

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08511

研究課題名(和文)2種類の粘膜アジュバントを併用した新規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 a novel intranasal influenza vaccine by combination of two mucosal adjuvants

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)：粘膜アジュバント作用が明らかになっているポリミキシンB(PMB)、クロシン、ショ糖脂肪酸エステル(SucC12)のうち2つの化合物を併用してアジュバント作用を検討した。各アジュバントの作用発現にはアジュバント-抗原複合体の直径が関与するため、併用時の物理化学的性質(直径とゼータ電位)とアジュバント作用の関係を明らかにすることを目的とした。PMBとクロシンの種々の配合比により物理化学的性質は異なった。マウスに経鼻免疫したところ、アジュバント作用の相加効果が認められた。PMBとSucC12の併用でも同様の結果だった。さらに、併用によるアジュバント作用に適した直径が存在することが示された。

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、毎年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や乳幼児合併症等がみられている。そのため、現行のインフルエンザHAワクチンの限界が指摘されている。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。本研究によりアジュバントの併用で形成される複合体の直径がアジュバント作用に関与する可能性が示された。本研究の学術的意義は、ワクチン開発においてワクチン抗原-アジュバント複合体の物理化学的性質の重要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)：Polymyxin B (PMB), crocin, and sucrose ester (SucC12) exhibit mucosal adjuvanticity. We have identified that the diameter of the adjuvant-antigen complex contributes to each adjuvanticity. In this study, we aimed to investigate the relationship between physicochemical properties (diameter and zeta potential) and adjuvanticity in combination with the two adjuvants. The physicochemical properties differed depending on the PMB-crocin or PMB-SucC12 combination ratios. An additive effect of adjuvanticity was observed in both combinations in mice immunized intranasally. Furthermore, we demonstrated a range of complex diameters suitable for adjuvanticity in the combination.

研究分野：免疫学

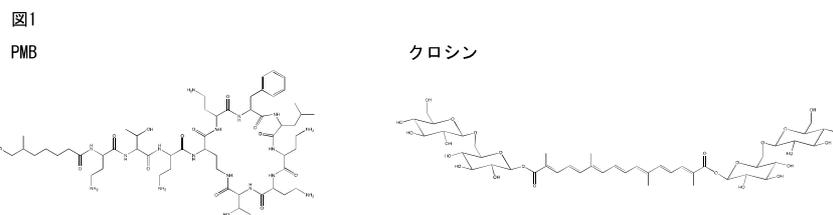
キーワード：アジュバント ワクチン 粘膜免疫 抗菌薬 食品添加物 ドラッグリポジショニング

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本ではインフルエンザワクチンの接種が行われているが、インフルエンザ推定患者数は国内で年間 100 万人超、死者は約 1,000 人報告されている。現行ワクチンの限界として「呼吸器に感染防御のための粘膜免疫を誘導できない」点が指摘されている。ワクチン抗原に対する粘膜免疫の誘導には粘膜アジュバントが必要であるが、臨床使用されているものはない。我々は一部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、これらのアジュバント作用の特徴は臨界ミセル濃度以上でアジュバント作用が発現すること、界面活性剤と抗原とが複合ミセルを形成し免疫誘導に適した物理化学的性質(粒子径およびゼータ電位)になることを証明している(文献 1, 2)。

アジュバント作用があることが明らかになった界面活性剤の中には、抗菌薬であるポリミキシム B(PMB)や食品添加物であるクロシンがある(文献 3, 4)(図 1;構造式)。しかし、これらのアジュバント単剤の使用では抗体価の有意な上昇は認められたが、インフルエンザウイルス感染に対する防御は十分ではなかった。近年、複数のアジュバントを併用することでアジュバント作用が増強されることが明らかになってきている。



本研究は現行ワクチンの限界を踏まえ、「併用アジュバント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る。

2. 研究の目的

本研究で使用する PMB は界面活性作用がある抗菌薬で、近年では多剤耐性菌感染症の治療薬として用いられている。クロシンはサフランやクチナシに含まれる糖型界面活性剤で、パエリアや栗きんとんなどに古くから用いられている黄色食品色素である。いずれの化合物もヒトに対し安全性が確認されている。アジュバント添加ワクチンは世界中で研究が行われているが、これらの研究は免疫学的知見に基づいたアジュバント探索が行われ、安全性の理由から臨床使用に到達できない事例が多くある。

