

年 12 月 10 日

堀本泰介、藤井健、渡辺真治、前田寧子、河岡義裕、インフルエンザウイルスベクターの構築と展望、第 27 回日本分子生物学会（神戸）、2004 年 12 月 11 日

河岡義裕、インフルエンザウイルスの謎、第 27 回日本分子生物学会（神戸）、2004 年 12 月 11 日

堀本泰介、河岡義裕、鳥インフルエンザウイルスの人への感染メカニズム、平成 16 年度学会年次大会（合同学会：日本産業動物獣医学会、日本小動物獣医学会、日本獣医公衆衛生学会）（新潟）、2005 年 2 月 11 日

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等医療技術リスク評価研究事業）
分担研究報告書

新型インフルエンザワクチンの製造に用いる細胞株の検索

分担研究者：今井 正樹（国立感染症研究所ウイルス第三部主任研究官）

研究要旨 インフルエンザワクチン製造用の種ウイルスをリバーシジェネティクス技術で作製するためには、ウイルス遺伝子をコードするプラスミドを細胞にトランスフェクションすることが必要である。本研究では、トランスフェクションに感受性を示す細胞株を検索するため、American Type Culture Collection（ATCC）から様々なサル由来細胞株を入手し、これらがリバーシジェネティクス技術に利用できるかどうかを検討した。

A. 研究目的

高病原性鳥インフルエンザウイルス H5N1 はヒトに対する病原性が極めて高い。そのため、この強毒型ウイルスをワクチン製造株に用いると、ワクチン製造従事者に対して大きな健康被害をもたらす危険性がある。また、ウイルスの増殖に用いる発育鶏卵が早期に死亡し、生産効率が非常に悪いなどの問題点もある。したがって、リバーシジェネティクス技術を使って強毒型ウイルスを弱毒化し、これをワクチン製造株として用いる必要がある。リバーシジェネティクス法でウイルスを得るためには、ウイルス遺伝子をコードするプラスミド DNA を細胞に導入することが必須である。WHO はプラスミドをトランスフェクションする細胞株としてサル由来細胞株の Vero 細胞を推奨しているが、Vero 細胞はトランスフェクションに対する感受性が低いため、この細胞を使って組み換えウイルスを回収することは容易ではない。本研究では、Vero 細胞に替わる細胞株を検索するため、American Type Culture Collection（ATCC）から様々なサル由来細胞株を入手し、これらがリ

バーシジェネティクス法に使用可能かどうかを検討した。

B. 研究方法

（1）細胞：ATCC より 4 種類のサル由来細胞株（アフリカミドリザル腎臓 由来の CV-1 細胞（CCL-70）、アフリカミドリザル腎臓 由来の BS-C-1 細胞（CCL-26）、アカゲザル腎臓由来の LLC-MK2 細胞（CCL-7、CCL-7.1））を購入した。

（2）高病原性鳥インフルエンザウイルス遺伝子のクローニング：2004 年にベトナムでヒトから分離された A/Vietnam/JP1203/04（H5N1）（VNJP1203）ウイルスの HA を弱毒型に改変した遺伝子と NA 遺伝子をウイルス RNA 発現ベクターに組み込んだ。

（3）組み換えウイルスの作製：TransIT-LT1（Mirus）を用いて、A/PR/8/34（H1N1）（PR8）ウイルスの 8 種類（PB1、PB2、PA、HA、NP、NA、M、NS）の RNA（vRNA）とヌクレオキャプシド（vRNP）を構成する 4 種類の蛋白（PB1、PB2、PA、NP）を発現するプラスミドを細胞にトランスフェクションした。24 時間処理後、トリプシン（10ug/ml）

を加えた Opti-MEM 培地に交換して 24 時間から 48 時間培養し、培養上清中のウイルスを回収した。同様に、VNJP1203 ウイルス (弱毒型 HA および NA) と PR8 ウイルス (PB1、PB2、PA、NP、M、NS) とのリアソータントウイルス (H5N1 組み換えウイルス) の回収を試みた。

(4) ウイルス感染価の測定: 培養上清中のウイルス感染価は MDCK 細胞を用いたブラック法で測定した。

(5) ウイルスの抗原解析: A/duck/Hong Kong/820/80 ウイルスに対するヤギ高度免疫血清、A/Hong Kong/213/03 ウイルスに対するウサギ高度免疫血清、A/Vietnam/1194/04 に対するフェレット感染血清、A/Vietnam/1203/04 に対するフェレット感染血清、抗 A/duck/Hong Kong/739.2/02 ウイルスに対するアヒル感染血清、A/goose/Hong Kong/437/99 ウイルスに対するニワトリ感染血清を用いた赤血球凝集阻止試験を行った。

C. 研究結果と考察

(1) 組み換えウイルスの作製: PR8 株の vRNA および vRNP 蛋白を発現するプラスミドを 5 種類のサル由来細胞株にトランスフェクションし、それぞれの培養上清中のウイルス感染価を測定した。その結果、感染性ウイルス粒子は LLC-MK2 細胞でのみ検出され、LLC-MK2 細胞はトランスフェクションに感受性を示すことがわかった (表 1)。次に、この細胞を用いて、弱毒化 H5N1 組み換えウイルスの回収を試みたところ、 1.3×10^5 PFU/ml と高いウイルス産生効率が得られることがわかった。以上の成績は、LLC-MK2 細胞がワクチン製造用の種ウイルスを作製するための細胞株として有用であることを示している。

(2) 組み換えウイルスの抗原解析: LLC-MK2

細胞で作製された H5N1 組み換えウイルスは、野生株と抗原的に同じであるかどうかを赤血球凝集阻止試験で調べた。組み換えウイルスは、いずれの抗血清に対しても強毒型野生株の VNJP1203 ウイルスと同様の反応性を示した (表 2)。したがって、このウイルスは野生株と抗原的に同じであり、LLC-MK2 細胞を使ったリバーシジェネティクス系はウイルスの抗原性に影響しないことがわかった。

D. 結論

LLC-MK2 細胞は、Vero 細胞に替わる新型インフルエンザワクチン作製用細胞株候補として有望である。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Imai M., Watanabe S., Ninomiya A., Obuchi M., Odagiri T. : Influenza B virus BM2 protein is a crucial component for incorporation of viral ribonucleoprotein complex into virion during virus assembly. *Journal of Virology*, 78: 11007-11007, 2004

