

生体成分肺サーファクタントの抗原運搬
機能に基づく安全で有効な次世代型感染
症粘膜ワクチン開発

2024

堺 聡子

目次

第1章 序論	p. 1
1-1. 現行の注射型感染症ワクチンの問題点	p. 1
1-2. 粘膜ワクチンと粘膜アジュバント	p. 2
1-2-1. 粘膜ワクチンの必要性	p. 2
1-2-2. 粘膜アジュバントの必要性	p. 5
第2章 安全で有効な粘膜アジュバント SSF、SF-10、SF-11 の開発	p. 9
2-1. ヒト肺サーファクタント由来人工合成粘膜アジュバント SSF の開発	p. 9
2-1-1. 肺サーファクタントを基盤にしたサーファクテン (St®)	p. 9
2-1-2. 粘膜アジュバント SSF の開発	p. 10
2-1-2-1. 樹状細胞への粘膜アジュバント SSF の抗原取り込み増強効果	p. 11
2-1-2-2. 粘膜アジュバント SSF-抗原複合体の調製方法	p. 16
2-1-2-3. 粘膜アジュバント SSF を用いたマウス経鼻ワクチン投与試験	p. 17
2-1-2-4. 等温滴定カロリーメーターおよび示唆走査カロリーメーター測定による SSF と抗原の混合最適条件の検討	p. 18
2-2. 粘膜アジュバント SF-10	p. 19
2-2-1-1. SF-10 によるマウス鼻腔内抗原提示細胞 (APC s) への抗原取り込み増強 効果	p. 20
2-2-1-2. SF-10 添加ワクチンの経鼻投与における細胞性免疫応答	p. 25
2-2-2. 粘膜アジュバント SF-10 を用いたマウス経口ワクチン投与試験	p. 25
2-2-3. 若齢カニクイザルを用いた SF-10 の長期メモリーの検証と鼻腔洗浄液 S-IgA の 交差反応性	p. 29
2-3. 乾燥粉末粘膜ワクチン用アジュバント SF-11	p. 32
2-3-1. インフルエンザ乾燥粉末ワクチン (HAv-SF-11) マウスへの経鼻投与試験	p. 33
第3章 新規ワクチン投与方法、Trans-Airway (TA) の検証試験	p. 37
3-1. 研究目的	p. 37
3-2. TA 投与ワクチンのマウス投与容量試験	p. 38
3-3. マウス TA 投与の安全性確認試験	p. 41
3-3-1. HAv-SF-10-TA 投与後のマウス肺の病理組織学的検査	p. 41
3-3-2. S1-SF-10-TA マウス投与による体重変化確認試験	p. 43
3-4. 新型コロナウイルス SARS-CoV-2 ワクチン S1-SF-10 の有効性評価試験	p. 44

3-4-1. ワクチン抗原と実験動物	p. 44
3-4-2. S1 抗原と SF-10 複合体、S1-SF-10 ワクチンの調製方法	p. 44
3-4-3. 免疫とサンプリング方法	p. 44
3-4-4. 肺と脾臓リンパ球の単離精製	p. 45
3-4-4-1. 脾臓リンパ球の単離精製方法	p. 45
3-4-4-2. 肺リンパ球の単離精製方法	p. 46
3-5. 分析および測定解析	p. 46
3-5-1. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	p. 46
3-5-2. アンジオテンシン変換酵素 II (ACE2) 結合阻害試験 (BI)	p. 48
3-5-3. ELISPOT (Enzyme-Linked Immune Spot) assay	p. 48
3-5-3-1. ELISPOT ASC 測定方法	p. 48
3-5-3-2. ELISPOT CSC 測定方法	p. 50
3-5-4. フローサイトメトリー	p. 50
3-6. 検証結果	p. 51
3-7. 実験結果に対する考察	p. 58
第 4 章 肺サーファクタント由来の抗原送達アジュバントを用いたワクチンの今後の展望	p. 59
Abbreviations	p. 61
謝辞	p. 63
引用文献	p. 64

第 1 章 序論

1 - 1. 現行の注射型感染症ワクチンの問題点

ワクチン接種は人の健康と QOL の向上を目的に、感染症による罹患率と死亡率を制御できる医学史上最も効果的なツールである。2019 年 12 月に武漢で出現した重症急性呼吸器症候群コロナウイルス-2 (SARS-CoV-2) による新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は、人の健康と生命だけでなく、経済・社会活動にも深刻な損害を与え、世界的な事態の深刻さから WHO は 2020 年 3 月にパンデミックに指定した。COVID-19 ワクチンの開発が急がれ、いくつかのワクチンが前例のないスピードで承認され臨床的に使用された。現在、世界中で 135 億回以上の COVID-19 ワクチンが投与され感染重症化および死亡を抑制する上で強力な効果を発揮した [1]。

COVID-19 ワクチンを含め通常の感染症ワクチン接種の多くは、筋肉内注射 (IM) および皮下注射 (SC) などの針ベースの注射で投与され、抗原特異的な血清中 IgG 抗体による全身免疫と細胞性免疫応答を誘導し、感染重症化の抑制に効果を有する。しかし、病原体の侵入部位である粘膜表面の分泌型 IgA (Secretory IgA : S-IgA) 抗体の誘導は低いか全く誘導しないため、粘膜から侵入する病原体に対する防御効果は期待できない [2]。現在主流となっている mRNA ワクチン (Comirnaty など) は IM 接種でも血清中 IgG 抗体以外に抗原特異的 S-IgA 抗体を唾液や母乳、鼻腔などの粘膜部位に誘導したとする報告もある [3, 4]。しかし、誘導された粘膜 S-IgA 抗体量は微量で、SARS-CoV-2 感染防御効果には限界があると考えられている [5]。実際に、実用化された COVID-19 ワクチンは 2020 年 12 月から世界中で実施されているが、その後続出する変異株にも十分な対応ができず、COVID-19 感染者数は 2023 年 11 月時点で約 7 億 7,220 万人が確認され、累計約 699 万人が死亡している [1]。

また粘膜の S-IgA 抗体による中和効果が低いいため無症候性感染を許容し、免疫耐性変異体が形成され感染拡大の原因になるとの報告もある [6, 7]。したがって、将来、懸念される変異株を

含む SARS-CoV-2 に対する気道内の強力な感染防御免疫を確立するには、従来の接種に加えて追加の粘膜ワクチン接種が必要との指摘もある[8, 9]。

さらに、筋肉内注射型ワクチン接種の問題点として、注射の管理が煩雑でコンプライアンスが不十分となる可能性があり、針刺し事故のリスクや専門家の訓練の必要性についても指摘されている[9]。

次世代型感染症ワクチンには、係る問題を回避し、利便性と患者のコンプライアンスを向上させ、「感染予防」「感染発症予防」「感染重症化予防」効果を兼ね備えたワクチン開発が望まれる。また病原体の感染経路に合わせた局所免疫応答とその長期の記憶が望まれ、開発が進んでいる[10, 11]。

1-2. 粘膜ワクチンおよび粘膜アジュバントの必要性

1-2-1. 粘膜ワクチンの必要性

粘膜局所に投与する粘膜ワクチンは、全身部位と粘膜部位の両方で抗原特異的な体液性および細胞性免疫反応を誘導することができる。粘膜免疫系には解剖学および生理学的に異なる感染防御誘導部位とエフェクター部位で構成されており、これらの誘導部位は鼻咽頭関連リンパ組織（NALT）、腸関連リンパ組織（GALT）、および気管支関連リンパ組織等を含む多数の粘膜関連リンパ組織（MALT）から成る。マウスの NALT は、ヒトではワルデイヤー輪の扁桃腺やアデノイドに匹敵すると考えられている。この組織により、ある局所で感作されたリンパ球はほかの粘膜組織へと輸送され、侵入病原体に対する体全体の包括的な免疫構築の促進が可能となる。エフェクター部位は抗体産生および細胞性免疫応答の部位で、総免疫細胞の約 80% は粘膜表面のエフェクター細胞である CD8⁺ および CD4⁺T リンパ球で構成されているため、粘膜免疫応答を標的することで全身の免疫応答が期待できる[9, 12]。

粘膜ワクチンの接種によって粘膜免疫担当組織内の形質細胞から産出された抗原特異的 IgA 抗体は、骨髄由来の単量体の血液中 IgA 抗体と異なり二量体や多量体で、粘膜上皮細部の基底外側にある特定の高分子免疫グロブリン受容体 (polymeric immunoglobulin receptor ; pIgR) に結合する。pIgR と結合した IgA は小胞輸送によって上層内層を横切り、pIgR の一部は分解され分泌成分 (secretory component ; SC) として S-IgA の一部となり管腔でのタンパク質分解を避け、管腔側へと運搬され粘液や分泌液中に放出される。S-IgA 抗体は、内腔内の病原体と架橋して立体障害を引き起こすことで感染を防御したり、また、上皮内層を通過して固有層に入った病原体抗原や感染細胞内の抗原と結合して細胞外へ排泄することで感染防御効果を示す。また S-IgA 抗体は交差反応性が高く、抗原変異株にも免疫応答することで変異株への感染防御能も有する [9]。感染症の約 90% は粘膜からの病原体侵入による感染が原因であるため、S-IgA 抗体による第一線での感染防御が期待できる。

SARS-CoV-2 に対する粘膜免疫においても、mRNA 粘膜ワクチンによって誘導された S-IgA 抗体と常駐メモリー細胞 (TR_{RM}) が迅速に重要な役割を果たしていることが報告された [13]。また SARS-CoV-2 の感染初期において、血清 IgA 抗体および唾液中の粘膜 S-IgA 抗体は SARS-CoV-2 の中和能において IgG よりも強力であったとことも報告されている [8]。インフルエンザや HIV 特異的抗体に関する以前の研究でも、感染初期のウイルス中和における S-IgA 抗体の同様の役割が示唆されている [14, 15, 16]。

一方、ワクチンにより誘導された抗体は、細胞内のウイルスにはアクセスできないため、細胞性免疫として抗原特異的細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) の誘導も感染防御には必要である。CTL は細胞表面タンパク質ではなく細胞内のタンパク質を標的として認識し、ウイルス感染細胞を死滅させて、ウイルスの拡散を制限し、感染拡大とウイルスの除去に重要な役割を果たす。粘膜ワクチンには、交差反応性を有する液性免疫に加えて、抗原変異体にも応答可能な CTL の誘導と、これらの長期免疫記憶の誘導が望まれている [17]。

このような粘膜ワクチンには現在、チフス菌、コレラ、ロタウイルス、セイビンポリオ、インフルエンザワクチンなどの経口ワクチンと、生インフルエンザ鼻腔内ワクチンの Flumist[®] が米

国で粘膜ワクチンとして承認されている[表 1]。これらの認可された粘膜ワクチンのほとんどは、弱毒化または遺伝子改変された生または死滅した微生物（全粒子）を用いており、抗原成分（サブユニット）や精製された形態（エーテルスプリット）の粘膜ワクチンはまだ認可されていない。なお、Flumist®は体液性免疫と細胞性免疫の両方を誘導するが、その安全性については問題点が指摘されており、どちらも 2 歳未満の小児への使用は承認されていない[18]。経口ポリオワクチン（OPV）など最初に開発された粘膜ワクチンでも、世界中の予防接種プログラムで広く使用されていたが、2000 年頃、ハイチ、フィリピン、エジプト、ドミニカで弱毒化したウイルスが OPV 由来の感染性野生株に逆戻りして、免疫不全の人に感染を引き起こしてポリオが大流行したため、安全性への配慮が非常に重要視されている[19]。

表 1 ヒト用に認可された粘膜ワクチンの一覧

病原体	商品名	成分	投与ルート	免疫回数
ロタウイルス	Rotarix®, RotaTeq®	弱毒生ウイルス	経口	3 回
ポリオウイルス	Biopolio™ B1/3 他	弱毒生ウイルス	経口	3 回
サルモネラ・腸チフス	Vivotif®	弱毒生ウイルス	経口	3 - 4 回
コレラ菌	Dukoral®, Shanchol™, mORC-Vac™	不活化	経口	2 - 3 回
コレラ菌	経口の生ワクチン： Vaxchora®	弱毒生ウイルス	経口	1 回
インフルエンザ A 型 および B 型	FluMist™	弱毒生ウイルス	経鼻	2 回

引用：Correa, V. A. et al, (2022). Vaccines, adjuvants and key factors for mucosal immune response. *Immunology*, 167(2), 124-138. を改変

SARS-CoV-2 の粘膜ワクチンの有望な結果はこれまでに報告されていて、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質をコードしたアデノウイルスベクターワクチンをチンパンジーに経鼻投与したところ、上気道、下気道の両方で SARS-CoV-2 に対する中和活性を示す抗原特異的な IgG および IgA 抗体が誘導され、鼻腔内接種経路の有用性が示された[20]。

さらに、粘膜ワクチンと筋肉内注射型ワクチンの比較では、粘膜ワクチンの場合、針刺し事故や血液由来疾患の伝染からの回避、身体的および心理的不快感の軽減、廃棄物の低減などの低コスト化、医療専門家訓練の不要、などの利点があり、特に幼児にとってより受け入れられやすいものとなっている。

よって理想的な粘膜ワクチンは、物理的および化学的障壁（pH および酵素）の点で安定しており、特定の免疫誘導部位に抗原を送達し、粘液代謝回転に適応し、上皮障壁を通過でき、最終的には APC によって効果的に捕捉されることが求められる[9]。

1-2-2. 粘膜アジュバントの必要性

ヒトに対して認可されている粘膜ワクチンは極めて限定的であるが、これは主に安全で効果的な粘膜アジュバントが不足していることが原因とされている。

アジュバント(Adjuvant)は、ラテン語の「助ける」という意味をもつ 'adjuvare' という言葉を語源に持ち、1925 年に「抗原単独より高い免疫力を生み出す特定の抗原と組み合わせて使用される物質」として定義された。アジュバントをワクチンに組み込むことで、粘膜の生理学的および化学的障壁による抗原送達を改善し、ワクチンの安定性と吸着により免疫応答の規模、機能性、幅、持続性を高めることが期待される。

ヒトの粘膜表面は外部環境に近接して常時病原体にさらされ繊毛、粘液、さまざまなプロテアーゼといったワクチン抗原を含む異物に対する排除システムが備わっているため、抗原情報の APC への効果的な伝達が困難で、抗原のみを粘膜ワクチンとして使用しても、感染防御免疫を獲得できる可能性は低い。粘膜ワクチンの開発には免疫力を強化し、免疫記憶を誘導する安全で有効なアジュバントが粘膜ワクチンの重要な成分として不可欠である（生ワクチンを除く）。

一方で、従来の研究では強力なアジュバントが試みられたが、副反応のために実用化に至らなかった。典型的な例として、経鼻不活化インフルエンザワクチンのアジュバントとしてスイスで

使用された大腸菌由来の熱不安定性毒素（HLT）がある。HLT をアジュバントとしたビロゾルインフルエンザワクチンの接種者にはベル麻痺が多発したことが報告され市場からの撤退につながった[21]。子宮頸がん予防ワクチンやパンデミック用のインフルエンザワクチンなど、アジュバントによるワクチンの副作用の可能性が指摘され、安全で有効なアジュバントの開発が望まれており、多くの研究者が開発を進めている。

アジュバントは、作用機序、化学的特性、またはその起源（合成、天然、内因性）に基づいて、抗原提示細胞（APC）の活性化物質と抗原運搬物質の2つのカテゴリーに大別される。最も一般的なアジュバントを表2に示す。免疫活性化物質は、次の3つのメカニズムを通じて免疫活性化を開始する。（1）脂質、核酸、タンパク質、ペプチドなど多様であるがAPCに存在するパターン認識受容体（PRR）のリガンド、例えば Toll 様受容体（TLR）である。（2）宿主細胞の表面に存在するスフィンゴ糖脂質などの非 Toll 様受容体（非 TLR）に結合した後の毒素媒介免疫刺激。このクラスの最も代表的なものは、コレラ毒素（CT）と大腸菌によって産生される熱不安定性毒素（LT）である。（3）サイトカイン、補体フラグメント、メッセンジャー分子などの天然免疫調節物質である。一方、抗原運搬物質は、APC による抗原の取り込みを促進させるために、抗原を宿主の生体内環境から保護して抗原の分解や放出速度を遅らせる、あるいは抗原を持続的に放出して長期持続する標的特異的免疫応答を誘導するものである[16]。その中には、カプセル化または結合した抗原を効率的に送達するために、TLR リガンドまたは他の PRR リガンドや免疫グロブリンを組み込む、或いは特定の細胞を標的にするためのリガンド、粘膜接着剤、およびマンノース誘導體などをリポソームの表面に付加しているものもある。粘膜ワクチンには免疫原性となる抗原の運搬効率を左右する粘膜浸透が大きくかかわっている。表2に一般的なアジュバントの一覧を示す。

表2 一般的なアジュバント

分類		アジュバント	
抗原運搬物質	アルミニウム類		ASO4, ミョウバン+CpG
	エマルジョン	O/W	MF59, ASO2, ASO3, AF03, MPL-SE, GLA-SE, SLA-SE
		なし	モンタニド ISA-720, モンタニド ISA-51
	ナノ粒子	リポソーム	AS01, AS015
		脂質膜ベース	ウイルスソーム
			アーケオソーム
	ポリマー		キトサンおよびその誘導体 (N-トリメチルおよびモノ-N-カルボキシメチルキトサン)
活性化物質	TLR アゴニスト	TLR2	L-バンボ, MALP-2, PAM2CSK4, リポアラビノマンナン, リポテイコ酸, GP1 アンカー, ザイモサン, ペプチドグリカン
		TLR3	Poly(I:C), Poly-ICLC, ARNAX
		TLR4	ASO, Monophosphoryl lipid A [MPL]
		TLR5	フラジェリン, イミキモド[R837], レシキモド[R848]
		TLR7/8	イミキモド[R837], レシキモド[R848]
		TLR9	CpG-B-ODN, CpG1018, MGN1703
	非 TLR アゴニスト	コレラ毒素 (CT), エンテロトキシン(LTK3, LTR72)	
	天然免疫調節物質	サイトカイン、補体フラグメント、メッセンジャー分子など	

引用 : Brai, Annalaura, et al. "Progress towards Adjuvant Development: Focus on Antiviral Therapy. "*International Journal of Molecular Sciences* 24.11 (2023): 9225.を改変

我々は、粘膜への抗原運搬効率を促進して APC を活性化する粘膜アジュバント開発に取り組んでおり、アジュバント物質群の中で唯一、ヒト肺サーファクタント生体成分由来の抗原運搬機能を有する粘膜アジュバント SSF、SF-10、SF-11 の開発に取り組み、粘膜ワクチンの全身性、粘膜局所の液性免疫応答、細胞性免疫応答、さらにその長期免疫記憶について、その安全性と有効性についてこれまでに報告してきた[17, 24, 25, 26]。

本論文では、SSF、SF-10、SF-11 アジュバントについての解説と、論文提出者が担当した実験内容について報告する。特に SF-10 を用いた効果的な粘膜ワクチンの新たな投与方法である、TA (Trans-Airway) 投与における SF-10 の粘膜アジュバント効果について述べる。

尚、本文で使用したすべての実験動物は、特定の病原体を含まない環境下で飼育された。実験動物の飼育と使用の手引き (NIH Publication No.85-23、1996) に従って処置され、本研究は徳島大学動物飼育委員会(#180)によって承認されている (#徳動物 11092、#徳動物 12100、#徳動物 13040、# T29-93、# T2019-88、#T2020-65)。また本論文でマウスに経鼻投与、TA 投与する際には、投与前にケタミン(62.6 mg/kg)とキシラジン(12.4 mg/kg)を腹腔内注射して麻酔している。

第 2 章 安全で有効な粘膜アジュバント SSF、SF-10、SF-11 の開発

2-1. ヒト肺サーファクタント由来の人工合成粘膜アジュバント SSF の開発

2-1-1. 肺サーファクタントを基盤にしたサーファクテン (St®)

SSF は、肺サーファクタント (Pulmonary surfactant: PS) の代用薬として 1987 年に発売されたサーファクテン (St®) を基盤に開発された。生理活性物質である PS は、肺胞 II 型細胞やクララ細胞で産生・分泌される界面活性剤で、肺胞表面を覆って肺の表面張力を低下させ、肺呼吸を可能にしている[22, 23]。PS の特徴はラットおよびウサギの肺において短い半減期 (6-7 時間) を示し、約 50%は肺胞 II 型細胞に取り込まれて再利用され、残り 50%はマクロファージや樹状細胞等の APC に効果的に取り込まれて分解され、生体内で速やかに代謝されるという特性を備えている[24]。我々は、ヒトの肺サーファクタントに類似のウシの St®が、マウスおよびミニブタの APC への抗原送達を促進することにより、安全かつ有効な粘膜アジュバント作用を示すことを発見した[25, 26, 27]。St®を季節性インフルエンザ抗原(HAV)と共にマウスやミニブタの鼻腔内に投与すると、血液中の HAV 特異的 IgG と鼻粘膜局所の HAV 特異的 S-IgA 抗体が効果的に誘導され、また持続的な炎症性サイトカインの誘導もなく、有効で安全な St®の粘膜アジュバント活性が証明された。ミニブタ試験においては、鼻腔洗浄液中粘膜 S-IgA 抗体のインフルエンザ変異株への交差反応性も確認された[26]。さらにマウス鼻腔内投与試験では HAV 複合体は半値クリアランス時間が 43~116 分と短く、APC を過剰刺激しないと推定された[25]。

St®は、120 mg /体重 kg という比較的高い臨床用量でも今のところ重大な副作用はなく[28]、約 35 年以上にわたり未熟児の呼吸窮迫症候群の治療に世界中で広く使用されている。

2-1-2. 粘膜アジュバント SSF の開発

St[®]は牛由来の生物由来製品で牛海綿状脳症（BSE）の原因となるプリオンの汚染リスクを否定出来ないこと、ワクチンは乳幼児を含む健常者への接種を対象とすることから、St[®]に代わる人工合成品として人工合成肺サーファクタント（SSF）の開発に着手した[27]。St[®]は、約80%のリン脂質、約10%の脂肪酸、および約1%の肺サーファクタントタンパク質(SP)-B および SP-Cで構成される脂質タンパク質複合体で、PSの界面活性には、ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）、ホスファチジルグリセロール（PG）、パルミチン酸の3つのPS脂質成分が重要であることが報告されている[29]。DPPCは、ほとんどの哺乳類で肺組織以外の細胞膜構成脂質にはほとんど含有されていない[30, 31]が、PSの界面活性作用の主成分として重要な役割をもつ。アニリン性リン脂質のPGは界面活性作用とさらにカチオン性ペプチドとの相互作用によりペプチドがPS内で立体構造を取るための補助因子として機能すると考えられる。パルミチン酸もアシル鎖とペプチドとの結合によりPSの安定性をもたらす[32]。SSFの合成に当たって、SP-Bに明確なアジュバント効果が見られないため除外し、SP-CがSSFの必須の構成要素であることを同定し、そしてPSの3つの主要な脂質であるDPPC、PG、パルミチン酸と、SP-Cから再構成された合成粘膜アジュバントは、鼻腔洗浄液（NW）中のHAV特異的S-IgAおよび血清中HAV特異的IgGを誘導し、そのアジュバント効果はSt[®]のアジュバント効果と同様であることが確認された[27]。

