

ヒトの無菌性髄膜炎の発症頻度が異なるムンプスウイルスをヒト神経芽腫細胞 SH-SY5Y 細胞で増殖させたが、最も神経病原性の高い Odate 株ともっとも低い Jeryl-Lynn 株の間に、有意差が認められず、Urabe M3 株がこの 3 株の中では最も増殖性がよいという結果になった。従来知られているヒトでの無菌性髄膜炎の頻度とウイルス増殖性の間には、相関関係を見いだす事はできなかった。今後は他のヒト細胞株での実験も必要だろう。

5) RSV の F、G 蛋白を発現する組み換え麻疹 AIK-C 株

製造承認され広く使用され安全性が担保されている AIK-C 麻疹ワクチン株をベースとした reverse genetics の技法を確立した。AIK-C 株を生ワクチンウイルスベクターとして、未だワクチンが開発されていないウイルスとして RSV の G、F 蛋白遺伝子を挿入した cDNA から、RSV の G、F 蛋白を発現する組み換え麻疹ワクチンを回収した。未だ、有効なワクチンが開発させていない RSV 感染症に対して経鼻生組み換えワクチンとして利用できる可能性がある。ワクチンとして利用できる以外に、RSV の病態解析にも応用できると考えられる。

6) 百日咳 RT-LAMP 法の開発

百日咳菌の分離は検出率が低く、また、PCR といった遺伝子診断を行える施設が限られている。乳幼児の百日咳、青年、成人の百日咳の状況を把握するためには、簡便で感度の高い迅速診断法の開発が望まれている。LAMP 法は 200-250 塩基領域を target として特異的な LAMP primer を設定し、63℃ の恒温で DNA の増幅反応が進む特異性、感度共に高い DNA 増幅法で、今回、百日咳菌の IS 481 領域に特異プライマーを設定し 2.5 cfu/100ul (0.1 cfu/single assay) の感度で検出可能な百日咳 LAMP 法を開発した。

7) DPT-不活化ポリオウイルス混合ワクチン (DPT-sIPV) の免疫原性

DPT-sIPV の力価試験の標準化を行い、次期参照品の安定性評価および各社の DPT-sIPV 試作品の力価を測定した。力価試験では WHO の型毎に異なるカットオフ値を用いて得た陽性率によるプロビット法では、実際の抗体価を評価しないことから、近似最尤法による平行線定量法による方法を作成した。次期参照品を 4℃ で保存し、経時的に -70℃ 保存品と比較して安定性を評価したところ、12 ヶ月までのところ有意な力価の変化は認められないことが確認された。各社で作成した DPT-sIPV 試作品の力価を比較したところ、製造所によらずほぼ均一の力価であることが確認され、接種時に区別なく互換的に用いることで問題ないことが示唆された。

8) インフルエンザ罹患時の鼻汁、鼻咽頭拭い液中のサイトカイン

インフルエンザ感染の primary site での炎症反応を知るために鼻汁、鼻咽頭拭い液中の IL-6、IFN- γ 、TNF- α の量を測定した。IL-6 と TNF- α は良く相関しており IL-6 が局所で長く検出され、TNF- α は 3-5 病日には減少することが明らかとなった。IL-6、TNF- α の産生細胞は NK 細胞、単球が主体で感染の primary site でのウイルス感染により IL-6、TNF- α の炎症性サイトカインが産生され血清中に報告されている量からみると桁外れに高く、局所で大量に産生されていることが分かった。

9) ヒトにおけるインフルエンザワクチン免疫 monitoring system の検討-ELISPOT 法による HLA-クラス I 拘束性インフルエンザ抗原特異的細胞障害性リンパ球 (CTL) 活性測定-

HLA-A*2402 陽性成人 2 例における recall response を検討した。1 例は IFN-gamma, 他の 1 例は granzyme B 産生細胞を ELISPOT 法にて検出した。ELISPOT 法を行う前に Flu A, B epitope peptides, IL-2 を用いて刺激培養を行ったため、recall response を検出したこ

とになる。いずれも CD8+陽性細胞 5×10^4 あたり数十から 100 個の spot を認めた。次に 3 例の小児 (12.7 歳男児, 4.9 歳男児, 6.1 才女児, 前二者は Flu A, 後二者は Flu B 罹患を rapid test で確認) から急性期, 罹患後 2 週目, 同 3 週目に末梢血検体を採取した。前述の如く前培養することなく, ex vivo で抗原 peptide 特異的な IFN-gamma の ELISPOT 法を行った。かなりの spot 数が観察された。この assay 系は 5×10^5 /ml order の CD8+細胞が 1.5ml 回収されれば実施可能であることが分かった。

10) 合成二本鎖 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による高病原性鳥インフルエンザの感染防御

自然免疫の刺激となる TLR-3 のリガンドである合成二本鎖 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をマウスに接種することにより、マウス血中特異的 IgG および鼻腔洗浄液中の IgA 抗体を誘導し致死的な高病原性鳥インフルエンザ (H5N1) 感染を防御した。さらにベトナム株で作製されたワクチンを用い抗原性の異なる香港株に対しても交叉防御が働くことが示された。合成二本鎖 RNA は TLR3 を介し自然免疫を誘導し粘膜免疫を誘導し高病原性鳥インフルエンザの感染防御に有効である事が分かった。新しいワクチンの候補であり特に流行株の予測が不可能な新型インフルエンザに対しては感染防御の有効な手段と考える。

発表論文

- 1) Ichinohe T, Ito S, Kawaguchi A, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Moriyama M, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H. Protection against influenza virus infection by intranasal vaccine with Surfclam Powder as a mucosal adjuvant. *J Med Virol* 78:954-963,2006
- 2) Asahi-Ozaki Y., Itamura S., Ichinohe T., Strong P., Tamura S., Takahashi H., Sawa H., Moriyama M., Tashiro M., Sata T., Kurata T., Hasegawa H. Intranasal administration of adjuvant-combined recombinant influenza virus HA vaccine protects mice from the lethal H5N1 virus infection. *Microbes Infect* 8:2706-14, 2006
- 3) Mori N, Motegi Y, Shimamura Y, Ezaki T, Natsumeda T, Yonekawa T, Ota Y, Notomi T, Nakayama T. Development of a new method for diagnosis of rubella virus infection by reverse transcription-loop mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol* 44: 3268-73, 2006.
- 4) Nakayama T, Onoda K. Vaccine adverse events reported in post-marketing study of the Kitasato Institute from 1994 to 2004. *Vaccine*. 25: 570-576, 2007.
- 5) Yoshida N, Fujino M, Ota Y, Notomi T, Nakayama T. Simple differentiation method of mumps Hoshino vaccine strain from wild strains by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) *Vaccine* 25; 1281-1286, 2007.

