

158. 微粒子イメージングに基づくナノ経皮ワクチンの開発

吉岡 靖雄

Key words : イメージング, 動態, ナノ粒子

*大阪大学 大学院薬学研究科
毒性学分野

緒 言

新型インフルエンザパンデミックでも明らかなように, 新興・再興感染症は, ヒトの健康維持における圧倒的脅威であり, WHO がワクチンによる感染予防が最重要課題であることを宣言するなど, 種々の感染症に対するワクチンの新規開発やその増産が国際的に推進されている. 我々は, 少なくとも一次元の大きさが 100 nm 以下に制御された素材であるナノ粒子の安全性確保を目指し, その物性と体内局在との関連情報を収集してきた. その過程で, ナノ粒子の一つである非晶質ナノシリカを抗原キャリアとして適用することで, 1) 樹状細胞における抗原提示経路に影響を与えること, 2) 抗原と共に経皮投与後, 抗原単独免疫と比較して, 高い免疫応答を誘導可能であったことから, ナノシリカが抗原キャリアとして有用である可能性を明らかとした. そこで本研究では, ナノマテリアルを抗原キャリアとして用いたワクチン開発を最終目標に, 体内・細胞内動態の基礎情報を収集した. 特に, 粒子径の異なる非晶質シリカを用い, 1 粒子の細胞内動態をライブイメージング解析した. さらに, 皮内投与後のリンパ節への移行性を評価した.

方 法

1. 細胞内における 1 粒子の動態観察

ガラスボトムの dish に播種した A549 細胞に赤色蛍光修飾された非晶質シリカ (粒子径 70 nm, 300 nm, 1,000 nm : 各々 nSP70, nSP300, mSP1000 と略す) を加え, 3 時間培養した. 培養上清を除去し, シリカを含まない培地条件下で, 斜光照明顕微鏡により観察した. 取得したシリカ粒子の細胞内挙動の動画データを Image J を用いて解析した. シリカの運動性評価に関しては, 300 枚の連続写真からなる動画のうち, 3 秒以上粒子が追跡できた粒子のみを解析に使用し, 粒子の運動範囲の広がり, 拡散係数, 能動運動の速度を算出した.

2. リンパ節への移行性評価

クエン酸で表面保護された粒子径 10, 50, 100 nm の銀ナノ粒 (nAg10, nAg50, nAg100) を用いた. 9-10 週齢の BALB/c マウスに, 各ナノ粒子 (0.8 mg metal/mouse) を右耳介へ皮内投与した. 投与の 24 時間, 48 時間, 96 時間後に, 所属リンパ節を回収した. リンパ節に 1 mL の硝酸と 1 mL の過酸化水素水を加え, その後, マイクロウェーブ分解によりサンプルを均一な溶液とした. これを純水にて 10 mL に希釈し, 約 10% 程度の希硝酸溶液とした. その後, ICP-MS により銀量を定量した.

3. 統計解析

個々の実験ごとに, 溶媒感作群等のコントロールと多重比較検定 (Dunnett 法) を行うことにより, サンプル感作群等の統計学的有意差を検定した. なお, 解析ソフト (エクセル統計 2012, SSRI) を用い, 統計学的有意差は $p < 0.05$ の場合を有意であるとした.

結果

1. 細胞内における1粒子の動態解析

まず、細胞内に移行した非晶質シリカ粒子の挙動を捉えることを目的に、薄層斜光照明顕微鏡により、細胞内のシリカ粒子を経時的に観察した。サンプルとしてナノサイズの nSP70, サブミクロンサイズの nSP300, mSP1000 を用いた。その結果、nSP300, mSP1000 添加群では、細胞内において1点で揺れ動く粒子が多数認められ、細胞内を大きく運動する粒子はほとんど認められなかった (Fig. 1a)。一方で、nSP70 添加群では、細胞内を大きく一方向に運動する粒子が存在するなど、様々な挙動が認められた (Fig. 1a)。このことから、ナノ粒子はサブミクロンサイズの粒子と比べ、細胞内における粒子の運動性が大きく異なる可能性が見出された。

