

新型インフルエンザに対する粘膜免疫誘導型ワクチンの開発

所 属 東京大学医科学研究所 ウイルス感染分野

研究者 高田 礼人

要旨

ホルマリンで不活化したインフルエンザワクチンをマウスの鼻腔内に投与すると、様々な亜型のウイルスに対して交差感染防御が成立した。これにはウイルス表面糖蛋白質に対する中和抗体以外の免疫応答が関与していると考えられた。また、現在用いられているエーテルスプリットワクチンには同様の効果が認められなかった事から、ワクチンウイルスが完全粒子の形態を保っていることが重要であることが判った。

1. 研究目的

インフルエンザウイルスはヒト、他の哺乳動物および鳥類に重篤な疾病を引き起こす重要な病原微生物である。本ウイルスは表面糖蛋白質ヘマグルチニン(HA)およびノイラミニダーゼ(NA)の抗原性の違いによって、それぞれ H1-H15 および N1-N9 の亜型に分けられる。これら全ての亜型のウイルスが野生の水禽類の間で維持されているが、これまでにヒトで流行を起こしたウイルスは H1、H2、H3、N1 および N2 のみである。新型ウイルスとは、過去数十年間ヒトが経験していない HA または NA 亜型の A 型インフルエンザウイルスのことである。新型インフルエンザウイルスに対する免疫を人類は持っていない事に加え、現行の不活化インフルエンザワクチンは異なる HA 亜型のウイルスには全く効果がないので、新型インフルエンザの世界的規模の流行が起きた場合、人的ならびに経済的損失は計りしれない。また、近年、高齢者入所施設におけるインフルエンザによる集団死、小児におけるインフルエンザ脳症も問題となっている。このような状況にもかかわらずインフルエンザの予防・制圧法は未だ確立されていない。

本研究の目的は、どのヘマグルチニン亜型のウイルスが新型インフルエンザウイルスとして出現しても流行を最小限に食い止められるように、現在流行しているインフルエンザウイルスに対してのみならず異なるヘマグルチニン亜型のウイルスに対しても交差感染防御免疫を誘導するワクチンを開発する事である。

2. 研究方法

A 型インフルエンザウイルス、A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (PR8)、A/swine/Chiba/1/91 (H1N2)(Sw/Chiba)、A/Adachi/2/55(H2N2) (Adachi)、A/duck/Hong Kong/836/80(H3N1) (HK836)、A/Aichi/2/68(H3N2) (Aichi)、A/Memphis/4/96(H3N2) (Memphis)、A/duck/Hong Kong/W213/97 (H9N2) (HK/W213)、A/swine/Hong Kong/10/98(H9N2) (HK/10/98)、A/Hong Kong/911(H5N1) (HK911)、A/Hong Kong/483/97(H5N1) (HK483)、A/duck/Hokkaido/67/96(H5N4) (Hok67)および B 型インフルエンザウイルス B/Lee/40 (B/Lee) 株を実験に用いた。HA および NA 亜型の異なるこれらのウイルスを用いて、ホルマリン不活化完全粒子ワクチンおよびエーテル処理 HA サブユニットワクチンを作出した。それらをマウスの鼻腔内に投与して、香港 H5N1 インフルエンザウイルスに対する粘膜免疫応答および感染防御効果を比較した。また、様々なヘマグルチニン亜型のウイルス（特に、現在ヒトの間で流行している株以外の亜型のヘマグルチニンを持つウイルスも含めて）で攻撃し感染防御効果を調べ、内部蛋白質に対する抗体応答との相関を調べた。

A 型インフルエンザウイルスの内部蛋白質に対するモノクローナル IgA、IgM および IgG 抗体を作出するために、アジュバントとしてコレラ菌毒素 B サブユニットを混合したホルマリン不活化ワクチン（Aichi 株）をマウスの鼻腔内に 3 回投与し、脾臓および呼吸器に付属するリンパ節中の細胞を用いてハイブリドーマを作出した。Aichi 株の HA および NP 遺伝子をクローニングし、細胞に発現させた抗原を用いてスクリーニングを行った。

3. 研究成果

HA および NA 亜型の異なる様々な A 型インフルエンザウイルスのホルマリン不活化完全粒子ワクチンを調製した。これらをマウスの鼻腔内に接種すると、いずれのワクチンを投与した場合でも、マウスの血清および呼吸器分泌液中に、ウイルス蛋白質に対する抗体が誘導された。これらの抗体はワクチンウイルスと同じ亜型のウイルスを *in vitro* で中和したが、異なる HA 亜型のウイルスは全く中和しなかった。それにも関わらず、いずれの亜型のワクチンで免疫した場合でも、マウスは致死量の香港 H5N1 ウイルスの感染に耐過した。B/Lee ワクチンを投与したマウスは全て斃死した。これらの成績は、不活化ワクチンを鼻腔内に投与すれば、HA 亜型の異なるウイルスに対する交差感染防御免疫を誘導できる可能性を示唆している。また、この感染防御効果には A 型インフルエンザウイルス間で抗原性が共通する蛋白質に対する免疫応答が関与していることを示している。

次に 1 種類のワクチンが亜型の異なる複数のウイルスに対して有効か否かを調べた。PR8 (H1N1) および Aichi (H3N2) 株のホルマリン不活化ワクチンを作製し、マウスの鼻腔内に投与した。PR8(H1N1)、Aichi(H3N2)、HK483(H5N1)、HK10/18(H9N2)、および B/Lee で攻撃し、肺におけるウイルスの増殖をコントロールと比較した。その結果、いずれの A 型ウイルスワクチン

