancers. *J. Control. Release* 148 (2010) 187-196.
28. Sakuma, S., Suita, M., Yamamoto, T., Masaoka, Y., Kataoka, M., Yamashita, S., Nakajima, N., Shinkai, N., Yamauchi, H., Hiwatari, K., et al. Performance of cell-penetrating peptide-linked polymers physically mixed with poorly membrane-permeable molecules on cell membranes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 81 (2012) 64-73.
29. Mohri, K., Morimoto, N., Maruyama, M., Nakamoto, N., Hayashi, E., Nagata, K., Miyata, K., Ochiai, K., Hiwatari, K., Tsubaki, K., et al. Potential of D-Octaarginine-Linked Polymers as an in Vitro Transfection Tool for Biomolecules. *Bioconjug. Chem.* 26 (2015) 1782-1790.
30. Miyata, K., Ukawa, M., Mohri, K., Fujii, K., Yamada, M., Tanishita, S., Higashitarumi, S., Ishizaki, S., Kumagai, H., Ochiai, K., et al. Biocompatible Polymers Modified with D-Octaarginine as an Absorption Enhancer for Nasal Peptide Delivery. *Bioconjug. Chem.* 29 (2018) 1748-1755.
31. Sakuma, S., Suita, M., Inoue, S., Marui, Y., Nishida, K., Masaoka, Y., Kataoka, M., Yamashita, S., Nakajima, N., Shinkai, N., et al. Cell-Penetrating Peptide-Linked Polymers as Carriers for Mucosal Vaccine Delivery. *Mol. Pharm.* 9 (2012) 2933-2941.
32. Sakuma, S., Morimoto, N., Nishida, K., Murakami, T., Egawa, T., Endo, R., Kataoka, M., Yamashita, S., Miyata, K., Mohri, K., et al. Cross-reactivity of immunoglobulin A secreted on the nasal mucosa in mice nasally inoculated with inactivated H1N1 influenza A viruses in the presence of D-octaarginine-linked polymers. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 92 (2015) 56-64.
33. Miyata, K., Mohri, K., Egawa, T., Endo, R., Morimoto, N., Ochiai, K., Hiwatari, K., Tsubaki, K., Tobita, E., Uto, T., et al. Demonstration of D-Octaarginine-Linked Polymers as Promising Adjuvants for Mucosal Vaccination through Influenza Virus Challenge. *Bioconjug. Chem.* 27 (2016) 1865-1871.
34. 遠藤 カ斗 「粘膜投与型ワクチンの抗原キャリアとしての D-オクタアルギニン固定化高分子による免疫活性増強機構の解明」 第 32 回日本 DDS 学会学術集会 2016 年 6 月 30 日

35. Tada, R., Hidaka, A., Iwase, N., Takahashi, S., Yamakita, Y., Iwata, T., Muto, S., Sato, E., Takayama, N., Honjo, E., et al. Intranasal Immunization with DOTAP Cationic Liposomes Combined with DC-Cholesterol Induces Potent Antigen-Specific Mucosal and Systemic Immune Responses in Mice. *PLoS One* 10 (2015) e0139785. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139785>
36. Liu, J., Jiang, X., Ashley, C., and Jeffrey Brinker, C. Electrostatically Mediated Liposome Fusion and Lipid Exchange with a Nanoparticle-Supported Bilayer for Control of Surface Charge, Drug Containment, and Deliver. *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 7567-7569.
37. Davidsen, J., Rosenkrands, I., Christensen, D., Vangala, A., Kirby, D., Perrie, Y., Agger, E. M., and Andersen, P. Characterization of cationic liposomes based on dimethyldioctadecylammonium and synthetic cord factor from *M. tuberculosis* (trehalose 6,6'-dibehenate)-a novel adjuvant inducing both strong CMI and antibody responses. *Biochim. Biophys. Acta.* 1718 (2005) 22-31.
38. Tasaniyananda, N., Chaisri, U., Tungtrongchitr, A., Chaicumpa, W., and Sookrung, N., Mouse Model of Cat Allergic Rhinitis and Intranasal Liposome-Adjuvanted Refined Fel d 1 Vaccine. *PLoS One* 11 (2016) e0150463. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150463>
39. Matsumoto, K. The Role of Hyaluronan in Cartilage. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* 22 (2010) 57-67.
40. Creamer, P., Sharif, M., George, E., Meadows, K., Cushnaghan, J., Shinmei, M., and Dieppe, P. Intra-articular hyaluronic acid in osteoarthritis of the knee: an investigation into mechanisms of action. *Osteoarthr. Cartil.* 2 (1994) 133-140.
41. Laurent, T. C., and Fraser, J. R. Hyaluronan. *FASEB J.* 6 (1992) 2397-2404.
42. Purkayastha, N., Eyer, K., Robinson, T., Dittrich, P. S., Beck, A. K., Seebach, D., Kolesinska, B., and Cadalbert, R. Enantiomeric and diastereoisomeric (mixed) L/D-octaarginine derivatives - a simple way of modulating the properties of cell-penetrating peptides. *Chem. Biodiversity* 10 (2013) 1165-1184.
43. Mohri, K., Miyata, K., Egawa, T., Tanishita, S., Endo, R., Yagi, H., Ukawa, M., Ochiai, K., Hiwatari, K., Tsubaki, K., et al. Effects of the Chemical Structures of Oligoarginines Conjugated to Biocompatible Polymers as a Mucosal Adjuvant on Antibody Induction in Nasal Cavities. *Chem. Pharm. Bull.* 66 (2018) 375-381.
44. Tømmeraas, K., and Melander, C. Kinetics of Hyaluronan Hydrolysis in Acidic Solution at Various pH Values. *Biomacromolecules* 9 (2008) 1535-1540.
45. Pollock, J. F., Ashton, R. S., Rode, N. A., Schaffer, D. V., and Healy, K. E. Molecular characterization of multivalent bioconjugates by size-exclusion chromatography (SEC) with multi-angle laser light scattering (MALS). *Bioconjug. Chem.* 23 (2012) 1794-1801.