SP-Cは膜貫通ペプチドで、リン脂質膜に入り込み、サーファクタントの単分子膜を安定化するものと考えられている。またSP-Cは細胞膜表面活性の発現に不可欠な成分で、SP-C欠損があると種々の呼吸器疾患を発症することが分かっている[33]。SP-Cの正電荷残基がリン脂質小胞の挿入に先立って単層に結合するのに重要であること、および疎水性のC末端ヘリックスがその迅速な吸着に重要であることも報告されている[22]。

ヒトSP-Cは、FGIPCCPVHCLKRLLIVVVVVVVVVIVGALLMGLからなるアミノ酸配列でN末端側に親水性アミノ酸12残基、C末端側に疎水性アミノ酸23残基を有する35アミノ酸から

なるペプチドで、その高い疎水性から工業的量产製造に適さないことから、SSF の抗原導入能と APCs 活性化能に寄与する SP-C のアミノ酸配列と特性に基づいて、我々は SP-C に改良を加えた 11 種類のペプチドを合成して、SSF のアジュバント作用に寄与するペプチドを探索した結果、K6L16 ペプチド (KKKKKKLLLLLLLLLLLLLLLLLLLL) の発見に至り工業化製造が可能となった [34]。このペプチドでは、SP-C の親水性領域が 6 個のリジン残基で置き換えられ、疎水性領域が 16 個のロイシン残基で置き換えられた、塩基性アミノ酸と疎水性アミノ酸を有する両親媒性ペプチドでメタノールやエタノールに溶けやすく、SP-C に比べて扱いやすい材料である。また、SSF から K6L16 ペプチドを除去するとアジュバント活性が失われることが判明している。以上の検討から、現在の SSF の組成比は DPPC : PG : パルミチン酸 : K6L16 ペプチド = 75 : 25 : 10 : 2 である [34] (図 1 に示す)。

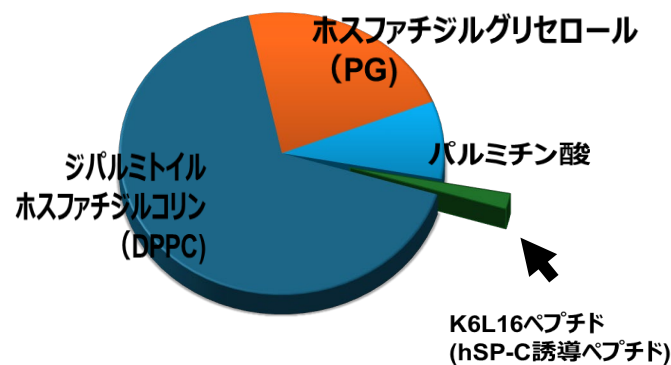


図 1 SSF の組成

2-1-2-1. 樹状細胞への粘膜アジュバント SSF の抗原取り込み増強効果

人工合成肺サーファクタント SSF においても St®と同様にインフルエンザ抗原 (HA_v) の樹状細胞への取り込み増強効果が確認された [35]。

SSF の抗原運搬機能を評価するため、HA_v に蛍光色素である ATTO488 (ATTO TECH、

AD488-31)で標識した fHAV と SSF の複合体 (fHAV-SSF) を調製してマウス骨髄由来の樹状細胞 (BMDCs) へ添加し、BMDCs 活性マーカーCD86 を用いてフローサイトメトリーで測定し、SSF による BMDCs への fHAV の取り込み増強効果を測定した結果を図 2 A、B に示す。実験には、fHA(5 μ g)-SSF(50 μ g)の複合体を、 1×10^5 細胞数の BMDC に添加し、添加後 5~120 分間、10 分おきにフローサイトメータで fHA の取り込み率を測定した。図 2 C、D は、BMDCs 活性化マーカーの PE anti-mouse CD86 を BMDCs と反応させて、CD86 発現量を BMDCs の活性化の指標とし、Na イオンチャンネル阻害によるエンドサイトーシス阻害剤であるアミロライド (Sigma- Aldrich, 1214-79-5)の添加(0, 50, 100, 200 μ M)により、BMDCs への抗原取り込み阻害と活性化の阻害をフローサイトメトリーで測定した結果である。またこの試験の前に、細胞を 4°C の低温で培養すると fHA-SSF の取り込みは抑制され、SSF の抗原取り込み増強効果は ATP 依存性のエンドサイトーシスによることを確認している。

蛍光色素 ATTO488 で標識された fHAV はゲルろ過で fHA 分画を精製して使用した。まず、HAV ワクチン液[A/New Caledonia/20/99(H1N1)、タンパク質濃度(720 μ g/ml)、デッ生研]10 mL を VIVASPIN20(SKK)で 250 μ L に濃縮し、濃縮液を 1.7 mL チューブ(BM Bio、BM-15)に移して 0.2M NaHCO₃ (pH 8.5) 液で 1 mL に調製する。この約 7.2mg の HAV 液に DMSO で溶解した ATTO488 (1 mg/mL) を 33 μ L を添加し、室温で 1 時間、ローター攪拌し(IWAKI 愛くる、RVH-101)、fHA 液とする。500 mL ビーカーに秤量した Sephadex™ G-75(Cytiva)1 mg と超純水 400 mL を添加してゲル状に膨潤させ、3 時間後にゲルが沈降したら上清を廃棄し超純水 400 mL を添加して混合し上清を廃棄し、この洗浄作業を 2 回繰り返す。洗浄が終わったゲルをカラム (内径 Φ 22mm、100 cc)に均一に詰めてフラクションコレクター (ADVANTECH、SF-2120) とペリスタリポンプ(Multi PEPEX PUMP、LKB2115)を装着する。カラム上から fHA 液を流し、その上から超純水をペリスタリポンプで流し (流速 1 mL/min) 、カラム下から出てくる分画サンプルを 1 mL ずつ回収した (回収チューブ No.1~60) 。各チューブのタンパク量を BCA アッセイ(Thermo、# 23225)で定量し、濃度の高いチューブをプールし fHAV として実験に使用した。

BMDCs の単離方法は次の通りである。まず無菌条件下にマウス(BLB/c、雌性、9 週齢、日本エスエルシー株式会社より購入)から骨髓大腿骨を分離する。はさみで大腿骨の両端を切断して、ピンセットを用いて骨を保持し 26 ゲージ針装着のシリンジ(テルモ、SS-01T2613S)にて、5 mL の cRPMI[RPMI1640(nacalai tesque、05176)、10 mM HEPES(gibco、15630-80)pH 7.2、1 mM sodium pyruvate(SIGMA、S8636)、1%MEMnon-essential amino acids solution(SIGMA、M7145)、14.3 μ M 2-mercaptoethanol(FUJI フィルム和光純薬株式会社、137-06862)、10 μ g/mL gentamycin、10%非働化 FBS]で骨髓を注意深く 50 mL 遠心管チューブ(CORNING、430829)に洗い出す。必要に応じて、骨が白くなるまで洗い流し、すべての細胞が骨髓から除去されるまで繰り返す。骨髓液を回収した 50 mL 遠心管チューブを 5 分間静置し、自然沈降により大きな骨髓片を分離する。上清を別の 50 mL 遠心管チューブ回収し遠心分離(TOMY、EX126)する(600G、4 分間、4°C)。上清を廃棄する。細胞ペレットに約 5 mL の cRPMI を加え、上下にピペティングして再懸濁したのち、生細胞をカウント(Logos、LUNA-II、LUC-15-00349)し、cRPMI に最終濃度 5 μ g/mL となるよう IL-4(R&D Systems, Inc.、404ML)、と GM-CSF(R&D Systems, Inc. 415-ML)を最終濃度 1 μ g/mL となるよう添加し、細胞を懸濁する。GM-CSF と IL-4 は樹状細胞の分化誘導因子である。細胞懸濁液 10 mL を培養用シャーレ(Thermo、150466)にまき、37°C、5%CO₂、1 時間培養する。培養後、培養シャーレに接着したマクロファージを分離除去するため、上清を遠心チューブ(FALCON、352196)に回収し遠心(600 G、4 分間、4°C) し、得られた BMDCs を cRPMI 10 mL を添加して培養用シャーレにまき、37°C、5%CO₂、3 日間培養する。培養後のシャーレ内の培養液をピペットで遠心チューブに回収し遠心する。細胞ペレットを PBS(nacalai tesque、14249-24)で 300 μ L で懸濁し、磁気ビーズを固定化した BMDC 抗体(Miltenyi、130-052-001)100 μ L を添加し、4°C 10 分間インキュベートにより細胞表面を標識する。遠心 (TOMY、MX-301、4°C、200 G、10 min) したのち、細胞ペレットに PBS を添加して細胞浮遊液を調整する。磁気標識細胞をセルソーティングカラム(miltenybiotec.com、130-042-201)を用いて MACS で BMDCs を分離回収した。得られた BMDCs 数をカウントし実験に使用した。

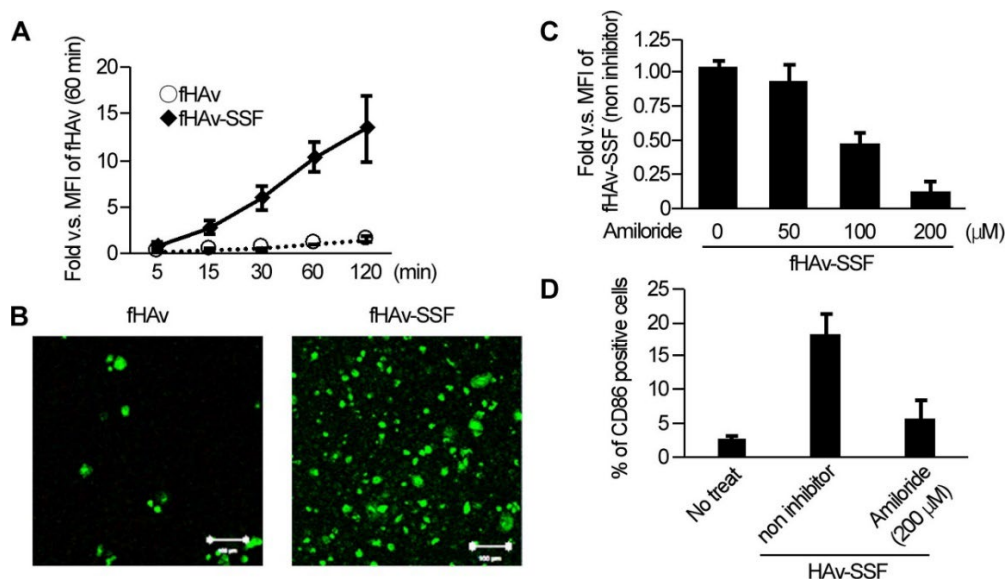


図 2 fHAV-SSF の樹状細胞への取り込み増強効果 ([35]より引用)

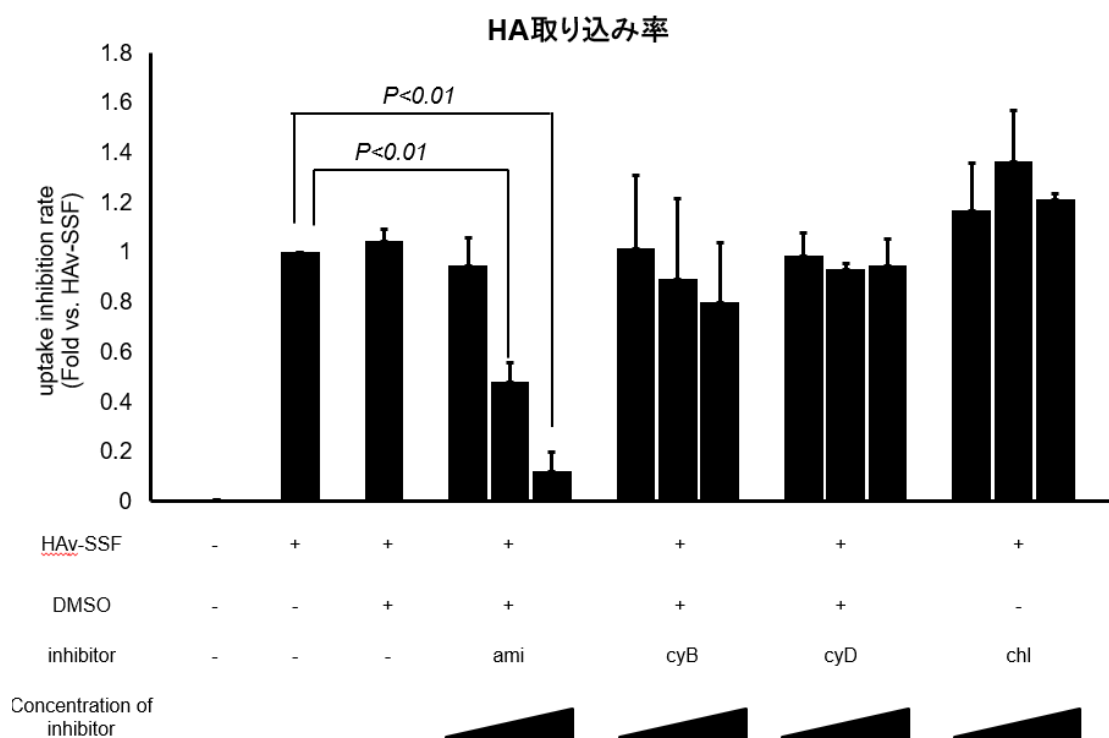
(A)はBMDCs (1×10^6 細胞)にfHAV($10 \mu\text{g}$)またはfHAV($10 \mu\text{g}$)-SSF($100 \mu\text{g}$)を添加し、5、15、30、60、120分間培養後フローサイトメトリーでfHAVを取り込んだBMDCsの平均蛍光強度(MFI)を測定した。fHAV群(○)およびfHAV-SSF群(黒◇)のデータで示す。fHAV単独で60分間培養したBMDCsのMFI($n=3-4$)に対する増加倍率の平均 \pm SEMである。(B)60分後にfHAVまたはfHAV-SSFを組み込んだBMDCs(緑色)を蛍光顕微鏡で調べた。(C、D)BMDCsを50、100および $200 \mu\text{M}$ のアミロライドで前処理したのちfHAV($10 \mu\text{g}$)-SSF($100 \mu\text{g}$)を添加し60分後にBMDCsのMFIをフローサイトメトリーで測定した。データは非阻害剤前処理BMDCsのMFIに対する倍数増加の平均 \pm SEMである($n=3$)。(D) $200 \mu\text{M}$ のアミロライドで60分間処理した後、BMDCsにfHAV($10 \mu\text{g}$)-SSF($100 \mu\text{g}$)を添加し24時間培養したのち、蛍光標識抗マウスCD86で染色し、BMDC上のCD86の発現レベルをフローサイトメトリーで解析した。データは $n=3$ の平均値 \pm SEMである。

図2A、Bの結果より、fHAVの取り込み率と比較して、SSFは経時的にfHAVのBMDCsへの取り込みを増強していた。図2C、Dの結果からfHAV-SSFにより取り込み増強されたBMDCs活性化効果はアミロライドの前処理で減少し、fHAV-SSFの取り込み効果もアミロライドで阻害されることが分かった。また、アミロライドの阻害効果は濃度(50~ $200 \mu\text{M}$)依存的であった。

この結果より、SSFの抗原取込機能はエンドサイトーシスによると考え、さらにエンドサイト

ーシスの各阻害剤を用いて調べた結果を図3に示す。ファゴサイトーシスのアクチン重合阻害剤であるサイトカラシン B(富士フィルム和光純薬、14930-96-2)と D(Sigma-Aldrich、22144-77-0)、およびクラスリン・カペラエンドサイトーシス阻害剤であるクロルプロマジン(Sigma-Aldrich、69-09-0)で BMDCs を前処理しても取り込み阻害効果はなく、fHAV-SSF による BMDCs の活性化阻害は認められなかった。サイトカラシン B、D およびクロルプロマジンについては濃度変化(サイトカラシン B: 2~40 μ M、サイトカラジン D: 2~40 μ M、クロルプロマジン: 0.1~10 μ M)を行っているが、いずれも阻害効果はなかった。以上の結果から、fHAV-SSF の樹状細胞への取り込み機構は、マクロピノサイトーシスによる抗原送達型アジュバントと考えている。

気道の粘膜免疫における BALT を形成しているリンパ性組織においても、エンドサイトーシスやピノサイトーシスなどにより効率的に抗原が取り込まれることが明らかになっている[36]。しかし、マクロピノサイトーシスは、これまで粒子サイズに依存した非特異的なピノサイトーシス経路として漠然と捉えられており、その誘導の調節機序や細胞内シグナル伝達との関連に関して不明な点も多い[37]。SSF の抗原取込増強機能におけるマクロピノサイトーシス経路と関係する外的刺激物質や受容体の関与も不明な点が多く、さらなるSSF の作用機序解明が待たれる。さらにSSF は SP-C を模倣するカチオン性膜貫通リポペプチド K6L16 を持つため、その K6L16 のリジンが有するカチオン性の N 末端セグメントは小胞表面に正電荷を与え、APC の原形質膜の負に荷電したリン酸基との相互作用において重要な役割を果たしている可能性がある。現時点ではこれ以上のSSF の作用機序解明は今後の課題としたい。また一方で、SSF が一連のダメージ関連分子(DAMP, damage-associated molecular patterns)の誘導に関与している可能性もある。SSF の成分である K6L16 ペプチドのリジン残基の正電荷が、投与部位の細胞にダメージを与え、DAMP の一種である二本鎖 DNA を放出する可能性も否定できない[38]。



ami : amiloride, cyB : cytochalasin B, cyD : cytochalasin D, chl : chlorpromazine

図 3 エンドサイトーシス阻害剤による fHAV-SSF の抗原取込率への影響 (木本 貴士、水野大、小野 慎司、堺 聡子、園浦 拓龍、木戸 博「肺サーファクタント由来人工合成粘膜アジュバントSSF の抗原取込増強機構の解析」日本肺サーファクタント・界面医学会雑誌 43: 47-49, 2012.より)

2-1-2-2. 粘膜アジュバント SSF-抗原複合体の調製方法

SSF の調製方法は次の通りである。クロロホルム：メタノール(いずれも特級試薬)= 2 : 1 (v/v)中に DPPC、PG および PA を各 10 mg/mL、K6L16 ペプチドはメタノールで 1 mg/mL と なるよう秤量・溶解し、ナス底フラスコ中で 75 : 25 : 10 : 2 の重量比で混合する。混合物の有機溶媒をバンガム法にてエバポレーターで減圧乾燥により除去した後、ナス底フラスコ内の乾燥薄膜 SSF を 10%エタノール水で懸濁し、SSF 懸濁液濃度を 4 mg リン脂質/mL に調整する。SSF 懸濁液を均一に拡散させるために、懸濁液を 45°C で 10 分間加熱し、加温中 3 分おきにボルトックスで攪拌する。懸濁液を凍結乾燥し、乾燥後、粉末 SSF を - 20°C で保存する。

抗原-SSF の調製は以下の方法で実施する。凍結乾燥粉末 SSF を 10 mg/mL となるよう超純水で懸濁し、42°Cで 10 分間加熱する。HAV などの抗原溶液と SSF 懸濁液を抗原タンパク質量：SSF(含有リン脂質量) = 1:1 ~ 1:10 で混合し、42°Cの水浴で加温混合（加温中 3 分おきにボルテックスで攪拌）する。抗原-SSF の混合懸濁液を凍結乾燥する。凍結乾燥には、LABCONCO(Freeze 4.5)を使用する。抗原-SSF の凍結乾燥粉末は使用するまで、- 20°Cで保存する。

2 - 1 - 2 - 3. 粘膜アジュバント SSF を用いたマウス経鼻ワクチン投与試験

- 20°Cで保存していた抗原-SSF 凍結乾燥粉末を室温に戻し、投与経路、投与条件に合わせて抗原-SSF に適量の生理食塩水を添加して懸濁液を調製し、マウスの鼻へピペットマンで初回免疫から 2 週間間隔で 3 回投与（2 μ L/nostril）して、最終免疫から 2 週間後に血中の抗原特異的な IgG 抗体と NW 中の粘膜 S-IgA 抗体を ELISA で検出し、SSF のアジュバント効果を確認し報告した[34]。この報告で HAV-SSF を評価した結果を表 3 に示す。ELISA 測定方法については「第 3 章 3 - 5 - 1. ELISA (Enzyme-Linked Immune Sorbent Assay)」に述べた。

表 3 HAV-SSF 複合体の調整法と HAV 抗原特異的抗体の誘導効果の比較([34]より引用)

Materials			Preparation		HA binding (%)	Anti-HA antibodies($\mu\text{g/ml}$)	
HA	SSF	CVP	Sonication	Lyophilization		Nasal washes (S-IgA)	Serum (IgG)
-	-	-	-	-	-	0.0 \pm 0.0	0.1 \pm 0.1
+	-	-	+	-	-	0.0 \pm 0.0	0.5 \pm 0.5
+	+	-	+	-	65-70	0.2 \pm 0.2	4.3 \pm 0.9
+	+	-	-	+	92-98	2.3 \pm 1.4 ^b	724.5 \pm 248.1 ^b
+	-	+	-	-	-	0.3 \pm 0.2	4.9 \pm 1.6
+	+	+	+	-	-	3.3 \pm 0.9 ^b	568.7 \pm 95.2 ^b
+	+	+	-	+	-	9.9 \pm 5.1 ^{a, b}	925.0 \pm 633.3 ^b

マウス (BALB/c、雌性、6-8 週齢、日本エスエルシー株式会社より購入) に HAV(0.2 μg 、A/New Caledonia/20/99(H1N1)、デンカ生研) 単独、または HAV(0.2 μg)-SSF(2 μg) 複合体 (HAV-SSF) の超音波処理品または凍結乾燥品に Carboxyl Vinyl polymer (CVP) 有無を組み合わせ比較した。^a $P < 0.01$ (HAV-SSF の凍結乾燥品群と比較)

^b $P < 0.05$ (HAV-SSF の超音波処理品群と比較) データはマウス $n = 10 - 15$ 匹の幾何平均値 \pm SD で示す。

2-1-2-4. 等温滴定カロリーメーターおよび示唆走査カロリーメーター測定による

SSF と抗原の混合最適条件の検討

抗原と SSF の最適混合条件の検討には、ITC カロリーメーター (ITC200、Malvern) を使用した。飽和脂肪酸鎖からなるリン脂質二分子膜は、低温では脂肪酸が結晶構造 (ゲル相) となっており流動性はないが、ある温度以上において流動的な液晶層へと転移する。液晶層では透過性が上昇するため、このリン脂質のゲル相-液相転移点を利用して、抗原と SSF の混合最適条件を、ITC カロリーメーターの測定パラメーター値を用いて評価した。また、不純物の混入したペプチド K6L16 を用いて調製した SSF ではマウスでの抗体誘導活性が低く、同時にカロリーメーター測定での抗原との相互作用が見られなかったため、カロリーメーター測定は抗原-SSF 複合体の品質評価試験に有用と考える。今後、TA instrument 社製の等温滴定カロリーメーターと示