- 6) Phan TG, Kuroiwa T, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Yamamoto A, Sugita K, Nishimura T, Yagyu F, Okitsu S, Müller WEG, Maneekarn N, Ushijima H. Changing Distribution of Norovirus Genotypes and Genetic Characterization of Recombinant GIIB among Infants and Children with Diarrhea in Japan. *J Med Virol* 78: 971-978, 2006.
- 7) Phan TG, Yagyu F, Kozlov V, Kozlov A, Okitsu S, Müller WEG, Ushijima H. Viral gastroenteritis and Genetic Characterization of Recombinant Norovirus among Infants and Children with Diarrhea in Eastern Russia. *Clin Lab* 52: 247-253, 2006.
- 8) Phan TG, Yan H, Li Y, Okitsu S, Müller WEG, Ushijima H. Novel Recombinant Norovirus in China. *Emerg Infect Dis* 12: 857-858, 2006.
- 9) Phan TG, Okitsu S, Müller WEG, Kohno H, Ushijima H. Identification of Novel Recombinant Sapovirus in Japan. *Emerg Infect Dis* 12: 865-867, 2006.
- 10) Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Molecular characterization of a rare G3P[3] human rotavirus reassortant strain reveals an evidence for human-animals multiple interspecies transmissions. *J Med Virol* 78:986-994, 2006
- 11) Phan TG, Trinh OD, Yagyu F, Sugita K, Okitsu S, Muller WEG, Ushijima H. Outbreak of sapovirus infection among infants and children with acute gastroenteritis in Osaka City, Japan during during 2004-2005. *J Med Virol* 78:839-846, 2006.
- 12) Okame M, Akihara S, Hansman G, hainan Y, Thien Tuan Tran H, Phan TG, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Existence of multiple genotypes associated with acute gastroenteritis during 6-year survey of norovirus infection in Japan. *J Med Virol* 78:1318-1324, 2006.
- 13) Phan TG, Shimizu H, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. Human adenovirus type 1 related to feline adenovirus: evidence of interspecies transmission. *Clin Lab* 52: 515-518, 2006.
- 14) Phan TG, Takanashi S, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Sugita K, Nishimura T, Yamamoto A, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Detection and genetic characterization of norovirus strains circulating among infants and children with acute gastroenteritis in Japan during 2004-2005. *Clin Lab* 52: 519-525, 2006.
- 15) Phan TG, Yan H, Khamrin P, Quang T, Dey SK, Yagyu F, Okitsu S, Mueller WEG, Ushijima H. Novel intragenotype recombination in sapovirus. *Clin Lab* 52:363-366, 2006.

- 16) Okitsu-Negishi S, Okame M, Shimizu Y, Phan TG, Tomaru T, Kamijo S, Sato T, Yagyu F, Mueller WEG, Ushijima H. Detection of norovirus antigens from recombinant virus-like particles and stool samples by a commercial norovirus enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 44:3784-3786, 2006.
- 17) Phan TG, Khamrin P, Quang TD, Dey SK, Yagyu F, Okitsu S, Nishio O, Ushijima H. Genetic characterization of group A rotavirus strains circulating among children with acute gastroenteritis in Japan in 2004-2005. *Infection, Gene Evol* 7: 347-253, 2007.
- 18) Phan TG, Trinh QD, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Sugita K, Nishimura T, Yamamoto A, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Emergence of new variant rotavirus G3 among infants and children with acute gastroenteritis in Japan during 2003-2004. *Clin Lab* 53: 41-48, 2007.
- 19) Maneekarn N, Khamrin P, Chan-it W, Peerakome S, Sukchai S, Pringprao K, Ushijima H. Detection of rare G3P[19] porcine rotavirus strains in Chiang Mai, Thailand provides evidence for the origin of VP4 genes of Mc323 and Mc345 human rotaviruses. *J Clin Microbiol* 44:4113-4119, 2006.
- 20) Shimizu H, Phan TG, Nishimura S, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. An outbreak of adenovirus serotype 41 infection in infants and children with acute gastroenteritis in Maizuru city, Japan. *Infect, Genet and Evol* 7:247-253, 2007
- 21) Phan TG, Trinh QD, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Emergence of rare sapovirus genotype among infants and children with acute gastroenteritis in Japan. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 26: 21-27, 2007.
- 22) Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Chan-It W, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Novel porcine rotavirus of the genotype P[27] shares new phylogenetic lineage with G2 porcine rotavirus strain. *Virology* 2007 (E-pub).
- 23) Fujita S, Eguchi A, Okabe J, Harada A, Sasaki K, Ogiwara N, Inoue Y, Ito T, Matsuda H, Kataoka K, Kato A, Hasegawa M, Nakanishi M. Sendai virus-mediated gene delivery into hepatocytes via isolated hepatic perfusion. *Biol Pharm Bull* 29:1728-1734, 2006.
- 24) Goto, T., M. Morishita, K. Nishimura, M. Nakanishi, A. Kato, J. Ehara, K. Takayama. Novel mucosal insulin delivery systems based on fusogenic liposomes *Pharm Res* 23:384-391, 2006.
- 25) Zhou Y, Ushijima H, Frey TK. Genomic analyses of diverse rubell virus genotypes. *J Gen Virol* 88:932-941, 2007.

- 26) Wang XT, Liu PY, Tang JB, Mizutani H, Xin KQ, Ozawa K, Ushijima H. Tendon healing in vitro: Adeno-associated virus-2 effectively transduces intrasynovial tenocytes with persistent expression, but other serotypes do not. *Hand/Peripheral Nerve Plastic Reconstructive surgery*. 119:227-234, 2007.
- 27) Nagai T, Okafuji T, Miyazaki C, Ito Y, Kamada M, Kumagai T, Yuri K, Sakiyama H, Miyata A, Ihara T, Ochiai H, Shimomura K, Suzuki E, Torigoe S, Igarashi M, Kase T, Okuno Y, Nakayama T. A comparative study of the incidence of aseptic meningitis in symptomatic natural mumps patients and monovalent mumps vaccine recipients in Japan. *Vaccine* in press
- 28) Fujino M, Yoshida N, Kimura K, Zhou J, Motegi Y, Komase K, Nakayama T. Development of a new neutralization test for measles virus. *J Virol Meth* in press
- 29) Terao Y, Takagi H, Phan TG, Okitsu S, Ushijima H. Identification of IgA against coronavirus in breast milk. *Clin Lab*, in press.
- 30) Makita K, Hayakawa Y, Okame M, Homma K, Phan TG, Okitsu S, Ushijima H. First detection of IgA against Norovirus in breast milk. *Clin Lab* in press.
- 31) Dieng H, Boots M, Tamori N, Satho T, Higashihara J, Okada T, Kato K, Komalamisra N, Ushijima H, Takasaki T, Kurane I, Eshita Y. Effect of food, embryo density and conspecific immatures on hatchability in the dengue vector *Aedes albopictus* House household insect pest in press.
- 32) Dieng H, Boots M, Higashihara J, Satho T, Kato K, Okada T, Komalammisra N, Ushijima H, Takahashi T, Kurane I, Eshita Y. Two dimensional gel analysis of midgut proteins of the dengue vector *Aedes albopictus* (Diptera Culicidae) with reference to sex and Bbody size. *Jpn J Environ Entemol Zool* in press.
- 33) Nguyen TA, Yagyu F, Okame M, Phan TG, Yan H, Hoang PL, Cao Anh TH, Hoang KT, Okitsu S, Ushijima H. Diversity of viruses associated with acute gastroenteritis in children hospitalized with diarrhea in Ho Chi Minh city, Vietnam. *J Med Virol* in press.
- 34) Trinh QT, Nguyen TA, Phan TG, Khamrin P, Yan H, Hoang PL, Maneeakarn N, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Amino acid substitution in VP7 sequences of human rotavirus G1 isolated in Japan, China, Thailand, and Vietnam in 2002-2003. *J Med Virol* in press.
- 35) Ushijima H. Foreword. *Mother and child health in Asia and Africa*. *Pediatr Int* in press.