46. CDC. Ncir. 2018 Combined Recommended Immunization Schedule for Children and Adolescents Aged 18 Years or Younger. United States, 2018. <https://www.cdc.gov/vaccines/schedules/downloads/past/2018-child.pdf>
47. Eijgenraam, J. W., Oortwijn, B. D., Kamerling, S. W., de Fijter, J. W., van den Wall Bake, A. W., Daha, M. R., and van Kooten, C. Secretory immunoglobulin A (IgA) responses in IgA nephropathy patients after mucosal immunization, as part of a polymeric IgA response. *Clin. Exp. Immunol.* 152 (2008) 227-232
48. Glück, R., Mischler, R., Durrer, P., Fürer, E., Lang, A. B., Herzog, C., and Cryz, S. J. Jr. Safety and Immunogenicity of Intranasally Administered Inactivated Trivalent Virosome-Formulated Influenza Vaccine Containing Escherichia coli Heat-Labile Toxin as a Mucosal Adjuvant. *J. Infect. Dis.* 181 (2000) 1129-1132.
49. Levine, A. S., and Levy, H. B. Phase I-II trials of poly IC stabilized with poly-L-lysine. *Cancer Treat. Rep.* 62 (1978) 1907-1912.
50. 独立行政法人 医薬品医療機器総合機構ホームページ
<https://www.pmda.go.jp/int-activities/int-harmony/ich/0069.html>(accessed Jan 6, 2020)
51. Zhang, A., Lai, H., Xu, J., Huang, W., Liu, Y., Zhao, D., and Chen, R. Evaluation of the Protective Efficacy of Poly I:C as an Adjuvant for H9N2 Subtype Avian Influenza Inactivated Vaccine and Its Mechanism of Action in Ducks. *PLoS One* 12 (2017) e0170681. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170681>
52. Tamura, S., Tanimoto, T., and Kurata, T. Mechanisms of Broad Cross-Protection Provided by Influenza Virus Infection and Their Application to Vaccines. *Jpn. J. Infect. Dis.* 58 (2005) 195-207.
53. Terauchi, Y., Sano, K., Ainai, A., Saito, S., Taga, Y., Ogawa-Goto, K., Tamura, S., Odagiri, T., Tashiro, M., Fujieda, M., et al. IgA polymerization contributes to efficient virus neutralization on human upper respiratory mucosa after intranasal inactivated influenza vaccine administration. *Hum. Vaccines Immunother.* 14 (2018) 1351-1361.
54. 日本経済新聞 「鼻に噴射でインフル感染予防 国産ワクチン承認申請へ」
<https://www.nikkei.com/article/DGXMZO5252140U9A121C1CR8000/> (accessed Jan 6, 2020)
55. Mosmann, T. R., and Coffman, R. L. TH1 and TH2 Cells: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7 (1989) 145-173.
56. Murphy, B. R., Nelson, D. L., Wright, P. F., Tierney, E. L., Phelan, M. A., and Chanock, R. M. Secretory and Systemic Immunological Response in Children Infected with Live Attenuated Influenza A Virus Vaccines. *Infect. Immun.* 36 (1982) 1102-1108.
57. Zuercher, A. W., Coffin, S. E., Thurnheer, M. C., Fundova, P., and Cebra, J. J. Nasal-Associated Lymphoid Tissue Is a Mucosal Inductive Site for Virus-Specific Humoral and Cellular Immune Responses. *J. Immunol.* 168 (2002) 1796-1803.

論文目録

1. Tanishita, S., Ukawa, M., Tomono, T., Yoshida, Y., Tsujioka, T., Miyata, K., Tobita, E., Uto, T., Baba, M., Sakuma, S., Cross-protective Abilities of Hyaluronic Acid Modified with Tetraglycine-L-octaarginine as a Mucosal Adjuvant against Infection with Heterologous Influenza Viruses. *Bioconjug. Chem.* 30 (2019) 3028-3037.
2. Ukawa, M., Tanishita, S., Yagi, H., Yoshida, Y., Tomono, T., Shigeno, K., Tobita, E., Uto, T., Baba, M., Sakuma, S., Biodegradable hyaluronic acid modified with tetraglycine-L-octaarginine as a safe adjuvant for mucosal vaccination. *Mol. Pharm.* 16 (2019) 1105-1118.