本研究では安全でより強い感染防御効果を誘導するため、PMB とクロシンを併用したアジュバントを用いて新規経鼻インフルエンザワクチン開発のための物理化学的性質を基軸とした基礎的検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は PMB とクロシンとを併用してインフルエンザワクチンとともに経鼻免疫し、感染防御免疫の誘導を目的とした新規アジュバント添加経鼻インフルエンザワクチンの開発のための基礎研究である。

インフルエンザワクチンを用いた研究を行う前段階として、卵白アルブミン(OVA)を用いて物理化学的性質および経鼻免疫によるアジュバント作用の検討を行った。

(1) PMB とクロシン併用での物理化学的性質の解析

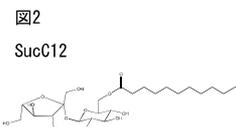
本研究で重要な点となるのは PMB とクロシンの配合比である。そこで、種々の配合比の PMB とクロシンを生理食塩水に溶解し OVA と混合した。具体的な配合比は、PMB またはクロシン単独でアジュバント作用が発現する最低量をそれぞれ 10:0、0:10(PMB:クロシン)とし、9:1、8:2、7:3、6:4、5:5、4:6、3:7、2:8、1:9 およびアジュバント不含(0:0)の 12 種類とした。各混合液中の粒子径とゼータ電位をゼータサイザーで測定した。

(2) PMB とクロシン併用での経鼻免疫および特異抗体価の測定

(1)のうち配合比が 0:0、10:0、7:3、5:5、3:7、0:10 の各混合液を BALB/c マウスに経鼻免疫した。スケジュールは 0、7、14 日目に 3 回経鼻免疫を行い、21 日目に粘膜分泌液(鼻腔洗浄液、気管-気管支洗浄液、唾液、糞便抽出液、腔洗浄液)および血漿を採取した。粘膜分泌液中の OVA 特異的 IgA 抗体価および血漿中の OVA 特異的 IgG 抗体価をエンドポイント ELISA で測定した。

(3) PMB と SucC12 併用での物理化学的性質の解析

PMB とクロシンの併用による相乗的アジュバント作用が見られなかったため、当初予定通りクロシンをショ糖脂肪酸エステル(SucC12)に変更した(図2;構造式)。種々の配合比の PMB と SucC12 を生理食塩水に溶解し OVA と混合した。具体的な配合比は、PMB またはクロシン単独でアジュバント作用が発現する最低量をそれぞれ 10:0、0:10(PMB:SucC12)とし、9:1、8:2、7:3、6:4、5:5、4:6、3:7、2:8、1:9 およびアジュバント不含(0:0)の 12 種類とした。各混合液中の粒子径とゼータ-電位をゼータサイザーで測定した。SucC12 は食品添加物であり、粘膜アジュバント作用があることはすでに明らかにしている。また、その作用は免疫に用いる溶液中のアジュバント-抗原複合体の直径が関与する(文献2)。



(4) PMB と SucC12 併用での経鼻免疫および特異抗体価の測定

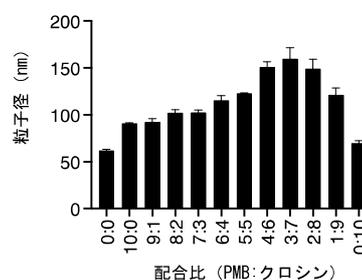
(3)のうち配合比が0:0、10:0、9:1、7:3、5:5、3:7、1:9、0:10の各混合液を BALB/c マウスに経鼻免疫した。スケジュールは0、7、14日目に3回経鼻免疫を行い、21日目に粘膜分泌液(鼻腔洗浄液、気管-気管支洗浄液、唾液、糞便抽出液、腔洗浄液)および血漿を採取した。粘膜分泌液中の OVA 特異的 IgA 抗体価および血漿中の OVA 特異的 IgG 抗体価をエンドポイント ELISA で測定した。

4. 研究成果

(1) PMB+クロシン+OVA 混合液中の粒子径の測定

OVA 単独(0:0)での粒子径は 62.2 nm であった。PMB 単独(10:0)またはクロシン単独(0:10)での粒子径はそれぞれ 91.0 nm、69.8 nm であった。PMB とクロシンを混合すると粒子径は 102.3~159.8 nm に増大した。最大値となった配合比は 3:7 であった(図3)。