- 36) Li Y, Hotta M, Shi A, Li Z, Yin J, Guo G, Kawata K, Ushijima H. Malnutrition Improvement for Infants and Young Children under 18 months old of Dai Minority in Luxi, China. *Pediatr Int* in press.
- 37) Kominami M, Kawata K, Ali M, Meena H, Ushijima H. Factors determining prenatal HIV testing for PMTCT in Dar Es Salaam, Tanzania. *Pediatrics International*, in press.
- 38) Nguyen TH, Ushijima H. Nutritional status of low birth weight ethnic minority infants in Backan province, Vietnam. *Pediatr Int* in press.
- 399 Hotta M, Ali M, Ushijima H, Lee S, Nakamura Y, Shigeta M, Kobayashi N. Situational analysis of maternal and child health services for foreign residents in Japan. *Pediatr Int* in press.
- 40) Li L, Li K, Ushijima H. Moderate- to -vigorous physical activity and body fatness in Chinese urban school children. *Pediatr Int* in press.
- 41) Manilay P, Ali M, Yagyu F, Soulivanh P, Kuroiwa C, Ushijima H. Risk factors for protein-energy malnutrition of children under 5 years: A study from Luangprabang province, Lao PDR. *Pediatr Int* in press.

キチン微粒子（CMP）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による感染防御

長谷川秀樹、一戸 猛志（国立感染症研究所感染病理部）

倉田 毅（国立感染症研究所）

研究要旨：キチン微粒子(CMP)は強力なマクロファージの刺激物質として知られ免疫応答を刺激することが知られている。経鼻インフルエンザワクチンのアジュバントとしてキチン微粒子を用いその感染防御能についてマウスモデルを用い検討を行った。PR8 (H1N1) ワクチンをキチン微粒子と共に BALB/c マウスに経鼻接種を行うことにより鼻腔洗浄液中に PR8 の HA 特異的な IgA 及び血清中に IgG を誘導することができさらにチャレンジウイルス感染に対し感染を完全に防御することが可能であった。さらにワクチン株とチャレンジ株が異なる場合においても交叉防御能が見られた。天然物由来であるキチン微粒子はその安全性及び有効性から経鼻アジュバントとして有望であることがしめされた。

【目的と意義】

現行のインフルエンザ皮下注射ワクチンの場合、ワクチン株と流行株が一致するとき予防効果が期待できるがワクチン株と流行株が一致しないとき予防効果が著しく減少する。そこで交叉防御能をゆうする粘膜での分泌型 IgA 抗体を誘導するには、ワクチンを粘膜に投与することが必要であるが、高い免疫応答を誘導するにはアジュバント併用が不可欠である。これまで、有効なアジュバントとしてコレラトキシンや大腸菌易熱性毒素やその変異体が用いられてきたが、その使用については安全性に疑念がでており、新たな安全性の高いアジュバントが求められている。そこでマクロファージを活性化する事がしられている天然物由来のキチン微粒子は安全でありその経鼻アジュバントとしての効果が示されればその意義は大きい。そこで本研究では経鼻アジュバントとしてのキチン微粒子の効果を検討した。

【材料と方法】

HA ワクチン：ワクチンは北里研究所で作成された Influenzavirus A,; A/Puerto Rico/8/34 (A/PR8; H1N1), A/Yamagata/120/86 (A/Yamagata; H1N1), A/Guizhou/54/89 (A/Guizhou, H3N2) *influenzavirus B*, B/Ibaraki/2/85 (B/Ibaraki)、それぞれの HA ワクチンを用いた。

アジュバント：キチン微粒子（Chitin Microparticles, Sigma-Aldrich, Poole, UK）:1-20 μ m 大の微粒子。CTB*: コレラトキシン B サブユニット、0.1%コレラトキシン入り, Sigma, St. Louis, MO

マウス：6-8週齢のメス BALB/c マウス（日本 SLC）

ウイルス：マウス馴化 A/Puerto Rico/8/34 (A/PR8; H1N1)をチャレンジに用いた。

ワクチン接種と抗体測定

1群5匹の BALB/c マウスにエーテル麻酔下に HA ワクチン1µg とアジュバントとしてキチン微粒子 10µg, 100µg, CTB* 1µg をそれぞれ用い経鼻接種を行った。第1回目の接種後4週間及び6週間後に追加免疫を行い最終免疫の2週間後に鼻腔洗浄液、血清の回収及びウイルスチャレンジを行った。ウイルスチャレンジは 1×10^2 PFU のマウス馴化 PR8 ウイルスを片鼻 1.2µl ずつ両鼻に接種した。

回収された鼻腔洗浄液及び血清中の抗体価は ELISA 法を用いて HA 特異的 IgA 及び IgG の測定を行った。ウイルス価は MDCK 細胞を用いたプラーク法で測定した。

結果

キチン微粒子アジュバント併用インフルエンザワクチンを経鼻接種後の鼻腔洗浄液中の HA 特異的 IgA と血清中の HA 特異的 IgG の抗体価を図1に示した。

図に示すごとく PR8 ワクチンと CMP100µg を経鼻接種すると CTB*をアジュバントとして用いた場合と同等の特異的 IgA 及び IgG 応答が見られた。CMP を 10µg に減らしても有意な抗体応答がみられた。これらの抗体応答はアジュバントを用いないワクチンのみの接種では見られなかった。

アジュバント併用経鼻インフルエンザワクチンの交叉防御能を調べるために型の異なるウイルスのワクチンをアジュバントと共に経鼻接種したその結果、図1に示すごとく A/Yamagata(H1N1), A/Guizhou (H3N2), B/Ibaraki について PR8 と交叉反応する鼻腔洗浄液中に IgA が検出された。

図1

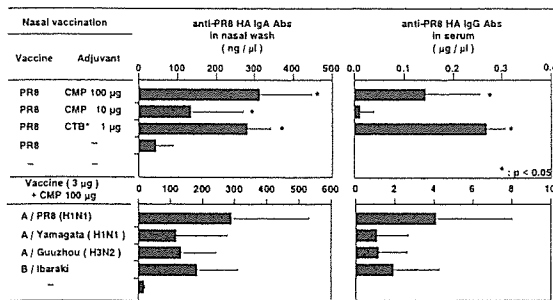
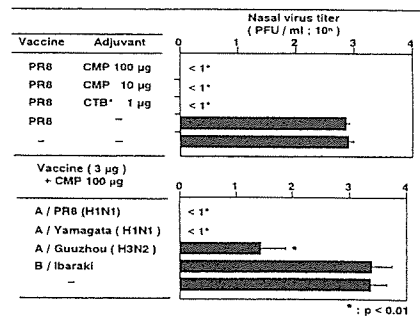