2. 学会発表

1) 今井正樹、渡辺真治、二宮愛、小淵正次、小田切孝人: B 型インフルエンザウイルスの増殖過程における BM2 蛋白の機能、第 52 回日本ウイルス学会総会、横浜、2004 年 11 月

2) 小田切孝人、今井正樹、二宮愛、納富継宣、峰川晴美、石崎徹、田代真人: LAMP (loop-mediated isothermal amplification) 法による高病原性鳥インフルエンザウイルス感染診断系の開発、第 52 回日本ウイルス学会総会、横浜、2004 年 11 月

3) 二宮愛、今井正樹、田代真人、小田切孝

人：弱毒化鳥インフルエンザウイルスH5N1
を用いたアルムアジュバントワクチンのマ

ウスにおける有効性の検討、第52回日本ウイルス学会総会、横浜、2004年11月

表. 1

Virus yield of transfectants recovered from cells transfected with 8 polI/PR8-plasmids and 4 pCA/ORF-plasmids^a

Cells	Virus yield (PFU/ml)
Vero	ND ^b
CV-1 (CCL-70)	ND
BS-C-1 (CCL-26)	ND
LLC-MK2 (CCL-7)	1.5×10
LLC-MK2 (CCL-7.1)	3.6×10^3

^aCells were transfected with 12 plasmids for production of rg-PR8 virus.

The infectious particles in the supernatants were recovered 48 h pt and titrated in MDCK cells.

^bND, not detected.

表. 2

HEMAGGLUTINATION INHIBITION REACTIONS OF INFLUENZA H5 VIRUSES

	Antiserum Goat	Antiserum Rabbit	Antiserum duck	Antiserum chicken	Antiserum Ferret	Antiserum Ferret
REFERENCE ANTIGENS	A/duck/Hong Kong/820/80	A/Hong Kong/213/2 003	A/duck/Hong Kong/739. 2/0 2	A/goose/Hong Kong/437/99	A/VN/1194/04	A/VN/1203/04
A/duck/Hong Kong/820/80 (H5N3)	640	160	<10	40	<10	<10
A/Hong Kong/156/97 (H5N1)	2560	1280	<10	1280	<10	<10
A/Hong Kong/483/97 (H5N1)	2560	320	40	1280	<10	320
A/Hong Kong/213/2003 (H5N1)	2560	1280	1280	2560	640	160
A/Vietnam/JP1203/04 (H5N1)	160	80	10	160	10	160
A/Vietnam/1194/04 (H5N1)	320	160	80	320	80	320
TEST ANTIGENS						
H5N1 組み換えウイルス (H5N1)	80	80	<10	160	<10	160

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）

分担研究報告書

新型インフルエンザウイルスに対するワクチンのマウスにおける有効性の検討

分担研究者 二宮 愛 国立感染症研究所ウイルス第3部第1室 研究員

研究要旨 2003年にヒトから分離された鳥由来のH5ウイルスで作製した不活化全粒子ワクチンをアルミニウムアジュバントと共にマウスに皮下接種した。免疫後、ワクチンの元株ならびに2004年に分離された強毒H5N1ウイルスを感染させ、感染防御効果を調べた。その結果、微量の抗原でもアジュバントの使用により、効果的に感染防御能を誘導できる可能性が示された。

A. 研究目的

2003年末から東アジアを中心に続いているH5N1高病原性鳥インフルエンザの流行は終息する気配を見せず、2005年に入ってからベトナムでは鳥からの感染者が報告されている。現時点では、ヒトへの感染は散発的なものにとどまっておらず、分離されるウイルスの遺伝子は全て鳥型ウイルス由来で、ヒトからヒトへ効率よく感染するような変異は見られていない。しかし、これらのウイルスが変異を起しヒトの間で大流行すれば、その被害は甚大なものになることが予想される。したがって、新型インフルエンザウイルスの流行に備えた有効なワクチンの開発が望まれている。

平成15年度に厚生労働科学研究費補助金医薬品等医療技術リスク評価研究事業

「新型インフルエンザ用ワクチンの有効性・安全性確保に関する研究」の総括・分担研究報告書において、不活化全粒子ワクチンおよびアジュバント使用の有効性について検討し、ワクチン接種マウスにおいて抗体価の上昇が見られたことを報告した。本研究では、強毒ウイルスを用いて感染実験を行い、ワクチン接種により感染防御能を付与できるか否かを検討した。

B. 研究方法

不活化全粒子ワクチン

以下のウイルスを精製し、ホルマリンで不活化してワクチンを作製した。

・rg-A/HK/213/2003 (dH5N1) × A/PR/8/34 (Internal) (rgHK213/03) : 2003年2月に香港でヒトから分離された強毒株 A/HK/213/2003 (H5N1) (HK213/03) をリバ

ースジェネティクス法で弱毒化したワクチン株

マウスの免疫・感染実験 (図 1)

BALB/c (メス、4 週齢) を各群 5 匹ずつ使用した。表 1 のとおり調整したワクチン (総量 200u1/匹) を 3 週間隔で 2 回、マウスに皮下接種した。2 回目の免疫後 1 週目に強毒ウイルス HK213/03 または VNJP1203/04 を感染させ、肺のウイルス価または生残率により感染防御能を調べた。

表 1) 免疫実験に使用したワクチン

group No.	抗原	抗原 (HA 蛋白) 量 /100u1	アジュバント (2% Alum) (100u1/匹)
1	rgHK213	2ug	+
2			-
3		0.2ug	+
4			-
5		0.02ug	+
6			-
7	なし	-	+
8			-

C. 研究結果

HK213/03 による経鼻感染実験では、2ug のワクチン接種では Alum 添加・非添加の両群で、0.2ug、0.02ug では、Alm 添加群でのみ有意の肺内ウイルス増殖抑制が見られた (図 2)。

平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金 医薬品等医療技術リスク評価研究事業

「新型インフルエンザ用ワクチンの有効性・安全性確保に関する研究」の総括・分担研究報告書において、rgHK213/03 で免疫したマウスの中和抗体は、2004 年のベトナムの患者からの強毒型 H5N1 分離株 (VNJP1203/04) にほとんど交差反応性を示さないことを報告した。しかし VNJP1203/04 の経鼻感染実験では、Alum 添加ワクチン投与群はいずれも 8 割以上の生残率であった。抗原量 0.02ug の Alum 非添加群では全てのマウスが死亡した (図 3)。

