

トを 1 μ g を用いました。4 週間間隔で 2 回ワクチン接種の後、2 週間後に同じ型のウイルスで攻撃感染し、サンプルを集めて免疫学的に解析いたしました。

こちらが PolyIC のアジュバント濃を示したものです、このように 1 μ g のワクチンと、10 μ g の Poly(I:C) から減らしていき、1 μ g の Poly(I:C) の 2 回投与でウイルスを完全に防御いたしました。また、粘膜中には分泌型の IgA が誘導されました。2 回目の免疫には抗原のみを用いませても、1 回目に 3 μ g の Poly(I:C) を使うと完全な防御が可能でした。

こちらに、その交叉防御能を示しましたが、ワクチン株を同じ H1N1 であります北京株、山形株、また H3N2 のワクチン株、あとはインフルエンザ B の抗原をワクチンとして用いました、これらを H1N1 の PR8 ウイルスでチャレンジ感染いたしました。そうすると、同じ H1N1、同じ亜型内においては完全にプロテクションされております。しかし、血中の中和抗体は PR8 のみに対して中和抗体がありますので、ここの分泌型、IgA がこの交叉防御に効いていると考えられます。

実際に生存率を見ると、H1N1 は同じ亜型内ではすべてが生存、それで H3N2 も部分的に生存しております。B は全く効かないで 100% の致死率になっています。

このワクチンにおいて、粘膜分泌型の IgA と中和 IgG のみではなくて、T 細胞の応答を調べました。こちらは、脾臓の細胞を取ってきて、抗原で刺激後、細胞内への取込み、もしくはインターフェロンの産生で調べたところ、CTL も誘導されていることが示されました。

実際の感染のときには、鼻の NALT において、二本鎖 RNA のレセプターであります、Toll-like receptor 3、及び Toll-like receptor 7 の誘導が認められます。今回用いました、ワクチンと Poly(I:C) を用いますと、それを模倣する形でこのように Toll-like receptor 3 と 7 の誘導が認められました。

ここまですべてをまとめますと、インフルエンザワクチンと Poly(I:C) を経鼻投与することにより、未成熟な樹状細胞が、成熟し、それによってこの獲得免疫への橋渡しになっているということ。それで結果的には分泌型の IgA、血中の IgG、CTL の誘導へとつながっております。

次に、ここまですべてを踏まえ、高病原性鳥インフルエンザワクチンへの応用を試みました。現在、アジアから広がり高病原性鳥インフルエンザは、中東やアフリカまで、達しております。これはヒトでの発症例を示しておりますが、社会的にも非常に不安を起し問題になっております。これらに対するワクチン開発は非常に急務であります。

ところが、H5N1 から得られたワクチンというのは、ヒトの皮下接種において免疫性が非常に低いことが知られています。もう 1 つは、どの株がパンデミックを起こすのか予測することが難しく、流行する前にパンデミックワクチンを準備しておくことは困難であります。皮下接種の場合には、流行株とワクチン株が一致しないと効果は期待できない。また、感染部位が呼吸器だけではなくて、消化管などでのウイルスの分離が報告されている点が挙げられます。

今回用いましたアジュバントは、先ほどと同じ合成二本鎖 RNA なのですが、

PolyI:PolyC12U といひまして、Poly(I:C)のCの部分に12個に1個Uに置換されている構造を持ったもので、これは同様に Toll-like receptor 3 のリガンドとして働きます。

なぜこれを用いたかといひますと、既にヒトでの投与での安全性が確認されていて、米国で慢性疲労症候群の治療薬として、内因性のインターフェロンを誘導する薬剤として、第Ⅲ相の臨床試験を終了しております。こちらの治験においては静脈内に400mg という大量の PolyI:PolyC12U を静注し、延べ7万5,000 ドース以上用いられていて安全が確認されています。

今回は、ヒトでの応用を前提として、この PolyI:PolyC12U、Ampligen が商品名ですが、これを用いました。

免疫スケジュールとしては、全粒子不活化ワクチンのベトナム株から得られた NIBRG14 を用いて、アジュバントとしては Ampligen を用いました。マウスで経鼻、もしくは皮下接種で2回接種後、チャレンジを3種類の clade の異なる、ワクチン株と同じ抗原性を持つベトナム株、あとは1997年に香港で流行を起こした香港株の H5N1、あと clade 2 に属するインドネシアで分離された H5N1、これらはすべてヒトから分離された株ですが、これで攻撃感染実験を行いました。

NIBRG14 に対する抗体誘導ですが、ルートを鼻から入れた場合と皮下接種した場合で比較しますと、このように皮下接種では鼻粘膜上の IgA は全く誘導されません。ところが、経鼻で投与すると、このように IgA を誘導し、血中の中和抗体価を調べますと、中和抗体価はベトナム株に対してのみ、これらの群で認められました。ほかの香港株、インドネシア株に対する中和抗体価は全く認められませんでした。

次に、チャレンジした後の生存と、感染3日後の鼻腔内でのウイルス価を測りました。まず、ワクチン株と同じ抗原性を持つベトナム株でチャレンジした場合、皮下接種群と経鼻接種群共に生存率は100%でした、コントロール群は100%死亡しております。ところが、鼻でのウイルス価を見ますと、皮下接種群では有意にウイルス価は下がっておりますけれども、経鼻接種群においては、全く生きてウイルスの分離ができませんでした。要するに、感染自身を防御して、その結果100%の生存率を得たということになります。

次に、1997年の香港株でチャレンジした例です。ここでは、皮下接種群においては、ウイルスの減少は全く認められませんが、生存率も皮下接種では全く認められず100%の死亡になりました。ところが、経鼻接種しておきますと、80%の生存が得られました。感染は、すべて1000PFU という同じウイルス価での感染を行いましたので、死亡率に多少差はありますが、インドネシアの株でチャレンジしたところ、経鼻接種群では有意に、また皮下接種群でもウイルス価は下がっておりますが、生存率では、経鼻接種群が100%、コントロール群が20%の生存に対して、皮下接種群が40%という結果になりました。このように見ますと、ワクチン株と同じ株でのチャレンジに対しては、感染自体を防御している。また、異なる clade のものでありましても、同じ H5N1 に属するものに関しては、ほぼ100%に近い生存率で、交叉防御が認められたこととなります。

次にこのアジュバントが、シーズナルなスプリットワクチンに、同じような抗体誘導ができるのかどうかを調べました。これは 2005 年、2006 年のシーズンのワクチンで、市販されているものを用いました、そのワクチンの総蛋白量 $1 \mu\text{g}$ 、Ampligen $10 \mu\text{g}$ 、それで経鼻接種群と皮下接種群で、抗体価は鼻腔中の IgA、血中の IgG を、それぞれ 3 価ワクチンですので、ニューカレドニア、ニューヨーク、B 上海それぞれについての抗体を調べました。

そうしますと、このように皮下接種群、あとは Ampligen なしの、ワクチンのみの群においては IgA 誘導が認められませんが、このアジュバントを加えることにより、このように IgA が出てきて、IgG は皮下接種群と同等の IgG 応答が認められました。

