

機関番号：13201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590033

研究課題名（和文） インフルエンザビロソームの構築とワクチン開発への展開

研究課題名（英文） Construction of influenza virosome and its development to preparation of vaccine

研究代表者

上野 雅晴（UENO MASAHARU）

富山大学・大学院医学薬学研究部（薬学）・教授

研究者番号：40080197

研究成果の概要（和文）：

インフルエンザはインフルエンザウイルスによって引き起こされる身近な感染症の1つである。ワクチンは感染症と戦う最も有効な武器であり、リポソームは有効な免疫アジュバントであることが知られている。ここでは、リポソームワクチン（ビロソーム）を調製する新しい方法として膜タンパク質の膜間移行を検討し、この方法が有効であると結論した。調製したビロソームは高い免疫活性を示した。とくにMDP誘導体を組み込んだときその効果は大であった。

研究成果の概要（英文）：

Influenza is one of the common infectious diseases caused by influenza virus. Vaccines are the most effective means to fight infectious diseases. Liposomes are known to be effective immunoadjuvants. In this article, we introduced a new method to prepare the liposome vaccine, "influenza virosomes", using inter-membrane protein transfer. We concluded that this method is useful to prepare virosomes. The virosomes showed high immunoactivity especially with MDP derivatives.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：薬品物理化学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：製剤学

## 1. 研究開始当初の背景

インフルエンザは、毎冬、短期に集中して100万人単位で罹患する。最近問題になっている高病原性H5N1型鳥インフルエンザが変異して人から人への感染する可能性が指摘されている。ウイルス感染症の最も有効

な治療（予防）法はワクチンである。抗体産生能は生ワクチンが最も優れているが、体力の低下している人には、ある確立で病原ウイルスへの回帰の危険性があり、また不活化ワクチンでは一匹たりとも生きたウイルスを残さないことが要求されるがその保証は

ない。一方成分ワクチンはそのような危険性はないが、成分を精製すればするほど、抗体産生能が低下するというジレンマがあり、またCTLを誘導できないという欠点をもつ。これらを解決するために人工膜ワクチンの検討を開始した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、新しい型のワクチンとして人工膜ワクチンの開発を試みる。調製の方法として膜蛋白質の膜間移行を利用してインフルエンザピロソームを構築する。ピロソームを人工膜ワクチンとしてマウスに接種し、抗体産生能を追跡して、ワクチンとしての有効性を検討する。

## 3. 研究の方法

1) サル腎由来CV-1細胞にインフルエンザウイルスを感染させ、ウイルス抗原蛋白質(HA, NA)を膜表面に突出させる。2) CV-1細胞にリポソームを加え、HA, NA蛋白質を移行させてピロソーム(人工膜ワクチン)を構築する。3) 人工膜上に導入された抗原蛋白質を免疫沈降法により確認し、存在状態を蛍光2次抗体法および電子顕微鏡により追跡する。4) 人工膜ワクチンをマウス腹腔内に投与し、ELISA法および中和活性試験を行い免疫能を評価する。5) 人工膜ワクチンを皮下および鼻粘膜接種し、投与経路の効果を検討する。6) アジュバントとしてMDP誘導体の効果を調べる。

## 4. 研究成果

インフルエンザ感染CV-1細胞とリポソームを一定時間インキュベートした後リポソームを分離し、免疫沈降の後SDSPA G Eを行ったところ、インフルエンザ抗原蛋白質、NA, HA1, HA2のバンドが観察された(Fig. 1)。これより、リポソームにインフルエンザ抗原蛋白質が移行していることを推定した。

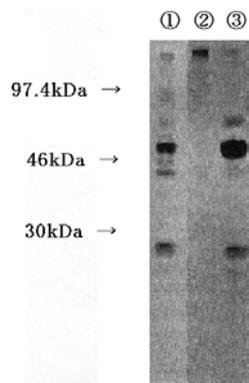


Fig. 1 Detection of influenza virus glycoproteins by SDS PAGE after immunoprecipitation.

