

氏 名	お だ けん じ 小 田 健 司
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	論 薬 博 第 720 号
学位授与の日付	平 成 16 年 9 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	ワ ク チ ン ア ジ ュ バ ン ト の 構 造 活 性 相 関 に 関 す る 研 究

論文調査委員 (主 査)
教授 河 合 明 彦 教授 川 寄 敏 祐 教授 本 多 義 昭

論 文 内 容 の 要 旨

ワクチンの免疫賦活能の増強を目的として添加される物質をアジュバントと総称する。アジュバントとして、アルミニウムゲル、ムラミルジペプチド、あるいはサポニンなど多種類の物質が報告されている。アジュバントをワクチンへ添加することで、少ない抗原量でも十分な免疫応答が誘導されることをはじめ、アジュバントの種類によっては免疫応答のクラススイッチや、抗体産生の持続も可能である。現在ヒト用ワクチンのアジュバントとしてアルミニウムゲルの使用が認められており、インフルエンザワクチンや破傷風トキソイドワクチンをはじめとする不活化ワクチンで使用実績がある。しかし、その他のアジュバントについては、注射部位での炎症反応や残留等の問題があり、実験用もしくは動物用ワクチンアジュバントとしてのみ用いられ、使用上の制限がある。さらに、アジュバントの化学構造が複雑であることや、高純度サンプルの入手が困難であることを背景として、構造活性相関についての基礎研究は立ち遅れており、数種類のアジュバントについての構造活性相関は報告されているものの、今だ不明な点が多い。従って、今後のワクチン開発においてもアジュバントの開発、研究は不可欠である。

本研究では天然物質と化学合成物質の2種類の糖鎖アジュバントに焦点をあてて、それぞれ構造活性相関を検討した。サポニンについては、化学構造の異なる47サンプルを収集し、アジュバント活性と化学構造との関係を調べた。また、新規アジュバント物質として化学合成されたオリゴ糖脂肪酸エステルについても、その構造の解明とアジュバントとしての性質について検討した。

第1章 サポニンのアジュバント活性と化学構造との関係

生薬や食物原料より、アグリコン骨格、糖鎖の種類、及び官能基に基づいて構造的に異なる合計47種類の精製サポニンを収集し、抗原としての卵白アルブミン(以下OVA)とともに免疫原としてマウスに1回筋肉内注射し、そのアジュバントとしての性能を比較検討した。抗原感作4週後にOVAに対する血清抗体価を受身赤血球凝集反応にて測定した。また個々の精製サポニンの溶血活性をヒツジ赤血球を用いて測定した。得られた結果について、化学構造、抗体価、及び溶血活性との関連性を比較したところ、以下の関係が見い出された。

- 1) アジュバント活性に糖鎖の存在が必須である
- 2) 糖鎖が直鎖・分枝鎖のどちらでもアジュバント活性を示す
- 3) アグリコン骨格の構造はアジュバント活性には無関係である
- 4) アルデヒド基及びアシル基の存在はアジュバント活性には無関係である
- 5) アジュバント活性と溶血活性とは相関しない

この結果から、アジュバント活性と溶血活性とが相関しないことから、溶血活性の低い低毒性のサポニンの中からアジュバント活性の高いものを選ぶことができるようになることが示唆された。また、サポニンが高アジュバント活性を示すためには、アグリコン骨格や結合する官能基の種類ではなく、アグリコン分子と糖鎖より成る両親媒性構造が重要であることが示唆された。そこで、サポニンのアジュバント活性と糖鎖との関係について、次の章でさらに詳細に調べた。

第2章 サポニンのアジュバント活性と両親媒性構造との相関性

Soyasaponin 類のアジュバント活性と、分子内の親水基と疎水基の数量的バランスとして hydrophile-lipophile balance (以下 HLB) 値とを比較した。免疫原の調製方法、試験動物、及び免疫期間は前章に準じて行い、血清中マウス抗 OVA 抗体価を ELISA 法で測定した。その結果、HLB 値が高い、すなわち糖鎖が長い、構成糖数が多いほど、高アジュバント活性を示すことが示された。また、soyasaponin 類は IgG1 抗体を主体に賦活することが分かった。Soyasaponin 類は食用マメ類に含有されるサポニンであり、原料の入手が容易な点や食用としての安全性の実績から、こうしたサポニンは高活性かつ安全なワクチンアジュバントとして実用化が期待される。

第3章 オリゴ糖脂肪酸エステルの合成とアジュバントとしての性状

前章での結果を基にして、人工的な糖鎖アジュバントを化学合成して、その化学構造とアジュバント活性との関連性について調べた。アジュバント活性は前章と同様の方法で調べ、マウスでの抗 OVA 抗体価を元に活性分画を追跡し、評価した。本章では特に、マンニトールとオレイン酸のエステル反応生成物から得られたアジュバント活性分画について詳細に調べた。その結果、この活性分画は平均分子量2850、脂肪酸/単糖比がおよそ0.8のオリゴ糖脂肪酸エステルであることが判明した。また、このエステルは IgG1 及び IgG2a 抗体の双方の産生を賦活すると共に、マウス腹腔内注射では低毒性であることが確認された。なお、現在オリゴ糖脂肪酸エステルの高収率な合成法の確立が未解決であるが、今後この点が解決されれば、水系分散型アジュバントあるいは油性アジュバントの乳化補助剤としての実用化が期待される。

以上、本研究では天然物質(サポニン)および化学合成物質(オリゴ糖脂肪酸エステルの2種類の物質について行った解析の結果から、アジュバント活性には両親媒性構造が必須であることが明らかとなった。サポニンは糖鎖が長い時に、またオリゴ糖脂肪酸エステルは脂肪酸/単糖比がおよそ0.8の時に高いアジュバント活性を示すことが明らかとなり、今後の糖鎖アジュバントの基礎研究のみならず実用化にも有用な知見を与えるものである。

