



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	アジュバント効果を発揮する「ポリイノシン酸-ポリシチジル酸」の二重鎖構造に関する研究
Author(s)	中野, 哲郎
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第13933号
Issue Date	2020-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13933
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/80104
Type	doctoral thesis
File Information	Testuo_nakano.pdf



アジュバント効果を發揮する
「ポリイノシン酸ーポリシチジル酸」
の二重鎖構造に関する研究

北海道大学 大学院農学院
応用生物科学専攻 博士後期課程

中野 哲郎

2020 年 3 月

略語一覧	01
第1章 緒論	03
第2章 ポリイノシン酸-ポリシチジル酸の二重鎖長変動 抑止技術の探求	09
第1節 序文	09
第2節 実験材料および方法	10
第1項 試薬と用水, 使用器具	10
第2項 リボヌクレアーゼ対策, エンドトキシン対策	10
第3項 サイズ排除クロマトグラフィー分析	11
第4項 PIC の作製方法	14
第5項 エンドトキシンの測定と管理	15
第6項 poly-I, poly-C の非酵素的加水分解試験	16
第7項 円偏光二色性(CD)スペクトル分析	16
第8項 融解温度(T _m)	16
第9項 保存安定性試験	17
第10項 統計解析	17
第3節 結果	18
第1項 poly-I, poly-C, PIC の鎖長分布	18
第2項 加熱冷却による PIC 二重鎖長の収縮とその効果	21
第3項 poly-I, poly-C 分子の熱安定性	24
第4項 poly-I 分子の短鎖化による PIC 二重鎖長の伸長抑制	26
第5項 poly-I 分子の短鎖化による PIC の二重らせん構造の変化	30
第6項 uPIC100-400 の保存安定性	32
第4節 考察	34

第3章 二重鎖 RNA リガンドの応答性評価 36

第1節	序文	36
第2節	実験材料と実験方法	37
第1項	PIC, トランスフェクション試薬	37
第2項	細胞	37
第3項	培地および培養方法	38
第4項	TLR3 レポーター細胞評価	39
第5項	RLRs レポーター細胞評価	39
第6項	MRC-5 細胞株を用いた評価	40
第7項	フォーカスト DNA マイクロアレイ解析	40
第8項	ヒト血清による PIC の消化性評価	41
第9項	統計解析	41
第3節	結果	43
第1項	TLR3 応答性	43
第2項	RLRs 応答性	43
第3項	ヒト線維芽細胞 MRC-5 の応答性	46
第4項	自然免疫関連遺伝子の発現応答性	49
第4節	考察	53

第4章 経鼻ワクチン用アジュバントとしての有効性評価 55

第1節	序文	55
第2節	実験材料と実験方法	56
第1項	PIC	56
第2項	倫理的配慮, バイオセーフティー	56
第3項	マウス, ウイルス, ワクチン	56
第4項	経鼻インフルエンザワクチン接種とウイルス感染	57
第5項	検体の採取と各種分析	57

第6項	統計解析	59
第3節	結果	62
第1項	経鼻インフルエンザワクチン接種と上気道感染試験	62
第4節	考察	65
第5章	マウス毒性評価	67
第1節	序文	67
第2節	実験材料と実験方法	68
第1項	PIC	68
第2項	倫理的配慮	68
第3項	マウスとその飼育条件	68
第4項	PIC 溶液の調製	68
第5項	腹腔内投与試験	69
第6項	統計解析	69
第3節	結果	71
第1項	マウス腹腔内単回投与毒性試験(試験1)	71
第2項	マウス腹腔内単回投与毒性試験(試験2)	72
第4節	考察	81
第6章	総合考察	83
要約		86
参考文献		89
謝辞		101

略語一覧

AP-I ; Activator protein I (アクチベータータンパク質 I)

BSA ; Bovine serum albumin (牛血清アルブミン)

CD ; Circular Dichroism (円偏光二色性)

CDP ; Cytidine 5'-diphosphate (シチジン 2 リン酸)

dsRNA ; Double stranded ribonucleic acid (二重鎖リボ核酸)

dsDNA ; Deoxyribonucleic acid, DNA ([二重鎖]デオキシリボ核酸)

ELISA ; Enzyme-linked immunosorbent assay (酵素結合免疫測定法)

FBS ; Fetal bovine serum (ウシ胎児血清)

HA ; Hemagglutinin (ヘマグルチニン)

HI ; Hemagglutination inhibition (赤血球凝集抑制)

IDP ; Inosine 5'-diphosphate (イノシン 2 リン酸)

IFN- β ; Interferon- β (インターフェロン β)

IgA ; Immunoglobulin A (免疫グロブリン A)

IgG ; Immunoglobulin G (免疫グロブリン G)

kb ; kilo base (1,000 base)

kbp ; kilo base pairs (1,000 bp)

LD₀ ; 0% lethal dose (最小致死量)

LD₅₀ ; 50% lethal dose (50%致死量)

MAVS ; Mitochondrial antiviral-signaling protein

MDA5 ; Melanoma differentiation-associated gene 5 (メラノーマ分化関連遺伝子 5)

MEF ; Mouse embryonic fibroblast (マウス胎児線維芽細胞)

Mn ; Number average molecular weight (数平均分子量)

Mw ; Weight average molecular weight (重量平均分子量)

NF κ B ; Nuclear factor-kappa B (核内因子 κ B)

PBS ; Phosphate buffered saline (リン酸緩衝食塩水)

PCR ; Polymer chain reaction (ポリメラーゼ連鎖反応法)

PIC ; Polyinosinic-polycytidylic acid (ポリイノシン酸-ポリシチジル酸)

PNPase ; Polynucleotide phosphorylase (EC 2.7.7.8)

poly-I ; Polyinosinic acid (ポリイノシン酸)

poly-C ; Polycytidylic acid (ポリシチジル酸)

PVM ; Pneumonia virus of mice (マウス肺炎ウイルス)

RIG-I ; Retinoic acid-inducible gene-I (レチノイン酸誘導遺伝子 I)

RLR ; RIG-I like receptors (RIG-I 様レセプター; RNA ヘリカーゼ系レセプター)

RNase ; Ribonuclease (リボヌクレアーゼ)

RTECS ; Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (化学物質毒性データ総覧)

S ; Svedberg unit (スベドベリ単位)

SEAP ; Secreted alkaline phosphatase (分泌型アルカリホスファターゼ)

SEC ; Size exclusion chromatography (サイズ排除クロマトグラフィー)

S-IgA ; Secretory Immunoglobulin A (分泌型免疫グロブリン A)

ssRNA ; Single stranded ribonucleotide (一本鎖リボ核酸)

TICAM-I ; TIR domain-containing adapter molecule I (TRIF)

TLR3 ; Toll like receptor 3 (トール様受容体 3)

T_m ; Melting Temperature (融解温度)

VSV ; Vesicular stomatitis virus (水疱性口内炎ウイルス)

第1章 緒論

呼吸器感染症を対象とする予防ワクチンの研究開発現場では、有効性が飛躍的に向上するワクチンの開発を目指し、経鼻粘膜ワクチンの実用化研究が行われている (Ichinohe *et al.*, 2007; Azegami *et al.*, 2018; Adderson *et al.*, 2015; Ascough *et al.*, 2019; Green *et al.*, 2015; Ollivett *et al.*, 2018; Overton *et al.*, 2014; Thorstensson *et al.*, 2014). インフルエンザワクチンを例に述べると、毎年、予防接種に使われる国産の季節性インフルエンザワクチンは、流行が予測されるウイルス株のヘマグルチニン(HA)抗原を高度に精製したスプリットワクチン(HA インフルエンザワクチン)が主流であり、夾雑物の少ない製剤として副反応のリスクが低減されている (Nakayama, 2015). この HA インフルエンザワクチンは、65 歳以上の高齢者に対する死亡回避率が 80 %, 発病予防率が 34-55 % である (神谷ら, 1999). 米国の 2018 – 2019 シーズンのインフルエンザワクチンの有効率は A(H1N1)pdm09 ウイルスに対しては、全年齢平均で 44 %, 65 歳以上で 16 % であり、A(H3N2)ウイルスに対しては、全年齢平均で 9 %, 65 歳以上で 13 % であった (Flannery *et al.*, 2020). このように現在のインフルエンザワクチンは重症化の回避に有効ではあるが、発症予防の有効率は決して高くない. ワクチンの有効率を高めるためには抜本的なワクチンの改良が必要であると考えられている (Nakayama, 2015). HA インフルエンザワクチンは、国内では皮下注射、欧米では筋肉注射によって行われ、体内で HA 特異的 IgG 抗体を主体とする液性免疫が誘導される. 体液に乗って全身に広がる IgG 抗体は、気道粘膜への漏出が少なく気道粘膜に付着したウイルスに対する感染防御効果は期待できない. このような背景から、全身性の免疫応答を誘導しつつ気道局所の粘膜免疫を誘導する粘膜ワクチンの研究が進められている (Boyaka *et al.*, 1999; Tamura *et al.*, 2016).

経鼻インフルエンザワクチンによって粘膜免疫が作動すると分泌型 IgA 抗体(S-IgA)が鼻腔粘膜に分泌される (Ito *et al.*, 2003). S-IgA 抗体は、気道から侵入しようとする病原体を粘膜面で捉え不活化する (Hasegawa *et al.*, 2009). また、抗原特異性が低い S-IgA は、系統が多少異なるウイルスに対しても不活化活性を示す. この抗原に対する交叉性が S-IgA 抗体を産生する粘膜ワクチンの特長である (Tamura, *et al.*, 2016). 最近、経鼻インフルエンザワクチン接種後に誘導される HA 特異的 S-IgA は、2 量体だけではなく、4 量体、8 量体など多量体 S-IgA として産生されていて、多量体がより高い

交叉性を担うことが明らかにされた(Terauchi *et al.*, 2018; Saito *et al.*, 2019).

経鼻ワクチンの接種で粘膜免疫を作動させるためには、粘膜繊毛クリアランスに打ち勝つことのできる多量の抗原が必要となる(Tanimoto, 2010). 不活化全粒子インフルエンザワクチンを経鼻接種する臨床研究において、血清の HI 抗体価が有効基準に達し、鼻腔の S-IgA 抗体価を上昇させるためには、現在の皮下注射型 HA ワクチンで用いる抗原量の 3 倍量の抗原を 3 週間間隔で 2 回経鼻接種する必要があった(Ainai *et al.*, 2017). 発育鶏卵を用いるワクチン抗原の製造量には上限がある. より少ない抗原量で獲得免疫を作動させるためには抗原の提示能を高めることのできるアジュバントの併用が有効な手段と考えられている(Nakayama, 2015; Aoshi, 2017).

ワクチンアジュバントとしては、水酸化アルミニウム塩(アラム)とオイルアジュバントが特定のワクチン用アジュバントとして国内で承認され、一部の注射型ワクチンに採用されている. アラムは、接種した局所の細胞に作用して細胞死(ネクロプトーシス)を引き起こし、DNA を放出させ、その DNA を介して自然免疫を誘導される作用機構が報告されている(Marichal *et al.*, 2011). しかし、インフルエンザワクチンではアラムに十分なアジュバント効果が認められていない(Nakayama, 2015). 経鼻インフルエンザワクチン用のアジュバントとしては、これまでにコレラ毒素や大腸菌易熱性毒素を利用したワクチン研究が行われた(Tamura *et al.*, 1988; Giuliani *et al.*, 1998). 大腸菌易熱性毒素をアジュバントとする経鼻インフルエンザワクチンがスイスで発売されたが、副作用として顔面神経麻痺(ベル麻痺)が発生し、発売が中止された(Mutsch *et al.*, 2004). これらの毒素タンパクは経鼻投与後、嗅神経細胞内に取り込まれ、軸索方向へ遊走され、大脳直下の嗅球に移行し脳神経に影響を与えることが明らかとなっている(van Ginkel *et al.*, 2005; Giese, 2016).

これに代わる非タンパク性のアジュバントの一つが、二重鎖リボ核酸(dsRNA)の「ポリイノシン酸-ポリシチジル酸」(PIC)である(図 1). PIC は、イノシン酸のホモポリマー(poly-I)とシチジル酸のホモポリマー(poly-C)が相補的に塩基対を形成した物質で、インターフェロン(IFN)誘導活性がある(Field *et al.*, 1967). この dsRNA 分子は(-)鎖 RNA ウイルスが複製する過程で生じる分子パターンであり(Hilleman, 1968), 哺乳類の免疫は敏感に応答して抗原提示細胞に検知される(Kawai and Akira, 2006). ヒトを含め哺乳類, 鳥類, 魚類の免疫は強く応答する(Field *et al.*, 1971; Ekwemakor and Worku, 2019; Gupta *et al.*, 2014; Jensen *et al.*, 2002; Nishizawa *et al.*, 2009). PIC の非臨

床安全性試験が審査され(Philips *et al.*, 1971), 感染症に対する臨床研究(Hill *et al.*, 1972; Freeman *et al.*, 1977), 抗がん効果の臨床研究(Robinson *et al.*, 1976), 小児の IFN 応答性に関する臨床研究(Guggenheim and Baron, 1977)などが行われた。しかし, 高い薬効が得られず, 原薬としての利用研究は IFN 製剤の誕生した時期に減退した。

自然免疫によるカビの認識機構の解明(Lemaitre *et al.*, 1996)を契機に自然免疫機構が分子レベルで解明され(Akira, 2011), PIC の応用研究が始まった。PIC は自然免疫における 2 つの独立したシグナル伝達経路によって哺乳類に検知される。そのシグナル伝達経路の 1 つが, エンドソームに局在する TLR3 から始まる経路である(Matsumoto *et al.*, 2002; Oshiumi *et al.*, 2003)。2 つ目のシグナル伝達経路は, 細胞質に偏在する RNA ヘリカーゼの一種の RIG-I と MDA-5 の接触によって始まる経路である(Kato *et al.*, 2006; Kawai *et al.*, 2005; Yoneyama *et al.*, 2004)。両シグナル伝達経路は, それぞれ独立した機構で制御されており(Hotz *et al.*, 2015), 自然免疫応答にも質的な違いがある(Akira, 2011; Seya *et al.*, 2013)。細胞外の PIC は, Raftlin を必須分子とするクラスリン依存的エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ, TLR3 が発現するエンドソームと合体し TLR3 に検知される(Watanabe *et al.*, 2011)。

PIC が感染症予防ワクチンのアジュバントとして有効であることは数多くの動物モデルで示されている。長谷川らは H1N1(pdm09)不活化インフルエンザワクチンに PIC を併用して経鼻接種することで鼻腔の粘膜免疫が作動することをマウスとサルで示している(Ichinohe *et al.*, 2005; Ichinohe *et al.*, 2010)。また, 弱毒生インフルエンザ経鼻ワクチンにおいても PIC を配合することで樹状細胞と T 細胞免疫の機能が向上することが別のグループから報告されている(Perez-Giron *et al.*, 2014)。さらに, エボラウイルス感染症の予防ワクチン研究において, 糖タンパク抗体複合体と PIC を併用したワクチンを皮下接種することで, 先行するウイルスベクターワクチン接種群と同等のマウス生存率が得られることが報告されている(Phoolcharoen *et al.*, 2011)。感染症予防ワクチン以外にも, がん治療用ワクチンへの応用研究(Ammi *et al.*, 2015; Forghani and Waller, 2015; Forte *et al.*, 2012; Galli *et al.*, 2013; Nagato *et al.*, 2014; Seya *et al.*, 2013), 脳外科手術後のサイトカインストームを抑制する用途研究などが進められている(Gesuele *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014)。

その一方で, 疾患モデル動物において高用量の PIC(> 1 mg/kg)投与が, 症状を増悪

させることが報告されている。一例を挙げると、慢性閉塞性肺疾患(Harris *et al.*, 2013), 喘息(Kimura *et al.*, 2013), 肺炎(Qu *et al.*, 2002), 神経変性疾患(Field *et al.*, 2010), 精神神経疾患(Aavani *et al.*, 2015), 仔マウスにおける壊死性腸炎(Ginzel *et al.*, 2016)で報告されている。それらの毒性応答は、PIC が直接作用する応答だけではなく、IFN や炎症性サイトカインの過剰産生が関与している(Dauletbaev *et al.*, 2015; Field *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011; Wright *et al.*, 2010)。

これらの毒性応答を抑えて薬効を得るためには、投与量と投与回数の適正化が不可欠である。PIC の場合には、さらに、投与する PIC 二重鎖長の規格化と適切な製造管理が必要となる。なぜならば、PIC による IFN 産生の強さと持続時間は PIC 二重鎖長に強く相関するからである(Lampson *et al.*, 1970; Machida *et al.*, 1976)。Machida らは PIC の分子量がスヴェドベリ値(S 値)8.2-16 S 間でマウス LD₅₀ と強く相関することを示した(Machida *et al.*, 1976)。また、Yano らは PIC の二重鎖長とマウスの骨髄毒性の関係を調べ、13-24 S の PIC を 0.5 mg/kg 静注された BALB/c マウスから採取した骨髄は網状赤血球数が約 40 %減少していたが、乾熱処理して 8-9 S に短鎖化した PIC を同一条件で静注されたマウスの骨髄は網状赤血球数が減少しなかったと述べている(Yano and Oki, 1988)。PIC の生物活性が PIC の二重鎖長に相関することは明らかである。

現在、研究試薬用として販売されている PIC の二重鎖長の分布を図 2 に示した。PIC の二重鎖長はメーカーごとに大きく異なり、製造ロット間の違いも認められる。製品ごとに生物活性にバラツキがある状況は開発当初から課題となっている(Field *et al.*, 1968)。ワクチンアジュバントとして求められる高い品質要求事項(EMA, 2005; WHO, 2013)を満たした PIC を製造するためには、その生物活性に影響を与える二重鎖長を、合理的に説明し得る方法で制御し、製造ロットごとの再現性を安定化させる必要がある。言い換えると二重鎖長を制御できる技術の構築が求められている。本研究では、PIC の実用化を目指し、その二重鎖構造に起因する物理化学的、生物学的特性を明らかにするとともに、PIC 製造時および製品保管中に起こる二重鎖長の変化を抑制し、アジュバントとしての有効濃度範囲を拡大せしめる二重鎖構造を探索した。

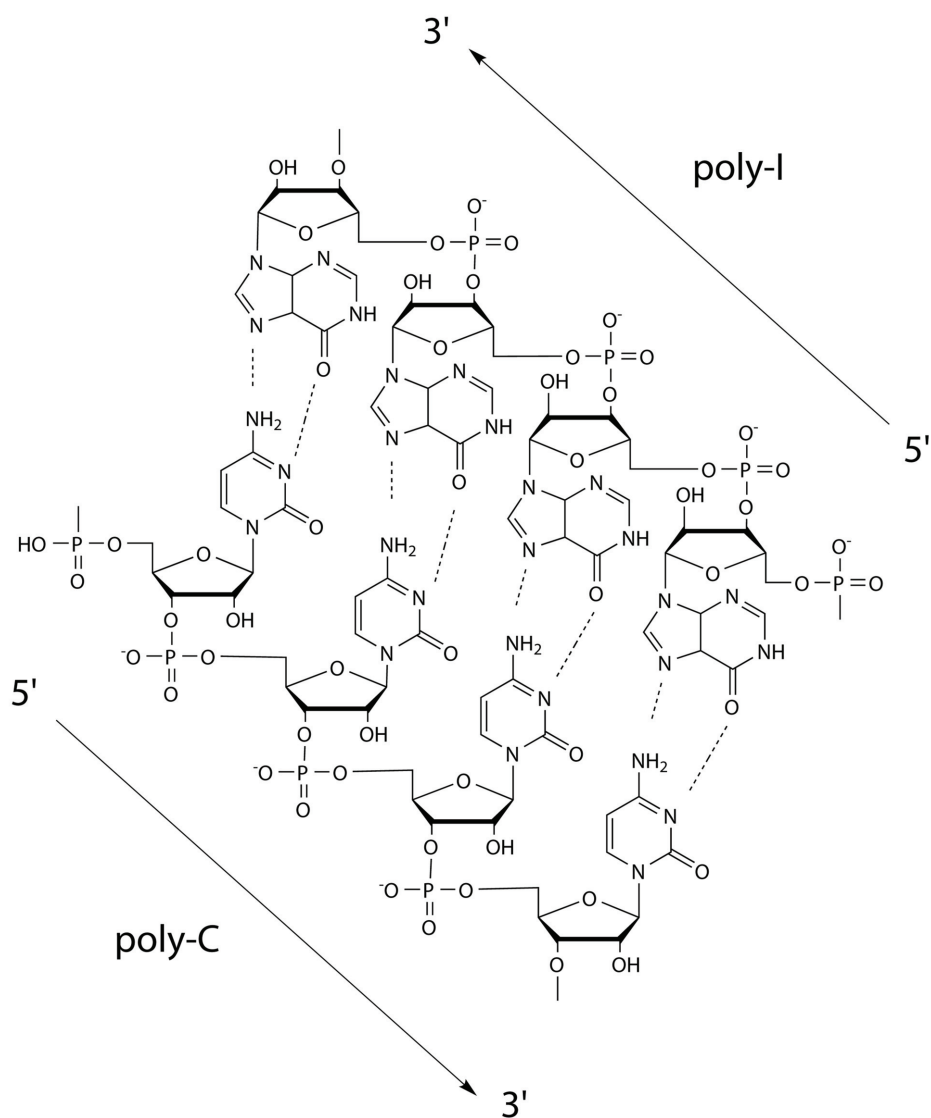


図1 PICの化学構造

イノシン酸ホモポリマーの分子とシチジル酸ホモポリマーの分子は、常温の水溶液中で1対1のワトソン・クリック型塩基対を形成し、同時に両隣の塩基対が疎水的相互作用によりスタックして安定な右まわりの二重らせん構造を形成する。

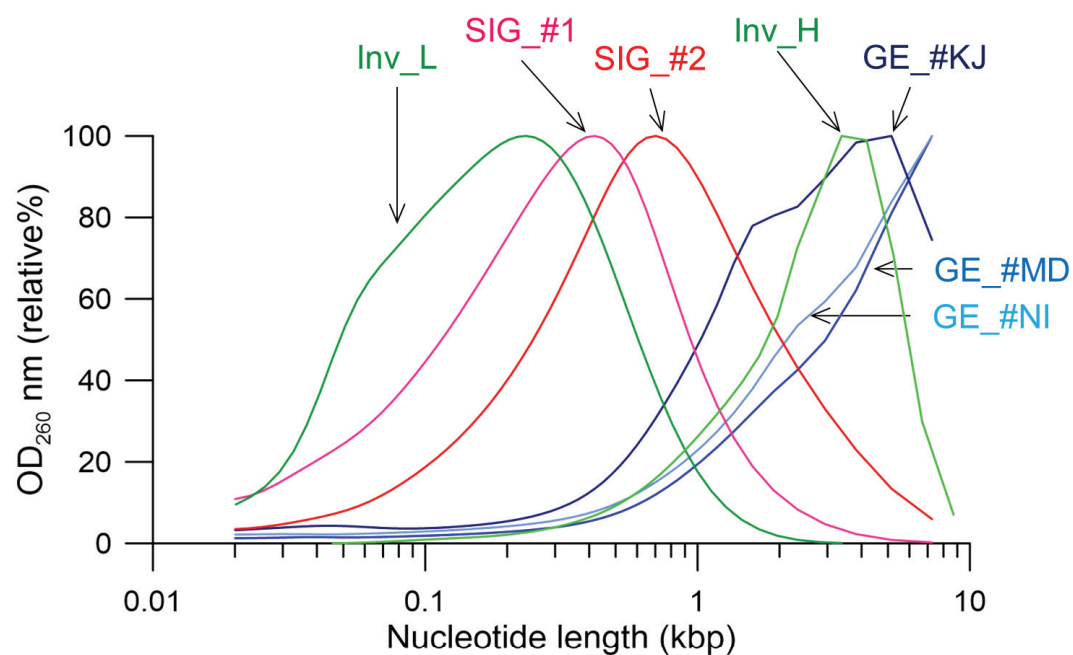


図2 PIC 市販品の塩基長分布

Invivogen LMW type (Lot 番号不明, Inv_L), Invivogen HMW type (Lot 番号不明, Inv_H), SIGMA-Aldrich PI530 (Lot 不明, SIG_#1), SIGMA-Aldrich PI530 (Lot 079K4137, SIG_#2), GE Healthcare (Lot KJ1882, GE_KJ), GE Healthcare (Lot MD1142, GE_MD), GE Healthcare (Lot NI2022, GE_NI)

第2章 ポリイノシン酸－ポリシチジル酸の二重鎖長変動抑止技術の探求

第1節 序文

PIC の製造に使用する poly-I と poly-C は，イノシン 2 リン酸 (IDP) とシチジン 2 リン酸 (CDP) を基質として，ポリヌクレオチドホスホリラーゼ (PNPase) を用いて数十から数千塩基の RNA 分子を酵素合成する (Basilio *et al.*, 1963). 50 base 以上のこれらのホモポリマーは，化学合成品として入手することが困難である. 3'-5' ホスホジエステル結合を積み重ねる過程において一定頻度で 2'-5' の結合が入り込むため，供給可能なメーカーは見つからない. PNPase は，3'-5' エキソ型リボヌクレアーゼ活性と 3' ポリメラーゼ活性を持つ 2 機能酵素である. 両反応とも RNA が開裂しやすい塩基性条件で反応が進行するため，PNPase で生成される poly-I 分子と poly-C 分子は塩基長が一定の幅で対数正規分布した混合物となる (図 3A).

本研究では，ワクチンアジュバントとしての実用化を目指し，毒性の低い PIC を扱うこととした. PIC のマウス LD₅₀ 値と二重鎖長は 8.2-16 S の間で強い正の相関性を示すことが報告されている (Machida *et al.*, 1976). この S 値を，dsDNA の分子量変換式 [分子量 = 1150 × S^{2.9}] (Lampson *et al.*, 1970) で二重鎖長に変換すると，0.8-5.7 kbp となる. また，マウス骨髄毒性が認められた 13-24 S と骨髄毒性が消失した 8-9 S (Yano *et al.*, 1988) を塩基長で表現すると，それぞれ 3.1-18 kbp, 0.75-1.0 kbp である. これらの毒性情報を元に，本研究では 8 S に相当する二重鎖長の PIC を作製することとした. なお，8 S (0.75 kbp) とは，濃度が最大となる塩基長，言い換えると OD 値が最大となる塩基長であり，本章以降で述べる平均塩基長 0.4 kbp の分子量分布を持つ PIC に相当する.

