

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08445

研究課題名(和文) サフラン色素クロシンを粘膜アジュバントとした経鼻インフルエンザワクチンの開発

研究課題名(英文) Development of intranasal influenza vaccine supplemented with crocin, saffron coloring agent, as a mucosal adjuvant

研究代表者

吉野 直人 (YOSHINO, Naoto)

岩手医科大学・医学部・特任准教授

研究者番号：20372881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では食品添加物として用いられているサフラン色素の成分であるクロシンの粘膜アジュバント作用を検討した。全粒子不活化インフルエンザウイルスとクロシンを経鼻免疫すると気管洗浄液中のIgA抗体価の上昇、ウイルス感染後の体重減少の抑制および気管洗浄液中のウイルス量減少が観察された。インフルエンザ流行期間で免疫が維持されているかを確認するため最終免疫から30週の間隔を開けてウイルスを接種しても効果が認められた。クロシンはインフルエンザウイルス感染に対して有効な粘膜免疫を誘導できる粘膜アジュバントであった。クロシン添加経鼻インフルエンザワクチンは安全かつ有効な新規ワクチンになり得る可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インフルエンザは急性の呼吸器感染症で、世界中で流行がみられている。ワクチン接種が行われているわが国でも毎年冬季を中心に多数の患者発生と高齢者の超過死亡、インフルエンザ脳症に代表される乳幼児合併症等がみられている。多くの臨床および基礎研究者は現行のインフルエンザHAワクチンの限界を指摘している。アジュバント添加経鼻ワクチンはこれらの限界を克服する可能性を有している。本研究の学術的意義は、基礎研究においてクロシン添加経鼻インフルエンザワクチンが安全かつ有効な新規ワクチンになりえる可能性を示したことであり、将来の臨床応用への第一歩となる研究である。

研究成果の概要(英文)：We investigated the mucosal adjuvant activity of crocin, a saffron coloring agent used as a food additive. Intranasal immunization of whole inactivated influenza virus with crocin increased the IgA antibody titer in the bronchial lavages, suppressed weight loss after virus infection, and reduced viral load in bronchial lavages. Furthermore, the effect of crocin was observed even when the virus was challenged 30 weeks after the last immunization to confirm whether immunity was maintained during the influenza epidemic period. Crocin was a mucosal adjuvant capable of inducing effective mucosal immunity for influenza virus infection. The crocin-supplemented intranasal influenza vaccine has the potential to be a safe and effective vaccine.

研究分野：免疫学

キーワード：アジュバント 粘膜免疫 ワクチン 糖型界面活性剤 インフルエンザ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

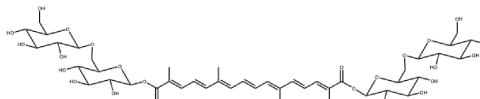
### 1. 研究開始当初の背景

インフルエンザは急性の呼吸器感染症で、世界中で流行がみられている。ワクチン接種が行われているわが国でも毎年冬季を中心に多数の患者発生と高齢者の超過死亡、インフルエンザ脳症に代表される乳幼児合併症等がみられている。多くの臨床および基礎研究者は以下の点から現在臨床で使用されているインフルエンザ HA ワクチンの限界を指摘している。呼吸器に感染防御のための粘膜免疫を誘導できない。インフルエンザウイルスに感染歴のない乳幼児ではワクチンに対する免疫応答が弱い。CTL を誘導できない。Th2 型応答の偏重により IgE 感作を増強する。アジュバント添加経鼻ワクチンはこれらを克服する可能性を有している。

我々は粘膜免疫を増強するアジュバントの探索を行っており、これまでにクロシンを含む 26 種類の粘膜アジュバント作用を有する化合物を発見し、その中でも糖型界面活性剤に強い粘膜アジュバント作用があることを明らかにした。