VNJP1203/04 に対する防御効果をさらに詳細に検討するため、感染後経時的に肺、脾臓、脳を採取してウイルスの有無を調べた (図 4)。抗原量 0.02ug の Alum 非添加群および Alum のみの投与群は全身でウイルスが検出された。一方、抗原量 2ug、0.02ug の Alum 添加ワクチン投与群では、ウイルスが検出されないか、あるいは感染後日数が経過しても感染が肺に局限しているかのどちらかであった。

D. 考察

本実験の結果から、rgHK213/03 を用いて作製した Alum 添加全粒子不活化ワクチンは、抗原量を 1/10 以下に減少させてもホモの強毒株に対する感染後の肺内ウイルス増殖抑制効果を誘導できることが判った。また、抗原性が大きく変化した VNJP1203/04 に対しても、rgHK213/03 ワ

クチンは全身へのウイルスの広がりを防ぐことによる交差防御効果を示し、その際にもアジュバントが抗原量を減らすのに有効であることが明らかとなった。

E. 結論

本実験の結果から、弱毒ウイルスで作製した不活化全粒子ワクチンを、Alumと共に皮下接種することで、強毒ウイルスに対する感染防御効果を効果的に誘導できることが判った。

今後、新たに分離された強毒ウイルスに対してもこの方法が有効かどうか検討する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ohishi K, Kishida N, Ninomiya A, Kida H, Takada Y, Miyazaki N, Boltunov AN, Maruyama T
Antibodies to Human-Related H3 Influenza A Virus in Baikal Seals (*Phoca sibirica*) and Ringed Seals (*Phoca hispida*) in Russia. *Microbiol Immunol* 48:905-909. 2004

2) Imai M, Watanabe S, Ninomiya A, Obuchi M, Odagiri T
Influenza B virus BM2 protein is a crucial component for incorporation of viral ribonucleoprotein complex into virions during virus assembly. *J Virol* 78:11007-11015. 2004

2. 学会発表

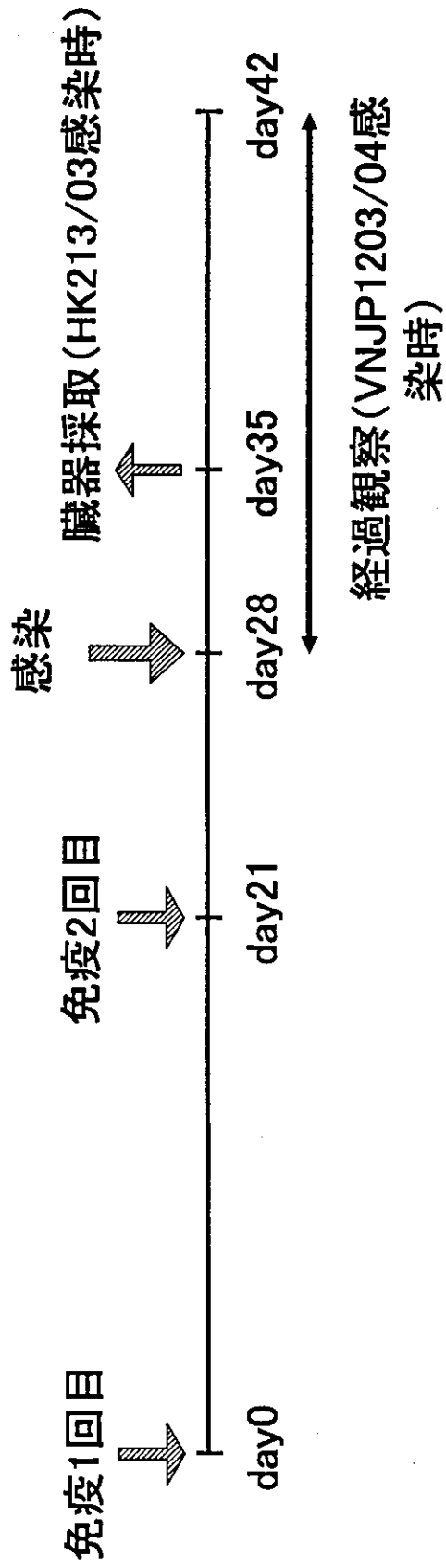
1) 二宮愛、今井正樹、田代真人、小田切孝人 弱毒化鳥インフルエンザウイルスH5N1を用いたアルムアジュバントワクチンのマウスにおける有効性の検討 第8回日本ワクチン学会、札幌、10月、2004年

2) 二宮愛、今井正樹、田代真人、小田切孝人 弱毒化H5N1型高病原性鳥インフルエンザウイルスを用いたアルムアジュバント添加ワクチンのマウスにおける有効性の検討 第52回日本ウイルス学会、横浜、11月、2004年