第2節 実験材料および方法

第1項 試薬と用水，使用器具

(1) PIC

試薬として入手可能な PIC は，シグマアルドリッチ・ジャパン(東京)，GE ヘルスケアジャパン(東京)，Invivogen(CA, USA)から購入した。

(2) PIC 酵素合成用試薬

IDP ナトリウム塩，CDP ナトリウム塩は，Shanghai Hanhong Chemical (Shanghai, China)と Hongene Biotechnology (Shanghai, China)から購入した。*Bacillus stearothermophilus* 由来 PNPase, *Escherichia coli* 由来 PNPase はニプロ(大阪)から購入した。

(3) DNA 分子量マーカー合成用試薬

λ DNA および PCR 増幅用試薬 Premix ExTaq HS はタカラバイオ(滋賀)から購入し，制限酵素 HaeIII は東洋紡(大阪)から購入した。

(4) その他の試薬

生理食塩水はテルモ(東京)から購入した。局方注射用水は大塚製薬工場(徳島)から購入した。リン酸緩衝生理食塩水(pH 7.4)(PBS)およびその他の試薬は富士フィルム和光純薬(東京)から購入した。

第2項 リボヌクレアーゼ対策，エンドトキシン対策

PIC の製造・分析に用いる用水は，リボヌクレアーゼ(RNase)除去フィルター「BIO-PAK」(メルク，東京)を装着した純水製造装置で作製した(以後，「UF ろ過ミリQ 水」と略す)。RNA の合成と精製に用いる器具は，RNase フリーのシングルユース資材，または，250℃で2時間乾熱滅菌して RNase とエンドトキシンを完全分解したガラス

器具を使用した。乾熱が困難な器具はオートクレーブで滅菌後 UF ろ過ミリ Q 水で十分に流水洗浄して使用した。酵素反応と精製時に使用する試薬は、UF ろ過ミリ Q 水で溶解・調製し、分画分子量 10,000 の限外ろ過膜を通して、RNase とエンドトキシンを除去した。PNPase は高純度品を調達し、前処理せずに使用した。代表的な限外ろ過膜ユニットとして、公称分画分子量 10,000 のアミコンウルトラ(Amicon Ultra)15 遠心式フィルターユニット(メルク)を多用した。イソプロピルアルコールとエチルアルコールは未開封の特級グレード品を前処理なしで用いた。

第3項 サイズ排除クロマトグラフィー分析

(1) 分子量マーカー

塩基長分布に用いるサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)用の分子量マーカーは、λ DNA (タカラバイオ)を鋳型として、表 1 に示したプライマーと Premix ExTaq HS (タカラバイオ)を用いて PCR 増幅した 4.0 kbp, 2.0 kbp, 800 bp, 400 bp, 200 bp, 110 bp の各 dsDNA を使用した。200 bp の dsDNA は、さらに制限酵素 HaeIII 0.2 units/ μ L (東洋紡, 大阪)で 37 °C, 2 時間処理し、169 bp と 31 bp に切断した。

(2) 塩基長の分析

PIC の塩基長分布を高解像度で解析するために SEC 分析系を構築した。装置は、Prominence GPC システム(島津製作所, 京都), 分子量分画カラムは, TSKgel G5000PWXL (東ソー, 東京)を用いた。GPC システムの移動相(以後, GPC バッファーと略す)は, 150 mM 硫酸ナトリウム含有 10 mM トリス硫酸緩衝液(pH 7.0, 25 °C)とし, 流速 0.5 mL/min, カラムオープン温度 25 °Cに設定し, UV 検出器(260 nm)を接続して信号を GPC システムに取り込んだ。検体は, GPC バッファーで 10 倍以上に希釈して分析に供した。分子量マーカーの詳細は表 1 にまとめた。

(3) 平均塩基長

本研究における平均塩基長とは、Prominence GPC システムで出力される数平均分子量を 1 塩基(対)の分子量で割って算出した。PIC, poly-I, poly-C の 1 塩基(対)の分

子量は、それぞれ 635, 330, 305 である。なお、平均分子量の表記は、分析精度の観点から、キロベース(kb)またはキロベースペアー(kbp)とした。塩基長の分布は、重量平均分子量(Mw)を数平均分子量(Mn)で除した値として表示した。

表 I SEC 分析用分子量マーカー

物質	PCRプライマー	鋳型	制限酵素 処理	塩基長 (bp)	分子量 (D)
PCR産物	5' CGTCGCCAGCTGTCTGCACA 5' GGTCTGTGGTGTGTCCGGC	λ DNA		4000	2463298
PCR産物	5' CGTCGCCAGCTGTCTGCACA 5' CAAAGTTGCCGACGTTATTGCGG	λ DNA		2000	1235988
PCR産物	5' TGAAAAAGCCGAAACAGTCCAGCGT 5' GGATGCGCCGCCACCAACAG	λ DNA		800	494427
PCR産物	5' TGAAAAAGCCGAAACAGTCCAGCGT 5' GTCAGCCCCCGGCTTTTCGC	λ DNA		400	247234
PCR産物	5' CGTCGCCAGCTGTCTGCACA 5' GTCAGCCCCCGGCTTTTCGC	λ DNA		200	124254
PCR産物 ^{*1}	5' CGTCGCCAGCTGTCTGCACA 5' GTCAGCCCCCGGCTTTTCGC	λ DNA	HaeIII切断 大断片	169	104826
PCR産物	5' CCCGTTCCGTGTGTCCATGA 5' GGATGCGCCGCCACCAACAG	λ DNA		110	68344
PCR産物 ^{*1}	5' CGTCGCCAGCTGTCTGCACA 5' GTCAGCCCCCGGCTTTTCGC	λ DNA	HaeIII切断 小断片	31	19142
オリゴDNA	5' AGGACAATCTGAATACGCCACCT			24 nt	7332
IDP				1 nt	428

*1 PCR 産物を制限酵素 HaeIII で切断し、混合物としてマーカーに使用した。

第4項 PICの作製方法

(1) poly-I, poly-Cの酵素合成

poly-I, poly-Cの酵素合成法は数多くの論文に記載されている(Basilio *et al.*, 1963; Micheson *et al.*, 1967). 本研究ではTorrenceの方法(Torrence, 1981)に準じて行なった. 具体的には, 0.1 M トリス塩酸バッファー(pH 8.0-9.0), 15 mM 塩化マグネシウム, 20 mM IDP または CDP から成る 40 mL または 250 mL の反応液に PNPase 6 U/mL を加えて, 40 °C または 50 °C で 5-24 時間かけて合成した. 塩基長が異なる poly-I と poly-C は, SEC 分析でモニタリングし, pH と反応時間を変えて作製した.

(2) poly-I, poly-Cの精製

poly-I と poly-C の精製法に違いはない. 酵素合成した poly-I および poly-C 反応液を約 25 °C に冷却し, 1 M HCl を滴下して反応液を中和した後, 3 M 塩化ナトリウム溶液を 1/10(v/v)添加混合し, 等量の 99 % イソプロピルアルコールを加えて poly-I および poly-C を凝集させた. 遠心分離機で沈殿物を分離し, 上清を捨て, 80 %エタノール, 99 %エタノールの順に容器と沈殿物を洗浄した. 減圧容器内でアルコール分を蒸散させ, 適量の UF ろ過ミリ Q 水を加えて溶解した後, 公称分画分子量 10,000 のアミコンウルトラ(Amicon Ultra)15 遠心式フィルターユニット(メルク)を用いて約 10 倍に濃縮し, 30 mM 塩化ナトリウム溶液で 10 倍に希釈した. この濃縮-希釈を 4 回繰り返した. poly-I と poly-C 溶液の濃度は, 溶液を 0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.0)で 2 倍以上に希釈した後, OD_{260 nm} の吸光度を測定し, 1 OD = 40 µg/mL として概算した. 作製した poly-I と poly-C は, -30 °C 以下のフリーザーで保存した. なお, 0.2 kb 以上の poly-I は冷凍保存中に塩基長の短縮が顕著であったことから, 本研究では必要時に作製し 1 週間以上の保存を避けた.

(3) poly-I, poly-Cのアニーリング

アニーリングは 2 通りの方法が報告されている. 一つは, poly-I 溶液と poly-C 溶液を 20-25 °C で混合する方法である(Field *et al.*, 1967). 別の方法は, 20-25 °C で poly-I 溶液と poly-C 溶液を混合した後に, 60-80 °C に加熱し緩やかに冷却する方法で

ある(Torrence, 1981). poly-I 分子と poly-C 分子の塩基対形成が最大となる poly-I と poly-C 水溶液の混合比は、OD₂₆₀ nm の吸光度比で 52:48 であった. この比率は、核酸の濃色効果(hyperchromic effect)を利用し poly-I 溶液と poly-C 溶液の混合比を変えた実験を行い決定した. この比率は過去の報告と同じ数値であった (Chamberlin *et al.*, 1965). なお、本研究で作製した塩基長の異なる poly-I 分子と poly-C 分子は、どのような塩基長の組合せでも、最多の塩基対を形成する量比は 52:48 であることを確かめている. poly-I 分子と poly-C 分子のアニーリングは、40 mL または 250 mL スケールで行った. poly-I 分子と poly-C 分子は、30 mM 塩化ナトリウムを含む 20 mM または 50 mM HEPES バッファー(pH 7.0)で約 400 μ g/mL となるように濃度調整し、52:48 で混合した. その後、加熱が必要な場合は 60 $^{\circ}$ C または 70 $^{\circ}$ C のバスにつけて昇温し、冷却した.

(4) PIC の精製

PIC 水溶液に 3 M 塩化ナトリウム溶液を 1/10(v/v)添加混合し、PIC 水溶液と等量の 99 % イソプロピルアルコールを加えて PIC を凝集させた. 遠心分離機で沈殿物として分離し、上清を捨てて、容器と沈殿物を 80 % エタノール、99 % エタノールの順に洗浄した. 減圧容器内でアルコール分を蒸散させ、適量の UF ろ過ミリ Q 水を加えて溶解した後、公称分画分子量 10,000 のアミコンウルトラ-15 遠心式フィルターユニット(メルク)を用いて約 10 倍に濃縮し 30 mM 塩化ナトリウム溶液で 10 倍に希釈する操作を 4 回繰り返し、最後に濃縮を行った. 溶液の濃度は、溶液を 0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.0)で 2 倍以上に希釈した後、OD₂₆₀ nm の吸光度を測定し、1 OD = 50 μ g/mL として概算した. 作製した PIC は、-30 $^{\circ}$ C 以下のフリーザーで保存した.

第5項 エンドトキシンの測定と管理

動物試験に供する PIC は、エンドトキシン含有量を ToxinSensor Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit (Genescript Japan, 東京)を用いて定量分析した. 分析手順はキット記載の方法に従って実施した. PIC 1 mg に対してエンドトキシンの値が 0.1 EU 以下という自主基準を設け、0.1 EU を超えた場合には、エタノール沈殿を繰り返してエンドトキシンを除去した後、精製を実施した. エンドトキシン値が合格した

PIC 溶液は、孔径 0.22 μm の滅菌済みポリエーテルスルホンフィルターでろ過滅菌し、バイアルに小分けし凍結乾燥した。凍結乾燥後は $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下のフリーザーで保存した。凍結乾燥品の復水は、 $20\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$ に温度を戻した後、日本薬局方 注射用水を加えて行なった。

第6項 poly-I, poly-C の非酵素的加水分解試験

poly-I, poly-C 分子の非酵素的な熱分解実験は、 150 mM 塩化ナトリウム含有 50 mM トリス塩酸緩衝液($\text{pH } 7.0\text{--}9.2$)、および 150 mM 塩化ナトリウム含有 50 mM HEPES 緩衝液($\text{pH } 6.5\text{--}7.0$)に poly-I または poly-C を添加して 1.2 mg/mL 溶液を作製し、 1.5 mL テストチューブに 1 mL ずつ分注して、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ のウォーターバスでインキュベートした。指定時間経過後、テストチューブを取り出し SEC 分析で平均塩基長の変化を解析した。

第7項 円偏光二色性(CD)スペクトル分析

PIC の2次構造を解析するために Model 430 CD spectrometer (AVIV Biomedical, NJ, USA)を用いて CD スペクトルデータを取得した。poly-I, poly-C, PIC はリン酸緩衝生理食塩水(PBS)($\text{pH } 7.4$)に溶解し、 OD_{260} 0.50 に調製し、マイクロスターラーピースを挿入した光路長 10 mm の4面石英キュベットに注入して $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ で CD スペクトルを測定した。測定では、同一サンプルを3回計測し、平均値をデータ化した。

第8項 融解温度(T_m)

PIC 二重鎖の疎水結合力を解析するために、 T_m 解析システム TMSPC-1(島津製作所)を用いて PIC の温度解離データを取得し、解離曲線から T_m 値を算出した。PIC は PBS ($\text{pH } 7.4$)に溶解し、マイクロスターラーピースを挿入した光路長 10 mm の石英キュベットに注入し、PBS で OD_{260} 値が 0.50 となるように調製し、 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ から $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ まで $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 刻みでキュベットの温度を上昇させ、 OD_{260} 値を計測した。計測に際しては、キュベット内部温度が $\pm 0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ の精度で安定化した後に計測されるように機器の制御パラメーターを設定した。 T_m 値は、中線法で算出した。

第9項 保存安定性試験

PIC は、PBS (pH 7.4)に溶解して 1 mg/mL の溶液を調製し、10 mL ずつ 20 mL 硼珪酸ガラスバイアル瓶に注入し、閉栓後、25 °C および 40 °C の恒温室で保管した。保存安定性試験は、PIC400-400CA と uPIC100-400 のどちらも製造 2 ロット分を供試した。0 日目、2 週間後、4 週間後、8 週間後、12 週間後、16 週間後の 4 か月間、同一製造ロット同一保管温度あたり 2 本のバイアルを開封・消費して SEC 分析を行った。また、0 日目の検体は、マイクロチューブに小分けして -80 °C フリーザーで保管し、保存サンプルの分析時に 1 本解凍して、SEC 分析時の比較対照として使用した。SEC 分析によって得られた平均塩基長は、同時分析した 0 日目の検体に対する百分率で表記することで、SEC 分析カラムの経日変化の影響を回避した。

第10項 統計解析

グループ間の平均値差の解析はスチューデントの t 検定で行った。p 値が 0.05 以下のとき、統計的に有意な差があると判断した。

第3節 結果

第1項 poly-I, poly-C, PIC の鎖長分布

PNPase で酵素合成される poly-I 分子と poly-C 分子は、平均塩基長が同等の場合、塩基長分布全体が近似した混合物となり、その分布は対数正規分布となった(図 3A)。この分布幅が酵素の性質で変化するのかどうかを調べるために、入手可能でサブユニットの構造が異なる *Bacillus stearothermophilus* 由来と *Escherichia coli* 由来の2種類の PNPase を用いて poly-I と poly-C を合成し塩基長分布を比較したところ、PNPase の由来による塩基長分布の差異は認められなかった(データ略)。以後、*B. stearothermophilus* 由来の PNPase を使用した。

PNPase で合成した平均塩基長 0.4 kb の poly-I 分子と poly-C 分子の塩基長分布を図 3A に示した。これらの分子は、0.1-2 kb 間の塩基長成分が 97 % (w/w) 以上であり、PIC の塩基長分布に置き換えると、IFN 誘導活性の低い 0.1 kbp 以下の成分とマウス毒性の強い 2 kbp 以上成分の含量が低い塩基長分布となった。この塩基長分布と同じ PIC 分子の製造を目指し、研究を進めた。平均塩基長 0.4 kbp の PIC 分子は、理論的には、同じ平均塩基長の poly-I 分子と poly-C 分子をアニーリングすることで得られるはずである。しかし、平均塩基長 0.4 kb の poly-I 分子と poly-C 分子を室温で混合したところ二重鎖長は大きく伸長し、その塩基長分布はアニーリング反応容器ごとにばらついた(図 3B)。このように poly-I 分子と poly-C 分子を室温で混合して作製した PIC の二重鎖長が大きく伸長する現象は、過去にも報告されている(Hamilton, 1971)。Katoh らは、S 値が 5.2-10.8 S (0.2 kb-0.8 kb) の poly-C 分子を同等 S 値の poly-I 分子と混合し、取得した PIC の S 値を表にまとめている(Katoh *et al.*, 1975)。その poly-I, poly-C の S 値を ssRNA の分子量変換式 [分子量 = $2820 \times S^{1.9}$] (Maeda, 1961) で分子量に変換し、また、PIC の S 値を前章で用いた dsDNA の分子量変換式 [分子量 = $1150 \times S^{2.9}$] (Lampson *et al.*, 1970) で分子量に変換して、塩基長として比較したところ、poly-I 分子、poly-C 分子の塩基長に対して PIC の二重鎖長は 10-36 倍に伸長したことが読み取れた(図 4)。このように、poly-I 分子と poly-C 分子を室温で混合して作製した PIC の二重鎖長は、材料の poly-I 分子、poly-C 分子の塩基長に正の相関を示すが、その二重鎖長は極めて長く大きく変動することが明白となった。

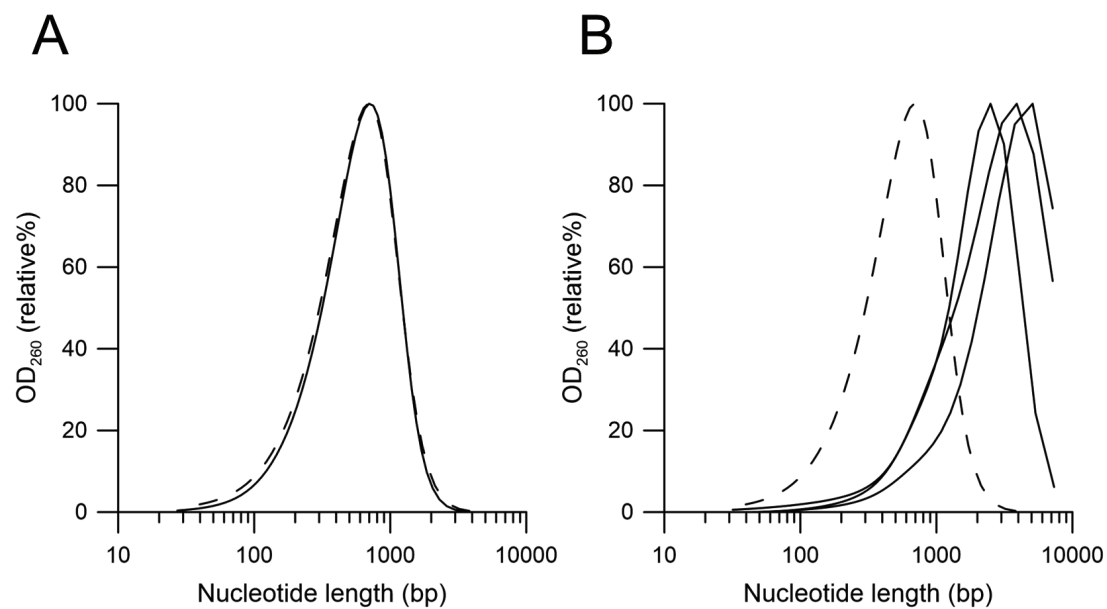


図3 poly-I, poly-C 分子の塩基長分布とアニーリング後の塩基長分布

(A)PNPase で酵素合成した平均塩基長 0.4 kb の poly-C 分子(実線), poly-I 分子(破線)の塩基長分布. (B)平均塩基長 0.4 kb の poly-C 分子と poly-I 分子(破線)を室温混合して作製した PIC(PIC400-400 と表記する)の二重鎖長分布の例(実線, $n = 3$).

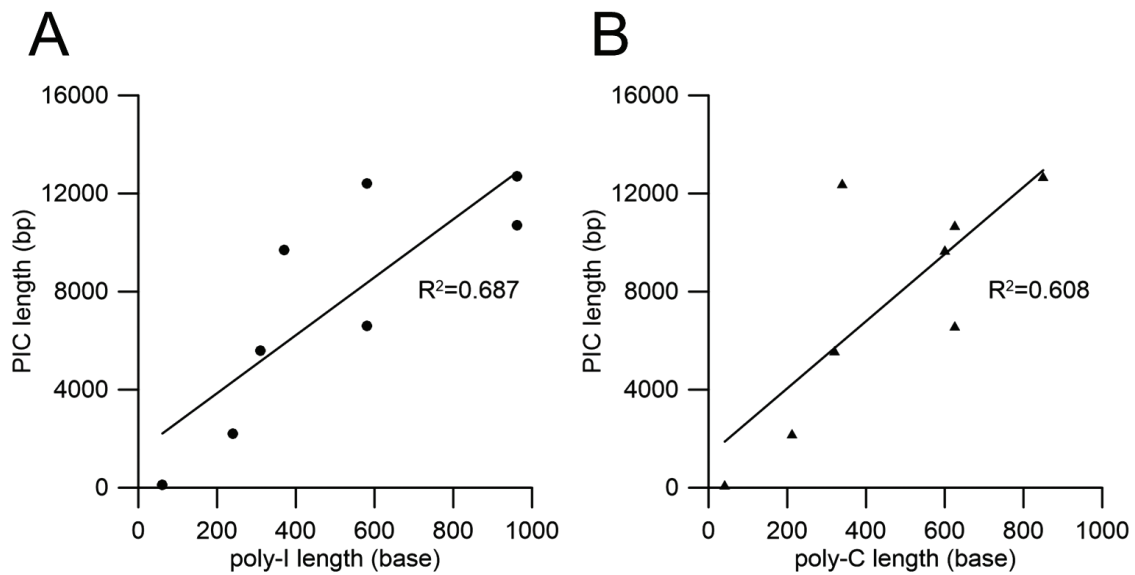


図4 poly-I, poly-C 塩基長とアニーリング後の PIC 二重鎖長の関係

Katoh らの遠心沈降データ (Katoh *et al.*, 1975) を, 分子量換算式 (dsRNA: $M_w = 1150 \times S^{2.9}$ (Lampson *et al.*, 1970); ssRNA: $M_w = 2820 \times S^{1.9}$ (Maeda, 1961) を用いて塩基長に変換し作図した. PIC 塩基長と poly-I 塩基長 (A), poly-C 塩基長 (B) の関係を示す.

第2項 加熱冷却による PIC 二重鎖長の収縮とその効果

Hamilton は、PIC の二重鎖長の分布が製造ロットごとにばらつき、長鎖側に伸長することを報告している(Hamilton, 1971). その二重鎖長の伸長は 80 °C, 15 分間の加熱処理である程度抑制されること、および二重鎖の伸長が抑制された PIC はマウスの腹腔内投与毒性が低下することを合わせて報告している(図 5).

本研究で 0.4 kb の poly-I と poly-C 分子を室温で混合して作製した PIC400-400 を加熱冷却処理して得た PIC 分子の代表的な塩基長分布を図 6 に示した. PIC400-400 を 40 mL スケールで 60 °C, 70 °C, 80 °C のバスに入れて加温し, 10 分経過後, 室温に静置して自然冷却した結果が図 6A である. 加熱温度が高くなるにつれて二重鎖の伸長は抑制されたが, 80 °C まで加熱しても poly-I, poly-C 分子と類似した塩基長にはならなかった. そこで加熱冷却温度に加えて PIC 濃度, pH, 塩濃度を振って条件検討を重ねたところ, 最も理想型に近い二重鎖長分布が得られたのは, 70 °C まで加熱し, 2 °C/h で温度調節しながら直線的に極めて緩やかに温度降下させる方法であった(図 5B). この加熱冷却条件で処理した PIC400-400(PIC400-400CA と表記する)は平均塩基長 0.4-0.5 kbp の二重鎖長を有していた. しかし, この 2 °C/h の精密な温度制御は, 工業的な大量生産には適さない. その理由は大型の反応槽は内部温度が不均一であり精密な温度制御に依存する製法は大量生産時の再現性低下を招くからである. また, 冷却開始温度を 70 °C から 80 °C に引き上げたとき, 冷却後の PIC の平均二重鎖長は 0.15 kbp へ大きく減少した(図 6B). この現象は, 長時間の加熱冷却処理によって起こる変化は, 伸長した二重鎖がそろそろ変化だけではなく, poly-I 分子と poly-C 分子がこの加熱冷却の過程で切断していたことを示している. 言い換えると, この長時間の加熱冷却処理で作製された PIC の二重鎖は, ランダムに切断された poly-I 分子と poly-C 分子でできている. PIC400-400CA として得られた理想型に近い二重鎖長の分子は, 両分子が適度に切断されて得られた結果と考えられた.

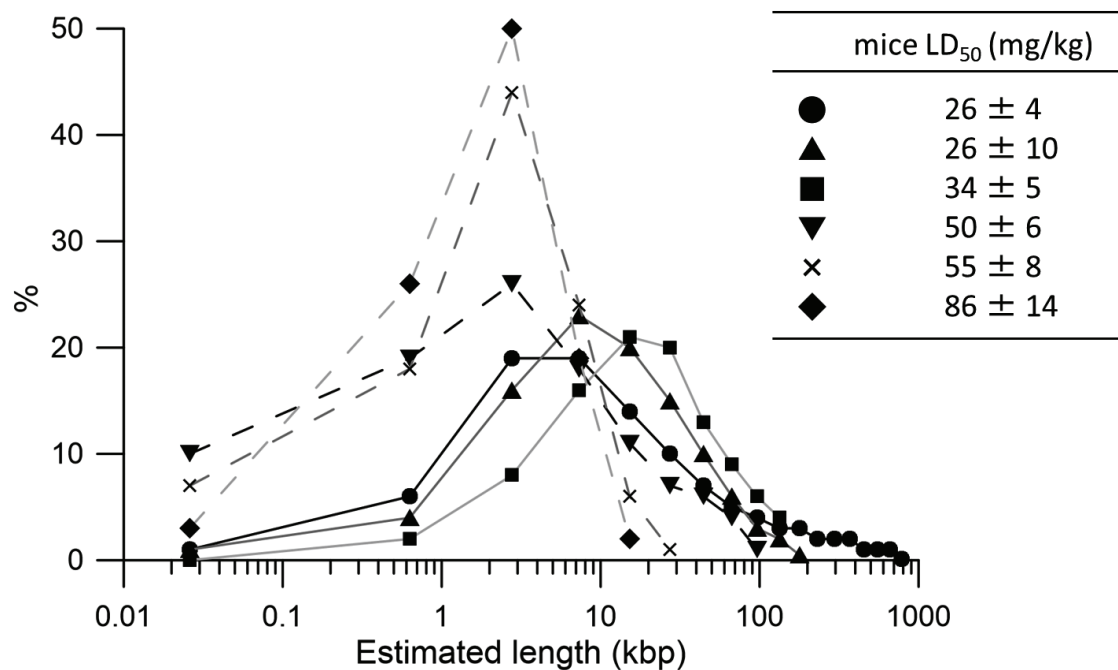


図5 加熱処理によるPICの塩基長伸長の抑制とマウスLD₅₀値の上昇

Hamiltonの研究報告(Hamilton, 1971)記載のS_{20,w}分布データを塩基長分布に変換しグラフ化した。6種のPICのどれが80℃加熱処理されたものかは明記されていない。各PICのマウス腹腔内単回投与毒性データを右上の表に転記した。なお、原著のデータには、骨肉腫と口蹄疫ウイルスに対する効果が数値として併記記載されているが、効果との関係性が不明確なため転記していない。

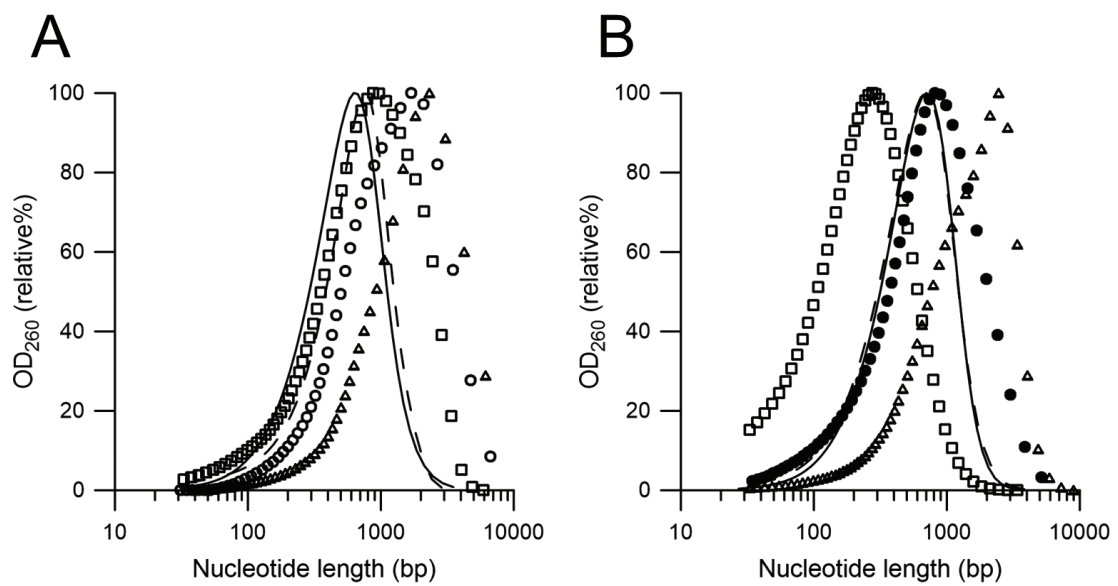


図6 PIC400-400 のアニーリング温度と時間の影響

(A)平均塩基長 0.4 kb の poly-I 分子と poly-C 分子を混合し、60 °C (△), 70 °C (○), 80 °C (□) に加熱後、室温で空冷して作製した PIC の代表的な塩基長分布. (B) 平均塩基長 0.4 kb の poly-I 分子と poly-C 分子を混合し、60 °C (△), 70 °C (○), 80 °C (□) に加熱後、2 °C/h で精密に温度降下させて作製した PIC の代表的な塩基長分布. アニーリングに用いた poly-I 分子の塩基長分布(破線)と poly-C 分子の塩基長分布を併記した(実線).

