

Title	ムラミルジペプチド誘導体 B30-MDPのピロソームワク チンへの応用に関する物理化学的研究
Author(s)	安藤, 秀一
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/39572">https://hdl.handle.net/11094/39572</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていない ため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利 用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文につい て <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	安 藤 秀 一
博士の専攻分野の名称	博 士 ( 薬 学 )
学 位 記 番 号	第 1 2 2 5 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 8 年 2 月 2 2 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 名	ムラミルジペプチド誘導體 B30 - MDP のピロソームワクチンへの応用に関する物理化学的研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 真 弓 忠 範 (副査) 教 授 馬 場 明 道 教 授 大 森 秀 信 教 授 西 原 力

### 論 文 内 容 の 要 旨

ムラミルジペプチド (MDP) 誘導體 6-O-(2-tetradecylhexadecanoyl)-N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (B30-MDP) は、アジュバント活性を有し、発熱等の毒性が低いことから、ワクチンアジュバントとして、低活性ワクチンへの適用が期待されている物質である。そして、Nerome et al. は、B30-MDP を含有したリポソームの膜に、インフルエンザ Hemagglutinin (HA) 抗原が突き刺さった形のインフルエンザウイルスを膜做した形態をとるピロソームワクチンを調製し、このピロソームワクチンに有効性が期待できる免疫増強能があることを報告した。さらに、Kaji et al. は、このピロソームを用いて臨床試験を行い、本ワクチンが現行のエーテル処理 HA ワクチンに比べ、優れた H1 抗体産生効果を有すること、および副作用の発生頻度は若干高いもののヒトに適用可能な範囲で有ることを報告し、B30-MDP ピロソームワクチンの有効性と安全性が確認され、実用化への期待が得られた。

有効性と安全性と同様にピロソームワクチンの実用化において重要な項目として、ピロソーム製剤としての処方設計、製造法の確立および品質の確保が挙げられる。そこで、本研究においては、B30-MDP のベシクル形成能の評価および安定性評価を中心に検討を実施し、ピロソーム製剤の処方設計、製造法および品質の確保に関する物理化学的性質の把握を試みた。

検討の結果、B30-MDP は緩衝液中において、単独で膜を形成することが明らかになった。このとき緩衝液中の塩の存在により、B30-MDP のカルボキシル基の解離に基づく影響が低下して、ベシクル膜を形成したと考えられた。また、B30-MDP 膜の流動性は、疎水性相互作用よりも親水基同士の分子間水素結合に基づく相互作用により制御されていると考えられた。B30-MDP ベシクルにおいて、B30-MDP にコレステロールを添加した場合、コレステロールは B30-MDP 膜に均一に分散し、膜流動性を低下させると考えられた。また、コレステロールは B30-MDP の疎水基の近傍に局在することにより、B30-MDP に依存したベシクル膜表面の電位にほとんど影響を及ぼさなかった。一方、B30-MDP にリン脂質を添加した場合、B30-MDP とリン脂質は相分離を示すことが明らかになった。

次に、B30-MDP の化学的安定性に関する検討を行った。その結果、B30-MDP は、ベシクル形態および混合ミセ

ルいずれにおいても、擬1次反応に従って分解することが確認され、B30-MDPの親水基であるMDP部分が加水分解していると考えられた。そして、B30-MDPの安定性はベシクルを形成した場合に高く、OGによりベシクル膜の流動性が増加するとともに低下した。また、OGによるB30-MDPのミセルからベシクルへの転移は、粒子径および膜流動性から把握できることを明らかにした。B30-MDPとリン脂質またはコレステロールとの混合ベシクル中におけるB30-MDPの分解速度定数( $k_{obs}$ )値は、コレステロールの濃度増加に伴って増加したが、リン脂質添加の影響は受けなかった。そこで、コレステロールまたはリン脂質を含んだB30-MDP混合ベシクルについて、粒子径測定および膜流動性測定等の物理化学的性質について検討を行い、B30-MDPの化学的安定性に影響を与える因子を把握することを試みた結果、B30-MDP/コレステロール混合ベシクルにおいては、膜流動性変化は $k_{obs}$ 値に影響を及ぼさなかったが、粒子径の増加により $k_{obs}$ 値は増加した。一方、B30-MDP/リン脂質混合ベシクルにおいては、膜流動性および粒子径変化は、いずれも $k_{obs}$ 値に影響を及ぼさないことが明らかとなった。B30-MDPにコレステロールを添加した場合、コレステロールはB30-MDPと均一に混合することで、MDP同士の相互作用を抑制し、MDP部分に対する水の接触頻度を増加させることで、B30-MDPの $k_{obs}$ 値が増加したと考えられた。一方、B30-MDPにリン脂質を添加した場合は、相分離が生じるため、MDP同士の相互作用が維持されて、MDP部分に対する水の接触頻度が変化せず $k_{obs}$ 値に影響を及ぼさなかったと考えられた。したがって、B30-MDPの親水基であるMDP部分同士の相互作用は、膜物性およびB30-MDPの化学的安定性に対して重要な役割を果たしていると考えられた。