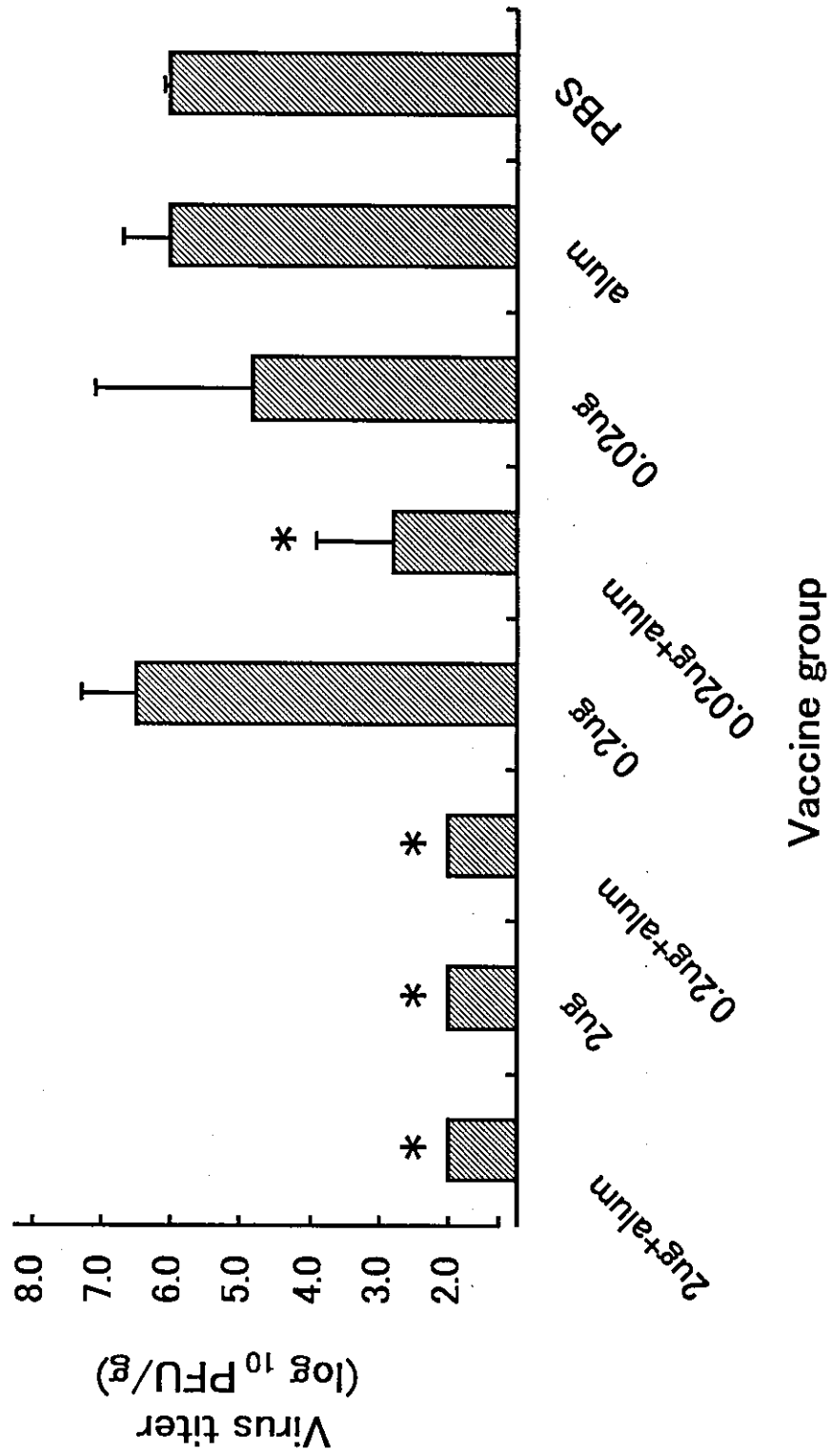
H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

<図1>
免疫・感染スケジュール



<図2>
ワクチン接種マウスの肺における攻撃ウイルス(HK213/03)の増殖



* $p < 0.01$ compared with group "alum" and "PBS"

<図3>

rgHK213/03ワクチン接種マウスにおけるVNJP1203/04ウイルス攻撃時の生残率

Vaccine group	生残数/全頭数
2ug+alum	5/5
2ug	4/5
0.2ug+alum	4/5
0.2ug	3/5
0.02ug+alum	4/5
0.02ug	0/5
alum	0/5
PBS	0/5

<図4>

rgHK213/03ワクチン接種マウスにおけるVNJP1203/04ウイルス攻撃後のウイルス分布

Vaccine group												
day	2ug+alum			0.02ug+alum			0.02ug			alum		
	Lu	Sp	Br	Lu	Sp	Br	Lu	Sp	Br	Lu	Sp	Br
1	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> -/-	<input type="checkbox"/> -/-	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> -/-	<input type="checkbox"/> -/-	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> -/-	<input type="checkbox"/> -/-	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> -/-	<input type="checkbox"/> -/-
3	<input type="checkbox"/> -/-	<input type="checkbox"/> -/-	<input type="checkbox"/> -/-	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> -/-	<input type="checkbox"/> -/-	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> -/-	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> -/-
5	<input type="checkbox"/> -/-	<input type="checkbox"/> -/-	<input type="checkbox"/> -/-	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> -/-	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> +/-
7	<input type="checkbox"/> -/-	<input type="checkbox"/> -/-	<input type="checkbox"/> -/-	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> -/-	<input type="checkbox"/> -/-	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> +/-	<input type="checkbox"/> +/-

+/- 2匹中1匹で検出

+/- 2匹中2匹で検出

アジュバント併用経鼻 H5 インフルエンザワクチンの有効性の解析

分担研究者：長谷川秀樹（国立感染症研究所、感染病理部）

協力研究者：尾崎泰子、一戸猛志、佐多徹太郎（同所、感染病理部）

板村繁之（同所、ウイルス第三部）

研究要旨

高病原性トリインフルエンザ H5N1 のマウス感染モデルを用い不活化ワクチンの有効な接種方法と安全性を検討した。H5N1 不活化ワクチンをアジュバントと共に経鼻接種することにより上気道の粘膜に H5N1 特異的な分泌型の IgA、また血清に IgG を誘導に成功した。それに伴い致死的なインフルエンザウイルス H5N1 感染を防御することが可能であった。用いるアジュバントにより抗体応答にばらつきがあり防御に最良の接種方法を検討した。アジュバントとしてコレラトキシン B サブユニット、二本鎖 RNA である poly(I:C)、キチン微粒子(CMP) を用いた。安全性を考えると poly(I:C)、CMP の併用がもっとも効果的で安全な粘膜アジュバントであることが示された。

A. 研究目的

高病原性トリインフルエンザ H5N1 はアジア地域で流行が見られヒトへの致死的な感染が報告されている。その爆発的な感染を防御する有効な手段としてワクチンが考えられる。そこで H5N1 インフルエンザウイルスに対する有効で安全なワクチン開発とその接種方法の開発を目的とする。

B. 研究方法

材料と方法：

ワクチンの作製

リバーズジェネティクス法により、

A/HK/156/97(H5N1)の HA 遺伝子を弱毒型に改変し鳥由来のウイルスに導入した遺伝子組換えワクチン(HK9-1-1,H5N1)株を用いて、定法のワクチン製造手法によって作成した不活化(スプリット)ワクチンを使用した。