第3項 poly-I, poly-C 分子の熱安定性

poly-I 分子と poly-C 分子を緩衝生理食塩水に溶解し、50 °C と 70 °C の 2 温度で pH を変えて一定時間反応させたところ、両分子とも溶液の塩基性が強くなるにつれて速やかに短鎖化した。また poly-I 分子の方が poly-C 分子よりも短鎖化が顕著であった(図 7A)。RNA の 3', 5' ホスホジエステル結合は、リボースの 2' OH 基によって求核攻撃を受けて開裂するため、DNA よりも不安定で、塩基性条件下で切断されやすい。本研究で観察された pH 依存的な poly-I 分子と poly-C 分子の短鎖化は、ホスホジエステル結合の開裂であることは明白である。PIC400-400 の塩基長伸長が抑制された加熱冷却処理が、70 °C に昇温後に 2 °C/h で冷却する処理であることは第 2 項で述べた。PIC400-400 と PIC400-400CA の T_m 値は変わりなく、どちらも T_m 値が 63 °C、完全解離温度が 64 °C であったので、64 °C から 70 °C への昇温時間と 70 °C から 64 °C に到達するまでの 3 時間余りの間は poly-I 分子と poly-C 分子は完全に解離した状態で高温に暴露されたことになる。そこで、アニーリング溶液と同じ pH 7.0 の条件で両分子を 37 °C、50 °C、70 °C に 3 時間さらしたところ、37 °C と 50 °C では両分子とも塩基長の明確な短縮は認められなかったが、70 °C では両分子とも短鎖化し、poly-I 分子の方が poly-C 分子よりも短鎖化の度合いが強かった(図 7B)。これらの結果から、PIC400-400CA の二重鎖は、70 °C への昇温と 70 °C から 2 °C/h の温度降下の過程で poly-I 分子と poly-C 分子の両方が適度に切断されて、想定した二重鎖長の PIC に仕上がったことが示唆された。言い換えると、PIC400-400CA の poly-I 鎖と poly-C 鎖には適度な鎖の分断点(ニック)が存在することが示唆された。

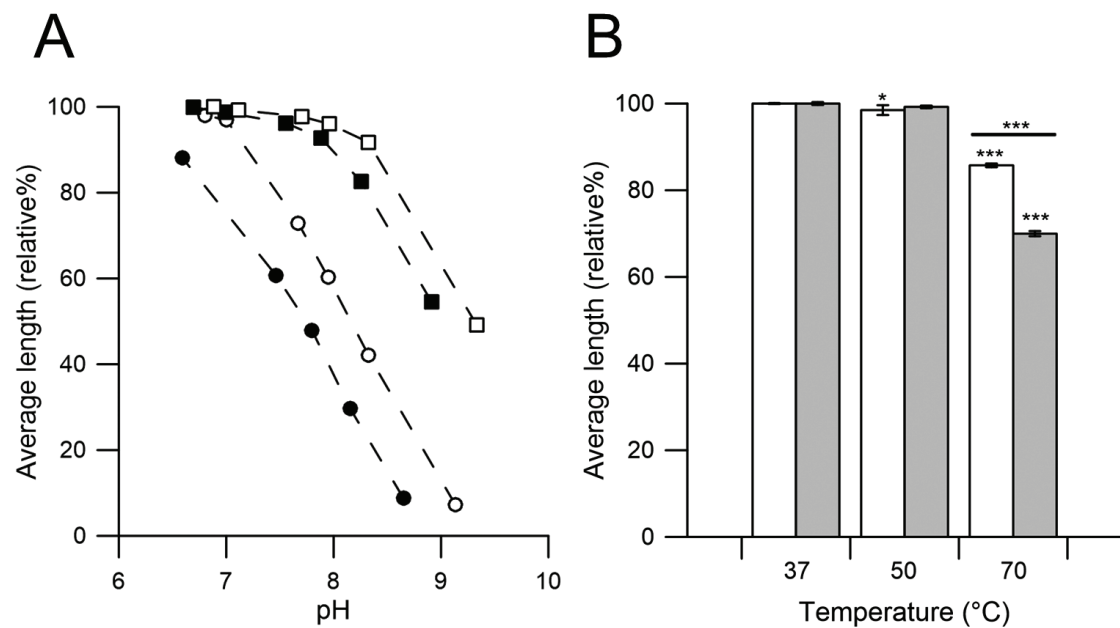


図7 poly-I, poly-C 分子の熱安定性

(A)poly-I 分子(■●)と poly-C 分子(□○)を緩衝生理食塩水に溶解して、50 °C(■□)と 70 °C(●○)で 2 時間インキュベートし、pH と切断速度の関係を調べた(n = 1)。 (B)poly-I 分子(灰色)と poly-C 分子(白色)を緩衝生理食塩水(pH 7.0)で 3 時間インキュベートした後の塩基長を平均値 ± 標準誤差 (n = 3)で表示した。統計的に有意な塩基長の変化は棒グラフの上端に*印を付し、poly-I 分子と poly-C 分子間で統計的有意差のある試験区は棒グラフ上部にバーと*印を付した(***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05)。

第4項 poly-I 分子の短鎖化による PIC 二重鎖長の伸長抑制

第3項の結果から、poly-I 分子または poly-C 分子をあらかじめ切断した後に両分子をアニーリングすることで、0.4 kb の相補分子に短鎖分子が配位・整列した二重鎖長の PIC が得られると考えた。さらにその際に、二重鎖長の基準となる分子として熱安定性の高い poly-C 分子を採用し、あらかじめ切断した poly-I 分子を poly-C 分子に短時間でアニーリングさせることで、安定した二重鎖長が形成されることが考えた。言い換えると、製造環境に作用されにくい、堅ろう性の高いアニーリングプロセスの構築である。そこで、平均塩基長が 0.2 kb, 0.1 kb, 0.05 kb の poly-I 分子を作製し、平均塩基長 0.4 kb の poly-C 分子と最大限の塩基対が形成する濃度比(poly-I と poly-C の混合比が OD₂₆₀ nm 基準で 52:48)で混合し、PIC 二重鎖長の伸長度合いを調べた。0.2 kb の poly-I 分子と 0.4 kb の poly-C 分子の組合せは、70 °C の短時間加熱では二重鎖長の伸長は抑制されなかった(図 8A)。一方、0.1 kb の poly-I 分子と 0.4 kb の poly-C 分子の組合せは、60 °C の短時間加熱で poly-C 分子の塩基長とほぼ同じ二重鎖長の PIC が得られた(図 8B)。この組合せにおいて、ロット間の再現性は平均塩基長の誤差として ± 0.0 kb ($n = 10$)であった。言い換えると平均塩基長の振れ幅は ± 50 bp 未満に制御された。また、0.05 kb の poly-I 分子と 0.4 kb の poly-C 分子の組合せでは、室温で混合するだけで poly-C 分子の塩基長とほぼ同じ二重鎖長が形成された(図 8C)。60 °C の短時間加熱で二重鎖長がそろった poly-I 分子の上限塩基長を調べたところ、0.13 kb のときに 0.4 kbp の PIC 二重鎖長が形成され、0.14 kb のときには PIC 二重鎖長は 0.5 kbp となったことから、poly-I 分子の上限塩基長は 0.13 kb と特定した。同様に 60 °C の短時間加熱が必要な poly-I 分子の下限塩基長について調べ、0.07 kb と特定した(表 2)。

次に、上述した PIC とは逆の長さの poly-I と poly-C 分子の組合せについて調べた。0.4 kb の poly-I 分子と 0.1 kb の poly-C 分子の組合せは、60 °C の短時間加熱で二重鎖長の伸長はほとんど抑制されず、70 °C の短時間加熱において poly-I 分子に近い二重鎖長に仕上がった(図 8D)。0.4 kb の poly-I 分子と 0.05 kb の poly-C 分子の組合せは、非加熱では塩基長がそろわずにばらつき、60 °C の短時間加熱でもそろわず、70 °C の短時間加熱処理で poly-I 分子とほぼ同じ二重鎖長の PIC 分子が得られた(図 8E)。このように、poly-I 分子を 0.05-0.1 kb に短鎖化した場合と poly-C 分子を 0.05-0.1 kb に

短鎖化した場合では，目的の二重鎖長となる条件が明らかに異なった．これらの実験で用いた加熱処理条件は poly-I 分子も poly-C 分子もほとんど切断されない条件であるので，この条件の違いは，加熱による分子の切断とは別の理由によると考えられた．そこで，これら PIC の CD スペクトルを測定し，二重鎖構造の違いを解析した．

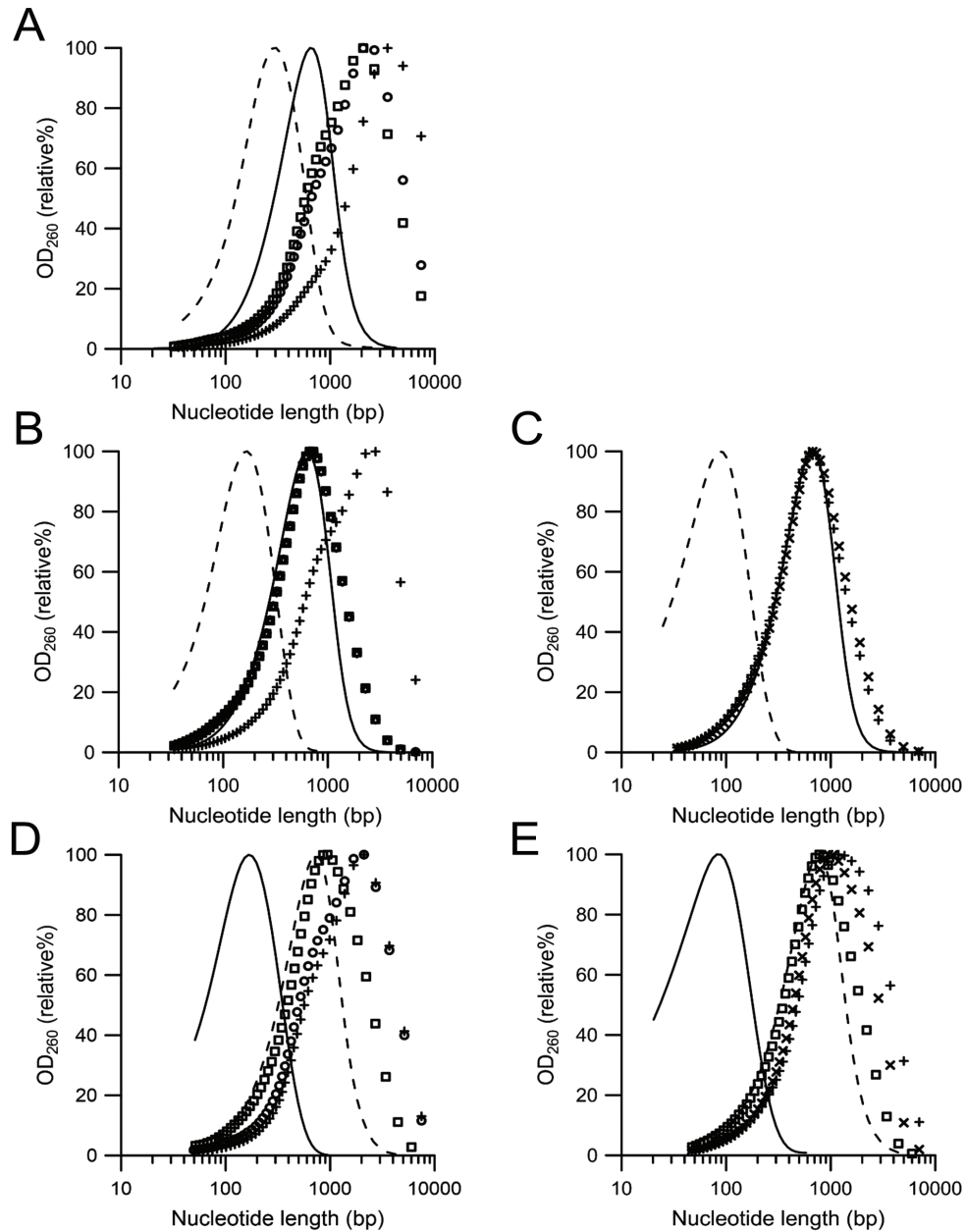


図 8 poly-I, poly-C 分子の塩基長分布とアニーリング後の PIC 二重鎖長との関係性

(A) 0.2 kb poly-I 分子(破線)と 0.4 kb poly-C 分子(実線)でアニールした PIC 分子の代表例. 60 °C加熱冷却処理(○), 70 °C加熱冷却処理(□), 非加熱(+). (B) 0.1 kb poly-I 分子(破線)と 0.4 kb poly-C 分子(実線)でアニールした PIC 分子の代表例. 60 °C加熱冷却処理(○), 70 °C加熱冷却処理(□), 非加熱(+). (C) 0.05 kb poly-I 分子(破線)と 0.4 kb poly-C 分子(実線)でアニールした PIC 分子の代表例. 非加熱(+), ×). (D) 0.4 kb poly-I 分子(破線)と 0.1 kb poly-C 分子(実線)でアニールした PIC 分子の代表例. 60 °C加熱冷却処理(○), 70 °C加熱冷却処理(□), 非加熱(+). (E) 0.4 kb poly-I 分子(破線)と 0.05 kb poly-C 分子(実線)でアニールした PIC 分子の代表例. 70 °C加熱冷却処理(□), 非加熱(+), ×).

表 2 poly-I, poly-C 分子の塩基長とアニーリング条件と PIC 二重鎖長の伸長

Assembled molecules		PIC length (kbp) ^{*1}					
Poly-I (kb)	Poly-C (kb)	H:25°C ^{*2}	H:40°C	H:60°C	H:70°C	H:60°C	H:70°C
		C:Free	C:Free	C:Free	C:Free	C:2°C/h	C:2°C/h
0.4	0.4	Ext	Ext	Ext	Ext	Ext	0.5 ^{*3}
0.2	0.4	Ext	Ext	Ext	Ext	Ext	0.5 ^{*4}
0.14	0.4	Ext	Ext	0.5			
0.13	0.4	Ext	Ext	0.4 ^{*5}			
0.1	0.4	Ext	Ext	0.4 ^{*6}			
0.07	0.4	Ext	Ext	0.4 ^{*7}			
0.05	0.4	0.4 ^{*8}					
0.4	0.1	Ext	Ext	Ext	0.5 ^{*9}		
0.4	0.05	Ext	Ext	Ext	0.4 ^{*10}		

^{*1} 平均二重鎖長. 二重鎖長が伸長してばらつく状態は Ext と表記.

^{*2} 上段[H]は, 加熱温度. 下段[C]は, 冷却方法を表示. 25 °C で自然冷却[Free], または温度勾配 2 °C/h で徐冷[2 °C/h].

^{*3} この条件で作成した PIC を PIC400-400CA と表記する.

^{*4} この条件で作成した PIC を uPIC200-400CA と表記する.

^{*5} この条件で作成した PIC を uPIC130-400 と表記する.

^{*6} この条件で作成した PIC を uPIC100-400 と表記する.

^{*7} この条件で作成した PIC を uPIC70-400 と表記する.

^{*8} この条件で作成した PIC を uPIC50-400 と表記する.

^{*9} この条件で作成した PIC を ruPIC400-100 と表記する.

^{*10} この条件で作成した PIC を ruPIC400-50 と表記する.

第5項 poly-I 分子の短鎖化による PIC の二重らせん構造の変化

RNA 分子の 2 次構造は CD スペクトルに反映される。ホモポリマーである poly-I, poly-C とそのアニーリング体である PIC の二重らせん構造を解析する上で、塩基長の影響を受けない CD スペクトルは重要な解析ツールである。PIC400-400CA および poly-I, poly-C 分子の PBS (pH 7.4) 中の CD スペクトルを図 9A に示した。PIC 分子の PBS (pH 7.4) における CD スペクトルは、245 nm と 275 nm で極大となり、210 nm と 260 nm で極小となる 2 つの山を持つ。このうち、275 nm の極大は、PIC を構成する poly-I 鎖および poly-C 鎖の 2 次構造に由来する CD スペクトルであり、210 nm の極小点から 245 nm の極大点に向かってプラス側に増大する波形は右周りの二重らせん構造を示す CD スペクトルである(Bloomfield *et al.*, 2000)。poly-C 分子は強い右らせんの 2 次構造をとり(Rodger and Norden, 1997)、poly-I 分子はほとんど 2 次構造をとらない(Sarkar and Yang, 1965)。poly-I 分子と poly-C 分子の CD スペクトルを並べてみると違いは明解であった。

0.1 kb の poly-I と 0.4 kb の poly-C で作製した uPIC100-400 の CD スペクトルを PIC400-400CA と比較すると、245 nm の極大点および 210 nm と 260 nm の極小点の振れ幅が縮小したことが読み取れる(図 9B)。この CD スペクトルの変化は、微弱な変化ではあるが、分析日を変えても、作製したロットを変えても再現する確かな変化であった。これらの CD シグナルの減少は、uPIC100-400 の二重らせん構造が PIC400-400CA よりも緩くなったことを示唆している。また、uPIC100-400 で観察された 275 nm の CD シグナルの増加は、poly-C 分子本来の 2 次構造の回復を示唆し、二重らせん構造の緩みと合致した。

0.05 kb の poly-I と 0.4 kb の poly-C で作製した uPIC50-400 の CD スペクトルは、uPIC100-400 の CD スペクトルと酷似していた。一方、長さが逆の組合せとなる 0.4 kb の poly-I と 0.1 kb の poly-C で作製した ruPIC400-100 の CD スペクトル、および 0.4 kb の poly-I と 0.05 kb の poly-C で作製した ruPIC400-50 の CD スペクトルは、PIC400-400CA の CD スペクトルと酷似していた。以上述べたように、CD スペクトルの解析により、uPIC50-400 と uPIC100-400 の二重らせん構造の特殊性が明らかとなった。

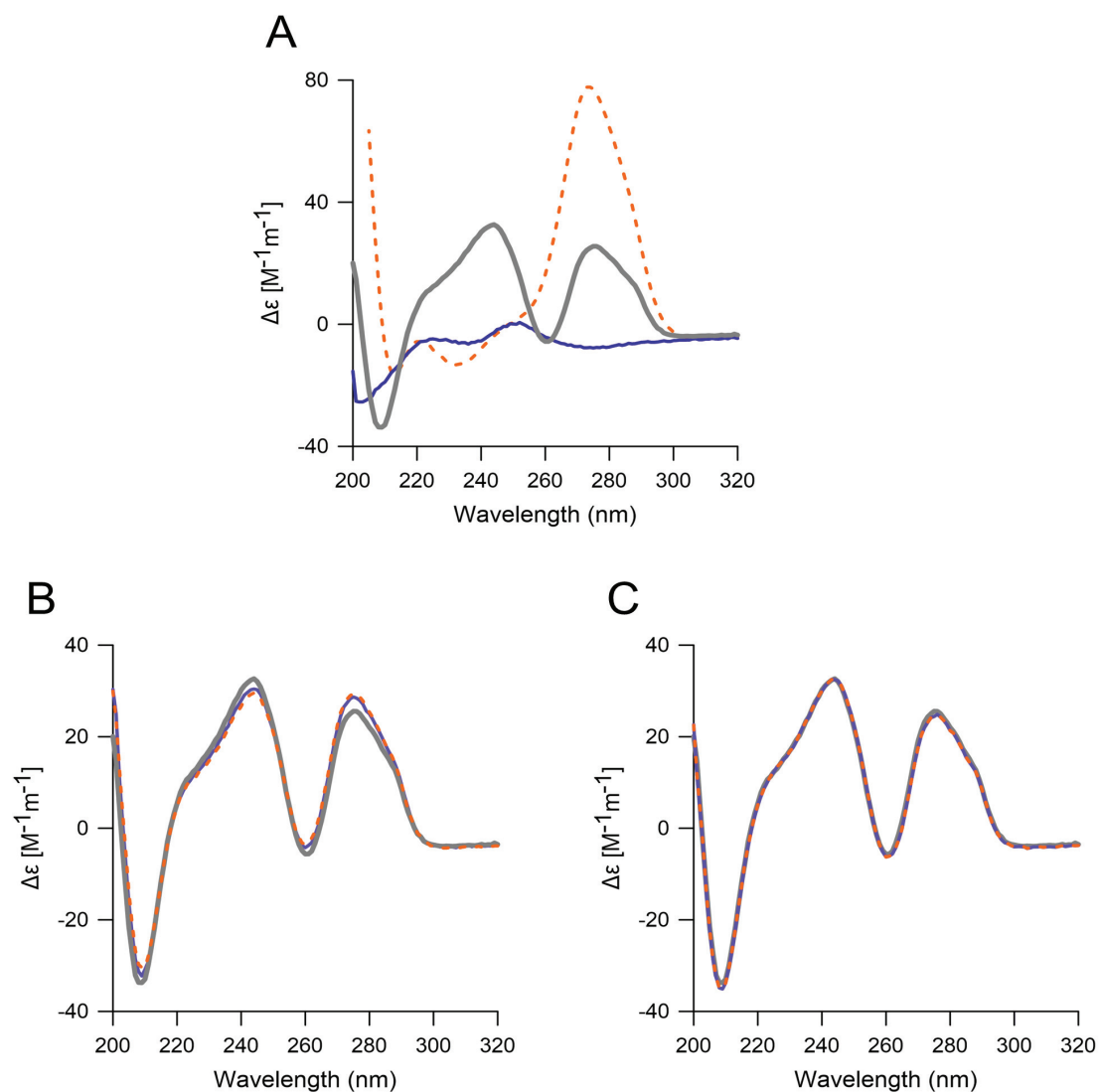


図9 poly-I, poly-C, PIC の CD スペクトル

PBS (pH 7.4)溶液の CD スペクトルを示した. (A)poly-I(実線, 青色), poly-C(破線, 橙色), PIC400-400CA(太線, 灰色). (B)uPIC100-400(実線, 青色), uPIC50-400(破線, 橙色), PIC400-400CA(太線, 灰色). (C)ruPIC400-100(実線, 青色), ruPIC400-50(破線, 橙色), PIC400-400CA(太線, 灰色).

第6項 uPIC100-400 の保存安定性

ワクチン添加剤としての使用を想定して、PBS(pH 7.4)溶液中の保存安定性について検討した。uPIC100-400 と PIC400-400CA の溶液を小型ガラスバイアルに入れて密栓し、25℃と40℃で4か月間保存し、計画した間隔で瓶を抜き取り SEC 分析で二重鎖長の変化を追跡した。両溶液ともに試験期間を通して濁りや着色などの外観の変化は認められなかった。また、SEC 分析においてモノマーなど 260 nm に吸収を持つ低分子化合物の増加も認められなかった。唯一認められた変化が二重鎖長の減少であった(図 10)。PIC400-400CA の 25℃保存サンプルは、保管から 30 日後に有意な二重鎖長の減少が認められ、120 日後には平均二重鎖長が保管開始時の $89.9\% \pm 0.9\%$ ($p < 0.01$)に減少した。PIC400-400CA における二重鎖長の減少は 40℃保管で加速し、120 日後の平均二重鎖長は保管開始時の $56.1\% \pm 5.1\%$ ($p < 0.001$)まで減少した。これに対して、uPIC100-400 の場合は、25℃保管サンプルは 120 日後の平均二重鎖長が保管開始時の $96.6\% \pm 2.6\%$ ($p = 0.134$)であり、有意な減少ではなかった。40℃保管では、14 日後の時点では有意な減少ではなく($p = 0.197$)、30 日後に有意差がみられた($p < 0.01$)。120 日後には保管開始時の $78.6\% \pm 0.7\%$ ($p < 0.001$)に減少した。120 日後の uPIC100-400 と PIC400-400CA の塩基長減少率の違いは、25℃保存($p < 0.01$)、40℃保存($p < 0.001$)ともに顕著な差であり、uPIC100-400 の二重鎖は PIC400-400CA の二重鎖よりも加水分解を受けにくく安定性が大きく向上したことが数値として示された。uPIC100-400 を PBS の代わりにインフルエンザ HA ワクチン(KM バイオロジクス, 熊本)に溶解して二重鎖長の変化を 25℃で 30 日間モニタリングしたところ、PBS 溶液と同様に二重鎖長の顕著な変化は認められず、HA 抗原の存在下でも PIC の溶液安定性に変化は認められなかった(データ略)。

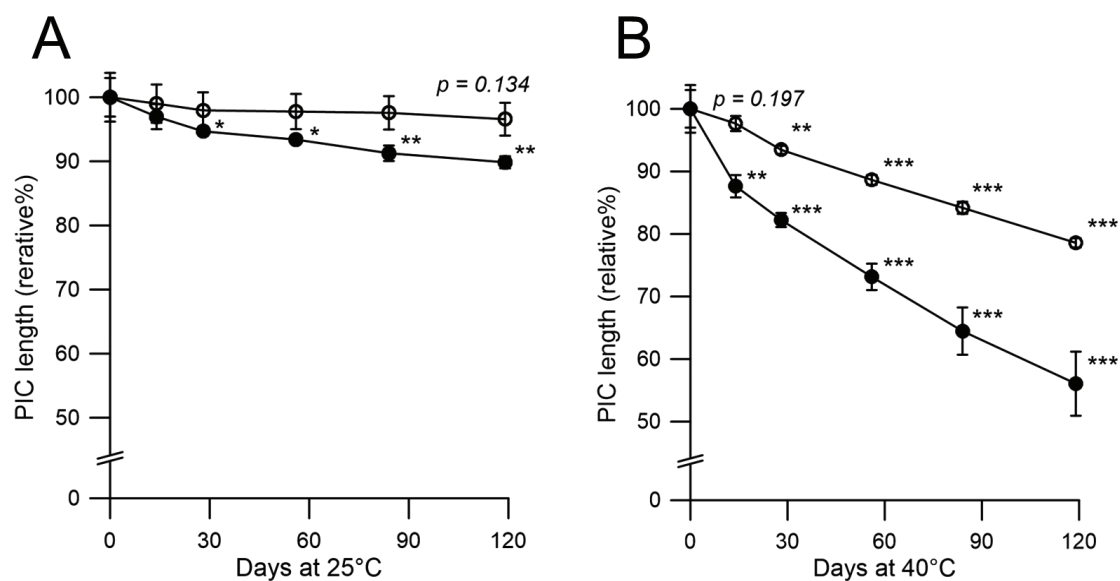


図 10 PIC 塩基長の溶液保存安定性

PBS (pH 7.4)に溶解して密栓し，(A) 25 °Cで保管したときの uPIC100-400 (○) と PIC400-400CA (●)の平均塩基長，(B) 40 °Cで保管したときの uPIC100-400 (○) と PIC400-400CA (●)の平均塩基長をプロットした．試験はそれぞれの保管温度で 2 製造ロット各 2 サンプル(合計 $n = 4$)で実施し，0 日目の値に対する相対値を標準誤差とともにプロットした．統計的に有意差がついたサンプルには*印をつけた (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

第4節 考察

本章では、塩基長の長い poly-C 分子に短い poly-I 分子を複数個相補させたアニーリングを行うことで、二重鎖長の伸長を回避できることを示した。この poly-I 分子と poly-C 分子の長さが異なる組合せ、いわゆる不均等構造の PIC によって、これまで誰も成功し得なかった PIC 二重鎖長の制御が実現した。

本研究の課題として取り組んだ PIC アニーリング時に観察される分子量の増加現象は、poly-I 分子と poly-C 分子が数珠つなぎに連なった二重鎖長の伸長現象である。一部の核酸分子では三重鎖や四重鎖の形成が観察されているが、poly-I 分子と poly-C 分子は、中性溶液中では 1 対 1 のワトソン・クリック型塩基対で形成した二重鎖が唯一の会合の形態である (Michelson *et al.*, 1967)。また、poly-I 分子と poly-C 分子は特定の条件を除いてバルジ構造やループ構造をとることはなく、その隙間に別の分子が結合するような不定形の凝集体を形成することもない。なぜならば、poly-I 分子と poly-C 分子は完全なホモポリマーであるので、配座エントロピーが最大となるような塩基対の位置で安定化するためである。塩基配列による立体障害で塩基対の形成が途中で阻まれることはない。ただし、PIC 二重鎖は、0 °C で不安定なマルチループ構造が生じること、その PIC のマルチループ構造は 37 °C に昇温すると速やかに解消し整った二重らせんに戻ることが観察されている (Merigan *et al.*, 1971)。

poly-I 分子と poly-C 分子のどちらかの塩基長を短くすることは、PIC 二重鎖の伸長抑制に効果的であった。uPIC50-400 や ruPIC400-50 のようにどちらかの分子を短くすればするほど、高温に長時間さらすことなく二重鎖の伸長が抑制された。したがって、二重鎖長の伸長抑制だけを主眼におくと uPIC50-400 がベストの組合せとなる。しかし、uPIC50-400 や ruPIC400-50 は、 T_m 値が 60 °C を下回った。過去の報告を調べると T_m 値が 60 °C を下回る二重鎖は *in vivo* で IFN 誘導活性が弱いという調査結果がある (De Clercq, 1974)。uPIC50-400 と ruPIC400-50 は、アジュバントとして機能しない可能性が示唆されるが、この点については次章で探求する。

poly-I 分子のみを短鎖化した PIC は、poly-C 分子のみを短鎖化した PIC よりも弱い熱処理で二重鎖が目的の長さに整った。両者の違いは、poly-I 分子と poly-C 分子の 2 次構造の違いに起因する可能性が、CD スペクトルの比較実験から示唆された。らせん構造をほぼとらない直鎖状の poly-I 分子は、二重らせん構造を形成する際に立体構

造が激しく変化する。長い poly-I 分子ほどひずみを多く蓄え、安定した二重鎖分子を形成するまでの間に塩基対の解離と再対合が幾度となく行われることが類推され、より高い熱量が必要な事情と合致する。

PIC400-400CA の二重鎖長が整ったように、同等塩基長の poly-I 分子と poly-C 分子を用いても、70 °C まで加熱し、2 °C/h で緩やかに温度降下することによって二重鎖長の伸長はほどよく解消された。しかし、このアニーリング方法における二重鎖長の伸長回避は、高温処理によって poly-I 分子と poly-C 分子の塩基長が適度に切断されたためであった。したがって、このような熱処理を加えて作製した PIC400-400CA は、poly-I 鎖と poly-C 鎖の両鎖に一定頻度でニック(切れ目)が入っていると推定される。poly-I 分子のホスホジエステル結合は、poly-C 分子のホスホジエステル結合よりも非酵素的に開裂しやすいことは本章で述べた。この事実を踏まえると、PIC400-400CA 分子内の poly-C 鎖の切れ目が PIC 二重鎖の優先的な切断点であり、溶液保存中に早い段階で切断され则认为ることができる。保存安定性の高い二重鎖構造の要件の一つは、poly-C 鎖に切れ目のない二重鎖構造であるという推定は、uPIC100-400 の二重鎖が PIC400-400CA の二重鎖よりも溶液中の安定性が勝っていた事実によって支持される。

第3章 二重鎖 RNA リガンドの応答性評価

第1節 序文

本章では、第2章で見いだした二重鎖長の伸張抑制に効果があった PIC の二重鎖構造がヒトの免疫応答にどのような質的、量的変化をもたらすのか、レポーター細胞を用いた *in vitro* の実験系で探求した。

PIC は自然免疫における 2 つの独立したシグナル伝達経路によって哺乳類に検知される。PIC を検知した哺乳類では、I 型 IFN と炎症性サイトカインの産生応答が速やかに起こる(Akira, 2011)。そのシグナル伝達経路の 1 つは、TLR3-TICAM-1(TRIF)経路である(Matsumoto *et al.*, 2002; Oshiumi *et al.*, 2003)。エンドソーム内の TLR3 刺激で始まるこのシグナル伝達経路は、樹状細胞やマクロファージ、神経細胞、線維芽細胞など幅広い細胞で見ついている(Matsumoto and Seya, 2008)。2 つ目のシグナル伝達経路は、RLR-MAVS 経路である。この経路はあらゆる細胞で機能しているシステムで、RNA ヘリカーゼの一種の RIG-I と MDA-5 (RIG-I like receptors; RLRs)によって起こる細胞質内から開始されるシグナル伝達である(Kato *et al.*, 2006; Kawai *et al.*, 2005; Yoneyama *et al.*, 2004)。両シグナル伝達経路は、それぞれ独立した機構で制御されており(Hotz *et al.*, 2015)、自然免疫応答にも質的な違いがある(Akira, 2011; Seya *et al.*, 2013)。

PIC に対する自然免疫応答は、二重鎖を構成する poly-I 分子、poly-C 分子の塩基長の影響を受ける。0.6 kb の poly-I 分子と 0.07 kb 以上の poly-C 分子で構成される PIC を、ニュージーランド白ウサギに静脈注射すると水疱性口内炎ウイルス(VSV)に 100 % 耐性を示すが、0.6 kb の poly-C 分子と 0.2 kb の poly-I 分子で構成される PIC は、VSV に対するウイルス耐性が 20-50 %に低下することが報告されている(Tytell *et al.*, 1970)。また、ヒト L 細胞とウサギの腎細胞の I 型 IFN 産生応答は、poly-C 分子よりも poly-I 分子の塩基長の影響を強く受けることが報告されている(Stewart and de Clercq, 1974)。一方で、ヒト TLR3 レポーター細胞を用いて、長さの異なる poly-I 分子と poly-C 分子で組み合わせた PIC に対する TLR3 の応答性実験では、poly-I 分子と poly-C 分子のどちらか一方を 30 base の人工オリゴヌクレオチドに替えると、TLR3 の応答性がどちらも約 1/4 に低下することが示されている(Okahira *et al.*, 2005)。このように、PIC を構成する poly-I 分子と poly-C 分子の塩基長の影響は議論の余地が残されている。

第2節 実験材料と実験方法

第1項 PIC, トランスフェクション試薬

本章の実験に供した PIC を表 3 に示す.