次に、ビロソーム製剤の製造方法を確立するために、界面活性剤除去法による製造条件の把握を試みた。その結果、Hemagglutinin-neuraminidase (HANA)、B30-MDPおよびコレステロールからなるビロソームワクチンを調製する場合、透析時のB30-MDPの初期濃度がビロソームの形態に対して影響を与えることが明らかになった。そこで、粒子径および膜流動性変化から、HANA抗原のミセル-ロゼット転移とB30-MDP/コレステロールのミセルベシクル転移を把握した結果、透析開始時のB30-MDPの初期濃度により、それぞれの転移時のOG濃度が異なることが明らかになった。したがって、ビロソームの調製のためには、HANA抗原のミセル-ロゼット転移とB30-MDP/コレステロールのミセルベシクル転移を把握して、それぞれの転移が一致するように、透析開始時のB30-MDPの初期濃度を設定することが重要であると考えられた。

本研究により得られた知見は、B30-MDPを用いたビロソームワクチン製剤の処方設計、製造方法および品質の確保に関して、膜流動性および粒子径等の物理化学的性質の把握が重要であることを示したものである。また、これらの研究成果を基礎として、インフルエンザだけでなく、他のエンベロープウイルスが原因となる感染症のワクチンに、ビロソームワクチンが応用されることが期待される。

## 論文審査の結果の要旨

ワクチンの免疫効果を高めるための有効な方法の一つとして、古くからアジュバントの添加が考えられてきた。一方、近年リポソームがインフルエンザHA抗原を膜に保持できる事を応用して、インフルエンザウイルスを模倣したリポソーム(ビロソーム)が考案され、インフルエンザウイルス等のエンベロープウイルスに対するワクチンとして、このビロソームの形態が免疫効果を高めることが報告された。しかしながら、本アジュバント効果は有効性においてはまだ不十分であった。そこで著者の共同研究者らは、更なる免疫増強を図るべくムラミルジペプチド(MDP)に2本鎖のアルキル基を結合させたB30-MDPを用いてインフルエンザビロソームワクチンを調製し、顕著な効果を得ることに成功した。

そこで著者は本ビロソームワクチンの実用化に向けて、ビロソーム製剤としての処方設計、製造法の確立および品質の確保のために不可欠な物理化学的諸性質を明らかにすべく種々検討を行った。さらにビロソーム製剤の製造法としては、抗原の安定性を考慮して、加熱処理や有機溶媒を必要としない界面活性剤除去法が最適と考えられることから、判明した物理化学的諸性質をもとに、最適製造条件の検討を行った。

その結果、以下の知見が得られた。1) B30-MDP はベシクル形成能を有しているがその膜流動性は低く、この原因は親水基の水素結合に基づくものである。2) B30-MDP のベシクル膜は、コレステロールの添加によりパッキングが向上して膜流動性が低下した。リン脂質を添加すると、リン脂質の相状態に依存した膜流動性の上昇が判明した。3) ベシクル形態における B30-MDP の化学的安定性に対するオクチルグルコシド、コレステロールおよびリン脂質の影響を検討した結果、膜物性および化学的安定性に B30-MDP の親水基の相互作用が重要な役割を果たしていることが判明した。4) ビロソーム製剤の製造法として、HANA 抗原のミセル-ロゼット転移と B30-MDP/コレステロールのミセル-ベシクル転移が一致するように、透析開始時の B30-MDP 濃度を設定することが重要であることを明らかにした。

以上の成果は、一つインフルエンザだけに留まらず、他のエンベロープウイルスについても、原因となる感染症のワクチンにビロソームが広く応用される際に重要な指標を与えるものであり、博士（薬学）の学位を授与するにふさわしいものとする。