

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月1日現在

機関番号： 15501
 研究種目： 若手研究(B)
 研究期間： 2011～2012
 課題番号： 23760754
 研究課題名（和文） 膜透過性ナノ集合体を利用した次世代型経粘膜ワクチンの開発
 研究課題名（英文） Development of mucosal vaccine using membrane permeation nanoparticles
 研究代表者
 通阪 栄一 (TOORISAKA EIICHI)
 山口大学・大学院理工学研究科・准教授
 研究者番号： 40363543

研究成果の概要（和文）：本研究では、粘膜面に存在する免疫組織への抗原キャリアとして S/O/W エマルジョンを使用した。S/O/W エマルジョンを腹腔内に投与したところ血中に抗体が産生されたことからこのエマルジョンが、免疫誘導能力を有していることが確認された。しかし、鼻腔粘膜に投与しても免疫誘導が発現しなかった。そこで、エマルジョン表面に粘膜付着性高分子をコーティングしたところ、鼻腔投与で免疫誘導が可能となった。この結果から、エマルジョンに免疫組織へのターゲティング機能を付与することが、効率的な免疫誘導に重要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, S/O/W emulsion was used as a vaccine carrier to induce immunity at the mucosal surface. When the S/O/W was administered into the abdominal cavity, the IgG level in blood increased gradually. This result indicates that the S/O/W emulsion has the potential to be useful for antigen delivery into the mucosal immune system. However, when the formulation was administered into the nasal cavity, the specific IgG level in the blood was not led. To overcome that problem, we assessed a modification of the emulsion droplets by using a mucoadhesive polymer. As a result, the induction of immunity was confirmed. It was expected that the modification of mucoadhesive polymers on an oil droplet surface could improve the uptake of antigens to the immune system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目： プロセス工学、生物機能・バイオプロセス

キーワード： 粘膜ワクチン、エマルジョン、界面活性剤、ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

経済・社会のグローバル化に伴い感染症の流行の拡大が懸念され、新興・再興感染症から人類を防御するワクチンの開

発は必要不可欠となっている。一般的にワクチン投与は注射によって行われているが、患者の苦痛を回避し、簡便に投与できる「飲む・吸うワクチン」の開発が

望まれている。

通常、注射投与されたワクチンは全身系免疫を誘導し、抗原特異的抗体の産生で体内に侵入した病原体の増殖を抑え病気の重篤化を防ぐ。一方、経口・経鼻投与されると、粘膜面での免疫誘導を発現し粘膜表面への抗体分泌により病原体の侵入を防ぐだけでなく、同時に全身系免疫も誘導できることから、二段構えの防御が可能となる。また、粘膜免疫は、投与部位以外の粘膜面においても免疫誘導が発現する。病原体の大部分が粘膜を介して体内へ侵入することから、粘膜ワクチンは、感染症に対し絶大な効果を示すと期待される。しかし、未だ効果的な粘膜ワクチンは開発されていない。

粘膜ワクチンのターゲットとなるのは、小腸粘膜や鼻粘膜に存在する粘膜関連リンパ組織 (MALT) である。MALT 表面に存在する M 細胞から抗原は取り込まれ、その下部の樹状細胞に達することで免疫応答が誘導される。そのため、効率よくこの経路を輸送することが重要であるが、現在開発されているワクチン抗原は DNA やタンパク質などの生体高分子であるため、そのまま投与しても体内で代謝されやすい、M 細胞への集積性が低い、または樹状細胞への導入効率が低いといった問題で、免疫誘導はほとんど発現しない。

そこで、抗原の安定性を維持したまま、樹状細胞までデリバリーする技術が必要となる。そのために、申請者が開発した脂溶性ナノ集合体に M 細胞集積性を組み込むことが効果的だと考えた。なぜならば、界面活性剤でタンパク質をコーティングすることで形成される脂溶性ナノ集合体は、細胞膜との親和性が高く、タンパク質の細胞への導入を促進することが判明しているからである。さらに最近、Solid-in-Oil-in-Water (S/O/W) エマルション (脂溶性ナノ集合体を分散させた油を乳化したもの) を樹状細胞表面に散布すると、タンパク質が細胞中に取り込まれ、細胞全体に分布していることを確認した。

