

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 613 号	学位申請者	烏飼 祐介
審査委員	主査	原 博満	学位 博士 (医学) 歯学・学術)
	副査	山下 勝	副査 郡山 千早
	副査	西 順一郎	副査 宮田 篤郎
<p>主査および副査の5名は、令和3年5月27日、学位申請者 烏飼 祐介 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問 1) 臨床応用は結晶セルロースキャリアなのか。また、本研究で使用したデバイスとは異なるものか。 (回答) 結晶セルロースキャリアを使用している。デバイスは本研究で使用したものと異なり、ヒト用に設計しているものである。</p> <p>質問 2) トレハロースをコントロールとして使用しているが、乳糖などは使っていないのか。 (回答) 乳糖もコントロールとして使用しており、結果が変わらないことを確認している。</p> <p>質問 3) 噴射特性評価では、どのような向きで噴射しているか。実際に噴射する時は横向きであり、重力による影響はないか。 (回答) 垂直に真上を向けて測定しているが、本噴射評価条件での噴射角及び Spray Pattern は、横向きでも変化がみられないことを確認している。</p> <p>質問 4) 液剤の噴射時の粒子径はどうなっているのか。 (回答) 噴射時の粒子径は2次粒子径と呼ぶが、本実験では測定していない。</p> <p>質問 5) サル鼻腔モデルで粘液等は考慮しているのか。 (回答) 粘液に関しては人工鼻汁が存在しなかったため、粘性のある人工唾液(サリベート)を事前にモデル内に噴霧して実験している。</p> <p>質問 6) 鼻腔モデルでの液剤分布と MEMRI での液剤分布に乖離があるようにみえるがどうか。 (回答) MEMRI ではシグナルが低いものの小鼻道にも分布がみられている。シグナル強度に違いがみられた要因として MRI の検出感度が考えられる。</p> <p>質問 7) MEMRI では結晶セルロース製剤で投与後3時間でも強いシグナルがみられているのはキャリアが残っているのではなく、粒子の形態を失い、マンガがマクロファージ等に取り込まれ、細胞内のシグナルをみているのではないか。サッカリンテストでは下鼻道にドロップするが、10分程度でほとんどがクリアランスされる。この結果と大きく異なる。 (回答) 下鼻道では線毛が発達しており、これが鼻腔内クリアランスの主役となる。鼻腔上部は線毛が少ないため、今回の結果のように鼻腔上部にキャリアが局在していると考えている。ただし、マンガが粘膜にあるのか細胞内に取り込まれているのかは確認できていない。</p> <p>質問 8) 免疫応答については下気道の考察も加えた方がいいかと思う。 (回答) 肺へは、粒子径で 5 μm 以下のものが移行すると言われており、今回使用したものは粒子径が 20 μm であることから肺における免疫応答は考えていない。しかし、MEMRI 等で確認する価値はあると考えられる。</p> <p>質問 9) セルロースは鼻腔に投与された後、どうなるのか。 (回答) 不溶性のセルロースであり、線毛クリアランスにより鼻腔から胃へ排泄される。</p> <p>質問 10) トレハロース製剤の SEM 画像ではセルロース製剤と比較して細かい粒子がみられるが、Dv50 (粒子径中央値) では、全ての製剤で概ね同じ径 (約 20 μm) を示しているのはなぜか。 (回答) 各製剤にはいろんなサイズの粒子が存在する。その中において、一番多い粒子径が約 20 μm であったという結果である。</p> <p>質問 11) 結晶セルロース製剤は扁桃まで分布するのか。扁桃に届かないのであれば、NALT がある小児だけに有効で大人では効かないということになる。 (回答) MEMRI 画像では扁桃への分布は定かではないが、別途、蛍光標識 OVA を用いた検討で投与後 30 分及び 3 時間において扁桃での抗原の局在を確認している。</p> <p>質問 12) サル免疫原性試験で、投与前に抗 OVA 抗体を示す個体はいるのか。 (回答) いない。稀に非特異的に示すものがみられるが、そういった個体は実験から外している。</p> <p>質問 13) IgA 抗体は分泌型抗体を測定しているのか。 (回答) 資料に示している抗体価は全て分泌型ではなく、通常の IgA である。別途、SC 抗体 (分泌型) を用いたバリデーションを実施しており、鼻腔洗浄液中の分泌型 IgA と通常の IgA が相関することを確認している。</p> <p>質問 14) 結晶セルロース製剤で高い滞留性がみられたことから免疫原性試験は結晶セルロース製剤のみで実施したと思うが、実際にどれだけ滞留すれば高い免疫誘導が起こるのか。</p>			