峻走査カロリメーターで更なる詳細な解析を実施して、SSF の作用機序解明に繋げたい。

2-2. 粘膜アジュバント SF-10

SSF は抗原を樹状細胞に運搬した後、肺サーファクタントに類似した早い代謝を示して細胞内で代謝・分解され、樹状細胞への過剰な刺激による副作用が認められない利点がある反面、早く代謝されクリアランスされるためアジュバント作用の持続が困難という欠点があった。そのため体内クリアランス時間を延長させるため、SSF に増粘剤の CVP を添加し、粘膜局所での抗原-SSF 複合体の滞留時間を延長させて、粘膜細胞への抗原取り込み増強効果を高めた剤型が SF-10 である。SF-10 はアジュバント効果の持続性を高め、抗体誘導効果の大幅な増幅を可能とした。当初、CVP は和光純薬工業(株) (現 富士フィルム和光純薬(株)) 製品「カルボキビニルポリマー 105」を使用していたが、SF-10 の実用化に向けて、世界各国で医薬品添加物として承認を受けている Lubrizole 社製の「Carbopol® Polymers 971NP」に変更した。日本国内でも CVP はアレルギー用点鼻薬の医薬品添加剤として使用されている（「エージーアレルカット EXc<季節性アレルギー専用>®」）。CVP 液の調製方法は、CVP 粉末を生理食塩水で分散・懸濁し、10 wt/v %水酸化ナトリウム液で pH 7.0 - 7.5 となるよう調製した。調製後は 4°C で保管する。APCs への抗原導入能と細胞活性化能は、in vitro 試験において SSF と同等であることを確認している。

後述の「2-2-1、2-2-2」にインフルエンザ抗原(HAv)と SF-10 の複合体ワクチンのマウスの経鼻投与および経口投与の試験結果を、「2-2-3」にカニクイサルの経鼻投与試験結果を、そして第3章にマウスへの新規投与ルートである経気道投与の試験結果を述べるが、各投与部位において使用した SF-10 の最適化（抗原-SSF 組成比、CVP 濃度、投与容量）を行っている。

2-2-1. 粘膜アジュバント SF-10 を用いたマウス経鼻ワクチン投与試験

2-2-1-1. SF-10 によるマウス鼻腔内抗原提示細胞 (APCs) への抗原取り込み増強効果

抗原にインフルエンザヘマグルチニン抗原 (HA_v) (A/New caledonia/20/99/H1N1)を用いて、抗原-SF-10 ワクチンとしてマウスへの経鼻投与を行い、鼻腔内の APCs に抗原の吸収が促進されるか確認して報告した[34]。この試験で使用した HA_v-SF-10 ワクチンの調製方法は次の通りである。まず、「2-1-2-2、2-1-2-3」で述べた SSF、抗原-SSF の調製方法を元に、HA_v 溶液と SSF 懸濁液を、HA_v のタンパク質量と SSF のリン脂質量の重量比を 1:10 で混合した後に抗原と SSF を凍結乾燥し、抗原と SSF の凍結乾燥粉末 (HA_v-SSF) は使用するまで -20°C で保存した。抗原-SF-10 の調製方法は、「2-2」で述べた方法で 0.5% CVP 溶液を調製し、HA_v-SSF に 0.5% CVP 溶液を添加しボルテックス (VORTEX GENIE 2) で 1 分間混合し、HA_v-SF-10 ワクチン液とした。HA_v-SF-10 ワクチンをマウス 1 匹あたり 0.2 μg/2 μL/ nostril となるようピペットマンでマウスの両鼻へ投与した。初回免疫から 2 週間間隔で 2 回および 3 回免疫して、最終免疫から 2 週間後に血清と NW を回収した。ELISA により誘導される抗 HA 特異的 NW S-IgA 抗体価および血清 IgG 抗体価を測定した。HA_v-SF-10 ワクチンが誘導する抗 HA 特異的 NW S-IgA 抗体価は、強力な粘膜ワクチンアジュバントである poly(I:C) の約 4 倍、血清 IgG 抗体価は poly(I:C) の約 3 倍と高い誘導能を示した。また HA_v-SF-10 の 3 回免疫によって誘導された血清 IgG 抗体価は、皮下注射 2 回免疫で誘導される抗体価とほぼ同等であった。(図 4)

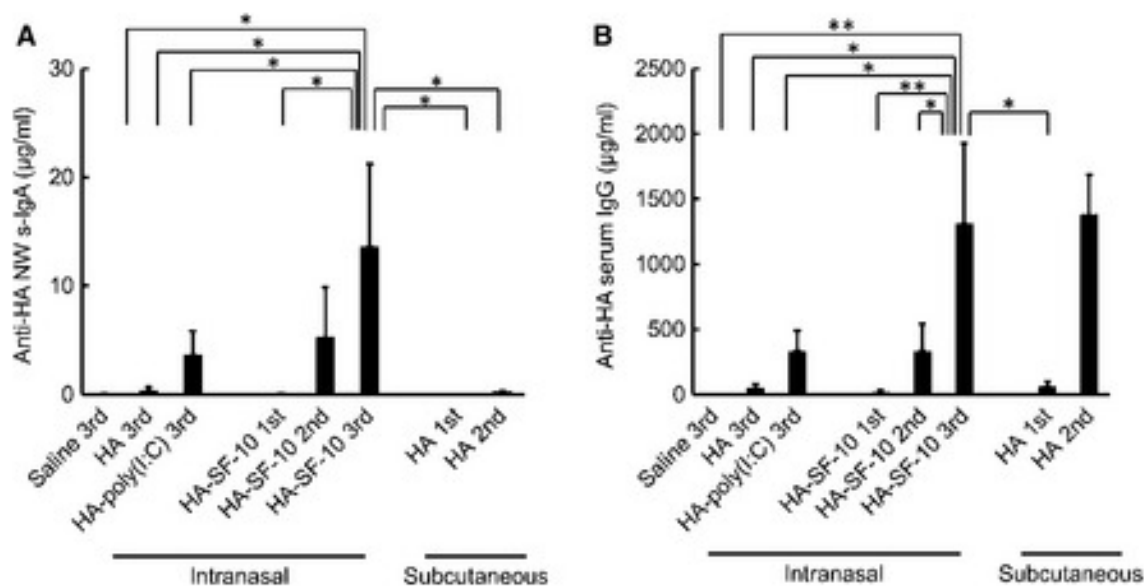


図 4 HAV-SF-10 のマウス経鼻投与で誘導された抗原特異的 NW S-IgA 抗体と血清 IgG 抗体 ([3 4]より引用) データは 8-10 匹のマウスの平均±SD で示す。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

さらに、採取した血清抗体を用いて、インフルエンザワクチンのウイルス感染防御能の指標となる国際的測定方法である HI titer(赤血球凝集阻害値：hemagglutination inhibition titer)試験を行った。測定には、ニワトリの赤血球と RDE(II)「生研」(デンカ生研)を用いて、添付プロトコールに従った。まず、購入したニワトリの血液(株)ジャパンバイオシーラム)を 50 mL 遠心チューブ(CORNING、430829)に 20 mL 添加し、PBS(nacalai tesque、14249-24)を 25 mL 添加し、遠心により洗浄する。この作業を 2 回繰り返す、最終的に PBS で 50%と 0.5%の各赤血球浮遊液を調製した。次に、RDE(II)「生研」1 バイアルを 20 mL の生理食塩水(大塚生食注)で溶解し、血清 50 µL に RDE 液を 150 µL (血清の 3 倍量) 添加しボルテックス(VORTEX GENIE 2)により混合、37°C、16~18 時間インキュベート(EYELA、SLI-400)した。インキュベート後、56°C、1 時間のインキュベートにより RDE(II)を失活させた。インキュベート後、50%赤血球浮遊液 25 µL を添加し、ゆっくり攪拌し室温で 1 時間インキュベートした(15 分おきにゆっくり攪拌する)。得られた浮遊液を遠心(2,000 rpm、5 min)し、上清を HI tier 測定に用いた。上清 50 µL を丸底 96 ウェルプレート(積水メディカル、521102)の 1 段目に添加し、プレート 2

段目から8段目にはPBSを25 μ L添加しておき、マルチピペットマンで1段目から25 μ Lを取って2段階希釈する。8段目の希釈液は廃棄する。各ウェルに8HA価のHI試薬[A/New Caledonia/20/99(H1N1)]25 μ Lを添加し、室温で30分間インキュベートし、その後0.5%赤血球浮遊液を50 μ L添加し、室温で1時間インキュベートした。血球の沈殿状態からHI tierの測定を行った結果を図5に示す。測定結果から、SF-10により誘導された血清中のHI titer値はインフルエンザワクチンの国際標準基準値 ≥ 40 をクリアし、HAv-SF-10はインフルエンザワクチンとして有効である事を確認した。

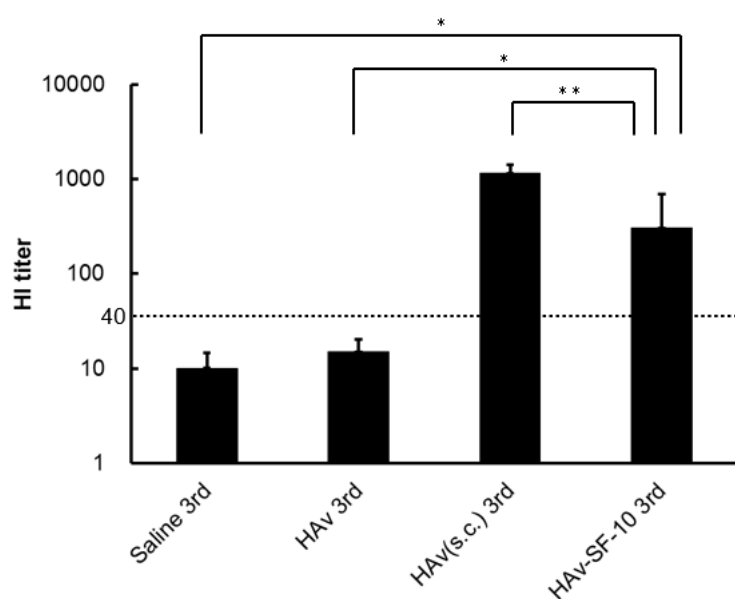


図5 マウス血清を用いたHI titer測定結果 ([34]より引用)

生理食塩水の経鼻投与[Saline(i.n.)]とHAvの経鼻投与(i.n.)、HAvの皮下注射(s.c.)またはHAv-SF-10ワクチン(i.n.)を3回接種し、最終接種から2週間後の血清のHI価を測定した。データはマウス10匹の平均値 \pm SDで示す。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

次に、HAv-SF-10ワクチンで経鼻免疫したマウスの感染防御効果を調べるために、HAv-SF-10で経鼻免疫したマウスから採取したNWからS-IgA画分を精製分離し、インフルエンザウイルス[IAV/New Caledonia/20/99(H1N1)]を用いてS-IgAによるウイルス中和活性を測定した。また、HAv-SF-10ワクチンで経鼻免疫したマウスにインフルエンザウイルス[IAV/New

Caledonia/20/99(H1N1)]で感染させ、感染後の NW および BALF を採取し、洗浄液中のウイルス力価 (Virus titer) を調べた。S-IgA 抗体の精製方法を以下に示す。

使い捨てカラム(BIO-RAD、731-1550)を Loading Buffer (0.05-0.1M Na-Phosphate、pH 7.0) 5 ml で洗浄し、これにマウス IgA 抗体のアフィニティー精製ビーズである KAPTIVE-AE(TECNOGEN)1 ml をカラムに充てんし、Loading Buffer 3 ml で洗浄する (この洗浄作業を 5 回繰り返す)。その洗浄した際にカラム下の濾液を 1.7 mL チューブ(BM Bio、BM-15)に回収し、ELISA で IgA 未検出であることを確認する。次にサンプルである NW あるいは BALF をカラムに入れて、Loading Buffer 5 ml で洗浄する (この洗浄作業を 2 回繰り返す)。予め回収エッペンチューブに pH 調整用の Neutralizing Buffer (1.0 M Tris-HCl、pH 9.0) を 100 μ L を添加しておき、その中へ IgA の Elution Buffer (0.1 M Acetic Acid) 800 μ L をカラムに添加して IgA を溶出し、回収チューブで 5 本回収する (Elution 1~5)。プレートリーダー 280 nm で Elution 1~5 の各タンパク量を確認する。タンパク量が検出されたチューブの液をプールし、これを vivaspin15(sartorius)で遠心濃縮する(2270 G \times 2 hr)。vivaspin に PBS 2 ml を添加してさらに濃縮と緩衝液置換を実施し、vivaspin 内の IgA 精製液を回収して中和試験に用いる。回収した IgA 液中の IgA 抗体量は Bethyl IgA kit(Bethyl Laboratories, Inc., E90-103)を用いて定量した。

図 6 A に精製した NW 中の S-IgA 抗体のインフルエンザウイルス[IAV/New Caledonia/20/99(H1N1)]の中和活性の測定結果を示す。結果から、S-IgA 抗体のウイルス中和効果は S-IgA 抗体の濃度依存的な防御効果を示し、S-IgA 抗体のウイルス防御効果に対する有効性を示した。

図 6 B および図 6 C に、HAV-SF-10 ワクチンで経鼻免疫したマウスにインフルエンザウイルス[IAV/New Caledonia/20/99(H1N1)]で感染させた後のマウスの NW および BALF の各洗浄液中のウイルス力価の測定結果を示す。結果から、生理食塩水または HAV を鼻腔内投与で免疫したマウスでは高いウイルス力価が検出されたが、対照的に、HA-SF-10 で経鼻免疫したマウスの鼻洗浄および肺洗浄では、ウイルス力価は検出限界以下であった。HAV-SF-10 ワクチンの経鼻投

与は致死量のウイルス攻撃に対して、病原体の侵入部位である上気道、および増殖部位である下気道で有効なウイルスに対する防御効果が示された。

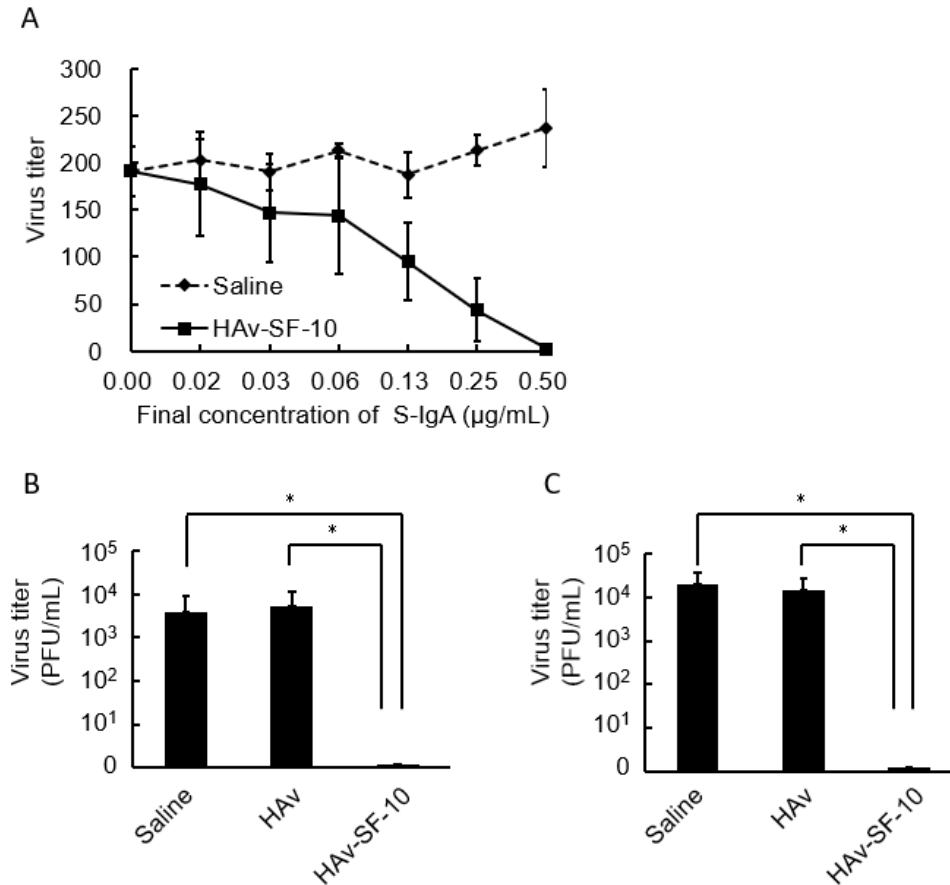


図 6 マウス NW の中和活性と NW および BALF の感染防御効果 ([34]より引用)

(A)HAv-SF-10 または生理食塩水で鼻腔内免疫したマウス (n=10) の鼻洗浄液から分離した S-IgA 画分による IAV/New Caledonia/20/99(H1N1)の中和活性測定結果。データは 3 回行った実験の平均±SD である。* $P < 0.05$ (B)および(C)は、最終免疫から 2 週間後、マウスに 5×10^4 PFU のインフルエンザウイルス[IAV/New Caledonia/20/99(H1N1)]をピペットマンで経鼻投与 ($20 \mu\text{L}/\text{head}$) することにより感染させ、感染後 4 日目にマウスの NW および BALF を採取し、各洗浄液中のウイルス力価を測定した。(B)に NW、(C)に BALF のウイルス力価の測定結果を示した。データは マウス n= 8 - 10 の平均値 ±SD、* $P < 0.05$

この報告の中で、HAv-SF-10 の鼻腔内投与は副反応の原因となる抗原特異的 IgE 抗体を誘導することなく、IL -4 産生リンパ球の誘導による全身と投与部位局所の液性免疫応答と、さらに

血清中の Th1/Th2 バランスのとれた抗原特異的 IgG1 抗体および IgG2a 抗体の誘導と鼻腔内の IFN- γ の誘導による細胞性免疫応答効果が確認された。

2-2-1-2. SF-10 添加ワクチンの経鼻投与における細胞性免疫応答

2-2-1-1. の報告の中で、我々はマウスへの HAv-SF-10 の経鼻投与により、血清中のバランスのとれた抗原特異的 IgG1 抗体および IgG2a 抗体の誘導と、鼻腔内の IFN- γ 誘導による細胞性免疫応答効果を確認できたが、さらに CD8⁺T 細胞を介した獲得免疫応答について、CD8⁺T 細胞を介した局所および全身の細胞性免疫に及ぼす影響を調査した[17]。モデル抗原である OVA(SIGMA-ALDRICH、A2512)を SF-10 と組み合わせて点鼻すると、抗原が粘膜の樹状細胞および上皮細胞に効率良く送達され、抗原提示細胞の抗原提示が促進され、SF-10 のない OVA 単独群に比べて鼻粘膜に OVA 特異的細胞傷害性 T リンパ球が高い割合で誘導された。

HA_v[A/California/7/2009(H1N1)、北里第一三共(株)]-SF-10 の経鼻免疫でも、HA_v 特異的細胞傷害性 T リンパ球を誘導し、HA_v で刺激した標的細胞への細胞傷害性に伴う脾臓 CD8⁺T 細胞のグランザイム B の発現増強を確認した。さらに、HA_v-SF-10 の経鼻ワクチン接種は HA_v 単独と比較して、インフルエンザウイルス感染の初期段階で肺および頸部リンパ節においてより高い細胞傷害性 T リンパ球を介した細胞傷害性の有意な誘導を確認できた。これらの結果は、SF-10 が抗原提示細胞への効果的な抗原情報の送達を促進して CD8⁺T 細胞を活性化し、抗原に対する細胞性免疫応答を誘導したことを示唆している。

2-2-2. 粘膜アジュバント SF-10 を用いたマウス経口ワクチン投与試験

天然肺サーファクタントは胎児期に呼吸器粘膜だけでなく消化管粘膜でも代謝されることが報告されている[39]。この生理活性機能を利用して我々は、経鼻投与と同様にインフルエンザヘマグルチニン抗原[HA_v、A/California/7/2009(H1N1)、北里第一三共(株)]と SF-10 の複合体ワクチン (HA_v-SF-10) をマウスへの経口投与 (HA_v-SF-10-PO) により有効性を検討し報告した

[40]。また、モデル抗原である OVA (SIGMA-ALDRICH、A2512) を SF-10 と組み合わせて経口投与 (OVA-SF-10-PO) すると、腸内の抗原提示 MHC II⁺ CD11c⁺ 細胞およびそれらの主要な抗原提示サブセットである CD11b⁺ CD103⁺ および CD11b⁺ CD103⁻ における抗原取り込みが増強されることを確認した。この試験で OVA-SF-10-PO は、抗原特異的全身の IgA および粘膜 S-IgA を効率的に誘導したことから、SF-10 は消化管内の Th17 および制御性 T 細胞の機能を刺激する可能性も示唆された。

また、HAV-SF-10-PO は、血清中の HAV 特異的 IgA および IgG を誘導し、気管支肺胞洗浄液、鼻洗浄液、胃抽出物および糞便物質中の HAV 特異的分泌型 S-IgA および IgG を誘導した。そのレベルは、皮下 HAV または鼻腔内 HAV および HAV-SF-10 のマウス接種によって誘導されるレベルよりも有意に高く経口ワクチン投与の優位性の可能性を示唆した。またその誘導された血清抗体は HI tier 試験でインフルエンザワクチンの国際標準基準値 ≥ 40 の防御効果を示し、その血清抗体は強力なマウス用強毒型インフルエンザウイルス [IAV/PR8/34(H1N1)] 感染に対しても強い防御免疫効果を示した。この報告では、HAV に添加する既存の一般的な粘膜アジュバントの LPS、Pam3CSK4、Poly(I : C)、CpG、CT-B、CT と SF-10 のアジュバント効果を比較検討した。CT および SF-10 以外のすべての検討したアジュバントは、経口接種のシステムではそのアジュバント作用をほとんどまたはまったく示さなかった (図 7 に示す)。SF-10 は BALF 中の HAV 特異的 S-IgA と血清中の IgG の両方を誘導したが、CT は血清中の HAV 特異的 IgG のみを誘導し、BALF 中の HAV 特異的 S-IgA は誘導しなかった。また、SF-10 によって誘導された血清中 IgG 抗体は CT によって誘導される防御免疫よりも有意に高かった。さらに、HAV-SF-10-PO では、HAV 刺激後の脾臓における独特のサイトカイン産生パターンとして、HAV 応答性 Th17 サイトカインを顕著に誘導し、IL-2 および IFN- γ など Th1 サイトカインの高い誘導、および IL-4、IL-5 および IFN- γ に示される中程度の Th2 サイトカインの誘導が確認された。これらの結果により、HAV-SF-10-PO は経鼻投与または皮下注射のワクチン接種と比べて、全身粘膜面での抗原特異的 S-IgA を誘導するような全身免疫応答と局所免疫応答を効率的に誘導することが明らかになった。

一般に経口投与されたタンパク質抗原は、胃内の低い pH 環境や消化管の消化酵素によって変性し、効果的な経口免疫を誘導することが困難とされており、我々も胃酸でインフルエンザ抗原タンパク質が分解されることを人工胃酸で確認している。この実験における SF-10 効果の作用機序の解明が待たれる。