2. 研究の目的

そこで本研究では、樹状細胞への生体高分子 (抗原) の導入を向上させる脂溶性ナノ集合体を主たる免疫誘導ツールとして利用した。そして、その効果を最大限に発揮させるために脂溶性ナノ集合体を粘膜関連リンパ組織内の樹状細胞まで輸送する微粒子キャリアを開発し、高効率な粘膜

免疫誘導を可能とする抗原デリバリーシステムの構築を目指した。

本研究期間内に、導入効率を最大限に引き上げる S/O/W エマルションの調製を目指した。また同時に、粘膜面の免疫組織へ効率的に抗原をデリバリーできる機能をエマルション表面に修飾することを試みた。

3. 研究の方法

(1) S/O/W エマルションの調製

モデル抗原である BSA の水溶液 (10 mL) と界面活性剤を含むヘキササン溶液 (20 mL) をホモジナイザーで高速攪拌 (24000 rpm, 2 min) 後、一晚凍結乾燥し、界面活性剤-薬物複合体を得た。複合体に大豆油 (10 mL) を添加後、卓上型超音波洗浄器を用いて分散させることで、S/O サスペンションを調製した。続いて、調製した S/O サスペンション (5 mL) と 1 wt% 水溶性界面活性剤を含む水溶液 (10 mL) をホモジナイザー (13500 rpm, 1 min) で高速攪拌し、S/O/W エマルションを調製した。その後、シラス多孔質ガラス (SPG) 膜を用いての膜乳化を行うことで、エマルション油滴の粒子径制御を試みた。

(2) エマルション表面への粘膜付着性高分子のコーティング

キトサン溶液 (10 mL) を攪拌しながら、S/O/W エマルション溶液 (5 mL) を滴下 (1 mL/min) した。滴下後、そのまま 10 分間攪拌した。その後、アルギン酸溶液とキトサン溶液に交互に浸した。

(3) 動物実験による免疫誘導能の評価

Sea:ddY マウスの鼻腔と腹腔に各製剤を投与した。投与後、1 週間後、2 週間後に採血を行い、BSA 投与 1 により免疫誘導され生産された血中 IgG 抗体を ELISA 法で測定した。

4. 研究成果

(1) S/O/W エマルションによる免疫誘導

BSA を封入した S/O/W エマルションの免疫誘導効果を検討するために、腹腔と鼻腔に投与し、全身系免疫の誘導で生産された IgG 抗体を検出した。比較として、BSA 水溶液、不完全フロイントアジュバント (BSA を封入した W/O エマルション) を使用した。図 1(a), (b) は腹腔と鼻腔に製剤を投与後に生産されたそれぞれの血中 IgG 相対濃度を示している。腹腔へ BSA 水溶液を投与した場合、IgG 抗体濃度の変化はほとんどなかった。ところが、S/O/W エマルションとフロイントアジュバントを投与した場合、徐々に IgG 抗体濃度が増

加した。また、その増加速度から2つの製剤がほぼ同等の効果であることが確認された。このことから、S/O/W エマルションは免疫誘導を促進するフロイントアジュバントに匹敵する効果があることが確認された。さらに、S/O/W エマルション中の抗原量を増加させると、抗体生産を促進できることも確認された。一方で、鼻腔に投与した場合、フロイントアジュバントを使用した製剤以外では、免疫誘導の効果は確認できなかった。フロイントアジュバントは流動パラフォンで形成されているため粘着性を有しており、そのため鼻腔粘膜へ付着する。その結果、粘膜下部に存在する抗原提示細胞へ抗原が効率的に輸送され、免疫誘導が生じたと考えられた。これらの結果から、鼻腔粘膜で免疫誘導を引き起こすためには、製剤を粘膜面に留まらせる必要があると推察される。つまり、鼻腔粘膜にS/O/W エマルションを付着させることができれば、免疫誘導を発現できるのではないかと考えた。