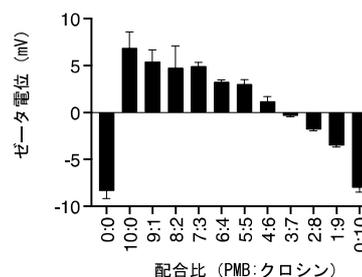
図3



(2) PMB+クロシン+OVA 混合液中のゼータ-電位の測定

OVA 単独(0:0)でのゼータ-電位は -8.4 mV であった。PMB 単独(10:0)またはクロシン単独(0:10)でのゼータ-電位はそれぞれ +6.9 mV、-8.0 mV であった。PMB とクロシンを混合するとゼータ-電位は -3.5~+5.4 に変化した。クロシンの配合比依存的にゼータ-電位は低下した(図4)。

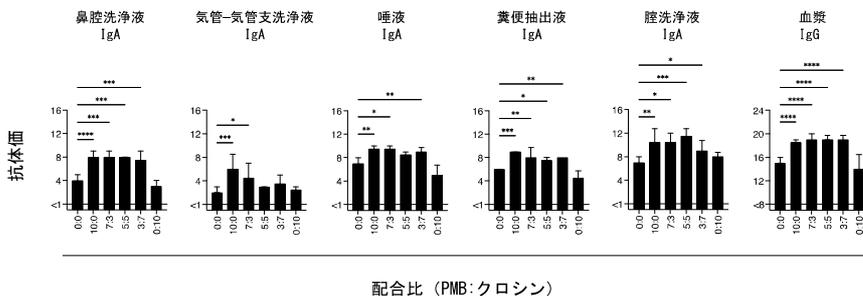
図4



(3) PMB とクロシン併用での OVA 特異的抗体価の測定

PMB 単独(10:0)では全ての粘膜分泌液および血漿での OVA 特異的抗体価が OVA 単独(0:0)よりも有意に上昇していた。クロシン単独(0:10)は C57BL/6 マウスではアジュバント作用があったが、今回用いた BALB/c マウスではアジュバント作用は見られなかった。PMB とクロシンの混合により相乗的なアジュバント作用の増強はいずれの配合比でも認められなかった(図5)。

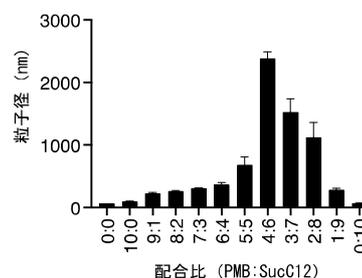
図5



(4) PMB+SucC12+OVA 混合液中の粒子径の測定

SucC12 単独(0:10)での粒子径は 70.6 nm であった。PMB と SucC12 を混合すると粒子径は 231.5~2,387 nm に増大した。最大値となった配合比は 4:6 であった(図6)。クロシンと比較すると併用により形成される粒子の直径は大きかった。

図6



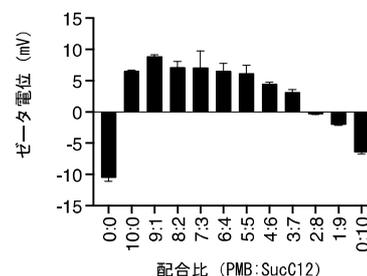
(5) PMB+ SucC12+OVA 混合液中のゼータ-電位の測定

SucC12 単独(0:10)でのゼータ-電位は -6.5 mV であった。PMB と SucC12 を混合するとゼータ-電位は -2.1~+8.9 に変

化した。クロシンと同様に SucC12 の配合比依存的にゼータ電位は低下した (図7)。

(6) PMB と SucC12 併用での OVA 特異的抗体価の測定

PMB 単独(10:0)および SucC12 単独(10:0)では粘膜分泌液および血漿での OVA 特異的抗体価が OVA 単独(0:0)よりも有意に上昇していた。PMB とクロシンの混合により相乗的なアジュバント作用の増強はいずれの配合比でも認められなかった。配合比が 3:7 の混合液では鼻腔洗浄液、気管-気管支洗浄液、唾液、糞便抽出液での OVA 特異的 IgA 抗体価は OVA 単独(0:0)と比較して有意差はなかった (図8)。



(7) 粒子径と OVA 特異的抗体価の関係

PMB+クロシン+OVA 混合液および PMB+SucC12+OVA 混合液中の粒子径とそれぞれを経鼻免疫した時の鼻腔洗浄液中の OVA 特異的 IgA 抗体価との相関を解析した (図9)。相関関係はなかった ($r^2 = 0.03132$) が、91.03~684.0 nm で抗体価が高く、アジュバント作用を高める粒子の至適直径があると考えられた。