これらのワクチンで免疫したもので、H5N1 で同様の感染実験を行いました。そうしたところ、ベトナムの株に対しては、有意にウイルス価を減少させ、致死率もコントロールで 100%のところ、最終的には 50%の生存。香港株に対しては、コントロールが 60%の死亡のところ、100%の生存。インドネシア株に対しては、コントロール群 20%のところ 100%の生存。このようにシーズナルワクチンであっても、経鼻接種することにより、ある程度の交叉防御によって生存率の改善が認められました。

マウスでは、そのようにアジュバント効果があるという報告がいくつかありますが、実際に、それがヒトに近い霊長類において利用できるかどうかということが 1 つのハードルになると思います。本アジュバントを用いて、カニクイザルで実験を行いました。用いたワクチンは、全粒子の NIBRG14、これはベトナム株で作られたワクチンですが、抗原量としては総蛋白は $90 \mu\text{g}$ 、PolyI:PolyIC12U の Ampligen を $500 \mu\text{g}$ 、感染はベトナムのウイルスを用いました。

実験スケジュールは、サルは貴重ですし、どれぐらいの免疫応答が得られるかわからなかったので、3 回投与してみ、経時的に抗体応答を追っていきました。これらの実験は、感染研の村山にあります P4 施設ですけれども P3 として運用されている BSL3+で、グローグボックスの中で行いました。

まず、症状といたしましては、上が免疫群、下が非免疫群の摂食活動を表しています。ここの矢印のところ、チャレンジ感染を行ったところです。非免疫群においては、各群 3 頭で行い、すべてのサルが食事を摂らなくなり、しばらくうつうつな状態が続きました。症状としては、鼻水、咳、下痢を起こしたりという個体がありました。それは、2 週間のうちに改善されていきました。一方、経鼻で免疫した群においては、摂食行動に全く変化はなく、臨床症状も全く認められませんでした。

これが、血中の特異的な IgG ですけれども、ここでわかりますように、2 回接種することにより、血中の IgG がかなり高く誘導されていて、この値は naive 群に感染した 2 週間後の IgG の値よりも高いものでありました。チャレンジはここで行いました。

こちらが、唾液中に分泌されている特異的な IgA ですが、こちらも 2 回のワクチン接種後に非常に高いワクチン特異的な IgA が誘導されております。

攻撃感染後のウイルス分離ですが、鼻腔スワブ及び咽頭スワブで、3 頭中 3 頭すべての

サルから生きたウイルスが分離されました。ところが、ワクチン群においては1つもウイルスは分離されておりません。

こちらが、2週間後に解剖したサルの肺を表しています。こちらが、免疫した群、こちらが非免疫群です。非免疫群のほうは、このようにスポット状に変色しているところが認められますけれども、ここの部分を病理で見ますと、非常に激しい炎症が起こっています。肺全体がこういう状態ではありませんが、ローカライズされた部分ですけれども、このように炎症が認められています。それに相当する部分は免疫群においては、このように感染の癍痕のような状態は認められますけれども、炎症は全く認められませんでした。

まとめますと、合成二本鎖 RNA 併用の経鼻インフルエンザワクチンによって、ワクチン株とは異なるウイルスに対しても交叉防御が、これはマウスの実験ですが可能であった。もう1つは、交叉防御というのは、中和抗体がないにもかかわらず防御されていたので、粘膜上のIgA抗体によるものであることが推察された。

免疫機構がヒトに近いカニクイザルにおいても、PolyI:PolyC12U をアジュバントとして用いたワクチンが、H5 ウイルスに対して有効であることが示されました。今後は、これらの製剤化、安全性を検討して臨床試験に進めたいと思っております。

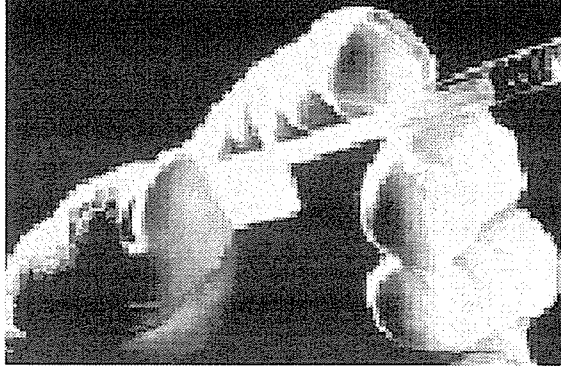
新興感染症というのは、漫画で取り上げられるぐらいに国民の関心を得ていまして、これは村山庁舎そのものなのですからけれども、いままでの実験はすべてこの村山で行った、6号棟、もしくはBSL4の施設で行ったものであります。

ここにラボのメンバー、特に二本鎖のRNAに関しては、大学院生の一戸君を中心にやってもらいました。

(パワーポイント終了)

以上です。

経鼻粘膜投与型 インフルエンザワクチンの開発



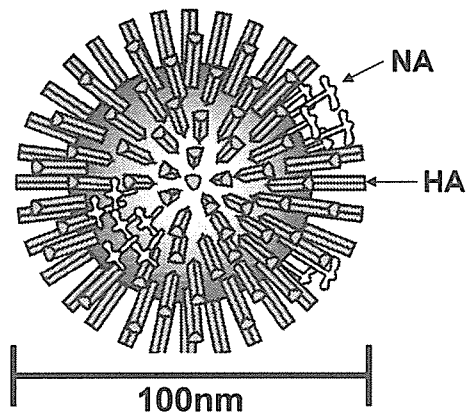
国立感染症研究所感染病理部
長谷川 秀樹

目的

- ・感染予防を目指した
インフルエンザワクチン開発
- ・交叉防御能(cross-protection)のある
ワクチン開発
- ・新型インフルエンザに対応した
ワクチン開発