本研究で検討するクロシンはサフランの雌しべやクチナシの実に含まれる分子量 977.0 の天然糖型界面活性剤であり、黄赤色の化合物でペリアや栗きんとんなど洋の東西を問わず古くから用いられている天然食品色素であり安全性が高い(図 1;構造式)

図1



本研究は現行のインフルエンザ HA ワクチンの限界を踏まえ、「クロシン添加経鼻インフルエンザワクチンは安全かつ有効な新規ワクチンになりえるか？」の問いに対する基礎研究であり、将来の臨床応用への第一歩となる研究である。

### 2. 研究の目的

近年、免疫学的知見に基づいて Toll-like receptors 等に注目したアジュバント探索が行われているが安全性の点で臨床試験に到達できない事例が多くある。本研究では一般的な免疫学を出発点としたアジュバント開発とは異なり安全性を出発点としていることに独自性がある。我々は、複数の界面活性剤に粘膜アジュバント作用があることを発見している。そこで安全性に着目し、糖型界面活性剤の中でも食用色素として用いられているサフランに含まれるクロシンをアジュバント候補物質とした。本研究は、食品成分によるワクチンアジュバント開発であるため安全性においてすでに優位にあると考えられ、「クロシンアジュバント添加経鼻インフルエンザワクチンが安全かつ効果的な新規インフルエンザワクチンであることを明らかにする」ことを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究はクロシンと不活化インフルエンザウイルスを経鼻免疫し、感染防御免疫の誘導を目的としたアジュバント添加新規インフルエンザワクチンの開発である。一般に HA スプリットはより安全性が高く、全粒子不活化インフルエンザウイルス (WIV) はワクチン効果が高い。両者のクロシン添加経鼻接種での安全性および効果は不明であるため、クロシンと HA スプリットまたは WIV をマウスに経鼻免疫後、免疫応答と安全性を評価するとともにマウス馴化インフルエンザウイルスに対する感染阻止効果を比較した。

(1) ワクチン抗原の作製：インフルエンザウイルスは臨床分離株である A/Iwate/1130/2009 (H1N1pdm) を元株としたマウス馴化ウイルスを用いた。インフルエンザウイルスを MDCK 細胞で大量培養し、HA スプリットはインフルエンザウイルスをショ糖密度勾配遠心法で精製し、 $\beta$ -プロピオラクトン不活化法(文献 1)で不活化後エーテル処理を行い作製した。WIV は  $\beta$ -プロピオラクトンで不活化し作製した。

(2) 界面化学的解析：これまで検討を行った界面活性剤では臨界ミセル濃度以上で粘膜アジュバント効果が認められるため(文献 2, 3)、クロシン溶液の表面張力を毛細管上昇方式表面張力計で測定し臨界ミセル濃度を算出した。界面活性剤はタンパク質と複合体を形成し、その混合比によって複合体粒子サイズは異なる。免疫誘導に適した複合体粒子サイズ(約 100~500 nm)があるため、クロシン-HA スプリットおよびクロシン-WIV 複合体の粒子サイズを粒子径分析装置で測定する。これらの結果から動物実験で用いる至適投与量を決定した。HA スプリットと WIV のマウスへの投与量 (HA 価) は等価とした。

(3) インフルエンザ特異免疫解析：マウスに経鼻免疫後、血中および粘膜分泌液(鼻腔洗浄液、気管支洗浄液)でインフルエンザ特異的抗体価を ELISA で測定した。免疫後約半年(30 週)の期間で長期免疫応答を解析し、インフルエンザ特異的記憶免疫の誘導を解析した。

(4) 安全性試験：ワクチン接種経路である鼻粘膜組織および鼻腔に近接する脳組織（主に嗅球）で炎症応答を病理学的に解析した。クロシンのマウスでの致死量は約 100mg/マウスであり、またマウスに約 4mg/マウス量のクロシンを腹腔投与すると軽度の血小板減少が起こることが報告されている。本研究での投与量は 5~50 µg/マウスであるが、クロシンの経鼻投与後の血球数を血球測定装置で測定した。