トランスフェクション試薬は LyoVec™(Invovogen)を使用した. この試薬は, ホスホノ脂質 di-tetradecylphosphoryl-N,N,N-trimethylmethanaminium chloride (DTCPTA) と中性脂質 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phospho-ethanolamine (DiPPE)から構成されるカチオンリポソームである.

第2項 細胞

(1) TLR3 レポーター細胞

ヒト由来 TLR3 とマウス由来 TLR3 の応答性評価は, それぞれ HEK-Blue™-hTLR3 細胞と HEK-Blue™-mTLR3 細胞(Invovogen)を使用した. これらの細胞は, IFN- β 最小プロモーター下流に転写促進因子 NF κ B と AP-1 の結合配列および分泌型アルカリ性ホスファターゼ(SEAP)構造遺伝子を配したレポーター遺伝子カセット, ならびに TLR3 遺伝子が導入された HEK293 細胞の形質転換体である. TLR3 から発せられたシグナル伝達によって活性化された NF κ B 量を SEAP の発現量でモニタリングできる.

(2) RLRs レポーター細胞

マウス RLRs の応答性評価は, C57/WT MEF 細胞株(Invovogen)を用いた. この細胞は, 転写促進因子 NF κ B と IRF3/7 および SEAP 構造遺伝子のレポーター遺伝子カセットで形質転換された C57/BL6 起源のマウス胎児線維芽細胞(MEF)細胞株である. RIG-I/MDA5 から発せられたシグナル伝達によって SEAP 発現量が増大する.

(3) ヒト肺線維芽細胞株

ヒト RLR の応答性評価は, 理化学研究所バイオリソースセンターから分譲を受けたヒト胎児肺由来正常 2 倍体線維芽細胞株 MRC-5(RCB0211)を使用した.

第3項 培地および培養方法

(1) 培地

培地はダルベッコ変法イーグル培地(DMEM; 1.0 g/L グルコース, L-グルタミン, ビルビン酸含有)(ナカライテスク, 京都)を用い, 50 units/mL ペニシリン G, 50 μ g/mL ストレプトマイシン硫酸塩(富士フィルム和光純薬)および 10 % (v/v) 牛胎児血清(FBS)(MP Bio Japan, 東京)を加えて培養した. FBS は, あらかじめ 56 °C で 30 分間加温して不活化処理したものを用いた. HEK-Blue™-hTLR3 細胞と HEK-Blue™-mTLR3 細胞用の培地は, さらに 100 mg/mL Zeocin(Invivogen), 10 mg/mL Blasticidin(Invivogen)を添加し, C57/WT MEF 細胞用の培地は 100 mg/mL Zeocin, 3 mg/mL Blasticidin を添加した.

(2) 培養方法

シード培養は, 凍結細胞ストックを 10 cm または 6 cm ディッシュに播種して 37 °C, 5 % CO₂ 条件で培養し, 70-80 % コンフルエント ($6-7 \times 10^5$ cells/mL) の状態で継代した. 維持培養は最長 2 週間以内とし, レポーター細胞の劣化を回避した. ディッシュからの細胞剥離操作は, C57/WT MEF 細胞と MRC-5 細胞は 0.25 % トリプシン処理で行い, HEK-Blue™-hTLR3 細胞と HEK-Blue™-mTLR3 細胞はトリプシンを避け, セルスクレーパーで行った.

評価培養は, 12 ウェルプレート(AGC テクノグラス, 静岡)で行った. HEK-Blue™-hTLR3 細胞と HEK-Blue™-mTLR3 細胞は剥離しやすいため, コラーゲンコート済み 12 ウェルプレート(AGC テクノグラス)を用いた. シード培養細胞は, 2×10^5 cells/well 濃度で播種し, 37 °C, 5 % CO₂ 条件で 70-80 % コンフルエントまで培養した. 培養時間は, 20-40 時間であった.

(3) PIC の細胞導入 (トランスフェクション)

PIC の細胞導入は, トランスフェクション試薬 LyoVec™(Invovogen)を用いて行なった. LyoVec™ 凍結乾燥バイアル 1 瓶に 1.6 mL の滅菌水を加えて 30 秒間激しくボルテックスした後, 4 °C で 30 分以上静置した. この LyoVec™ 溶液 40 μ L に対して 10 μ L

の PIC 水溶液または生理食塩水を軽く混合して 12 ウェルプレート 1 ウェル分のリポソーム吸着 PIC 溶液 50 μ L を準備した。このリポソーム吸着 PIC 溶液は、25 $^{\circ}$ C で 15 分以上静置した後に、細胞培養液に添加することで PIC の細胞導入を行った。

第 4 項 TLR3 レポーター細胞評価

細胞が 70-80 %コンフルエントになったタイミングで、培養上清をアスピレーターで吸引し、FBS を含まない DMEM(-FBS) 1 mL でリンスした。リンスを 2 回実施後、DMEM(-FBS)を 1 mL/well 加えて培地交換を行った。その後、20 ng/ μ L の PIC 溶液または生理食塩水を 5 μ L/well 添加し、37 $^{\circ}$ C、5 % CO₂ 条件で培養した。PIC 添加量は、終濃度 100 ng/mL である。培養 2 時間後に低 IgG FBS(Thermo Fisher Scientific, 東京)を 0.1 mL/well 添加し培養を継続した。PIC 添加 20 時間後に培養上清を採取し、上清中の SEAP を QUANTI-Blue™(Invivogen)による発色法で定量分析した。QUANTI-Blue™の粉末 1 袋を 100 mL の精製水に溶解し、0.22 μ m のフィルターでろ過した後、96 ウェルプレートに 200 μ L/well 分注した。適宜希釈した検体と PBS で段階希釈した SEAP(タカラバイオ)を 10 μ L/well 添加して軽く振盪攪拌し、37 $^{\circ}$ C で 30 分から 2 時間静置した。生じた青色の発色を 630 nm の吸光度でプレートリーダーで測定し、SEAP の検量線から検体の SEAP 活性を求めた。

第 5 項 RLRs レポーター細胞評価

PIC の細胞導入は、トランスフェクション試薬 LyoVec™(Invovogen)を用いて行なった。LyoVec™ 溶液 40 μ L に対して 10 μ L の PIC 水溶液(200 ng/ μ L)または生理食塩水を軽く混合して 1 ウェル分のリポソーム吸着 PIC 溶液 50 μ L (PIC 1 μ g)を準備した。このリポソーム吸着 PIC 溶液は、25 $^{\circ}$ C で 15 分以上静置した後に使用した。70-80 %コンフルエントまで増殖した 12 ウェルプレートの細胞培養液は、アスピレーターで培養上清を吸引し、FBS を含まない DMEM(-FBS)を用いて 3 回リンスし、DMEM(-FBS)を 1 mL/well 静かに加えて培地を交換した。その後、リポソーム吸着 PIC 溶液またはリポソーム-生理食塩水溶液を 50 μ L/well 添加し、37 $^{\circ}$ C、5 % CO₂ 条件で培養した。培養 2

時間後に低 IgG FBS(Thermo Fisher Scientific)を 0.1 mL/well 添加した。PIC 添加 20 時間後に培養上清を採取し、上清中の SEAP を QUANTI-Blue™(Invivogen)による発色法で定量分析した。

第6項 MRC-5 細胞株を用いた評価

PIC の細胞導入は、LyoVec™(Invovogen)を用いて行った。リポソーム吸着 PIC 溶液の作製から培養上清の採取に至る手順は C57/WT MEF 細胞評価で述べた方法と同様に行った。培養上清中の IFN- β 濃度は、「ヒトインターフェロン- β ELISA キット」(鎌倉テクノサイエンス, 神奈川)を用いて定量した。この測定キットは、NIH ヒト IFN- β 標準品で検定されたキット添付の標準品を用いて検量線を引き、国際単位(IU)で表示するサンドイッチ ELISA 測定キットである。抗ヒト IFN- β ポリクローナル抗体がコーティングされた 96 ウェルプレートに、段階希釈した IFN- β 標準品 0.1 mL および適宜希釈した培養上清 0.1 mL を添加して IFN- β をプレートに吸着させ、HRP 標準抗ヒト IFN- β マウスモノクローナル抗体 Fab で IFN- β を挟み込み、HRP 活性による基質 TMB の発色を波長 450 nm の吸光度で測定し、IFN- β 標準直線から IFN- β 濃度を算出した。測定はキット記載のプロトコール通りに実施し、波長 450 nm と波長 595 nm の吸光度差をプレートリーダーで読み取り、検量線から IFN- β 濃度を算出した。

第7項 フォーカスト DNA マイクロアレイ解析

PIC をトランスフェクションして培養した MRC-5 株の自然免疫関連遺伝子の発現変化を「ジェノパール™ ヒト自然免疫チップ」(三菱レイヨン, 東京)を用いて解析した。MRC-5 の細胞培養は、12 ウェルプレートを 6 cm ディッシュに変えて行った。PIC のトランスフェクションとその後の培養方法は、細胞播種量、培養液量、リポソーム吸着 PIC 添加量を 5 倍に拡大した以外は、上述した「MRC-5 細胞株を用いた評価」と同様である。PIC 添加 4 時間後および 24 時間後のディッシュを取りだし、培養上清を吸引除去し、PBS で 1 回リンスし、PBS を 1 mL 加えてスクレーパーで細胞を剥がし、RNeasy mini Kit(キアゲン, 東京)でトータル RNA を抽出・精製した。アレイ解析は、ジェノパー

ル受託解析サービス(倉敷紡績, 大阪)を利用した。送付したトータル RNA は, ビオチン標識化され, DNA チップとのハイブリダイゼーション, 洗浄, 蛍光標識, 洗浄, 安定化処理を経て, 蛍光測定が行われ, 生データとデータ処理で算出された遺伝子ごとの発現データがレポートされた。「ジェノパール™ ヒト自然免疫チップ」に搭載された 199 遺伝子の発現量は, シグナル強度を 9 つのハウスキーピング遺伝子(ACTB, ATP5F1, GAPDH, GTF2B, PLA2G5, RPS5, TUBA1B, GUSB, RPLP0)のシグナル強度で補正した値としてデータ化される。同時に, それらのシグナル強度と DNA チップ上の空スポットのシグナル強度の差が有意な変化であるかどうかの情報が付記される。

第8項 ヒト血清による PIC の消化性評価

PBS(pH 7.4)で希釈調製した 0.1 mg/mL の PIC 溶液 90 μ L をマイクロチューブに計量し, PBS(pH 7.4)で 10 倍希釈したヒト血清(Lonza Japan, 東京)を 10 μ L 加えて 37 °C で 5 分間インキュベートし, 4 °C に冷却した。TE 飽和フェノール(ニッポンジーン, 東京) 100 μ L を加え, 激しく混合して血清中の RNase を失活させ, 遠心分離して上層の水層を回収した。次にクロロホルム 100 μ L を加えて激しく混合し, 遠心分離して上層を回収した。1×TBE バッファードアガロースゲル電気泳動を行い, 塩基長分布の変化を調べた。

第9項 統計解析

細胞培養実験データの統計解析は, SPSS 統計解析ソフトウェア(SPSS, IL, USA)を用いて行なった。グループ間の平均値の差を一元配置分散分析と Turkey の多重比較検定で行った。p 値が 0.05 以下のとき, 統計的に有意な差があると判断した。DNA アレイデータの解析における回帰方程式の算出および決定係数 R^2 の算出は, Grapher 10 (Golden Software, CO, USA)を用いて行なった。

表 3 試験に供した PIC の一覧

Test materials	Length of RNA molecules			Distribution of RNA molecules ^{*1}			Heat & Cool treatment ^{*2}	Tm [°C]
	poly-I	poly-C	PIC	poly-I	poly-C	PIC		
	[kb]	[kb]	[kbp]					
PIC400-400CA	0.4	0.4	0.4	1.6	1.5	2.0	70/Long	63
uPIC200-400CA	0.2	0.4	0.4	1.6	1.6	1.9	70/Long	63
uPIC130-400	0.13	0.4	0.4	1.4	1.5	1.8	60/Quick	62
uPIC100-400	0.1	0.4	0.4	1.5	1.6	1.8	60/Quick	62
uPIC70-400	0.07	0.4	0.4	1.6	1.5	1.8	60/Quick	60
uPIC50-400	0.05	0.4	0.4	1.4	1.5	1.7	nt	59
ruPIC400-100	0.4	0.1	0.5	1.6	1.5	1.9	70/Quick	61
ruPIC400-50	0.4	0.05	0.4	1.6	1.7	1.9	70/Quick	58

*1 分子量分布幅 = 重量平均分子量(Mw)/数平均分子量(Mn)

*2 70 °C加熱後, 2 °C/h で冷却 (70/Long), 70 °C加熱後, 室温で自然冷却(70/Quick), 60 °C加熱後, 室温で自然冷却(60/Quick), 無加熱 (nt).

第3節 結果

第1項 TLR3 応答性

まずはじめに塩基長が異なる poly-I 分子, poly-C 分子をアニーリングして作製した, 同等鎖長分布の PIC 分子(表 3)をレポーター細胞アッセイに供し, TLR3 の応答性を評価した(図 11). Invivogen 社のヒト TLR3 レポーター細胞を用いたアッセイでは, 0.07 kb 以上の poly-I 分子と 0.4 kb の poly-C 分子で作製した PIC で明確な TLR3 応答が認められたが, 0.05 kb の poly-I 分子で作製した uPIC50-400 は統計的に有意な TLR3 応答が得られなかった. ポジティブコントロールの PIC400-400CA に対する応答性と比較すると, 0.1 kb 以上の poly-I 分子で作製した PIC に対する応答性に差は認められなかったが, 0.07 kb の poly-I 分子で作製した uPIC70-400 に対する応答性は明らかに低下した. これらの結果から, ヒト TLR3 の応答性は, PIC を構成する poly-I 分子の塩基長が 0.07 kb 以下の PIC に対して低下することが明らかとなった. poly-I 分子を 0.4 kb に固定して短い poly-C 分子を組合せて作製した poly-I 分子長と poly-C 分子長が逆の組合せの PIC については, 少なくとも poly-C 分子が 0.05 kb まではヒト TLR3 の応答性が変化しなかった. 言い換えると, poly-I 分子の短鎖化でヒト TLR3 の応答性の低下は認められなかった. 同様の結果はマウス TLR3 レポーター細胞でも確認されたことから, poly-I 分子の短鎖化に伴う TLR3 応答性の低下現象は試験に供したヒト TLR3 に限定された現象ではないことが確認された.

第2項 RLRs 応答性

次に, RNA ヘリカーゼ系の dsRNA リガンドである RIG-I と MDA5 (合わせて RLRs) の応答性について Invivogen 社の C57 WT/MEF レポーター細胞を用いて評価した. このレポーター細胞は, 刺激に対するマウス RIG-I と MDA5 から発せられるシグナルの総和が SEAP 活性として検出できる. 両者を区別することはできない. トランスフェクション試薬を用いて PIC を細胞内に導入した C57 WT/MEF 細胞は, poly-I 分子の塩基長が 0.05-0.4 kb の間のすべての PIC に対して同等の RLR 応答を示した(図 12).

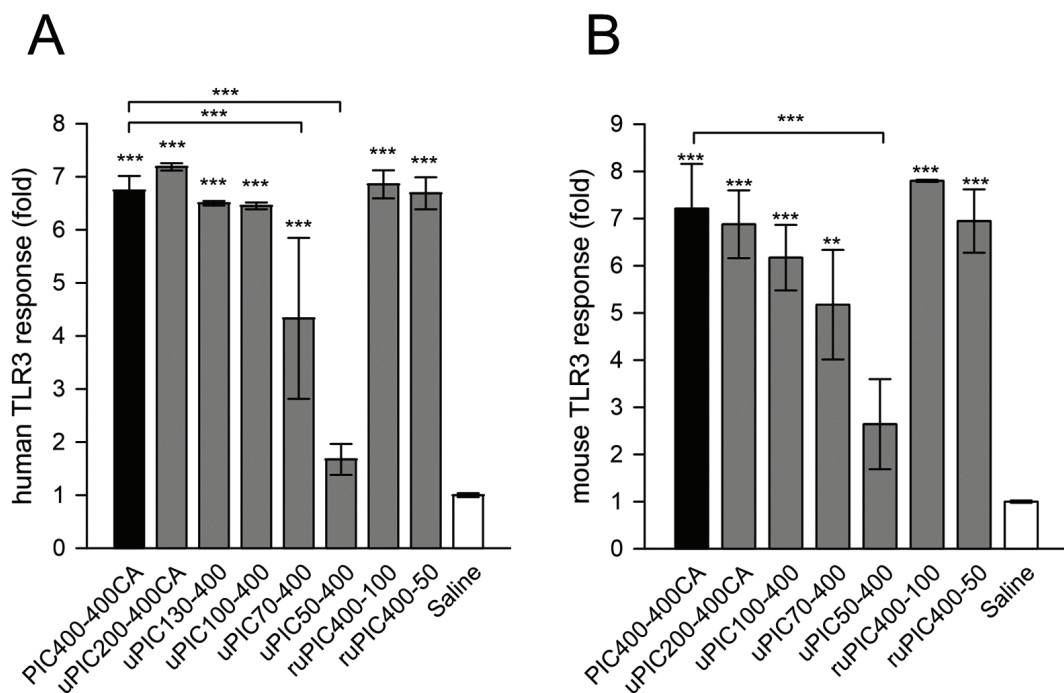


図 11 TLR3 応答性に対する PIC の二重鎖構造の影響

ヒト TLR3(A), マウス TLR3(B)の応答性をレポーター細胞で評価した。PIC 無添加区(Saline)を1としたときの相対値を平均値 ± 標準誤差(n = 3)でグラフ化した。PIC 無添加区に対して統計的有意差のある試験区は棒グラフの上端に*印を付し, PIC400-400CA 添加区に対する統計的有意差のある試験区は棒グラフ上部のバーを付け加えた(***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05)。

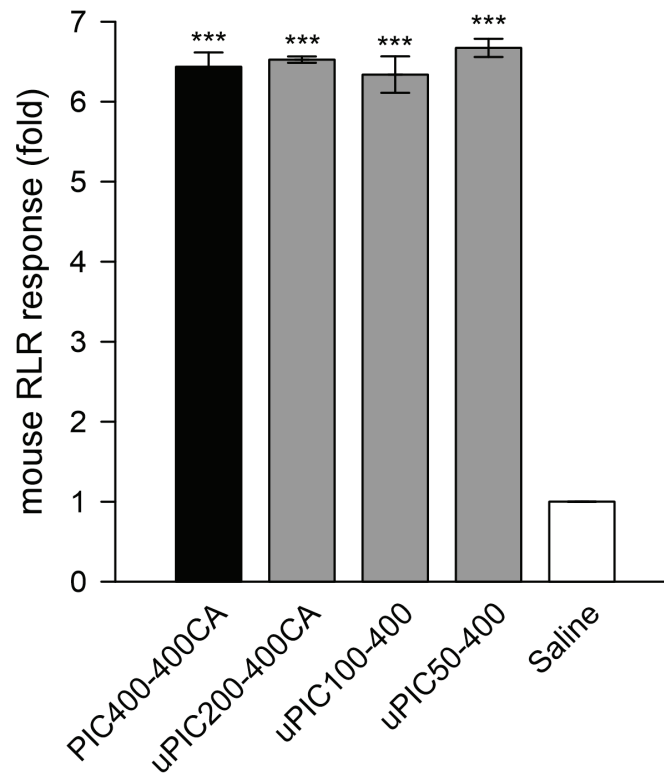


図 12 RLRs 応答性に対する PIC の二重鎖構造の影響

マウス RLRs の応答性をレポーター細胞で評価した。PIC 無添加区 (Saline) を 1 としたときの相対値を平均値 $\pm$ 標準誤差 ($n = 3$) でグラフ化した。PIC 無添加区に対して統計的有意差のある試験区は棒グラフの上端に*印を付した。PIC400-400CA 添加区に対する統計的有意差のある試験区はなかった (** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$)。

第3項 ヒト線維芽細胞 MRC-5 の応答性

次に、ヒト肺線維芽細胞株 MRC-5 を用いてヒト RLRs の応答性を評価した。トランスフェクション試薬を用いて PIC を細胞内に導入した MRC-5 細胞における IFN- β 産生は、長鎖 PIC を除き、培養 4 時間後から検出され、少なくとも培養 21-27 時間後までは増加し続けた(図 13A)。長鎖 PIC の IFN- β は培養約 12 時間から観測され、他の短鎖 PIC より応答が遅延した。培養 20 時間後の IFN- β 産生量は、トランスフェクション試薬に混合した PIC 添加量に応じて増加した(図 13B)。したがって、MRC-5 細胞を用い、少なくとも培養 4-27 時間の範囲で IFN- β 産生量を比較することで PIC 刺激に対する細胞応答性を評価できると判断した。

この IFN- β の産生応答は、PIC 間で有意な差異は認められなかった(図 14)ことから、PIC を構成する poly-I 分子、poly-C 分子の塩基長が、少なくとも 0.05-0.4 kb の間では、RLRs の応答性に影響を与えないことが明らかとなった。

MRC-5 細胞は、細胞表面に TLR3 が発現していることが免疫染色で確認されている(Matsumoto *et al.*, 2002)。トランスフェクション試薬を併用せずに、PIC 溶液を直接 MRC-5 細胞培養液に添加する実験も合わせて行なったが、100 倍量に相当する 10 μ g/mL を添加しても IFN- β の産生は検出されなかった(図 14)。この結果から、PIC のトランスフェクションによって誘導された IFN- β の産生は、RLRs のシグナル伝達によって起こった現象と判断した。

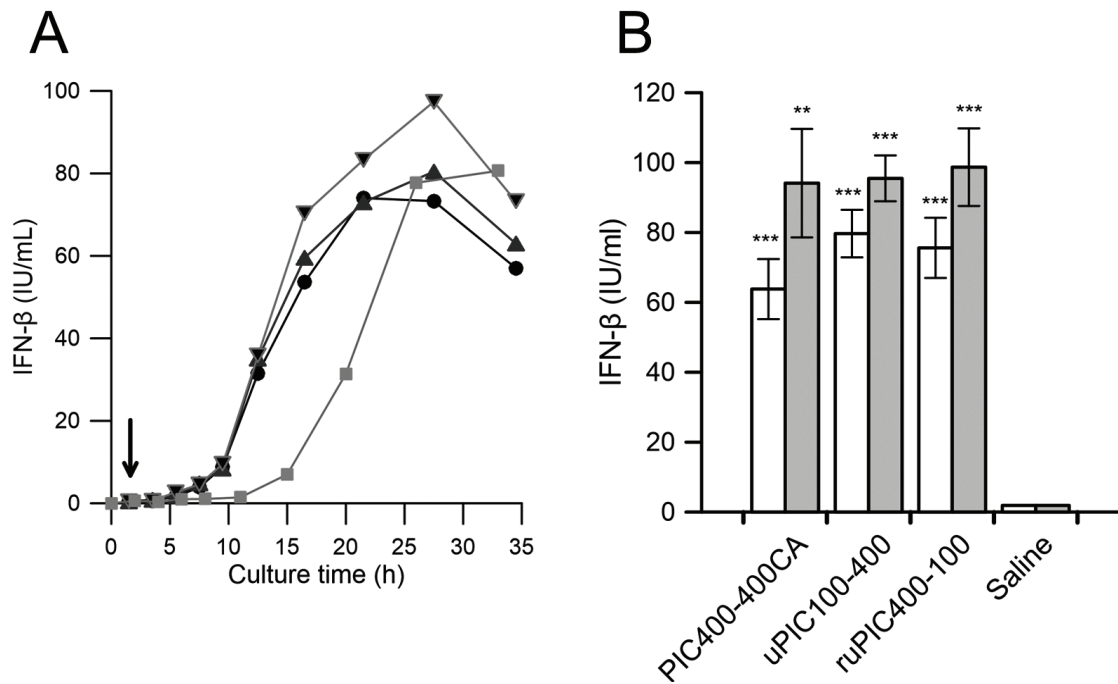


図 13 MRC-5 株の PIC 刺激に対する IFN- β 産生応答

(A) IFN- β 産生の経時変化：60 mm ディッシュ培養。培養 2 時間後(矢印)に 1 μ g/mL の PIC400-400CA(●), uPIC100-400(▲), uPIC50-400(▼), 長鎖 PIC(■) を添加した(n = 1)。 (B) 12 ウェルプレート培養：培養 2 時間後に PIC を 0.3 μ g/mL(白色), 1 μ g/mL(灰色)添加し, さらに 18 時間培養したときの IFN- β 産生量 (n = 3)。PIC 無添加区(Saline)に対する有意差を*印で表示した (**p < 0.01, ***p < 0.001)。

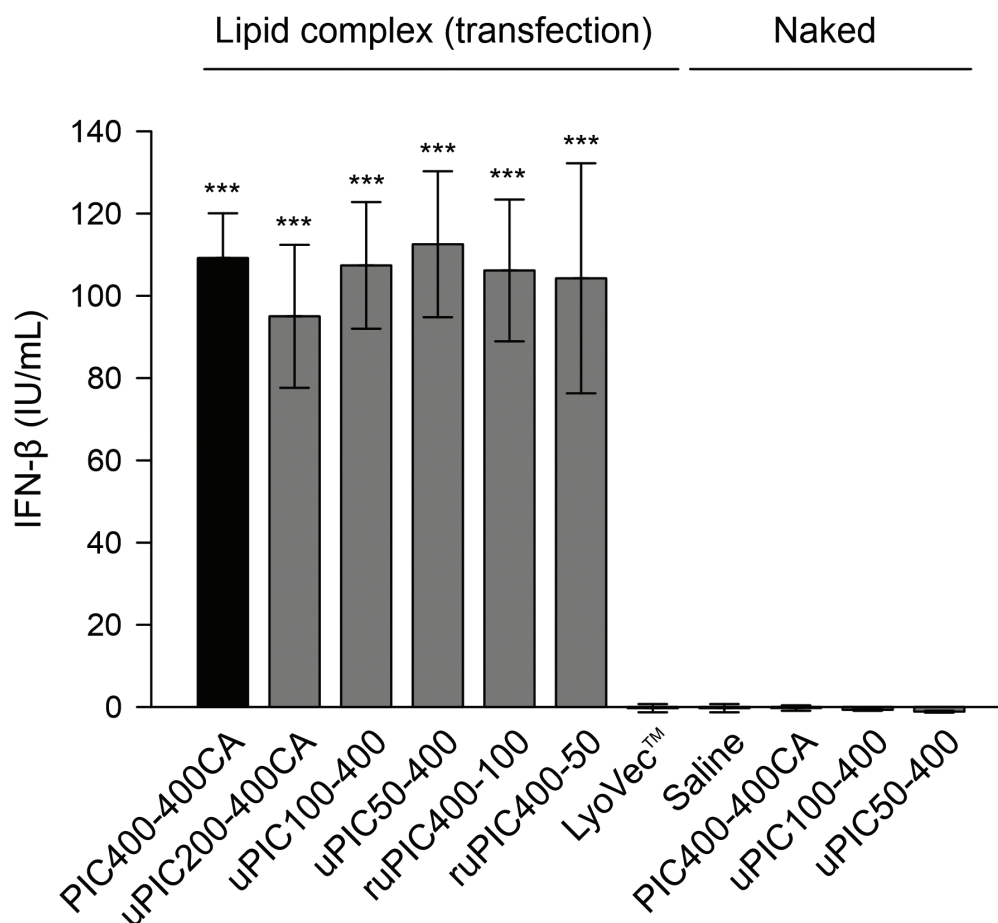


図 14 ヒト肺線維芽細胞株 MRC-5 の IFN- β 産生応答に対する PIC 二重鎖構造の影響

トランスフェクション試薬 LyoVec™ を用いて PIC (1 μ g/mL) を細胞に導入する試験系と PIC (100 μ g/mL) を細胞培養液に添加する試験系の 2 通りで評価した。IFN- β の産生量は ELISA で測定し、平均値 $\pm$ 標準誤差 ($n = 3$) でグラフ化した。PIC 無添加区 (図の LyoVec™, Saline) に対して統計的有意差のある試験区は棒グラフの上端に * 印を付した。PIC400-400CA 添加区に対する統計的有意差のある試験区はなかった (***) $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