Influenza virus

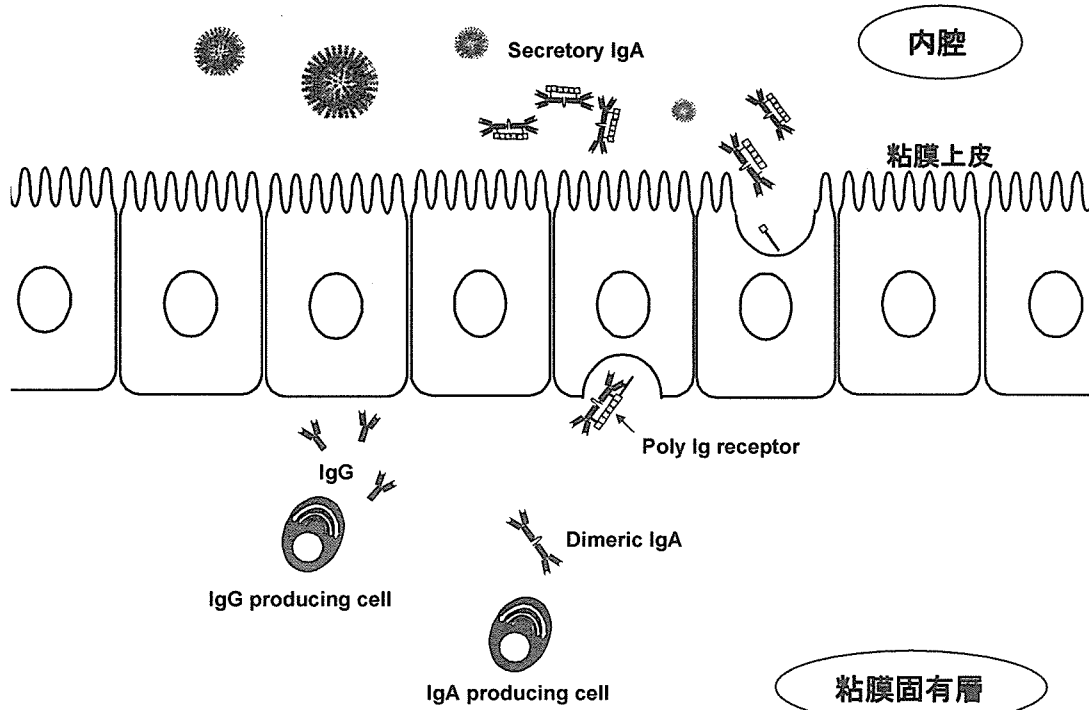
- Influenza type : A, B, C
- Eight negative-strand viral RNA segments
- Hemagglutinin (HA) 1-16
Neuraminidase (NA) 1-9



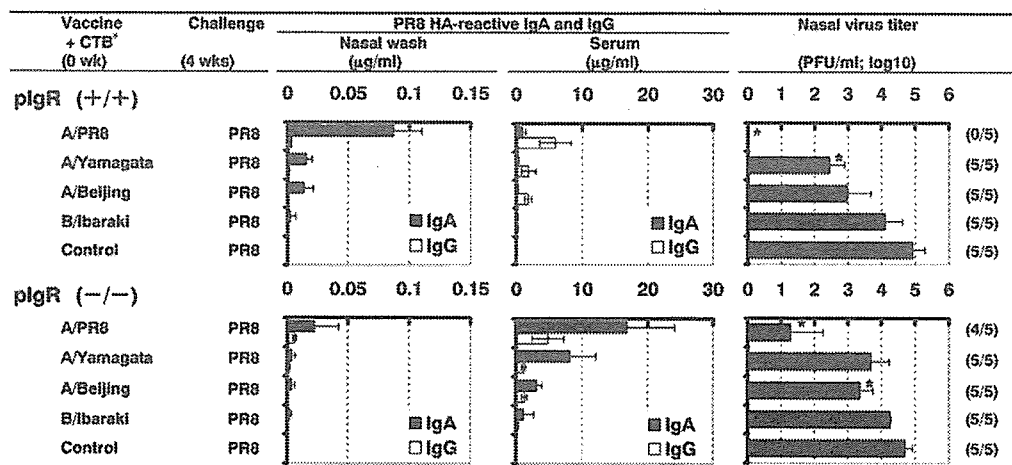
自然感染時に起こる免疫応答

- 粘膜でのインターフェロン誘導
- 粘膜への分泌型IgA抗体誘導
- 血液中のIgG抗体誘導
- CTL誘導

粘膜免疫における 分泌型IgA抗体の特長



分泌型IgAが交叉防御に与える影響



Asahi Y et.al. *J Immunology* 2002,168: 2930-2938.



経鼻インフルエンザワクチンの開発

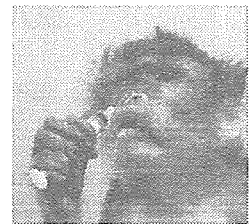


経鼻ワクチン (intranasal vaccine)

不活化ワクチン単独では
免疫応答を誘導できない

アジュバント

経鼻ワクチンには、
免疫応答を増強させる物質が必要！



粘膜ワクチンアジュバントの歴史

コレラトキシン (CT)
大腸菌易熱性毒素 (LT)

CT/LT併用経鼻ワクチンにより、ワクチン特異的な全身のIgG応答だけではなく、鼻粘膜上のIgA抗体も誘導する



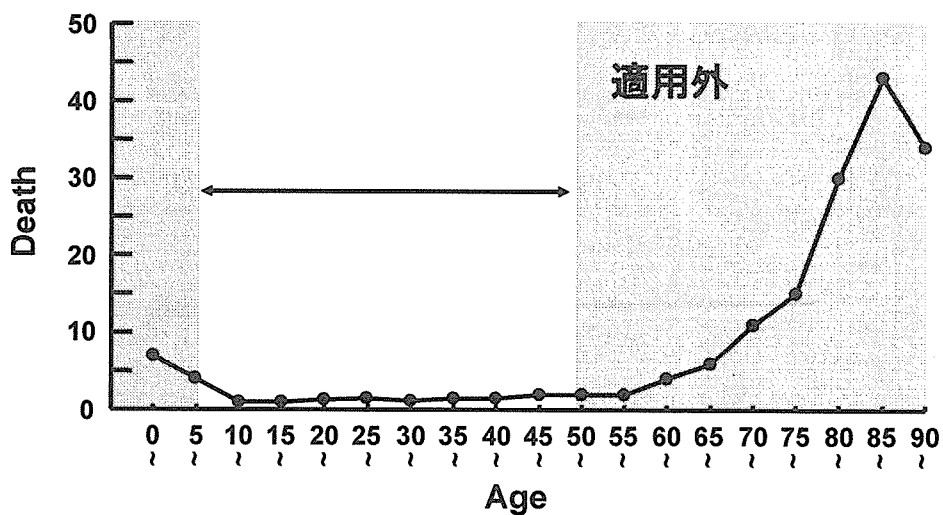
2000年、スイスでLTアジュバント併用の経鼻ワクチン治験



ワクチンを受けたヒトの一部に顔面神経麻痺が生じたため、毒素系アジュバントはヒトには用いられなくなった。

低温馴化生ウイルスワクチン(FluMist)

2003年、米国で認可(5~49歳の健康なヒトに限る)



経鼻ワクチン

利点

全身の粘膜へ分泌型IgA抗体の誘導
交叉防御効果
簡便で痛くない！

低温馴化生ウイルスワクチン

アジュバント無しで強い免疫応答を誘導できる
肝心なハイリスク群での適用が認められていない



安全な不活化経鼻ワクチンの開発には
ヒトで使用できる安全で効果的なアジュバントの開発が
不可欠！！

新規粘膜ワクチンアジュバントの開発

1) 補体C3d結合HAワクチン

[Watanabe I Hasegawa H *et al.* *Vaccine* 2003 Nov;7(31):4532-8.]

2) キチン微粒子(CMP)

[Hasegawa H *et al.* *J.Med.Virol.* 2005 Jan;75(1):130-136.]

3) ホッキ貝微粒子(SMP)

[Ichinohe T, Hasegawa H. *et al.* *J.Med.Virol.* 2006 May;23(7):954-963.]

