

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670075

研究課題名(和文) 飲むワクチン開発のためのナノ動態制御技術開発へのチャレンジ

研究課題名(英文) Approach to develop a dynamics control technology of nanomaterial for oral nano-vaccine carrier

研究代表者

堤 康央 (Tsutsumi, Yasuo)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：50263306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、研究代表者独自の、ナノマテリアルの物性-動態の連関情報を基盤として、最も重要でありながら、国内外を問わず、殆ど手が付けられていない抗原・ナノマテリアルの動態解析を試み、他に類のない、実用化に耐える「本邦発のナノワクチンとも呼ぶべき『飲むワクチン』の確立」に向け、基礎情報の収集を試みた。将来的には、種々ナノマテリアルの物性-動態の連関情報を集積することで、抗原を安全かつ効果的に、口から免疫担当細胞へと送達でき、効果的かつ安全に粘膜免疫を誘導できるナノキャリアの粒子設計を目指す。

研究成果の概要(英文)：In this study, by the foundation of our own linkage information between physical properties of nanomaterials and the information of dynamics, we attempted to analyze the kinetics of antigen-nanoparticles that are not given a hand though it is most important thing for development of vaccine. From this study, we tried to collect the fundamental information toward the establishment of Japanese originated nano-vaccine. In the future, accumulation of linkage information of various nanomaterials with their dynamics might result in development of nano-carrier that can transport the antigen from the mouth to the immunocompetent cells, and that can induce mucosal immunity effectively and safety.

研究分野：ナノ安全科学、薬物動態学、薬物送達学

キーワード：経口ワクチン 新興再興感染症

## 1. 研究開始当初の背景

近年のエイズやウイルス性肝炎の地球規模での蔓延、新型インフルエンザのパンデミック、さらには、かつて人類を苦しめた狂犬病や結核などの再興といった問題からも明らかのように、新興・再興感染症は、まさに現代のヒトの健康維持における圧倒的脅威となっている。世界保健機関 (WHO) は現在、インフルエンザを初めとする 19 疾病を要警戒感染症として位置づけている。さらにマラリアやデング熱など、ネグレクトドディゼーズとも呼ばれる感染性風土病が、地球温暖化も相俟って、北上しており、日米欧における将来的脅威となりつつある。そのため、WHO は世界予防接種週間を設け、ワクチン接種を啓発している。しかし未だワクチンが無い病原体や、あったとしても有効性や安全性で決定的な問題を抱えたワクチンしかない病原体も数多く残されており、従前の「注射によるワクチン」や「リスクを伴う生ワクチン」では、もはや現状に対応でき得ない。従って医療薬学の視点から、これら問題を克服した「有効かつ安全なワクチン開発」が今後の最重要課題の一つとなっている。

## 2. 研究の目的

飲むワクチン (経口ワクチン) は、投与部位である消化管粘膜のみならず、鼻腔・膣など、遠隔の粘膜面でも抗原特異的な免疫応答を誘導でき、粘膜面での初発感染防御が可能となうえ、万が一に、感染性病原体が粘膜面を突破してしまった場合においても、全身レベルで抗原特異的な体液性免疫と細胞性免疫を誘導し得るため、最適なワクチンと考えられている。しかし、弱毒株の病原体そのものを用いた、危険と隣り合わせの経口ワクチン以外、実用化例は無いのが現状である。そこで本研究では、研究代表者独自の、ナノマテリアルの物性-動態の連関情報を基盤として、最も重要でありながら、国内外を問わず、殆ど手が付けられていない抗原・ナノマテリアルの動態解析を試み、他に類のない、次世代型の「飲むワクチン」の開発に向けた基礎情報の収集を試みた。

## 3. 研究の方法

### 実験動物

雌性 BALB/c マウスは日本 SLC より購入し

た。本研究における動物実験の飼育および実験は、大阪大学大学院薬学研究科、医薬基盤研究所において行い、各機関の動物実験規定に準じた。

### 細胞

Caco-2 細胞は理研バイオリソースセンターより購入した。細胞は 37℃、5%CO<sub>2</sub> の条件下で培養し、培地は FCS20%、抗生物質 1% を含む DMEM を用いた。

### ナノ粒子

銀ナノ粒子は、表面がクエン酸修飾された、粒子径 5、10、50、100 nm の nAg5C、nAg10C、nAg50C、nAg100C を使用した。また、表面修飾の違いによる腸管透過性の違いを評価する目的で、表面がリポ酸修飾された 10 nm の銀ナノ粒子、nAg10L を用いた。なお、銀粒子は銀イオンを徐放することが知られていることから、銀イオンの動態を評価する目的で硝酸銀水溶液を用いた。