図2



感染防御

アジュバント併用インフルエンザワクチンを経鼻接種後1匹あたり100pfuのインフルエンザウイルスチャレンジ感染を行った。図2に示すごとく100µg, 10µgのCMPと共にワクチ

ン接種した群において CTB*を用いた場合と同様 PR8 (H1N1) ウイルスのチャレンジを完全に防御した。ワクチンのみの接種ではまったく防御効果が見られなかった。

交叉防御能を調べるため、A/Yamagata(H1N1), A/Guizhou (H3N2), B/Tbaraki のそれぞれのワクチンを CMP をアジュバントに用い経鼻接種後 100pfu の PR8(H1N1)インフルエンザウイルスチャレンジを行った。結果は同じ H1N1 である A/Yamagata は完全防御が成立し、A/Guizhou(H3N2)は部分防御、B/Tbaraki に関しては感染抑制効果がまったく見られなかった。

考察

キチン微粒子をアジュバントとして用いることによりワクチンの経鼻接種で粘膜での特異的 IgA 誘導と血清中の IgG を誘導することができ感染防御に非常に有用であることが示された。いままで粘膜免疫誘導によるインフルエンザウイルス感染防御の研究はコレラトキシン(CTB)や大腸菌易熱性毒素 (LT) などを用いて行われてきた。粘膜免疫誘導の重要性は示されてきたがヒトへの応用はその副作用により進まなかったのが現状である。今回アジュバント効果がみとめられたキチン微粒子はカニの甲羅やえびの甲羅など天然物を原料とする安全な物質である。その作用機序はまだ不明な点が多いがキチンには IL-12, IFN- γ , TNF- α などの Th1 関連サイトカインの誘導が知られておりワクチンとともに経鼻接種されたばあい鼻咽頭関連リンパ装置 NALT で直接抗原提示細胞に取り込まれ働いていると考えられる。

結論

不活化ワクチンを経鼻粘膜接種することは粘膜免疫誘導に有用であり粘膜を介して感染する様々な病原体に対して有効である。しかし不活化ワクチンでの粘膜免疫誘導のためにはアジュバントが必要であり、ヒトでの応用が可能な新しいアジュバントの開発が望まれている状況である。今回その粘膜アジュバント作用が示されたキチン微粒子はヒトでの応用を考えた場合安全で有効なアジュバントとして有望であると考えられる。

論文発表

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*, *in press*

合成二重鎖 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による感染防御

長谷川秀樹、一戸 猛志（国立感染症研究所感染病理部）
倉田 毅（国立感染症研究所）

研究要旨：インフルエンザワクチンで交叉防御効果が期待される分泌型 IgA を粘膜上に誘導する為にはワクチンの粘膜への投与が不可欠であり、またワクチンと同時にアジュバントの併用が必要である。今回我々は Toll-like receptor(TLR)3 のリガンドとして知られる二重鎖 RNA を経鼻インフルエンザワクチンのアジュバントに用いその分泌型 IgA 及び IgG 抗体誘導能、感染防御能についてマウスのインフルエンザモデルを用いて検討した。Poly(I:C)アジュバントを PR8 (H1N1) ワクチンと共に BALB/c マウスに経鼻接種を行うことにより鼻腔洗浄液中に PR8 の HA 特異的な IgA 及び血清中に IgG を誘導することができさらにチャレンジウイルス感染に対し感染を完全に防御することが可能であった。さらにワクチン株とチャレンジ株が異なる場合においても交叉防御能が見られた。合成二重鎖 RNA は TLR3 を介し自然免疫を誘導し粘膜免疫を誘導できることがわかった。

【目的と意義】

現行の皮下接種インフルエンザワクチンの場合、ワクチン株に対する IgG が誘導され流行株がワクチン株と一致するとき予防効果が期待できるがワクチン株と流行株が一致しないとき予防効果が著しく減少する。そこでワクチンの接種ルートを変え交叉防御能を有する粘膜での分泌型 IgA 抗体を誘導する事がより効果的なワクチン開発には必要である。粘膜での分泌型 IgA を誘導するにはワクチンを粘膜に接種することが必要であるが、高い免疫応答を誘導するにはアジュバント併用が不可欠である。これまで、有効なアジュバントとしてコレラトキシンや大腸菌易熱性毒素やその変異体が用いられてきたが、その使用については安全性に疑念がでており、新たな安全性の高いアジュバントが求められている。そこで内因性インターフェロン誘導のために既にヒトへの投与も行われた事があり TLR3 を介して自然免疫を活性化する事が知られている合成二重鎖 RNA, poly(I:C)を用い、経鼻アジュバントとしての効果が示されればその意義は大きい。そこで本研究では経鼻アジュバントとしての二重鎖 RNA、poly(I:C)の効果を検討した。

【材料と方法】

HA ワクチン：ワクチンは北里研究所で作成された Influenzavirus A; A/Puerto Rico/8/34

(A/PR8; H1N1), A/Yamagata/120/86 (A/Yamagata; H1N1), A/Guizhou/54/89 (A/Guizhou, H3N2)

influenzavirus B, B/Ibaraki/2/85 (B/Ibaraki)、それぞれの HA ワクチンを用いた。

アジュバント：poly(I:C)、ポリイノシンポリシチジン酸[polyinosinic-polycytidylic acid, poly(I:C)] CTB*: コレラトキシン B サブユニット、0.1%コレラトキシン入り, Sigma, St. Louis, MO

マウス：6-8 週齢のメス BALB/c マウス（日本 SLC）

ウイルス：マウス馴化 A/Puerto Rico/8/34 (A/PR8; H1N1)をチャレンジに用いた。

ワクチン接種と抗体測定

1 群 5 匹の BALB/c マウスにエーテル麻酔下に HA ワクチン 1 µg とアジュバントとして poly(I:C) 0.1µg, 1µg, 3µg, 10µg,及び熱変性を加えた poly(I:C) 10µg をそれぞれ用い経鼻接種を行った。第 1 回目の接種後 4 週間及び 6 週間後に追加免疫を行い最終免疫の 2 週間後に鼻腔洗浄液、血清の回収及びウイルスチャレンジを行った。ウイルスチャレンジは 1×10^2 PFU のマウス馴化 PR8 ウイルスを片鼻 1.2µl ずつ両鼻に接種した。

回収された鼻腔洗浄液及び血清中の抗体価は ELISA 法を用いて HA 特異的 IgA 及び IgG の測定を行った。さらに IgG のサブクラスを測定した。ウイルス価は MDCK 細胞を用いたブランク法で測定した。

【結果】

抗体応答

Poly(I:C)併用インフルエンザワクチンを経鼻接種後の鼻腔洗浄液中の HA 特異的 IgA と血清中の HA 特異的 IgG の抗体価を図 1 に示した。

図に示すごとく PR8 ワクチンと poly(I:C) 1-10µg を経鼻接種すると特異的 IgA 及び IgG 応答が見られた。Poly(I:C) 3µg 及び 10µg では 1 回接種のみで有意な抗体応答がみられた。これらの抗体応答はアジュバントを用いないワクチンのみの接種では見られなかった。