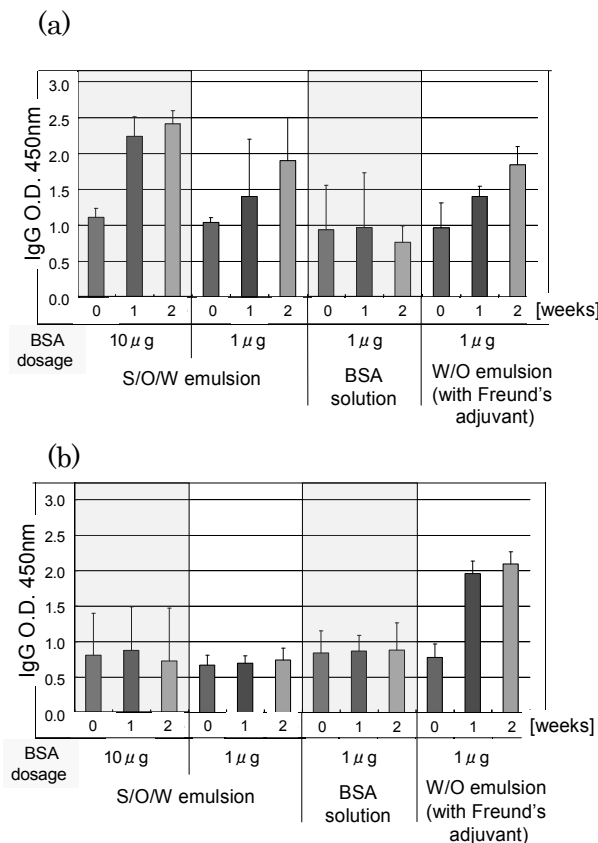


図1 エマルション投与後の血中IgG抗体濃度 (a)腹腔内投与, (b)鼻腔内投与

(2) 粘膜付着性製剤の最適化

S/O/W エマルションへ粘膜付着性を加えることができれば粘膜免疫の誘導を促進できることが予想されたことから、エマルション表面への粘膜付着性高分子の修飾を試みた。エマルション調製時の水溶性界面活性剤として、コール酸ナトリウムとTween20を用いて、それぞれの混合比を変え、粒子特性への影響を検討した(図2)。Tween20のみを用いたエマルションの場合、電解質高分子溶液中で、粒子径はほとんど変わらなかった。しかし、コール酸ナトリウムの割合を増やした場合、電解質高分子溶液中で粒子径は大きくなった。ノニオン性のTween20のみのエマルションは、電解質高分子との相互作用がないため表面にコーティングされないことが考えられた。また、アニオン性のコール酸ナトリウムが、エマルションの表面に配向することで、カチオン性のキトサンと相互作用するため、コール酸ナトリウムの割合が大きいほど、エマルション同士の凝集が生じ、その結果エマルションが融合したと考えられる。結果として、0.1wt% コール酸ナトリウムと0.9wt% Tween20の水溶液を用いた場合に、キトサンとの適度な相互作用のため、エマルションの安定性が維持できることが分かった。実際に、電解質高分子がコーティングされているか調べるため、エマルションのゼータ電位を測定した(図3)。カチオン性のキトサンとアニオン性のアルギン酸ナトリウムの水溶液にエマルションを交互に浸すことにより、ゼータ電位が大きく変化していることから、エマルション表面にそれぞれの高分子がコーティングされていることが分かる。

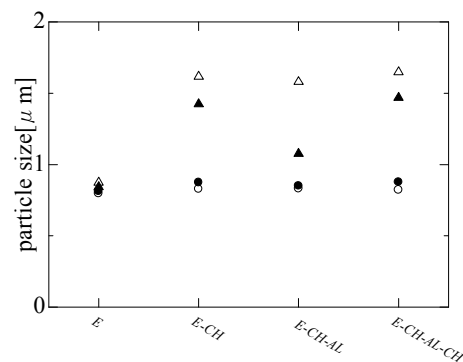


図2 電解質高分子コーティング後のエマルション粒子径

E:エマルション, CH:キトサンコーティング, AL:アルギン酸コーティング

(○)1wt% Tween20, (●)0.1wt% コール酸 Na + 0.9wt% Tween20, (△)0.25wt% コール酸 Na + 0.75wt% Tween20, (▲)0.5wt% コール酸 Na + 0.5wt% Tween20