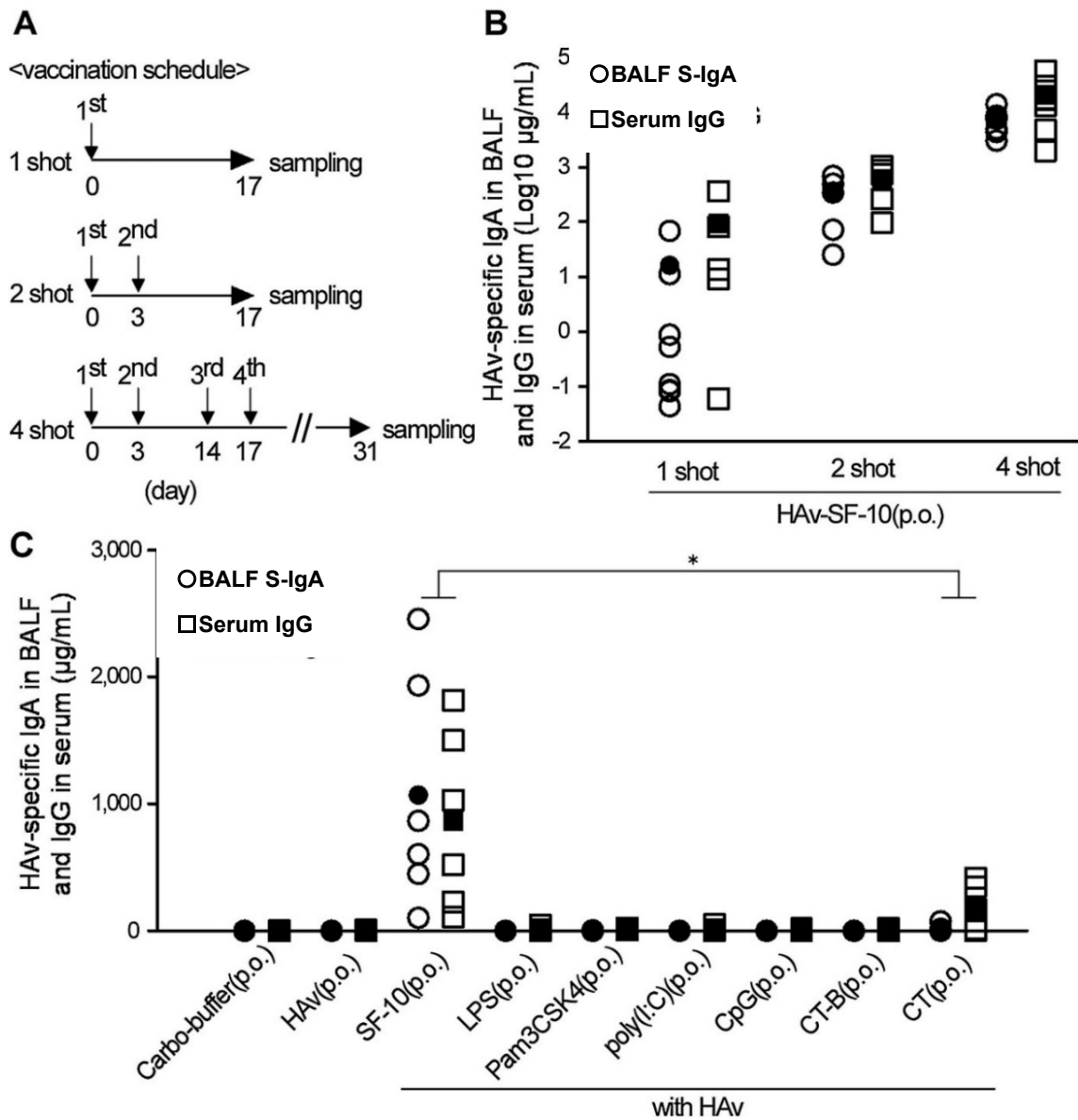


図 7 HAV-SF-10-PO のブースト効果と各アジュバント経口投与試験 ([34]より引用)

- (A) 免疫スケジュール：マウス (BALB/c、メス、7 週齢、日本エスエルシー(株)より購入) に HAV-SF-10(p.o.) (1 μg HAV、10 μg SSF、0.5% CVP) を 1-4 回免疫した。
- (B) 初回免疫、2 回目免疫、最終 4 回目免疫からそれぞれ 2 週間後に BALF 中の HAV 特異的 S-IgA 抗体価と血清中の HAV 特異的 IgG 抗体価を ELISA で測定した。
- (C) HAV-SF-10(p.o.)あるいは HAV と LPS、Pam3CSK4、poly(I:C)、CpG、CT-B または CT と組み合わせ経口免疫した。免疫から 2 週間後、BALF 中の HAV 特異的 S-IgA 抗体価と血清中の HAV 特異的 IgG 抗体価 ELISA で測定した。データは各個体 BALF の HAV 特異的 S-IgA (○) とその平均値 (●)、各個体血清中の HAV 特異的 S-IgG (□) とその平均値 (■) を表す。実験は各群 5-6 匹のマウスで独立に 2 回繰り返し、統計的有意性検定は Welch の t 検定を用いて解析した。* $P < 0.05$

2-2-3. 若齢カニクイザルを用いた SF-10 の長期メモリーの検証と鼻腔洗浄液 S-IgA の交差反応性

インフルエンザ感染の重度合併症は、2歳未満の子供や高齢者、心臓、肺、免疫系に基礎疾患のある人に最もよく見られる。先に述べたように感染予防効果のために筋肉内または皮下注射型投与ではなく、鼻腔内へのワクチン投与による安全で効率的なワクチン開発が強く望まれている。2023年に国内で承認された弱毒性ワクチン FluMist™では、2歳未満の小児では呼吸困難のリスクが高くなるため使用できない。我々は、HA_v 抗原[A/California/7/2009(H1N1)]と SF-10 を組み合わせたワクチン (HA_v-SF-10) を若年齢カニクイザルの鼻腔内に投与し、全身免疫および粘膜局所免疫の誘導とその免疫記憶維持に対する粘膜 SF-10 アジュバントの効果を調査し報告した[41]。この報告では、粘膜アジュバント SF-10 を含むインフルエンザワクチンを若いカニクイザルに鼻腔内接種すると、効果的な粘膜免疫および全身免疫が誘導され、36週間後の再接種では、最初のワクチン接種と比較して急激な抗体価の増加が確認され、効果的な免疫記憶が成立していたことを示唆した。また粘膜 S-IgA は主に変種ウイルス感染に対する交差免疫防御に関与しており、3回の経鼻ワクチン接種後の鼻腔洗浄液中の誘導抗体の交差反応性を調べた[表 4]。カニクイザルのモデルでは、長期間にわたる血清と鼻洗浄液の継続的なサンプリングと再ワクチン接種が可能であり、局所および全身的免疫応答の両方をモニタリングできる利点がある[42, 43]。

試験には、生後 30~32 か月(体重 2.4~2.8 kg)の臨床的に健康で感染症に罹患していない若い雄カニクイザル(*Macaca fascicularis*)12頭に、HA_v(15 μg)-SF-10(150 μg SSF、0.5% CVP) 複合体の接種群(4頭)と、コントロール群として SF-10 単独接種群(4頭)、HA_v 単独接種群(2頭)を設定した。それぞれの接種液を 3回鼻腔内に投与し、投与後全身免疫および粘膜免疫の誘導と免疫記憶の維持を調査した。HA_v-SF-10 群は、HA_v 抗原群および SF-10 群と比較して、血清中の HA_v 特異的 IgG および血球凝集素阻害 (HI) 力価および鼻洗浄液中の HA_v 特異的分泌型 S-IgA 誘導、その中和活性を有意に高く誘導した。また、3回目の HA_v-SF-10 ワクチン接種後の鼻

洗浄液では、H1N1 株および H3N2 株に対する有意な交差中和活性が観察された[表 4]。血清中の HI 力価と鼻洗浄液中の中和活性は、最初のワクチン接種後 6 週間でピークに達し、その後 10 週間後に徐々に低下し、36 週目でベースラインレベルに戻った。この 36 週目に HAv-SF-10 ワクチンを鼻腔内再接種すると、未処置のサルと比較して、血清および鼻洗浄液中の免疫の両方が急速かつ有意に増加して、免疫記憶の存在を示した。1 回または 2 回目の再ワクチン接種後 2 週間または 4 週間ではほぼ最大の免疫が達成された (図 8 に示す)。統計的に有意な副作用 (体重減少、体温の上昇、鼻汁、末梢血白血球および血小板数の変化など) は、HAV-SF-10 接種群、HAV 接種群、SF-10 接種群で、ワクチン接種後 2 週間の実験期間、および接種期間中で観察されなかった (図 9 に示す)。これらの若いサルモデルにおける結果は、鼻腔内インフルエンザワクチンとしての SF-10 の臨床使用の可能性を示唆した。

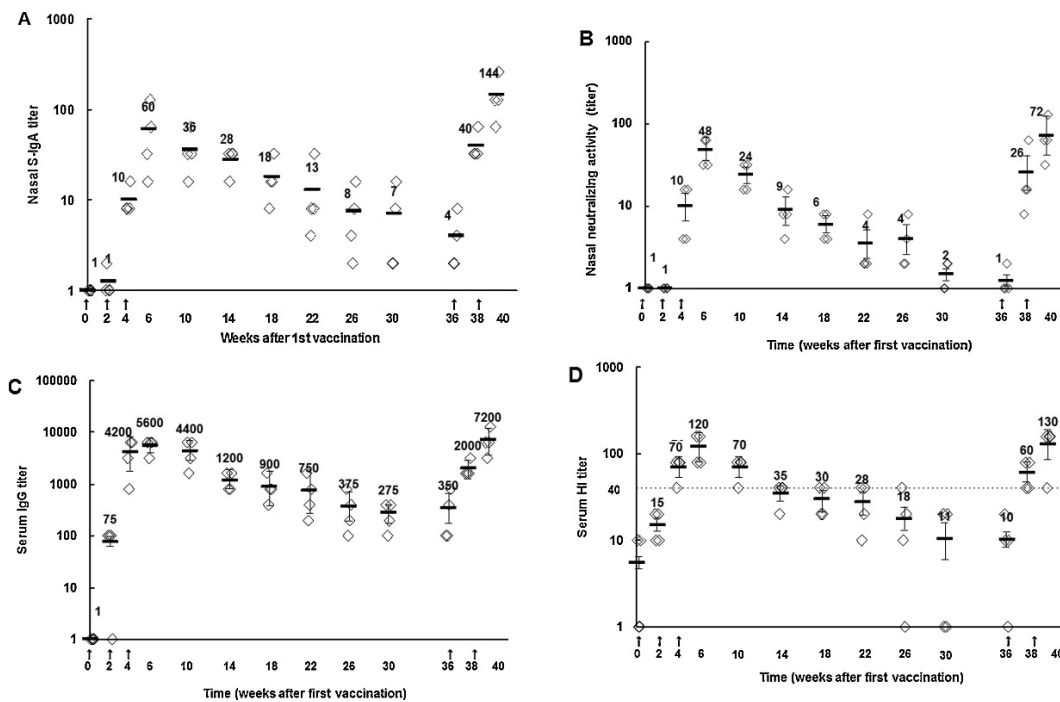


図 8 ([4 1]より引用)

1 回目のワクチン接種の 2 日目、2 回目、3 回目、4 回目、5 回目のワクチン接種の 1 日目、および実験期間中の図 8 に示した時点でサルから血清と鼻腔吸引液を採取した。血清および鼻洗浄液中の抗インフルエンザ HA 特異的抗体価を ELISA で評価した。HAV-SF-10 を接種したサルの NW 中の HAv 特異的 S-IgA 抗体価 (A)、NW の中和活性 (B)、血清中の HAv 特異的 IgG 抗体価 (C) および HI titer (D) を示す。横軸の矢印はワクチン接種を示す。データは各群 4 頭の平均抗体価 \pm SD である。

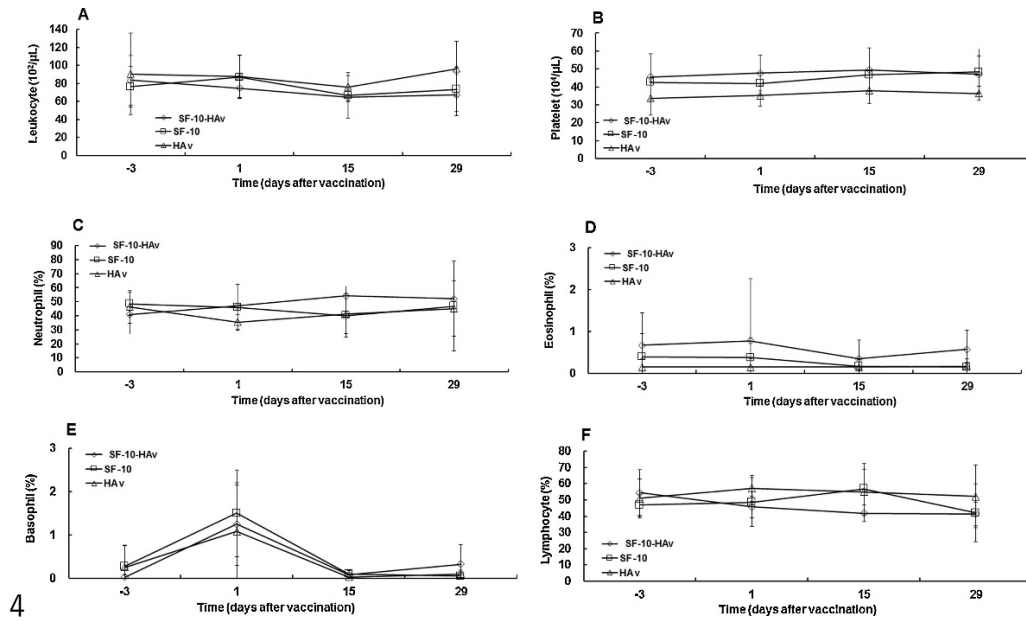


図 9 ([4 1]より引用)

図 9 A-F は、鼻腔内ワクチン接種後に得られた末梢血サンプルの白血球数 (A)、血小板数 (B)、好中球数 (C)、好酸球数 (D)、好塩基球数 (E) およびリンパ球数 (F) の変化を示す。血液サンプルは、1 回目のワクチン接種後-3 日目、および 1 回目、2 回目、3 回目の各ワクチン接種後 1 日目にサルから採取した。データは 4 頭の平均値 ± SD。

表 4 ([4 1]より引用)

Group	Animal number	Neutralizing activities				
		A/California (H1N1)	A/PR8 (H1N1)	A/WSN (H1N1)	A/Aichi (H3N2)	A/Uruguay (H3N2)
Empty Cell	Empty Cell					
	1	32	8	16	8	4
HAv - SF-10	2	64	8	32	8	4
	3	32	1	16	4	1
	4	64	1	8	1	1
	Mean ± SD titer	48.0 ± 18.0*	4.5 ± 4.0	18.0 ± 10.1*	5.3 ± 3.4*	2.5 ± 1.7
SF-10	5	1	1	1	1	1
	6	1	1	1	1	1
	7	1	1	1	2	2
	8	1	1	1	1	1
Mean ± SD titer	1.0 ± 0	1.0 ± 0	1.0 ± 0	1.3 ± 0.5	1.3 ± 0.5	
HAv	9	1	1	1	1	2
	10	1	1	1	1	1
	11	1	1	2	1	1
	12	1	1	1	1	1
Mean ± SD titer	1.0 ± 0	1.0 ± 0	1.3 ± 0.5	1.0 ± 0	1.3 ± 0.5	

2-3. 乾燥粉末粘膜ワクチン用アジュバント SF-11

輸送や保管に 4°C や超冷凍温度などの温度管理を要する従来の液剤ワクチンや COVID-19 mRNA ワクチンなどは、コールドチェーンに大きく依存し、その維持は世界中で、特に発展途上国において大きな問題である。乾燥粉末ワクチン製剤は、室温での安定性によりコールドチェーン問題を回避し、発展途上国での予防接種率向上に貢献が期待でき、さらに輸送および保管コストの低さ、使いやすさなど多くの利点を有している。また液剤ワクチンは保存と輸送のための防腐剤や緩衝剤の添加が必要であるが、乾燥粉末ワクチン製剤の開発はこれらの不安も排除可能で、より安定した有効なワクチンにつながる[45]。我々は、気道粘膜に広く分布する APCs や免疫メモリーを担う T 細胞、B 細胞免疫担当細胞にワクチン情報を伝えるワクチン剤型として、気道粘膜でのワクチンクリアランス時間を延長させて滞留時間を長くするために微粒子粉末剤型ワクチンが好ましいと考え、SSF の粉体特性を生かして応用開発した粘膜アジュバント SF-11 を開発し（国際出願特許、PCT/JP2022/004130、2022-579589）、SF-11 と抗原を組み合わせた乾燥粉末ワクチン開発に取り組んでいる。

液剤の SF-10 の場合、我々の使用している増粘剤 CVP はマウス 1 匹あたりの含有量が少ないため、凍結乾燥の粉末化工程で SF-10 添加ワクチン素材は塊や紐状となって微粒子化が困難で、気流に乗せてマウス気道粘膜に広く分散させることができにくい。そこで CVP に代わって、SSF の微粒子粉末剤型化の分散賦形剤と、吸入や噴霧の気流にワクチンを乗せるための増量賦形剤を添加した剤型が SF-11 である。高分子蛋白質抗原は、凍結乾燥に伴う立体構造変化により、一般にウイルス感染防御能の指標となる抗体価、例えばインフルエンザワクチンの場合 HA 価の低下が見られるが、SF-11 を添加して凍結乾燥した場合 SF-11 による保護作用により HA 値の低下は見られなかった。

2-3-1. インフルエンザ乾燥粉末ワクチン (HAv-SF-11) マウスへの経鼻投与試験

市販の季節性 HAv 抗原 (meiji、2020 年度) と SF-11 を組み合わせた乾燥粉末ワクチン (HAv-SF-11) を調製し (HAv-SSF 調製方法は、「2-2-1」に記載、SF-11 の組成、組成比は特許申請中で公開を控える)、経鼻投与によりマウスへ投与したところ、全身性免疫である血液中に抗原特異的 IgG 抗体および BALF 中に抗原特異的 S-IgA 抗体の有意な誘導効果を得た結果を図 1 0 A、B に示す。HAv-SF-11 接種群は HAv 単独群に比べて、血液中の抗原特異的 IgG 抗体と BALF の S-IgA 抗体を有意に誘導できた。また誘導された IgG 抗体の HI titer 測定結果を図 1 1 A、B、C、D に示す。インフルエンザ 4 価抗原[A/広東-茂南, SWL1536/2019(CNIC-1909)(A/H1N1)、A/香港, 2671/2019(NIB-121)(A/H3N2)、B/プーケット, 3073/2013(B/山形系統)、B/ビクトリア, 705/2018(BVR-11)/ビクトリア系統]のいずれにおいても、インフルエンザワクチンのウイルス感染防御能の指標となる HI 価は国際標準基準値の ≥ 40 以上を示し、HAv-SF-11 粉末ワクチンの効果を確認できた。また、マウスの強毒インフルエンザウイルス株 PR8[A/PuertoRico/8/1934(H1N1)]を用いた攻撃感染実験で、皮下注射群は約 14%の生存率を示したのに対し HAv-SF-11 群は 100%生存率を示し、有効な感染防御効果を確認できた(図 1 2)。結果から、生体成分である肺サーファクタントを基盤にした SSF の気道粘膜への取り込み効果と増量剤による増強効果を示す SF-11 粉末アジュバントは呼吸器感染症に有効と考える。免疫投与群および投与スケジュールは以下の通りである。

免疫投与群 (BALB/c、雌性、7 週齢、n= 6、日本エスエルシー株式会社より購入)

- ① Non-treat (ワクチン投与なし)
- ② HAv (8 μ g) を生理食塩水で希釈し、50 μ L を皮下注射投与した[HAv(s.c.)]
- ③ HAv (8 μ g) -SF-11 乾燥粉末ワクチンをマウスに経鼻により投与した (HAv-SF-11)。

免疫スケジュール

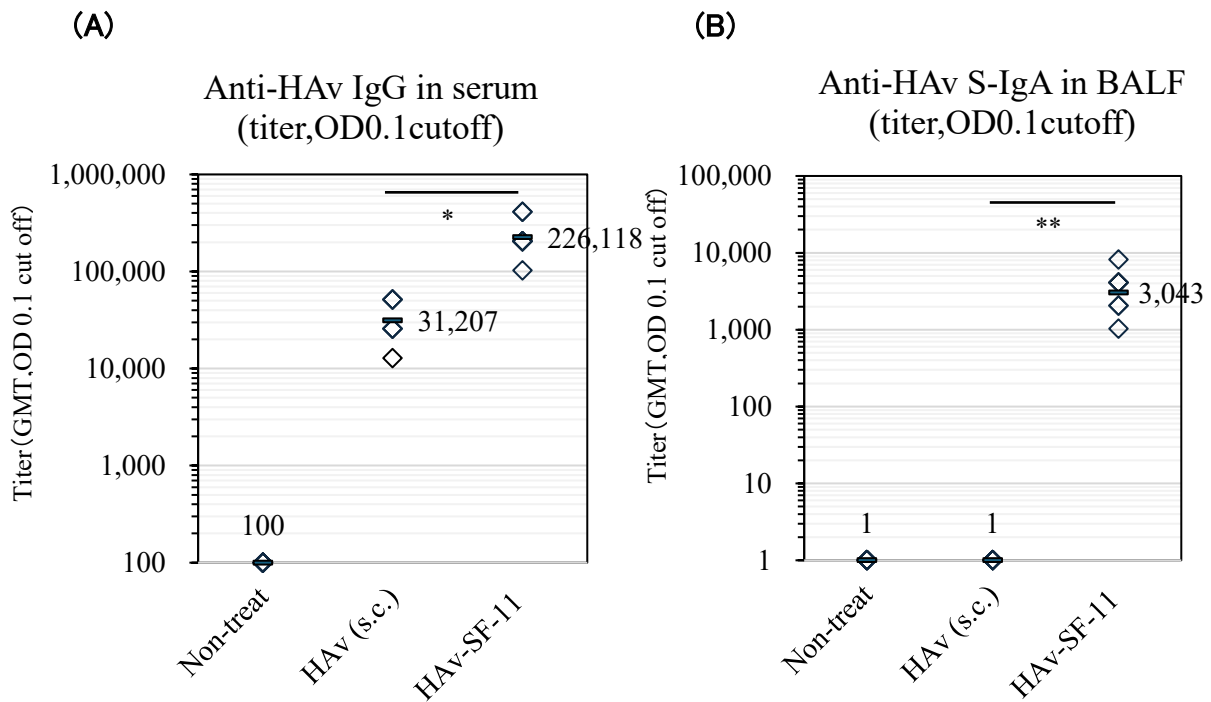
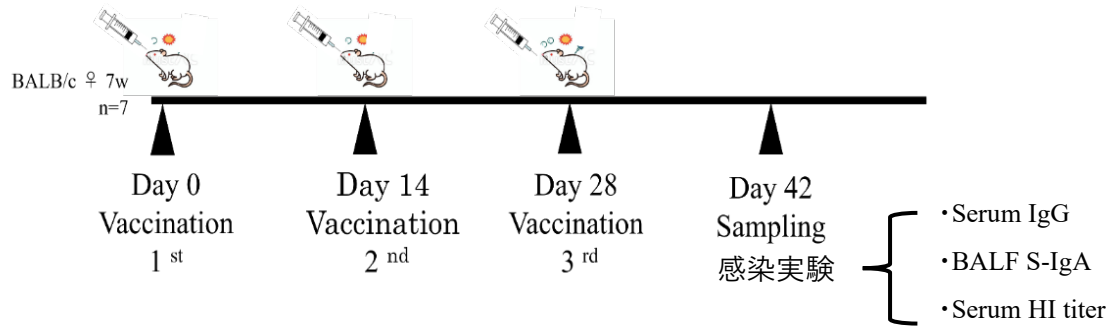