アジュバントの調整

コレラトキシン B サブユニット(CTB; Sigma-Aldrich)は、0.2%のホロトキシンを添加して用いた(CTB*)。合成二本鎖 RNA (polyI:C)は東レより分与を受けた。キチン微粒子(chitin micro-particles : CMP, Sigma-Aldrich)は PBS に希釈して用いた。

免疫方法

7週齢のBALB/cマウス(雌)または23週齢のB10マウス(雌)を用いた。1群15匹のマウスにエーテル麻酔下で0.1~2 μ gのワクチンを0.1~100 μ gのアジュバントと共に経鼻投与した。4週後に2 μ gのワクチンのみの追加免疫または、初回免疫と同じ材料の追加免疫をおこない、その2週後に5匹/群から血清、鼻腔洗浄液、鼻腔関連リンパ組織(NALT)および脾臓を回収し抗体応答と抗体産生細胞数の測定をおこなった。残りの10匹/群は、強毒株A/HK/483/97(HK483)株を経鼻感染し体重変化と致死率の観察を18日間おこなった。

すべての動物実験は国立感染症研究所の動物実験ガイドラインに従っておこなった。

感染

HK483株は、MDCK細胞で4代継代した。チャレンジ感染は100 \times LD50量を1 μ Lずつ両鼻腔に接種した。感染実験は、レベル3の動物実験施設でおこなった。

ELISA アッセイ

遺伝子を改変したH5HAに対するIgAおよびIgG抗体価の測定は、ELISAにておこなった。バキュロウイルスで発現させ、精製したHA蛋白をELISAプレートにコートし、血清サンプルまたは鼻腔洗浄液を加えて培養後、ビオチン化ヤギ抗マウスIgA(α 鎖)またはIgG(γ 鎖)を反応させた。アルカリホスファターゼ-ストレプトアビジンを加えて培養した後、基質を加えて発色させ吸光度を測定した。あらかじめ精製したH5-HA反応性のIgAとIgGを任意の単位(160U)のスタンダ

ードとして用い、2段階希釈の標準曲線を作成して抗体価を表現した。

ELISPOT アッセイ

追加免疫2週後のNALTと脾臓中のH5-HA特異的抗体産生細胞(AFC)は、ELISPOTアッセイにより測定した。ニトロセルロース膜の96穴プレートに精製H5-HAをコートし、NALTと脾臓から取り出したリンパ球浮遊液を加えて5時間培養し、0.5% Tween-20/PBSにて洗浄後、ビオチン化ヤギ抗マウスIgA(α 鎖)、IgG(γ 鎖)、IgM(μ 鎖)を反応させた。アルカリホスファターゼ-ストレプトアビジンを加えて培養した後、基質を加えて発色させ、スポットを数えた。

病理

Poly(I:C)+CMPアジュバント併用ワクチンを投与し、チャレンジ感染後7日目のマウスにつて、脳、鼻腔、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、膵臓、小腸の病理学的変化を観察し、非免疫マウスのものと比較した。各組織の切片をHE染色およびA型ウイルスのNPに対するポリクローナル抗体を用いて免疫染色をおこなった。

結果

1、CTB*アジュバント併用ワクチンを経鼻免疫したBALB/cおよびB10マウスでの抗体応答と感染防御効果

0.1、0.5、2 μ gのCTB*とワクチンを経鼻免疫したマウスのH5-HA分子に対する抗体応答(ELISA)とチャレンジ感染に対する感染防御効果(生存率)を図1に示す。BALB/c、B10マウスは共に、CTB*をアジュバントとすることにより少量のワクチ

ンでも鼻腔洗浄液中に特異的な IgA および IgG が、血清中には IgG が誘導され、強毒株 HK483 の致死的なチャレンジ感染に対し有効であることを示した。非免疫マウスではほとんどすべてのマウスがチャレンジ感染後に死亡した。

2、CTB*、poly(I:C)、CMP

poly(I:C)+CMP のアジュバント併用ワクチンを経鼻免疫した BALB/cマウスの抗体応答と感染防御効果の比較

2 μ g のワクチンを様々なアジュバントと共に経鼻免疫した BALB/c マウスの H5-HA 分子に対する抗体応答(ELISA)を図2に示す。CTB*は最も強い IgA および IgG 抗体応答を誘導したが、poly(I:C)+CMP も CTB*よりはやや弱いものの鼻腔洗浄液中に IgA、血清中に IgG を誘導した。poly(I:C)および CMP を投与したマウスも、各々鼻腔洗浄液中および血清に特異的抗体が検出された。アジュバントを併用せずワクチンのみを経鼻免疫したマウスでは抗体が検出されなかった。また、NALT と脾臓の H5-HA 特異的 AFC 量を図 3 に示す。CTB*を投与したマウスでは、脾臓の IgA および IgG-AFC が他の群に比べて最も多かったが、NALT の IgA および IgG-AFC は、CTB*と poly(I:C)+CMP 投与群で同等に高かった。

3、病理像

Poly(I:C)+CMP アジュバント併用ワクチンを投与したマウスと、非免疫マウスのチャレンジ感染後 7 日目の各組織の病理像を比較した。非免疫マウスでは鼻腔上皮細胞の脱落がみられ、ウイルス抗原が陽性であり、大脳の脳幹全体がウイルス抗原陽性であった

(図4)。他の臓器や、ワクチンを投与したマウスでは病理学的変化およびウイルス抗原は認められなかった。

なお、いずれの感染実験も国立感染症研究所戸山庁舎高度安全実験施設においてバイオセーフティーレベル 3 病原体取り扱い規定および動物実験委員会規定に従い実施した。

D. 考察

従来 of 皮下接種では抗体応答を得ずらいとされているインフルエンザウイルス H5N1 ワクチンを用い、投与方法を経鼻とすることにより防御効果の高い上気道での IgA、血清中の IgG を誘導することができた。用いたアジュバントのうちもっとも抗体誘導能の高かったものは CTB*でありついで poly(I:C)、CMP の順番であった。CTB*はアジュバント効果が最も高かったがヒトへの応用を考えた場合その毒性によりヒトへの投与が認められていない。よってより毒性の低いアジュバントが求められているが今回得られた結果により二本鎖 RNA である poly(I:C)に防御効果のある粘膜免疫の誘導能があり、インフルエンザウイルス H5N1 に対して有効なアジュバントであることが示された、さらにその効果はキチン微粒子である CMP と併用することにより増強され、臨床応用に向けた研究が望まれる。