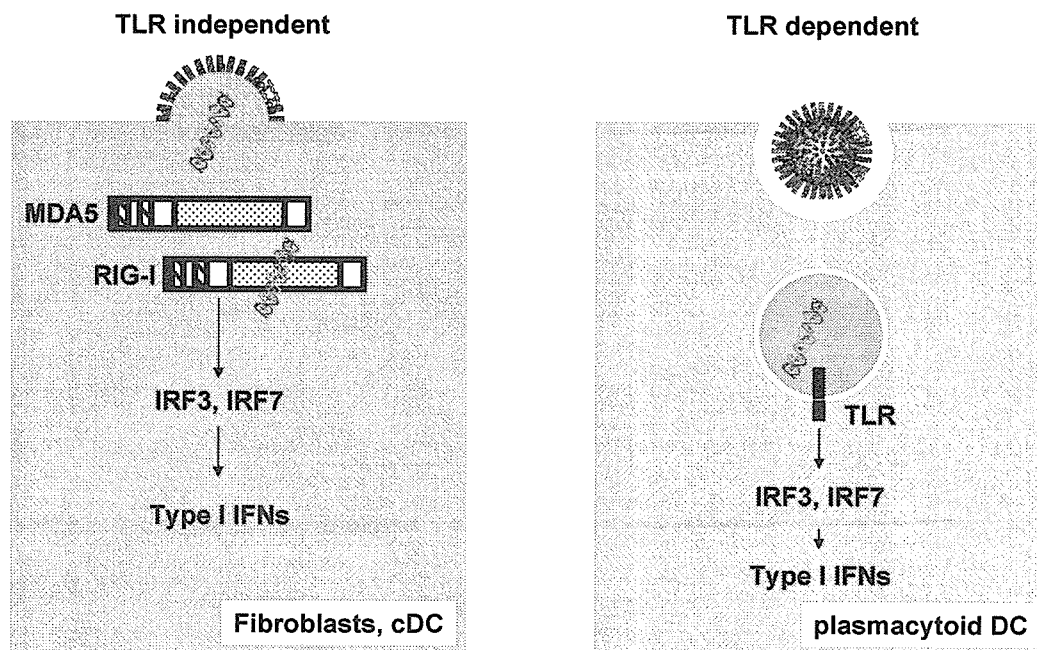
4) 合成二本鎖RNA [poly(I:C)], Toll like receptor-3のリガンド

[Ichinohe T, Hasegawa H *et al.* *J Virol.* 2005 Mar;79(5):2910-9.]

5) Alpha-galactosylceramide (α-GalCer), NKT細胞のリガンド

(submitted)

二本鎖RNAの認識

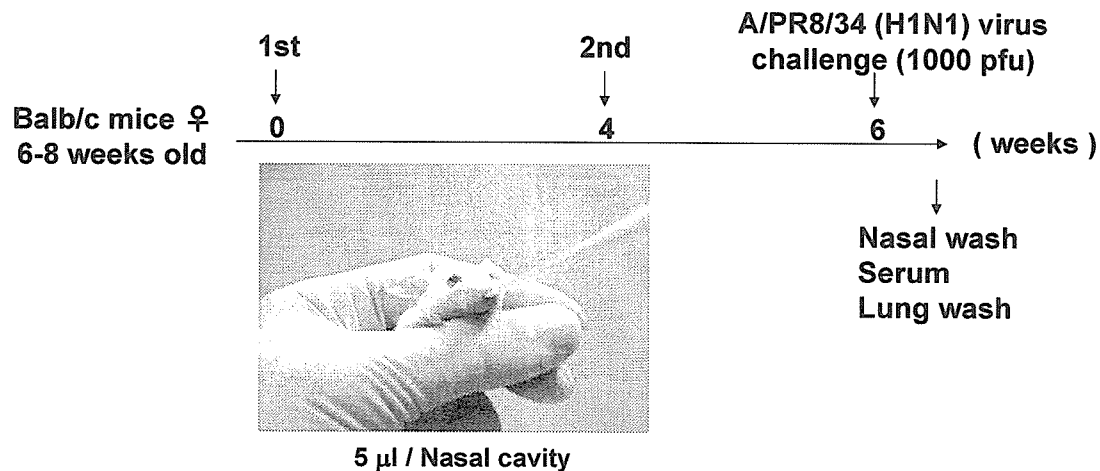


Kato et al. (2005) Immunity

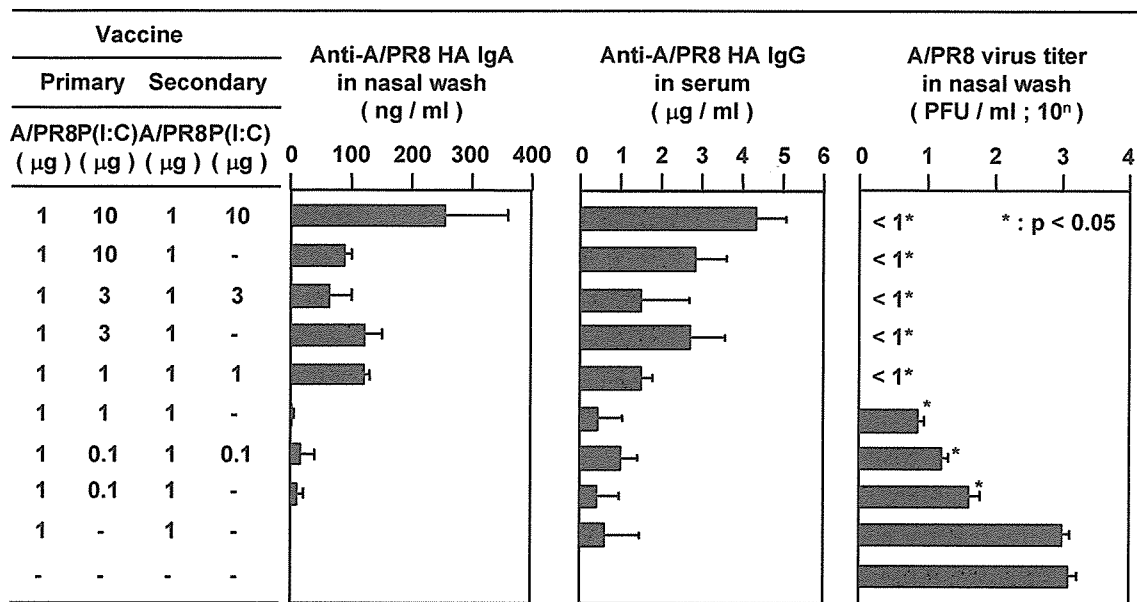
実験スケジュール

A/PR8 (H1N1) HA vaccine 1 μ g + Poly (I:C) 10 ~ 0.1 μ g
(split-product virus vaccine) or CTB* 1 μ g / 10 μ l PBS (-)

CTB* : CTB containing a trace amount (0.1%) of holotoxin (CT)