第4項 自然免疫関連遺伝子の発現応答性

第1-3項の実験によって、TLR3の応答性は、平均塩基長0.07 kb以下のpoly-I分子で作製したPICに対して減弱すること、RLRsの応答性はpoly-Iまたはpoly-C分子のどちらか一方を短くしても変化しないことが明らかとなった。次に、TLR3, RLR以外の自然免疫関連因子の応答性に影響を与えるのかどうかを解析するために、フォーカストDNAアレイを用いて、自然免疫関連遺伝子の発現変動を調べた。解析に用いた「ジェノパール™ ヒト自然免疫チップ」は、ヒトの自然免疫関連遺伝子199遺伝子が選抜搭載されたDNAチップである。9つのハウスキーピング遺伝子(ACTB, ATP5F1, GAPDH, GTF2B, PLA2G5, RPS5, TUBA1B, GUSB, RPLP0)が搭載されており、これらのハウスキーピング遺伝子を用いて補正したシグナル強度によってサンプル間の発現量が比較できる。4種のPIC (PIC400-400CA, uPIC100-400, uPIC50-400, ruPIC400-50)でそれぞれトランスフェクションされた培養24時間後のMRC-5細胞のmRNA量を、同時培養したLyoVec™のみ(PIC無添加)でトランスフェクション操作を行ったMRC-5細胞の発現量を遺伝子ごとに比較した。

PIC400-400CAが細胞内に導入されたMRC-5細胞では、DNAチップに搭載された自然免疫関連遺伝子199遺伝子のうち157遺伝子の発現量が、統計的に意味のある変化(空スポットのシグナル強度の標準偏差の3倍以上)として検出された。このDNAチップに搭載された全遺伝子の発現量を遺伝子別にPIC無添加MRC-5細胞の遺伝子の発現量と比較したデータを散布図として図15Aに示した。PIC400-400CAが細胞内に導入されたことで3倍以上に発現上昇した遺伝子は110遺伝子(70%)あり、発現量が1/3以下に減少した遺伝子はなかった。主な遺伝子の発現上昇率は、RIG-I (DDX58, 72倍), MDA5 (IFIH1, 98倍), IFN- β (IFNB1, 173倍), IFN誘導性タンパク遺伝子群(10-1000倍), 炎症性ケモカインのCCL5(534倍), 炎症性サイトカインのIL-6(238倍)であった。その中には、TLR3遺伝子(173倍)も含まれていた。PIC400-400CAが細胞内に導入されたMRC-5細胞で観察された遺伝子の発現上昇率は、uPIC100-400を細胞内導入したMRC-5細胞で観察された遺伝子の発現上昇率と極めて強く相関していた($R^2 = 0.964$, 図15B)。同様にuPIC50-400 ($R^2 = 0.978$, 図15C), ruPIC400-50 ($R^2 = 0.967$, 図15D)による発現上昇とも極めて強く相関した。

これらの相関性が極めて高い理由として、ネクロシスの末期の遺伝子発現変化を

見たために差異が認められなかった可能性が考えられた。そこで、IFN- β の産生応答が起こり始めた培養 4 時間目のフレッシュな細胞を用いて、自然免疫関連遺伝子の発現変動を再度調べた。製造 2 ロット分の PIC400-400CA と uPIC50-400 の合計 4 サンプルについて遺伝子発現変化を比較した。図 16A は、PIC400-400CA を細胞内導入した MRC-5 細胞と、トランスフェクション試薬のみ(PIC 無添加)で同じ導入操作を行った細胞の遺伝子発現変化を比較した図である。このサンプルを含め、全 4 サンプルの添加区／PIC 無添加区の回帰方程式の決定係数は $R^2 = 0.867 \pm 0.014$ ($n = 4$)であった。24 時間経過後の細胞における PIC 添加区／PIC 無添加区の決定係数が、 $R^2 = 0.454 \pm 0.006$ ($n = 4$)であったので、24 時間経過後の細胞と比較すると 4 時間後の細胞の遺伝子応答は弱かった。しかし、PIC 添加 4 時間後の細胞も発現上昇が起こっていることは図 16A から明らかである。これらのサンプルの遺伝子発現データを PIC400-400CA でトランスフェクションした群($n = 2$)と uPIC50-400 でトランスフェクションした群($n = 2$)で比較した。その一例が図 15B である。両群間の決定係数は $R^2 = 0.975 \pm 0.012$ ($n = 4$)であった。同じ PIC 間の決定係数は、 $R^2 = 0.968 \pm 0.010$ ($n = 2$)であったので、PIC400-400CA でトランスフェクションした群($n = 2$)と uPIC50-400 でトランスフェクションした群($n = 2$)で遺伝子発現変化に差異があるとは言えない。言い換えると、uPIC50-400 と PIC400-400CA の二重鎖構造の違いによる遺伝子発現の変化は認められないと考えられた。

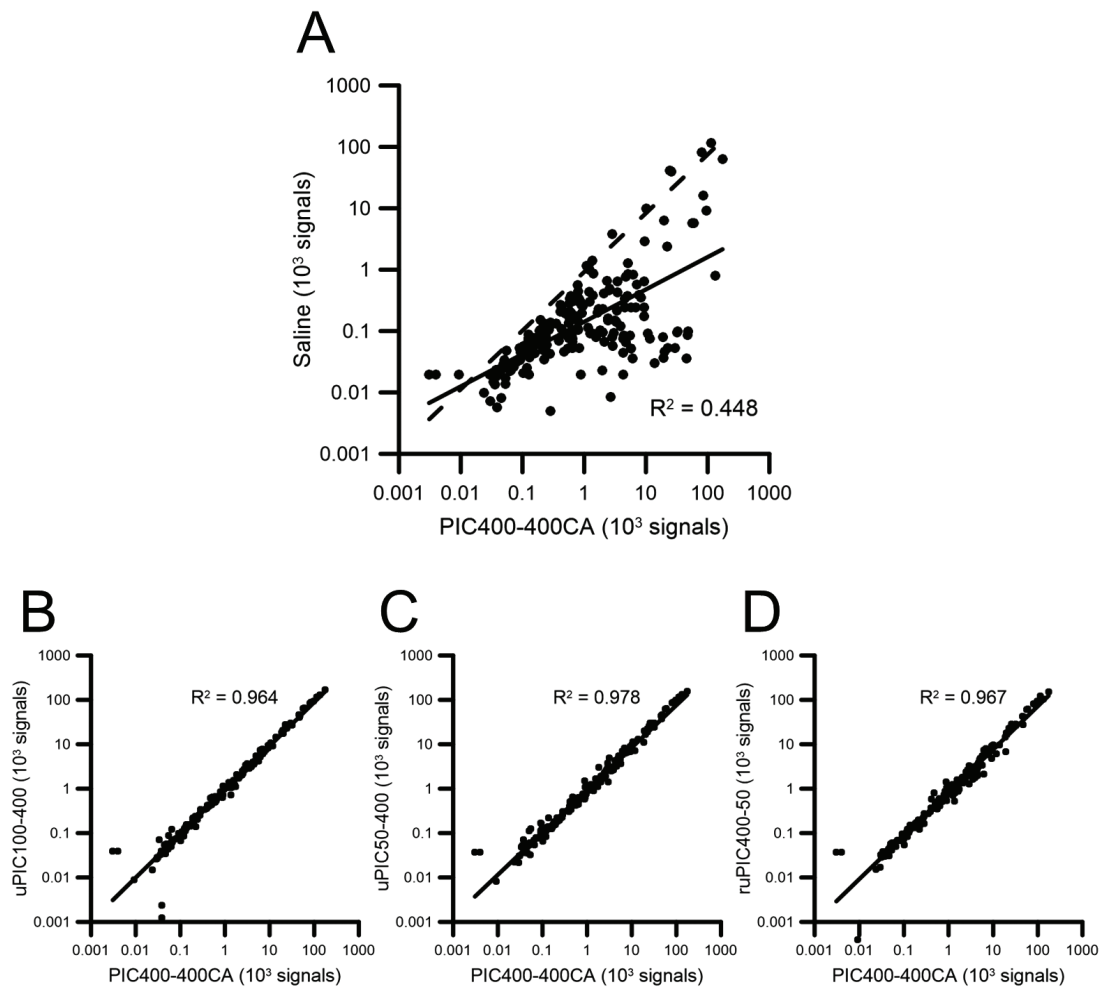


図 15 PIC 細胞導入 24 h 後の MRC-5 株における自然免疫関連遺伝子発現に対する PIC 二重鎖構造の影響

(A)PIC400-400CA を細胞導入し 24 h 経過後の自然免疫関連遺伝子の転写量を PIC 無添加区(Saline)と対数-対数プロットで比較. 回帰直線を実線で示し, 決定係数を R^2 として記載した. 両発現に差がない場合の仮想回帰直線を破線で示した.

(B)PIC400-400CA に対する発現応答と uPIC100-400 に対する発現応答との比較. 回帰直線を実線で示し, 決定係数を R^2 として記載した. (C)PIC400-400CA に対する発現応答と uPIC50-400 に対する発現応答との比較. 回帰直線を実線で示し, 決定係数を R^2 として記載した.

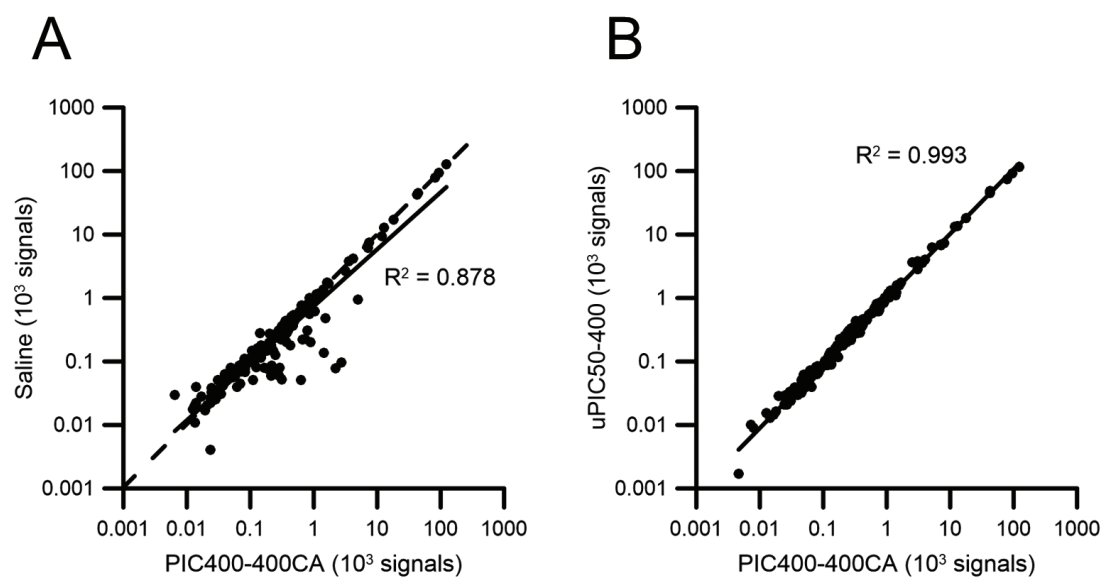


図 16 PIC 細胞導入 4 h 後の MRC-5 株における自然免疫関連遺伝子発現に対する PIC 二重鎖構造の影響

(A)PIC400-400CA を細胞導入し 4 h 経過後の自然免疫関連遺伝子の転写量を PIC 無添加区(Saline)と対数-対数プロットで比較. 回帰直線を実線で示し, 両発現に差がない場合の仮想回帰直線を破線で示した. (B)PIC400-400CA に対する 4 h 後の転写応答を uPIC50-400 と比較. 回帰直線を実線で示した. 決定係数を R^2 として記載した.

第4節 考察

本章では、poly-I と poly-C 分子の鎖長が異なる 8 種の PIC を用いて TLR3 の応答性および RLR の応答性を調べ、二重鎖構造との関係について解析した。ヒト由来 TLR3 レポーター細胞とマウス由来 TLR3 レポーター細胞の評価では、PIC400-400CA と uPIC100-400 に対する TLR3 の応答性に有意な差は認められなかったが、uPIC70-400 および uPIC50-400 に対する TLR3 の応答性は、PIC400-400CA に対する応答性に比べて明らかに低下した。言い換えると、同等塩基長の PIC 同士でも二重鎖を構成する poly-I 分子が 0.07 kb 以下であれば TLR3 の応答性が著しく低下することが示された。ヒト TLR3 とマウス TLR3 の違いは認められなかったことから、この poly-I 分子の塩基長を反映した TLR3 の応答性は、試験に供したヒト TLR3 に限定された特性ではなく、TLR3 共通の特性と考えられる。一方、poly-C 分子に対する TLR3 の応答性は 0.05 kb まで変わらなかった。RNA ヘリカーゼ系のリガンド RLRs の応答性は、poly-I 分子、poly-C 分子の塩基長の影響は受けないことが確かめられた。

TLR3 と RLRs のレポーター細胞評価では、PIC の投与方法に違いがあった。TLR3 レポーター細胞評価は、PIC 溶液をそのまま培養液に加える実験系であり、培養液の RNase の影響を受けやすい。一方の RLRs 評価用の C57/WT MEF 細胞株の評価は、PIC をトランスフェクション試薬に吸着させて、強制的に細胞内に送達する実験系であり、PIC は速やかに細胞内に入るため RNase の影響を受けにくい。TLR3 レポーター細胞評価では、培地に含まれる FBS 中の RNase の影響を排除するために、PIC 添加前に FBS 無添加培地で十分に洗浄し、PIC 添加後も、FBS 添加までのタイミングを 2 時間確保して RNase による分解の影響を極力排除した。この FBS 添加までの時間差は 2 時間から 1 分間まで段階的に縮めた試験を行ったところ、TLR3 レポーター細胞の応答性に大きな違いは認められなかったことから、FBS 中の RNase による分解の影響は少ないと推定された。しかし、培地を交換せずに PIC を添加したところ PIC の効果が認められなくなったことから細胞が産生する RNase による分解の可能性は完全否定されていない。微量のヒト血清を加えて 5 分間インキュベートした分解過程の PIC の塩基長がわかる写真を図 17 に示した。poly-I の長さが短ければ短いほど短時間で出現する二重鎖が短くなることは明白である。TLR3 の構造解析において、TLR3 が認識できる dsRNA 塩基長の下限は 40-50 bp であることが明らかにされている(Liu *et al.*, 2008; Luo *et al.*, 2012)。本章で観察された uPIC50-400 に対する TLR3 の反応性の低下は、RNase により断片化され、TLR3 が認識できる二重鎖長分子の割合が低下したことに起因する可能性がある。

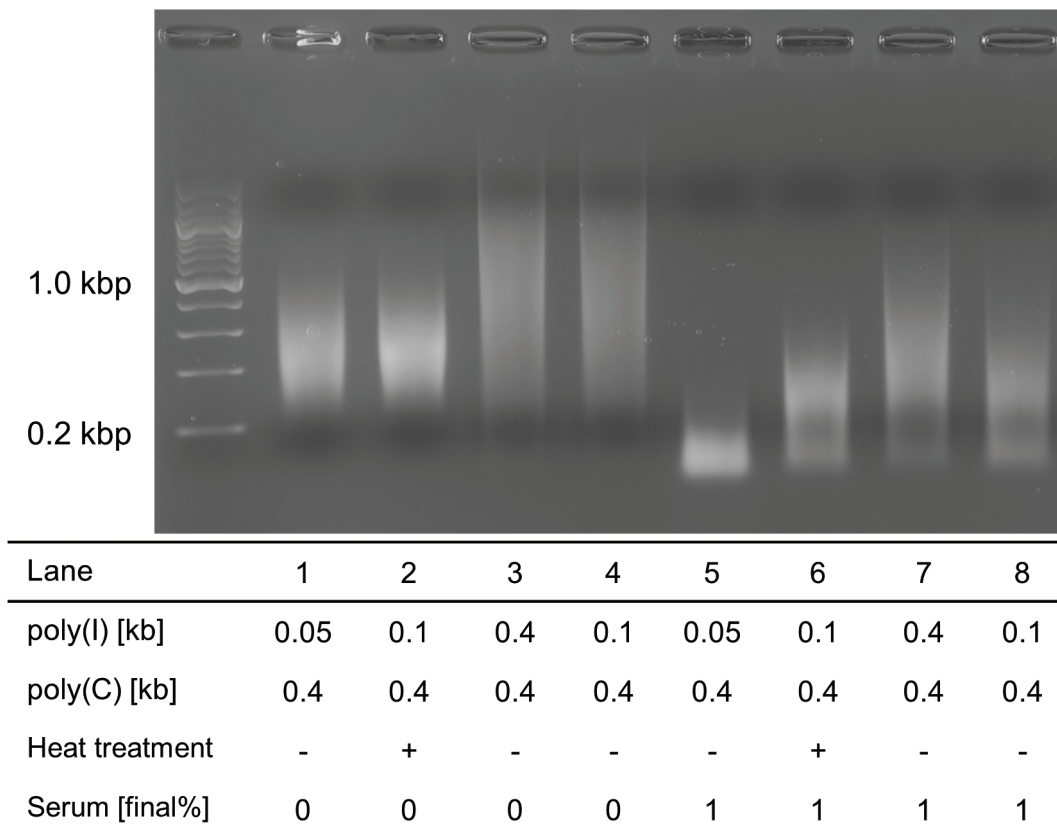


図 17 血清による PIC 二重鎖の断片化

ヒト血清処理前後の PIC のアガロースゲル電気泳動写真。各レーンの PIC は写真下の表の組成でアニーリングし、ヒト血清で 37 °C、5 分間処理前と後の塩基長を比較した。アニーリング時に 60 °C 加熱処理を加えた PIC は Heat treatment(+)と表記した。(-)は加熱処理を行っていない PIC である。

第4章 経鼻ワクチン用アジュバントとしての有効性評価

第1節 序文

国内で承認されている HA インフルエンザワクチンを皮下接種して免疫すると，全身免疫が刺激されて血清中に HA 特異的 IgG 抗体が産生される．その HA 特異的 IgG 抗体は，血流によって気道にも運ばれ，下気道の呼吸気管支から肺胞部において漿液に染み出して，ウイルス感染による重症化の抑止に貢献する．しかし，上気道の鼻腔咽頭から肺気管支の間における粘液では IgG 抗体濃度が低いため，上気道の粘膜面で IgG 抗体が感染を防御することは困難である(Tanimoto, 2010)．一方，鼻腔局所の粘膜免疫の誘導を狙った経鼻不活化インフルエンザワクチンの接種では，血清の HA 特異的 IgG 抗体に加えて，粘膜免疫の応答による HA 特異的 IgA 抗体が気道粘液全体に分泌され，インフルエンザウイルス感染を効率良く阻止することができる．この粘膜免疫は，抗原単独のワクチン接種では誘導されにくく，アジュバントの添加が有効である (Ichinohe *et al.*, 2005 ; Mizuno *et al.*, 2006)．マウスを用いた経鼻インフルエンザワクチン用アジュバントの評価方法として，上気道感染モデルと肺炎発症モデルの 2 通りのウイルス感染実験系が確立されている (Ichinohe *et al.*, 2005, 2009)．本章では，前章で選抜した PIC を用いて，PIC 二重鎖構造とアジュバント活性の関係を探求することを目的に，インフルエンザウイルスの上気道感染モデルを用いた評価を実施した．なお，この上気道感染モデルは，ワクチン接種による獲得免疫応答をインフルエンザウイルスの増殖抑制効果として検証するモデルである．この試験系におけるインフルエンザウイルスの増殖抑制効果は，PIC のみを接種しても観察されず，抗原と PIC を併用したときにのみ観察される効果であることが，長鎖 PIC を用いた試験にて検証されている (Ichinohe *et al.*, 2005)．

第2節 実験材料と実験方法

第1項 PIC

本章で用いた PIC の塩基長分布と模式的な構造を図 18 にまとめた。

第2項 倫理的配慮，バイオセーフティー

この実験は，国立感染症研究所 感染病理部との共同研究として国立感染症研究所 戸山庁舎にて実施した。すべての実験は，「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」(2006 年 6 月 1 日，日本学術会議)を批准している。動物実験の実験計画と実験プロトコールは，国立感染症研究所 動物実験実施規程および病原体等安全管理規程に従って委員会の承認を得，バイオセーフティレベル(BSL)2 の実験施設で実施した。

第3項 マウス，ウイルス，ワクチン

(1) マウス

BALB/c マウス(6-8 週齢のメス)を日本エスエルシー株式会社から購入し，動物実験施設の管理エリア内で飼育，感染試験に供した。

(2) ウイルス

実験に供したインフルエンザウイルス株は，A/Narita/1/09 (H1N1)pdm09 マウス馴化株である(Ainai *et al.*, 2015)。10-11 日目の発育鶏卵の尿膜腔にウイルスを接種し，37℃で 2 日間増殖させた後，漿尿液を回収した。漿尿液を低速遠心分離して夾雑物を沈殿除去し，上清を超速心分離(18,500 rpm, 4℃, 2 時間)して沈殿物を回収した。沈殿物は，ダルベッコ PBS (DPBS; Thermofisher scientific Japan, 東京)で浸漬し，4℃で 3-6 日間かけて完全溶解させた。その後，20-50 %ショ糖密度勾配遠心でウイルス粒子を精製し，30-40 %濃度域に収束した白濁バンドをウイルス懸濁液として回収した。ウイルス懸濁液は DPBS を加えて遠心分離で洗浄し，DPBS に再懸濁し，ウイルス価を測定して-80℃に保存した。

(3) ワクチン

スプリットワクチンは、A/California/7/09 (H1N1)pdm09 から分離した弱毒株 A/California/7/09 (X-179A)(H1N1)pdm09 で製造したものを一般財団法人阪大微生物研究会から入手し使用した。

第4項 経鼻インフルエンザワクチン接種とウイルス感染

(1) ワクチン接種と上気道ウイルス感染

試験は1群6匹で実施した。ワクチンの投与経路は、経鼻投与と皮下投与の2通りで行い、比較した。ワクチン接種およびウイルス感染は、全身麻酔装置を用いて2.0-4.0 %イソフルラン(DS ファーマアニマルヘルス, 東京)の麻酔下で行った。ヘマグルチニン(HA) 10 μ g/body のスプリットワクチンを3週間間隔で2回接種した。PICは、5 mg/mL 溶液を調製し、試験計画どおりワクチンに1-10 %(v/v)混合した。経鼻投与は、マイクロピペットを用いて片鼻 5 μ L ずつ合計 10 μ L を呼気に合わせて少しずつ鼻腔に滴下した。皮下投与は、マウスの背頸部に 50 μ L 注射した。ウイルス感染は、2回目のワクチン接種から2週間後に、A/Narita/1/09 (H1N1)pdm09 の懸濁液を片鼻に 2 μ L ずつ、合計 4 μ L (40,000 PFU)を呼気に合わせて少しずつ滴下した。感染3日後にマウスを安楽死させ、心採血により脱血を行い、血清と鼻腔洗浄液を採取し、抗体価とウイルス数の測定に供した。タイムスケジュールを図19に示す。

第5項 検体の採取と各種分析

(1) 検体の採取

鼻腔洗浄液は、0.1 %牛血清アルブミン(BSA)含有 PBS 1 mL を用いて採取した。切開した上顎部の気管に洗浄シリンジを用いて BSA 含有 PBS を注入し、鼻腔から漏出した洗浄液をマイクロチューブに回収し、洗浄シリンジで吸い上げた。この洗浄操作を3回繰り返した後、遠心分離で夾雑物を沈降させ、上清を-80℃にて保存した。

血清は、心採血した血液を遠心分離して調製し、-80℃にて保存した。

(2) ウイルス価の測定

鼻腔洗浄液中のウイルス数の測定は、既報に従ってイヌ腎臓尿細管上皮細胞由来細胞(MDCK 細胞)を用いたプラークアッセイを行った(Tobita, 1975). 具体的には、6 ウェルプレートを用いて 10 % FBS 含有イーグル最小必須培地(MEM; 0.3 g/L グルタミン含有)で培養した MDCK 細胞が 100 %コンフルエントの状態となった段階で、培地を吸引除去し、PBS で洗浄し、鼻腔洗浄液を 10 倍単位で段階希釈したものを 1 ウェルあたり 0.2 mL 添加し、37 °C, 5 % CO₂ 条件で 1 時間インキュベートした. その後、PBS で 2 回洗浄し、アガロース培地(1 % DEAE-デキストラン, 1 % アセチルトリプシン, 0.1 % 炭酸水素ナトリウム, 0.2 % BSA および 0.3 % アガロース含有 MEM) 2 mL を重層して、37 °C, 5 % CO₂ 条件で 40 時間培養した. 培養終了後、重層したアガロースを剥離して除去し、プレートを乾燥させた後に 0.1 % クリスタルバイオレットを含む 20 % エタノール染色液で生細胞を染色し、UV 照射で固定し、水道水で洗浄し、プラーク(死細胞)数を計測した. ウイルス価は、鼻洗浄液 1 mL あたりの PFU として表示した.

(3) 抗体価の測定

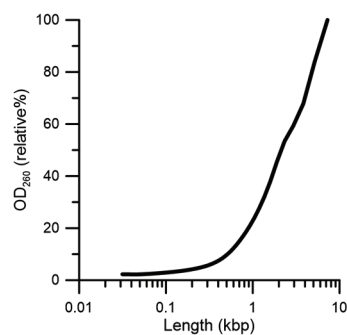
鼻腔洗浄液中の HA 特異的 IgA 抗体価と血清中の HA 特異的 IgG 抗体価は ELISA 法で測定した(Asahi *et al.*, 2002). プレートのコーティングに使用する HA 抗原は、Phelan らの方法に従って A/Narita/1/09 (H1N1)pdm09 から調製した(Phelan *et al.*, 1980). HA 特異的 IgA 抗体と HA 特異的 IgG 抗体の標準品は、長鎖 PIC を配合した不活化スプリットワクチンで過免疫したマウスの鼻腔洗浄液と血清を用い、これら標準品の値を 160 unit (任意の数値) と設定し、相対値で ELISA unit を表示した. 96 穴の EIA プレート(Corning, NY, USA)に、1 ウェルあたり 5 ng の HA 抗原を含む炭酸ナトリウム緩衝液(pH 9.0) 50 μ L を添加して 4 °C で一晩静置しコーティングした. プレート内の緩衝液をデカンテーションで捨て、ブロッキング溶液(1 % BSA 含有 PBS) 100 μ L を添加して 37 °C で 1 時間インキュベートした. ブロッキング溶液をデカンテーションで捨て、ブロッキング溶液で段階希釈した検体および標準抗体を各ウェルに 50 μ L 添加して 25 °C で 2 時間緩やかに振盪した. 検体および標準抗体をデカンテーションで捨て、洗浄液(0.05 % Tween 20 含有 PBS)で 3 回洗浄後、0.1 μ g/mL のビオチン標識された α 鎖特異的ヤギ抗マウス IgA 抗体(SeraCare, MA, USA)またはビオチン標識された Fc γ 鎖特異

的ヤギ抗マウス IgG 抗体(Jackson ImmunoResearch, PA, USA)を 50 μ L 添加し, 25 $^{\circ}$ C で 1 時間緩やかに振盪して HA 特異的 IgA 抗体, IgG 抗体をラベル化した. その後, ビオチン標識抗体をデカンテーションで捨て, 洗浄液で 3 回洗浄後, 0.1 μ g/mL のストレプトアビジン結合アルカリホスファターゼ(Thermo Fisher Scientific)を 50 μ L 添加し, 25 $^{\circ}$ C で 1 時間緩やかに振盪して, ビオチン標識にアルカリホスファターゼを吸着させた. ストレプトアビジン結合アルカリホスファターゼ溶液をデカンテーションで捨て, 洗浄液で 3 回洗浄後, p-ニトロフェニルホスフェート(SIGMA)溶液を 50 μ L 添加して 25 $^{\circ}$ C で静置し, アルカリホスファターゼ反応によって生じた色素を OD₄₀₅ nm の吸光度としてプレートリーダーで測定した.

第 6 項 統計解析

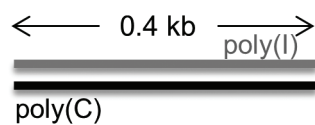
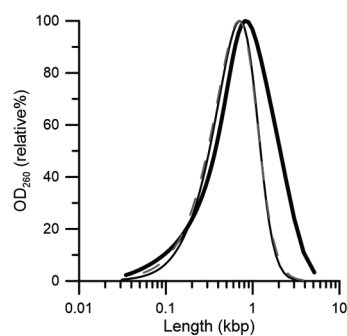
マウスを用いた感染実験データの統計解析は, GraphPad Prism (GraphPad Software, CA, USA)を用いて行なった. ウイルス価の検定は, Kruskal-Wallis 検定と Dunn の多重比較検定で行った. 抗体応答性の検定は, 一元配置分散分析と Bonferroni の多重比較検定で行った. p 値が 0.05 以下のとき, 統計的に有意な差があると判断した.