E. 結論

高病原性インフルエンザ H5N1 のマウス感染モデルを用いアジュバント併用経鼻 H5N1 ワクチンの有効性を示した。二本鎖 RNA である poly(I:C)とキチン微粒子(CMP)の併用によ

り高い防御効果のある免疫誘導が可能であった。今後はヒトへの応用を考えた研究につなげていく予定である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

1. Takahashi H, Sawa H, Hasegawa H, Nagashima K, Sata T, Kurata T. Topoisomerase I dissociates human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase from genomic RNAs. **Biochem Biophys Res Commun.** 2004 Jan 23;313(4): 1073-8.
2. Ueno T, Tokunaga K, Sawa H, Maeda M, Chiba J, Kojima A, Hasegawa H, Shoya Y, Sata T, Kurata T, Takahashi H. Nucleolin and the Packaging Signal, Ψ , Promote the Budding of Human Immunodeficiency Virus Type-1 (HIV-1) **Microbiol Immunol.** 2004;48(2):111-8.
3. Hasegawa H, Katano H, Tanno M, Masuo S, Ae T, Sato Y, Takahashi H, Iwasaki T, Kurata T, Sata T. BCL-6-positive Human Herpesvirus 8-associated Solid Lymphoma Arising from Liver and Spleen as Multiple Nodular Lesions. **Leuk Lymphoma.** 2004 Oct;45(10):2169-72.
4. Nagata N, Iwasaki T, Ami Y, Tano Y, Harashima A, Suzaki Y, Sato Y, Hasegawa H, Sata T, Miyamura T, Shimizu H. Differential localization of neurons susceptible to

enterovirus 71 and poliovirus type 1 in the central nervous system of cynomolgus monkeys after intravenous inoculation. **J Gen Virol.** 2004Oct;85(Pt10):2981-9.

5. Hasegawa H, Ichinohe T, Strong P, Watanabe I, Ito S, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T. Protection against influenza virus infection by intranasal administration of HA vaccine with chitin microparticles as an adjuvant. **Journal of Medical Virology**, 2005 Jan; 75:130-136.
6. Ichinohe T, Watanabe I, Ito S, Fujii H, Moriyama M, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, and Hasegawa H*, Synthetic double-stranded RNA [poly (I:C)] combined with mucosal vaccine protects against influenza virus infection. **Journal of Virology**, 2005 Mar;79(5):2910-9.

学会発表

1. 一戸猛志、渡邊泉、伊藤智史、森山雅美、田村慎一、千葉丈、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川 秀樹 合成2本鎖RNA, Poly(I:C) をアジュバントに用いた経鼻インフルエンザワクチンの開発。第52回日本ウイルス学会総会 (2004年11月横浜)。
2. 一戸猛志、渡邊泉、伊藤智史、森山雅美、田村慎一、千葉丈、倉田毅、佐多徹太郎、長谷川 秀樹 合成2本鎖RNA, Poly(I:C) をアジュバントとして用いた経鼻インフルエンザワクチンの開発。第8回日本ワクチン学会学術集会 (2004年10月札幌)。