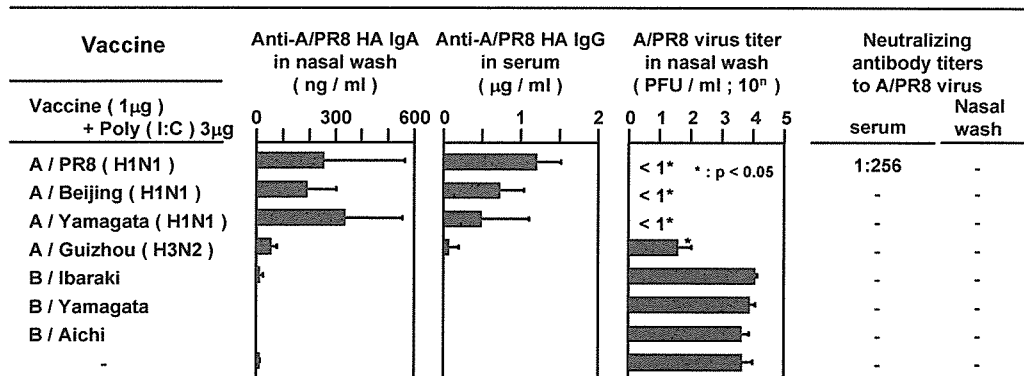


Poly(I:C)併用経鼻インフルエンザワクチン接種により、
インフルエンザウイルスの感染を防御できる

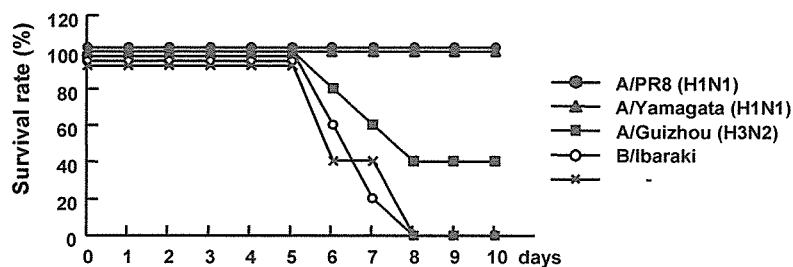


Poly(I:C)併用経鼻ワクチンは、変異ウイルスに対しても効果的である
(交叉防御効果)

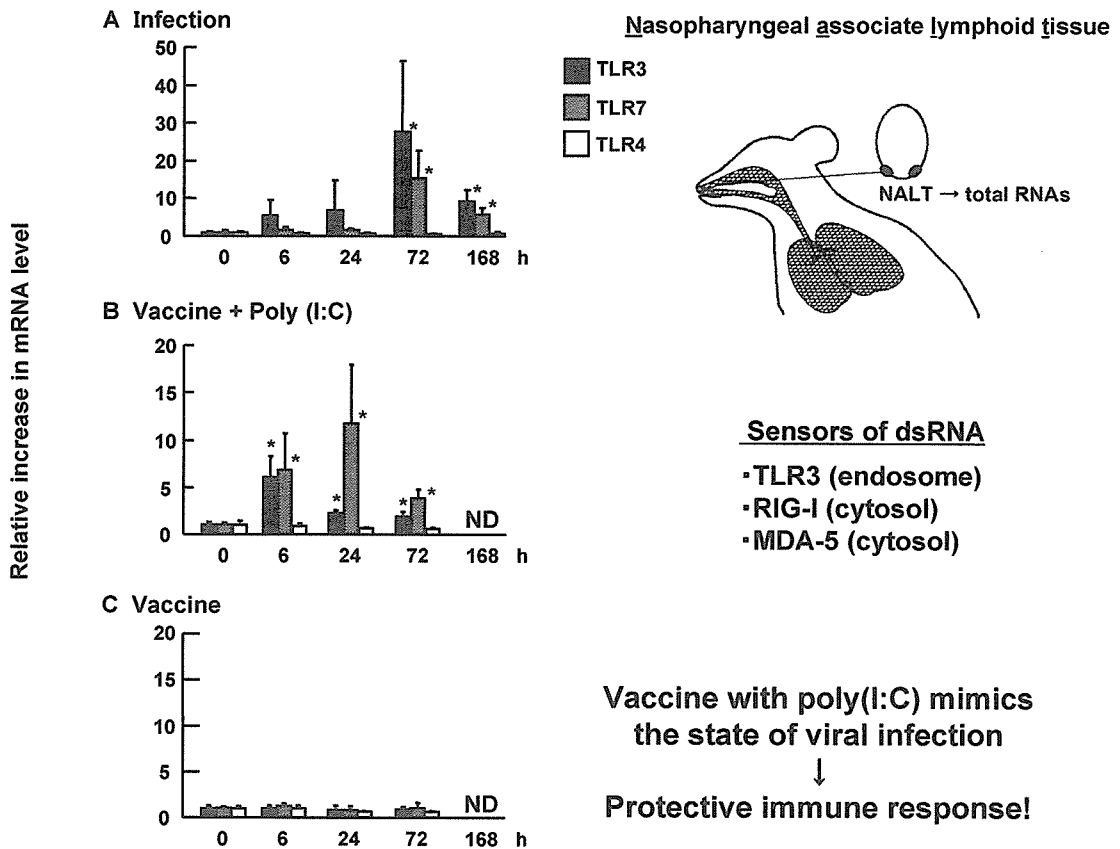
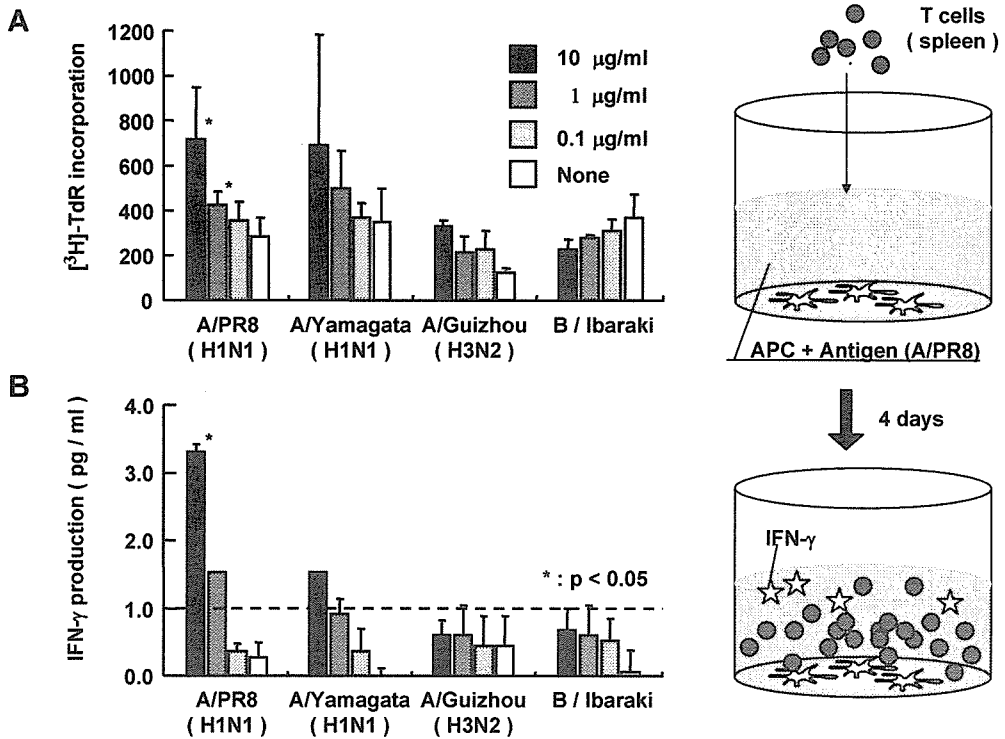
A. Nasal-restricted influenza model (challenged with A/PR8 virus)