また熱変性を加えた poly(I:C)をアジュバントとして用いると抗体応答は見られなくなった。アジュバント併用経鼻インフルエンザワクチンの交叉防御能を調べるために型の異なるウイルスのワクチンをアジュバントと共に経鼻接種すると A/Yamagata(H1N1), A/Guizhou (H3N2), B/Ibaraki について PR8 と交叉反応する鼻腔洗浄液中に IgA が検出された。Poly(I:C)をアジュバントに用いた時の IgG 抗体のサブタイプを CTB*を用いた時と比較した結果、図 2 に示すごとく poly(I:C), CTB*共に IgG1, IgG2a ほぼ同量認められた。

感染防御

アジュバント併用インフルエンザワクチンを経鼻接種後 1 匹あたり 100pfu のインフルエンザウイルスチャレンジ感染を行った。図 1 に示すごとく 10µg, 3µg, 1µg の poly(I:C)と共にワ

クチン接種した群において PR8 (H1N1) ウイルスのチャレンジを完全に防御した。ワクチンのみの接種、熱変性を加えた poly(I:C)をアジュバントとした場合ではまったく防御効果が見られなかった。

交叉防御能を調べるため、A/Yamagata(H1N1), A/Guizhou (H3N2), B/Ibaraki のそれぞれのワクチンを poly(I:C)をアジュバントに用い経鼻接種後 100pfu の PR8(H1N1)インフルエンザウイルスチャレンジを行った。結果は同じ H1N1 である A/Yamagata は完全防御が成立し、A/Guizhou(H3N2)は部分防御、B/Ibaraki に関しては感染抑制効果がまったく見られなかった。

【考察】

合成二重鎖 RNA, poly(I:C)をアジュバントとして用いることによりワクチンの経鼻接種で粘膜での特異的 IgA 誘導と血清中の IgG を誘導することができ感染防御に非常に有用であることが示された。いままで粘膜免疫誘導によるインフルエンザウイルス感染防御の研究はコレラトキシン(CTB)や大腸菌易熱性毒素 (LT) などを用いて行われてきた。粘膜免疫誘導の重要性は示されてきたがヒトへの応用はその副作用により進まなかったのが現状である。今回アジュバント効果がみとめられた poly(I:C)は TLR3 のリガンドとして働き自然免疫を誘導し IgA 応答等の獲得免疫との架け橋として働くと考えられる。

【結論】

現在のインフルエンザワクチンはその効果の点でまだまだ改良の余地がありアジュバント併用経鼻ワクチンが新しいワクチンの候補であると考ええる。不活化ワクチンを経鼻粘膜接種することは粘膜免疫誘導に有用であり粘膜を介して感染する様々な病原体に対して有効である。安全で効果のあるアジュバントの開発が望まれている状況において今回その粘膜アジュバント作用が示された二重鎖 RNA はヒトでの応用を考えた場合安全で有効なアジュバントとして有望であると考ええる。

論文発表

1. 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.
2. 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.

図 1

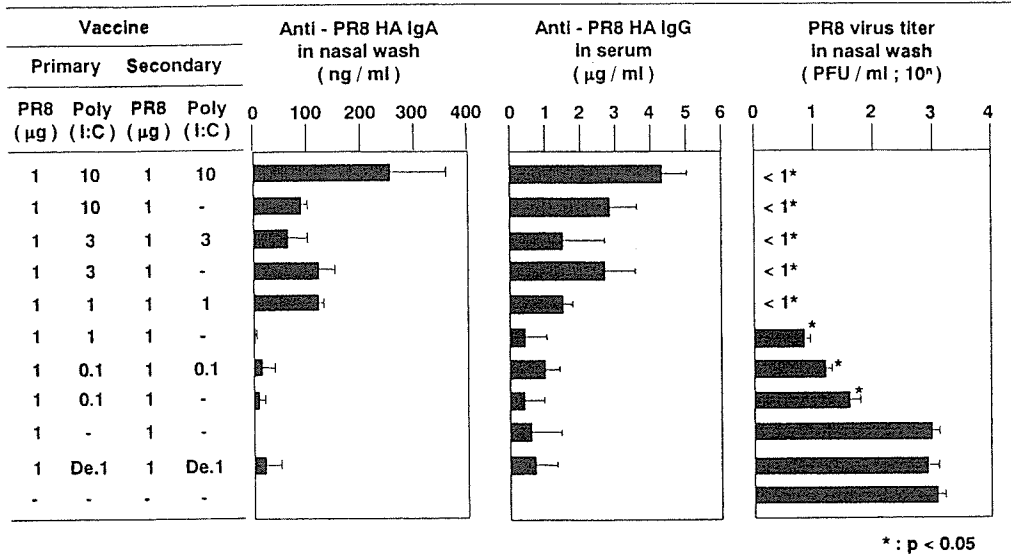
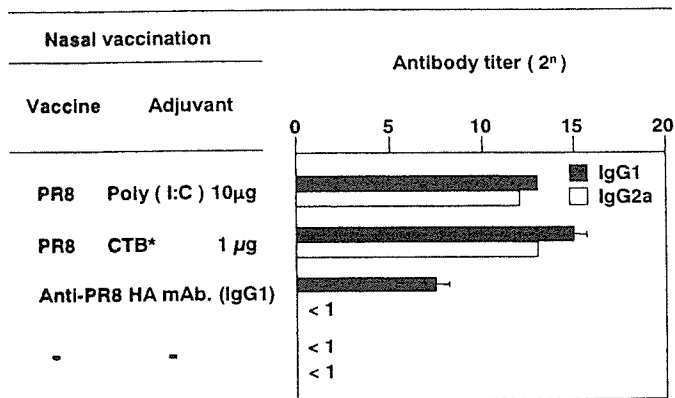


図 2



合成二本鎖 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による高病原性鳥インフルエンザの感染防御

長谷川 秀樹、一戸 猛志 (国立感染症研究所感染病理部)
倉田 毅 (国立感染症研究所)

研究要旨：アジアを発端とした高病原性鳥インフルエンザの流行はヨーロッパ、アフリカへと広がりを見せ、ヒトでの感染例もアジアを中心に報告されている。その高い致死率と今後ヒトからヒトへの感染能を獲得した場合パンデミックを起こす可能性がある事から対策が急務である。本研究において自然免疫の刺激となる Toll-like receptor(TLR)3 のリガンドである合成二本鎖 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により血中の特異的 IgG および鼻腔洗浄液中の IgA 抗体を誘導し致死的な高病原性鳥インフルエンザ (H5N1) 感染を防御した。更に、ベトナム株で作製されたワクチンを用い抗原性の異なる香港株に対しても交叉防御が働く事がしめされた。合成二本鎖 RNA は TLR3 を介し自然免疫を誘導し粘膜免疫を誘導し高病原性鳥インフルエンザの感染防御に有効である事がしめされた。