図8

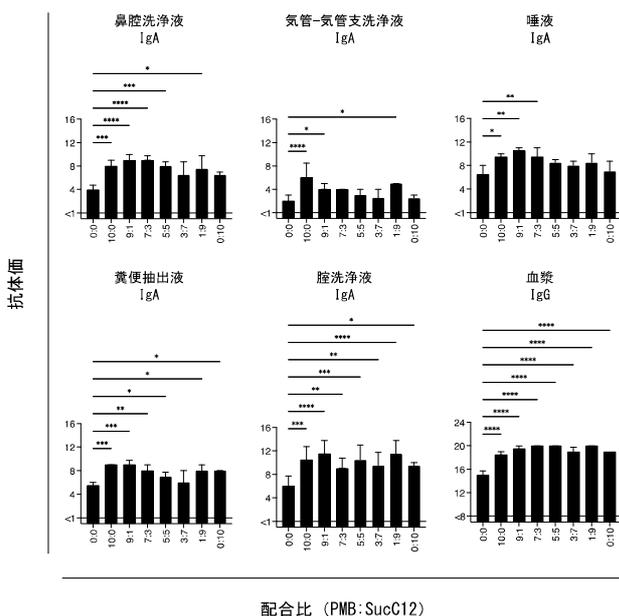
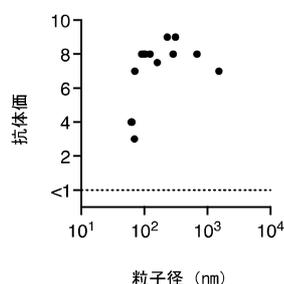


図9



(8) まとめ

PMB とクロシン、PMB と SucC12 のいずれの併用でもアジュバントの相乗作用は認められなかった。しかし、本研究によりアジュバントの併用で形成される粒子の直径がアジュバント作用に關与する可能性が示された。今後、インフルエンザワクチンを用いて同様の実験を行い、ワクチン開発においてワクチン抗原-アジュバント複合体の物理化学的性質の重要性を検討していく。

< 引用文献 >

1. 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.
2. Kawamura H, Yoshino N, Murakami K, Kawamura H, Sugiyama I, Sasaki Y, Odagiri T, Sadzuka Y, Muraki Y. The relationship between the chemical structure, physicochemical properties, and mucosal adjuvanticity of sugar-based surfactants. *Eur J Pharm Biopharm.* 2023 Jan;182:1-11.
3. Yoshino N, Endo M, Kanno H, Matsukawa N, Tsutsumi R, Takeshita R, Sato S. Polymyxins as novel and safe mucosal adjuvants to induce humoral immune responses in mice. *PLoS One.* 2013 Apr 11;8(4):e61643.
4. Yoshino N, Yokoyama T, Sakai H, Sugiyama I, Odagiri T, Kimura M, Hojo W, Saino T, Muraki Y. Suitability of polymyxin B as a mucosal adjuvant for intranasal influenza and COVID-19 vaccines. *Vaccines (Basel).* 2023 Nov 18;11(11):1727.