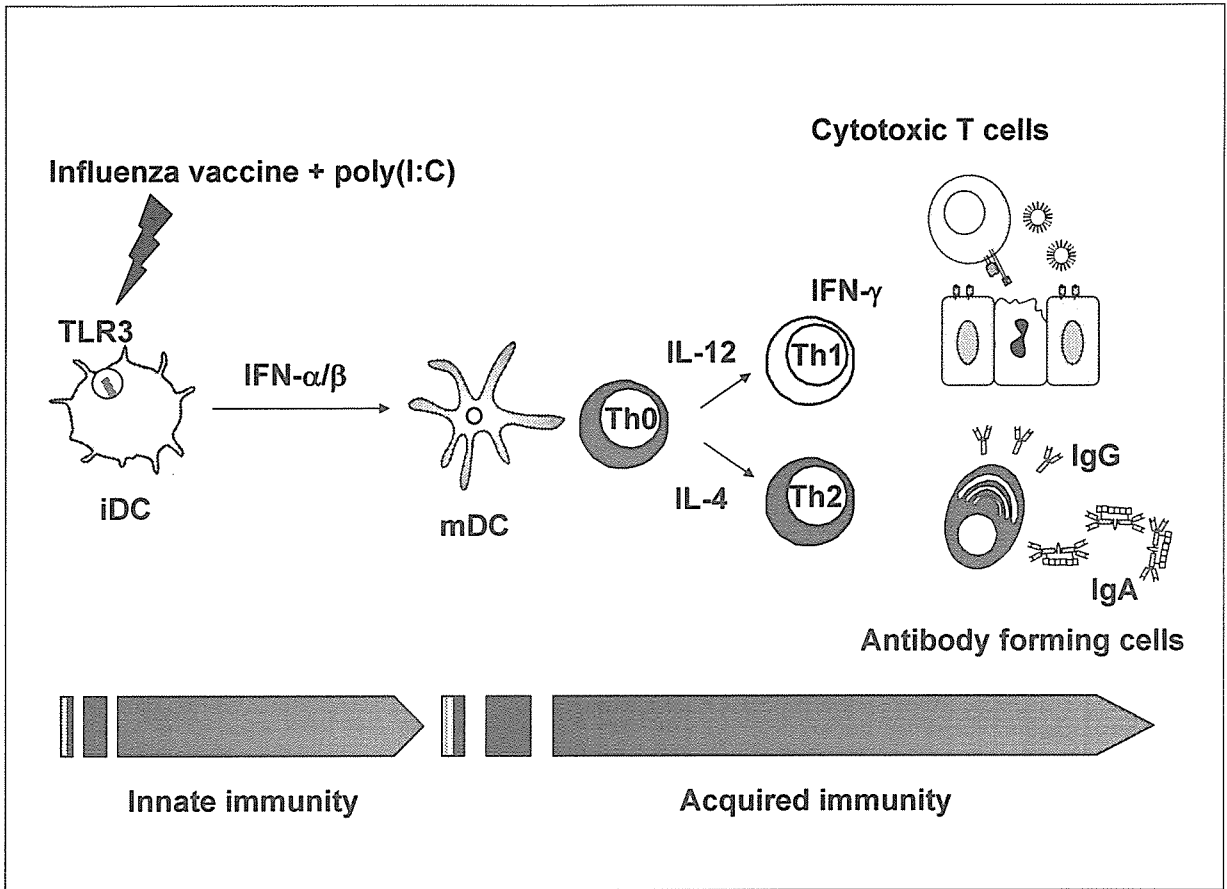


B. Lethal lung influenza model (challenged with A/PR8 virus)

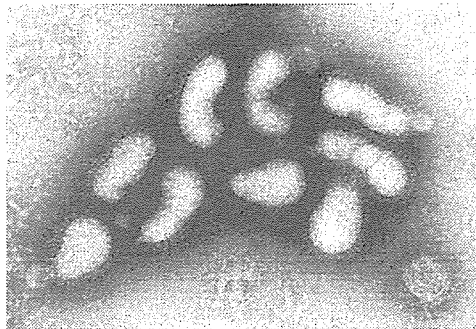


Poly(I:C)併用経鼻ワクチン後のワクチン特異的なT細胞応答





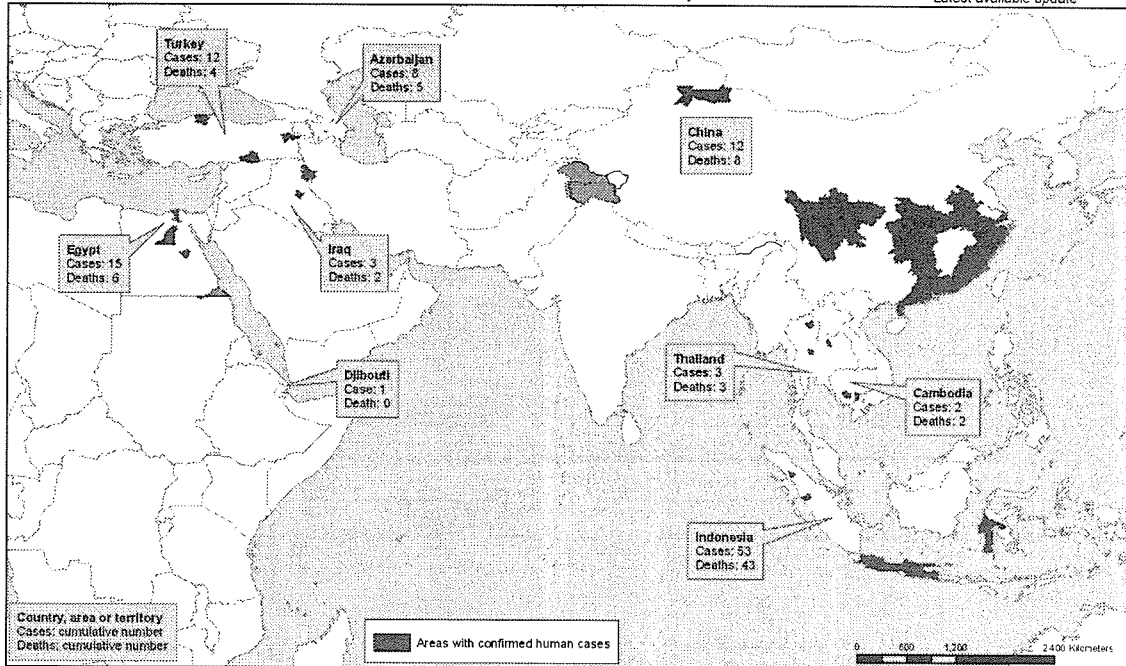
高病原性鳥インフルエンザウイルスワクチンへの応用



H5N1ウイルスに感染したヒトが報告された地域

Affected areas with confirmed human cases of H5N1 avian influenza since January 2006

Status as of 16 October 2006
Latest available update



World Health Organization

The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement.