【目的と意義】

アジアを発端として感染の広がりを見せ世界中に蔓延した高病原性鳥インフルエンザはヒトからヒトへの感染能を獲得するとヒトの新型インフルエンザとなりパンデミックを引き起こす可能性がある。それを未然に防ぐ為にはワクチンの接種が有効と考えられる。しかし現行法のワクチン接種法ではいくつかの問題点がある。その一つは高病原性鳥インフルエンザ(H5N1)が皮下接種で免疫応答が低く、不活化ワクチン単独では有効な中和抗体価が得られていないという事であり、もう一つは、現行の皮下接種インフルエンザワクチンの場合は、ワクチン株に対する IgG が誘導され流行株がワクチン株と一致するとき予防効果が期待できるがワクチン株と流行株が一致しないとき予防効果が著しく減少する。またどの株がパンデミックを起こすのか予測が不可能であり事前にパンデミックワクチンを準備する事は不可能である。そこでワクチンの接種ルートを変え交叉防御能を有する粘膜での分泌型 IgA 抗体を誘導する事がより効果的なワクチン開発には必要である。内因性インターフェロン誘導のために既にヒトへの投与も行われた事があり TLR3 を介して自然免疫を活性化する事が知られている合成二本鎖 RNA, poly(I:C)を用い、高病原性鳥インフルエンザの感染防御効果が示されればその意義は大きい。そこで本研究では経鼻アジュバントとしての二本鎖 RNA, poly(I:C)を用いた高病原性鳥インフルエンザワクチンの感染防御効果の検討をした。

【材料と方法】

ワクチン：ワクチンは北里研究所で作成されたホルマリン不活化全粒子ワクチン NIBRG14 A/VT/JP1203/2004-PR8(H5N1)株を用いた。

アジュバント：poly(I:C), ポリイノシンポリシチジン酸[polyinosinic-polycytidylic acid, poly(I:C)] CTB*: コレラトキシン B サブユニット、0.1%コレラトキシン入り, Sigma, St. Louis, MO

マウス：6-8週齢のメス BALB/c マウス (日本 SLC)

ウイルス：ヒトの患者から分離された強毒株 A/Vietnam/1194/2004(H5N1)、A/HK/483/97 (H5N1)

ワクチン接種と抗体測定

1群5匹の BALB/c マウスにエーテル麻酔下にホルマリン不活化全粒子ワクチン NIBRG14 1 µg とアジュバントとして poly(I:C) 0.1 µg, 1 µg, 10 µg, をそれぞれ用い経鼻接種を行った。第1回目の接種後4週間及び6週間後に追加免疫を行い最終免疫の2週間後に鼻腔洗浄液、血清の回収及びウイルスチャレンジを行った。ウイルスチャレンジは 1×10^2 PFU の強毒株 A/Vietnam/1194/2004(H5N1)、A/HK/483/97(H5N1) ウイルスを片鼻 1.2 µl ずつ両鼻に接種した。

回収された鼻腔洗浄液及び血清中の抗体価は ELISA 法を用いてワクチン特異的 IgA 及び IgG の測定を行った。ウイルス価は MDCK 細胞を用いたプラーク法で測定した。

【結果】

抗体応答

Poly(I:C)併用インフルエンザワクチンを経鼻接種後の鼻腔洗浄液中のワクチン特異的 IgA と血清中のワクチン特異的 IgG の抗体価を図1に示した。

図に示すごとく NIBRG14 ワクチンと poly(I:C) 1-10 µg を経鼻接種すると特異的 IgA 及び IgG 応答が見られた。皮下接種群においては血清中の IgG 応答は見られたが鼻腔洗浄液中の IgA 応答はまったくみられなかった。鼻腔洗浄液中の IgA 抗体は 0.1 µg のワクチンと 10 µg の poly(I:C)で免疫した群まで 100U/ml 以上の高い抗体誘導が得られた。

感染防御

アジュバント併用インフルエンザワクチンを経鼻接種後 1 匹あたり 100pfu の強毒株 A/Vietnam/1194/2004(H5N1)攻撃感染を行った。図1に示すごとく高い IgA 応答が見られた 0.1 µg のワクチンと 10 µg の poly(I:C)で免疫した群までにおいて3日後の鼻腔洗浄液中での

生きたウイルスは検出されなかったが生存率は 80%であった。また、0.5 μ g のワクチンと 10 μ g の poly(I:C)と共にワクチン接種した群において 100%の生存率が見られた。非免疫群において生存率は 0%だった。

交叉防御能を調べるため、ベトナム株のワクチンを poly(I:C)をアジュバントに用い皮下接種及び経鼻接種後 100pfu の強毒株 A/HK/483/97(H5N1)インフルエンザウイルス攻撃感染を行った。ワクチンの皮下接種群の生存率が 80%だったのに対し、経鼻接種群では 100%だった。

【考察】

合成二本鎖 RNA, poly(I:C)をアジュバントとして用いることにより高病原性鳥インフルエンザワクチンの経鼻接種で粘膜での特異的 IgA 誘導と血清中の IgG を誘導することができ感染防御に非常に有用であることが示された。また、ワクチンの経鼻接種により抗原性の異なる H5N1 インフルエンザウイルスに対する交叉防御が示された事より、パンデミックに備えたワクチンを考える場合今回用いたアジュバント併用経鼻ワクチンが現行の皮下接種法より優れている事が考えられる。今回アジュバント効果がみとめられた poly(I:C)は TLR3 のリガンドとして働き自然免疫を誘導し IgA 応答等の獲得免疫との架け橋として働き、高病原性鳥インフルエンザの感染防御に働いたと考えられる。

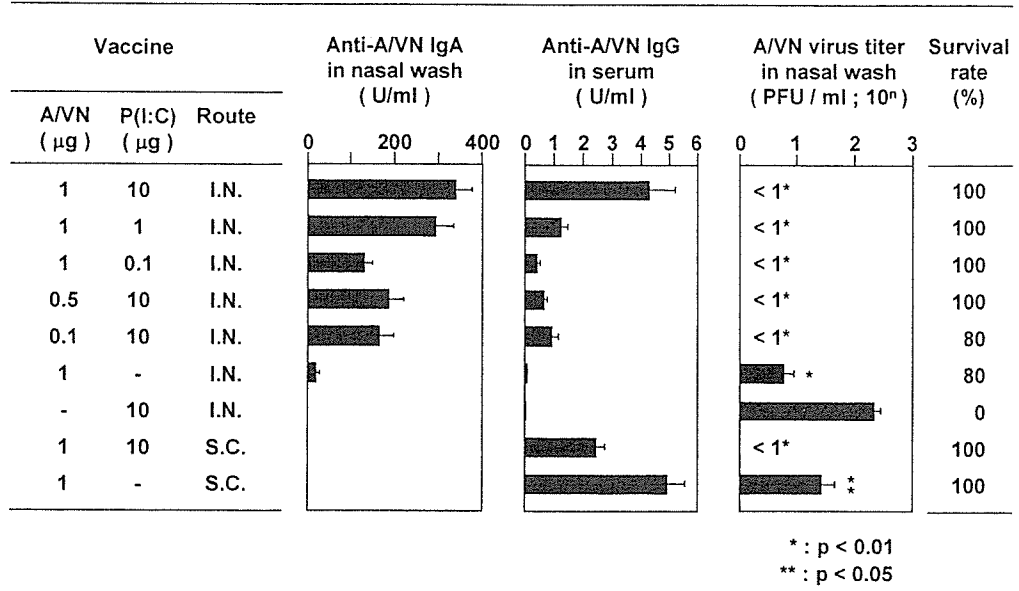
【結論】

高病原性鳥インフルエンザや今後パンデミックを起こす可能性のある新型インフルエンザに対して現行法のインフルエンザワクチンはその効果の点でまだまだ改良の余地がある。感染自体を粘膜で防御し交叉反応性のあるアジュバント併用経鼻ワクチンが新しいワクチンの候補であり特に流行株の予測が不可能な新型インフルエンザに対しては感染防御の有効な手段と考える。