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 3件）

1. 著者名 Yoshino Naoto, Kawamura Hanae, Sugiyama Ikumi, Sasaki Yutaka, Odagiri Takashi, Sadzuka Yasuyuki, Muraki Yasushi	4. 巻 165
2. 論文標題 A systematic assessment of the relationship between synthetic surfactants and mucosal adjuvanticity	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 -
1. 著者名 Sasaki Yutaka, Yoshino Naoto, Okuwa Takako, Odagiri Takashi, Satoh Takashi, Muraki Yasushi	4. 巻 11
2. 論文標題 A mouse monoclonal antibody against influenza C virus attenuates acetaminophen-induced liver injury in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11816
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-91251-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kawamura Hanae, Yoshino Naoto, Murakami Kazuyuki, Kawamura Hideki, Sugiyama Ikumi, Sasaki Yutaka, Odagiri Takashi, Sadzuka Yasuyuki, Muraki Yasushi	4. 巻 182
2. 論文標題 The relationship between the chemical structure, physicochemical properties, and mucosal adjuvanticity of sugar-based surfactants	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics	6. 最初と最後の頁 1 ~ 11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejpb.2022.11.023	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 Kagabu Masahiro, Yoshino Naoto, Murakami Kazuyuki, Kawamura Hideki, Sasaki Yutaka, Muraki Yasushi, Baba Tsukasa	4. 巻 24
2. 論文標題 Treatment of HPV-Related Uterine Cervical Cancer with a Third-Generation Oncolytic Herpes Simplex Virus in Combination with an Immune Checkpoint Inhibitor	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1988 ~ 1988
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms24031988	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yoshino Naoto, Yokoyama Takuya, Sakai Hironori, Sugiyama Ikumi, Odagiri Takashi, Kimura Masahiro, Hojo Wataru, Saino Tomoyuki, Muraki Yasushi	4. 巻 11
2. 論文標題 Suitability of Polymyxin B as a Mucosal Adjuvant for Intranasal Influenza and COVID-19 Vaccines	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Vaccines	6. 最初と最後の頁 1727 ~ 1727
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/vaccines11111727	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計16件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小田切崇、吉野直人、木村将大、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ポリミキシンBの粘膜アジュバント作用
3. 学会等名 第35回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木村将大、小田切崇、吉野直人、村木靖
2. 発表標題 C型インフルエンザウイルスのスプライシング効率変異体の作製と解析
3. 学会等名 東北乳酸菌研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小田切崇、吉野直人、木村将大、村木靖
2. 発表標題 PMBの粘膜アジュバント作用：全粒子不活化インフルエンザウイルスを用いた検討
3. 学会等名 第74回日本細菌学会東北支部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木村将大、小田切崇、吉野直人、村木靖
2. 発表標題 C型インフルエンザウイルスM遺伝子のスプライシング効率の解析
3. 学会等名 第74回日本細菌学会東北支部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshino N, Odagiri T, Kimura M, Muraki Y.
2. 発表標題 Different mucosal adjuvanticity of polymyxin B for influenza virus and SARS-CoV-2
3. 学会等名 第51回日本免疫学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木村将大、石川静麻、小田切崇、吉野直人、村木靖
2. 発表標題 C型インフルエンザウイルスM遺伝子のスプライシング効率が増殖に与える影響
3. 学会等名 第143回日本薬学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉野直人、酒井博則、北條涉、杉山育美、小田切崇、木村将大、佐塚泰之、岩淵拓也、村木靖
2. 発表標題 病原体タンパクに対するポリミキシンBの粘膜アジュバント作用
3. 学会等名 第34回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木裕、吉野直人、大桑孝子、小田切崇、佐藤孝、村木靖
2. 発表標題 C型インフルエンザウイルスに対する単クローン抗体S16はマウスにおいて薬剤誘導性肝障害を緩和する
3. 学会等名 第34回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉野直人、小田切崇、木村将大、村木靖
2. 発表標題 ウイルスタンパクに対するポリミキシンBの粘膜アジュバント作用
3. 学会等名 東北乳酸菌研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshino N, Odagiri T, Muraki Y.
2. 発表標題 Structure-activity relationship between mucosal adjuvanticity and surfactants -second report-
3. 学会等名 第50回日本免疫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小田切崇、石川静麻、吉野直人、村木靖
2. 発表標題 B型インフルエンザウイルス特異的免疫逃避機構解明にむけた抗HA単クローン抗体の作製
3. 学会等名 東北乳酸菌研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉野直人、横山拓矢、酒井博則、杉山育美、小田切崇、木村将大、北條渉、齋野朝幸、村木靖
2. 発表標題 ウイルスタンパクに対するポリミキシンBの粘膜アジュバント作用の検討
3. 学会等名 第75回日本細菌学会東北支部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yoshino N, Yokoyama T, Sakai H, Sugiyama I, Odagiri T, Kimura M, Hojo W, Saino T, Muraki Y.
2. 発表標題 Development of influenza and COVID-19 intranasal vaccines containing polymyxin B as a mucosal adjuvant
3. 学会等名 第70回日本ウイルス学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉野直人、横山拓矢、酒井博則、杉山育美、小田切崇、木村将大、北條渉、齋野朝幸、村木靖
2. 発表標題 ポリミキシンBの粘膜アジュバント作用：インフルエンザおよびCOVID-19経鼻ワクチン開発における可能性
3. 学会等名 第27回日本ワクチン学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石川静麻、小田切崇、吉野直人、村木靖
2. 発表標題 B型インフルエンザウイルスヘマグルチニンに対するIgMの取得と機能評価
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yoshino N, Odagiri T, Muraki Y.
2. 発表標題 Elucidation of chemical structures and physicochemical properties related to mucosal adjuvanticity of sugar-based surfactants -second report-
3. 学会等名 第52回日本免疫学会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

岩手医科大学 医学部 微生物学講座 感染症学・免疫学分野 http://www.iwate-med-micro.org/index.html

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
研究協力者	小田切 崇 (Odagiri Takashi)		
研究協力者	菅野 祐幸 (Kanno Hiroyuki)		
研究協力者	杉山 育美 (Sugiyama Ikumi)		

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
---------	---------