Data Source: WHO / Map Production: Public Health Mapping and GIS
Communicable Diseases (CDS) World Health Organization

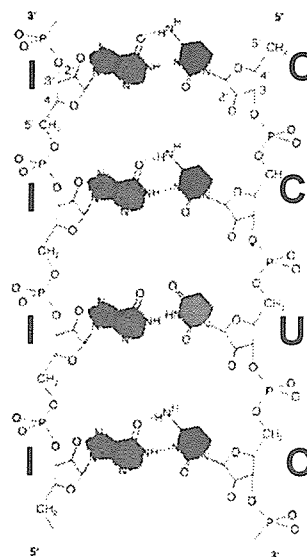
© WHO 2006. All rights reserved

背景

- 高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)ワクチンは、ヒトでの皮下接種において免疫応答が低いことが知られている
- ウイルスのどの株がパンデミックを起こすのか予測することは難しく、流行前にパンデミックワクチンを準備しておくことは困難である
- 皮下接種ワクチンは、ワクチン株と流行ウイルス株が一致しないとワクチンの効果が期待できない
- 感染部位が呼吸器だけでなく消化管への感染が報告されている。

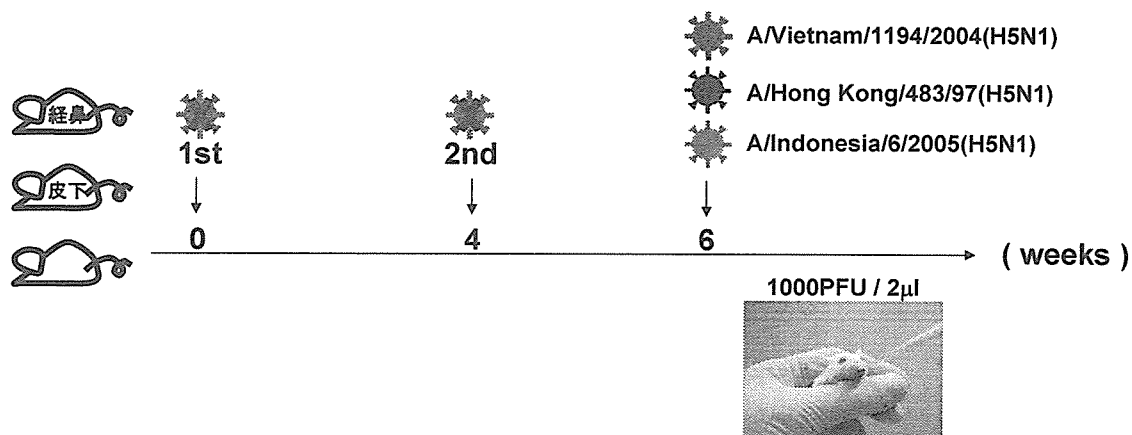
PolyI:PolyC₁₂U (Ampligen®)

- 合成二本鎖RNA
TLR3 ligand
- 慢性疲労症候群
第3相臨床治験終了(USA)
> 75,000 dose (400 mg IV)
- 12塩基に1塩基ミスマッチ



実験スケジュール

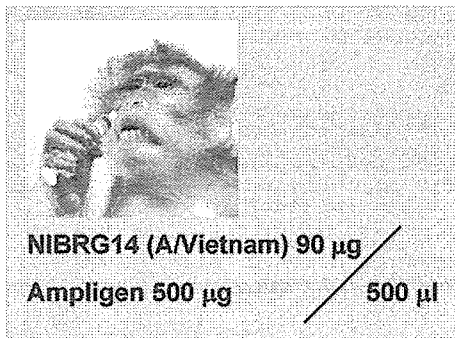
全粒子不活化ワクチン 1μg : NIBRG14 (A/Vietnam/1194/2004)
 アジュバント 10μg : PolyI:PolyC₁₂U (Ampligen®)



Intranasal H5N1 vaccine in macaque



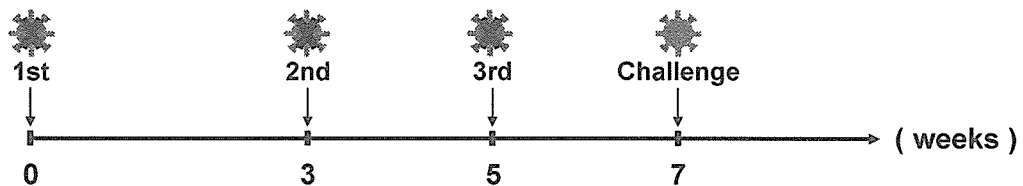
実験スケジュール



A/Vietnam/1194/04 (H5N1) virus

Nasal : 0.5×10^5 pfu / 0.5ml

Lung : 2.5×10^5 pfu / 2.5ml



Nasal wash virus s-IgA titers

Serum IgG titers

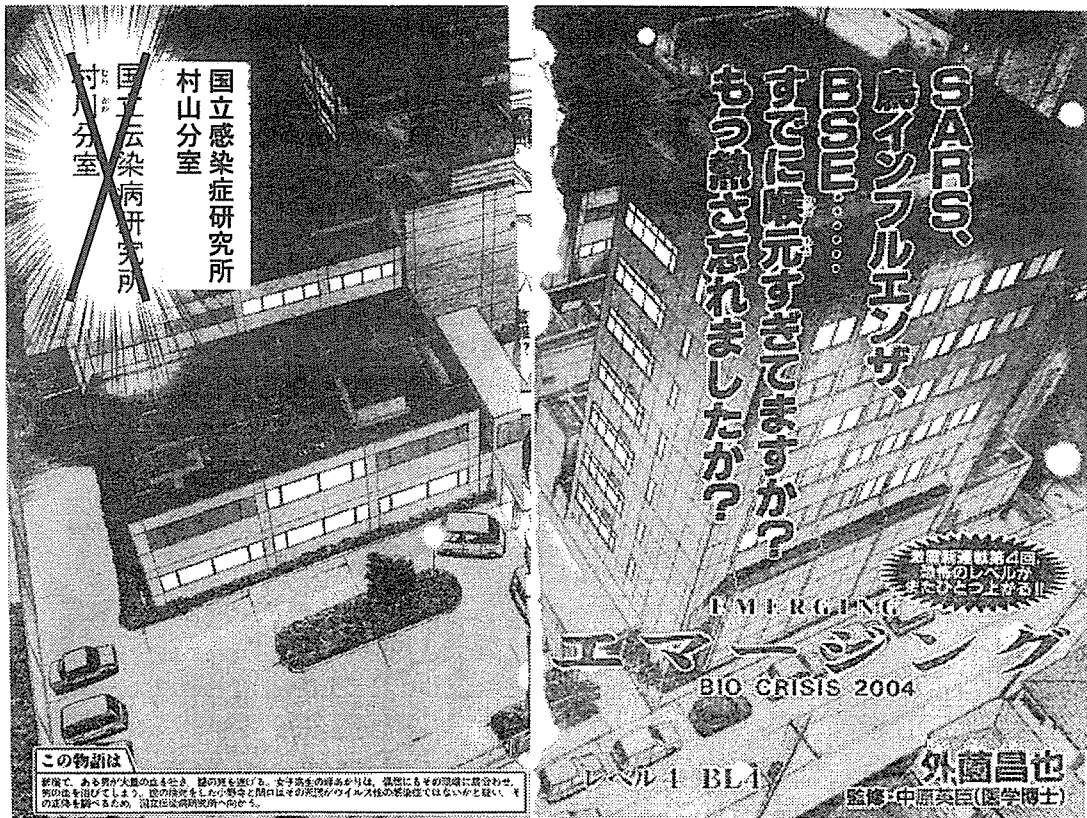
Virus titer of swabs (nasal, throat)