(5) インフルエンザウイルス感染防御試験：感染阻止実験に用いるマウス馴化インフルエンザウイルスは臨床分離株である A/Iwate/1130/2009 (H1N1pdm) を元株とし、マウスでの継代を繰り返すことでマウス 50%致死量(MLD<sub>50</sub>)が 2.5PFU/マウスの馴化ウイルスをすでに作製している。マウスに経鼻免疫を行い、一定期間後に 50MLD<sub>50</sub> のマウス馴化インフルエンザウイルスを経鼻接種し感染防御効果を比較した。皮下接種後に感染防御試験を行い、クロシン添加経鼻インフルエンザワクチンと現行のワクチンを比較した。

#### 4. 研究成果

(1) ワクチン抗原の作製：最初に本研究で用いるワクチン抗原の作製を行なった。マウス馴化ウイルスを MDCK 細胞で大量培養後、ショ糖密度勾配遠心法でウイルスを精製した。-プロピオラクトンで不活化し、全粒子不活化インフルエンザウイルス抗原 (WIIV) を作製した。不活化の確認は生物学的製剤基準の不活化試験に準拠し発育鶏卵を用いて行い、感染性ウイルスは陰性であった。

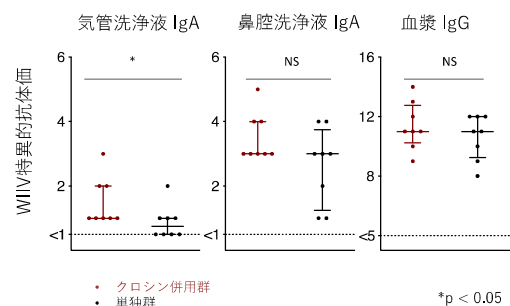
(2) 粒子サイズの測定：界面活性剤の粘膜アジュバント作用は、界面活性剤とタンパク質とが複合体を形成しその複合体粒子サイズに影響されることを明らかにしてきた。そこで、クロシン-WIIV 複合体の粒子サイズを粒子径分析装置で測定した。WIIV の粒子サイズは 164.4 nm であったのに対し、クロシン添加後の粒子サイズは 332.7 nm であった。この結果からクロシンと WIIV が複合体を形成していることが推定された。また、免疫誘導に適した複合体粒子サイズは約 100~500 nm であり、クロシン-WIIV 複合体の粒子サイズはこの範囲内であった。

(3) 抗原投与量の検討：クロシンの粘膜アジュバント効果を検討するために、最初に WIIV の免疫に用いる量を決定する必要がある。そこで、マウスに 1、0.1、0.01 µg の WIIV を経鼻投与した。1 µg および 0.1 µg では血液中および粘膜分泌液（鼻腔洗浄液、気管洗浄液）中にインフルエンザ特異的抗体を確認できたが、0.01 µg では抗体は検出されなかった。そこで、抗原量は 0.1 µg とした。

(4) 安全性の検討：粘膜アジュバント候補物質であるクロシンを経鼻投与後、24 時間間隔で体重体温を測定し、7 日後に血球算定および病理解析を行なった。観察期間中、体重体温の変化はなく、血小板数、赤血球数、白血球数、ヘマトクリット、ヘモグロビン値に異常値は見られなかった。鼻粘膜組織および嗅球で炎症応答は認められなかった。

(5) アジュバント作用の検討：WIIV のみ（単独群）WIIV とクロシン（クロシン併用群）をそれぞれマウスに経鼻免疫後、気管洗浄液、鼻腔洗浄液、血液中のウイルス特異的抗体価を測定した。併用群の気管洗浄液中の IgA 抗体価は単独群より有意に上昇した。また、鼻腔洗浄液中の IgA および血漿中の IgG 抗体価には有意差はなかったものの、併用群は単独群より高い傾向にあった（図 2）。