長鎖PIC

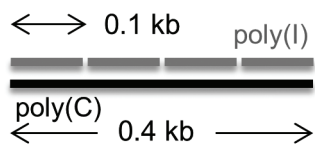
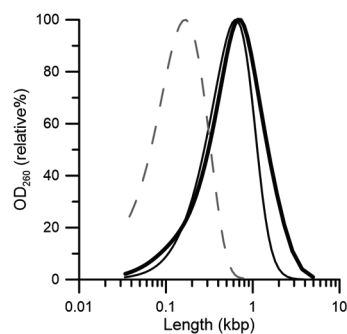


二重鎖構造不明

PIC400-400CA



uPIC100-400



uPIC50-400

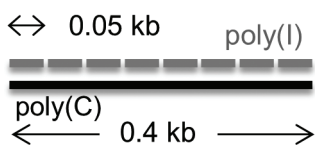
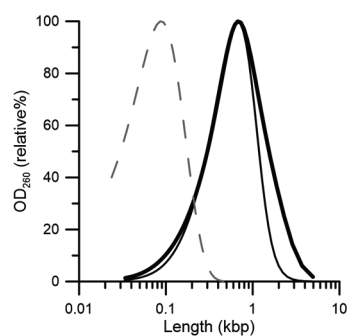


図 18 PIC の塩基長分布と二重鎖構造の模式図

本章で用いた PIC 分子の代表的な塩基長分布(太線)とその二重鎖を形成する poly-I 分子(破線), poly-C 分子(実線)の塩基長分布を同一グラフ内に描いた。また, 二重鎖構造の概略図を分布図の右側に添えた。

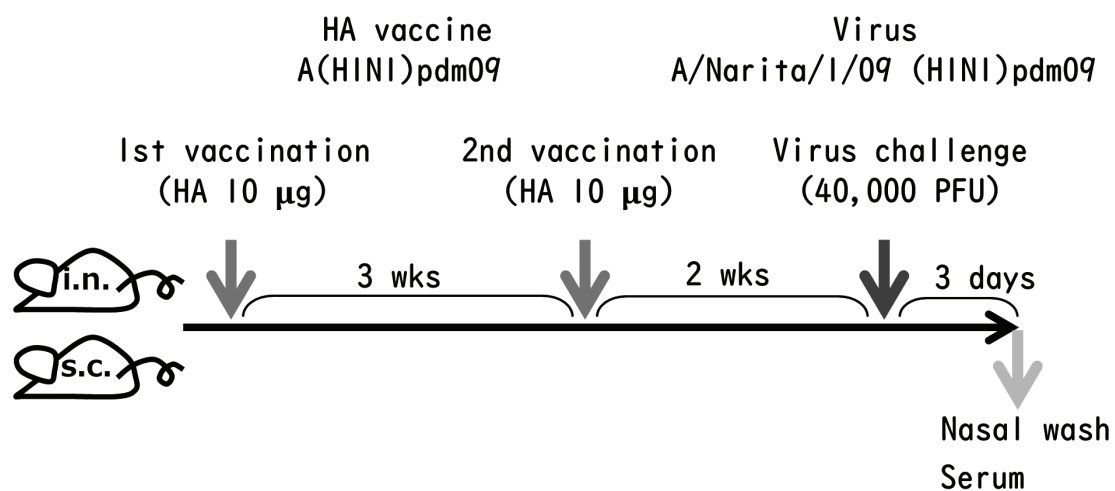


図 19 ワクチン接種と攻撃感染実験のタイムスケジュール

経鼻接種群(i.n.)，皮下接種群(s.c.)ともに3週間間隔で2回ワクチン接種を行った．その2週間後にウイルスを上気道に感染させ，3日後に鼻腔洗浄液と血清を採取してウイルス価と抗体価を測定した．

第3節 結果

第1項 経鼻インフルエンザワクチン接種と上気道感染試験

マウスを用いた A(H1N1)pdm09 インフルエンザワクチン接種と A/Narita/1/09 (H1N1)pdm09 マウス馴化型ウイルスによる上気道攻撃感染試験を行い、非均等二重鎖構造の uPIC100-400 と uPIC50-400、および同等塩基長でポジティブコントロールの PIC400-400CA、および感染実験で効果が確認済みの長鎖 PIC のアジュバント活性を比較した。試験に供した HA スプリットワクチンの抗原とアジュバントの配合量、および検体として採取した鼻腔洗浄液中のウイルス価と HA 特異的 IgA 抗体価、ならびに血清中の HA 特異的 IgG 抗体価を図 20 に示した。

長鎖 PIC 10 μ g/body を配合した経鼻ワクチン接種群における鼻腔洗浄液中のウイルス価は、PIC 無配合経鼻ワクチン接種群における同ウイルス価の約 1/1000 に減少した。皮下接種群は、長鎖 PIC の添加の効果は乏しくウイルス価の減少は認められなかった。これら結果は、過去に行われた Ichinohe らの試験結果(Ichinohe *et al.*, 2005)を再現した。しかし、今回の実験では、長鎖 PIC を配合したワクチンを接種した群の鼻腔洗浄液中の HA 特異的 IgA 抗体価と血清中の HA 特異的 IgG 抗体価の上昇は弱く、これまでの感染実験で得られている明確な抗体応答を確認することができなかった。

PIC400-400CA または uPIC100-400 を 10 μ g/body 配合した経鼻ワクチン接種群における鼻腔洗浄液中のウイルス価は PIC 無配合経鼻ワクチン接種群における同ウイルス価の約 1/100 に減少した。両 PIC のウイルス増殖抑制効果は、PIC 配合量を 1 μ g/body へ削減すると減弱した。皮下接種群ではウイルス増殖抑制効果は認められなかった。このような uPIC100-400 と PIC400-400CA の類似した応答性は、両者のアジュバント活性が同等であることを示している。uPIC100-400 の 10 μ g/body 経鼻投与群では、鼻腔洗浄液の HA 特異的 IgA 抗体価に有意な上昇が認められた。

uPIC50-400 配合ワクチン接種群は、ウイルス価の減少が全く認められなかった。配合量を増やすことでアジュバント活性が出現する可能性はあるが、アジュバント活性が uPIC100-400 と PIC400-400CA に比べて劣ることは明白である。

今回の試験では、ワクチンの投与による一過性の体重減少は認められたが、PIC アジュバントワクチンの投与によるマウスの外観の変化や異常などの毒性症状は認められなかった。過去の試験 (Ichinohe *et al.*, 2005) で IgA 抗体価の上昇が確認されている長鎖 PIC を配合した群において、IgA 抗体価の有意な上昇が認められなかった。また、IgA 抗体価が有意に変化した uPIC100-400 接種群も個体毎の比較においてウイルス価と IgA 抗体価の間に明確な相関性は確認できなかった。IgA 抗体価の変化については再現性を確認した上で議論する必要がある。HA 特異的 IgG 抗体価も、過去の実験で IgG 抗体価の上昇が確認されている長鎖 PIC を配合した群において、有意な上昇が認められなかった。皮下接種した PIC 配合ワクチン群で上昇傾向が認められた。uPIC100-400 接種群の IgG 抗体価は長鎖 PIC および PIC400-400CA 接種群より上昇傾向にあったが、IgG 抗体価の変化についても再現性を確認した上で議論する必要がある。

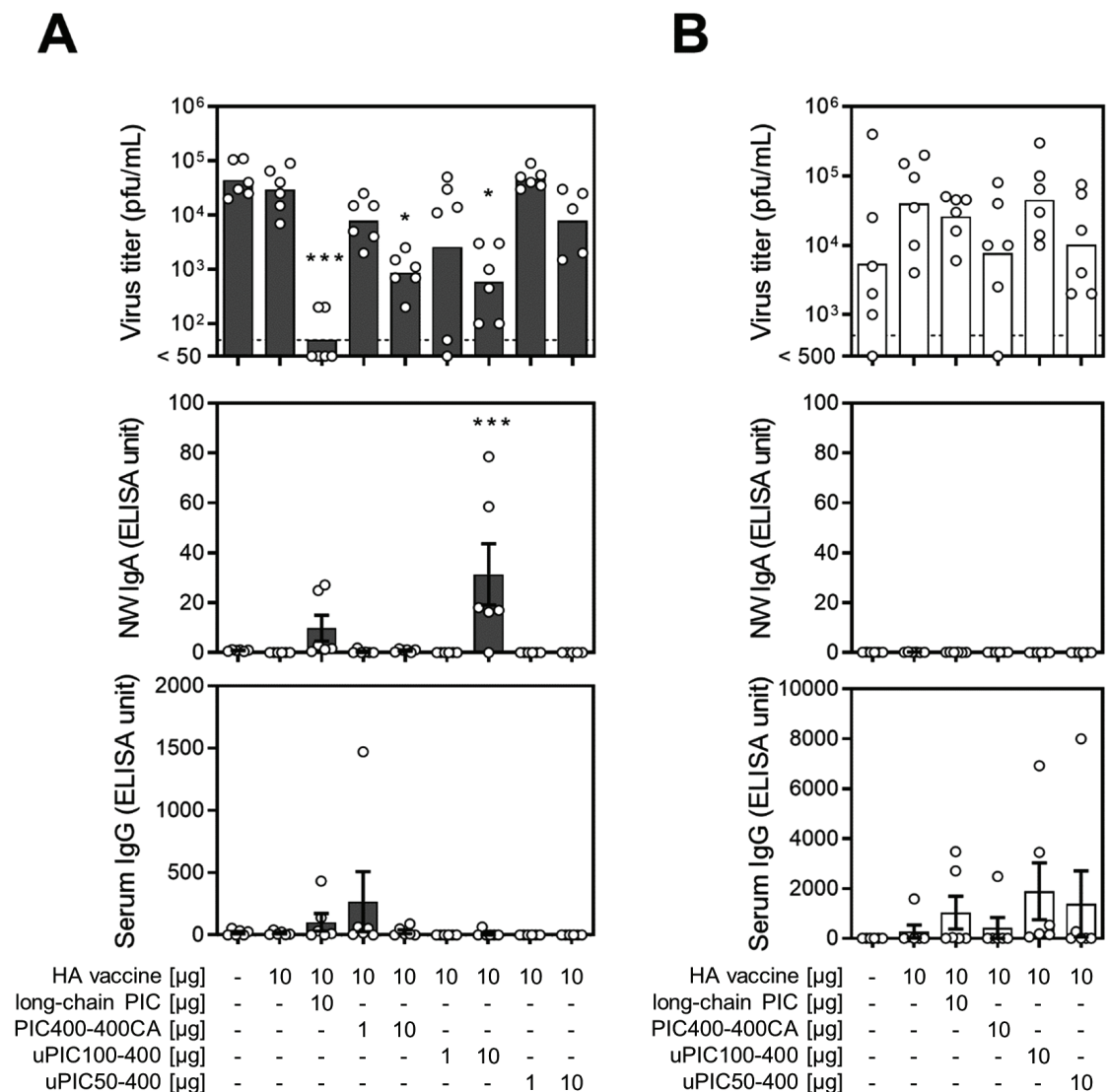


図 20 マウス経鼻 A(H1N1)pdm09 インフルエンザワクチン接種と A/Narita/I/09 上気道感染モデルにおける PIC のアジュバント効果

A(H1N1)pdm09 インフルエンザワクチンをマウスに 3 週間間隔で 2 回，経鼻接種(A)または皮下接種(B)を行った．その 2 週間後に A/Narita/I/09 (H1N1)pdm09 ウイルスを経鼻接種して上気道に感染させた．感染 3 日後の鼻腔洗浄液のウイルス価(上段)，鼻腔洗浄液の HA 特異的 IgA 抗体価(中段)，血清中の HA 特異的 IgG 抗体価(下段)を図に示した．接種したワクチンの組成は図の最下部に表示した．HA 抗原単独接種群に対する差を*印で表示した(** $p < 0.001$ ，** $p < 0.01$ ，* $p < 0.05$)．

第4節 考察

本章の試験で採用した上気道感染モデルで観察されたウイルス抑制効果は、経鼻ワクチン接種によってマウスが獲得した免疫応答の効果である。PIC の経鼻接種でウイルス感染を一時的に防御し得ることがマウス肺炎ウイルス(PVM)の感染実験で示されている。しかし、その感染防御効果は PIC 接種から 2 日間持続し 3 日後には消失する短期間の自然免疫の効果である(Field, 1973)。本研究で採用した上気道感染モデルは、2 回目の PIC 併用ワクチン接種から 14 日後にウイルス接種する試験系であり、その間、自然免疫の亢進が持続することはない。本章の試験では PIC 単独投与試験区を設けなかったが、PIC 単独投与ではウイルス増殖が抑制されないことは過去に検証済みである(Ichinohe *et al.*, 2005)。

本章で用いた経鼻不活化インフルエンザワクチンにおける uPIC100-400 のウイルス抑制効果は、PIC400-400CA のウイルス抑制効果と同等であり遜色はなかった。一方、uPIC50-400 はウイルス抑制効果がほとんど認められなかった。uPIC100-400、PIC400-400CA および uPIC50-400 の構造上の違いは poly-I 分子の塩基長であるから、経鼻インフルエンザワクチンのアジュバントとして機能する PIC 分子は、平均塩基長 0.1 kb 以上の poly-I 分子と 0.4 kb の poly-C 分子で組み立てた二重鎖構造を持つ PIC 分子であり、0.05 kb の poly-I 分子で組み立てた PIC は無効であると言い換えることができる。PIC400-400CA と uPIC100-400 が同等で uPIC50-400 は劣性という関係性は、第 3 章で示した TLR3 リガンドの応答性と合致し、RLR の応答性とは合致しない。言い換えると、PIC が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抗原提示細胞を活性化するプロセスに、RLR は関与しないことが示唆される。

PIC400-400CA と uPIC100-400 のウイルス増殖抑制効果は長鎖 PIC よりも弱かった。この違いは、第 1 章で述べた二重鎖長に相関した免疫応答(Lampson *et al.*, 1970; Machida *et al.*, 1976)と合致する。uPIC100-400 の場合、添加量を 2 倍に増やすことで長鎖 PIC と同等のアジュバント効果が得られることが、後の研究で明らかになっている(Ohara *et al.*, 2015)。長鎖 PIC は、粘性が高く、常温で取り扱うことのできる上限濃度は、5 mg/mL である。上気道感染マウスモデルのワクチン接種量は肺への誤注入を避けるために 10 μ L で実施している。この 10 μ L のワクチンに配合できる長鎖 PIC の量は、今回の試験で用いた 10 μ g がほぼ上限である。一方、uPIC100-400 は、長鎖 PIC

よりも粘度が低く、25 mg/mL の高濃度溶液として取り扱うことができるので、ハンドリング性という観点からみると、配合量は少なくとも長鎖 PIC の 5 倍に上げることが可能である。

uPIC50-400 に関しては、経鼻ワクチンの HA 抗原量を 10 倍(100 ng)に増量したワクチンでアジュバント活性が認められている(Tazaki *et al.*, 2018). この結果は、ワクチンの組成次第では uPIC50-400 もアジュバントとして利用できることを示唆する。しかし、本研究の結果から明らかなように、uPIC50-400 のアジュバント活性は PIC400-400CA および uPIC100-400 よりも低い。

今回の評価では、鼻腔洗浄液中の HA 特異的 IgA 抗体価と血清中の HA 特異的 IgG 抗体価の上昇は弱く、獲得免疫が発動している証拠を HA 特異的抗体価で確認することはできなかった。ワクチンの抗原量が下限であった可能性と実験の手技が影響した可能性が考えられ、再現性の確認が必要である。

第5章 マウス毒性評価

第1節 序文

アジュバントを配合した感染症予防ワクチンを開発する上で、明らかにしなければならない項目の一つが、アジュバントによる副作用である。薬効が得られる用量と毒性を示す用量に関する情報は、副作用の発生リスクを予測にする上で欠かせない情報である。アジュバントが原因となる副作用には、アジュバント物質が直接引き起こす作用と、抗原との組合せで起こる作用がある。その全容を明らかにすることは容易ではない。しかし、PIC 単独の毒性が二重鎖構造に影響を受けるのかどうかを明らかにすることは、少なからず今後の研究開発に役立つと考える。本章では、PIC の二重鎖構造と poly-I 分子の塩基長と全身毒性との関係性を明らかにすることを目的に、マウスの毒性試験を実施した。PIC の経鼻投与毒性を推し量る上で Stowell らの実験が参考となる。彼らは、長鎖 PIC (GE ヘルスケア) の 2 mg/mL 溶液 50 μ L (約 40 mg/kg) をマウスの鼻腔に 24 時間間隔で 3 回反復投与し、肺局所の炎症と TLR3 応答との関係性を調べている。彼らが採用した投与液量は、一部が肺に流入する液量 (50 μ L) である。3 日間の反復投与が原因で起こる肺組織の炎症症状は、気管支肺泡洗浄液の単核球数と好中球数、サイトカインの変化、およびコリンエステラーゼ阻害剤投与に対するマウスの呼吸変化量、で示されている (Stowell *et al.*, 2009)。気道を確保しながら粘性が高い長鎖 PIC 溶液を鼻腔に投与するためには 2 mg/mL が上限濃度と推定されるので、単回経鼻投与による PIC の毒性評価は困難であると判断した。経鼻投与による PIC の毒性は認められないと明記された文献もみつかった (Field, 1973)。そこで、本研究では、既存のデータとの比較が可能な腹腔内単回投与毒性を評価法として選定し、急性期の毒性症状と poly-I 分子の塩基長との関係を解析した。PIC のマウス腹腔内単回投与毒性値は、LD₅₀ 50-100 mg/kg (Philips *et al.*, 1971) であり、Machida らが二重鎖長と LD₅₀ の関係データ (Machida *et al.*, 1976) によると、8 S の PIC は LD₅₀ 150 mg/kg である。これらの情報を元に、最小限のマウスで結果が得られるように、試験を 2 回に分けて実施した。試験 1 では、投与量を 100 mg/kg に統一して PIC 間の違いを探索し、試験 2 では、試験 1 の結果を踏まえて追加投与量を決定し、比較のためのデータを取得した。

第2節 実験材料と実験方法

第1項 PIC

本章で用いた PIC の塩基長分布と模式的な構造を図 21 に示した。

第2項 倫理的配慮

この実験は、受託試験機関の一般財団法人生物科学安全研究所で実施した。すべての実験は、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」(2006 年 6 月 1 日, 日本学術会議)に批准している。動物実験の実験計画と実験プロトコルは、一般財団法人生物科学安全研究所の「動物実験実施規程」に従い、同施設の動物実験委員会の承認を得て行われた。

第3項 マウスとその飼育条件

CrIj:CD1(ICR)マウス(SPF; 5 週齢のオス)を日本チャールズリバー株式会社から購入し、6 日間試験環境に馴化させ、検疫を行い、発育が順調で一般状態が良好な 40 匹を選抜し、6 週齢で供試した。マウスは、温度 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、換気回数 10 回以上/時(オールフレッシュエア方式)、照明 12 時間/日(午前 7 時点灯、午後 7 時消灯)に設定されたバリアーシステム動物室で、床敷き(ホワイトフレークを入れたポリカーボネート製マウス用ケージ(210 W × 320 D × 130 H mm)に原則として 5 匹収容し、これをステンレス製 5 段のラックに設置して飼育した。飼料(固形飼料ラボ MR ストック、日本農産工業株式会社)と水(孔径 $1 \mu\text{m}$ のカートリッジフィルターで濾過後紫外線照射した殺菌水道水)は、それぞれ蓋型固形飼料用給餌器およびポリカーボネート製給水瓶により自由に摂取させた。

動物の個体識別は、ラックおよびケージへの標識札貼付ならびにピクリン酸溶液を被毛に塗布する方法により行った。

第4項 PIC 溶液の調製

PIC は、局方生理食塩水(大塚製薬工場)で投与濃度まで希釈し、投与直前に 37°C で 10

分間以上加温して 2 重鎖の凝集を完全に解いたものを使用した。100 mg/kg 投与群に用いた PIC 溶液は 5 mg/mL に調製し、高粘度の長鎖 PIC のみ 4 mg/mL に調製した。200 mg/kg、400 mg/kg 投与群に用いた PIC 溶液は、それぞれ 10 mg/mL、20 mg/mL に調製した。

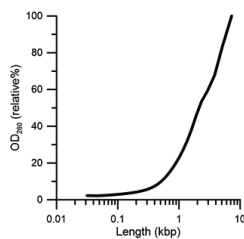
第 5 項 腹腔内投与試験

試験は 5 匹/群で 2 回に分けて実施した。試験期間は 7 日間で、投与日を Day 0 とすると Day 6 まで観察し、生存したマウスは Day 7 に二酸化炭素ガスで安楽死させ剖検した。1 回目は、投与量 100 mg/kg で統一した試験を実施した。2 回目は、1 回目の結果を踏まえて PIC ごとに投与量を 200 mg/kg、400 mg/kg に増加させた試験を実施した。いずれの試験もガンマ線滅菌された 25G × 1” の注射針および 1 mL のツベルクリン用注射筒を用いて、濃度調製した PIC 溶液を液量 20 mL/kg（長鎖 PIC は 25 mL/kg）でマウス腹腔内に単回投与した。各個体の投与液量は、投与日の測定体重を基に算出した。投与後 6 時間までは頻繁に外観と行動を観察し、その後は毎日 2 回、動物の生死、外観、行動を観察した。個体ごとの体重を Day 6 まで毎日記録し、ケージごとの摂餌量を Day 7 まで毎日記録した。摂餌量は、ケージごとに算出される餌の消費量を飼育容器内のマウスの個体数で割った数値で表した。

第 6 項 統計解析

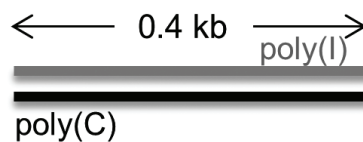
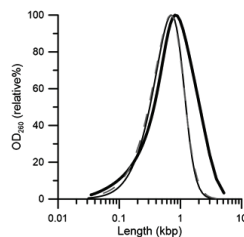
統計解析は、SPSS 統計解析ソフトウェア (SPSS, IL, USA) を用いて 1 元分散分析を行った。また、マウスの生存率をロジスティック解析し LD₅₀ 値を概算した。p 値が 0.05 以下のとき、統計的に有意な差があると判断した。

長鎖PIC

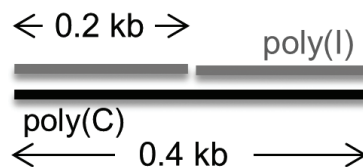
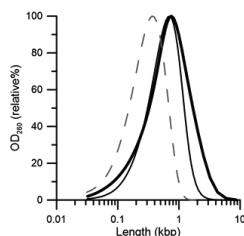


二重鎖構造不明

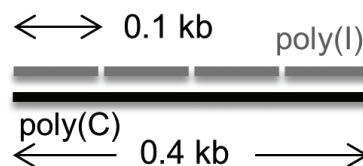
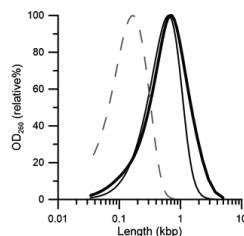
PIC400-400CA



uPIC200-400CA



uPIC100-400



uPIC50-400

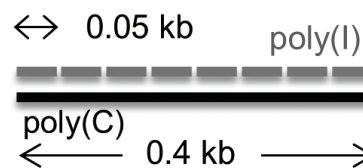
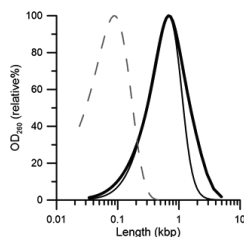


図 21 PIC の塩基長分布と二重鎖構造

本章で用いた PIC 分子の代表的な塩基長分布(太線)とその二重鎖を形成する poly-I 分子(破線), poly-C 分子(実線)の塩基長分布を同一グラフ内に描いた。また, 二重鎖構造の概略図を分布図の右側に添えた。

第3節 結果

第1項 マウス腹腔内単回投与毒性試験(試験1)

一群 5 匹のマウスで試験を行った。uPIC100-400, uPIC50-400, uPIC200-400CA, PIC400-400CA および長鎖 PIC をマウス腹腔内に 100 mg/kg 投与し, 7 日間の一般状態, 体重および摂餌量の変化から急性毒性の強さを比較した。

長鎖 PIC を投与した群において, 中等度の立毛, 肛門周囲の汚れ, 尾先端部の壊死が認められ, 投与日(Day 0)に 1 匹, Day 1 に 1 匹, Day 3 に 1 匹, 合計 3 匹の死亡が認められた。PIC400-400CA では, 中等度の立毛と尾先端部の壊死が認められ, Day 3 に 1 匹の死亡が認められた。uPIC200-400CA では, 中等度の立毛と尾先端部の壊死が認められたが, 死亡は認められなかった。uPIC100-400 と uPIC50-400 では中等度の一般症状は認められず, 死亡も認められなかった(表 4)。

個体別の体重推移を表 5 に示した。体重は PIC を投与したすべての個体において Day 1 で減少し, その後上昇に転じた(図 22)。体重増加に転じる時期は, uPIC50-400 > uPIC100-500 > uPIC200-400CA > PIC400-400CA > 長鎖 PIC 投与群の順に早い傾向が認められた。Day 1 と Day 6 の体重差において, 長鎖 PIC 投与群に対する有意な差が uPIC50-400 投与群 ($p < 0.01$), uPIC100-400 投与群 ($p < 0.01$), uPIC200-400CA 投与群 ($p < 0.05$)で認められたが, PIC400-400CA に対する有意な差は認められなかった。摂餌量は, 群ごとの平均値として表 6 に示した。いずれの PIC 投与群も Day 0 から Day 1 の間で摂餌量が低値となった。通常量に回復する時期は, uPIC50-400 > uPIC100-400 > uPIC200-400CA > PIC400-400CA > 長鎖 PIC の順に早い傾向が認められた。

剖検においては, 死亡例を含む全てのマウスに肉眼的異常所見は認められなかった。死亡を含む一般症状, 体重および摂餌量の回復性の程度から, uPIC50-400 < uPIC100-400 < uPIC200-400CA < PIC400-400CA < 長鎖 PIC, の順に毒性影響が強くなるものと判断された。

第2項 マウス腹腔内単回投与毒性試験(試験2)

uPIC50-400, uPIC100-400 および uPIC200-400CA は 200 mg/kg と 400 mg/kg の 2 用量で, PIC400-400CA は 100 mg/kg と 200 mg/kg の 2 用量で, 一群 5 匹の追加試験を実施した. 試験期間は 7 日間とし, 一般状態, 体重および摂餌量の変化から急性毒性の強さを比較した. 生存数を表 4 に示した.