図 10 血清 HAV 特異的 IgG 抗体価および BALF HAV 特異的 S-IgA 抗体価 (堺聡子ら

2022 年度第 26 回日本ワクチン学会)

(A)、(B)共に、グラフは各投与群のマウス n=6 匹の個々の Titer 値 (◇) と、GMT(Geometric mean titer)値 (—) で示す。有意差検定は Wilcoxon 検定 * $P < 0.005$ ** $P < 0.001$

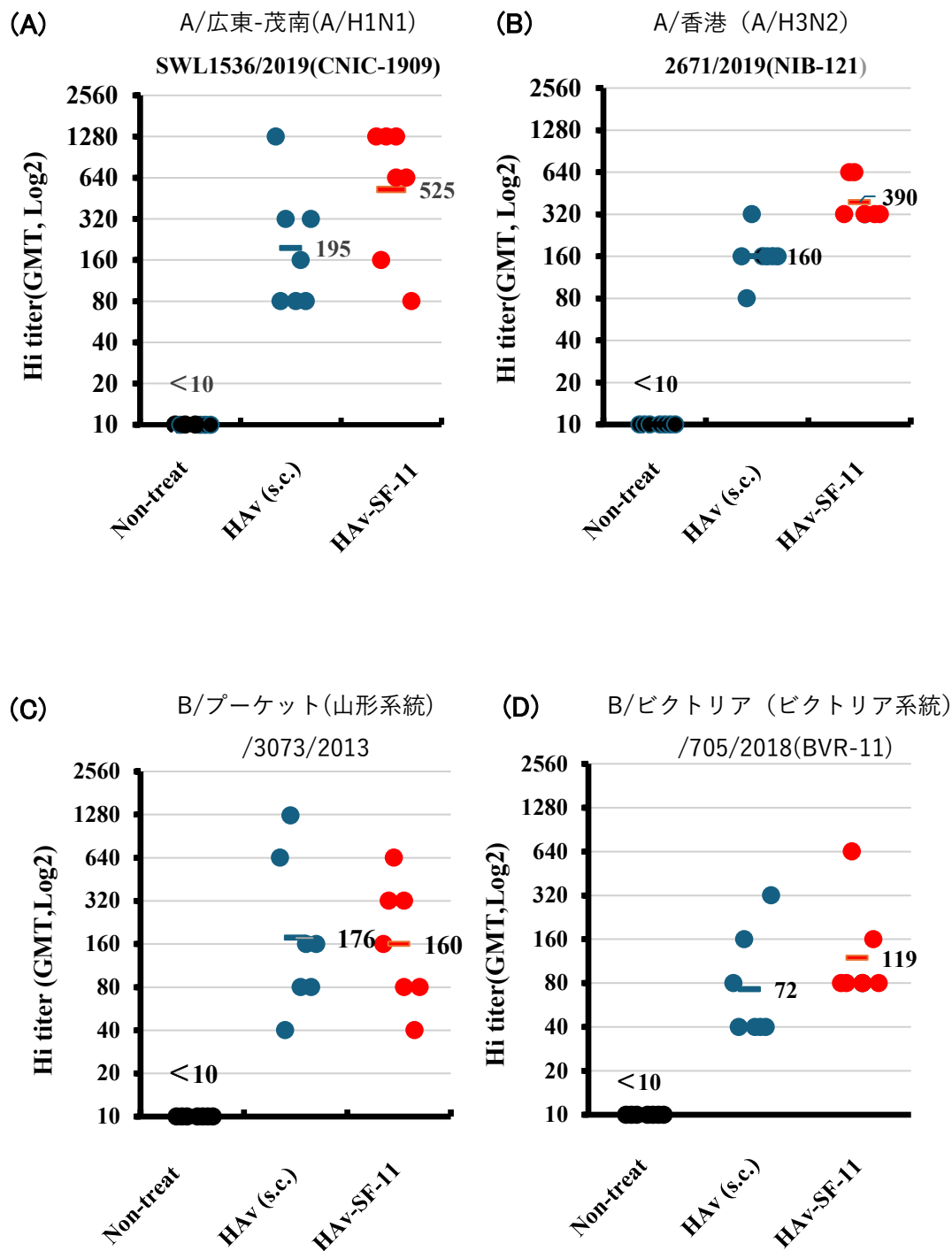


図 11 HI titer 測定結果 (堺聡子ら、2022 年度第 26 回日本ワクチン学会)

グラフは、各投与群のマウス 6 匹の個々の HI Titer 値 (○)、GMT 値 (—) で示す。

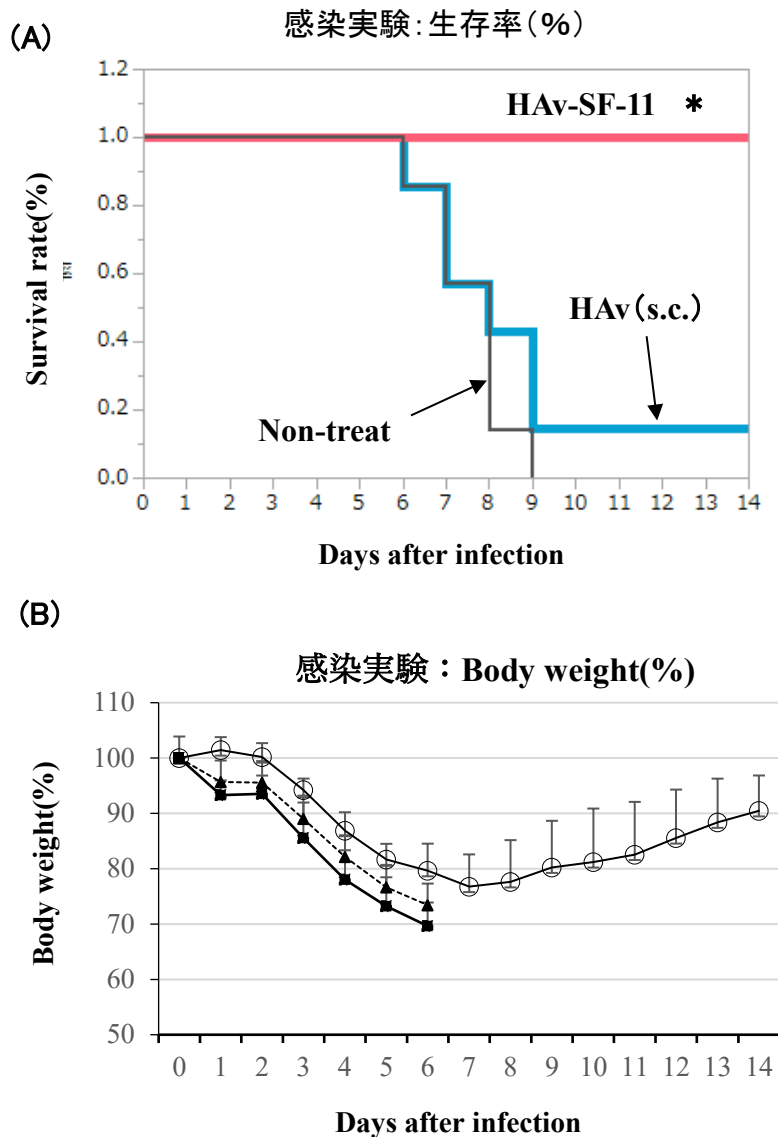


図 12 感染実験結果（堺聡子ら、2022 年度第 26 回日本ワクチン学会）

- (A) 感染実験にはマウスの強毒インフルエンザウイルス株 PR8[A/PuertoRico/8/1934(H1N1)]をマウス 1 匹あたり 20 μ L 中に 20 PFU 力価のウイルスを経鼻投与により感染させた。グラフは感染から 14 日間の 1 群あたり 6 匹の生存率(%)を示す。有意差検定は Kaplan-Meier 法 Wilcoxon * $P=0.0023$ vs HAv(s.c.)
- (B) グラフは各群 n=6 匹の GMT+SD について、HAv-SF-11 群は (○)、HAv(s.c.)群は (▲)、non-treat 群は (■) で示す。

第 3 章 新規ワクチン投与方法、Trans-Airway (TA) の検証試験

3-1. 研究目的

呼吸器に豊富に存在する DC は、肺実質と気道粘膜に局在しており、骨髄性 (mDC) と形質細胞様 DC (pDC) に分類され、多様な機能性と不均一性を有し、DC の局在に応じて取り込まれた抗原に対して異なる免疫学的活性を提供する[45]。また肺は異物粒子に継続的にさらされているため、気道には局所免疫応答を活性化することによって潜在的な抗原の侵入を克服することに特化した様々な常在マクロファージが存在する[46]。このように呼吸器は気道感染の標的臓器であると共に、極めて有望な免疫応答臓器でもある。

これまで我々は第 2 章で述べたように、呼吸器で分泌される肺サーファクタントに注目して、ヒト肺サーファクタント由来の合成粘膜アジュバント SF-10 が気道 DC への効率的な抗原送達アジュバントとして働き、インフルエンザウイルス抗原特異的血清 IgG、粘膜 S-IgA および細胞性免疫の誘導を促進することを確認している。そして今回新たに、SSF の組成となる DPPC の特徴である肺胞の気液界面への効率的な吸着作用[47]と、添加した CVP ポリマーの増粘機能から、抗原-SF-10 複合体を肺内に運搬し広く拡散することで、既存の送達システムではアクセスできない肺内 DC への効果的なワクチン送達が可能になると考えた。肺サーファクタントへのポリマー添加効果については、いくつかの非イオン性および陰イオン性ポリマーが肺胞の界面活性剤の能力を強化することが報告されている[32, 48]。薬物送達担体としての脂質ベースやポリマーベースなど様々なナノ粒子は、送達薬物の不安定性、低溶解性、毒性の課題を解決し得ることから、抗ウイルス薬やワクチンへのこれらのナノテクノロジーの使用によりウイルスの付着と宿主細胞への侵入を防ぎ、ウイルス性呼吸器感染症を標的とする薬剤開発の上で画期的な進歩とされている[45]。

さらに肺胞には薄い粘膜と高密度の血管網が分布しており、生理活性物質の迅速な吸収には理想的環境で、酵素活性も制御されているため抗原分解の確立が低く、肺に分布する DC へのワクチン送達は有望な戦略と想定される[32]。

我々は、組換え SARS-CoV-2 スパイク蛋白質 1 (S1) と SF-10 を組み合わせたワクチン (S1-SF-10) の TA 投与という新たなワクチン投与方法による全身および局所免疫に及ぼす影響を検討し報告した[38]。S1-SF-10-TA により誘導された血清と BALF 中の S1 特異的抗体 IgG 抗体および S-IgA 抗体と、誘導された抗 S1 抗体の感染防御能の指標となる S1 抗原と ACE2 との結合阻害効果を検討した。さらに免疫したマウスから採取した肺リンパ球と脾臓細胞の S1 応答性抗体分泌細胞 (ASCs) および S1 応答性 Th サイトカイン分泌細胞 (CSCs)、細胞障害性 T 細胞の誘導について検証し、抗原-SF-10 複合体の TA 投与によって増強される局所免疫と全身免疫の応答性を解析した。比較対照群として、既存の強力なアジュバントである AS03 (AddaS03™、InvivoGen、vac-as03-10)を用いた筋肉内注射 (IM) の S1-AS03-IM を用いた。

3-2. TA 投与ワクチンのマウス投与容量試験

ワクチンの TA 投与は、TA 投与に最適化した CVP 調製方法の改良により可能となった。図 1 3 に TA 投与量 (volume) の増加に伴う気道内のワクチン分布の変化と、抗体誘導効果の変化を調べた結果を示す。BALB/c、雌性 7 週齢マウス(日本 SLC 株式会社より購入)に、ワクチンとして、5 μ g の Alexa647 標識オバルブミン(fOVA、invitrogen、074781)と 50 μ g (リン脂質量) の SF-10 複合体を用い、TA ワクチン (fOVA-SF-10-TA) として接種した。TA ワクチン 10 μ L、15 μ L、20 μ L、30 μ L の各容量を、鼻腔からピペットマン(eppendorf、Reference2)で接種した。fOVA-SF-10 の調製方法は、「2-1-3」および「2-2-1」と同様の方法で調製した。マウスに fOVA-SF-10-TA を投与直後に頭部、気管、肺、食道を分離し、in vivo イメージングシステム (IVIS® Spectrum、Caliper) で fOVA の分布を解析した。図 1 3 A に fOVA-SF-10-TA の投与量を増加させた場合の気道におけるワクチン分布の変化を示す。結果より、10 μ L の

fOVA-SF-10-TA 投与では、fOVA-SF-10-TA は鼻腔内にのみ分布していたが、この投与量を 15-30 μ L に増やすと、fOVA-SF-10-TA は鼻腔から下気道へと分布した。

図 1 3 B に HAV 抗原と SF-10 のワクチン複合体の TA ワクチン (HAV-SF-10-TA) 投与量に対して誘導された血清中の HAV 特異的 IgG 抗体価の測定結果を示す。試験方法は、1 μ g の HAV 抗原[A/California/7/2009(H1N1)、北里第一三共ワクチン株式会社]と 10 μ g SSF 複合体を 0.1% CVP に溶解した HAV-SF-10 を調製し、0 日目と 14 日目に各投与量でマウスに TA 接種した。最終接種から 2 週間後の血清中に誘導された HAV 特異的 IgG 抗体価は、HA-SF-10-TA 投与量の増加と共に数十倍にまで増加した。陽性対照群として現行のワクチン接種法である HAV 抗原の皮下注射群 HAV (s.c.) を用いた。

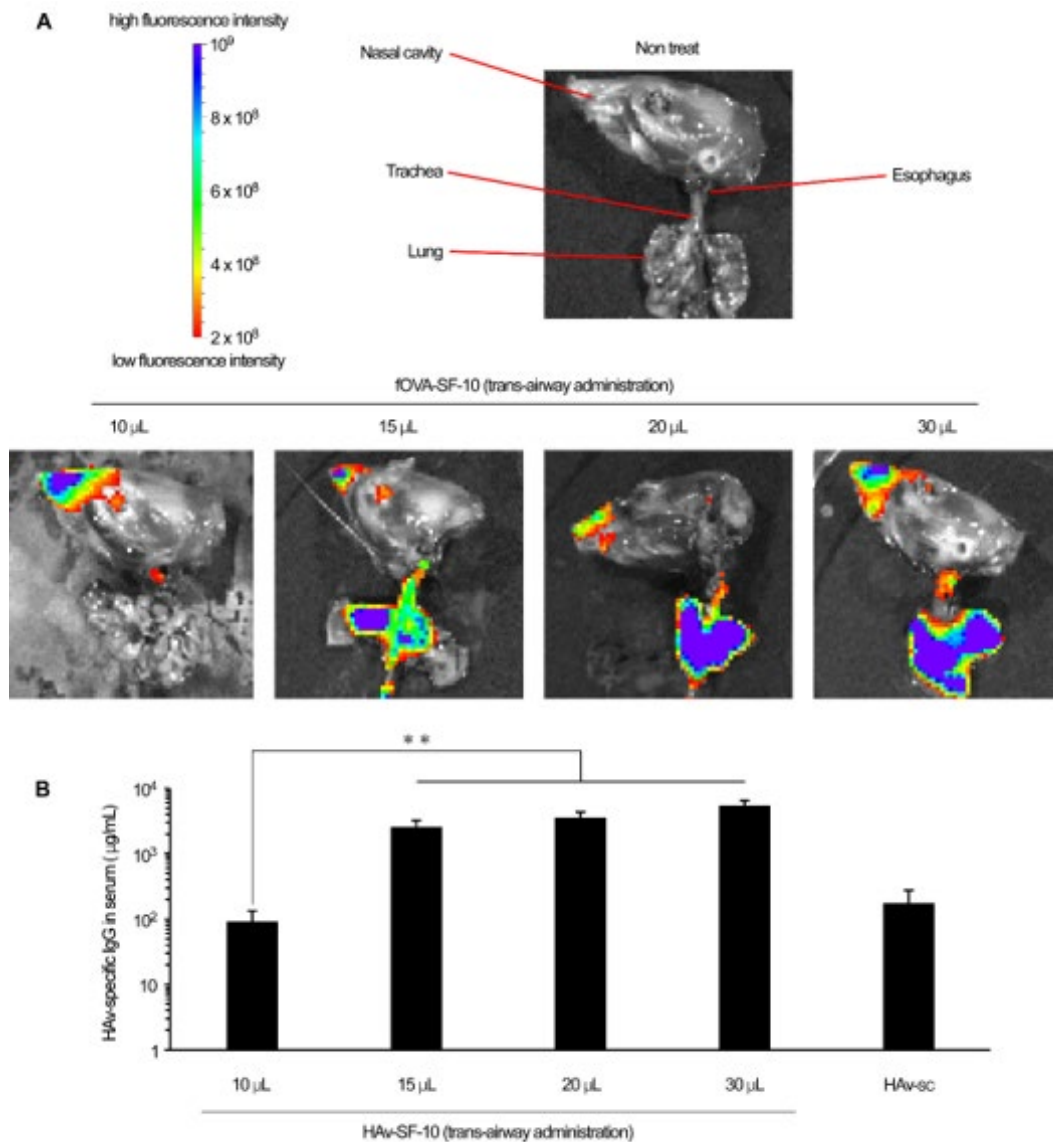


図 13 HAV-SF10-TA のマウス下気道への投与容量 (μL) 試験と抗体誘導効果 ([38] サプリメント図を引用)

(図 13 A) HAV-SF10-TA 投与量を増加させた場合の気道におけるワクチン分布

(図 13 B) HAV-SF10-TA 投与量と血清中の HAV 特異的 IgG 抗体価 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)。

データは 6 匹のマウスの幾何平均 \pm SEM である。

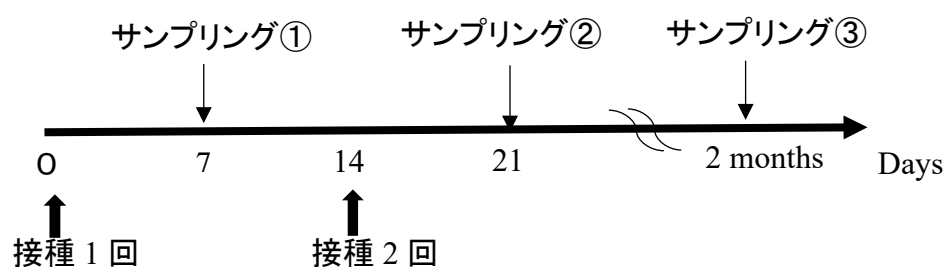
有意差検定はノンパラメトリック Mann-Whitney U-検定で解析した。 * $P < 0.01$ 。

3-3. マウス TA 投与の安全性確認試験

3-3-1. HAv-SF-10-TA 投与後のマウス肺の病理組織学的検査

TA 投与による肺への影響を調べるため、HAV-SF10-TA 投与後のマウス肺の病理組織学的検査を行った結果を表5に示す。試験方法は、BALB/c、雌性7週齢のマウス(日本エスエルシー株式会社より購入)を用いた。HAV 抗原[A/California/7/2009(H1N1)、北里第一三共ワクチン(株)]1 μg と SF-10 を(10 μg SSF、0.1% CVP 溶液)複合体の HAV-SF-10 を調製し、0日、14日に TA 投与により1匹あたり30 μL を TA 投与した。初回免疫と2回目免疫の1週間後、2週間後と2か月後にマウスから肺全体の左葉を採取し、ホルムアルデヒド液(富士フィルム和光純薬, 064-00406)で固定し、日本精化バイリス株式会社へ病理組織学的検査に依頼した。投与およびサンプリングスケジュールと投与群は次の通りである。陰性コントロール群として生理食塩水と HAV 液を HAV-SF-10 と同様にマウスに投与し、初回免疫から7日後に肺を採取し、HAV-SF-10 群と同様に処置し解析を行った。詳細な投与群とスケジュールは次の通りである。

投与およびサンプリングスケジュール



投与群 (BALB/C、雌性 7 週齢、n= 2 - 3)

サンプリング① (初回投与から 7 日後)

No.1 生理食塩水 30 μ L を TA 投与

No.2 HAv 30 μ L を TA 投与

No.3 HAv-SF-10 30 μ L を TA 投与

サンプリング② (2 回目の接種から 7 日後)

No.4 HAv-SF-10 30 μ L を TA 投与

サンプリング③ (2 回目の接種から 2 か月後)

No.5 HAv-SF-10 30 μ L を TA 投与

表 5 HAv-SF-10-TA 投与後のマウス肺の病理組織学的検査結果 (堺聡子ら未発表データ)

Organ/tissue	No.1, Saline			No.2, HA			No.3, HAv-SF-10 (7days after 1 st)		No.4, HAv-SF-10 (7days after 2 nd)		No.5, HAv-SF-10 (2months after 2 nd)	
	1	2	3	1	2	3	1	2	1	2	1	2
細気管支及び血管周囲の炎症 性細胞浸潤*	-	-	-	-	-	+	++	++	++	+	+	++
II 型上皮細胞の過形成	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
肺胞中隔の肥厚 (炎症性細胞浸潤*を伴う)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
肺胞腔内のマクロファージの集簇	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
肺胞腔内の顆粒球浸潤	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
肺胞腔内の好酸性物質の貯留	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
気管支粘膜の分泌亢進	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
出血 (血管周囲)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

* Severity grading of histopathological findings -: normal, +: mild, ++: moderate, +++: severe

* リンパ球を主とし、マクロファージ及び顆粒球を伴う。a: リンパ濾胞形成を伴う。 b: 気管支腔内の分泌物

サンプリング③は、初回免疫後の抗 IgG 誘導能の高い HA-SF-10 について、初回免疫後の肺への炎症反応の影響を長期に調べた結果である。結果から、初回免疫は HAv-SF-10 の投与群で、細気管支及び血管周囲の炎症性細胞浸潤と気管支粘膜の分泌亢進において僅かな炎症反応が確認されたが、その炎症の程度は HA 群と同様であり、SF-10 によるものではなく一過性のものであるとの見解に至った。また 2 回接種後 7 日目 (②, No.4) と初回接種から 2 か月後 (③, No.5) においても肺の病理所見に新たな所見は無く、HAV-SF-10 の TA 投与安全性は確認された。