Lane 1: influenza virus- infected CV-1 cells

Lane 2: liposomes incubated with CV-1 cells

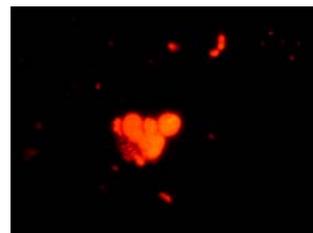
Lane 3: liposomes incubated with influenza virus-infected CV-1 cells

Fig.1の結果が細胞の脱落ベシクルではないことを確認するためにさらに以下の実験を行った。

脱落ベシクルとリポソームを区別するために、デキストランRITCをリポソームに封入した。RITC封入リポソームとCV-1細胞をインキュベートした後、リポソームをインフルエンザウイルス抗体で処理し、さらにFITCラベル2次抗体で処理したところ、Fig. 2で示すようにRITCの蛍光とFITCの蛍光が一致した。このことから、リポソームにインフルエンザ抗原蛋白質の移行していることが確認された(CV-1細胞の脱落ベシクルではなくリポソームである)。



Visible light



RITC



FITC

Fig. 2 Visible and fluorescent images of REV liposomes incubated with influenza virus-infected

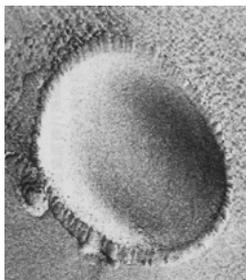
CV-1 cells.

Visible: visible image

RITC: fluorescent image of RITC-labeled dextran encapsulated in the liposomes

FITC: fluorescent image of FITC-labeled antibody (2<sup>nd</sup> antibody)

ビロソームのフリーズフラクチャー電子顕微鏡像を Fig. 3 に示す。リポソーム表面にインフルエンザウイルスと類似のスパイクが観察された。膜蛋白質の膜間移行を利用してインフルエンザビロソームを構築することに成功した。



A) virosome



B) influenza virus

Fig. 3 A) Freeze-fracture electron micrograph of liposome (virosome) incubated with infected cells

B) negative staining electron micrograph of influenza virus

次にビロソームを人工膜ワクチンとして BALB/c マウスに接種し、抗体産生能を追跡した。Fig. 4 で示すように、接種1週間後では抗体産生は低かったが、2週間後では死活化

ウイルスと同程度の力値を示した。特に2週間後に追加接種したブースター効果は大であった。

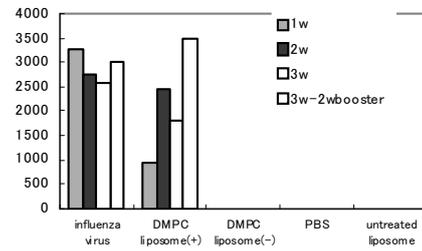


Fig. 4 Neutralizing antibody titers in sera of mice intraperitoneally administered with inactivated Viruses or virosomes

liposome(+): liposomes incubated with infected cells;

liposome(-): liposomes incubated with non-infected cells

untreated liposome: liposomes not incubated with cells.

別に、アジュバントとして2本鎖をもつMDP誘導体をリポソームに組み込み、投与すると、Fig. 5 で示すように、用量依存的なアジュバント効果が認められた。

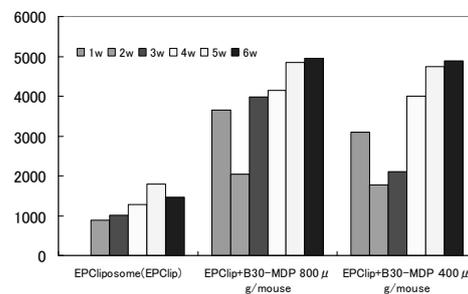


Fig. 5 Effect of B-30 MDP on the production of virus-specific antibody

EPC liposomes: Egg phosphatidylcholine liposomes without B30-MDP

incubated with virus-infected CV-1 cells

EPC+B-30MDP: EPC liposomes containing B30-MDP

次に人工膜ワクチンの投与経路の検討を行った。鼻腔内投与および皮下投与で比較を行った。結果を Fig. 6 に示す。投与1週間後では鼻腔投与にのみ抗体産生能を認めた。4週間後では皮下投与で鼻腔投与以上の高い抗体産生能を認めた。