PIC400-400CA の 100 mg/kg 投与群では, 投与 2 時間後から一過性の立毛, 肛門周囲の汚れが認められ, Day 1 には一過性の眼瞼下垂と自発運動低下, Day 2 には一過性の削瘦, Day 3 には尾先端部壊死する個体が認められた. 死亡数は, Day 2 で 2 匹, Day 3 で 1 匹, 合計 3 匹となった. PIC400-400CA の 200 mg/kg 投与群では, 100 mg/kg 投与群と同様のタイミングで同様の一般症状が観察された. 死亡数は, Day 1 で 1 匹, Day 2 で 1 匹, Day 4 で 1 匹, Day 7 で 2 匹となり, 試験終了前に 5 匹すべて死亡した. LD₀ 値は, 100 mg/kg 未満と結論した.

uPIC200-400CA の 200 mg/kg 投与群では, 投与 2 時間後から一過性の立毛, 肛門周囲の汚れが認められ, Day 1 には一過性の眼瞼下垂と自発運動低下, Day 2 には尾先端部壊死と一過性の削瘦が認められた. 死亡数は, Day 1 で 1 匹, Day 2 で 1 匹, Day 5 で 1 匹, 合計 3 匹であった. uPIC200-400CA の 400 mg/kg 投与群では, 投与 2 時間後から立毛, 肛門周囲の汚れ, 1 匹に自発運動低下が認められ, Day 1 には一過性の眼瞼下垂と自発運動低下, 1 匹に痙攣が認められた. 死亡数は, Day 1 で 4 匹, Day 2 で 1 匹となり, 試験終了前に 5 匹すべて死亡した. LD₀ 値は, 100-200 mg/kg と結論した.

uPIC100-400 の 200 mg/kg 投与群では, 投与 2 時間後から一過性の立毛, 肛門周囲の汚れが認められ, Day 1 には一過性の眼瞼下垂と自発運動低下, Day 2 には削瘦が認められた. 死亡数は, Day 2 で 2 匹, 合計 2 匹であった. uPIC100-400 の 400 mg/kg 投与群では, 200 mg/kg 群と同様, 投与 2 時間後から立毛, 肛門周囲の汚れが認められ, 1 匹に眼瞼下垂が認められた. Day 1 には自発運動低下が認められた. 死亡数は, Day 1 で 2 匹, Day 2 で 3 匹となり, 試験終了前に 5 匹すべて死亡した. LD₀ 値は, 100-200 mg/kg と結論した.

uPIC50-400 の 200 mg/kg 投与群では, 投与 2 時間後から一過性の立毛, 肛門周囲の汚れが認められ, Day 2 には一部で尾先端部壊死が認められた. 死亡例は認められなかった. uPIC50-400 の 400 mg/kg 投与群では, 200 mg/kg 群と同様, 一過性の立毛および

肛門周囲の汚れが認められ、Day 1 には一過性の眼瞼下垂および自発運動低下が認められた。死亡数は、Day 2 で 1 匹、合計 1 匹であった。LD₀ 値は、200-400 mg/kg と結論した。

個体別の体重推移を表 7 に示した。体重は、PIC を投与したすべての個体において Day 1 で減少した。体重増加に転じる時期は、200 mg/kg 投与群間で比較すると uPIC50-400 > uPIC100-500 > uPIC200-400CA の順に早い傾向が認められたが統計的に有意な差は見いだせなかった。摂餌量の推移を表 8 に示した。摂餌量はいずれの PIC 投与群も Day 0 から低値となったが、回復する時期を 200 mg/kg 投与群間で比較すると、uPIC50-400 > uPIC100-500 > uPIC200-400CA の順に早い傾向が認められた。剖検において、Day 1-4 に死亡した個体は、胃と腸内に水様性物の貯留が認められた。Day 5-6 に死亡した個体と生存した個体は、肉眼的異常所見は認められなかった。

表 4 腹腔内単回投与試験におけるマウスの生存数

PIC	Test No.	Dose	Survivals / Total		
			100 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg
Long chain PIC	Test 1		2/5	nt	nt
	Test 2		nt	nt	nt
PIC400-400CA	Test 1		4/5	nt	nt
	Test 2		2/5	0/5	
uPIC200-400CA	Test 1		5/5	nt	nt
	Test 2		nt	2/5	0/5
uPIC100-400	Test 1		5/5	nt	nt
	Test 2		nt	3/5	0/5
uPIC50-400	Test 1		5/5	nt	nt
	Test 2		nt	5/5	4/5

表の左から，投与した PIC の名称，試験番号，マウスの生存数を示した。

試験を実施していない試験区は nt と表示。

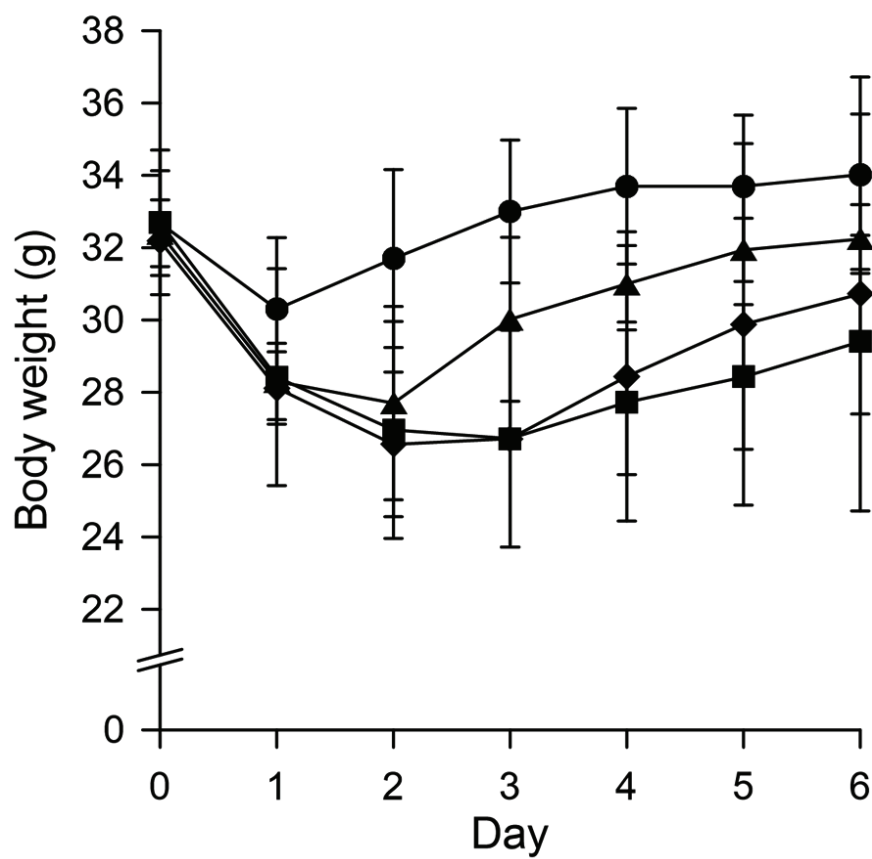


図 22 PIC 100 mg/kg 腹腔内単回投与後のマウスの体重推移(試験 I)

PIC400-400CA 投与生存個体(■), uPIC200-400CA 投与生存個体(◆), uPIC100-400 投与群(▲), uPIC50-400 投与群(●)の平均体重(n = 5)を標準偏差とともに示した.

表 5 マウスの体重変化(腹腔内単回投与毒性試験 試験 I)

PIC	Mouse No.	Body weight (g)						
		Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6
Long chain PIC 100 mg/kg	21	32.2	27.8	24.9	23.9	-	-	-
	22	32.5	27.2	25.5	24.2	23.3	25.3	27.0
	23	32.7	32.3	32.8	33.3	33.1	33.1	32.6
	24	32.9	29.0	-	-	-	-	-
	25	30.6	-	-	-	-	-	-
	Mean	32.2	29.1	27.7	27.1	28.2	29.2	29.8
PIC400-400CA 100 mg/kg	16	33.3	29.1	28.1	30.3	31.7	31.8	32.3
	17	35.8	31.9	29.8	30.6	33.6	35.0	35.9
	18	31.0	26.7	25.5	24.4	-	-	-
	19	30.8	26.2	24.6	23.6	22.5	22.7	23.5
	20	32.6	28.2	26.8	24.7	23.1	24.2	25.9
	Mean	32.7	28.4	27.0	26.7	27.7	28.4	29.4
uPIC200-400CA 100 mg/kg	11	33.7	29.4	27.5	26.6	28.5	30.7	31.9
	12	29.4	27.0	25.1	26.8	27.9	27.9	28.5
	13	32.4	27.4	26.3	24.7	25.2	28.0	30.0
	14	36.1	30.3	28.8	31.7	33.7	34.2	34.9
	15	29.3	26.5	25.1	23.8	26.9	28.6	28.3
	Mean	32.2	28.1	26.6	26.7	28.4	29.9	30.7
uPIC100-400 100 mg/kg	1	32.0	28.1	25.7	26.4	29.2	31.0	32.0
	2	32.9	29.9	32.4	32.6	31.7	32.1	32.1
	3	33.7	28.7	27.0	30.0	31.7	33.0	33.8
	4	31.3	27.6	26.6	30.2	30.9	31.1	31.2
	5	32.1	27.2	26.8	30.9	31.5	32.5	32.1
	Mean	32.4	28.3	27.7	30.0	31.0	31.9	32.2
uPIC50-400 100 mg/kg	6	32.6	32.1	34.3	35.0	36.0	35.4	35.9
	7	32.3	32.2	32.7	33.5	34.4	34.4	34.3
	8	30.5	27.4	27.9	29.7	30.2	30.3	31.3
	9	34.0	29.7	30.8	33.1	33.5	34.1	34.1
	10	34.0	30.1	32.8	33.7	34.4	34.3	34.5
	Mean	32.7	30.3	31.7	33.0	33.7	33.7	34.0

表の左から、投与した PIC の名称と投与量、動物番号、観察日の体重を示した。

Day 0 は投与日、Day 1 は投与 1 日後を示す。長鎖 PIC(Long Chain PIC)は、Lot No.

MDI142(GE ヘルスケア)を供試した。

表 6 マウスの摂餌量の推移(腹腔内単回投与毒性試験 試験 I)

PIC	Mouse No.	Upper: Daily food intake (g/mouse) Lower: Survival number						
		Day 0-1	Day 1-2	Day 2-3	Day 3-4	Day 4-5	Day 5-6	Day 6-7
Long chain PIC 100 mg/kg	21-25	1.2 5	1.4 4	2.4 3	3.0 3	6.2 2	5.5 2	5.8 2
PIC400-400CA 100 mg/kg	16-20	0.0 5	0.1 5	2.6 5	4.4 5	5.2 4	6.2 4	6.3 4
uPIC200-400CA 100 mg/kg	11-15	0.4 5	0.4 5	3.7 5	6.9 5	7.3 5	5.5 5	6.4 5
uPIC100-400 100 mg/kg	1-5	0.6 5	1.7 5	6.4 5	7.7 5	7.3 5	6.6 5	6.8 5
uPIC50-400 100 mg/kg	6-10	2.6 5	5.0 5	7.4 5	7.3 5	5.6 5	5.9 5	6.0 5

表の左から、投与した PIC の種類と投与量、動物番号、測定期間ごとの摂餌量(ケージごとの飼料の減少量を生存数で割った値)および生存数を示した。Day 0-1 は、投与日から投与 1 日後までの摂餌量および投与 1 日後夕刻の生存数。

表 7-1 マウスの体重変化(腹腔内単回投与毒性試験 試験 2)

PIC	Mouse No.	Body weight (g)						
		Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6
PIC400-400CA 100 mg/kg	31	30.9	27.3	–	–	–	–	–
	32	33.7	28.8	27.0	25.5	25.1	25.7	25.9
	33	30.8	26.9	–	–	–	–	–
	34	32.7	29.5	27.0	25.6	24.9	27.0	30.3
	35	33.8	29.8	28.3	–	–	–	–
	Mean	32.4	28.5	27.4	25.6	25.0	26.4	28.1
PIC400-400CA 200 mg/kg	36	34.9	29.6	27.5	26.2	25.9	24.3	–
	37	32.9	29.2	26.7	25.4	–	–	–
	38	31.7	25.9	–	–	–	–	–
	39	32.7	27.3	25.0	24.0	23.1	22.4	–
	40	32.2	26.7	–	–	–	–	–
	Mean	32.9	27.7	26.4	25.2	24.5	23.4	–
uPIC200-400CA 200 mg/kg	21	34.1	29.7	27.1	25.8	24.8	24.6	25.3
	22	32.1	27.9	25.8	24.0	23.2	23.2	23.4
	23	34.7	30.2	–	–	–	–	–
	24	30.8	25.3	23.1	21.7	21.4	–	–
	25	31.8	26.5	–	–	–	–	–
	Mean	32.7	27.9	25.3	23.8	23.1	23.9	24.4
uPIC200-400CA 400 mg/kg	26	31.5	26.4	–	–	–	–	–
	27	32.1	27.3	–	–	–	–	–
	28	32.8	28.4	27.1	–	–	–	–
	29	32.3	27.8	–	–	–	–	–
	30	32.2	27.7	–	–	–	–	–
	Mean	32.2	27.5	27.1	–	–	–	–

表の左から、投与した PIC の種類と投与量，動物番号，観察日の体重を示した。

Day 0 は投与日，Day 1 は投与 1 日後を示す。

表 7-2 マウスの体重変化(腹腔内単回投与毒性試験 試験 2)(続き)

PIC	Mouse No.	Body weight (g)						
		Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6
uPIC100-400 200 mg/kg	1	34.2	30.0	27.4	25.9	26.6	28.6	30.8
	2	32.6	28.0	26.3	24.8	25.7	28.5	29.3
	3	33.8	28.7	-	-	-	-	-
	4	33.0	29.0	26.9	30.2	31.7	32.2	32.8
	5	31.8	27.6	-	-	-	-	-
	Mean	33.1	28.7	26.9	27.0	28.0	29.8	31.0
uPIC100-400 400 mg/kg	6	32.8	31.3	-	-	-	-	-
	7	35.4	29.8	-	-	-	-	-
	8	32.1	-	-	-	-	-	-
	9	33.1	-	-	-	-	-	-
	10	35.2	29.9	-	-	-	-	-
	Mean	33.7	30.3	-	-	-	-	-
uPIC50-400 200 mg/kg	11	32.4	28.5	27.6	29.6	31.1	31.9	32.4
	12	31.1	27.2	26.7	29.2	30.1	30.3	30.6
	13	32.0	27.4	28.6	30.4	31.6	31.6	31.9
	14	31.2	27.6	29.4	30.8	31.2	31.3	30.7
	15	34.8	30.3	30.0	32.0	32.6	33.5	33.5
	Mean	32.3	28.2	28.5	30.4	31.3	31.7	31.8
uPIC50-400 400 mg/kg	16	36.7	33.4	30.9	31.7	33.1	34.8	35.4
	17	33.3	30.0	-	-	-	-	-
	18	33.5	30.2	29.1	32.0	32.3	33.1	33.4
	19	32.5	28.4	26.5	28.1	30.5	31.8	32.3
	20	31.2	27.6	26.3	26.8	28.3	29.9	29.9
	Mean	33.4	29.9	28.2	29.7	31.1	32.4	32.8

表の左から，投与した PIC の種類と投与量，動物番号，観察日の体重を示した。

Day 0 は投与日，Day 1 は投与 1 日後を示す。

表 8 マウスの摂餌量の推移(腹腔内単回投与毒性試験 試験 2)

PIC	Mouse No.	Upper: Daily food intake (g/mouse) Lower: Survival number							
		Day -1-0	Day 0-1	Day 1-2	Day 2-3	Day 3-4	Day 4-5	Day 5-6	Day 6-7
PIC400-400CA 100 mg/kg	31-35	5.8 5	0.6 5	0.1 3	0.4 2	3.1 2	4.5 2	6.5 2	6.7 2
PIC400-400CA 200 mg/kg	36-40	5.6 5	0.5 5	0.1 3	0.1 3	0.4 2	0.2 2	– –	– –
uPIC200-400CA 200 mg/kg	21-25	6.3 5	0.8 5	0.1 3	0.1 3	1.5 3	2.6 2	3.7 2	6.0 2
uPIC200-400CA 400 mg/kg	26-30	5.6 5	0.5 5	0.3 1	– –	– –	– –	– –	– –
uPIC100-400 200 mg/kg	1-5	6.0 5	0.6 5	0.3 3	3.9 3	7.0 3	8.9 3	7.5 3	5.8 3
uPIC100-400 400 mg/kg	6-10	6.2 5	0.9 3	– –	– –	– –	– –		– –
uPIC50-400 200 mg/kg	11-15	5.8 5	0.5 5	2.1 5	6.1 5	6.2 5	6.1 5	5.9 5	6.3 5
uPIC50-400 400 mg/kg	16-20	5.7 5	0.5 5	0.7 4	4.9 4	6.2 4	6.5 4	6.1 4	6.4 4

表の左から、投与した PIC の種類と投与量、動物番号、摂餌量(ケージごとの飼料減少量を生存数で割った値)と生存数を示した。Day -1-0 は、投与前日から投与日まで
の摂餌量および投与日夕刻の生存数。Day 0-1 は、投与日から投与 1 日後までの摂餌
量および投与 1 日後夕刻の生存数。

第4節 考察

PICの全身毒性データは、化学物質毒性データ総覧に RTECS Number TR0175000 として登録されている。マウスの腹腔内投与毒性量は、CF-1 マウスの腹腔内投与毒性量 LD₅₀ 150 mg/kg(Phillips *et al.*, 1971)が引用されている。この値は Miles Laboratories の Batch 11-3-21 の PIC を用いたデータであるが、本研究の文献調査の中でこの PIC の塩基長を探し出すことはできなかった。一方、別のグループは、Hamilton が作製した 13 S の PIC(Hamilton *et al.*, 1971)の毒性を調べている。この PIC の腹腔内投与毒性は CD-1 マウスにおいて LD₅₀ 80 mg/kg であると報告されている(Phillips *et al.*, 1971)。この値は、Jcl:ICR マウスにおける 12.8 S の LD₅₀ 80 mg/kg 値(Machida *et al.*, 1976)と一致することから、マウスの系統による毒性の違いはないかあったとしても軽微であると推定される。文献ごとに PIC の毒性データがばらつくのは、毒性評価に供した PIC の二重鎖長の違いを反映しているものと推定される。

本章で実施した腹腔内投与濃度とマウス生存数のデータ(表 4)をロジスティック解析して LD₅₀ 値を算出すると、PIC400-400CA が 120 mg/kg($p < 0.05$), uPIC200-400CA が 190 mg/kg ($p < 0.001$), uPIC100-400 が 210 mg/kg ($p < 0.001$), uPIC50-400 が 280 mg/kg ($p < 0.234$)となり、uPIC50-400 を除き統計的に確度の高い数値が得られた。

PIC400-400CA の LD₅₀ 値 120 mg/kg は、8.2 S の PIC の LD₅₀ 値 150 mg/kg (Machida *et al.*, 1976)に近似していた。この PIC400-400CA の LD₅₀ 値に対して、uPIC200-400CA, uPIC100-400 の LD₅₀ 値は明らかに増加していた。また、uPIC50-400 については LD₅₀ 値は確定されなかったものの毒性がさらに低下した。これらの結果から同じ二重鎖長でも PIC を構成する poly-I 分子の塩基長が短くなるにつれて毒性が低減することは明らかである。第 4 章でアジュバントとしての効果を認めた PIC の用量(片鼻 5 μ g ずつ両鼻で 10 μ g/body = 約 0.5 mg/kg)は、uPIC100-400 の腹腔内投与 LD₅₀ 値と比較すると 1/400 となる。

経鼻投与で全身毒性を推し量ることは、肺局所の炎症応答との区別がつけにくく困難であることを、本章の序文で述べた。鼻腔局所の炎症応答としては、2014 年に ICR マウスの片鼻に SIGMA 製の PIC 50 μ g/body を 24 時間間隔で 3 回投与すると 9 日後に嗅粘膜が一過性ではあるがダメージを起こすことが報告された(Kanaya *et al.*, 2014)。この炎症応答が TLR3 シグナル伝達によって起こる免疫応答なのかそうではないのかで

解釈は変わるが，自然免疫刺激物質の連続投与による炎症応答の増悪は想定範囲内の現象であり，使用にあたっては炎症の増悪を避ける投与スケジュールが求められる．

第6章 総合考察

本研究対象の PIC は、1960 年代に考案された化合物である (Chamberlin *et al.*, 1965; Field *et al.*, 1967). 物理化学的特性と生物学的特性は詳細に調べられ、免疫賦活化剤としての可能性が追求され (de Clercq, 1974), 臨床試験も行われた (Hill *et al.*, 1972; Freeman *et al.*, 1977; Robinson *et al.*, 1976; Guggenheim and Baron, 1977). しかし、PIC の生物活性は当時からメーカーごとにばらついていて (Field *et al.*, 1968; Cornell *et al.*, 1976). 二重鎖長が生物活性に影響を与えることは究明されたが (Stewart *et al.*, 1974), 二重鎖長のばらつきは今日まで解消されていない (Nakano *et al.*, 2018). 本研究において探求した二重鎖長制御技術は、短い poly-I 分子と長い poly-C 分子の組合せという単純な技術に帰したが、その効果は予想を超えた. アニール時の二重鎖長の伸長が回避されただけでなく、uPIC100-400 においては、溶液保存安定性が向上し、毒性が低減した. uPIC100-400 の溶液保存安定性は、切れ目のない poly-C 鎖によって実現された現象と考えられる. 言い換えると、熱安定性の低い poly-I 分子に支えられる二重鎖部分 (poly-C 鎖のニック) がない構造である. uPIC100-400 の毒性の低減は、血清や体液で切断されにくい性質の poly-I 分子が予め計画的に細断されて二重鎖に組み込まれているために、PIC 二重鎖の体内半減期が短縮され、過剰な免疫刺激が起こりにくくなったと考えることができる.

平均塩基長 0.05 kb の poly-I 分子で作製した uPIC50-400 は、本研究で評価した PIC の中で最も毒性が低かった. しかし、アジュバント活性も弱かった. この結果は uPIC50-400 のアジュバントとしての価値を完全否定するものではないと考えている. TLR3 が認識できる二重鎖長の下限は 40-50 bp であることが構造解析から明らかとなっている (Liu *et al.*, 2008; Luo *et al.*, 2012). 50 bp の poly-I 分子を持つ uPIC50-400 は、血清との接触によって速やかに下限二重鎖長付近に細断され、自然免疫応答の惹起に必要な十分な TLR3 シグナルが発生しなかった可能性が考えられる. その一方で、カチオンリポソームに吸着させて uPIC50-400 を細胞内に強制的に送達したとき、他の PIC と同様に TLR3 を含む自然免疫系の遺伝子発現が誘導された. TLR3 は I 型 IFN によって誘導される分子でもあるので、カチオンリポソームに吸着させて細胞内に uPIC50-400 を導入した細胞が TLR3 のシグナル伝達が起こったのかどうかは不明である. しかし、作業仮説として、uPIC50-400 は細胞内への取り込みが律速となっている

ために、エンドソームに発現する TLR3 に認識されず、アジュバント効果が発揮できないという可能性は残る。言い換えると、uPIC50-400 はエンドサイトーシスによる細胞内への輸送が起こりにくい分子である可能性である。PIC の細胞内への取り込みは、Raftlin およびクラスリン依存的なエンドサイトーシスによって起こることから (Watanabe *et al.*, 2011), この機構との関わりを調べることで uPIC50-400 のアジュバント効果を発揮させるために必要な知見が得られるかもしれない。

細胞内への取り込みは、PIC のアジュバント効果を改良する上で重要なターゲットとなる。新倉らとの共同研究において、uPIC50-400 は、ロッド型金ナノ粒子に吸着させることで、経鼻インフルエンザワクチンのアジュバント活性が向上する結果を得ている。球形の金ナノ粒子では uPIC50-400 のアジュバント効果が得られない。この形状特異的な金ナノ粒子の効果は、少なくとも金ナノ粒子と PIC の接触面積や結合力の差異ではないことが明らかとなっている (Tazaki *et al.*, 2018)。本研究の知見を踏まえると金ナノ粒子の形状は、鼻腔の上皮細胞や免疫担当細胞における PIC の取り込みに影響を与えている可能性が考えられる。

経鼻投与型インフルエンザワクチンは、弱毒生インフルエンザワクチンおよび不活化全粒子インフルエンザワクチンとしてヒトでの効果が確かめられている。低温馴化型弱毒生インフルエンザワクチンは、Flumist™ (MedImmune, MA, USA) として米国で市販されており、S-IgA を誘導することが確かめられている。このワクチンは生ワクチンであるため、接種した弱毒ウイルスが体内で一定期間増殖することがワクチン効果の発揮に不可欠である。インフルエンザ既往歴のある成人は接種されたウイルスを早々に不活化してしまい免疫されにくい。また、4 価ワクチンとなった 2017-2018 年シーズンの同ワクチンは、効果が期待できないので接種しないことを推奨するという勧告が米国予防接種諮問委員会から発せられた。もう一つの不活化全粒子インフルエンザワクチンの経鼻接種とは、日本で行われた臨床研究の事例である。季節性インフルエンザウイルス株の一つの A/Victoria/210/09(H3N2)ウイルスを用いて製造した不活化全粒子ワクチンの接種において、HA インフルエンザワクチンで使用する HA 抗原量の 3 倍量に相当する不活化全粒子インフルエンザワクチンを 3 週間間隔で 2 回経鼻接種すると、HI 抗体価が有効水準に達し、鼻腔での S-IgA の産生が確認された (Ainai *et al.*, 2017)。この経鼻不活化全粒子インフルエンザワクチンは、高病原性のインフルエンザウイルス株の A/Indonesia/5/05(H5N1) からリバーエンジニアリングで作製した H5 不活化全粒子

インフルエンザワクチンにおいても、HA インフルエンザワクチンで使用する HA 抗原量の 3 倍量の HA 抗原を 3 回経鼻接種することで有効とされる HI 抗体価が得られ、鼻腔の S-IgA 誘導と血清の IgG 値が上昇した(Ainai *et al.*, 2020). この経鼻不活化全粒子インフルエンザワクチンは、投与する抗原量が多い点と発熱の原因となる宿主由来の脂質膜成分の夾雑が課題となるが、そう遠くない将来に実用化される可能性が高い。

本研究によって、ワクチンアジュバントとして利用し得る PIC 製造技術は確立された。PIC を臨床応用するためには医薬品の開発ステップに沿った数多くの試験研究と安全性の確認が求められ、多くの時間を要するが、本研究の成果が経鼻 HA インフルエンザワクチンという形で社会実装されることを願っている。

要約

呼吸器感染症予防ワクチンの研究開発現場では、有効性が飛躍的に向上するワクチンの開発を目指し、全身性の免疫応答を誘導しつつ気道局所の粘膜免疫を誘導する経鼻ワクチンの研究開発が行われている。この粘膜ワクチンは皮下注射に比べて3倍以上の多量の抗原を必要とするため、限りある抗原量で粘膜ワクチンを大量生産するためにはアジュバントの併用が不可欠である。そのアジュバント候補の一つが dsRNA の「ポリイノシン酸-ポリシチジル酸」(PIC)である。本研究では、PIC の実用化を目指し、その二重鎖構造に起因する物理化学的、生物学的特性を明らかにするとともに、PIC 製造時および製品保管中に起こる二重鎖長の変化を抑制し、アジュバントとしての有効濃度範囲を拡大せしめる二重鎖構造を探索した。

第1章では、本研究の技術的背景を述べた。PIC は、イノシン酸ホモポリマー(poly-I)とシチジル酸ホモポリマー(poly-C)が塩基対を介して右回りの二重らせんを形成した非天然型の dsRNA である。この構造体は、RNA ウイルスが増殖する過程で出現する分子パターンであり、哺乳類の免疫システムは PIC に強く応答する。この PIC を配合した経鼻インフルエンザワクチンは、皮下注射と同じ抗原量で粘膜免疫を誘導しウイルス感染を防御することが動物モデルで確かめられている。その一方で、神経精神疾患や自己免疫疾患の動物モデルにおいて高用量の PIC 投与がストレスとなり、それぞれの病態を増悪させることが報告されている。したがって、PIC をワクチンアジュバントとして利用するためには、PIC の有効域と毒性域を特定する必要がある。PIC の免疫賦活化作用は約 0.1 kbp 以上の分子において認められ、その強さは二重鎖長に強く正相関することから、PIC の薬理活性を安定化させる技術、すなわち二重鎖長制御技術の開発が課題となった。

第2章では、PIC 製造工程内の二重鎖長の変動要因を解析し、poly-I と poly-C 分子がアニーリング時に数珠つなぎに伸長する現象に帰することを示した。さらに、poly-I, poly-C 分子の物理化学的特性の違いに着目して、PIC 二重鎖の伸長反応を抑制し得る二重鎖長制御技術を探索した。様々な塩基長の poly-I 分子と poly-C 分子を組み合わせることで二重鎖の伸長と加熱冷却による収束の違い調べ、0.4 kb の poly-C 分子に対して 0.13 kb 以下の poly-I 分子を相補分子に選択することで PIC 二重鎖長の伸長が効果的に抑制されることを見いだした。その代表例が 0.4 kb の poly-C 分子と 0.1 kb の poly-I 分

子で組み立てた uPIC100-400, および 0.4 kb の poly-C 分子と 0.05 kb の poly-I 分子で組み立てた uPIC50-400 である. 逆の組合せ(長鎖 poly-I と短鎖 poly-C 分子)は PIC 二重鎖の収束が不十分であったことから, poly-I 分子の短鎖化が二重鎖の伸長抑制の鍵と考えられた. poly-I 分子は, 単独では棒状に近い二次構造をとり, PIC 二重鎖形成時に立体構造を右らせんへ激しく変化させる. この事実を踏まえると, poly-I 分子の短鎖化はアニーリング時に生じる分子内のねじれの解消に寄与した可能性が考えられた. 次に, uPIC100-400 の二重鎖構造が長期保存に耐えられるかどうかを調べるために, PIC400-400CA(0.4 kb の poly-I, poly-C 分子をアニールし高温にさらして二重鎖長を約 0.4 kbp にそろえた PIC を対照区とし, PBS (pH 7.4) 溶液における 25 °C の保存安定性試験を実施した. PIC400-400CA は 1 か月目から統計的に有意な二重鎖長の減少が観察されたが, uPIC100-400 は, 試験期間中の 4 か月間, 有意な二重鎖長の減少は認められなかった. poly-I 分子が非酵素的な加水分解を受けやすい RNA であることを踏まえると, uPIC100-400 分子の高い保存安定性は, poly-C 鎖に切断点がない二重鎖構造に帰する可能性が考えられた.

第 3 章では, 第 1 章で作製した二重鎖構造の異なる PIC のアジュバント効果を調べるために, 自然免疫における dsRNA リガンドの応答性をレポーター細胞で評価した. Toll 様受容体 3(TLR3)は, 特定の免疫担当細胞や線維芽細胞で発現し, 主にエンドソームに局在するリガンドである. ヒト由来 TLR3 レポーター細胞とマウス由来 TLR3 レポーター細胞の評価において, 同等塩基長の PIC 同士でも二重鎖を構成する poly-I 分子が 0.07 kb 以下であれば TLR3 の応答性が著しく低下することが判明した. 一方, RNA ヘリカーゼ系のリガンド(RLR)の応答性は, poly-I 分子, poly-C 分子の塩基長の影響は受けないことが確かめられた. こうして明らかとなった poly-I 分子の塩基長が異なる PIC に対する TLR3 と RLR の応答の違いが *in vivo* のアジュバント活性にどのような影響をもたらすのか調べるために, PIC400-400CA と同等の TLR3, RLR 応答性が得られる uPIC100-400, および TLR3 の応答性のみが劣る uPIC50-400 を選抜し, マウスの感染実験に進んだ.