### ナノ粒子の Caco-2 細胞における管腔側から基底膜側への透過性評価

Caco-2 細胞を約 21 日間セルカルチャーインサートで培養し、ヒト腸管様単層膜を形成させた。その後、5 µg/mL の銀ナノ粒子 (nAg5C、nAg10C、nAg50C、nAg100C、nAg10L)、銀イオンを管腔側 (apical 側) に添加した。添加 4、8、24 時間後の細胞内および基底膜側 (basolateral 側) の銀量を ICP-MS により測定した。また、細胞内からの排出量について評価する目的で、銀ナノ粒子、および銀イオンを添加した 4、8、24 時間後に銀溶液を取り除き、apical 側の細胞表面、および basolateral 側のウェルを洗浄した後、24 時間培養した。その後、apical 側、細胞内、basolateral 側の銀量を ICP-MS により測定した。

### 単回経口投与時の乳幼仔と成体マウスの吸収性の違いの検討

出産後 3 日の乳幼仔、もしくは 6 週齢の成体マウスに、nAg10 (2.5 mg/kg)、AgNO<sub>3</sub> (2.5 mg/kg Ag+) を経口投与した。投与 0.025、0.5、1、2、4、8 時間後に血液を回収し、ICP-MS により血中 Ag 濃度を測定した。

#### 4. 研究成果

##### 4.1. ナノ粒子の Caco-2 細胞における管腔側から基底膜側への透過性評価

これまでに研究代表者らは、ナノキャリアとしての可能性を独自に示してきた非晶質ナノシリカをリード素材として、非晶質ナノシリカを経口曝露した際の腸管吸収性を定量的に評価することで、その腸管吸収性には、表面性状が重要な要素であることを見出してきた。一方で、安全かつ有効な飲むワクチン（ナノ経口ワクチン）の創成に向けては、薬物動態学的視点などから、ナノキャリアによる抗原の pH 安定性や酵素抵抗性、腸管送達性、腸管吸収性、免疫担当細胞への送達性など、経口投与後の体内・細胞内動態を精査・ナノキャリアを最適デザインすること、さらにはナノキャリア自身のアジュバント活性の最適化が必要不可欠である。このような背景のもと本研究では、経口吸収性・免疫担当細胞送達性に優れた経口ワクチン用のナノキャリアを粒子設計するうえで重要な、種々ナノマテリアルの経口投与後の腸管吸収性、および排泄性について定量評価を試みた。

ヒト結腸癌由来細胞株である Caco-2 細胞は、ヒト腸管様単層膜を形成し、①細胞間でタイトジャンクションを形成し、腸管のバリア機能を *in vitro* で再現できる点、②細胞に極性が生まれ、管腔側・基底膜側を加味した方向性をもった実験を実施できる点で、物質の *in vitro* における腸管吸収機序の解析に有用である。そこで、ナノ粒子の腸管透過性について精査する目的で、非晶質ナノシリカ粒子と比較し、定量性に優れた銀ナノ粒子を対象に、腸管上皮細胞を用いた単層培養による *in vitro* 腸管モデルを用い、粒子径や表面性状の異なる銀ナノ粒子の細胞内への取り込み、および透過性を、腸管上皮細胞の極性を加味しつつ評価した。なお、本結果を受けて、非晶質ナノシリカ粒子を用いた検討については現在解析中である。

Caco-2 細胞を約 21 日間セルカルチャーインサートで培養し、ヒト腸管様単層膜を形成させた。この時、単層膜形成の指標である膜抵抗値（TEER）が飽和に達しており、タイトジャンクションが形成されたことにより、物質透過が制限されていることを確認し

ている。その後、5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の銀ナノ粒子、銀イオンを管腔側（apical 側）に添加した。なお、本添加濃度において、TEER は、いずれの銀を添加した群においても低下しないことを確認している。添加 4、8、24 時間後の細胞内、および基底膜側（basolateral 側）の銀量を ICP-MS によって測定した結果、いずれの銀ナノ粒子、銀イオンにおいても、細胞内（Figure 1A）、および basolateral 側（Figure 1B）の銀量の増加が時間依存的に認められた。また、粒子径が小さい銀ナノ粒子ほど、細胞内、および basolateral 側の銀量が高い傾向が認められた。従って、銀ナノ粒子の細胞内取り込み・腸管透過性は、粒子径により規定されることが示唆された。また、細胞内への取り込みが多い粒子は basolateral 側への排出も大きく、細胞内への取り込みが少ない粒子は basolateral 側への排出も少ないことが示された。nAg10C と nAg10L はほぼ同様の結果となったことから、今後、多様な修飾体を用いて検討する必要があるものの、培地中の蛋白質等との相互作用よりも粒子径の方が、細胞内取り込みや腸管透過性への寄与は大きい可能性が考えられた。さらに、銀ナノ粒子、銀イオンを添加後に 4°C で 4 時間培養した場合、いずれの群においても、細胞内・basolateral 側の銀量が、37°C で培養していた場合と比較して顕著に減少したことから、銀ナノ粒子や銀イオンは能動輸送によって細胞内に取り込まれ、透過していることが明らかとなった。