3-3-2. S1-SF-10-TA マウス投与による体重変化確認試験

TA 投与による副反応を調べるため、2 週齢の若齢マウス(BALB/c、雌性 2 週齢、日本エスエルシー株式会社より購入)に、1 匹あたり 10 μ g S1(ACRO biosystem、#SIN-C52H3)-SF-10(100 μ g SSF、0.1%CVP)ワクチンをピペットマン(eppendorf、reference2)で鼻腔から 30 μ L を TA 投与し、初回免疫から 1 週間おきに約 1 か月間、体重測定を行った。測定結果を、図 14 に示す。結果から、ワクチン投与無し群と比較したところ、2 週齢の若齢マウスであっても S1-SF-10-TA 投与による体重減少の副反応は見られず、毛並みなど目立った外的悪変化も確認されなかった。

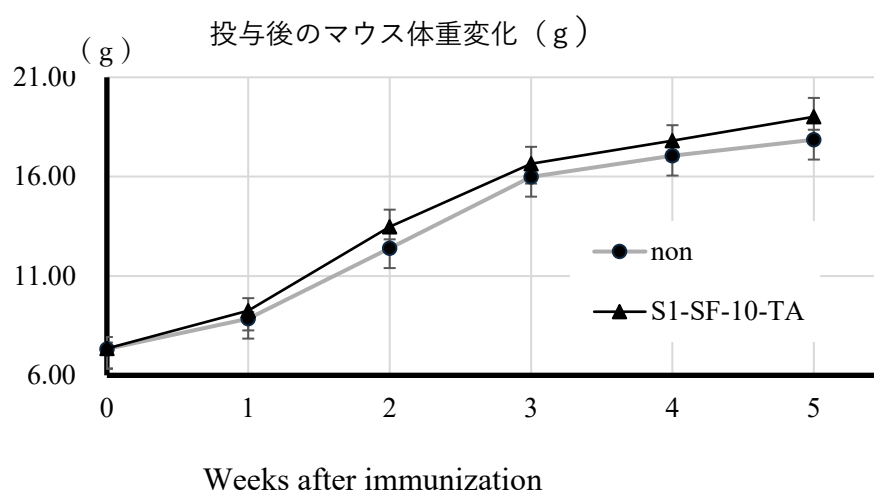


図 14 若年齢マウスへの S1-SF-10-TA 投与による体重変化 (木本貴士ら未発表データ)
ワクチン投与無し群 (●)、S1-SF-10-TA 群 (▲) で、マウス n= 8 - 10 匹の幾何平均値 \pm SEM で示す。

3-4. 新型コロナウイルス SARS-CoV-2 ワクチン S1-SF-10 の有効性評価試験

3-4-1. ワクチン抗原と実験動物

HEK293 に発現する武漢オリジナル株の SARS-CoV-2 spike protein1 の遺伝子組み換えタンパク質(S1、Assession# QHD43416.1, Val 16-Arg 685)を ACRO Biosystems(#SIN-C52H3)から購入した。マウスは雌性 BALB/c マウス (6~8 週齢) を日本エスエルシー株式会社から購入した。TA ワクチン接種前に、体重 1kg あたり 62.6 mg のケタミンと 12.4 mg のキシラジン腹腔内注射でマウスを麻酔した。

3-4-2. S1 抗原と SF-10 複合体、S1-SF-10 ワクチンの調製方法

SSF の調製方法は「2-2-1」に述べたとおりである。S1-SSF 複合体の調製方法は、調製した SSF 懸濁液に S1 液を、S1 タンパク質量：SSF (含有リン脂質量) = 1 : 10 となるよう添加し、添加後水浴で 42°C で 10 分間加温し、S1-SSF 複合体を形成し、その後凍結乾燥により S1-SSF 複合体を調製し使用まで -20°C で保存した。マウスへの投与前に凍結乾燥した S1-SSF 粉末に 0.1% CVP 溶液を添加して S1-SF-10 ワクチン液とした。

3-4-3. 免疫およびサンプリング方法

マウスへの免疫は、初回免疫から 2 週間ごとに 2 回または 3 回、S1 と SF-10 複合体ワクチン (S1-SF-10) をマウスの鼻腔内にピペットマンで 30 μ L を TA により接種した (S1-SF-10-TA)。陰性対照群のマウスには、S1 抗原単独 10 μ g を生理食塩水で懸濁した 30 μ L をピペットマンでマウスに TA 投与 (S1-TA)、或いは 1 プラスチックシリンジ(テルモ、SS-01T)で 50 μ L を筋肉内 (大腿筋) に注射 (S1-IM) した。陽性対照群にはアジュバント AS03 を添付説明書に従って調製した S1-AS03 ワクチン(S1-AS03)をプラスチックシリンジで 50 μ L 筋肉内に注射し

た(S1-AS03-IM)。S1-TA、S1-IM、S1-AS03の投与はS1-SF-10-TAと同じ投与スケジュールで行った。最終免疫から2週間後に、血清および気管支肺胞洗浄液(BALF)、脾臓と肺を採取し、脾臓と肺のリンパ球を単離精製した。

3-4-4. 肺と脾臓リンパ球の単離精製

3-4-4-1. 脾臓リンパ球の単離精製方法

ワクチン接種3回目の最終免疫から2週間後にマウスの脾臓と肺を摘出し、各組織のリンパ球を単離精製した。脾臓摘出後にGF RPMI[RPMI1640、10 μ g/mL gentamycin(nacalai tesque、1672-04)、2%非働化 FBS(Japan Bio serum s1780500)]中で低温(氷上 or 4°C)保管し、90 μ m ステンレスメッシュ(アズワン SANPO)で物理的にすりつぶし、3 mL の GF RPMI に懸濁して遠心用チューブ(FALCON 352063)に回収し遠心した(4°C、300G、5 min、TOMY EX-125)。上清をデカンテーションで廃棄する。溶血剤(154.4 mM NH₄Cl、14.2 mM NaHCO₃、0.1 mM EDTA-Na、pH 7.3)を1 mL 添加し、1分後にGF RPMI 3 mL を添加した。細胞をよく分散させ、40 μ m ステンレスメッシュに通す。濾液をFACS tube に回収し、遠心した(4°C、300G、5min)。上清をデカンテーションで廃棄し、cRPMI[RPMI1640(nacalai tesque、01576)、10 mM HEPES(gibco、15630-80)pH 7.2、1 mM sodium pyruvate (SIGMA、S8636)、1% MEM non-essential amino acids solution(SIGMA、M7145)、14.3 μ M 2-mercaptoethanol(FUJI フィルム和光純薬株式会社、137-06862)、10 μ g/mL gentamycin、10%非働化 FBS]を3 mL 添加し細胞数をカウント(Logos、LUNA-II、LUC-15-00349)し、フローサイトメトリーおよびElispot 実験に使用した。

3-4-4-2. 肺リンパ球の単離精製方法

脾臓と同様に、肺も摘出後 GF RPMI 中で低温(氷上 or 4°C)保管する。10 mL ガラス瓶(アズワン、3-1599-05)に肺を入れて解剖用ハサミでミンスする。ミンスを終えたガラス瓶に攪拌子とコラゲナーゼ処理用培地(1 mg/mL collagenase(FUJI フィルム和光純薬株式会社、032-22364)、2% FBS RPMI)7 mL を添加し、37°Cで 40 分間、攪拌・反応させて細胞を分離する。反応後の細胞懸濁液を 250 μ m ステンレスメッシュに通し、濾液をラウンドチューブ(FALCON、352059)に回収する。遠心後、上清をデカンテーションで廃棄する。溶血剤 1 mL を添加し、1 分後に GF RPMI を添加し遠心する。細胞ペレットに 40% Percoll(GE Healthcare、17-0891-01)を 3.2 mL 添加して細胞を懸濁する。予め 75% Percoll 2 mL をラウンドチューブに添加しておき、そこへ細胞懸濁液を添加して重層とし密度勾配遠心法にてリンパ球を分離する。遠心(20°C、800G、22min、加速・減速ともに low) 後、中間層のリンパ球分画を 14 mL ラウンドチューブに回収する。回収後、GF RPMI を 5 mL 添加し、遠心する(4°C、300G、5 min)。上清をデカンテーションで廃棄した後、cRPMI を 3 mL 添加し、40 μ m ステンレスメッシュに通す。濾液を FACS tube に回収して遠心し、上清をデカンテーションで廃棄し、cRPMI を 0.5 mL 添加して細胞数をカウントし、その後の Elispot 実験に用いた。

3-5. 分析および測定解析

3-5-1. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

血清中の S1 特異的 IgA 抗体および IgG 抗体、および BALF 中の S1 特異的 S-IgA 抗体および IgG 抗体を ELISA で測定した。96 ウェルプレート (Thermo Scientific、430341) に S1 抗原タンパク質 (0.1 μ g/well) を ELISA Coating Buffer (Bethyl Laboratories、E107) 中に懸濁して各

well に 100 μ L 添加し、4°Cで一晩インキュベートした。ブロッキング剤[50 mM Tris-HCl (Nacalai tesque、35434-34)、0.14 M NaCl(Nacalai tesque、31320-05)、1%BSA(Nacalai tesque、01859-47)、特級塩酸(Nacalai tesque、18321-05)で pH 8.0 に調製]を各 well に 200 μ L 添加し、37°Cで 2 時間ブロッキングした。ブロッキング液を廃棄後、サンプル希釈液 [ブロッキング剤、0.05% Tween20(ポリオキシエチン(20)ソルビタンモノラウレート、FUJI フィルム和光純薬株式会社、167-11515)]をプレート 2 段目以降の各 well に 100 μ L 添加した。サンプル添加は、プレート上段 1 段目に血清は 100 倍希釈、BALF は 2 倍希釈となるよう各 well に 200 μ L 添加し、プレート下段 8 段目まで各 well に 100 μ L ずつ 2 段階連続希釈し、最終 8 段目の希釈液は廃棄した。サンプル添加したプレートは 37°Cで 2 時間インキュベートした。プレートに洗浄液 (50mM Tris-HCl、0.14M NaCl、0.05% Tween 20、特級塩酸で pH 8.0 に調製) を各 well に 200 μ L 添加して廃棄し、この洗浄作業を 6 回繰り返した。洗浄後紙タオルでプレートを叩いて水気をしっかりふき取ったプレートに、二次抗体を各 well に 100 μ L 添加し 37°Cで 2 時間インキュベートした。二次抗体にはサンプル希釈液で HRP 抗マウス IgG 抗体 (SIGMA ALDORICH、A3673-1ML) を 10,000 倍希釈、HRP 抗マウス IgA 抗体 (SIGMA ALDORICH A4789-1ML) を 3,000 倍希釈して用いた。インキュベート後、二次抗体液を廃棄し、各 well を 6 回洗浄した (200 μ L/well) 。洗浄したプレートを紙タオルで叩いて水気をしっかりふき取り、TMB Microwell Peroxidase Substrate System (KPL,5120-0047) を各 well に 100 μ L 添加した。常温で 15 分間反応させたのち、2 N 硫酸(富士フィルム和光純薬、192-04696)液を各 well に 50 μ L 添加して反応を止めた。発色したプレートの 450 nm の吸光度をプレートリーダー (Molecular Devices、SpectraMax®ABS Plus) で測定し、光学密度(OD)が 0.1 以上であるサンプルの最高希釈 titer の逆数を抗体価と定義した。

3-5-2. アンジオテンシン変換酵素 II (ACE2) 結合阻害試験 (BI)

ACE2 inhibitor Screening Colorimetric Assay kit (BPS Bioscience、 # 79954)を使用して、血清および BALF 中に誘導された S1 特異的抗体における S1 スパイクと ACE2 との結合阻害効果を分析した。実験手順は 96 ウェルプレート (Thermo Scientific、 430341)と 2 N 硫酸液以外は全てキット添付試薬を用いて添付説明書に従って実験を行った。まず 96 ウェルプレートに Spike S1 蛋白質をコーティングした後、血清と BALF を血清は 100 倍希釈から 1/3200 の希釈液と、BALF は 1/2~1/64 希釈液を 50 μ L/well 添加し、室温で 1 時間インキュベートする。陰性群にはサンプル希釈液を添加する。インキュベート後、ACE2-Biotin 液を 20 μ L/well 添加し、室温で 1 時間反応させる。プレート内を洗浄後、Streptavidin-HRP を 100 μ L/well 添加して 1 時間インキュベートする。プレート内を洗浄後、TMB を 100 μ L/well 添加し発色反応させた。生成された発光体は、プレートリーダーを使用して 450 nm の吸光度で測定した。BI(%)は以下の式より求めた。結合阻害(%)=[(検体非存在下での OD 値) - (検体存在下での OD 値)]/ (検体非存在下での OD 値) \times 100

3-5-3. ELISPOT (Enzyme-Linked Immune Spot) assay

3-5-3-1. ELISPOT ASC 測定方法

予め Multi Screen 96well プレート (Millipore、 MSIPS4510)内の各 well を PBS で 3 回洗浄 (200 μ L/well)したのち、S1 抗原 (ACRO biosystem)を 1 μ g/100 μ L/well となるよう PBS で希釈して添加し、4°Cで一晩コーティングする。翌日、プレート内のコーティング液を廃棄し、各 well を PBS で 3 回洗浄 (200 μ L/well)したのち、1 %BSA PBS ブロッキング液を添加 (200 μ L/well)し、37°C、1-2 時間インキュベートする。ブロッキング液を廃棄し、コーティン

グされたプレートに精製した肺リンパ球を播種(2×10^5 cells/100 μ L/well)し、その上に S1 を 1 μ g/50 μ L/well となるよう cRPMI に添加して調製・添加し、37°C、5%CO₂、4 時間インキュベートした。脾臓リンパ球の培養培地には、cRPMI に免疫刺激剤である R848(NOVU、NBP2-26231)と IL-2(Biolegend、575406)を各々 2 μ g/mL と 20 ng/mL となるよう添加して用いた。コーティングされたプレートに脾臓リンパ球を播種(1×10^6 cells/100 μ L/well)し、37°C、5%CO₂、24 時間インキュベートした。いずれのプレートにおいても陰性群には S1 の代わりに cRPMI 培地を添加した。インキュベーション後、各 well を 3 回 PBS-T(0.05% tween20 in PBS) で 3 回洗浄(200 μ L/well)した。洗浄後、PBS-T で抗マウス IgG 抗体(SIGMA ALDORICH、A3673-1ML)を 10,000 倍希釈、抗マウス IgA 抗体(SIGMA ALDORICH A4789-1ML)を 3,000 倍希釈した二次抗体液を添加(100 μ L/well)し、37°C、2 時間インキュベートした。インキュベート後プレート内の二次抗体液を廃棄し、各 well を PBS で 3 回洗浄(200 μ L/well) 後、発色液 AEC を添加(100 μ L/well)し、暗い場所で 30 分間反応させた。反応後はプレート内の反応液を廃棄し、各 well を超純水で 3 回洗浄(200 μ L/well)した。発色液 AEC の調製方法は、DMF で溶解した 0.13 mM 3-amino-9-ethylcarbazole (SIGMA ALDORICH、A5754)と 0.05M 酢酸ナトリウム(FUJI フィルム和光純薬株式会社、192-01075)の混合液を 0.45 μ M のフィルター(IWAKI、8220500)をろ過して使用した。プレートを乾燥後、S1 特異的 ASC スポットを検出し、ASC スポットの数のカウントした(Immuno Spot S6)。AEC の調製方法は、AEC[3-amino-9-ethylcarbazole(Sigma、A5754)]を DMF[N,N-Dimethylformamide(Sigma、D4551)]に溶解し 12.5 mg/mL AEC 溶液を調製する。AEC 溶液を 400 μ L に 0.05M 酢酸ナトリウム 18 mL を添加し、0.45 μ m フィルターろ過する。ろ液に過酸化水素水(富士フィルム和光純薬、081-04215)を 20 μ L 添加し、発色液とする。

3-5-3-2. ELISPOT CSC 測定方法

S1 応答性 Th サイトカイン分泌細胞 (CSCs) の検出は、ELISpot BASIC kit の添付文書に従って測定した。まず、MultiScreen 96 ウェルプレート (Millipore、MSIPS4510) を 35% エタノール水で洗浄後、各サイトカインキャプチャー抗体をプレートに添加 ($100 \mu\text{L}/\text{well}$) して表面コーティングした (4°C 、一晚)。コーティング量は各サイトカインの添付文書に従った。コーティング後各 well を PBS で 5 回洗浄 ($200 \mu\text{L}/\text{well}$) し、精製した脾臓および肺リンパ球細胞を、肺は $1 \times 10^5 \text{ cells}/50 \mu\text{L}/\text{well}$ 、脾臓は $1 \times 10^6 \text{ cells}/50 \mu\text{L}/\text{well}$ となるよう cRPMI で調製して各 well に播種し、その上に S1 を $1 \mu\text{g}/50 \mu\text{L}/\text{well}$ となるよう添加し、 37°C 、5%、 CO_2 、24 時間インキュベートした。陰性対照群には cRPMI を $50 \mu\text{L}/\text{well}$ 添加した。インキュベート後、プレートを PBS で 2 回洗浄 ($200 \mu\text{L}/\text{well}$) し、0.5% FCS/PBS 溶液に各サイトカイン検出用抗 Mouse ビオチン抗体 IFN- γ (MABTECH、3321-2H)、IL-4 (MABTECH、3311-2H)、IL-17A (MABTECH、3521-2H) を添付文書に従って希釈調製して $100 \mu\text{L}/\text{well}$ 添加した。添加後、室温で 2 時間インキュベートし、その後、プレートを PBS で 2 回洗浄 ($200 \mu\text{L}/\text{well}$)、HRP ストレプトアビジンを 0.5% FCS/PBS 溶液に 100 倍希釈で調製して $100 \mu\text{L}/\text{well}$ 添加し、室温で 1 時間インキュベートした。インキュベート後、プレートを PBS で 2 回洗浄 ($200 \mu\text{L}/\text{well}$) し、ELISPOT ASC assay と同様の発色液 AEC を $100 \mu\text{L}/\text{well}$ 添加して Th CSC のスポットを検出した。CSC スポット数は、ELISPOT カウンターでカウントした。

3-5-4. フローサイトメトリー

調整した脾臓リンパ球を 24 well プレート (Greiner bio-one、662-160) に播種 ($1 \times 10^6 \text{ cells}/100 \mu\text{L}/\text{well}$) し、その上に S1 を $1 \mu\text{g}/50 \mu\text{L}/\text{well}$ となるよう cRPMI で調製して

添加し 37°C、5%、CO₂条件下で 3 日間培養した。培養後、細胞内サイトカインの Granzyme B を検出するために BD Cytfix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution Kit (BD、554714) を用いて細胞の固定化と透過化の処置を実施し、蛍光色素標識抗サイトカイン抗体により染色した。染色液には、1% FBS PBS(-)(Nacalai tesque、14249-24)液を 0.22 μ フィルター(Thermo、SCGVU02RE)で滅菌濾過して使用した。まずキット添付試薬の BD GolgiStop™ Protein Transport Inhibitor を培養液に添加し、37°C、5%、CO₂、6 時間培養した。培養後、well 内の細胞を遠心用チューブに回収し、遠心 (4°C、300G、10 min、TOMY EX-125) して上清を廃棄し、ペレットの細胞を BD Perm/Wash™ Buffer 1mL で洗浄した(4°C、300G、5 min、TOMY EX-125)。洗浄は同じ条件で 2 回繰り返した。次に、Fc ブロック液(BD Fc Block™、553142)を染色用 Buffer で希釈して添加し(1 μg BD Fc Block/1 × 10⁶ cells in 100 μL of 1%FBS PBS) , 非特異的に結合する Fc レセプターをブロックした(4°C、15 min) 。反応後 2 回洗浄し、次に細胞の表面マーカーの抗マウス CD3 (BioLegend、100204)と抗マウス CD8 α (BioLegend、100708)をメーカー推奨濃度に従って染色液で調製して添加し、4°C、30 分間反応させて染色した。反応後 2 回洗浄してから、BD Transcription Factor Buffer Set(BD Biosciences)で固定・透過化し、抗マウス Granzyme B(BioLegend、515406)をメーカーの推奨濃度で添加し、4°C、30 分間反応させて染色し、反応後 2 回洗浄した後、フローサイトメトリーにかけるとまで 4°Cで保管した。フローサイトメトリーは、CytoFLEX(Beckman Coulter)と Flowjo software(BD Biosciences)を用いて Granzyme B 産生 CD8⁺ T 細胞を細胞内染色により検出した。

3 - 6 . 検証結果

図 1 5 に、血清中の S1 特異的 IgG 抗体価 (図 1 5 A) と BALF の IgA 抗体価 (図 1 5 B) を測定した結果を示す。S1-IM と S1-TA は、S1 特異的 IgG を低レベル誘導した。これとは対照的に、S1-SF-10-TA は、S1 抗原単独処理例の 100 倍以上の顕著な S1 特異的 IgG を血清中に誘導

した (図 15 A)。一方、BALF における S1 特異的 S-IgA の誘導は、 $1\mu\text{g}$ および $10\mu\text{g}$ の S1-SF-10-TA 群でのみ検出され、S1-IM、S1-TA 群では検出されなかった (図 15 B)。

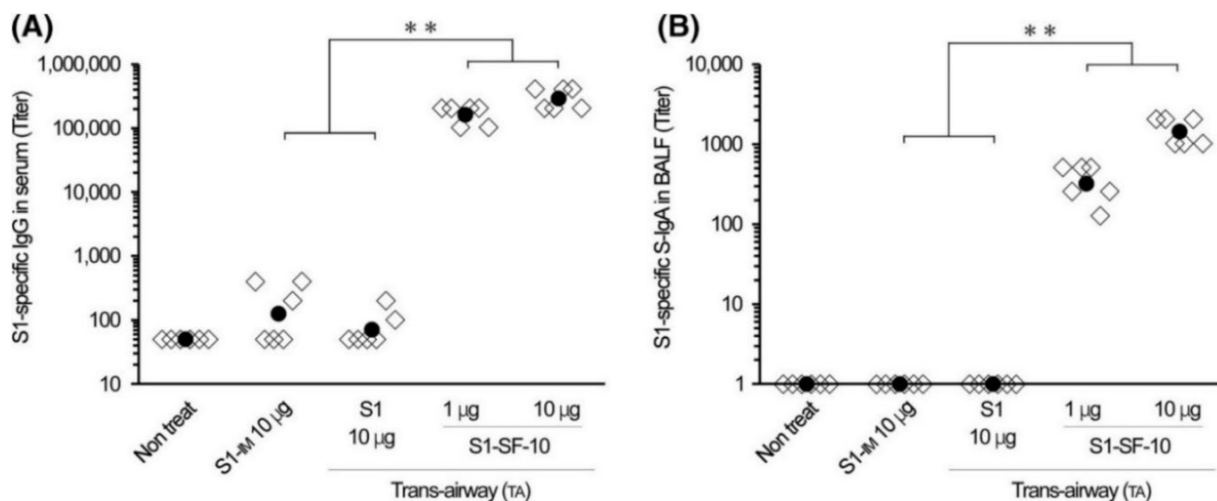


図 15 血清および BALF 中の S1 特異的 IgG および IgA 抗体の検出 ([38]より引用)