3.長谷川秀樹、一戸猛志、渡邊泉、伊藤智史、
千葉丈、田村慎一、倉田毅、佐多徹太郎。天
然物由来微粒子の粘膜ワクチンアジュバント

効果の検討
H. 知的財産権の出願、登録状況
なし

図 1

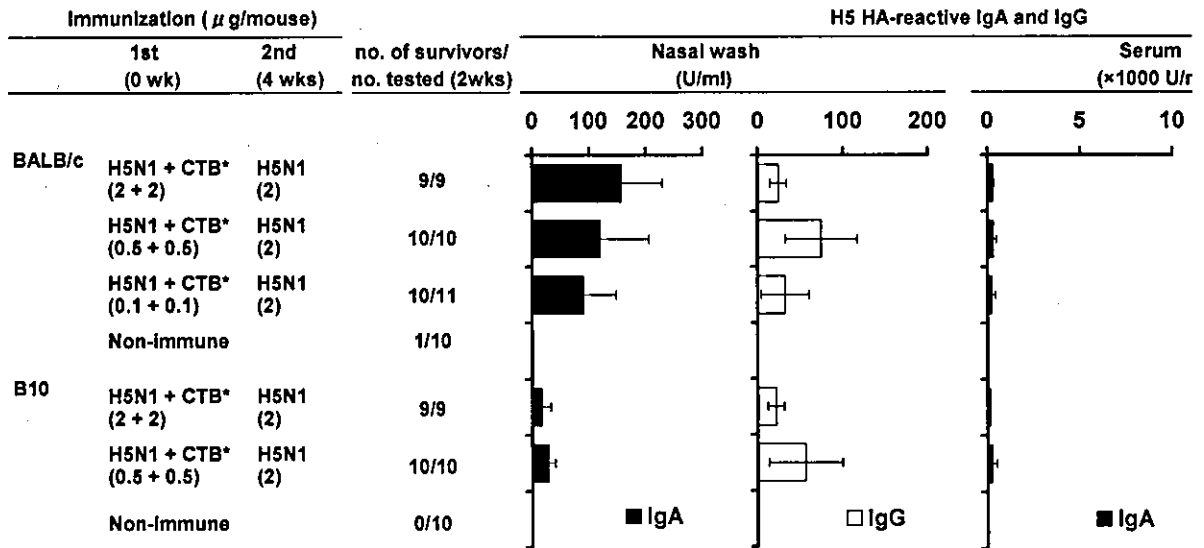


図 2

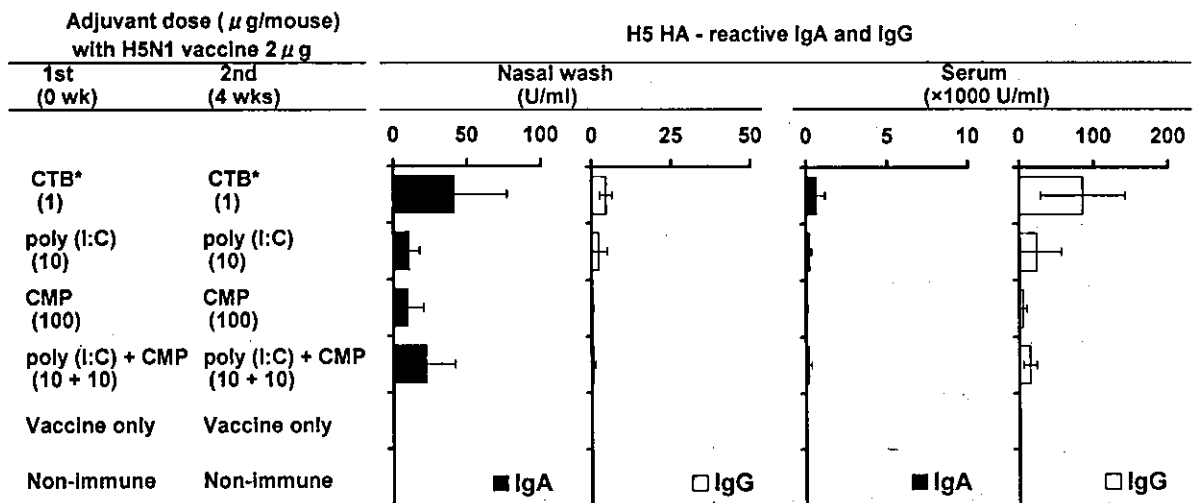


図 3

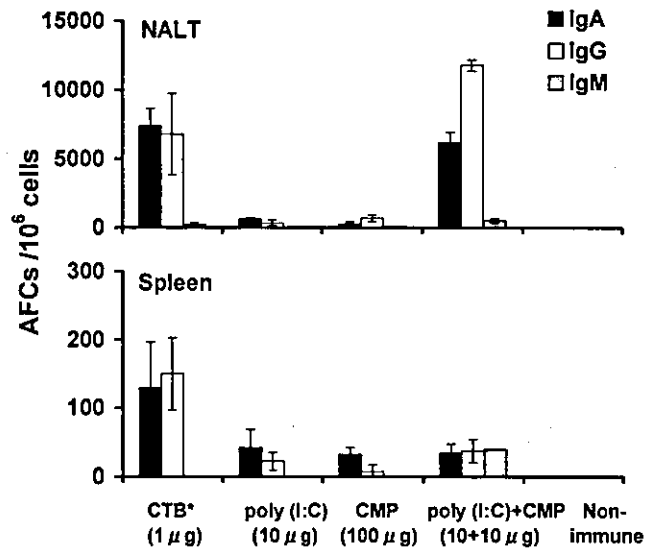
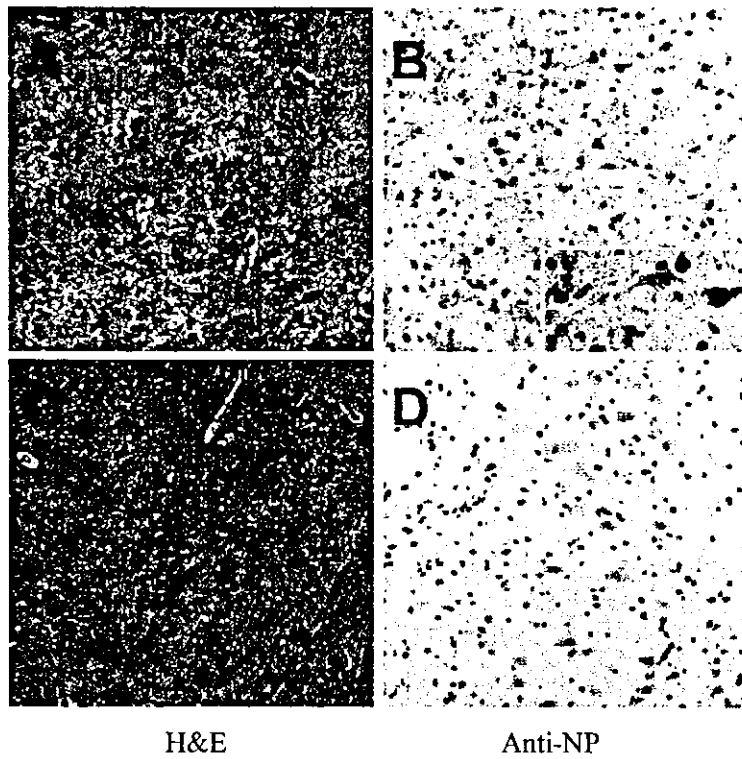


図 4



A,B: 脳幹部、非免疫群

C,D: 脳幹部、Poly(I:C)+CMP 併用経鼻ワクチン接種群

厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
分担研究報告書

新型インフルエンザ用ワクチンの有効性・安全性確保に関する研究

分担研究者 神谷 齊、中野 貴司(独立行政法人国立病院機構三重病院)
大熊 和行(三重県科学技術振興センター保健環境研究部)

研究要旨

インフルエンザ HA ワクチンの接種量の妥当性を明らかにすることを目的として、2003/2004 年に三重県内の小児(0~12 歳)を対象として 0.25mL 接種群と 0.5mL 接種群を設定し、HI 抗体産生状況と副反応発現状況を比較検討した。また、接種後 48 時間以内の副反応発現状況を調査し、採血に同意が得られた者は接種前、1 回接種後、2 回接種後の HI 抗体を測定した。

副反応については、1 回接種後に全身副反応、局所副反応のいずれも発現しなかった者は 2 回接種後でも発現しにくかったが、1 回接種後に局所副反応が発現した者は、2 回接種後に高い割合(56 人中 28 人:50%)で発現し、2 回接種後は特に注意して経過観察する必要性が明らかとなった。

A. 研究目的

現行のインフルエンザワクチンの接種量は 1 歳未満 0.1mL、1 歳~6 歳未満 0.2mL、6 歳~13 歳未満 0.3mL、13 歳以上 0.5mL と規定されているが、その科学的根拠に関するデータは必ずしも明確ではない。このため、著者らは、ワクチン接種量の妥当性を明らかにすることを目的として、2003/2004 年に三重県内の小児(0~12 歳)を対象に 0.25mL 接種群と 0.5mL 接種群を設定し、HI 抗体産生状況と副反応発現状況を比較検討したので報告する。

B. 研究方法

三重県内 11 ヶ所の小児科を調査対象施設として、医療機関ごとに、0~12 歳の受診者のうち保護者がワクチン接種を希望し、調査(採血を含む)に同意した小児を調査対象者に登録した。その年齢別内訳を表 1 に示した。

A/ニューカドニア/20/99(H1N1)(以下「A/ニューカドニア」)、A/パナマ/2007/99(H3N2)(以下「A/パナマ」)、B/山東/7/97(以下「B/山東」)の 3 種混

合ワクチン(抗原含有量:各株 HA 蛋白 30 μ g/mL)を 0~5 歳児に対しては 0.25mL、6~12 歳児に対しては 0.5mL を 4 週間間隔で 2 回皮下接種した。

調査対象者の属性は、医療機関記入用調査票により、性、生年月日、前シーズン(2002/2003 年)のインフルエンザ様疾患の罹患歴、前シーズンのインフルエンザワクチンの接種歴、今シーズン(2003/2004 年)のインフルエンザワクチン接種年月日、採血年月日の情報を得た。ワクチンの副反応は、接種後 48 時間以内の全身副反応(37.5℃以上の発熱、発疹)と局所副反応(発赤、腫脹、硬結)について保護者からの返信用はがきにより情報を得た。

HI 抗体測定は調査対象者について、ワクチン接種前、1 回接種 4 週間後、2 回接種 4 週間後の 3 回採血を行い、赤血球凝集抑制(HI)抗体を測定した。HI 抗体測定は、WHO 方式により 10 倍から 2 倍階段希釈した血清 25 μ L に 2003 年度ワクチン株(デンカ生研)3 株の抗原 4HA 単位/25 μ L および 0.5%ヒヨコ赤血球 50 μ L

を添加する方法により行い、HI を示した血清の希釈倍数を抗体価とした。

(倫理面への配慮)

調査対象者には、調査にあたった医師が本調査の意義を説明し同意を得た。

C. 研究結果

1. ワクチン接種による抗体産生に影響する要因

ワクチン接種前抗体価が 20 倍以下の者を対象として、抗体価の上昇状況の年齢間比較を Wilcoxon 順位和検定により行ったところ、A/ニューカドニア、A/パナマ、B/山東のいずれも 1 回接種後では 2~5 歳児は 0~1 歳児に比べ有意 ($p < 0.05$) に上昇した。また、A/ニューカドニアでは 2~5 歳児と 6~12 歳児とでは有意差は認められなかったが、A/パナマおよび B/山東では 6~12 歳児より 2~5 歳児のほうが有意 ($p < 0.05$) に上昇した(表 2)。これらの結果から、年齢については、0~1 歳児、2~5 歳児、6~12 歳児の 3 区分にカテゴリー化し、以後の検討を行うこととした。

ワクチン接種による抗体価の上昇状況を分かりやすくするため、接種前 vs 1 回接種後、1 回接種後 vs 2 回接種後の抗体価をそれぞれ x 軸、y 軸としてプロットし図 1~3 に示す。これらの抗体価分布、ワクチン接種による抗体価 2 管以上の上昇者割合を比較すると、A/ニューカドニアと A/パナマでは比較的良好で類似した上昇傾向を示したが、B/山東では両株のような傾向はみられなかった。また、ワクチン 1 回(2 回)接種前抗体価 20 倍以下対象者の 1 回(2 回)接種後 2 管以上上昇者割合を株および年齢区分別に比較すると、上昇者割合は A/ニューカドニア、A/パナマ、B/山東の順であり、いずれの株においても、0~1 歳児では 1 回接種後より 2 回接種後のほうが高く(A/ニューカドニアおよび A/パナマでは $p < 0.05$ で有意)、2~5 歳児および 6~12 歳児では 1 回接種後より 2 回接種後のほうが逆に低くなった(A/パナマの 2~5 歳児、B/山東の 2~5 歳児および 6~12 歳児では $p < 0.05$ で有意)(図 4)。

また、ワクチン 1 回(2 回)接種前抗体価が 20 倍以下の対象者が 1 回(2 回)接種で感染防御水準の 40 倍以上に上昇した者の割合を株および年齢区分別に比較すると、2 管以上の上昇状況と同様にいずれの株においても、0~1 歳児では 1 回接種後より 2 回接種後のほうが高く(A/ニューカドニアでは $p < 0.05$ で有意)、2~5 歳児および 6~12 歳児では 1 回接種後より 2 回接種後のほうが低くなった(A/ニューカドニアおよび A/パナマの 2~5 歳児では $p < 0.05$ で有意)(表 3)。

一方、ワクチン接種前抗体価が 20 倍以下の対象者における接種後 2 管以上上昇に影響する要因を多重ロジスティックモデルにより解析したところ、解析対象者を 1 回接種前抗体価が 20 倍以下の 1~5 歳児に制限した場合、1 回接種後の 1 歳児に対する 2~5 歳児の調整オッズ比は A/ニューカドニアでは 2.55 と有意 (p 値 0.047) となり、A/パナマおよび B/山東では有意ではなかったが同様に 1 を越える調整オッズ比(それぞれ 1.18 および 1.53)が得られ、Wilcoxon 順位和検定と同様の結果であった。また、前シーズンにワクチン接種を受けなかった者に対する受けた者の調整オッズ比は、A/ニューカドニアでは 2.45 (p 値 0.044)、A/パナマでは 2.38 (p 値 0.027)、B/山東では 1.98 (p 値 0.12) と前 2 株で有意となったことから、その影響をより詳細に検討するため、説明変数から年齢を除外し、解析対象者を 1 歳児のみに制限した場合と、2~5 歳児のみに制限した場合で解析したところ、前者の場合は、いずれの株においても前シーズンのワクチン接種歴が有意 ($p < 0.05$) に影響したが、後者の場合はいずれも有意にはならなかった。これらの結果から、1 歳児は 2 歳児以上に比べ抗体産生が悪く、その要因は前シーズンにおけるワクチン接種の有無、すなわち前シーズンにワクチン接種を受けなかった 1 歳児の抗体産生が最も悪くなることが明らかとなった。

解析対象者を 1 回接種前抗体価が 20 倍以下の 2~12 歳児に制限し、2~5 歳児と 6~12 歳児にカテゴリー化した年齢を説明変数とした場合、