次に、細胞内に取り込まれた銀が、apical 側あるいは basolateral 側にどの程度排出されるかを評価した。その結果、いずれの群においても、細胞内（Figure 2B）、basolateral 側（Figure 2C）のみならず、apical 側（Figure 2A）でも銀が同定された。また、何れの粒子あるいは銀イオンも細胞内銀量、basolateral 側の銀量は時間依存的に増加した。apical 側の銀量に関して、銀ナノ粒子は時間依存的な増加あるいは増加傾向を示しているが、銀イオンについては、apical 側では、添加後 4、8、24 時間培養した場合に、ほとんど変動が認められなかった。従って、銀イオンは、細胞内銀量が増加しても apical 側に排出される銀量は変化しないと考えられ、粒子とイオンでは細胞内に取り込まれた後の排出効率が異なる可能性が示された。銀ナノ粒子は細

胞内でエンドソーム中に分布しているのに対して、銀イオンは細胞質中に分布していることが報告されている。従って、銀ナノ粒子と銀イオンで細胞内局在が異なることで、細胞外への排出も変化した可能性が考えられた。以上の結果から、今後、粒子径や表面電荷などの物性-動態との関連情報について集積を図ることで、抗原の粘膜面での吸収性を向上可能であり、有効性・安全性に優れたナノキャリアの開発支援に貢献できるものと期待している。

#### 4.2. 成体と乳幼仔での銀ナノ粒子の吸収量の違いの検討

小児・妊婦など、あらゆる世代を対象とした安全かつ有効な経口ワクチン用ナノキャリアの開発においては、乳幼児における曝露情報の収集が当然ながら重要な課題であると考えられる。乳幼児は、腸管上皮細胞のバリアが未発達であり、成人では吸収されない物質も体内に移行してしまうことが知られている。即ち、乳幼児の腸管は成人と大きく異なり、より多種の物質を多く吸収している。そこで本検討では、こどもと成人でどの程度ナノ粒子の吸収率が違うかについて先行的に検討を試みた。

出生後 3 日、もしくは 6 週齢のマウスに 2.5 mg/kg の nAg10、Ag+ を経口投与し、経時的に血中銀濃度を測定した。なお、2.5 mg/kg は、出生後 3 日の仔に分散性を維持して投与できる最大用量である。測定の結果、nAg10、Ag+ を投与した際ともに、最高濃度の時点で比較して、乳幼仔は成体マウスよりも 14 倍以上高い血中銀濃度を示した (Figure 3)。従って、乳幼仔は成体と比較して、銀ナノ粒子を体内に吸収しやすい可能性、さらには銀ナノ粒子の血中からの排泄能が低い可能性が示された。以上の結果から、今後、ナノマテリアルの体内・細胞内動態とワクチン効果・ワクチンリスクとの関連解析を図ることで、安全かつ有効にあらゆる世代が活用することのできる最適な経口ワクチン用のナノキャリアの探索を図っていく。

本研究では、種々物性のナノマテリアルを対象に、ナノマテリアルそのものの経口投与後の動態 (腸管での安定性・吸収性など) 解析を試みた。将来的には、種々ナノマテリア

ルの物性-動態 (腸管安定性を含む) の関連情報をさらに集積し、これらをもとに、抗原を安全かつ効果的に、口から免疫担当細胞へと送達できる新規の抗原送達用のナノキャリアを最適化し、他に類のない、本邦初・発の次世代型の『飲むワクチン』の開発設計を目指す。

#### 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. Yoshida T., Yoshioka Y., Takahashi H., Misato K., Mori T., Hirai T., Nagano K., Abe Y., Mukai Y., Kamada H., Tsunoda S., Nabeshi H., Yoshikawa T., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Intestinal absorption and biological effects of orally administered amorphous silica particles., *Nanoscale Res Lett.*, 9:532, 2014., doi: 10.1186/1556-276X-9-532, 査読あり。

[学会発表] (計 3 件)

1. 堤 康央: ナノマテリアルの ADMET 研究の現状と創薬への展開., 創薬動態フォーラム 2013 (招待講演) ., 金沢大学 (石川), 2013 年 7 月 19 日.
2. 堤 康央: ナノ安全科学研究の現状と今後～トキシコ・バイオマーカー探索から代替法開発を含めて～., 日本動物実験代替法学会第 26 回大会 (招待講演) ., 京都テルサ (京都) . 2013 年 12 月 20 日.
3. 青山道彦, 吉岡靖雄, 新井由之, 石本里緒, 永井健治, 東阪和馬, 堤 康央: ナノマテリアルの細胞内挙動の理解に向けた基礎的解析., 第 30 回日本 DDS 学会., 慶應義塾大学 (東京), 2014 年 7 月 30-31 日.