データはマウスの S1 特異的抗体価 (◇) とその幾何平均値 (●) を表す。(1 群あたり 6 匹)。

有意差検定はノンパラメトリック Mann-Whitney U-検定で解析した。** $P < 0.01$ 。

図 16 に、S1-SF-10-TA を異なる免疫回数 (2 回あるいは 3 回) 処置したマウス血清および BALF の S1 特異的 IgG および IgA、S-IgA 抗体価測定の結果を示す。陽性対照群として、S1-AS03-IM、陰性対照群には処置無し (ワクチン投与無し) 群を示す。S1-SF-10-TA の免疫回数が 2 回から 3 回増加するに伴って血清の S1 特異的 IgG 抗体は増加したが、共に S1-AS03-IM と同レベルの誘導であった。一方、BALF 中の S1 特異的 IgG 抗体は S1-SF-10-TA の 2 回免疫から 3 回免疫の増加に伴って抗体価は増加したが、共に S1-AS03-IM よりも高い抗体価を示した。また血清中 S1 特異的 IgA 抗体においては、S1-SF-10-TA は 2 回から 3 回免疫に増加に伴い、明らかな抗体価の増加を確認したが、S1-AS03-IM の場合は血清および BALF 中の S1 特異的 IgA、S-IgA 抗体の誘導は見られなかった (図 16、A-D)。また、S1-IM は血清および BALF で共に S1 特異的 IgG および IgA、S-IgA 抗体誘導は極めて低レベルであった。

S1-SF-10-TA より誘導された S1 特異的抗体の S1/ACE2 BI 試験では、S1-SF-10-TA の 2 回免疫血清は S1-AS03-IM より高い結合阻害力を示し、3 回免疫血清になると S1-AS03-IM と S1-

SF-10-TA はほぼ同等の結合阻害力を示し (図 16 E、図 16 G) た。BALF においては 2 回免疫から 3 回免疫になると共に、結合阻害力は大きく増加したが、共に S1-AS03-IM に比べて S1-SF-10-TA は強い結合阻害力を示した (図 16、F-H)。

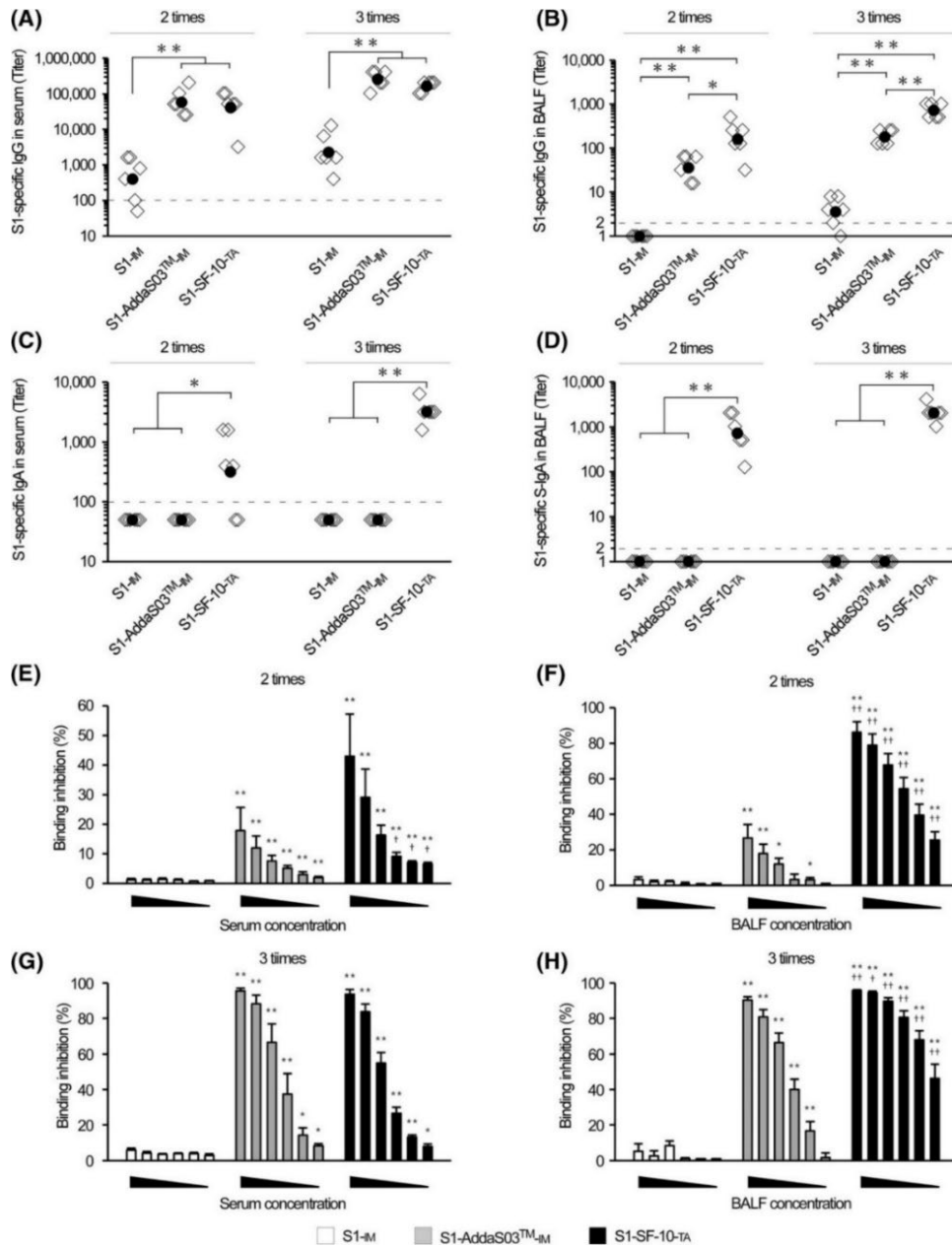


図 16 ワクチン投与回数と血清と BALF 中の S 特異的 IgG、IgA および S-IgA の抗体誘導効果 ([38]より引用)

有意差検定はノンパラメトリック Mann-Whitney U-検定で解析した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

図 A、B、C、D のデータはマウス 6 匹の各抗体価 (◇) を示し、6 匹の幾何平均値 (●) を表す。

図 E、F、G、H は、血清および BALF の ACE2 BI (%) 測定結果で、各群マウス 6 匹の幾何平均値 ± SEM を示す。図内の表示は、S1-IM (□)、S1-AddaS03™-IM (■)、S1-SF-10-TA (■)

図 17 に、ELISPOT assay

による脾臓の S1 特異的 IgG ASCs (A)、脾臓の IgA ASCs (B)、肺の IgG ASCs (C)、および肺の IgA ASCs (D) を示す。結果から、S1-SF-10-TA は、脾臓と肺に S1 特異的 IgG ASCs および IgA ASCs を効果的に誘導した (図 17、A-D)。一方、S1-AS03 は、脾臓の S1 特異的 IgG ASCs でのみ S1-SF-10-TA より多く観察され、S1-SF-10-TA 群の約 2 倍検出された (図 17、A) が、S1 特異的 IgA ASCs は脾臓も肺も検出限界レベルで (図 17、B、D) あった。さらに肺の S1 特異的 IgG ASCs は検出されたものの S1-SF-10-TA と比べると極めて僅かで、S1-SF-10-TA 群の約 15 分の 1 であった (図 17、C)。S1-IM 群では、脾臓で S1 特異的 IgG ASCs が低レベルに検出されたものの、脾臓の S1 特異的 IgA ASCs と肺の IgG、IgA ASCs は共に検出限界以下であった (図 17、A-D)。

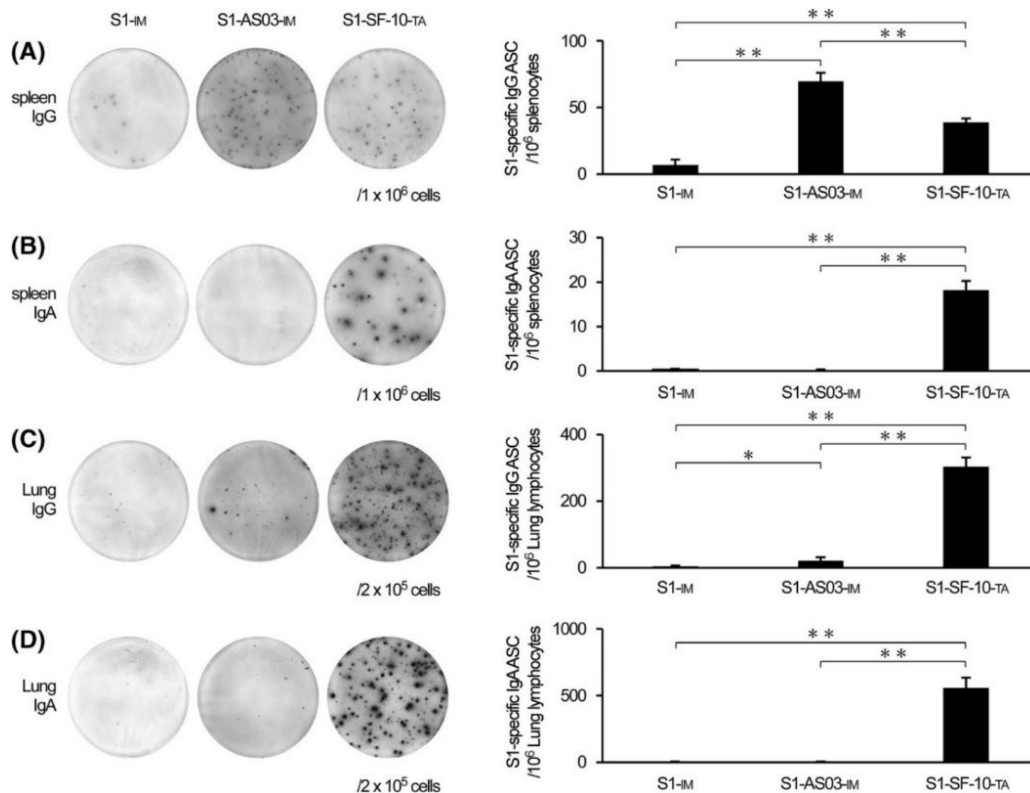


図 17 ELISPOT assay による脾臓と肺の S1 特異的 IgG ASCs および IgA ASCs の測定結果

([38]より引用)

各バーは脾臓は 1×10^6 細胞あたり、肺は 2×10^6 細胞あたりの ASC 数の幾何平均値 \pm SEM を表す ($n = 10$)。有意差検定はノンパラメトリック Mann-Whitney U-検定で解析した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。

次に、S1-SF-10-TA によって誘導された獲得免疫機構の中心的な役割を担う抗原特異的な CD4⁺ヘルパーT細胞のサブセットで、感染防御に関わる Th1、Th2、Th17 の各サイトカインを ELISPOT assay によって検出した。肺と脾臓に誘導された S1 応答性 Th1 (IFN- γ)、Th2 (IL-4)、Th17 (IL-17A) の CSCs を測定した結果を図 18 に示す。S1 応答性 IFN- γ CSCs は、脾臓において S1-AddaS03TM-IM と S1-SF-10-TA がほぼ同程度に高く誘導された (図 18、A) 一方で、肺では S1-SF-10-TA でのみ S1 応答性 IFN- γ CSCs 検出された (図 18、B)。S1 応答性 IL-4 CSCs は、脾臓では S1-AddaS03TM-IM 群が最も高く、S1-SF-10-TA 群は S1-IM 群よりわずかに低かった (図 18、C)。肺では、S1-IM 群、S1-AddaS03TM-IM 群、および S1-SF-10-TA 群で同程度の IL-4 CSCs が検出された (図 18、D)。S1 応答性 IL-17A CSCs は、脾臓では S1-SF-10-TA 群が最も高く検出され、S1-AddaS03TM-IM 群の 3 倍検出された (図 18、E)。肺では S1-SF-10-TA 群でのみ S1 反応性 IL-17A CSCs は検出された (図 18、F)。

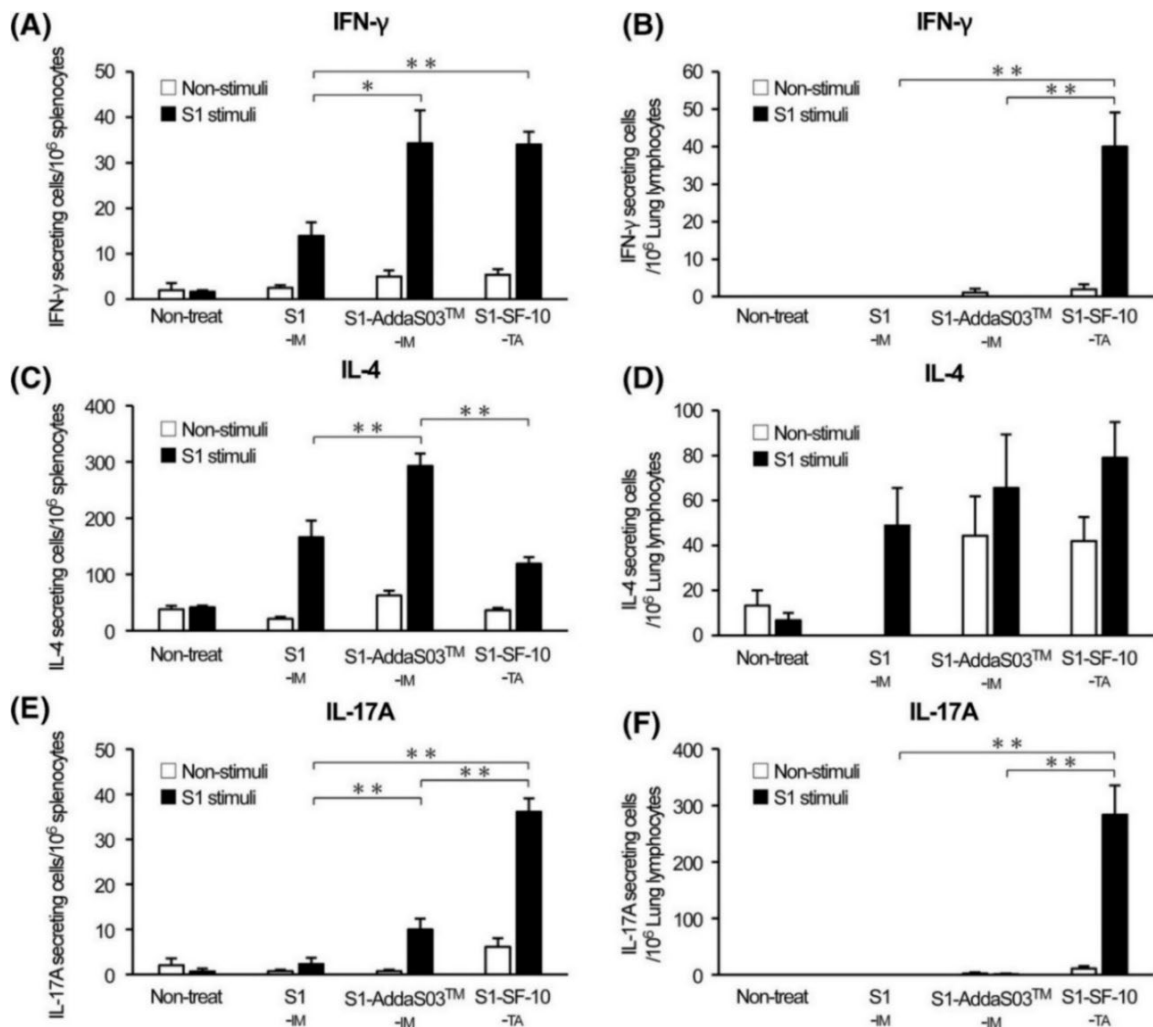


図 18 肺と脾臓リンパ球の ELISPOT assay による S1 応答性 IFN- γ CSCs、IL-4 CSCs、IL-17A CSCs の解析([38]より引用)

3回免疫マウス（各群 n = 10 匹）または非投与の陰性対照マウス（n = 3 匹）の CSCs を ELISPOT で検出し、 1×10^6 細胞あたりの CSC 数平均 \pm SEM 数を、S1 抗原添加有（■）と、S1 抗原添加無（□）で示した。脾臓（A、C、E）および肺（B、D、F）のリンパ球中の IFN- γ (A、B)、IL-4 (C、D) および IL-17A (E、F) を示す。有意差検定はノンパラメトリック Mann-Whitney U-検定で解析した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

次に、S1-SF-10-TA による S1 応答性の細胞傷害性 T 細胞誘導について、細胞傷害性 T 細胞発現マーカーの Granzyme B を S1-SF-10-TA 免疫マウスの脾臓から精製したリンパ球を細胞内染色し、フローサイトメトリーで検出した結果を図 19 に示す。結果から、脾臓のリンパ球中の Granzyme B 産生 CD8⁺T 細胞の割合は、S1-AS03-IM 群と S1-SF-10-TA 群では、S1-IM 群と比べて有意に高く誘導され、S1-SF-10-TA による全身性の細胞障害性 T 細胞の誘導が確認出来た。S1-IM 群では Granzyme B 産生 CD8⁺T 細胞の誘導は低く無処置マウスと同程度であった。

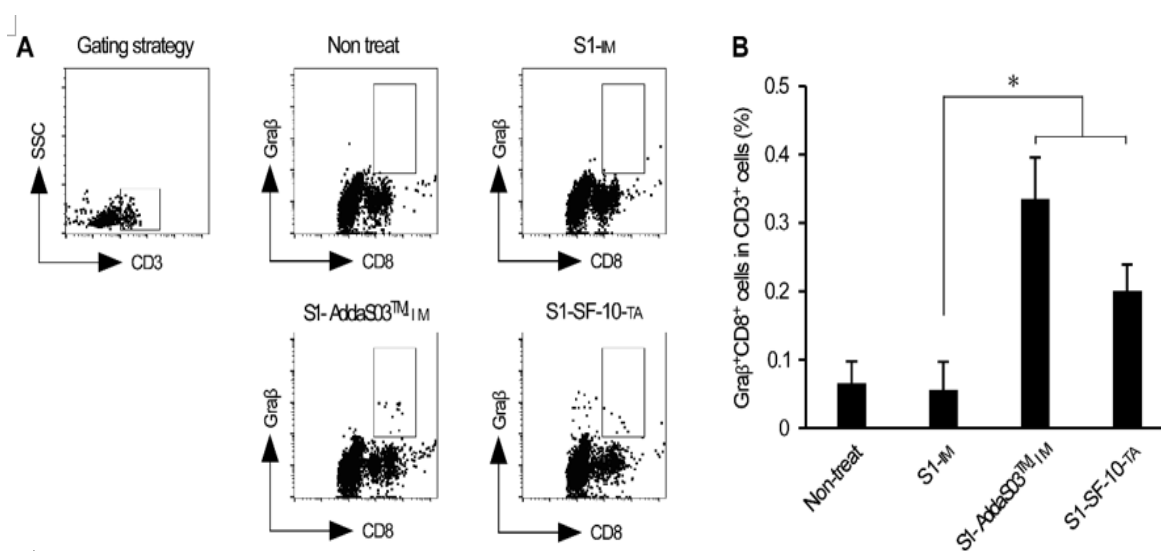


図 19 SARS-CoV-2 に対する細胞傷害性 T 細胞応答の誘導([38]サプリメント図より)

(A) に CD3⁺ T 細胞上の Granzyme B⁺CD8⁺ T 細胞集団のゲーティングを示す。

(B) ゲーティングされた Granzyme B⁺CD8⁺ T 細胞集団のデータを各免疫化群 (各群 n = 6 マウス)

および陰性対照無処置群 (n = 3) の平均値 ± SEM として表した。

有意差検定はノンパラメトリック Mann-Whitney U-検定で解析した。*P < 0.05.