最終試験の結果の要旨

(回答) 分からない。機会があれば、トレハロース製剤における免疫誘導評価を行い、滞留性に焦点を絞った免疫誘導評価も行っていく。

質問 15) 製造を想定したときに、結晶セルロースとトレハロースとで扱い易さなどに違いがあるのか。

(回答) 実際に各担体の製造を把握していないが、混合だけを考えるとあまり差はないと考えられる。セルロースは不溶性のものであることから、安定性という意味でもハンドリングが容易である可能性が考えられる。

質問 16) 抗体測定は Day 43 を最後としているが、その後を評価してもいいのではないか。

(回答) 今回はワクチンによる初期免疫誘導を評価する目的で Day 43 までとした。別途、インフルエンザワクチンを用いた実験では 1 年後なども評価している。

質問 17) 注射剤と比較して経鼻投与の方が安全のように感じるが、インフルエンザワクチンではどうか。

(回答) 実際の症例報告まで把握していない。アジュバントを配合した経鼻ワクチンでは大きな副作用が報告されており、アジュバントを含まないワクチンであれば安全だと考えている。

質問 18) パラフィン包埋前に脱灰を行う理由は何か。

(回答) 骨が固く、薄切できないからである。

質問 19) 担体ではなく、原薬の特性によって経鼻での作用が異なることはあるか。

(回答) ある。ワクチンで考えると、今回使用した OVA は高い抗原性を示すと言われているため、本研究結果を出せた可能性がある。抗原性が低いものに関しては確認していない。また、通常の薬剤でも溶解度の低い物質などに関して結晶セルロース製剤を用いても経鼻応用が難しい場合もある。

質問 20) 免疫原性試験で、Day 14 より前に抗体価を測定すれば筋注群と結晶セルロース製剤群とで差がでるのか。

(回答) 確認していないが、その可能性はある。

質問 21) IgG と IgA を評価しているが、IgM は測定していないのか。

(回答) IgM から他のサブクラスへのクラススイッチは律速に行われるため、評価していない。ただし、前述のように、免疫初期に評価することで検出される可能性が考えられる。

質問 22) IgA が交叉反応を示す理由は何か。実験で実際に試したのか。

(回答) IgG と比較して IgA が抗原への親和性が高いためと考えているが、より詳細なメカニズムは把握できていない。論文ベースで分泌型 IgA による交叉反応の報告はあるものの、本研究では確認していない。

質問 23) 結晶セルロースが担体として有用なのはなぜか。他の多糖でも有用なものはあるのか。

(回答) 結晶セルロースは多孔性であり、かつ、吸水性を示す。また不溶性でもあることから粘膜に付着すると、粘液を吸収することで高い滞留性を示すと考えられる。他の多糖で同様の特性を示す担体は報告されていない。

質問 24) アジュバントの配合は考えていないのか(製剤改良の余地はあるのか)。

(回答) 考えている。粘膜からの免疫誘導には限りがあり、COVID-19 等、パンデミックを考えればアジュバントは必要であると考えている。

質問 25) 臨床応用は、COVID-19 等のパンデミックあるいは季節性インフルエンザ等のブーストを想定しているのか。

(回答) 季節性インフルエンザ等のワクチンを想定している。多くのヒトがインフルエンザの罹患歴があるため、アジュバントがなくてもブースト作用がみられると考えている。

質問 26) 健常人では IgA が不足しているという理解か。そうであれば抗体価として目標値はあるのか。

(回答) 通常の上気道からのウイルス感染でも IgA が誘導される可能性はあるが、確実かつ高い誘導を行うという意味で粘膜ワクチンは有用と考えている。抗体価の目標値はないが、感染防御試験を行い、防御が成立した抗体価を示すことは可能と考える。

質問 27) 抗原分子量の大きさに限度はあるのか。

(回答) 今回はタンパク質を抗原としており、ペプチドでの応用経験もあるが、他の分子量やモダリティで確かめたことはないため、正確に返答はできない。

質問 28) マウスの免疫実験では免疫の付きやすい雌を使用するが、サルではどうか。

(回答) サルの免疫誘導における性差は不明であるため、今回は雄を使用した。性差よりも個体差が大きいと考えている。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。