を投与した場合でも、全てのA型ウイルスの増殖が約10分の1に抑えられる事が判明した。B/Lee ワクチンを投与したマウスでは、この効果は認められなかった。

ここまでの実験に我々が用いたホルマリン不活化ワクチンと現在ヒト用ワクチンとして使用されているエーテスプリットワクチンの感染防御効果を比較するために、PR8 (H1N1)および Aichi (H3N2) 株のホルマリン不活化ワクチンおよびエーテスプリットワクチンをそれぞれ作製した。これらをマウスの鼻腔内に投与し、強毒 H5N1 ウイルスに対する感染防御効果を比較した。ホルマリン不活化ワクチンを鼻腔内に投与したマウスは全て生残したが、同量のウイルス蛋白質を含むエーテスプリットワクチンを投与したマウスは斃死した。いずれのワクチンを皮下に接種しても、H5N1 インフルエンザウイルスに対する交差感染防御は殆ど認められなかった。これらの成績は、HA 亜型の異なるウイルスに対する交差感染防御免疫を効果的に誘導するにはワクチンウイルスが完全粒子の形態を保っていることが重要であり、さらに呼吸器粘膜に局所抗体の産生を誘導する必要がある事を示唆する。

ホルマリン不活化ウイルスを鼻腔内に投与したマウスの B 細胞を用いて、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作出した結果、HA に対する IgA、IgG および IgM 抗体、および NP に対する IgA および IgG 抗体を産生するクローンが多数得られた。従って、実際に不活化ウイルスワクチンの経鼻投与によって、HA 蛋白質同様に、内部蛋白質に対する IgA 抗体産生細胞も多数誘導されている事が判明した。

4. 考察・まとめ

インフルエンザウイルスの内部蛋白質に対する免疫応答として細胞障害性 T 細胞 (CTL) がよく知られている。A 型インフルエンザウイルスの内部蛋白質の抗原性は HA および NA 亜型に関わらず共通なので、ウイルスの内部蛋白質に対する CTL を誘導すれば、交差感染防御が成立することが知られている。しかし、一般に、不活化抗原 (細胞内で増殖しない抗原) に対しては CTL は誘導されないので、本研究で認められた交差感染防御は CTL 以外の免疫応答、恐らく粘膜に分泌される IgA 抗体が関与していると考えられる。また、A 型ウイルスの間でのみワクチンの交差感染防御効果が認められ、B 型ウイルスワクチンは A 型ウイルスの感染防御に全く効果がなく、逆に A 型ウイルスワクチンは B 型ウイルスの感染防御に全く効果がなかった事実は、型特異的なウイルス内部蛋白質に対する免疫応答が交差感染防御に重要であることを示唆している。

一般に中和抗体の標的蛋白質はウイルス表面蛋白質である。インフルエンザウイルスの場合は、HA および NA である。ホルマリン不活化ワクチンが誘導した抗体はワクチンウイルスと同じ HA 亜型のウイルスの感染性は効率的に中和した。これは HA または NA に対する抗体によるものである。しかし、これらの抗体は HA および NA 亜型の異なるウイルスの感染性を中

和しなかった。さらに、B 型ウイルスワクチンには、まったく感染防御効果が認められなかった事から、HA および NA 以外のウイルス蛋白質、恐らく A 型ウイルスで抗原性が共通である NP あるいは M 蛋白質に対する IgA 抗体によって交差感染防御免疫は成立している可能性がある。実際に、同様の方法で免疫したマウスの呼吸器近傍あるいは脾臓中の B 細胞を用いてハイブリドームを作出した結果、内部蛋白質 NP に対する IgA および IgG 抗体を産生するハイブリドームクローンが多数得られた事から、不活化ウイルスワクチンの経鼻投与によって、HA 蛋白質同様に、内部蛋白質に対する IgA 抗体産生細胞も誘導されている事が判明した。

ホルマリン不活化ワクチンをマウスの鼻腔内に投与すると交差感染防御免疫が誘導されたが、現在ヒトに用いられているエーテルスプリットワクチンを投与しても同様の免疫は誘導されなかった。全粒子ワクチンは抗原提示細胞への取り込まれやすさあるいはウイルス内部抗原を保護できるという点でエーテルスプリットワクチンより優れていると考えられ、内部蛋白質に対する免疫応答の誘導に適しているのかも知れない。

5. 研究発表

1. Takada, A., Matsushita, A., Ninomiya, A., Kawaoka, Y., Kida, H. (2003) Intranasal immunization with formalin-inactivated virus vaccine induces a broad spectrum of heterosubtypic immunity against influenza A virus infection in mice. *Vaccine* (in press).
2. Ninomiya, A., Ogasawara, K., Kajino, K., Takada, A., Kida, H. (2002) Intranasal administration of a synthetic peptide vaccine encapsulated in liposome together with an anti-CD40 antibody induces protective immunity against influenza A virus in mice. *Vaccine* 20(25-26): 3123-3129.
3. Ninomiya, A., Takada, A., Okazaki, K., Shortridge, K.F., Kida, H. (2002) Seroepidemiological evidence of avian H4, H5, and H9 influenza A virus transmission to pigs in southeastern China. *Vet. Microbiol.* 88(2):107-114.

6. 知的所有権の取得状況

該当なし