第 4 章では, 経鼻インフルエンザワクチンの上気道感染マウスモデルを用いて PIC の二重鎖構造とアジュバント作用の関係について探求した. PIC400-400CA, uPIC100-400, uPIC50-400 の 3 つの短鎖 PIC, および長鎖 PIC を個別に配合した不活化インフルエンザワクチンをマウスに 2 回経鼻接種し, ウイルス感染後に誘導されるヘ

マグルチニン特異的 IgG, IgA 抗体価と鼻腔洗浄液中のウイルス価を測定した. uPIC100-400 添加区は, PIC400-400CA 添加区と同等のウイルス抑制効果を示し, IgA 抗体産生量は PIC400-400CA を上回った. これらの結果から, uPIC100-400 の二重鎖構造がアジュバントとして機能し, その活性は一般的な二重鎖構造に対して非劣性であることが実証された. これらのウイルス増殖抑制効果は免疫賦活化作用の強い長鎖 PIC よりも劣ったが, uPIC100-400 のアジュバント効果は配合量を 2 倍にすることで長鎖 PIC と同等に向上することがその後の研究で実証されている. 一方で, uPIC50-400 はアジュバント効果が著しく劣る結果となった. uPIC100-400 と uPIC50-400 のアジュバント効果の違いから, 経鼻不活化インフルエンザワクチンのアジュバント効果が TLR3 経路のシグナル伝達を介して発揮されることが示唆された.

第 5 章では, PIC 二重鎖構造と毒性との関連性を調べるために, poly-I 分子の塩基長が異なる 4 種の PIC および長鎖 PIC をマウス腹腔内に単回投与し, 急性期の様子を比較した. 腹腔内投与後に観察された毒性症状は二重鎖長を 0.4 kbp に短縮することで低減することが示された. また, より短い塩基長の poly-I 分子で構成される PIC の毒性はさらに低減し, uPIC100-400 分子の致死量 LD₅₀ は PIC400-400CA の約 2 倍に上昇した. これらの結果から, uPIC100-400 の二重鎖構造は毒性の低減に寄与し, アジュバントとしての有効範囲が拡大することが示された. poly-I 分子の短鎖化による腹腔内投与毒性の低下効果は, リボヌクレアーゼによる二重鎖の切断長と関係することが血清による消化実験から推定された.

以上の研究により, PIC アニール時に生じる二重鎖長の伸長は, uPIC100-400 分子として提示した二重鎖構造を採用することで完全に解消することが示された. この構造は PIC の保存安定性を大きく改善することも明らかとなった. 本研究を通して開発した PIC 二重鎖長の安定化技術は, PIC の有効域と毒性域の特定作業を加速し, 経鼻インフルエンザワクチンの開発に貢献するものであり, 本研究の成果が人々の健康増進に貢献し得るものと考ええる.

参考文献

- Aavani T., Rana S.A., Hawkes R., Pittman Q.J. (2015). Maternal immune activation produces cerebellar hyperplasia and alterations in motor and social behaviors in male and female mice. *Cerebellum* **14**, 491-505.
- Adderson E., Branum K., Sealy R.E., Jones B.G., Surman S.L., Penkert R., *et al.* (2015). Safety and immunogenicity of an intranasal Sendai virus-based human parainfluenza virus type 1 vaccine in 3- to 6-year-old children. *Clin Vaccine Immunol* **22**, 298-303.
- Ainai A., Hasegawa H., Obuchi M., Odagiri T., Ujike M., Shirakura M., *et al.* (2015). Host adaptation and the alteration of viral properties of the first influenza A/H1N1pdm09 virus isolated in Japan. *PLoS One* **10**, e0130208.
- Ainai A., Suzuki T., Tamura S.I., Hasegawa H. (2017). Intranasal administration of whole inactivated influenza virus vaccine as a promising influenza vaccine candidate. *Viral Immunol* **30**, 451-462.
- Ainai A., van Riet E., Ito R., Ikeda K., Senchi K., Suzuki T., *et al.* (2020). Human immune responses elicited by an intranasal inactivated H5 influenza vaccine. *Microbiol Immunol*. doi: 10.1111/1348-0421.12775
- Akira S. (2011). Innate immunity and adjuvants. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **366**, 2748-2755.
- Ammi R., De Waele J., Willemen Y., Van Brussel I., Schrijvers D.M., Lion E., *et al.* (2015). Poly(I:C) as cancer vaccine adjuvant: knocking on the door of medical breakthroughs. *Pharmacol Ther* **146**, 120-131.
- Aoshi T. (2017). Modes of action for mucosal vaccine adjuvants. *Viral Immunol* **30**, 463-470.
- Asahi Y., Yoshikawa T., Watanabe I., Iwasaki T., Hasegawa H., Sato Y., *et al.* (2002). Protection against influenza virus infection in polymeric Ig receptor knockout mice immunized intranasally with adjuvant-combined vaccines. *J Immunol* **168**, 2930-2938.
- Ascough S., Vlachantoni I., Kalyan M., Haijema B.J., Wallin-Weber S., Dijkstra-Tiekstra M.,

- et al.* (2019). Local and systemic immunity against respiratory syncytial virus induced by a novel intranasal vaccine. A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Am J Respir Crit Care Med* **200**, 481-492.
- Azegami T., Yuki Y., Nakahashi R., Itoh H., Kiyono H. (2018). Nanogel-based nasal vaccines for infectious and lifestyle-related diseases. *Mol Immunol* **98**, 19-24.
- Basilio C., Ochoa S. (1963). Enzymatic sythesis of polyribonucleotides. *Methods Enzymol* **6**, 713-718.
- Bloomfield V.A., Crothers D.M., Tinoco Jr. I. (2000). Electonic and vibrational spectroscopy. In V.A. Bloomfield, D.M. Crothers, & I.Jr. Tinoco (Eds), *Nucleic acids: structures, properties, and functions* (pp. 165-222). University Science Books.
- Chamberlin M.J. and Patterson D.L. (1965). Physical and chemical characterization of the ordered complexes formed between polyinosinic acid, polycytidylic acid and their deoxyribo-analogues. *J Mol Biol* **12**, 410-428.
- Cornell C.J.Jr., Smith K.A., Cornwell G.G., 3rd, Burke G.P., McIntyre O.R. (1976). Systemic effects of intravenous polyriboinosinic-polyribocytidylic acid in man. *J Natl Cancer Inst* **57**, 1211-1216.
- Dauletbaev N., Cammisano M., Herscovitch K., Lands L.C. (2015). Stimulation of the RIG-I/MAVS pathway by polyinosinic:polycytidylic acid upregulates IFN-beta in airway epithelial cells with minimal costimulation of IL-8. *J Immunol* **195**, 2829-2841.
- de Clercq E. (1974). Synthetic interferon inducers. *Top Curr Chem* **52**, 173-208.
- de Clercq E. (1979). Degradation of poly(inosinic acid) - poly(cytidylic acid) [(I)_n - (C)_n] by human plasma. *Eur J Biochem* **93**, 165-172.
- Ekwemalor K., Worku M. (2019). PSX-41 effect of polyinosinic-polycytidylic acid on gene expression in goat blood. *J Anim Sci* **97**, 449-449.
- EMA (2005). *Guideline on adjuvant in vaccines for human use*. The European Medicines Agency. EMA/CHMP/VEG/134716/2004

- Field A.K., Tytell A.A., Lampson G.P., Hilleman M.R. (1967). Inducers of interferon and host resistance, II. Multistranded synthetic polynucleotide complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **58**, 1004-1010.
- Field A.K., Tytell A.A., Lampson G.P., Hilleman M.R. (1968). Inducers of interferon and host resistance, V. In vitro studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **61**, 340-346.
- Field A.K., Young C.W., Krakoff I.H., Tytell A.A., Lampson G.P., Nemes M.M., *et al.* (1971). Induction of interferon in human subjects by poly I:C. *Proc Soc Exp Biol Med* **136**, 1180-1186.
- Field A.K. (1973). Interferon induction by polynucleotides. In W.A. Carter (Ed.), *Selective inhibitors of viral functions* (pp. 149-176). CRC press.
- Field R., Campion S., Warren C., Murray C., Cunningham C. (2010). Systemic challenge with the TLR3 agonist poly I:C induces amplified IFN α /beta and IL-1beta responses in the diseased brain and exacerbates chronic neurodegeneration. *Brain Behav Immun* **24**, 996-1007.
- Flannery B., Kondor R.J.G., Chung J.R., Gaglani M., Reis M., Zimmerman R.K., *et al.* (2020). Spread of antigenically drifted influenza A(H3N2) viruses and vaccine effectiveness in the United States during the 2018-2019 season. *J Infect Dis* **221**, 8-15.
- Forghani P. and Waller E.K. (2015). Poly (I:C) modulates the immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells in a murine model of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **153**, 21-30.
- Forte G., Rega A., Morello S., Luciano A., Arra C., Pinto A., *et al.* (2012). Polyinosinic-polycytidylic acid limits tumor outgrowth in a mouse model of metastatic lung cancer. *J Immunol* **188**, 5357-5364.
- Freeman A.I., Al-Bussam N., O'Malley J.A., Stutzman L., Bjornsson S., Carter W.A. (1977). Pharmacologic effects of polyinosinic-polycytidylic acid in man. *J Med Virol* **1**, 79-93.
- Galli R., Paone A., Fabbri M., Zanesi N., Calore F., Cascione L., *et al.* (2013). Toll-like

- receptor 3 (TLR3) activation induces microRNA-dependent reexpression of functional RARbeta and tumor regression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 9812-9817.
- Gesuete R., Packard A.E., Vartanian K.B., Conrad V.K., Stevens S.L., Bahjat F.R., *et al.* (2012). Poly-ICLC preconditioning protects the blood-brain barrier against ischemic injury in vitro through type I interferon signaling. *J Neurochem* **123**(Suppl 2), 75-85.
- Giese M. (2016). Mucosal Immunity. In M. Giese (Ed.), *Introduction to Molecular Vaccinology* (pp. 63-95). Springer International Publishing.
- Ginzel M., Yu Y., Klemann C., Feng X., von Wasielowski R., Park J.K., *et al.* (2016). The viral dsRNA analogue poly (I:C) induces necrotizing enterocolitis in neonatal mice. *Pediatr Res* **79**, 596-602.
- Giuliani M.M., Del Giudice G., Giannelli V., Dougan G., Douce G., Rappuoli R., *et al.* (1998). Mucosal adjuvanticity and immunogenicity of LTR72, a novel mutant of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin with partial knockout of ADP-ribosyltransferase activity. *J Exp Med* **187**, 1123-1132.
- Green C.A., Scarselli E., Voysey M., Capone S., Vitelli A., Nicosia A., *et al.* (2015). Safety and immunogenicity of novel respiratory syncytial virus (RSV) vaccines based on the RSV viral proteins F, N and M2-1 encoded by simian adenovirus (PanAd3-RSV) and MVA (MVA-RSV); protocol for an open-label, dose-escalation, single-centre, phase 1 clinical trial in healthy adults. *BMJ Open* **5**, e008748.
- Guggenheim M.A. and Baron S. (1977). Clinical studies of an interferon inducer, polyriboinosinic-polyribocytidylic acid [poly (I)-poly (C)], in children. *J Infect Dis* **136**, 50-58.
- Gupta S.K., Deb R., Dey S., Chellappa M.M. (2014). Toll-like receptor-based adjuvants: enhancing the immune response to vaccines against infectious diseases of chicken. *Expert Rev Vaccines* **13**, 909-925.
- Hamilton L.D. (1971). Immunogenic polynucleotides. In F. Roland, J. Beers, W. Braun (Eds.), *Biological effects of polynucleotides* (pp. 107-128). Springer-Verlag.

- Harris P., Sridhar S., Peng R., Phillips J.E., Cohn R.G., Burns L., *et al.* (2013). Double-stranded RNA induces molecular and inflammatory signatures that are directly relevant to COPD. *Mucosal Immunol* **6**, 474-484.
- Hasegawa H., Ichinohe T., Ainal A., Tamura S., Kurata T. (2009). Development of mucosal adjuvants for intranasal vaccine for H5N1 influenza viruses. *Ther Clin Risk Manag* **5**, 125-132.
- Hill D.A., Baron S., Perkins J.C., Worthington M., Van Kirk J.E., Mills J., *et al.* (1972). Evaluation of an interferon inducer in viral respiratory disease. *JAMA* **219**, 1179-1184.
- Hilleman M.R. (1968). Interferon induction and utilization. *J Cell Physiol* **71**, 43-59.
- Homan E.R., Zendzian R.P., Schott L.D., Levy H.B., Adamson R.H. (1972). Studies on poly I:C toxicity in experimental animals. *Toxicol Appl Pharmacol* **23**, 579-588.
- Hotz C., Roetzer L.C., Huber T., Sailer A., Oberson A., Treinies M., *et al.* (2015). TLR and RLR signaling are reprogrammed in opposite directions after detection of viral infection. *J Immunol* **195**, 4387-4395.
- Ichinohe T., Ainal A., Ami Y., Nagata N., Iwata N., Kawaguchi A., *et al.* (2010). Intranasal administration of adjuvant-combined vaccine protects monkeys from challenge with the highly pathogenic influenza A H5N1 virus. *J Med Virol* **82**, 1754-1761.
- Ichinohe T., Lee H.K., Ogura Y., Flavell R., Iwasaki A. (2009). Inflammasome recognition of influenza virus is essential for adaptive immune responses. *J Exp Med* **206**, 79-87.
- Ichinohe T., Tamura S., Kawaguchi A., Ninomiya A., Imai M., Itamura S., *et al.* (2007). Cross-protection against H5N1 influenza virus infection is afforded by intranasal inoculation with seasonal trivalent inactivated influenza vaccine. *J Infect Dis* **196**, 1313-1320.
- Ichinohe T., Watanabe I., Ito S., Fujii H., Moriyama M., Tamura S., *et al.* (2005). Synthetic double-stranded RNA poly(I:C) combined with mucosal vaccine protects against influenza virus infection. *J Virol* **79**, 2910-2919.

- Ito R., Ozaki Y.A., Yoshikawa T., Hasegawa H., Sato Y., Suzuki Y., *et al.* (2003). Roles of anti-hemagglutinin IgA and IgG antibodies in different sites of the respiratory tract of vaccinated mice in preventing lethal influenza pneumonia. *Vaccine* **21**, 2362-2371.
- Jensen I., Albuquerque A., Sommer A.-I., Robertsen B. (2002). Effect of poly I:C on the expression of Mx proteins and resistance against infection by infectious salmon anaemia virus in Atlantic salmon. *Fish & Shellfish Immunology* **13**, 311-326.
- Kanaya K., Kondo K., Suzukawa K., Sakamoto T., Kikuta S., Okada K., *et al.* (2014). Innate immune responses and neuroepithelial degeneration and regeneration in the mouse olfactory mucosa induced by intranasal administration of poly(I:C). *Cell Tissue Res* **357**, 279-299.
- Kato H., Takeuchi O., Sato S., Yoneyama M., Yamamoto M., Matsui K., *et al.* (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* **441**, 101-105.
- Katoh Y., Kuninaka A., Yoshino H. (1975). Relationship of T_m and S Value of Double-stranded polynucleotides prepared from various sizes of single-stranded homopolynucleotides. *Agric Biol Chem* **39**, 1327-1328.
- Kawai T., Akira S. (2006). Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol* **7**, 131-137.
- Kawai T., Takahashi K., Sato S., Coban C., Kumar H., Kato H., *et al.* (2005). IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* **6**, 981-988.
- Kimura G., Ueda K., Eto S., Watanabe Y., Masuko T., Kusama T., *et al.* (2013). Toll-like receptor 3 stimulation causes corticosteroid-refractory airway neutrophilia and hyperresponsiveness in mice. *Chest* **144**, 99-105.
- Lampson G.P., Field A.K., Tytell A.A., Nemes M.M., Hilleman M.R. (1970). Relationship of molecular size of rIn:rCn (poly I:C) to induction of interferon and host resistance. *Proc Soc Exp Biol Med* **135**, 911-916.

- Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L., Reichhart J.-M., Hoffmann J.A. (1996). The Dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**, 973-983.
- Liu L., Botos I., Wang Y., Leonard J.N., Shiloach J., Segal D.M., *et al.* (2008). Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA. *Science* **320**, 379-381.
- Luo J., Obmolova G., Malia T.J., Wu S.J., Duffy K.E., Marion J.D., *et al.* (2012). Lateral clustering of TLR3:dsRNA signaling units revealed by TLR3ecd:3Fabs quaternary structure. *J Mol Biol* **421**, 112-124.
- Machida H., Kuninaka A., Yoshino H. (1976). Relationship between the molecular size of poly I-poly C and its biological activity. *Jpn J Microbiol* **20**, 71-76.
- Maeda A. (1961). Some properties of ribonucleic acid from yeast 80s particle; Effect of magnesium ions. *J Biochem* **50**, 377-385.
- Marichal T., Ohata K., Bedoret D., Mesnil C., Sabatel C., Kobiyama K., *et al.* (2011). DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nature Medicine* **17**, 996-1002.
- Matsumoto M., Kikkawa S., Kohase M., Miyake K., Seya T. (2002). Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochem Biophys Res Commun* **293**, 1364-1369.
- Matsumoto M. and Seya T. (2008). TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Adv Drug Deliv Rev* **60**, 805-812.
- Merigan T.C., de Clercq E., Eckstain F., Wells R.D. (1971). Molecular requirements for synthetic RNA to act in interferon stimulation. In R.F.J. Beer, W. Braun (Eds.), *Biological effects of polynucleotides* (pp. 67-78). Springer.
- Michelson A.M., Massoulie J., Guschlbauer W. (1967). Synthetic polynucleotides. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **6**, 83-141.
- Mizuno D., Ide-Kurihara M., Ichinomiya T., Kubo I., Kido H. (2006). Modified pulmonary

- surfactant is a potent adjuvant that stimulates the mucosal IgA production in response to the influenza virus antigen. *J Immunol* **176**, 1122-1130.
- Mutsch M., Zhou W., Rhodes P., Bopp M., Chen R.T., Linder T., *et al.* (2004). Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland. *N Engl J Med* **350**, 896-903.
- Nagato T., Lee Y.R., Harabuchi Y., Celis E. (2014). Combinatorial immunotherapy of polyinosinic-polycytidylic acid and blockade of programmed death-ligand 1 induce effective CD8 T-cell responses against established tumors. *Clin Cancer Res* **20**, 1223-1234.
- Nakano T., Yamamura E., Fujita H., Sone T., Asano K. (2018). Novel methods for nucleotide length control in double-stranded polyinosinic-polycytidylic acid production using uneven length components. *Biosci Biotechnol Biochem* **82**, 1889-1901.
- Nakayama T. (2015). Limitations of influenza split vaccine and new concepts for vaccine development. *Modern Media* **61**, 283-289.
- Nishizawa T., Takami I., Kokawa Y., Yoshimizu M. (2009). Fish immunization using a synthetic double-stranded RNA Poly(I:C), an interferon inducer, offers protection against RGNNV, a fish nodavirus. *Dis Aquat Organ* **83**, 115-122.
- Ohara Y., Suzuki T., Nakano T., Saito S., Aina A., Akimoto K., *et al.* (2015). Inactivated influenza vaccine combined with low toxicity dsRNAs induces mucosal and systemic immunity after intranasal immunization in mice. Poster presented at: *The 9th Vaccine & ISV Congress*; Oct 18-20, 2015; Seoul, South Korea.
- Okahira S., Nishikawa F., Nishikawa S., Akazawa T., Seya T., Matsumoto M. (2005). Interferon-beta induction through toll-like receptor 3 depends on double-stranded RNA structure. *DNA Cell Biol* **24**, 614-623.
- Ollivett T.L., Leslie K.E., Duffield T.F., Nydam D.V., Hewson J., Caswell J., *et al.* (2018). Field trial to evaluate the effect of an intranasal respiratory vaccine protocol on calf health, ultrasonographic lung consolidation, and growth in Holstein dairy calves. *J Dairy*

Sci **101**, 8159-8168.

- Oshiumi H., Matsumoto M., Funami K., Akazawa T., Seya T. (2003). TICAM-1, an adaptor molecule that participates in toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* **4**, 161-167.
- Overton E.T., Goepfert P.A., Cunningham P., Carter W.A., Horvath J., Young D., *et al.* (2014). Intranasal seasonal influenza vaccine and a TLR-3 agonist, rintatolimod, induced cross-reactive IgA antibody formation against avian H5N1 and H7N9 influenza HA in humans. *Vaccine* **32**, 5490-5495.
- Perez-Giron J.V., Belicha-Villanueva A., Hassan E., Gomez-Medina S., Cruz J.L., Ludtke A., *et al.* (2014). Mucosal polyinosinic-polycytidylic acid improves protection elicited by replicating influenza vaccines via enhanced dendritic cell function and T cell immunity. *J Immunol* **193**, 1324-1332.
- Phelan M.A., Mayner R.E., Bucher D.J., Ennis F.A. (1980). Purification of influenza virus glycoproteins for the preparation and standardization of immunological potency testing reagents. *J Biol Stand* **8**, 233-242.
- Phillips B.M., Hartnagel R.E., Kraus P.J., Tamayo R.P., Fonseca E.H., Kowalski R.L. (1971). Systemic toxicity of polyinosinic acid: polycytidylic acid in rodents and dogs. *Toxicol Appl Pharmacol* **18**, 220-230.
- Philips F.S., Fleisher M., Hamilton L.D., Schwartz M.K., Sternberg S.S. (1971). Polyinosinic-polycytidylic acid toxicity. In R.F.J. Beers & W. Braun (Eds.), *Biological effects of polynucleotides* (pp. 259-280). Springer-Verlag.
- Phoolcharoen W., Dye J.M., Kilbourne J., Piensook K., Pratt W.D., Arntzen C.J., *et al.* (2011). A nonreplicating subunit vaccine protects mice against lethal Ebola virus challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 20695-20700.
- Qu W.M., Miyazaki T., Terada M., Okada K., Mori S., Kanno H., *et al.* (2002). A novel autoimmune pancreatitis model in MRL mice treated with polyinosinic:polycytidylic acid. *Clin Exp Immunol* **129**, 27-34.

- Robinson R.A., DeVita V.T., Levy H.B., Baron S., Hubbard S.P., Levine A.S. (1976). A phase I-II trial of multiple-dose polyribonucleic-polyribocytidylic acid in patients with leukemia or solid tumors. *J Natl Cancer Inst* **57**, 599-602.
- Rodger A. and Norden B. (1997). *Circular Dichroism and Linear Dichroism*. Oxford university press.
- Saito S., Sano K., Suzuki T., Aina A., Taga Y., Ueno T., *et al.* (2019). IgA tetramerization improves target breadth but not peak potency of functionality of anti-influenza virus broadly neutralizing antibody. *PLoS Pathog* **15**, e1007427.
- Sarkar P.K. and Yang J.T. (1965). Optical activity and the conformation of polyinosinic acid and several other polynucleotide complexes. *Biochemistry* **4**, 1238-1244.
- Seya T., Azuma M., Matsumoto M. (2013). Targeting TLR3 with no RIG-I/MDA5 activation is effective in immunotherapy for cancer. *Exp Op Ther Tar* **17**, 533-544.
- Stewart W.E.2nd, de Clercq E. (1974). Relationship of cytotoxicity and interferon-inducing activity of polyribonucleic acid. Polyribocytidylic acid to the molecular weights of the homopolymers. *J Gen Virol* **23**, 83-89.
- Tamura S., Samegai Y., Kurata H., Nagamine T., Aizawa C., Kurata T. (1988). Protection against influenza virus infection by vaccine inoculated intranasally with cholera toxin B subunit. *Vaccine* **6**, 409-413.
- Tamura S., Aina A., Suzuki T., Kurata T., Hasegawa H. (2016). Intranasal inactivated influenza vaccines: a reasonable approach to improve the efficacy of influenza vaccine? *Jpn J Infect Dis* **69**, 165-179.
- Tanimoto T. (2010). Development of intranasal influenza vaccine. *Drug Delivery System* **25**(1), 15-21.
- Tazaki T., Tabata K., Aina A., Ohara Y., Kobayashi S., Ninomiya T., *et al.* (2018). Shape-dependent adjuvanticity of nanoparticle-conjugated RNA adjuvants for intranasal inactivated influenza vaccines. *RSC Advances* **8**, 16527-16536.

- Terauchi Y., Sano K., Aina A., Saito S., Taga Y., Ogawa-Goto K., *et al.* (2018). IgA polymerization contributes to efficient virus neutralization on human upper respiratory mucosa after intranasal inactivated influenza vaccine administration. *Hum Vaccin Immunother* **14**, 1351-1361.
- Thorstensson R., Trollfors B., Al-Tawil N., Jahnmatz M., Bergstrom J., Ljungman M., *et al.* (2014). A phase I clinical study of a live attenuated Bordetella pertussis vaccine-BPZE1; a single centre, double-blind, placebo-controlled, dose-escalating study of BPZE1 given intranasally to healthy adult male volunteers. *PLoS One* **9**, e83449.
- Tobita K. (1975). Permanent canine kidney (MDCK) cells for isolation and plaque assay of influenza B viruses. *Med Microbiol Immunol* **162**, 23-27.
- Torrence P.F. (1981). Preparation of a synthetic polynucleotide interferon inducer. *Methods Enzymol* **78**, 326-331.
- Tytell A.A., Lampson G.P., Field A.K., Nemes M.M., Hilleman M.R. (1970). Influence of size of individual homopolynucleotides on the physical and biological properties of complexed rIn:rCn (poly I:C). *Proc Soc Exp Biol Med* **135**, 917-921.
- van Ginkel F.W., Jackson R.J., Yoshino N., Hagiwara Y., Metzger D.J., Connell T.D., *et al.* (2005). Enterotoxin-based mucosal adjuvants alter antigen trafficking and induce inflammatory responses in the nasal tract. *Infect Immun* **73**, 6892-6902.
- Wang B., Koga K., Osuga Y., Cardenas I., Izumi G., Takamura M., *et al.* (2011). Toll-like receptor-3 ligation-induced indoleamine 2, 3-dioxygenase expression in human trophoblasts. *Endocrinology* **152**, 4984-4992.
- Wang P.F., Fang H., Chen J., Lin S., Liu Y., Xiong X.Y., *et al.* (2014). Polyinosinic-polycytidylic acid has therapeutic effects against cerebral ischemia/reperfusion injury through the downregulation of TLR4 signaling via TLR3. *J Immunol* **192**, 4783-4794.
- Watanabe A., Tatematsu M., Saeki K., Shibata S., Shime H., Yoshimura A., *et al.* (2011). Raftlin is involved in the nucleocapture complex to induce poly(I:C)-mediated TLR3

activation. *J Biol Chem* **286**, 10702-10711.

WHO. (2013). *Guidelines on the nonclinical evaluation of vaccine adjuvants and adjuvanted vaccines*. WHO Press.

Wright R.J., Visness C.M., Calatroni A., Grayson M.H., Gold D.R., Sandel M.T., *et al.*

(2010). Prenatal maternal stress and cord blood innate and adaptive cytokine responses in an inner-city cohort. *Am J Respir Crit Care Med* **182**, 25-33.

Yano J. and Oki T. (1988). *Nucleic acid derivative*. Patent application. JP63-146233.

Yoneyama M., Kikuchi M., Natsukawa T., Shinobu N., Imaizumi T., Miyagishi M., *et al.*

(2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* **5**, 730-737.

神谷 齊ほか：厚生科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業), 総合研究報告書(平成 9 年～ 11 年度), インフルエンザワクチンの効果に関する研究

謝辞

本研究のまとめと論文執筆に際し，多大なるご指導とご助言およびご校閲を賜った北海道大学大学院農学研究院 名誉教授 浅野 行蔵 博士，同教授 曾根 輝雄 博士に対し，心から深く感謝の意を表します．また，論文のご校閲を賜った北海道大学大学院農学研究院 教授 石塚 敏 博士，同教授 園山 慶 博士，青森大学薬学部 特任教授 松本 美佐子 博士に厚く感謝申し上げます．本研究の価値を共有し感染実験を率先牽引頂いた国立感染症研究所 インフルエンザ研究センター長 長谷川 秀樹 博士，国立感染症研究所 感染病理部 部長 鈴木 忠樹 博士，同主任研究官 相内 章 博士に対し，衷心より感謝申し上げます．マウスの毒性試験に際して多大なるご協力をいただいた一般財団法人 生物科学安全研究所 山本 謙 博士，野田 篤 博士，伊藤 雅也 博士，大原 匡史 博士に対し深く感謝申し上げます．また，本研究が目指す事業の方向性とリスクに対して慎重でありながらも研究資金を投じて支えてくださった協和発酵バイオ株式会社の役員の皆様，R & BD 部，旧 開発営業部，営業本部，KYOWA HAKKO Europe GMBH，協和発酵(広東)医薬有限公司 上海分公司の皆様，ならびに本研究の場となった生産技術研究所の諸氏に厚く御礼申し上げます．特に，研究グループ結成当時から熱意をもって難題に取り組んでくれた山村 栄虎 博士，藤田 洋志 博士，優れた技量で実験をサポートしてくれた森田 由美子 さん，長井 友海さん，林田 望さんに心から感謝申し上げます．本研究の遂行には，日本とフランスのワクチン企業のご意見と評価が有益でした．ありがとうございました．

2020 年 3 月 中野 哲郎