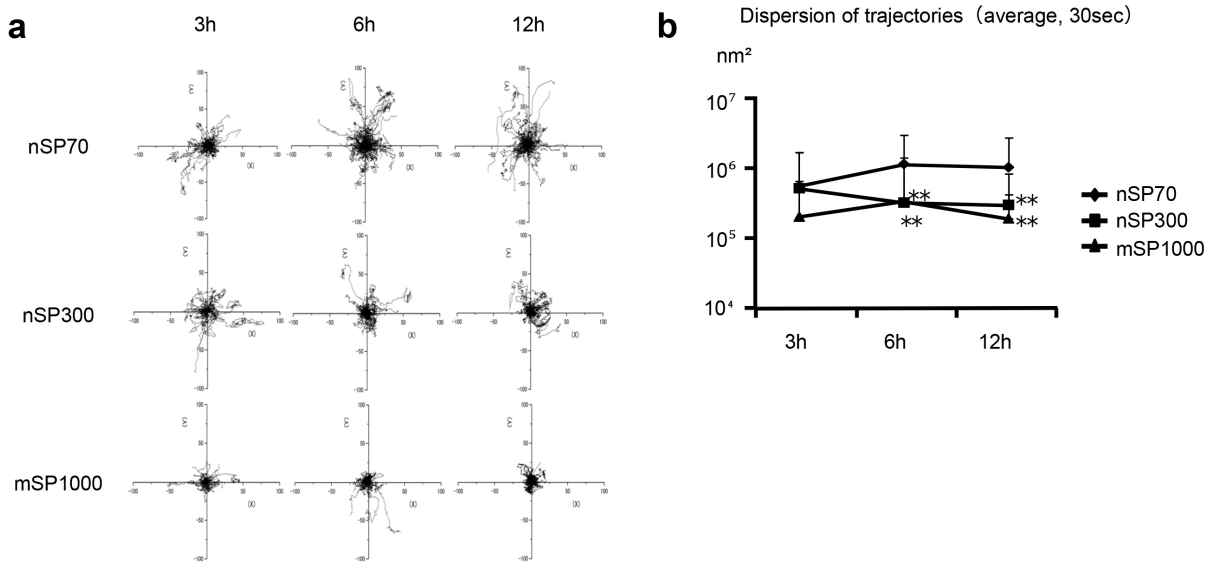


Fig. 1. Trajectories of the intracellular movement of silica particles in 30 second.

The trajectories of particle tracking by HILO. a) the dispersion of the trajectories of the particle tracking in 30 second. b) Average.

次に、細胞内に存在するシリカ粒子の運動性の違いを定量的に評価する目的で、観察により得られた粒子の挙動の軌跡から、単位時間当たりの最高到達距離を算出した (Fig. 1b)。その結果、粒子径が増加するにつれ、細胞内における粒子の最高到達距離が短くなることが示された。一般的に、細胞内における分子・粒子の運動は、エネルギー非依存的な拡散運動と、モーター蛋白質によるエネルギー依存的な能動的運動の2つの運動成分により構成されている。そこで、2つの運動成分が粒子の運動に与える影響を定量的に評価する目的で、拡散運動による運動性の指標である拡散係数と、能動的運動の指標である方向指向性の運動速度を算出した (Fig. 2)。その結果、いずれの粒子径においても、能動運動の指標である方向指向性の運動速度が認められ、能動的な運動を行っている粒子の存在が示唆された。さらに、ナノ粒子 (nSP70) はサブミクロンサイズの粒子 (nSP300, mSP1000) と比べ、拡散運動/能動的運動のいずれにおいても高い運動性を示すことが見出された。すなわち、ナノ粒子の細胞内挙動には、従来のサブミクロンサイズの粒子と異なるナノサイズ特異的な輸送経路が関与している可能性が考えられた。

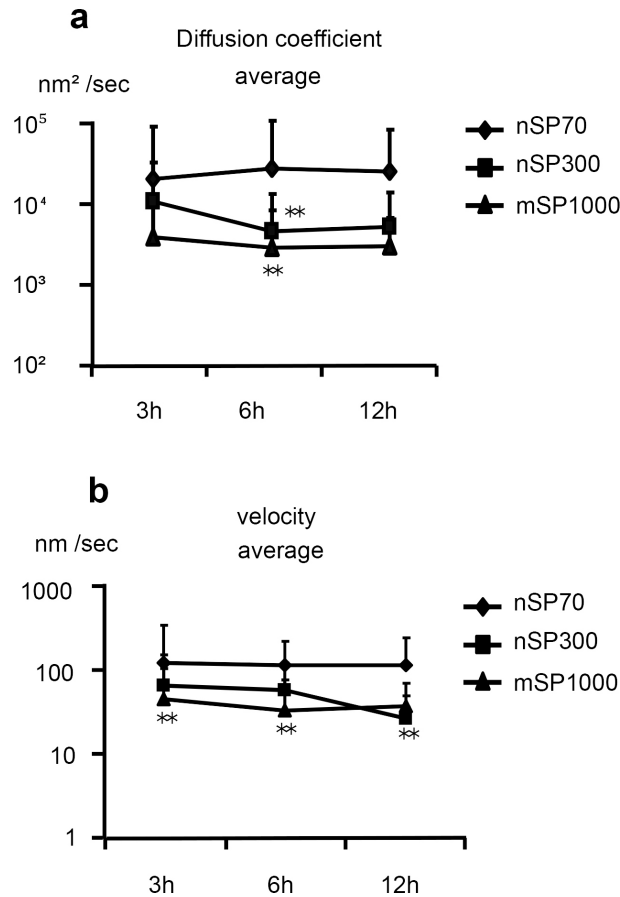


Fig. 2. Diffusion coefficient and velocity (bias movement) of the intracellular movement of silica particles.

The diffusion coefficient of intracellular movements of silica particles (a) and the velocity of intracellular bias movements of silica particles (b).