Pathological examination



結語

- 合成二本鎖RNA併用経鼻インフルエンザワクチンにより、ワクチン株とは異なるウイルス株(H5N1)に対しても、交叉感染防御が可能であった
- 交叉防御効果は経鼻ワクチンによって誘導される、鼻粘膜上のIgA抗体によるものであることが推察された
- 免疫機構がヒトに近いカニクイザルにおいても、polyI:polyC₁₂U(Ampligen)併用経鼻ワクチンがH5N1ウイルス感染に対して効果的であることが示された。
- 今後は製剤作製、安全性有効性試験を経て臨床治験へ進めたい。



Acknowledgement

国立感染症研究所

感染病理部

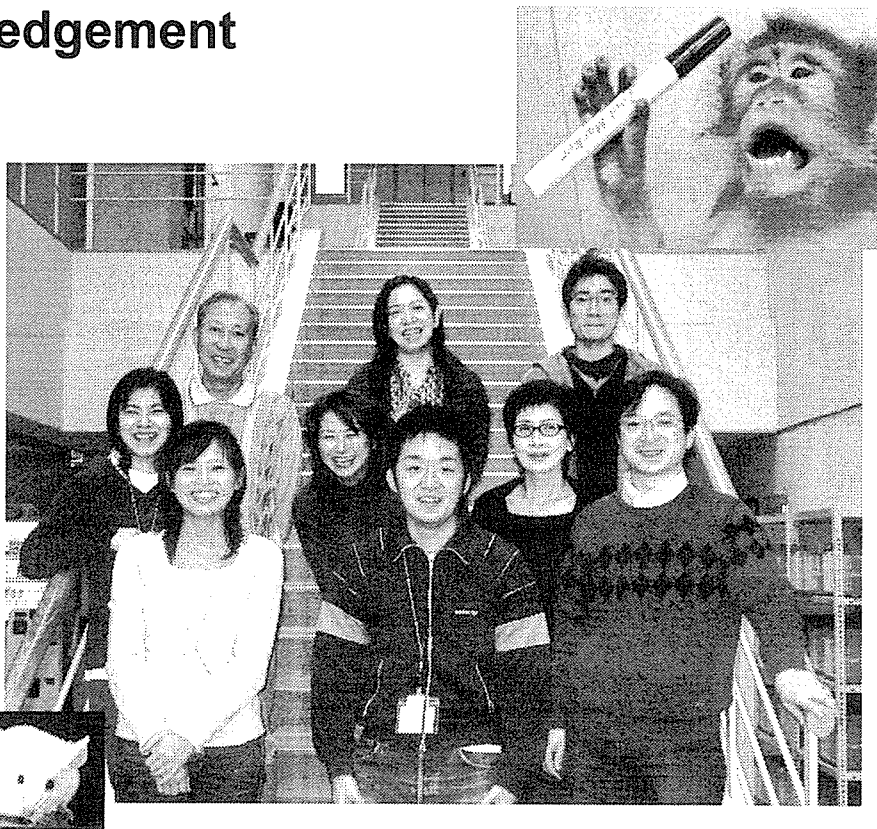
一戸猛史
川口晶
神戸光彦
永田典代
岩田奈緒子
原嶋綾
田村慎一
佐多徹太郎
倉田毅

ウイルス第3部

田代真人
小田切孝人
板村繁之
二宮愛
今井正樹

動物管理室

網康至
須崎百合子



「E型肝炎ウイルス（HEV）のウイルス様中空粒子（VLP）を用いた経口ワクチンの開発」
三重大学大学院医学系研究科助教授 保富康宏

本日私がお話しするのは、経口的に投与できるワクチンベクターのお話です。粘膜の免疫法に関しましては、今日、午前中に清野先生が非常にわかりやすく説明してくださったので、ザッと流していきたいと思います。

粘膜の免疫システムは、いま申し上げたように清野先生がお話になりましたが、このような呼吸器や消化器等の抗原取込部位から取り入れられた抗原が、ホーミングシステムもっているいろいろな粘膜面に同じような反応を起こす、いわゆる近隣の部位のみではなく、遠隔地であっても同じように粘膜面もしくは腺組織等々で同じようなことを起こすことができます。それを利用すると、こういう粘膜面や腺組織で感染症やアレルギー性疾患、がん等に対するワクチンが可能ではないかと考えられております。

もっとも簡便なのは何かといいますと、経口的に投与することであろうということで、WHO 等も経口的にできるワクチンを推奨しております。経口ワクチンの有用性は、先ほど清野先生もおっしゃいましたが、まず安全性が高いということです。生体の防御機構いで一番発達しているのは吐くとか下るというところで、そういう点で非常に安全性が高い。また、飲むということですから、非常に単純であるということです。ワクチンストレスもなく、飲むだけなので大規模なフィールドトライアルができることが利点として挙げられます。

しかしながら、いちばんの問題点は、先ほど清野先生もおっしゃいましたが、消化をするので、抗原がそこで変性せずに抗原取込部位に運ばれることが可能であるかが問題になっております。そのために、経口的に投与するものの免疫反応の誘導は非常に困難であると。これは、逆に言うと体にとっては非常にいいシステムで、口から入ったものは免疫反応を起こさないというのが免疫学の基本になっております。しかしながら、この点をクリアしないと、経口的なワクチンにはできないということです。

私が用いているのは、E型肝炎ウイルス（HEV）というものです。これは、当初小児や妊婦等々に急性肝炎を起こすもので、我が国には少ないとされていたのですが、現在は非常に多く、世界中で広く存在することが知られております。また、家畜や野性動物等にも多く存在しており、ズーノーシス（人獣共通伝染病）の様相を呈しております。通常は、感染というのは経口的に感染して、小腸粘膜上皮から門脈を通過して肝臓に至り、肝炎を起こすと考えられております。

私が用いるシステムは、この HEV のウイルス様中空粒子（VLP）を用いるということです。VLP は、感染研の李先生、武田先生のグループが作製したものをを用いているのですが、非常にすばらしいシステムです。というのは、HEV 以外の VLP は、過去に私どもも実験等々に使ったことはあるのですが、通常はワクチンにする量はまず取れないのです。非常