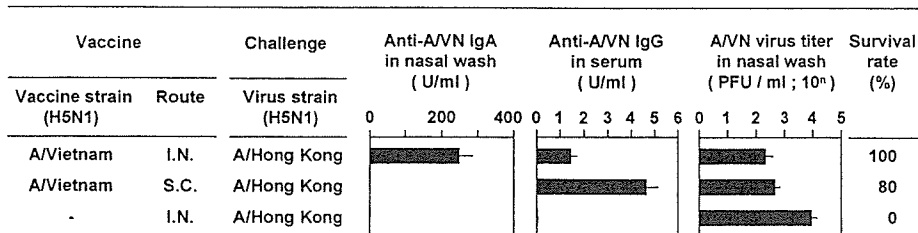
論文発表

1. Ichinohe T, Ito S, Kawaguchi A, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Moriyama M, Chiba J, Kurata T, Sata T, and Hasegawa H* Protection against influenza virus infection by intranasal vaccine with Surfclam Powder as a mucosal adjuvant. *J Med Virol*, 2006 78:954-963.
2. Asahi-Ozaki Y., Itamura S., Ichinohe T., Strong P., Tamura S., Takahashi H., Sawa H., Moriyama M., Tashiro M., Sata T., Kurata T., Hasegawa H., Intranasal administration of adjuvant-combined recombinant influenza virus HA vaccine protects mice from the lethal H5N1 virus infection. *Microbes Infect.* 2006 Oct;8(12-13):2706-14. Epub 2006 Aug 28.

☒ 1



☒ 2



経鼻高力価不活化 influenza virion ワクチン被接種者 における特異的免疫の動態

熊谷 卓司、長田 伸夫（札幌小児アレルギー感染症研究会）

奥井 登代、矢野 昭起（北海道立衛生研究所）

中山 哲夫（北里生命科学研究所）

奥野 良信（大阪府立公衆衛生研究所）

佐藤 昇志（札幌医科大学第1病理）

迫田 義博、喜 田 宏（北大獣医院微生物）

1. 研究目的

現在広く用いられている不活化インフルエンザワクチンは小変異(drift)を繰り返すインフルエンザウイルスを追跡し毎年ワクチン候補株の選定を繰り返さなければならないという問題点を包含している¹⁾。そしてその有効性は流行株とワクチン株の類似性に依存しており、流行株と不一致である場合はその程度に応じてワクチンの予防効果は減弱する。株間の一致が見られる場合における効果についても議論が続いており²⁾、さらに乳幼児、特に乳児における有効性に疑問を投げかける成績が蓄積しつつある³⁾。一方で、我が国においてはインフルエンザ脳症に対する保護者の懸念もあり、幼児のインフルエンザワクチン接種率は世界で随一となっている。近い将来に予想される新型インフルエンザウイルスの出現とそれによるパンデミックに対する preparedness の観点からも現行の不活化インフルエンザワクチンを凌駕する効果があるワクチンの開発は愁眉の課題である。

最近、高田らは carrier, adjuvant を用いない不活化 whole virion influenza vaccine をマウスに経鼻接種し、亜型特異性をこえる交差免疫(cross-protective immunity, heterosubtypic immunity)を誘導することに成功した⁴⁾。さらに Heinen らは豚でインフルエンザ生ウイルス接種による交差免疫誘導に成功した⁵⁾。rodent model のみならず豚の系でも heterosubtypic immunity が誘導され得ることが証明された意義は大きく人での可能性に希望を抱かせる研究成果と思われた。

著者らは今般、少数の年長児、成人に比較的高力価の不活化 whole virion を経鼻接種し、それに対する特異的免疫応答を多数回の末梢血、唾液検体採取によって詳細に検討したので報告する。

2. 研究対象と方法

(1) 研究対象

成人 10 例（男性 2 名、女性 8 名、21-54 歳、平均年齢 35.8 歳）、年長児 3 例（16, 14, 13 歳、男児 1 名、女児 2 名）を対象として、高度精製フォルマリン不活化 influenza virion (A/Aichi/2/68 (H3N2)) 125 µgHA を鼻腔に滴下接種（左右鼻腔各々 75µgHA）し、さらに 4 週間後に同様の追加接種を行った。接種前に 1 回目の耳下腺唾液、末梢血検体採取を行い以後 1 週間毎に検体を継続的に採取し合計 9 回、2 ヶ月間の follow up を行った。耳下腺唾液は Stensen's duct より Lashley cup を用いて採取した。対象者から informed consent を得た。また本研究は日本外来小児科学会倫理委員会の認可を得ている。

(2) ウイルス抗原

インフルエンザウイルス特異的リンパ球増殖反応試験に使用したウイルス抗原としては 03/04 期のワクチン株ウイルスである A/ニューカドニア/20/99(H1N1)、A/パナマ/2007/99(H3N2)、B/山東/7/97 を発育鶏卵で増殖させ、蔗糖濃度勾配遠心法により精製しフォルマリンで不活化した virion を用いた。希釈前のそれぞれの抗原力価は HA 蛋白に換算して各々 734, 1603, 916µg/ml であった。

血清赤血球凝集抑制反応(HI)抗体および唾液 ELISA IgA, IgG 抗体測定用の抗原としては heterologous 抗原として 2003/2004 シーズンのワクチン株である A/ニューカドニア/20/99(H1N1), A/パナマ/2007/99(H3N2), B/山東/7/97 および homologous 抗原として A/Aichi/2/68 (H3N2)を用いた。

(3) 血清抗体価測定

赤血球凝集抑制反応 (HI)を用いた。使用血球は人 O 型赤血球である。

(4) 唾液 ELISA IgA, IgG 抗体測定⁶⁾

96 穴 ELISA plate に 1µg/ml の influenza virus を分注, 4°C overnight 静置。洗浄後, 5% skim milk 含 PBS を分注, 4°C overnight 静置。被検血清または唾液を duplicate で 2 倍階段希釈し, 室温で 1 時間静置。洗浄後, HRP-conjugated goat anti-mouse IgG or IgA (Jackson Immuno Research Laboratory, West Grove, PA) を分注し 4°C overnight 静置。TMB solution (Moss Inc., Pasadena, MD)で発色させ, microplate reader で測定, 有意最大希釈倍数の逆数をもって抗体価とした。

(5) インフルエンザウイルス特異的リンパ球増殖反応試験 (Lymphocyte Proliferation Test: LPT)³⁾

微量全血培養法 (Whole blood microculture assay) を用いた。ヘパリン加末梢血を RPMI1640 培養液で 10 倍希釈し, この希釈液を U 型 microplate に各 well 200µl ずつ分注した。さらに, 種々の濃度に希釈したウイルス抗原および対照としての PBS を 20µl ずつ各希釈について 3 well に添加し, 37°C の炭酸ガス培養器で 7 日間培養した。培養終了の 24 時間前に ³H-thymidine 0.2 µCi を各 well に添加した。Multiple automated sample harvester (MASH) を用いて得られた単核球付着 glass fiber filter の radioactivity を液体シンチレーションカウンターでカウントし, ウイルス抗原添加, 対照抗原添加培養の uptake ratio すなわち stimulation index (S.I.) を算定した。S.I. ≥3.0 を陽性とした。

3. 研究結果

(1) 血清 HI 抗体価推移

Figure 1 にワクチン接種前後の HI 抗体価の推移を示す。全例接種前検体で H1, H3 に対して 1:40 以上を示した。A/Aichi/2/68 (H3N2) strain を用いた経鼻投与ワクチンは heterologous な抗原である A/New Caledonia/20/99 (H1N1), A/Panama/2007/99 (H3N2) および前抗体価が必ずしも高値ではなかった B/Shandong/7/97 に対しても血清 HI 抗体価レベルの booster response を誘導し得なかった。

Homologous 抗原である A/Aichi/2/68 (H3N2) に対しては 13 例中 7 例において前抗体価が 1:40 以上を示し, booster response は観察されなかった。症例 7 では前抗体価が低く抗体価の上昇が観察されたが, 症例 9 においては同様に前抗体価が低かったが抗体価の上昇は認めなかった。症例 10, 11, 12, 13 においては前抗体価が陰性で抗体価の上昇を示した。症例 10, 13 では 2 回接種後によりやく抗体価の上昇を認めた。

(2) 唾液中 IgA, IgG 抗体価

heterologous な抗原に対する IgA は全唾液検体で検出されなかった。さらに heterologous 抗原に対する IgG 抗体は検体量の制約から現在未検索である。

Homologous 抗原である A/Aichi/2/68 (H3N2) strain に対する唾液中 IgA, IgG 抗体価の推移を Figure 2 に示す。被接種者 13 例中 4 例は前検体で IgG 抗体を保有していた。前検体で陰性であった 9 症例も含め 12 例で 2 管以上の IgG 抗体価上昇を認めた。IgA 抗体価については全例有意な上昇を認めたが, 一般に抗体価は低値であった。

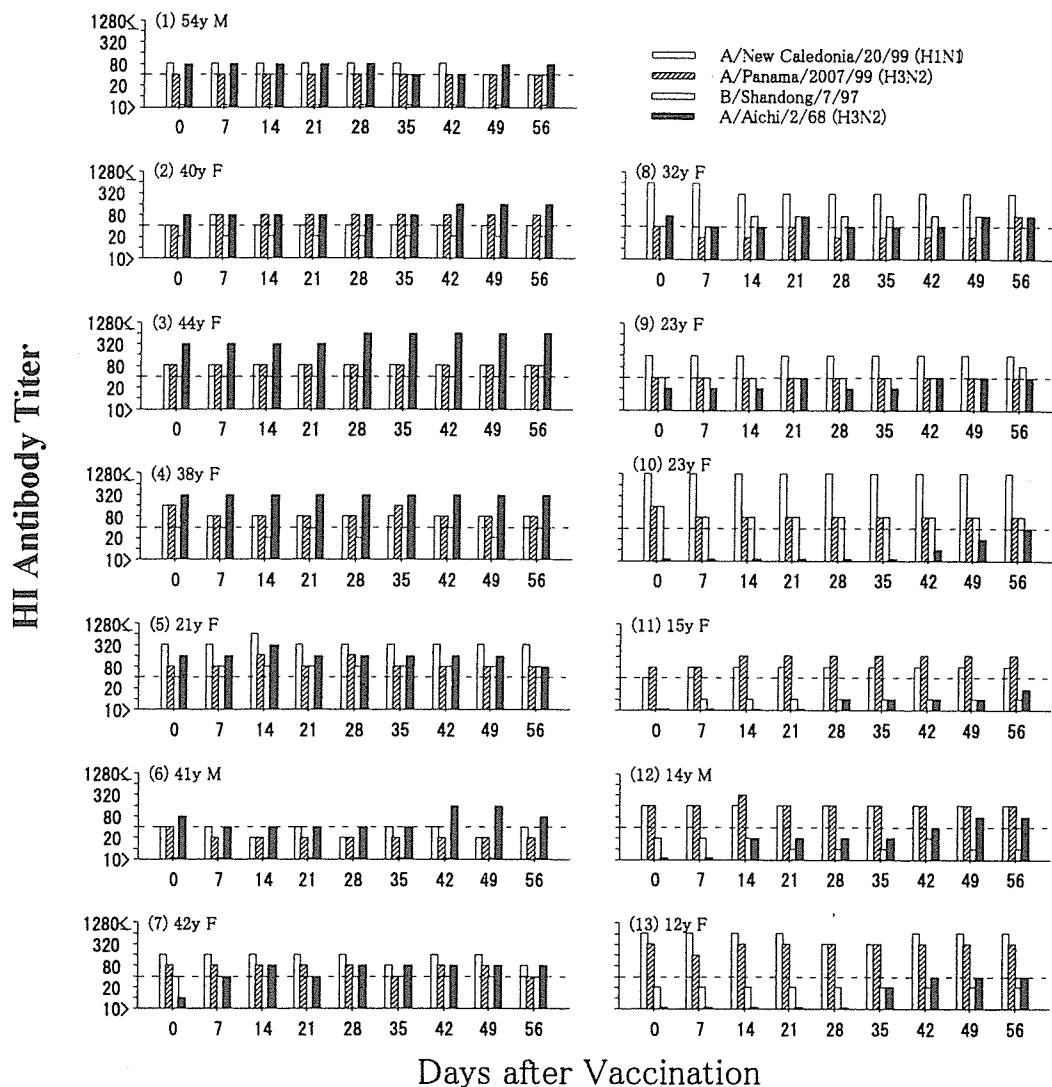


Figure 1. Kinetics of HI antibody titer directed against homologous and heterologous influenza virus antigen in subjects inoculated with nasal inactivated whole virion influenza vaccine. Immunization was performed on the day of the first (day 0) sampling and 4 weeks after the first vaccination (day 28). Nine consecutive blood specimens were obtained once a week. Abscissa represents weeks after vaccination and ordinate the HI titer. The horizontal broken line defines the point of 1:40 in HI titer.

(3) 特異的リンパ球増殖反応の推移 (Figure 3)

今回は heterologous な抗原である A/New Caledonia/20/99 (H1N1), A/Panama/2007/99 (H3N2), B/Shandong/7/97 に対する反応のみが検出可能であった。

A/New Caledonia/20/99 (H1N1), A/Panama/2007/99 (H3N2) に対する反応では、全 13 例中 7 例 (症例 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10) が接種前検体で陽性反応を認め、接種 1 週後の検体では活性が低下し、2 週後にピークとなり、その後徐々に減弱した。4 例では (症例 7, 11, 12, 13) 接種前検体の活性は低く、接種後徐々に上昇し 2 週後にピークとなった。これら 11 例における 2 回目の接種に対する反応のピークは初回接種に比してやや遅く観察された。他の 2 例 (症例 1, 2) では、接種前に陽性であったが、接種後遅くに高い反応を呈するに至った。

B/Shandong/7/97 に対しては初回免疫、および追加免疫後に高い反応を呈した。