細胞内における粒子の挙動の制御機構など、ナノ粒子の詳細な細胞内動態は不明であるものの、粒子はエンドサイトーシスにより、エンドソームなどの小胞に内包された状態で細胞内に移行することは広く知られている。そこで、エンドソームが粒子の細胞内取り込み機構の中心を担うことを鑑み、エンドソームへの内包が nSP70 の細胞内挙動に与える影響の評価を試みた。まず、エンドソームなどの小胞に内包されていない状態における粒子の運動性を評価する目的で、エンドソームなどの酸性小胞をクロロキンにより破壊した際の運動性を解析した。クロロキンと nSP70 を同時に 3 時間作用させ、その後、クロロキンおよび nSP70 を培地中より除き、粒子添加開始より 6 時間後にその挙動を観察した。その結果、クロロキン添加群において、最高到達距離、方向指向性の運動速度の顕著な低下が認められた。さらに、エンドソームとシリカ粒子の挙動を同時に観察することにより、エンドソーム内外に存在する nSP70 の挙動をそれぞれ分類、解析した。その結果、エンドソーム内に存在すると考えられる粒子は、エンドソーム外に存在すると考えられる粒子と比べ、拡散係数に大きな差がない一方で、方向指向性の運動速度が高い傾向が見出された。これらの結果から、nSP70 が細胞内において能動的に運動するうえで、エンドソームへの内包が重要である可能性が見出された。一方で、エンドソームを破壊した際やエンドソーム外の粒子の挙動を追跡した際においても、能動的な運動を示す粒子が存在し、エンドソーム非依存的な細胞内輸送経路も存在する可能性が認められた。

2. ナノ粒子のリンパ節移行能評価

次に、ナノ粒子を皮内投与後のリンパ節移行能を評価することで、抗原・アジュバント送達キャリアとしての特性を評価した。上記と同様にシリカ粒子を用いようとしたものの、シリカは高感度な定量法が存在しないため、ここでは銀ナノ粒子を用いた。粒子径 10, 50, 100 nm の銀ナノ粒子を皮内投与し、経日的にリンパ節内の銀量を ICP-MS を用いて

定量解析した。その結果、所属リンパ節における銀量は、銀ナノ粒子の粒子径が小さいほど、多くなることが示された (Fig. 3)。

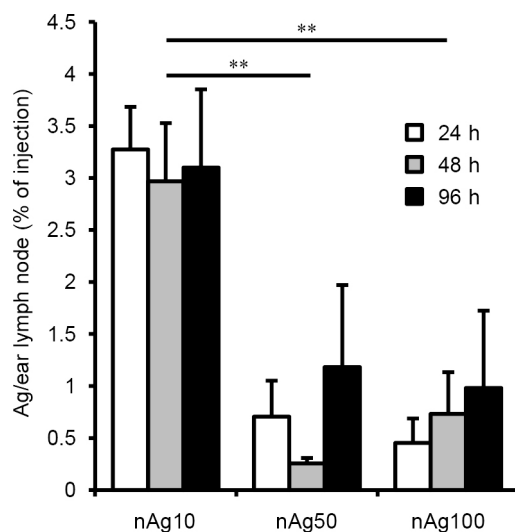


Fig. 3. Silver amount of Ag nanoparticles.

Silver amount of ear lymph nodes were quantitatively determined by ICP-MS up to 96 h post intradermal injection on ear with each size of nAgs. Data are means \pm SEMs (n=5). *p < 0.05, **p < 0.01. Veh: Vehicle.

以上の結果から、抗原やアジュバントの送達キャリアとして用いる場合、より小さなサイズのナノ粒子を用いることが有用である可能性が示された。今後は、リンパ節中のどの細胞に取り込まれたかを解析する必要があると考えられる。

考 察

本研究では、ナノ粒子をワクチンキャリアとして適用することを想定し、体内・細胞内動態をイメージング技術などを駆使し解析した。その結果、ナノ粒子は細胞内においてサブミクロンサイズ以上の粒子よりも高い運動性を示すと共に、それらの高い運動性にはエンドソームなどの細胞内輸送小胞の運動が関わっている可能性が示された。しかし、一部の粒子はエンドソーム非依存的に細胞内を運動することから、エンドソーム非依存的な能動輸送経路も存在しているものと考えられる。従って、本結果は、細胞内にエンドソーム依存的/非依存的かつナノサイズ特異的な細胞内輸送機構が存在している可能性を示す非常に興味深い知見であると言える。また、粒子径の違いにより、リンパ節への移行性が異なること、小さなナノ粒子ほど、リンパ節に移行しやすいことが示された。今後、リンパ節中での取り込み細胞の同定が必須であるものの、これら体内・細胞内動態情報とワクチン効果の連関を評価していくことが、ワクチンキャリアの開発に必要不可欠であると考えられた。

文 献

- 1) Yamashita, K., Yoshioka, Y., Higashisaka, K., Mimura, K., Morishita, Y., Nozaki, M., Yoshida, T., Ogura, T., Nabeshi, H., Nagano, K., Abe, Y., Kamada, H., Monobe, Y., Imazawa, T., Aoshima, H., Shishido, K., Kawai, Y., Mayumi, T., Tsunoda, S., Itoh, N., Yoshikawa, T., Yanagihara, I., Saito, S. & Tsutsumi, Y. : Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice. *Nat. Nanotechnol.*, **6** : 321-328, 2011.