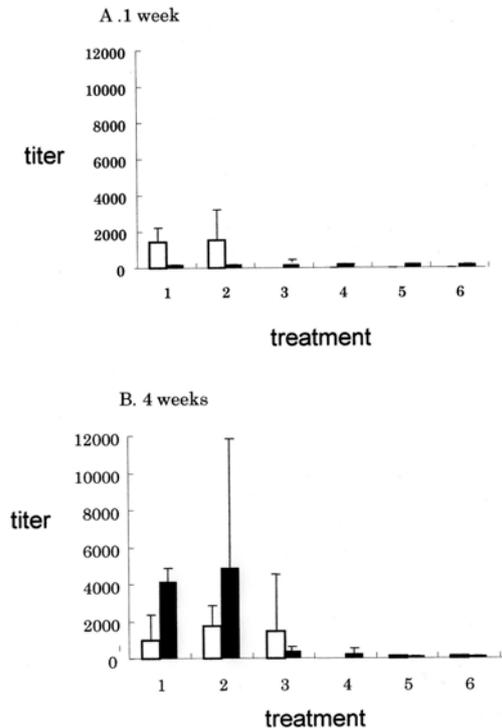


Fig. 6 Neutralizing antibody titers in sera 1 or 4 weeks after intranasal (□) and subcutaneous (■)

administration

1. liposomes incubated with influenza virus-infected CV-1 cells (virosomes)
2. virosomes + B-30 MDP as an adjuvant
3. inactivated virus
4. liposomes incubated with uninfected CV-1 cell
5. liposomes
6. PBS

以上より以下のことが結論できる。膜蛋白質の膜間移行はビロソームを調製する有効な方法である。ビロソームは高い免疫活性を持つ。特にNDP誘導体とともに用いたときまたはブースター処理により大きく効果が増強される。また、ビロソームを鼻腔より投与したとき早期に高い抗体産生を認めた。また、リポソーム組成としてオレイン酸を用いた場合も、ラフト形成脂質を用いた場合も抗原蛋白質の移行効率に有意な差はなかった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

[学会発表] (計 5 件)

(1) 白石智子、木平孝高、林 京子、奥野貴士、上野雅晴、：膜蛋白質の膜間移行を利用したインフルエンザ人工膜ワクチンの試作、日本薬学会代 129 年会、2009、3、26-28 (京都)

(2) 萩原由希子、白石智子、林 京子、奥野貴士、上野雅晴：インフルエンザビロソームの構築、日本膜学会代 31 年会、2009、5、21-22 (東京)

(3) 吉田湖南、桜田剛浩、茶木弘一、S. Chungcharoenwattana、奥野貴士、上野雅晴：オレイン酸のベシクル形成、日本薬学会第 130 年会、2010、3、28-30 (岡山)

(4) Masaharu Ueno, Takashi Okuno, Kyoko Hayashi, Preparation of Influenza Virosomes using Inter-Membrane Protein Transfer, International Liposome Research Days & Lipid, Liposomes & Membrane Biophysics, Vancouver, August 4-8 (2010)

(5) Masaharu Ueno, S. Chngcharoenwattana, Takashi Okuno, Konan Yoshida: Vesicle Formation of Fatty Acid in the Presence of Preformed Phospholipid Vesicles, PACIFICHEM 2010, December 15-20 (Honolulu)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 雅晴 (UENO MASAHARU )

研究者番号：40080197

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：