[図書] (計 0 件)

該当無し

[産業財産権]

○出願状況（計 0 件）

該当無し

○取得状況（計 0 件）

該当無し

〔その他〕

ホームページ等

該当無し

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

堤 康央 (Tsutsumi Yasuo)

大阪大学・薬学研究科・教授

研究者番号：50263306

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し

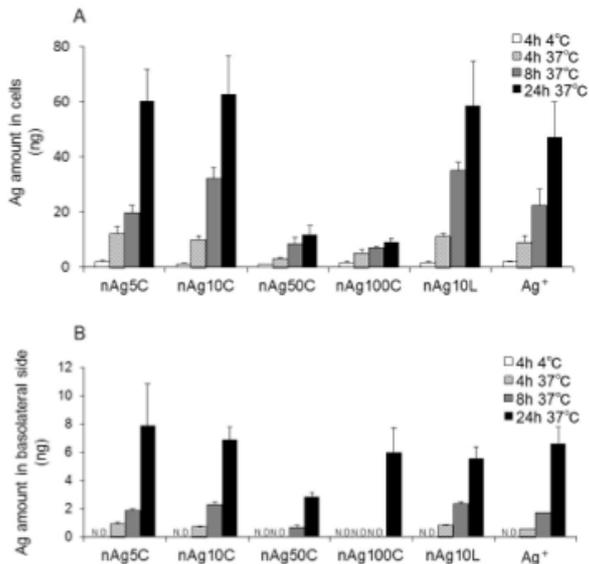


Figure 1. ナノ粒子のCaco-2細胞における管腔側から基底膜側への透過性評価

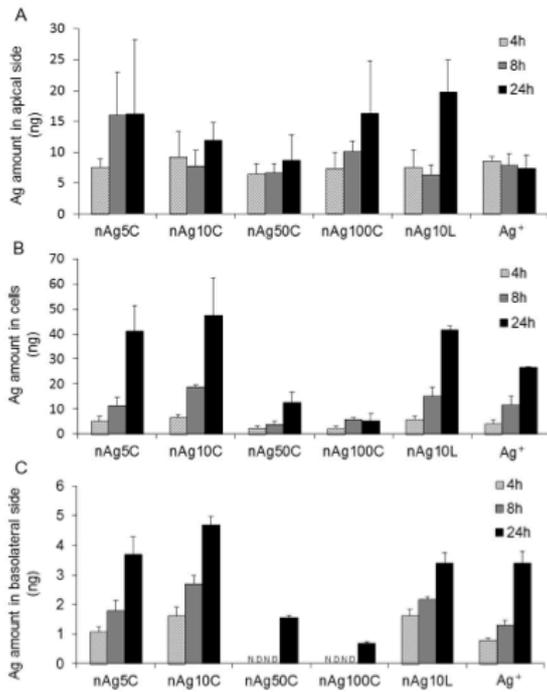


Figure 2. ナノ粒子の細胞内からの排出評価

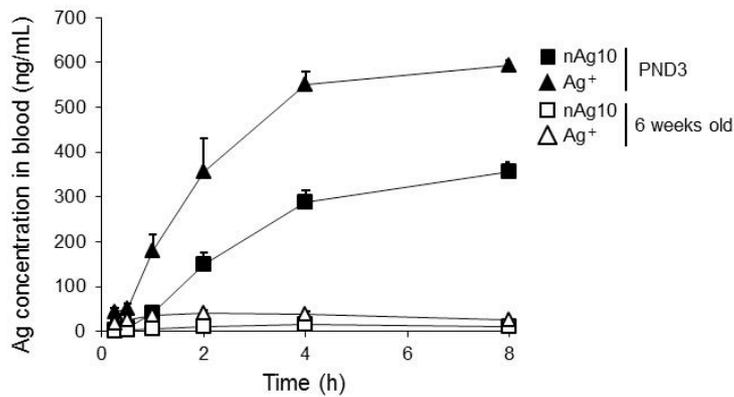


Figure 3. 乳幼仔と成体での銀ナノ粒子の吸収量の違いの検討