

## 研究主論文抄録

論文題目 人工脂質を利用するワクチン開発に資する新技術の開発、並びに高病原性鳥インフルエンザに対するワクチンの開発に関する研究  
(Studies on the development of a new technique contributing to vaccine development using synthetic lipids and on the vaccine development for highly pathogenic avian influenza)

熊本大学大学院自然科学研究科 複合新領域科学専攻 複合ナノ創成科学講座  
(主任指導 伊原博隆 教授)

論文提出者 今村 孝 (Takashi Imamura)

### 主論文要旨

《本文》

全世界において、家畜伝染病については、多くのワクチンが使用されている。ワクチンを使用することで伝染病の発生や発症を抑えることにより、経済的にも公衆衛生上も多くの利益を人類にもたらしている。

ワクチンを開発するためには基礎試験、臨床試験を及び製造販売承認申請のステップを踏むこととなる。各ステップにおいて様々な試験等を行い医薬品として必要とされるデータの収集を行う。

中でも、抗原抗体反応を利用した試験（イムノアッセイ）は、ワクチン開発において必須の試験となる。まずは、開発に移る前の研究段階において、ワクチン候補が動物の体内で防御抗原として働き、防御抗体を産生させることができるかの判断を行う。すでに中和試験法や赤血球凝集阻止（HI）試験等で試験法が確立されたものであればこれらの方法を使用することができるが、新規抗原の場合、新たな抗原抗体反応検出系の構築が必要となる。また、近年では、ワクチン接種による抗体と自然感染による抗体の識別も必要となるワクチンがあるため、識別用検出系も別途開発が必要になる。

第2章では、まず、完全合成脂質を利用した、新規な抗原抗体反応検出系の研究を行った。カチオン性二分子膜 dihexadecyl-dimethylammonium bromide とハプテンである DNPL (N,N'-bis(2,4-dinitrophenyl)-L-lysine)との組み合わせにより、凝集抑制型の抗体の検出法を構築した。次に、膜中へ疎水性抗原を埋め込み抗体を添加し凝集反応を行ったところ、抗原抗体反応に伴い濁りが発生し、凝集型の反応起こすことを確認した。また、生体由来たんぱく質であるアルブミンを抗原とした反応では、抗原及び抗体いずれの検出も可能である

ことを示した。以上の成績より、人工脂質を利用した非常に高感度な新規免疫検出法の構築が可能であることを確認した。

次に、第3章では、人工脂質修飾磁性粒子を用いた新規遺伝子導入法の研究を行った。現在のワクチン開発では、ウイルスそのものを改変した組換えウイルスの作出、ウイルスや細菌の主要免疫原となるたんぱく質の大腸菌や酵母又は動物細胞等による発現、特異抗原を発現させ抗体の確認などを行う等、トランスフェクションを利用した遺伝子組換え技術は必須のものとなっている。本研究では、磁性粒子の界面修飾剤（カチオンポリマー）のDNAトランスフェクション効率に及ぼす影響について検討した。トランスフェクション効率はアルキル側鎖の長さに影響を受け、より長い側鎖ほど効率は上昇した（C6>C4>C2 $\geq$ C1）。またN/P比（Mag-VPCm22の窒素（N）濃度とプラスミドDNA（7854 bp）のリン酸基濃度（P）の比）が大きくなるほど、トランスフェクション効率は上昇するものの、細胞へのダメージも大きくなることを確認した。更に、マグネットを用いることでより効率は上昇した。以上の結果より、磁性粒子を人工脂質で修飾することで、より高効率で細胞への影響の少ないマグネトフェクション法が構築可能であることが示唆された。

第4章では、流行している株に近いウイルスを使用した鶏用インフルエンザワクチンの開発における、安全性及び有効性に関する報告を行った。ワクチンは実験室内のみならず野外農場で使用した場合においても副作用を示さず、かつ1回注射においても鳥インフルエンザの防御に必要な抗体価を惹起しうる有用なワクチンであることを確認した。

本研究で実施した人工脂質を利用した凝集反応の系は簡便で高感度な系である為、更なる研究により新規な抗体検出系の応用が期待される。また、インフルエンザワクチンは、抗原性の変化が激しいウイルスとして知られている。そのため、流行株の抗原性とワクチン株で誘導される抗体の反応性は常にモニタリングする必要がある。この作業を効率良く行うためには、本研究において開発した抗原抗体検出系やマグネトフェクションの応用が有用な手段になるものと考えられる。

今回の研究の成果がワクチンの開発の効率化に寄与し、より短い期間で有用なワクチンの開発に繋がることを願う。