論文審査の結果の要旨

ワクチンの免疫賦活能を増強する目的で添加される物質(アジュバント)にはアルミニウムゲル、ムラミルジペプチド、サポニンなど多種類の物質があり、いずれかをワクチンへ添加することで、少ない抗原量でも十分な免疫応答が誘導され、またアジュバントの種類によっては免疫応答のクラススイッチ作用や、抗体産生の持続効果も見られる。現在ヒト用ワクチンのアジュバントとしてアルミニウムゲルのみ使用が認められており、インフルエンザワクチンや破傷風トキソイドワクチンをはじめとする不活化ワクチンで使用実績がある。しかし、その他のアジュバントについては、接種部位での炎症反応や残留等の問題があり、使用上の制限がある。さらに、アジュバントの化学構造が複雑であることや、高純度サンプルの入手が困難であることなどにより、構造活性相関についての基礎研究は立ち遅れており、数種類のアジュバントについて構造活性相関の報告があるが、今だ不明な点が多い。従って、今後のワクチン開発のためにもアジュバントの開発、研究が不可欠である。そこで著者は天然物質および化学合成物質の2種類の糖鎖アジュバントに焦点をあてて、構造活性相関を検討した。

まず、第1章では生薬や食物原料より、アグリコン骨格、糖鎖の種類、及び官能基に基づいて構造的に異なる合計47種類の精製サポニンを収集し、アジュバント活性と化学構造との関係を調べた。サポニンを卵白アルブミン抗原(以下 OVA)とともに免疫原としてマウスに1回筋肉内注射し、抗原感作4週後に採血し、受身赤血球凝集反応により OVA に対する血清抗体価を測定し、アジュバントとしての性能を比較検討した。また、溶血活性はヒツジ赤血球を用いて調べた。その結果、化学構造、抗体価、及び溶血活性との関連性について、以下の関係が見い出された。即ち、1)アジュバント活性に糖鎖の存在が必須である、2)糖鎖が直鎖・分枝鎖のどちらでもアジュバント活性を示す、3)アグリコン骨格の構造はアジュバント活性には無関係である、4)アルデヒド基及びアシル基の存在はアジュバント活性には無関係である、5)アジュバント活性と溶血活性とは相関しない。以上のように、アジュバント活性と溶血活性とが相関しないことから、溶血活性の低い低毒性のサポニンからアジュバント活性のより高いものを開発する可能性が示唆された。

次にサポニンが高いアジュバント活性を示すには、アグリコン骨格や結合する官能基の種類ではなく、アグリコン分子と糖鎖より成る両親媒性構造が重要であることが示唆されたことから、第2章ではサポニンのアジュバント活性と糖鎖との関係について、さらに詳細に調べた。まず、soyasaponin 類の分子内の親水基と疎水基の数量的バランスとして hydrophile-

lipophile balance (以下 HLB) 値とアジュバント活性とを比較した。前章に準じて感作を行い、得られた血清中マウス抗 OVA 抗体価を ELISA 法で測定した。その結果、調べた soyasaponin 類の HLB 値は $-1.6\sim 26.9$ の範囲内にあり、HLB 値が高いほど、すなわち糖鎖が長く、構成糖数が多いほど、高いアジュバント活性が示された。また、soyasaponin 類は IgG1 抗体を主体に賦活することが示された。以上から、soyasaponin 類は食用マメ類に含まれるサポニンで、原料の入手が容易であり、高活性かつ安全なワクチンアジュバントとして実用化が期待される。

次に前章で得られた結果を参考に、人工的な糖鎖アジュバントを化学合成し、化学構造とアジュバント活性との関連性の検討を試みた。種々合成品のいろいろの分画についてマウスを感作し抗 OVA 抗体価を元にアジュバント活性の高い分画を追跡した結果、特に、マンニトールとオレイン酸のエステル反応生成物に高いアジュバント活性分画が見出された。この分画について詳細に調べた結果、平均分子量2850、脂肪酸/単糖比がおよそ0.8のオリゴ糖脂肪酸エステルで、マウス腹腔内注射では毒性が低く IgG1 及び IgG2a 抗体の双方の産生を賦活することが確認された。今後、オリゴ糖脂肪酸エステルの高収率な合成法を確立することにより、水系分散型アジュバントあるいは油性アジュバントの乳化補助剤としての実用化が期待される。

以上、本研究は天然物質(サポニン)および化学合成したオリゴ糖脂肪酸エステルについて、アジュバント活性としての構造活性相関を検討し、以下の知見を得た。サポニンには毒性が低くアジュバント活性の高いものがあり、それにはアグリコン骨格へ直鎖・分枝鎖のいずれかの糖鎖が結合した両親媒性構造が必須であること、またソヤサポニンの場合 HLB 値は $-1.6\sim 26.9$ の範囲内で、HLB 値が高いほどアジュバント活性が高いことが示された。また、マンニトールとオレイン酸のエステル反応生成物から平均分子量2850、分子内の脂肪酸数/単糖数比がおよそ0.8の低毒性で高いアジュバント活性を示す高いオリゴ糖脂肪酸エステルが得られ、IgG1 及び IgG2a 抗体の双方の産生を賦活することが確認された。以上の成果は、糖鎖を有するアジュバントの基礎研究のみならず、今後の実用化にも有用な知見を与えるものである。

よって、本論文は博士(薬学)の論文として価値あるものと認められる。

更に、平成16年9月9日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。