図 2



(6) 感染抑制効果の検討：免疫したマウスに致死量のマウス馴化ウイルスを経鼻感染させた。感染実験は 1) WIIV 経鼻接種（単独群） 2) 併用経鼻接種（併用群）に加え、3) WIIV 皮下接種（皮下群） 4) クロシン単独経鼻接種（クロシン群） 5) 生理食塩水経鼻投与（非免疫群）で行なった（各群 8 匹）。ウイルス感染後に死亡したマウスの匹数は、単独群 1、併用群 0、皮下群 5、クロシン群 8、非免疫群 8 であった（図 3）。感染 3 日後の併用群での気管洗浄液中のウイルス量は非免疫群の 1/1000 未満、単独群の約 1/5 に低下していた（図 4）。

図3

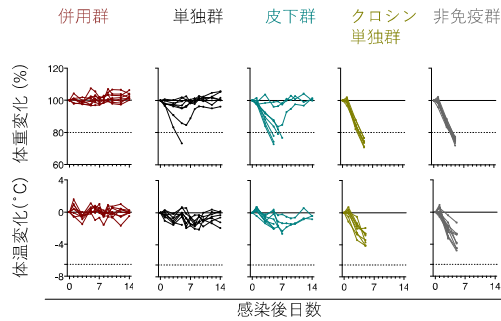
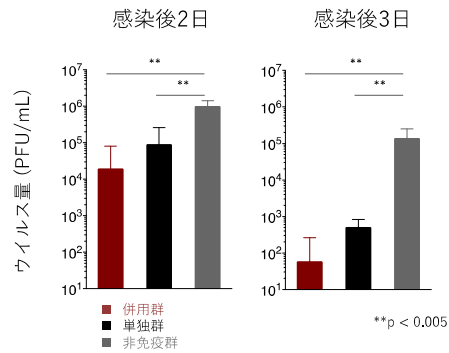
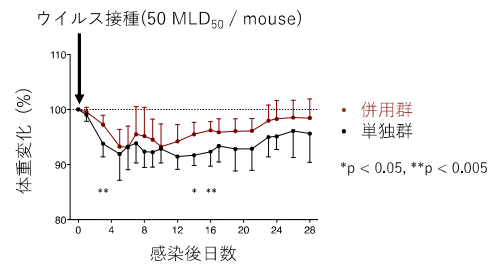


図4



(7) 長期免疫応答の検討：約半年のインフルエンザ流行期間で免疫が維持されているかを明らかにするため最終免疫から 30 週の間隔を開けて(この間ブーストはしていない)、致死量の同株ウイルスを感染させ体重と体温を測定した。感染後、WIIVとクロシンの併用群でも体重減少が見られ体重が回復するまで 2 週間の間隔を開けた時に比べ倍の 4 週間を要したが、単独群に比べて体重減少が有意に抑制された(図 5)。これらの結果から、長期間の免疫応答においてもクロシンは WIIV に対し効果的な粘膜アジュバントであると考えられた。

図5



(8) HA スプリットでのアジュバント作用の検討：0.1  $\mu\text{g}$  の WIIV 中の HA は 0.03455  $\mu\text{g}$  であった。WIIV と HA スプリットのマウスへの投与量を等価とするため、HA スプリットの投与量を 0.03455  $\mu\text{g}$  とした。HA スプリットのみ(単独群)、HA スプリットとクロシン(併用群)をそれぞれマウスに経鼻免疫し最終免疫から 2 週間後に気管洗浄液、鼻腔洗浄液、血液中のウイルス特異的抗体価を測定した。単独群と比較して併用群での抗体価の有意な上昇は観察されなかった。詳細は明らかではないが、クロシンの粘膜アジュバント作用は抗原の性質に依存すると推測された。