3-7. 実験結果に対する考察

鼻腔よりも表面積が広くマクロファージや樹状細胞を豊富に含む APCs が多く存在する下気道 [49, 50] へ S1-SF-10 を TA 投与した結果、血清および肺の粘膜において S1 特異的 IgG および S-IgA の高度な抗体誘導が確認された。これらの IgG 抗体および S-IgA 抗体は、S1 と ACE2 受容体の結合阻害試験において有意な阻害効果を示したことから、ウイルスの細胞内侵入の過程で、効果的に侵入を入口で阻止する感染防御抗体であることが示された。S1-SF-10 が誘導するこれらの抗体は、S1-AddaS03-IM 誘導抗体よりも強力かつ迅速な誘導を示した。また、2 回ワクチン接種後、血清中の S1 特異的 IgG 抗体価は、S1-SF-10-TA 群と S1-AS03-IM 群で同程度であったが、その血清中に含まれる抗体全体 (IgG と IgA) の S1/ACE2 結合阻害効果を調べたところ、S1-SF-10-TA は、S1-AS03-IM と比較してより強い阻害効果を示した。この理由として、S1-AS03-IM は血清および BALF 中の IgA 誘導効果が S1-SF-10-TA に比べて有意に低いため、IgA の阻害効果が加算されないためと考えられる。さらに、S1-SF-10-TA の粘膜 IgG 誘導効果として、2 回免疫後に BALF に S1-AS03-IM と比較して有意に高い S1 特異的な IgG を誘導した。以上の結果より、SF-10-TA は SARS-CoV-2 抗原の粘膜アジュバントとして免疫賦活作用を有し、感染防御抗体の誘導において優れていることが確認できた。

ELISPOT assay では、脾臓と肺に多数の S1 特異的 IgA および IgG ASCs および S1 応答性 IFN- γ 、IL-4、IL-17A CSCs が検出された。本実験で得られた重要な知見として、S1-SF-10-TA により、呼吸器感染症の局所免疫学的標的細胞である肺リンパ球の S1 応答性 CSCs は選択的に誘導されていることが明らかになった。Tan らは血中の SARS-CoV-2 抗原応答性 IFN γ CSCs が、SARS-CoV-2 感染の初期段階およびウイルスクリアランスの促進において重要な役割を果たしていることを報告しており [51]、また、IFN- γ を産生する肺組織常在記憶 T 細胞 (TRM) は、組織に侵入する病原体に対する免疫監視を行い、呼吸器における SARS-CoV-2 を含むウイルスによる部位特異的感染を強固に防御し、感染を予防している [52]。S1-AddaS03TM-IM は、脾臓で S1-応答性 IFN- γ 造血幹細胞を誘導したが、肺では誘導しなかった。一方、S1-SF-10-

TA は、脾臓だけでなく肺にも S1 応答性 IFN- γ CSCs を誘導した。さらに、肺における S1 応答性 IL-17A CSCs は S1-SF-10-TA 群でのみ検出された。IL-17 は粘膜上皮の pIgR を上方制御することによって S-IgA を増加させることで、T 細胞非依存性の B 細胞の S-IgA への分化を促進すると考えられているが[9]、最近の研究では、肺の IL-17 を産生する抗原特異的な TRM が結核菌 (*M. tuberculosis*) の制御に優れていることも示されている[53]。S1-SF-10-TA は SARS-CoV-2 や他の病原体の呼吸器感染症に対して肺と気道での病原体のクリアランス促進も期待できる可能性が示唆された。また、S1-SF-10-TA は、脾臓において細胞性免疫の指標となる S1 応答性 Granzyme B 産生 CD8⁺ T 細胞も誘導し、S1-SF-10-TA による全身の感染防御効果の可能性も確認できた。

以上の結果より、生体が本来保有する 3 種防御免疫系の全身免疫、局所粘膜免疫、細胞性免疫全てを誘導する S1-SF-10-TA が有用であること、さらにこの防御免疫の誘導には、生体生理活性物質としての肺サーファクタントの抗原送達機能を TA ワクチンとして利用することで、安全でしかも有効に感染防御免疫を誘導する COVID-19 ワクチン開発の新たな知見が得られたことに意味がある。しかしアジュバントによっては、気道ワクチン接種に対して有害性を示す可能性も否定できず、今後実用化に向けて各種炎症マーカーを指標にワクチンの用量と治療域を明確にする必要がある。さらに、異なる動物モデルで気道へのアジュバント効果が異なる可能性もあるため、ヒトに近い動物種での検討を続け、アジュバントと免疫応答間の相関関係を明確に決定する必要がある。

第 4 章 肺サーファクタント由来の抗原送達アジュバントを用いたワクチンの

今後の展望

現在、次世代ワクチンアジュバントとしてワクチンの有効性を高めるために、抗原運搬物質と強力な免疫応答活性化物質の両方の機能を含むように設計されたアジュバントが多数開発されて

いる。多くの予防ワクチンは中和抗体に依存しているが、癌や HIV、マラリア、結核などの疾患には、強力な T 細胞応答を誘発するワクチンが必要である。SSF と SF-10 による抗原特異的 CD4⁺T 細胞誘導と CD8⁺T 細胞誘導とその長期免疫メモリーは、次世代ワクチンアジュバントとしての効力を発揮すると考えられる。

SSF、SF-10 は粘膜アジュバントとしての抗原送達作用の他に、注射型のアジュバントとしても抗原送達効果を最近確認している。特に SF-10 は注射型でも強力な免疫応答性を示している（国際出願特許申 WO 2022/168889A1）。SF-10 の増粘剤ポリマー成分である CVP は、ナノサイズからマイクロサイズを含む水溶性ポリマーのため、SF-10 と組み合わせたワクチンのナノ粒子製剤としての可能性が、SF-10 を用いた筋肉内投与結果から示唆された。今後注射型アジュバントとして SSF、SF-10 の細胞性免疫応答やその長期免疫記憶などに関する研究が進展すると期待される。

また、従来のワクチン製造戦略は、ワクチンの工業製品開発にかなりの時間を要し、緊急のパンデミック対応は困難であったため、今後の感染症ワクチンは、遺伝子合成のプロセスが迅速で比較的安価な病原体の遺伝子配列情報をコードする遺伝子ベクター（DNA および mRNA）の核酸合成ワクチンが主流になると予想される。しかし遺伝子ワクチンは不十分な細胞への取り込み効果や内因性ヌクレアーゼによる核酸分解などさまざまな障壁があり、送達効率と免疫効果を最適化するには、精巧な送達ベクターを設計する必要があり、核酸送達用のポリマーは、現在さまざまな生物医学用途で広く研究されていて[54]、SSF および SF-10 も遺伝子ワクチンとして適用されるよう試みたい。

また、今回報告した SF-10 のアジュバント効果を示した肺への投与には、酵素攻撃に敏感なペプチド、タンパク質、RNA、DNA、および高分子複合化合物の不活性化に対する防御に SF-10 は適しており、今後肺ワクチン接種のような新しい戦略が、免疫療法とワクチン接種の新たな一歩となることを期待したい。

また肺への局所薬物送達は、新型コロナウイルス感染症など呼吸器感染症の治療薬として重要と考えられていて、特に SARS-CoV-2 感染は、肺サーファクタント欠乏と炎症を伴う新型コロナ

ナウイルス感染症関連急性呼吸窮迫症候群（CARDS）に進行する可能性があり、肺機能不全に対抗するため、外因性界面活性剤による補充療法も提案されている[55]。今後、人工合成肺サーファクタントである SSF の呼吸器感染症治療薬としての可能性も望みがある。

特に粉末化剤は肺投与経路により、全身性の副作用を最小限に抑えながら、局所的に薬剤を確実に多く沈着させることが出来るため[46]、粉末化剤アジュバント SF-11 を用いた粉末ワクチンや治療薬としての応用にも期待がもてる。

私たちは、安全性と有効性において DCs への優れた抗原送達アジュバント効果を示す SSF、SF-10、SF-11 を基盤に、今後 DNA または RNA を新たなワクチンの標的抗原として、感染症、がん、自己免疫などのさまざまな病気の予防と治療のための次世代型ワクチン開発に応用したい。

Abbreviations

ACE2, angiotensin converting enzyme 2; アンジオテンシン変換酵素 II

APCs, antigen presenting cells; 抗原提示細胞

ASCs, antibody secreting cells; 抗体産生細胞

BALF, bronchoalveolar lavage fluid; 気管支肺胞洗浄液

BI, binding inhibition; 結合阻害

BMDCs, mouse bone marrow-derived dendritic cells; 骨髄由来樹状細胞

CARDS, coronavirus acute respiratory distress syndrome; 新型コロナウイルス感染症連急性呼吸窮迫症候群

COVID-19, coronavirus disease 2019; 新型コロナウイルス感染症

CSCs, cytokine secreting cells; サイトカイン分泌細胞

CT, Cholera toxin; コレラ毒素

CTL, Cytotoxic T lymphocyte; 細胞傷害性 T リンパ球

CVP, carboxy vinyl polymer; カルボキシビニルポリマー

DAMP, damage-associated molecular patterns; ダメージ関連分子

DCs, dendritic cells; 樹状細胞

DPPC, dipalmitoyl phosphatidylcholine; ジパルパルミトイルホスファチジルコリン

ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay

ELISPOT, enzyme-linked immunospot

GALT, gut-associated lymphoid tissue; 腸関連リンパ組織

GraB, granzyme B; グランザム B

HA, hemagglutinin; ヘマグルチニン
HA_v, influenza ether split hemagglutinin vaccine; インフルエンザエーテルスプリットワクチン
HI titer, hemmagglutinin Inhibitor titer; ヘマグルチニン赤血球凝集素阻害値
HTL, heat labile toxin; 熱不安定性毒素
IAV, influenza A virus; インフルエンザ A 型ウイルス
IM, intramuscular; 筋肉内注射
IN, intranasal; 経鼻投与
LAIV, live attenuated influenza vaccine; 弱毒生インフルエンザワクチン
MALT, mucosal lymphoid tissue; 粘膜関連リンパ組織
MFI, Mean Fluorescence Intensity; 平均蛍光強度
NALT, nasal lymphoid tissue; 鼻咽頭関連リンパ組織
NT, neutral 中和抗体反応
NW, nasal wash, 鼻腔洗浄液
OVA, Ovalbumin (Albumin from chicken egg white); オボアルブミン
PA, palmitic acid; パルミチン酸
PG, phosphatidylglycerol; ホスファチジルグリコール
PS, Pulmonary surfactant; 肺サーファクタント
pIgR, polymeric immunoglobulin receptor; 高分子免疫グロブリン受容体
PRR, Pattern Recognition Receptor; パターン認識受容体
QOL : Quality of life ; 生活の質
RBD, receptor-binding domain; 受容体結合ドメイン
S, spike protein; スパイクタンパク質
SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; 重症急性呼吸器症候群コロナウイルス-2
SC, subcutaneous; 皮下注射 (SC)
S-IgA, secretory IgA; 分泌型 IgA
SP, surfactant protein; 肺サーファクタントタンパク質
SSF, synthetic surfactant; 人工合成肺サーファクタント
St[®], surfacten[®]; サーファクテン[®]
TA, trans-airway; 経気道
TLR, toll like receptor; Toll 様受容体
TLR, Toll-like receptor; Toll 様受容体
TRM, tissue-resident memory T cells; 組織常在記憶 T 細胞
WHO, world health organization; 世界保健機構

謝辞

本研究を行うにあたり、終始、ご教授、ご鞭撻を賜りました、徳島大学先端酵素学研究所 木戸 博 特任教授に衷心より感謝の意を表します。

また、終始、ご指導、ご協力を賜りました、木本 貴士 特任助教に心より御礼申し上げます。そして、高橋 悦久 准教授をはじめ教室員の方々に心より感謝の意を表します。

私の大学院進学と本研究を行うにあたり、深いご理解と貴重なご助言、ご激励を賜りました、徳島大学薬学部 篠原 康雄 教授、小暮 健太郎 教授、山崎 尚志 准教授に深く感謝の意を表します。

また、カロリメーターの測定や機器、脂質に関する貴重なご助言を賜り、専攻公開ゼミの授業に受け入れて下さいました、徳島大学生物資源産業学部 松木 均 教授、各種機器の測定に関してご指導を賜りました、薬学部中央機器室 北池 秀次 副技術部門長、実験動物管理で終始ご協力を賜りました、動物資源研究部門の方々に深謝致します。

最後に、大学院生活の私を常に支えてくれた家族、友人に感謝致します。

- [1] World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-19) dashboard. <https://data.who.int/dashboards/covid19/> (last accessed on 31 December 2023)
- [2] Focosi D, Fabrizio M, Arturo C. Mucosal vaccines, sterilizing immunity, and the future SARA-CoV-2 virulence. *Viruses*. 2022;14.2:187. doi:10.3390/ v14020187
- [3] Ketas TJ, Chaturbhuj D. et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 mRNA vaccines are detectable in saliva. *Pathog Immun*. 2021;6:116-34. doi:10.1101/2021.03.11.434841
- [4] Chan RWY, Liu S, Cheung JY, et al. The mucosal and serological immune responses to the novel coronavirus (SARS-CoV-2) vaccines. *Front Immunol*. 2021;12:744887. doi:10.3389/ fimmu.2021.744887
- [5] Azzi L, Dalla D, Veronesi G, et al. Mucosal immune response in BNT162b2 COVID-19 vaccine recipients. *EBioMedicine*. 2022;75:103788. doi:10.1016 /j.ebiom.2021.103788
- [6] Focosi D, Maggi F, Casadevall A. Mucosal vaccines, sterilizing immunity, and the future of SARS-CoV-2 virulence. *Viruses*. 2022;14(2):187. doi:10.3390/v14020187
- [7] Karczmarzyk K, Kęsik-Brodacka M. Attacking the Intruder at the Gate: Prospects of Mucosal Anti SARS-CoV-2 Vaccines. *Pathogens*. 2022;11(2):117. doi:10.3390/ pathogens11020117
- [8] Tang J, et al. Respiratory mucosal immunity against SARS-CoV-2 after mRNA vaccination. *Science immunology*. 2022;7.76:eadd4853. doi:10.1111/imm.13526
- [9] Correa VA, Amanda IP, Elizabeth DG. Vaccines, adjuvants and key factors for mucosal immune response. *Immunology*. 2022;167.2:124-138. doi: 10.1111/ imm.13526
- [10] Lavelle EdC, Word WW. Mucosal vaccines—fortifying the frontiers. *Nature Reviews Immunology*. 2022;22.4:236-250. doi:10.1038/ s41577-021-00583-2
- [11] Dotiwala F, Upadhyay AK. Next Generation Mucosal Vaccine Strategy for Respiratory Pathogens. *Vaccines*. 2023;11.10:1585. doi:10.3390/vaccines11101585
- [12] Holmgren J, Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines. *Nature medicine*. 2005; 11.Suppl 4:S45-S53. doi:10.1038/nm1213
- [13] Kumar S, Saxena SK, Maurya VK, et al. Progress and challenges toward generation and maintenance of long-lived memory T lymphocyte responses during COVID-19. *Frontiers in Immunology*. 2022;12: 804808. doi:10.3389/fimmu.2021.804808
- [14] Sterlin D, Mathian A, Miyara M, et al. IgA dominates the early neutralizing antibody response to SARS-CoV-2." *Science translational.Medicine*. 2021;13(577):eabd2223. doi:10.1126/scitranslmed. abd2223
- [15] Butler SE, Crowley AR, Natarajyan H, et al. Distinct features and functions of systemic and mucosal humoral immunity among SARS-CoV-2 convalescent individuals. *Frontiers in immunology*. 2021;11: 618685. doi:10.3389/fimmu.2020.618685
- [16] Brai A, Poggialini F, Pasqualini C, et al. Progress towards Adjuvant Development: Focus on Antiviral Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*.

2023;24.11:9225. doi:10.3390/ijms24119225

- [17] Kim H, Kimoto T, Sakai S, Takahashi E, Kido H. Adjuvanting influenza hemagglutinin vaccine with a human pulmonary surfactant-mimicking synthetic compound SF-10 induces local and systemic cell-mediated immunity in mice. *PLoS One*. 2018;13:e0191133. doi 10.1371/journal.pone.0191133
- [18] CDC(Centers for Disease Control and prevention)
<https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5646a4.htm>
- [19] Hassan, AO, Kafai NM, Dmitriev IP, et al. A single-dose intranasal ChAd vaccine protects upper and lower respiratory tracts against SARS-CoV-2. *Cell*. 2020;183.1:169-184. doi:10.1016/j.cell.2020.08.026
- [20] Anggraeni R, Ana ID, Wihadmadyatami H. Development of mucosal vaccine delivery: an overview on the mucosal vaccines and their adjuvants. *Clinical and Experimental Vaccine Research*. 2022;11.3:235. doi:10.7774/cevr.2022.11.3.235
- [21] Mutsch M, Zhou W, Rhodes P, et al. Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland. *New England journal of medicine*. 2004;350.9:896-903. doi:10.1056/NEJMoa030595
- [22] Goerke J. Pulmonary surfactant: functions and molecular composition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 1998;1408.2-3:79-89. doi:10.1016/s0925-4439(98)00060-x
- [23] Pérez-Gil J. Structure of pulmonary surfactant membranes and films: the role of proteins and lipid-protein interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2008;1778.7-8: 1676-1695. doi:10.1016/j.bbamem.2008.05.003
- [24] Konishi, M, et al. Surfactant replacement therapy in premature babies with respiratory distress syndrome: factors affecting the response to surfactant and comparison of outcome from 1982–86 and 1987–91. *Pediatrics International*. 1992;34.6:617-630. doi:10.1111/j.1442-200x.1992.tb01021.x
- [25] Mizuno D, Ide-Kurihara M, Ichinomiya T, Kubo I, Kido H. Modified pulmonary surfactant is a potent adjuvant that stimulates the mucosal IgA production in response to the influenza virus antigen. *The Journal of Immunology*. 2006; 176(2):1122-1130. doi:10.4049/jimmunol.176.2.1122
- [26] Nishino M, Mizuno D, Kimoto T, Shinahara W, Fukuta A, Takei T, Simida K, Kitamura S, Shiota M, Kido H. Influenza vaccine with Surfacten, a modified pulmonary surfactant, induces systemic and mucosal immune responses without side effects in minipigs. *Vaccine*. 2009; 27(41):5620-5627. doi:10.1016/vaccine.2009.07.024
- [27] Mizuno D, Kimoto T, Takei T, Fukuta A, Shinahara W, Takahashi E, et al. Surfactant protein C is an essential constituent for mucosal adjuvanticity of Surfacten, acting as

- an antigen delivery vehicle and inducing both local and systemic immunity. *Vaccine*. 2011;29:5368-78. doi:10.4049/_jimmunol.176.2.1122
- [28] PMDA 医薬品情報 https://www.info.pmda.go.jp/go/pack/2219700G1039_1_03/
- [29] Tanaka T, Takei T, Aiba T, Masuda K, Kiuchi A, Fujiwara T. Development of synthetic lung surfactants. *Journal of lipid research* 27.5 (1988): 475-485.
- [30] Brown ES. Isolation and assay of dipalmityl lecithin in lung extracts. *American Journal of Physiology-Legacy Content*. 1964;207.2:402-406. doi:10.1152/_ajplegacy.1964.207.2.402
- [31] Brown ES. Chemical identification of a pulmonary surface active agent. *Fed Proc*. 1962;21:438.
- [32] Castillo-Sánchez, Carlos J, Cruz A, Pérez-Gil J. Structural hallmarks of lung surfactant: Lipid-protein interactions, membrane structure and future challenges. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2021;703:108850. doi:10.1016/j.abb.2021.108850
- [33] 千田勝一. 肺サーファクタントの基礎と臨床. 小児保健研究. 2005;64(2):157-163. [jschild.med-all.net /0157-0163](http://jschild.med-all.net/_0157-0163)
- [34] Kimoto T, Mizuno D, Takei T, Kunimi T, Ono S, Sakai S, Kido H. Intranasal influenza vaccination using a new synthetic mucosal adjuvant SF-10: induction of potent local and systemic immunity with balanced Th1 and Th2 responses. *Influenza and Other Respiratory Viruses*. 2013;7(6):1218-1226. doi:10.1111/irv.12124
- [35] Kimoto T. Development of a safe and effective novel synthetic mucosal adjuvant SF-10 derived from physiological metabolic pathways and function of human pulmonary surfactant. *Vaccine*. 2022;40:544-553. doi:10.1016/j.vaccine.2021.11.030
- [36] 佐藤篤彦. BALT(bronchus-associated lymphoid tissue)の基礎的、臨床的展望. 日呼吸学会誌. 2000;38(1):3-11. [is.jrs.or.jp /038010003j](http://is.jrs.or.jp/_038010003j)
- [37] 二木史郎ら. マクロピノサイトーシスを活用した細胞内送達の可能性. 生化学. 2021;93(1):137-140. doi:10.14952/SEIKAGAKU.2021.930137
- [38] Kimoto T, Sakai S, Kameda K, Morita R, Takahashi E, Shinohara Y, Kido H. Induction of systemic, mucosal, and cellular immunity against SARS-CoV-2 in mice vaccinated by trans - airway with a S1 protein combined with a pulmonary surfactant - derived adjuvant SF - 10. *Influenza and Other Respiratory Viruses*. 2023;17.3: e13119. doi:10.1111/irv.13119
- [39] Nishijima K, Shukunami K, Yoshinari H, Takahashi J, Maeda H, Takagi H, et al. Interactions among pulmonary surfactant, vernix caseosa, and intestinal enterocytes: intra-amniotic administration of fluorescently liposomes to pregnant rabbits. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2012;303:L208-14. doi:10.1152/_ajplung.00081.2011.
- [40] Kimoto T, Kim H, Sakai S, Takahashi E, Kido H. Oral vaccination with influenza

- adjuvant SF-10 induces efficient local and systemic immunity compared with nasal and subcutaneous vaccination and provides protective immunity in mice. *Vaccine*. 2019;37(4):612-622. doi:10.1016 /j.vaccine. 2018.12.002
- [41] Mizuno D, Kimoto T, Sakai S, Takahashi E, Kim H, Kido H. Induction of systemic mucosal immunity and maintenance of its memory against influenza A virus by nasal vaccination using a new mucosal adjuvant SF-10 derived from pulmonary surfactant in young cynomolgus monkeys. *Vaccine*. 2016;34:1881-8. doi:10.1016/j.vaccine. 2016.02.061
- [42] Florek NW, Weinfurter JT, Jegaskanda S, Brewoo JN, Powell TD, Young GR, *et al*. Modified vaccinia virus Ankara encoding influenza virus hemagglutinin induces heterosubtypic immunity in macaques. *J Virol*. 2014;88:13418-13428. doi:10.1128 /JVI.01219-14
- [43] Rimmelzwaan GF, Baars M, Beek R, Amerongen G, Lövgren- Bengtsson K, Claas EC, *et al*. Induction of protective immunity against influenza virus in a macaque model: comparison of conventional and iscom vaccines. *J Gen Virol*. 1997;78:757-765. doi.org/10.1099 /0022-1317-78-4-757
- [44] Bahamondez-Canas, Tania F, Zhengrong C. Intranasal immunization with dry powder vaccines. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*. 2018;122:167-175. doi: 10.1016/j.ejpb.2017.11.001
- [45] Masjedi M, Talieh M, Zeinab S, Atefeh J. Pulmonary vaccine delivery: An emerging strategy for vaccination and immunotherapy. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2022; 69:103184. doi.org / 10.1016/j.jddst.2022.103184
- [46] Ching-Yee L, Lee WH, Zhou QT. Recent advances in inhaled nanoformulations of vaccines and therapeutics targeting respiratory viral infections. *Pharmaceutical Research*. 2023;40(5):1015–1036. doi: 10.1007/s11095-023-03520-1
- [47] Hidalgo A, Garcia-Moutona C, Autilioaet C, *et al*. Pulmonary surfactant and drug delivery: Vehiculization, release and targeting of surfactant/tacrolimus formulations. *Journal of Controlled Release*. 2021;329:205-222. doi.org/10.1016/j.jconrel.2020. 11.042
- [48] Braun A, Stenger PC, Warriner HE, Zasadzinski JA, Lu KW, Taesch HW. A freeze fracture transmission electron microscopy and small angle X-ray diffraction study of the effects of albumin, serum, and polymers on clinical lung surfactant microstructure. *Biophysical Journal*. 2007; 93.1:123-139. doi:10.1529/biophysj.106.095513
- [49] Sertl K, Takemura T, Tschachler E, Ferrans VJ, Kaliner MA, Shevach EM. 640 Dendritic cells with antigen-presenting capability reside in airway epithelium, lung parenchyma, and visceral pleura. *J Exp Med*. 1986;163:436-51. doi:10.1084/ jem. 163.2.436

- [50] McWilliam AS, Napoli S, Marsh AM, Pemper FL, Nelson DJ, Pimm CL, et al. Dendritic cells are recruited into the airway epithelium during the inflammatory response to a broad spectrum of stimuli. *J Exp Med*. 1996;184:2429-32. doi:10.1084/jem.184.6.2429
- [51] Tan AT, Linster M, Tan CW, Le Bert N, Chia WN, Kunasegaran K, et al. Early induction of functional SARS-CoV-2-specific T cells associates with rapid viral clearance and mild disease in COVID-19 patients. *Cell Rep*. 2021;34:108728. doi: 10.1016/j.celrep. 2021.108728
- [52] Lei H, Alu A, Yang J, et al. Intranasal administration of a recombinant RBD vaccine induces long - term immunity against omicron-included SARS-CoV-2 variants. *Signal Transduct Target Ther*. 2022;7(1):159. doi: 10.1038/s41392-022-01002-1
- [53] Ogongo, Paul, et al. Tissue-resident-like CD4+ T cells secreting IL-17 control Mycobacterium tuberculosis in the human lung. *The Journal of Clinical Investigation*. 2021;131:10. doi: 10.1172/JCI142014
- [54] Gang C, et al. Advances in the polymeric delivery of nucleic acid vaccines. *Theranostics*. 2022;12.9:4081. doi: 10.7150/thno.70853
- [55] Herman L, Smedt SCD, Raemdonck K. Pulmonary surfactant as a versatile biomaterial to fight COVID-19. *Journal of Controlled Release*. 2022;342:170-188. doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.11.023