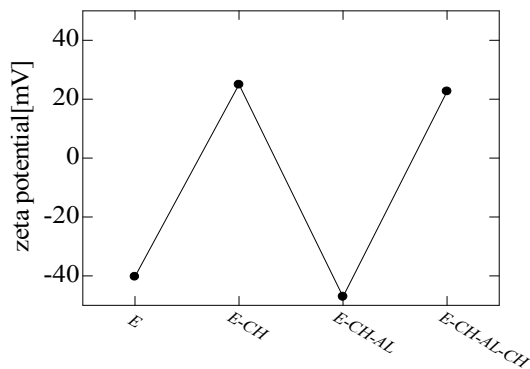


図3 調製した粒子のゼータ電位
E:エマルジョン, CH:キトサンコーティング,
AL:アルギン酸コーティング
(界面活性剤: 0.1wt% コール酸 Na + 0.9wt% Tween20)

(3) 粘膜炎着性エマルジョン製剤による免疫誘導

前述の方法により調製した粘膜炎着性 S/O/W エマルジョンを用いて免疫誘導を評価した。表面修飾を行っていないエマルジョンを鼻腔に投与しても抗体の産生がほとんど発現しないのに対し、粘膜炎着性エマルジョンを使用した場合は、徐々に抗体産生量が増加することが確認された。この結果から、粘膜炎着性エマルジョンキャリアが付着することで、その下部にある免疫組織への抗原デリバリーが促進することが判明した。今後、抗原導入口である M 細胞へのターゲティング機能をエマルジョンに導入することで、より効率的なワクチンデリバリーが実現できると考える。

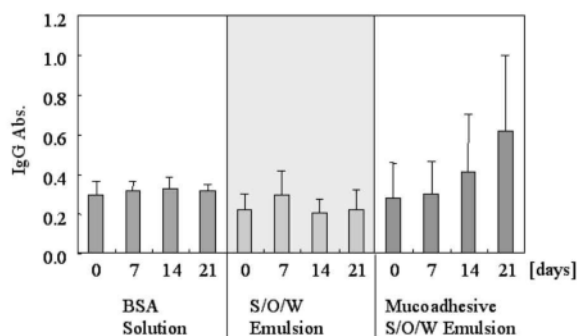


図4 粘膜炎着性エマルジョンを鼻腔投与後の血中 IgG 抗体濃度

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)

(1) Eiichi Toorisaka, Kikumi Watanabe, Hiroshige Ono, Makoto Hirata, Norihiro Kamiya, Masahiro Goto, Intestinal patches with an immobilized solid-in-oil formulation for oral protein delivery, Acta Biomaterialia, 8, 2012, 653-658
DOI: 10.1016/j.actbio.2011.09.023 査読有

[学会発表] (計 5 件)

①古賀悠歩, 通阪栄一, 平田 誠, 有機-無機複合粒子による放出制御型製剤の開発, 第 27 回日本 DDS 学会, 2011 年 6 月 9 日, 東京大学 (文京区)

②木村味加, 通阪栄一, 平田 誠, 松本 昂, 西園 晃, 神谷典穂, 後藤雅宏, 抗原デリバリーのための粘膜炎着性微粒子の開発, 第 27 回日本 DDS 学会, 2011 年 6 月 9 日, 東京大学 (文京区)

③前田 歩, 通阪栄一, 平田 誠, 神谷典穂, 後藤雅宏, 膜結合性集合体による動物細胞へのタンパク質導入, 第 27 回日本 DDS 学会, 2011 年 6 月 9 日, 東京大学 (文京区)

④通阪栄一, エマルジョン油水界面を利用した機能性微粒子の開発, 環境資源工学会 129 回例会, 2012 年 11 月 15 日, 山口大学 (山口市)

⑤野中友美, 通阪栄一, 油水界面での細胞培養とタンパク質導入の検討, 化学工学会中四国支部大会, 2012 年 12 月 7 日, サポートホール高松 (高松市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

通阪 栄一 (TOORISAKA EIICHI)
山口大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号: 40363543

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: