2. PR8株自身は、長年発育鶏卵で継代されており、ヒトに対するリスクは、通常流行しているインフルエンザウイルス株よりも低い。ただし、ヒト由来のウイルス株であるので、ヒトへの感染性はある程度保持している可能性がある。以前ソ連および中国において PR8株の伝播流行が報告されたことがあるが、それについては確実な根拠が無く、またその後、同様の報告はない。

3. 導入される弱毒型（解列部位にアルギニン残基を1つのみ持つ）のHA遺伝子およびNA遺伝子およびその発現蛋白については、ヒトに対する毒性は通常のインフルエンザウイルス以上のリスクは考えにくい。

4. マウスならびに哺乳類に対する病原性を規定するPB2およびNS1の特定変異については、いずれもPR8株に由来するので、鳥ウイルスに由来する高いリスクは存在しない。

5. 我が国のワクチン製造メーカーの製造設備(BSL2+) を考慮すると、従業員への感染のリスクおよび環境への汚染の可能性は極めて低いと判断される。

D. 考察

・今回まとめた最終案に沿って、我が国におけるインフルエンザワクチン製造株の開発に関するガイドラインを作製する必要がある。

特に、BSL3のH5N1ウイルスのおけるリバース・ジェネティクス操作は、 外部への汚染防止というバイオセフティーの規制と、外部からの混入汚染の防止という品質保証の規制の、お互いに矛盾する条件を満足させねばならず、こ

の解決は技術的にも容易ではない。前者につい

てはBSL3実験室が要求され、後者についてはGMPに準じた構造施設と運用が要求される。

この両者を満足させる施設は、我が国には存在しない。そこで、来年度において、感染研にこのような施設の建設が予定されており、これによって、安全性と品質確保という両条件を満たす、インフルエンザワクチン製造株の開発が可能となろう。

・WHOのガイドライン(2003)に沿って、現在開発中のH5N1型試験ワクチン製造に関してリスク評価を行ったところ、製造株(NIGRG-14) に関して特にバイオセフティー上で問題となる点は指摘できなかった。我が国のワクチンメーカーの製造設備を考慮すると、極めて安全性の高い製造株であると判断された。

今後は、昨年度にまとめた最終案に沿って、我が国におけるインフルエンザワクチン製造株の開発に関するガイドラインを作製する必要がある。

特に、BSL3のH5N1ウイルスのおけるリバース・ジェネティクス操作は、 外部への汚染防止というバイオセフティーの規制と、外部からの混入汚染の防止という品質保証の規制の、お互いに矛盾する条件を満足させねばならず、この解決は技術的にも容易ではない。前者についてはBSL3実験室が要求され、後者についてはGMPに準じた構造施設と運用が要求される。

この両者を満足させる施設は、我が国には存在しない。そこで、来年度において、感染研にこのような施設の建設が予定されており、これによって、安全性と品質確保という両条件を満たす、インフルエンザワクチン製造株の開発が可能となろう。

E. 結論

・最近、安全で効率のよりワクチン製造株の緊急開発を可能とする遺伝子操作技術（リバース・ジェネティクス）が開発されてきた。現在東アジアで流行し、ヒトにおける新型インフルエンザへ進展することが危惧されているH5N1型高病原性鳥インフルエンザに対するワクチンの緊急開発に際しては、この技術をワクチン株の開発に応用・実用化する必要がある。しかし、この技術の使用方法およびそれによるワクチン候補株の開発に関しては、特別な注意事項等が無く、安全性に関する規制の必要性が指摘されている。そこで、WHO世界インフルエンザ計画と協力して、遺伝子組換え操作、バイオセフティーおよび生物学的製剤の品質管理の面から、本遺伝子操作技術を用いたインフルエンザワクチン株開発に関する基本的問題を検討し、その基本指針をまとめた。

・最近、安全で効率のよりワクチン製造株の緊急開発を可能とする遺伝子操作技術（リバース・ジェネティクス）が開発されてきた。最近東アジアで流行し、ヒトにおける新型インフルエンザへ進展することが危惧されているH5N1型高病原性鳥インフルエンザに対するワクチンの緊急開発に際しては、この技術をワクチン株の開発に応用・実用化する必要がある。そこで、WHO世界インフルエンザ計画と協力して、遺伝子組換え操作、バイオセフティーおよび生物学的製剤の品質管理の面から、本遺伝子操作技術を用いたインフルエンザワクチ

ン株開発に関する基本的問題を検討し、その基本指針をまとめた。

今回は、この指針に沿って、現在開発中のH5N1型ワクチン製造株(NIBRG-14)のバイオセフティー上のリスク評価を行い、WHO基準を満たした安全性の高い物であると評価された。

F. 健康危険情報　なし

G. 研究発表

1 論文発表

J. McKimm-Breschkin, T. Trivedi, A. Hampson, A. Hay, A. Klimov, M. Tasihro, F. Hayden, M. Zambon Neuraminidase sequence analysis and susceptibilities of influenza virus clinical isolates to Zanamivir and Oseltamivir. Antimicrobial agents and Chemotherapy 47, 2264-2272, 2003

N. Nakajima, Y. Asahi-Ozaki, N. Nagata, Y. Sato, F. Dizon,F.J.Paladin, R. M. Olveda, T. Odagiri,M. Tashiro, T. Sata SARS corona virus-infected cells in lung detected by new in-situ hybridization technique. Jpn. J. Infect. Dis. 56, 139-141, 2003

C. Kawakami, T. Saito, Y. Nakaya, S. Nakajima, T. Munemura, M. Saikusa, Y. Noguchi, K. Fujii, M.Takaoka, R. Ito, T. Saito, T. Odagiri, M. Tashiro Isolation of influenza A H1N2 viruses from an outbreak in Yokohama city during the 2001-2002 influenza season in Japan. Jpn. J. Infect. Dis. 56, 110-113, 2003

Saito,T.,W. Lim, and M. Tashiro. :Attenuation of a human H9N2 influenza virus in mammalian host by reassortment with an avian influenza virus. Arch. Virol 149:1397-1407,2004

Saito,T., Nakaya,Y., Suzuki,T., Ito,R., Saito,T., Saito,H., Takao,S., Sahara,K., Odagiri,T., Murata,T.,Usui,T., Suzuki,Y., and Tashiro, M.:Antigenic alteration of influenza B virus associated with loss of a glycosylation site due to host-cell adaptation.J. Med. Virol. 74:336-343,2004

T. Iwasaki, S. Itamura, H. Nishimura, Y. Sato, M.Tashiro,T.Hashikawa,T. Kurata.:Productive infection in the murine central nervous system with avian influenza A (H5N1) after intranasal inoculation.Acta Neurapathol. 108: 485-492,2004.

Kidokoro, M., Tashiro, M., Shida, H. :Genetically stable and fully effective smallpox vaccine strain constructed from highly attenuated vaccinia LC16m8. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102; 4152-4157, 2005

Kubota, T., Yokosawa, N., Yokota, S., Fujii, N., Tashiro, M., Kato, A.: The mumps virus V protein antagonizes interferon without accompanying the complete degradation of STAT1. J.Virol.79; 4451-4459, 2005.

Horimoto T, Takada A, Fujii K, Goto H, Hatta M, Watanabe S, Iwatsuki-Horimoto K, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Yamada S, Ito H, Ito T, Imai M, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Lim W, Guan Y, Peiris M, Kawaoka Y.:The development and characterization of H5 influenza virus waccines derived form a 2003 human isolate. Vaccine

Members of the World Health Organizationユs Global Influenza Program and collaborating laboratories; Amanda Balish (6), Niranjan Bhat (6), Rick A. Bright (6), Hua-lan Chen (9), Nancy J. Cox (6), Aaron Curns (6), Julia Desheva (6), Nguyen Hong Diep (19), Ruben O. Donis (6), Scott F. Dowell (14), Nguyen Tien Dung (17), Lindsay Edwards (6), Keiji Fukuda (6), Alan Hampson (2), Nguyen Thi Hong Hanh (18), Scott Harper (6), Alan Hay (5), Masaki Imai (4) , Samadhan Jadhao (6), Chun Kang (12), Jackie Katz (6), Alexander Klimov (6), Phuong Song Lien (19), Wilina Lim, et al (8) , Stephen Lindstom (6), Jan Mabry (6), Taronna Maines (6), Masaje Mase (11), Marie-Jo Medina (6), Yumi Matsuoka (6), Doan Nguyen (6), Ai Ninomiya (4), Masatsugu Obuchi (4), Takato Odagiri (4), Malik Peiris (10), Takehiko Saito (4), Somchai Sangkitporn (13), Michael Shaw (6) , James M. Simmerman (14), Catherine Smith (6), Erica Spackman (7), Klaus Stohr (1), David Suarez (16), David E Swayne (16), Masato Tashiro (4), Pranee Thawatsupha (13), Terrence Tumpey (6), Timothy Uyeki (6), Sylvie Van der Werf (3) , Robert Webster (7) , John Wood, et al (15), Richard Webby (7), Xiyan Xu (6), Guan Yi (10): Evolution of H5N1 avian influenza viruses in Asia: antigenicity, antiviral drug sensitivity and vaccine development. Emerg. Infect. Dis. 2005

学会発表　なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項無し

平成15-17年度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

研究者　河岡義裕　東京大学　医科学研究所　教授

研究要旨: 近年、アジアを中心に高病原性H5N1鳥インフルエンザが流行している。ヒトへの感染の報告は日々増加しており、これまでにタイ、ベトナム、カンボジア、インドネシア、中国、トルコ、イラクの7カ国で確認されている。本邦でも、山口、大分、京都にて家禽への感染が発覚した。幸い日本国内での流行は終息したが、国内分離株はタイやベトナムの株と抗原性が若干、異なることが報告され、再流行への事前対策の一環として国内分離株に対するワクチン株の作製が重要であると考えられる。本研究では、新型インフルエンザに対応するためのヒト用ワクチン作製のため、発育鶏卵で良く増殖するバックボーンとなるウイルス株を組換え操作法を用いて作製し、その増殖性と病原性を調べた。次に、強毒株の流行に対処する新たなワクチン開発法として注目されているリバースジェネティクスにて、山口県での分離株を用いワクチン株の作製を試みた。得られたウイルスは、発育鶏卵においてよく増殖した。すなわち、リバースジェネティクスを用いて、日本国内分離株に対するワクチン候補株を作製することができた。一方、強毒株の流行に対処する新たなワクチン開発法として注目されているリバースジェネティクス法の改良を試みた。これまで、12 種類のプラスミドを同時にトランスフェクションしていたが、新しいプラスミドを作製し、4つのプラスミドのみでリバースジェネティクスが出来る系を確立した。これにより、安定したウイルス作製効率が得られ、ワクチン開発が容易となる。

A. 研究目的

２００３年暮れから２００４年にかけて、日本を含むアジア諸国においてＨ５Ｎ１ウイルスが家禽において流行した。その後、一度は収まったかに思われたヒトへの感染は、２００４年７月以降、再び増加し、これまでにベトナム、タイ、カンボジア、インドネシア、中国、トルコ、イラクの７ヶ国で確認されており、その数は日々増加している。今のところ、ヒトからヒトへの感染は限られているが、ヒトからヒトへ効率よく伝播する能力を持つ新型ウイルスが出現した場合、未曾有のパンデミックとなる恐れがある。本研究の目的は、遺伝子組換え技術を用いて作製するワクチン株のバックボーンなるウイルス株の増殖性と病原性を調べる。

近年注目されているリバースジェネティクス法を用いて山口分離株の弱毒改変型組換えウイルスの作製を試みる。および、強毒株の流行に対処する新たなワクチン開発法として注目されているリバースジェネティクス法の改良を試みることを目的とした。

B. 研究方法

・組換えワクチンのバックボーンとなるウイルスとして、発育鶏卵でよく増殖する A/Pueruto Rico/8/34 (H1N1)ウイルスを選んだ。リバース・ジェネティクス法により本ウイルスを作製するために、必要なプラスミドを、ヒト腎臓２９３Ｔ細胞に導入し、培養上清中のウイルスを回収した。

・回収されたウイルスの発育鶏卵における増殖性と病原性を調べた。

・A/Yamaguchi/7/04(H5N1)のHAおよびNA分節をリバースジェネティクス用 pPol I プラスミドにクローニングした後、HA の開裂部位配列 (RERRKKR) を三種類の弱毒型配列 (----RETR, ----TETR, あるいはIETR) に改変した。これら改変HAおよびNAと、それ以外の遺伝子がA/Puerto Rico/8/34 (PR8; H1N1)由来のウイルスを、293T細胞を用いてリバースジェネティクス法により作製した。作製したウイルスを発育鶏卵で増殖させ、48時間後に回収した漿尿液の EID_{50}/ml (50%発育鶏卵感染価) を算出し、発育鶏卵での増殖性を評価した。

・これまでリバースジェネティクスを行う際に、ウイルスRNA合成に用いていた８種のプラス

ミド“pPolI-WSN-PB2, -PB1, -PA, -HA, -NP, -NA, -M, -NS”を、human RNA polymerase I promoter および mouse RNA polymerase I terminator を持つ1つのプラスミドにまとめた(pTM-PolI-WSN-All)。また、ポリメラーゼサブユニットについても、PB2、PB1、PAの3つを、polymerase II promoter および poly A を持つプラスミドに1つにまとめた(pC-PolII-WSN-PB2-PB1-PA)。NP は単独でクローニングした。さらに、ワクチン作製を容易にするために、ウイルス RNA 合成プラスミドから HA および NA を分けて、HA および NA を発現するプラスミド(pTM-PolI-WSN-HA-NA)および、それ以外の6つウイルス RNA を発現するプラスミド(pTM-PolI-WSN-PB2-PB1-PA-NP-M-NS) を作製した。

C. 研究結果

・プラスミドを導入したヒト腎臓293T細胞の培養上清中にウイルスが検出された。得られたウイルス遺伝子の塩基配列を解析したところ、もともとのウイルスと同じであることが確認された。

・PR8 を遺伝的背景に持つ組換えウイルスは、いずれも発育鶏卵でよく増殖し、感染 48 時間後の漿尿液にて、$10^{8.5}$ EID_{50}/ml のウイルス産出が認められた。

・リバース・ジェネティクス法により得られたウイルスを発育鶏卵に接種し、その増殖性を調べたところ、10^{10} plaque-forming unit/ml 非常に高いタイターを示した。HA価は、4000 倍以上であった。

・また、発育鶏卵に対する病原性も接種3日目までに死亡する胎児はなく、ほとんど病原性がないことがわかった。

・293T 細胞を用いたリバースジェネティクスで、pTM-PolI-WSN-All、pC-PolII-WSN-PB2-PB1-PAおよびNP発現プラスミドの3つのプラスミドの組み合わせ、あるいはpTM-PolI-SN-HA-NA、pTM-PolI-WSN-PB2-PB1-PA-NP-M-NS、pC-PolII-WSN-PB2-PB1-PAおよびNP発現プラスミドの4つのプラスミドの組み合わせで 10^{8} $TCID_{50}$/ml 程度のウイルスを得ることが出来た。さらに、これまでリバースジェネティクス効率の非常に悪かった Vero 細胞でも、10^{4} $TCID_{50}$/ml 程度のウイルスを得ることが出来た。

D. 考察

・今回人工合成した A/Puerto Rico/34 (H1N1) は、発育鶏卵で非常に良く増殖し、病原性もないことから、組換え技術を使って作製するワクチン株のバックボーンウイルスとして、理想的であることがわかった。

・ワクチン株は、発育鶏卵でよく増殖し、かつ弱毒型でなくてはならないが、今回、その条件を満たすワクチン株を作製することができ、日本国内分離株に対するワクチン開発につながった。

・これまでインフルエンザウイルスのリバースジェネティクス法では 12 種のプラスミドを同時にトランスフェクションしなくてはならず、効率よくウイルスを作出するためには 293T 細胞を用いなくてはならなかったが、本研究で 4 種のプラスミドでリバースジェネティクスを行う系を開発したことにより簡便に、また 293T 細胞以外の細胞でもウイルスを作出することが可能となった。

E. 結論

・本年度の研究から、リバース・ジェネティクス法を用いて作製する新型ウイルス用のワクチンのバックボーンウイルスを用意することが出来た。

・リバースジェネティクスを用いることにより、日本国内分離株 (A/Yamaguchi/7/04[H5N1])の発育鶏卵における病原性を弱め、さらに発育鶏卵でよく増殖するワクチン株を作製することができた。

・ヒトのワクチン作製のための製造母体として認められている培養細胞である Vero 細胞で、効率よくウイルスを作出することの出来るリバースジェネティクス法を開発したことにより、今後のワクチン開発をより容易にすることが可能となった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Horimoto T, Takada A, Iwatsuki-Horimoto K, Hatta M, Goto H, Kawaoka Y. Generation of influenza A viruses with chimeric (type A/B) hemagglutinins. **J Virol** 77:8031-8038, 2003.

Takada A, Matsushita S, Ninomiya A, Kawaoka Y, Kida H. Intranasal immunization with

formalin-inactivated virus vaccine induces a broad spectrum of heterosubtypic immunity against influenza A virus infection in mice. **Vaccine** 21:3212-3218, 2003.
Watanabe T, Watanabe A, Noda T, Fujii Y, Kawaoka Y. Exploitation of nucleic acid packaging signals to generate a novel influenza virus-based vector stably expressing two foreign genes. **J Virol** 77:10575-10583, 2003.
Garulli B, Kawaoka Y, Castrucci MR. Mucosal and systemic immune responses to a human immunodeficiency virus type 1 epitope induced upon vaginal infection with a recombinant influenza A virus. **J Virol** 78:1020-1025, 2004.
Horimoto T, Takada A, Iwatsuki-Horimoto K, Kawaoka Y. A protective immune response in mice to viral components other than hemagglutinin in a live influenza A virus vaccine model. **Vaccine** (in press).
Horimoto H, Fukuda N, Iwatsuki-Horimoto K, Guan Y, Lim W5, Peiris M, Sugii S, Odagiri T, Tashiro M, Kawaoka Y. Antigenic Differences between H5N1 Human Influenza Viruses Isolated in 1997 and 2003. **J Vet Sci** (in press).
Iwatsuki-Horimoto K, Kanazawa R, Sugii S, Kawaoka Y, Horimoto T. The index influenza A virus subtype H5N1 isolated from a human in 1997 differs in its receptor binding properties from a virulent avian influenza virus. **J Gen Virol** (in press).
Shinya K, Hamm S, Hatta M, Ito H, Ito T, Kawaoka Y. PB2 amino acid at position 627 affects replicative efficiency, but not cell tropism, of Hong Kong H5N1 influenza A viruses in mice. **Virology** (in press).
Shinya K, Fujii Y, Ito H, Ito T, Kawaoka Y. Characterization of a neuraminidase-deficient influenza A virus as a potential gene delivery vector and a live vaccine. **J Virol** (in press).

Maeda Y, Goto H, Horimito T, Takada A, Kawaoka Y. Biological Significance of the U Residue at the -3 Position of the mRNA Sequences of Influenza A Viral Segments PB1 and NA. **Virus Res** (in press).
Hatta M, Goto H, Kawaoka Y.Influenza B virus requires BM2 protein for replication.
J Virol. 2004 Jun;78(11):5576-83.
Horimoto T, Takada A, Iwatsuki-Horimoto K, Kawaoka Y.A protective immune response in mice to viral components other than hemagglutinin in a live influenza A virus vaccine model.Vaccine. 2004 Jun 2;22(17-18):2244-7.
Horimoto T, Iwatsuki-Horimoto K, Hatta M, Kawaoka Y.Influenza A viruses possessing type B hemagglutinin and neuraminidase: potential as vaccine components.Microbes Infect. 2004 May;6(6):579-83.
Neumann G, Kawaoka Y. Reverse genetics systems for the generation of segmented negative-sense RNA viruses entirely from cloned cDNA. Curr Top Microbiol Immunol. 2004;283:43-60.
Iwatsuki-Horimoto K, Horimoto T, Fujii Y, Kawaoka Y.Generation of influenza A virus NS2 (NEP) mutants with an altered nuclear export signal sequence.J Virol. 2004 Sep;78(18):10149-55.
Kiso M, Mitamura K, Sakai-Tagawa Y, Shiraishi K, Kawakami C, Kimura K, Hayden FG, Sugaya N, Kawaoka Y.Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study.Lancet. 2004 Aug 28;364(9436):759-65.
Kobasa D, Takada A, Shinya K, Hatta M, Halfmann P, Theriault S, Suzuki H, Nishimura H, Mitamura K, Sugaya N, Usui T, Murata T, Maeda Y, Watanabe S, Suresh M, Suzuki T, Suzuki Y, Feldmann H, Kawaoka Y.Enhanced virulence of influenza A viruses with the haemagglutinin of the 1918 pandemic virus. Nature. 2004 Oct 7;431(7009):703-7.
Mase M, Tsukamoto K, Imada T, Imai K, Tanimura N, Nakamura K, Yamamoto Y, Hitomi T, Kira T, Nakai T, Kiso M, Horimoto T, Kawaoka Y, Yamaguchi S.Characterization of H5N1 influenza A viruses isolated during the 2003-2004 influenza outbreaks in Japan.
Virology. 2005 Feb 5;332(1):167-76.
Fujii K, Fujii Y, Noda T, Muramoto Y, Watanabe T, Takada A, Goto H, Horimoto T, Kawaoka Y.Importance of both the Coding and the Segment-Specific Noncoding Regions of the Influenza A Virus NS Segment for Its Efficient

Incorporation into Virions. J Virol. 2005 Mar;79(6):3766-74.

Le QM, Kiso M, Someya K, Sakai YT, NguyenTH, Nguyen KHL, Pham ND, Ngyen HH, Yamada S, Muramoto Y, Horimoto T, Takada A, Goto H, Suzuki T, Suzuki Y, Kawaoka Y. Emergence of an oseltamivir-resistant H5N1 influenza A virus. ***Nature*** 437:1108, 2005.

Horimoto T, Kawaoka Y. Influenza: Lessons from past pandemics, warnings from current incidents. ***Nature Rev Microbiol*** 8:591-600, 2005.

Neumann G, Fujii K, Kino Y, Kawaoka Y. An improved reverse genetics system for influenza A virus generation and its implications for vaccine production. ***Proc Natl Acad Sci*** 102:16825-16829, 2005.

Maeda Y, Hatta M, Takada A, Watanabe T, Goto H, Neumann G, Kawaoka Y. Live bivalent vaccine for parainfluenza and influenza virus infections. ***J Virol*** 79:6674-6679, 2005.

Shinya K, Hatta M, Yamada S, Takada A, Watanabe S, Halfmann P, Horimoto T, Neumann G, Lim W, Guan Y, Peiris M, Suzuki T, Suzuki Y, Kawaoka Y. Characterization of a human H5N1 influenza A virus isolated in 2003. ***J Virol*** 79:9926-9932, 2005.

Hatakeyama S, Sakai-Tagawa Y, Kiso M, Goto H, Kawakami C, Mitamura K, Sugaya N, Suzuki Y, Kawaoka Y. Enhanced expression of an α2,6-linked sialic acid on MDCK cells improves the isolation of human influenza viruses and theevaluation of their sensitivity to a neuraminidase inhibitor. ***J Clin Micro*** 43:4139-4146, 2005.

Suzuki T, Takahashi T, Guo C-T, K.I.-P. J Hidari, Miyamoto D, Goto H, Kawaoka Y, Suzuki Y. Sialidase activity of influenza A virus in an endocytic pathway enhances viral replication. ***J Virol*** 79:11705-11715, 2005.

Parrish C, Kawaoka Y. The origins of new pandemic viruses: the acquisition of new host ranges by canine parvovirus and influenza A viruses. ***Annu. Rev. Microbiol*** 59:533-86, 2005

Kobasa D, Kawaoka Y. Emerging influenza viruses: past and present. ***Curr Mol Med.*** 5:791-803, 2005.

Muramoto Y, Ozaki H, Takada A, Park CH, Sunden Y, Umemura T, Kawaoka Y, Matsuda H, Kida H. Highly Pathogenic H5N1 Influenza Virus Causes Coagulopathy in Chickens. ***Microbiol Immunol.*** 50:73-81, 2006.

Noda T, Sagara H, Yen A, Takada A, Kida A, Cheng RH, Kawaoka Y. Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. ***Nature*** 439:490-492, 2006.

Muramoto Y, Takada A, Fujii K, Noda T, Iwatsuki-horimoto K, Watanabe S, Horimoto T, Kida H, Kawaoka Y. Hierarchy among vRNA segments in their role in vRNA incorporation into influenza A virions ***J Virol.*** (in press)

Horimoto, T., Takada, A., Fujii, K., Goto, H., Hatta, M., Watanabe, S., Iwatsuki-Horimoto, K., Ito, M., Tagawa-Sakai, Y., Yamada, S., Ito, H., Ito, T., Imai, M., Itamura, S., Odagiri, T., Tashiro, M., Lim, W., Guan, Y., Peiris, M., and Kawaoka, Y. The development and characterization of H5 influenza virus vaccines derived from a 2003 human isolate. ***Vaccine*** (in press)

2．学会発表

河岡義裕、インフルエンザウイルス、第26回日本医学会総会(福岡)
2003年4月5日

河岡義裕、Enigmas of Influenza Viruses&Cells(ITALY)
2003年5月19日

河岡義裕、インフルエンザウイルスの病原性、第50回日本実験動物学会総会(埼玉)2003年5月31日

河岡義裕、PACKAGING MECHANISM OF INFLUENZA VIRAL RNA、Negative Strand Viruses 2003(ITALY)2003年6月15日

堀本泰介、高田礼人、堀本研子、五藤秀男、河岡義裕、GENERATION OF INFLUENZA A VIRUSES WITH CHIMERIC(TYPE A/B)HEMAGGLUTININS、Negative Strand Viruses 2003(ITALY)2003年6月15日

五藤秀男、河岡義裕、ADDITIONAL PROCESSES EXIST THAT AFFECT HA CLEAVAGE BY A PIASMINOGEN-ACTIVATING NA、NegativeStrand Viruses 2003(ITALY)
2003年6月15日

堀本研子、河岡義裕、堀本泰介、DIFFERENCE IN RECEPTOR BINDIND BETWEEN THE INDEX H5N1 HUMAN ISOLATE FROM 1997 AND A VIRULENT AVIAN INFLUENZA VIRUS、
Negative Strand Viruses 2003(ITALY)2003年6月15日
野田岳志、相良洋、喜田宏、河岡義裕
CLOSE-UP OF INFLUENZA A VIRUS RNPS、
Negative Strand Viruses 2003(ITALY)2003年6月15日
河岡義裕、インフルエンザ最近の知見、第10回ヘルペス感染症フィーラム(東京)2003年8月23日
五藤秀男、河岡義裕、A LOSS OF THE OLIGOSACCHARIDE CHAIN IN THE NA IS NOT ADEFINITIVE FACTOR FOR PLASMINOGEN-MEDIATED HA CLEAVAGE. 2nd Orthomyxoviruses Research Conference(U.S.A.)2003年8月21日
堀本泰介、高田礼人、堀本研子、八田正人、五藤秀男、河岡義裕
GENERATION OF INFLUENZA A VIRUSES WITH CHIMERIC(TYPE A/B)HEMAGGLUTININS、
第3回あわじしま感染症・免疫フォーラム(兵庫)、2003年8月27日
堀本泰介、高田礼人、堀本研子、八田正人、五藤秀男、河岡義裕
Potential for use of influenza A viruses with chimeric(type A/B)hemagglutinins as vaccines.
Options for the Control of Influenza V(沖縄)、2003年10月10日
高田礼人、松下幸子、二宮愛、河岡義裕喜田宏
Intranasal Immunization with Formalin-Inactivated Virus Vaccine Induces ABroad Spectrum of Heterosubtypic Immunity Against Influenza Virus Infection in Mice.
Options for the Control of Influenza V(沖縄)、2003年10月10日
堀本泰介、堀本研子、藤井健、渡辺登喜子、藤井豊、河岡義裕
9本鎖インフルエンザウイルスベクター、第51回日本ウイルス学会学術集会・総会(京都)、2003年10月28日
五藤秀男、河岡義裕
A型インフルエンザノイラミニダーゼの新規機能に関する研究、第51回日本ウイルス学会学術集会・総会(京都)、2003年10月28日
村本裕紀子、高田礼人、藤井健、堀本研子、渡辺真治、喜田宏、河岡義裕 インフルエンザウイルス PB2 遺伝子分節のパッケージングと粒子形成に及ぼす影響、第51回日本ウイルス学会学術集会・総会(京都)、2003年10月28日
藤井健、高田礼人、堀本泰介、五藤秀男、堀本研子、伊藤睦美、前田寧子、八田正人、渡辺真治、伊藤啓史、伊藤壽啓、二宮愛、今井正樹、西藤岳彦、板村繁之、小田切孝人、田代眞人、河岡義裕
2003年にヒトから分離されたH5N1インフルエンザウイルスの弱毒改変型HAをもつ組換えワクチン候補株の作出、第51回日本ウイルス学会学術集会・総会(京都)、2003年10月28日
河岡義裕、インフルエンザウイルス核蛋白質複合体の構造、第26回日本分子生物学会年会(神戸)2003年12月11日
堀本研子、堀本泰介、藤井豊、河岡義裕 A型インフルエンザウイルス NS2(NEP)蛋白質のNES配列の機能解析、第2回感染症若手研究者沖縄フォーラム（沖縄）2004年2月12日村本裕紀子、高田礼人、藤井健、野田岳志、堀本研子、渡辺真治、喜田宏、河岡義裕、A型インフルエンザウイルス PB2、PB1およびPA遺伝子分節のパッケージングと粒子形成への関与、第2回感染症若手研究者沖縄フォーラム（沖縄）2004年2月12日
河岡義裕、インフルエンザ、日本感染症学会(東京)、2004年4月6日
村本裕紀子、高田礼人、藤井健、堀本研子、渡辺真治、喜田宏、河岡義裕、A型インフルエンザウイルス PB2 遺伝子分節のパッケージングと粒子形成に必要な領域、第137回日本獣医学会、(藤沢)、2004年4月4日
村本裕紀子、高田礼人、藤井健、野田岳志、岩附（堀本）研子、渡辺真治、喜田宏、河岡義裕、Identification of the regions important for virion incorporation of PB2, PB1, and PA vRNA segments of influenza A virus. The Awaji International Forum an Infection and Immunity （兵庫県淡路島)、

2004年8月30日
山田晋弥、藤井健、伊藤睦美、堀本研子、田川優子、高田礼人、五藤秀男、城野洋一郎、堀本泰介、河岡義裕、H5N1 インフルエンザウイルス山口株の弱毒改変型HAをもつワクチンの化血研 VERO 細胞を用いての試作、第138回日本獣医学会（札幌）、2004年9月11日
岩附（堀本）研子、前田潤子、堀本泰介、河岡義裕、インフルエンザウイルス M2 蛋白質の細胞質領域とウイルス粒子形成、第138回日本獣医学会（札幌）、2004年9月11日
河岡義裕、インフルエンザ：その制圧は？、第７７回日本生化学学会（横浜）、2004年10月14日
河岡義裕、新型インフルエンザウイルス、第４５回熱帯医学会大会（東京）、2004年10月16日
堀本泰介、河岡義裕、Influenza vaccines by reverse genetics. First China-Japan Bilateral Symposium on avian Influenza (China)、2004年10月18日
河岡義裕、Influenza pathogenesis、第1回中日鳥インフルエンザシンポジウム（北京）、2004年10月18日
河岡義裕、Why Influenza Kills … and will Kill Again、44TH ICAAC(U.S.A.)、2004年10月30日
山田晋弥、新矢恭子、高田礼人、五藤秀男、鈴木隆、鈴木康夫、堀本泰介、河岡義裕、鳥インフルエンザウイルスの宿主域変化におけるウズラの役割、第3回感染症若手研究者沖縄フォーラム（沖縄）2004年11月6日
藤井健、岩附（堀本）研子、堀本泰介、河岡義裕、シークエンス・トラップ法を用いたインフルエンザウイルスのゲノム・パッケージングシグナルの解析、第52回日本ウイルス学会学術集会（横浜、2004年11月21日
岩附（堀本）研子、野田岳志、渡辺真治、村本裕紀子、藤井健、前田潤子、堀本泰介、河岡義裕、インフルエンザウイルス M2 蛋白質の細胞質領域とウイルス粒子形成、第52回日本ウイルス学会学術集会（横浜）、2004年11月21日
堀本泰介、藤井健、山田晋弥、伊藤睦美、岩附（堀本）研子、坂井（田川）優子、高田礼人、五藤秀男、城野洋一郎、河岡義裕、H5N1 インフルエンザワクチン候補株の Vero 細胞を用いての試作、第52回日本ウイルス学会（横浜）、2004年11月21日
木曽真紀、三田村敬子、坂井（田川）優子　白石京子、川上千春、菅谷憲夫、河岡義裕、小児におけるオセルタミビル耐性インフルエンザウイルスの出現、第52回日本ウイルス学会（横浜）、2004年11月22日
河岡義裕、インフルエンザウイルスの謎、第52回日本ウイルス学会学術集会（横浜）2004年11月22日
河岡義裕、Why Influenza kills…and will kill again、第３４回日本免疫学会（札幌）、2004年12月2日
藤井健、岩附（堀本）研子、堀本泰介、河岡義裕、インフルエンザウイルスのゲノム・パッケージングに必要な塩基配列、第27回日本分子生物学会、20004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、鳥インフウ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 Noda, T., Sagara, H., Takada, A., Kida, H., Kawaoka, Y. Ultrastructural analysis of an architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virions; an implication of selective packaging of segmented genome. Asia-Pacific international Molecular Biology Network Meeting. Hanoi, 2005, May.
Iwatsuki-Horimoto, K., Horimoto, T., Noda, T., Kiso, M., Maeda, J., Watanabe, S., Muramoto, Y., Fujii, K., Kawaoka, Y. The cytoplasmic tail of the influenza A virus M2 protein plays a role in viral assembly. XIIIth International Congress of Virology, San Francisco, 2005, Jul.
Fujii, K., Iwatsuki-Horimoto, K., Horimoto, T., Kawaoka, Y. Are specific nucleptides required

for influenza viral genome incorporation into virions? XIIIth International Congress of Virology, San Francisco, 2005, Jul.

Yamayoshi, S., Goto, H., Noda, T., Fujii, K., Kawaoka, Y. A FLAG and HA Tandem Epitope-tagged System for Analyzing Viral/host Protein Interactions XIIIth International Congress of Virology, San Francisco, 2005, Jul.

Muramoto, Y., Takada, A., Fujii, K., Noda, T., Iwatsuki-Horimoto, K., Watanabe, S., Horimoto, T., Kida, H., Kawaoka, Y. The importance of the coding regions of the influenza virus polymerase genes for virion incorporation. XIIIth International Congress of Virology, San Francisco, 2005, Jul.

Neumann, G., Fujii, K., Kino, Y., Kawaoka, Y. Improved reverse genetics system for influenza A virus generation and its implications for vaccine production. XIIIth International Congress of Virology, San Francisco, 2005, Jul.

Goto, H., Fujii, K., Ozawa, M., Muramoto, Y., Kawaoka, Y. The structures formed by both the non-coding and coding regions of influenza A virus NP segment are important for virus replication. XIIIth International Congress of Virology, San Francisco, 2005, Jul.

Yamada, S., Shinya, K., Takada, A., Goto, H., Suzuki, T., Suzuki, Y, Horimoto, T., Kawaoka, Y. Adaptation of A duck influenza A virus in Quail. XIIIth International Congress of Virology, San Francisco, 2005, Jul.

Hatta, M., Maeda, Y., Shinya, K., Watanabe, S., Kim, J. H., Kawaoka, Y. Pathogenicity of H5N1 influenza A viruses isolated from humans and birds in Vietnam in 2004. XIIIth International Congress of Virology, San Francisco, 2005, Jul.

Kiso, M., Tagawa, Y. S., Shiraishi, K., Mitamura, K., Kawakami, C., Kimura, K., Sugaya, Y., Kawaoka, Y. Resistant influenza viruses in children treated with Oseltamivir. XIIIth International Congress of Virology, San Francisco, 2005, Jul.

Maeda, Y., Hatta, M., Takada, A., Watanabe, T., Goto, H., Neumann, G., Kawaoka, Y. Live bivalent vaccine for parainfluenza and influenza infections. XIIIth International Congress of Virology, San Francisco, 2005, Jul.

Iwatsuki-Horimoto, K., Horimoto, T., Noda, T., Kiso, M., Maeda, J., Watanabe, S., Muramoto, Y., Fujii, K., Kawaoka, Y. The cytoplasmic tail of the influenza A virus M2 protein plays a role in viral assembly. Vth Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, 2005, Sept.

堀本泰介、村本裕紀子、藤井健、山田晋弥、岩附研子、城野洋一郎、河岡義裕 「インフルエンザ不活化ワクチンの製造基材である発育鶏卵でより効率よく増殖する H5N1 ワクチンシードウイルス候補株の作出」第 53 回日本ウイルス学会総会、横浜、2005 年 11 月

藤井健、山吉誠也、五藤秀男、河岡義裕「A 型インフルエンザウイルス NP 蛋白質の核内における動態」第 53 回日本ウイルス学会総会、横浜、2005 年 11 月

藤井健、福田宏之、大海忍、小澤真、山吉誠也、五藤秀男、河岡義裕「A 型インフルエンザウイルス NP 蛋白質の核内局在と細胞性因子との相互作用解析」第 28 回日本分子生物学会、福岡、2005 年 12 月

Nidom, C. A., Iwatsuki-Horimoto, K., Indiyanti, N. P. L., Kawaoka, Y. Molecular analysis H5N1 subtype of avian influenza virus genome in Indonesia. 2005 CAS-JSPS Asian Science Seminar, Tianjin, 2005, Dec.

Yamayoshi, S., Goto, H., Noda, T., Fujii, K., Kawaoka Y. A FLAG and HA tandem epitope-tagged system for analyzing viral/host protein interactions. 2005 CAS-JSPS Asian Science Seminar, Tianjin, 2005, Dec.

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

平成15-17年度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

遺伝子操作技術で作製した弱毒化H5N1ウイルスの性状に関する研究

分担研究者：今井　正樹（国立感染症研究所ウイルス第3部主任研究官）
共同研究者：喜田　宏（北海道大学大学院獣医学研究科教授）

研究要旨　リバースジェネティクス技術により弱毒化した組み換え H5N1 インフルエンザウイルスの病原性を確認するため、ウイルスのニワトリに対する病原性試験ならびにトリプシン依存性増殖試験を行った。その結果、組み換えウイルスはニワトリに対して強い病原性を示さず、トリプシンに依存して増殖することがわかった。従って、このウイルスはニワトリに対して十分に弱毒化されていることが確認された。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、これらがリバースジェネティクス技術に利用できるかどうかを検討した。2005年にベトナム患者から分離されたH5N1ウイルスを基にリバースジェネティクス技術を用いて弱毒化組換えウイルスを作製し、その増殖性および抗原性を調べた。その結果、このウイルスは発育鶏卵でよく増殖し、その抗原性は基の野生株と同じであることが分かった。さらに、培養細胞を用いたトリプシン依存性試験により、このウイルスのHA蛋白質は弱毒型であることが確認できた。

A. 研究目的

2003年から始まった家禽における高病原性鳥インフルエンザウイルスH5N1の大流行は、アジアから欧州、アフリカへと拡大し、各地に大きな経済被害をもたらした。東アジアや中近東では、高い死亡率を伴うヒト感染例が報告され、H5N1ウイルスによる新型インフルエンザの出現と流行が懸念されている。

インフルエンザに有効なワクチンを開発するには、流行しているウイルスの性状を把握し、流行ウイルスと抗原性が一致したワクチン製造株を準備することが必要である。2005年にベトナムで流行したH5N1ウイルスの一部は、抗原解析の結果、2004年に開発されたワクチン製造株から抗原変異していることが判明した。このため、2005年の抗原変異株の流行に備えた新たなワクチン開発が必要となった。本研究では

・リバースジェネティクス(RG)遺伝子操作技術を用いて弱毒化したワクチン候補株の病原性を確認するためにウイルスのニワトリに対する病原性試験ならびにトリプシン依存性増殖試験を行った。

・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、これらがリバースジェネティクス法に使用可能かどうかを検討した。

・2005年にベトナム患者から分離されたH5N1ウイルスを基に試作ワクチン株を作製し、その増殖性、抗原性、トリプシン依存性について解析した。

B. 研究方法

(1)H5N1 組み換えウイルスの作製

発育鶏卵で高増殖する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作製し、これらを細胞に導入して、感染性ウイルス粒子を回収した。同様に、A/Hong Kong/213/03（H5N1）（強毒型HK213)ウイルスのHAの開裂部位を弱毒型に改変した遺伝子とNA遺伝子を作製し、HK213ウイルス(弱毒型HA、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。
(2)ウイルスのニワトリに対する病原性試験
1) Mean death time at minimum leathal dose (MDT/MLD):ウイルスを10倍段階希釈し(10^{-3}―10^{-9})、各希釈を3個ずつの9日卵齢鶏胚の尿膜腔内に0.1ml接種し、8時間ごとに5日間観察した。MDT値は全ての鶏胚が死亡する最高希釈のところで決定した。
2) Intracerebral pathogenecity index (ICPI):1日齢のニワトリ(品種:白色レグホン)10羽の脳内にウイルス感染鶏胚尿液$10^{5.5}$EID50/mlを0.1ml接種し、8日間観察した。スコア(0, normal; 1, sick; 2, dead)の合計を観察したニワトリ数で割った(最大指数 2.00=全ニワトリが24時間以内に死亡、0.00=8日間いずれのニワトリも臨床症状を示さない時)。
3) Intravenous pathogenecity index (IVPI):6週齢のニワトリ(品種:サクラ)8羽の静脈内にウイルス感染鶏胚尿液$10^{5.5}$EID50/mlを0.1ml接種し、10日間観察した。スコア(0, normal; 1, sick; 2, paralysed; 3, dead)の合計を観察したニワトリ数で割った(最大指数 3.00=全ニワトリが24時間以内に死亡、0.00=10日間いずれのニワトリも臨床症状を示さない時)。
(3)ウイルスのトリプシン依存性増殖試験
1)ウイルスのプラック形成に及ぼすトリプシンの影響:ウイルスを10倍段階希釈した後、各希釈を2組のマルチプレートウエルに培養したMDCK細胞に0.1ml接種し、一方をトリプシン(10ug/ml)を加えた培地で他方をトリプシン(-)の培地でそれぞれ2日間35.5℃で培養して、プラックの形成を観察した。
2)ウイルスの増殖に及ぼすトリプシンの影響:ウイルスを2組のシャーレに培養したMDCK細胞にMOI 0.01で接種し、一方をトリプシン(10ug/ml)を加えた培地で他方をトリプシン(-)の培地でそれぞれ3日間35.5℃で培養して、培養上清中のウイルス感染価をHA活性を指標にして測定した。
3)ウイルスHA蛋白の開裂活性化に及ぼすトリプシンの影響:ウイルスを2組のシャーレに培養したMDCK細胞にMOI3で接種し、一方をトリプシン(10ug/ml)を加えた培地で他方をトリプシン(-)の培地でそれぞれ20時間35.5℃で培養した。培養後、細胞内および細胞表面に検出されるHAを含むウイルス蛋白をA/duck/Hong Kong/820/80ウイルスに対するヤギ高度免疫血清を用いたウエスタンブロット法で検出した。
(4)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、抗A/duck/Hong Kong/739.2/02ウイルスに対するアヒル感染血清(St. Jude Children's Research Hospital、R.G. Webster博士より分与)、A/goose/Hong Kong/437/99ウイルスに対するニワトリ感染血清(St. Jude Children's Research Hospital、R.G. Webster博士より分与)を用いた赤血球凝集阻止試験を行った。
(5)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。
(6)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。
(7)組み換えウイルスの作製:*Trans*IT-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。
(8)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細胞を用いたプラック法

で測定した。
（9）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。
(10) 組換えウイルスの作製：2005 年にベトナムでヒトから分離された A/Vietnam/JPHN30321/05 (H5N1) (VNJPHN30321) 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。これらの遺伝子と A/PR/8/34 (H1N1) 株由来の遺伝子を 293T 細胞にトランスフェクションし、VNJPHN30321 株と A/PR/8/34 株とのリアソータントウイルス (弱毒型 H5N1 組換えウイルス) を回収した。
(11) ウイルスの抗原解析：A/duck/Hong Kong/820/80 に対するヤギ高度免疫血清、A/Hong Kong/213/03、A/Vietnam/1194/04、A/Vietnam/HN30259/04、VNJPHN30321、A/chicken/Kyoto/3/04、A/chicken/Anhui-choahu/85/04 の各ウイルスに対するウサギ高度免疫血清、A/Indonesia/6/05 に対するフェレット感染血清を用いて赤血球凝集阻止試験を行った。
(12) ウイルス HA 蛋白質の開裂活性化に及ぼすトリプシンの影響：2組のシャーレに培養した MDCK 細胞にウイルスを接種し、トリプシン添加 (10ug/ml) あるいはトリプシン無添加培地で9時間培養した。培養後、感染細胞内で合成される HA 蛋白質をウェスタンブロット法で検出した。

C. 研究結果と考察

(1) H5N1 組み換えウイルスの作製

PR8ウイルスのvRNA およびvRNP を発現するプラスミドを細胞に導入し、感染性ウイルス粒子の回収に成功した。これによって、PR8 ウイルスを骨組みとしたRG 系を確立した。この方法を用いて、弱毒化した H5N1 組み換えウイルスを回収した。

(2) ニワトリに対するウイルスの病原性試験

H5N1 組み換えウイルスを接種したニワトリは臨床症状を全く示さなかった(表1)。このことから、このウイルスはニワトリに対して弱毒であると判断された。

(3) ウイルスのトリプシン依存性増殖試験

1)ウイルスのプラック形成に及ぼすトリプシンの影響:H5N1 組み換えウイルスを感染させた細胞では、トリプシンを加えた培地でのみプラックが出現した。一方、強毒型 HK213 ウイルスを感染させた細胞では、トリプシン無しの条件でもトリプシン存在下と同様にプラックが出現した。
2)ウイルスの増殖に及ぼすトリプシンの影響:H5N1 組み換えウイルスを感染させた細胞では、トリプシンを加えた培地でのみ HA 活性が検出された。さらに、トリプシン非存在下で培養した細胞の上清をトリプシン処理し、これを新しい細胞に接種して3日間トリプシン存在下で培養したところ、上清中の HA 活性が検出されるようになった。これは上清中に含まれていた非活性型 HA0 をもつウイルス粒子がトリプシンにより活性化をうけたことで、感染性を獲得したためと考えられる。一方、強毒型 ウイルスを感染させた細胞では、トリプシンの有無にかかわらず HA 活性が検出された。
3)ウイルス HA 蛋白の開裂活性化に及ぼすトリプシンの影響:H5N1 組み換えウイルスを感染させた細胞では、トリプシンを加えた条件でのみ開裂した活性型 HA1 が検出された。一方、強毒型 HK213 ウイルスを感染させた細胞では、トリプシンの有無にかかわらず HA1 が検出された。

以上の結果から、H5N1 組み換えウイルスはトリプシンに依存して HA が開裂活性化し、増殖することが確認された。

(4)ウイルスの抗原解析

H5N1 組み換えウイルスはいずれの抗血清に対しても野生株である強毒型 HK213 ウイルスと同様の反応性を示した(表2)。従って、このウイルスは野生株と抗原的に同じであることがわかった。

(5) 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、1.3×10^5PFU/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。

（６）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ス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。

（７）組換えウイルスの増殖能： 293T 細胞から回収した弱毒化 H5N1 組換えウイルを発育鶏卵で継代した後、ウイルス液の感染価を EID_{50} 法で測定した。その結果、$10^{9.6}$ EID_{50}/ml と非常に高い収量のウイルス液が得られることが分かった。このことは、この組換えウイルスが発育鶏卵で効率良く増殖することを示している。

（８）組換えウイルスの抗原解析： H5N1 組換えウイルスの抗原性が野生株と同じであるかどうかを赤血球凝集阻止試験で調べた。組換えウイルスは、いずれの抗血清に対しても強毒型野生株の VNJPHN30321 ウイルスと同様の反応性を示した（表1）。したがって、このウイルスは野生株と抗原的に同じであることが明らかになった。このことは、組換えウイルスに対する抗体が強毒型ウイルスの感染を効果的に防御する可能性を示唆している。

（９）ウイルス HA 蛋白質の開裂活性化に及ぼすトリプシンの影響：組換えウイルスの HA 蛋白質が弱毒型であるかどうかを確認するために、培養細胞を用いたトリプシン依存性試験を行った。組換えウイルスを感染させた細胞では、トリプシンを加えた条件でのみ HA1 と HA2 のサブユニットに開裂した活性型 HA 蛋白質が検出された（図１）。一方、強毒型野生株の VNJPHN30321 ウイルスを感染させた細胞では、トリプシンの有無にかかわらず活性型 HA 蛋白質が検出された。以上の結果から、組換えウイルスの HA 蛋白質はトリプシンに依存して開裂活性化する弱毒型であることが確認できた。このことは、この組換えウイルスがニワトリに対してほとんど病原性を示さないことを示唆している。この組換えウイルスの病原性を更に検証するために、今後ニワトリやフェレットを使ったウイルス接種試験を実施する必要がある。

D. 結論

・RG 法により弱毒化した H5N1 組み換えウイルスを作製した。このウイルスは、ニワトリに対して強い病原性を示さず、トリプシンに依存して増殖することが確認された。さらに強毒型ウイルスと抗原的に同じであることから、ワクチン製造株として有用であることが示された。

・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。

・2005 年の強毒分離株から作製された弱毒化試作ワクチン株は発育鶏卵での増殖能が高く、その抗原性は基の強毒株と同じであることが分かった。更にこの株は弱毒型の HA 蛋白質をもっていることが確認できた。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

論文発表

1) Imai M., Watanabe S., Odagiri T. : Influenza B virus NS2, a nuclear export protein, directly associates with the viral ribonucleoprotein complex. Archives of Virology, 148: 1873-1884, 2003.

2) Watanabe S., Imai M., Ohara Y., Odagiri T. : The influenza B virus BM2 protein is transported through the *trans* Golgi network as an integral

membraneprotein. Journal of Virology, 77: 10630-10637, 2003.

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

1) Sakai T, Ohuchi M, Imai M, Mizuno T, Kawasaki K, Kuroda K, Yamashina S.:Dual wavelength imaging allows analysis of membrane fusion of influenza virus inside cells. J Virol.,80:2013-2018, 2006.

2) Gopinath SC, Misono TS, Kawasaki K, Mizuno T, Imai M, Odagiri T, Kumar PK.:An RNA aptamer that distinguishes between closely related human influenza viruses and inhibits haemagglutinin-mediated membrane fusion. J Gen Virol.,87:479-487, 2006.

2.学会発表

1) Watanabe, S., Imai, M., and Odagiri, T.: The influenza B virus BM2 protein is transported in cytoplasm through the *trans* Golgi network as an integral membrane protein. Negative Strand Viruses 2003. Pisa, Italy. June 14-19, 2003.

2) Imai, M., Watanabe, S., Ninomiya, Ai., and Odagiri, T.: Integral membrane protein BM2 of influenza B virus is a necessary component for generation of infectious virus. Options for the Control of Influenza V. Okinawa, Japan. October 7-11, 2003.

3) Imai, M., Mizuno, T., and Kawasaki, K.: Numbers of influenza hemagglutinin trimers necessary for membrane fusion: a kinetics examination with single particle analysis of reconstituted vesicles of hemagglutinin. Options for the Control of Influenza V. Okinawa, Japan. October 7-11, 2003.

4) 今井正樹、渡辺真治、二宮愛、小田切孝人：リバースジェネティクス法によるB型インフルエンザウイルスBM2変異株の作製とBM2蛋白質の機能解析、第51回日本ウイルス学会総会、京都、2003年10月

1) 今井正樹、渡辺真治、二宮愛、小渕正次、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、田代眞人：LAMP (loop-mediated isothernal 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、田代眞人、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

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成15-17年度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およびH7ウイルスに対する不活化全粒子ワクチンを作製した。これ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、血清中のHIおよび中和抗体を測定してワクチンの効果を検討した。その結果、微量の抗原でもアジュバントの使用により、効果的に血中抗体を誘導できる可能性が示された。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。今回新たに作製したワクチン株rgVNJP1203/04は、やや免疫原性が低いものの強毒ウイルスでの攻撃に対する免疫応答を誘導できること、また、アジュバントの使用で、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たH5N1高病原性鳥インフルエンザの流行は、2006年に入り、中近東、アフリカ、ヨーロッパへも広がる気配を見せている。現時点では、ヒトの感染は鳥との濃密な接触によるものがほとんどで、分離されるウイルスの遺伝子も全て鳥由来である。しかし、これらのウイルスが変異を起こ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急務となっている。
本研究では、
・共に鳥の高病原性ウイルスであるH5N1およびH7N7ウイルスに対する不活化全粒子ワクチンを作製した。これを様々な条件でマウスに投与して免疫応答を調べ、効果的なワクチン投与方法の検討を行った。
・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。
・2004年にベトナムでヒトから分離された強毒ウイルスをもとに作製した弱毒ワクチン株を用い、免疫・感染実験を行い、その効果を検討した。

B. 研究方法

<u>(I) 不活化全粒子ワクチンの作製</u>

以下のウイルス2株を精製し、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)：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)をリバースジェネティクス法で弱毒化したワクチン株

・A/mallard/NL/12/2000 (H7N3) (malNL12)：2003年にオランダでヒトから分離された強毒株A/NL/219/2003 (H7N7) (NL219)とヘマグルチニン(HA)遺伝子が近縁の弱毒株

<u>マウスの免疫実験</u>

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200ul/匹）を2週間隔で2回、マウスに皮下接種した。2回目の免疫後1週目に全採血し、血清を採取した。

<u>免疫応答の解析</u>

採取した血清を用いて、赤血球凝集阻止(HI)試験および中和試験を行った。

<u>(II) 不活化全粒子ワクチン</u>

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

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 200ul/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。

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。

・rgVNJP1203/04：2004 年 2 月にベトナムでヒトから分離された強毒株 A/Vietnam/JP1203/2004 (VNJP1203/04) 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

BALB/c（メス、4 週齢）を各群 15 匹ずつ使用した。表 1 のとおり調整したワクチン（総量 200ul/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、各群 5 匹から全採血し血清を採取した。採取した血清を用いて、赤血球凝集阻止(HI)試験および中和試験を行った。残りのマウスにワクチンの親株である強毒ウイルス VNJP1203/04 を感染させ、感染後の体重推移ならびに生残率により感染防御能を調べた。

C. 研究結果

1）rgHK213 で免疫したマウス血清中の HK213 に対する HI および中和抗体の有無を表 2 に示した。最も少ない抗原量 0.02ug を免疫したマウスのうち、アジュバント非添加群 (group 6) では抗体が検出されなかったが、アジュバント添加群 (group 5) では 5 匹中 2 匹で HI 抗体、4 匹で中和抗体が検出された。同じ群のマウスでも抗体の上昇率にばらつきがあった。そのため、アジュバント添加群と非添加群との間で、抗体価に有意な差は見られなかったものの、5 匹の平均値はいずれの抗原量でもアジュバント添加群の方が高かった。一方、2003 年 12 月にベトナムでヒトから分離された強毒 H5N1 ウイルス (VNJP1203) に対するこれらの血清の交差反応を調べた。HI 試験では全く反応せず、中和試験では group 1 の 1 匹で反応が見られただけであった。

malNL12 で免疫したマウス血清中の NL219 に対する HI および中和抗体の有無を表 3 に示した。H5 ウイルスでの実験に比べ、全体的に抗体保有率が低く HI 抗体は検出されなかった。中和抗体は抗原量 2ug、0.2ug の群で上昇しており、いずれもアジュバント添加群の方が非添加群より保有率が高かった。抗原量 2ug の群では、アジュバント添加群と非添加群との間に中和抗体価に有意な差 (p<0.05) があった。抗原量 0.02ug の群では、アジュバントの有無にかかわらず NL219 に対する抗体は検出されなかった。

2）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限局しているかのどちらかであった。

3） rgVNJP1203/04 で免疫したマウス血清中の VNJP1203/04 に対する HI および中和抗体の測定を行った（図 2)。HI 抗体は全て検出限界以下であり、中和抗体もアジュバントの有無にかかわらず低かった。

次に、ワクチン接種マウスにおける強毒株に対する防御効果をチャレンジ実験で調べた。血中抗体はほとんど検出されなかったにもかかわらず、抗原量 2ug では 9 割以上、0.2ug の両群とアジュバントを添加した 0.02ug では 3 割以上のマウスが生残した。

抗原量 2ug を接種したマウスの体重変化を 1 匹ごとに示した。実線は免疫したマウス、点線はアジュバントのみ接種したマウス、×は感染により死亡したことを示す。生残率だけではアジュバントの有無による防御効果の違いがよく分からなかったものの、体重変化で比較すると、アジュバントなしでは体重減少の後に回復したのに対し、アジュバント添加群ではほとんど体重が減少することなく推移していた。以上の結果から、2004 年のウイルスをもとに作製したワクチン株についても、アジュバントの使用で、より効果的にウイルスに対する免疫応答を誘導できることが分かった。

D. **考察**

・今回の実験では、同じ群内でも抗体価にばらつきがあったことから、(H7 ウイルスの抗原量 2ug 接種群以外は) 有意差のある結果を得ることはできなかった。しかし、全体的な傾向として、アジュバントの添加がウイルス特異的な抗体をより効果的に誘導する可能性が示された。特に、H5 ウイルスを用いた実験では、0.02ug という少ない抗原量でも、アジュバントの添加により 5 匹中 4 匹で中和抗体価の上昇が見られた。アジュバントの使用により、抗原量を減らすことができれば、より多くの人々にワクチンを接種することが可能となる。本実験で使用したアルミニウムアジュバントはヒトでの使用が認可されており、その効果が確認できれば、新型インフルエンザ流行の際にも、早期に実用化可能なワクチン接種法として期待できる。

H5 ウイルスを用いた実験では、2003 年 12 月にヒトから分離された VNJP1203 に対する抗体価の測定も行った。rgHK213 で免疫した血清中の抗体は、VNJP1203 に対してほとんど反応せず、同じ H5N1 ウイルスでも抗原性はかなり異なっていた。今後、新型ウイルスが出現した場合には抗原性を考慮し、その都度新しいワクチンを準備する必要があるかもしれない。

今回、抗体検出法として HI 試験および中和試験を行った。現在、ヒトで流行しているウイルスに対する抗体保有状況は HI 試験によって調べられている。しかし、本実験の結果から、ウイルス特異的な抗体が存在しても HI 試験では検出できない可能性があること、また、一般的に鳥由来のウイルスに対する HI 抗体は上昇しにくいという考えもあることから、新型ウイルスに対する抗体検出には HI 試験以外の方法を検討する必要がある。

・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。

・2004 年に新たに分離されたウイルスをもとに作製されたワクチン株、rgVNJP1203/04 のマウスにおける効果を調べた。前回報告したワクチン株 rgHK213/03（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）に比べ、rgVNJP1203/04 はウイルス特異抗体を誘導しにくいことが分かった。この原因としては 1）rgVNJP1203/04 の免疫原性が低い 2）抗体は誘導されていたが、VNJP1203/04 の抗体検出用抗原としての感度が低いという 2 点が考えられる。また、今回の実験とは別に（財）阪大微生物病研究会の試作したアジュバントワクチンを使用し、同様の実験を行ったところ、低いながらも HI 抗体が検出された。このことから、アジュバントと抗原の混合方法等を工夫すれば、検出可能な抗体応答が期待できるかもしれない。一方、抗体価が低かったにもかかわらず、強毒株 VNJP1203/04 によるチャレンジ実験においては、前回報告の rgHK213/03 ワクチンと同様の防御効果を示した。さらに、アジュバント添加によりワクチンの効果が増強されることが明らかとなった。

D. 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、アルミニウムアジュバントと共に皮下接種することで、強毒ウイルスに対する血中抗体を、ある程度効果的に誘導できることが判った。

・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。

・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。

・本実験の結果から、より新しい分離株をもとに作製した rgVNJP1203/04 の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。一方、抗体誘導能については、ワクチンの調製方法ならびに抗体検出法に関して改良の余地があるかもしれない。

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。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Park CH, Matsuda K, Sunden Y, Ninomiya A, Takada A, Ito H, Kimura T, Ochiai K, Kida H, Umemura T
Persistence of viral RNA segments in the central nervous system of mice after recovery from acute influenza A virus infection. Vet Microbiol 97:259-268. 2003

2) Tanaka H, Park CH, Ninomiya A, Ozaki H, Takada A, Umemura T, Kida H
Neurotropism of the 1997 Hong Kong H5N1 influenza virus in mice. Vet Microbiol 95:1-13. 2003

3) Takada A, Matsushita S, Ninomiya A, Kawaoka Y, Kida H
Intranasal immunization with formalin-inactivated virus vaccine induces a broad spectrum of heterosubtypic immunity against influenza A virus infection in mice. Vaccine 21:3212-3218. 2003

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

1. 学会発表

1) 二宮愛、今井正樹、田代眞人、小田切孝人　弱毒化H5N1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9回日本ワクチン学会、大阪、10月、2005年

2) 二宮愛、今井正樹、田代眞人、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53回日本ウイルス学会、横浜、11月、2005年

3) 二宮愛、今井正樹、田代眞人、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

4) 二宮愛、今井正樹、田代眞人、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

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成 15-17 年度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

アジュバント併用経鼻高病原性鳥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）

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。感染防御のメカニズムの解析及びアジュバントの安全性について更に検討を行った結果、インフルエンザウイルス感染に伴い最初に応答するリンパ装置である Nasopharyngeal Lymphoid Tissue, (NALT) における Toll like receptor (TLR) 3 及び 7 の発現亢進が認められた。インフルエンザウイルス感染を模倣する形で poly(I:C) 併用スプリットワクチン経鼻投与後 NALT ではその receptor である Toll-like receptor (TLR)3 の発現が亢進しインターフェロン α、β、γ、その他種々のサイトカインの発現がみられ粘膜免疫誘導へ働いている事が明らかにされた。

A. 研究目的

高病原性トリインフルエンザ H5N1 はその流行がアジア地域に留まらずヨーロッパにまで広がりヒトの死亡例も出ている現状で、新型インフルエンザの出現とヒトからヒトへの感染が脅威となっている。その爆発的な感染を防御する有効な手段はワクチンしかないと考えられる。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

<u>材料と方法：</u>

ワクチンの作製

リバース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）株及び A/Puerto Rico/3/334 (A/PR8; H1N1) 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。

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 5 匹のマウスにエーテル麻酔下で 1μg のワクチンを 10μg の poly(I:C) アジュバントと共に経鼻投与した。一部のグループは 4 週後に、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。TLR 発現及び IFN、サイトカイン