本研究はインフルエンザワクチン開発の基礎研究であり、将来のインフルエンザ感染者・死者数の減少を目指した研究である。HA スプリットと WIIV の比較を行うことで、クロシンアジュバントに適したインフルエンザワクチン抗原が明らかになった。さらに、クロシン添加経鼻インフルエンザワクチンの安全性および有効性を示すことができた。

< 引用文献 >

1. Sasaki Y, Yoshino N, Sato S, Muraki Y. Analysis of the beta-propiolactone sensitivity and optimization of inactivation methods for human influenza H3N2 virus. *J Virol Methods*. 2016 Sep;235:105-111.
2. Yoshino N, Takeshita R, Kawamura H, Murakami K, Sasaki Y, Sugiyama I, Sadzuka Y, Kagabu M, Sugiyama T, Muraki Y, Sato S. Critical micelle concentration and particle size determine adjuvanticity of cyclic lipopeptides. *Scand J Immunol*. 2018 Jun 23:e12698.
3. Yoshino N, Kawamura H, Sugiyama I, Sasaki Y, Odagiri T, Sadzuka Y, Muraki Y. A systematic assessment of the relationship between synthetic surfactants and mucosal adjuvanticity. *Eur J Pharm Biopharm*. 2021 Aug;165:113-126.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshino N, Takeshita R, Kawamura H, Murakami K, Sasaki Y, Sugiyama I, Sadzuka Y, Kagabu M, Sugiyama T, Muraki Y, Sato S.	4. 巻 88
2. 論文標題 Critical micelle concentration and particle size determine adjuvant activity of cyclic lipopeptides	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scandinavian Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 e12698 ~ e12698
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/sji.12698	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshino N, Kawamura H, Sugiyama I, Sasaki Y, Odagiri T, Sadzuka Y, Muraki Y.	4. 巻 165
2. 論文標題 A systematic assessment of the relationship between synthetic surfactants and mucosal adjuvant activity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics	6. 最初と最後の頁 113 ~ 126
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejpb.2021.05.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yoshino N, Odagiri T, Muraki Y.
2. 発表標題 Structure-activity relationship of surfactants as mucosal adjuvants.
3. 学会等名 第47回日本免疫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉野直人、佐々木裕、小田切崇、杉山育美、松本有機、菅野祐幸、佐塚泰之、村木靖
2. 発表標題 アジュバント作用を有する天然物由来糖型界面活性剤の探索.
3. 学会等名 第73回日本細菌学会東北支部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉野直人
2. 発表標題 界面活性剤の物性とワクチンアジュバント作用 .
3. 学会等名 第8回物理・分析系若手研究者セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshino N, Odagiri T, Muraki Y.
2. 発表標題 Assessment of relationship between structure and adjuvanticity of sugar-based surfactant .
3. 学会等名 第48回日本免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉野直人、佐々木裕、小田切崇、杉山育美、松本有機、菅野祐幸、佐塚泰之、村木靖
2. 発表標題 全粒子不活化インフルエンザウイルスに対する安全な新規粘膜アジュバントとしてのクロシン .
3. 学会等名 第13回次世代アジュバント研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉野直人、佐々木裕、小田切崇、杉山育美、松本有機、菅野祐幸、佐塚泰之、村木靖
2. 発表標題 全粒子不活化A型インフルエンザウイルスに対するクロシンの粘膜アジュバント作用 .
3. 学会等名 第24回日本ワクチン学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	佐々木 裕  (SASAKI Yutaka)  (80526062)	岩手医科大学・医学部・助教   (31201)	
連携研究者	菅野 祐幸  (KANNO Hiroyuki)  (40252663)	信州大学・学術研究院医学系・教授   (13601)	
連携研究者	杉山 育美  (SUGIYAMA Ikumi)  (80509050)	岩手医科大学・薬学部・助教   (31201)	
連携研究者	佐塚 泰之  (SADZUKA Yasuyuki)  (90162403)	岩手医科大学・薬学部・教授   (31201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------