

200817005A

厚生労働科学研究費補助金

平成 20 年度

医療技術実用化総合研究事業：基礎研究成果の臨床応用推進研究

経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンの臨床応用に関する研究
(H19-トランス-一般-002)

研 究 報 告 書

平成 21 年 3 月

研究代表者 長谷川 秀樹
(国立感染症研究所)

厚生労働科学研究費補助金

平成 20 年度

医療技術実用化総合研究事業：基礎研究成果の臨床応用推進研究

経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンの臨床応用に関する研究
(H19 - トランス - 一般 - 002)

研 究 報 告 書

平成 21 年 3 月

研究代表者 長谷川 秀樹
(国立感染症研究所)

目 次

I. 総括研究報告書	
経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンの臨床応用に関する研究	1
研究代表者：長谷川秀樹 (国立感染症研究所・感染病理部)	
II. 分担研究報告書	
1. アジュバントの選択と製剤化の検討	17
研究分担者：長谷川秀樹 (国立感染症研究所・感染病理部)	
2. 試作ワクチンの作製と安全性及び効果の検討	24
研究分担者：真鍋貞夫 (財団法人阪大微生物研究会観音寺研究所)	
3. ワクチン株の選択と製剤化の検討	29
研究分担者：田代真人 (国立感染症研究所・ウイルス第3部)	
4. 野生水禽、家禽およびヒトから分離されたインフルエンザウイルス株の 抗原性、遺伝子および生物性状の解析	41
研究分担者：喜田 宏 (北海道大学大学院獣医学研究科)	
5. アジュバントの選択と製剤化の検討、免疫学的研究	44
研究分担者：清野研一郎 (聖マリアンナ医科大学・ 難病治療研究センター生体機能制御研究部門)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	47

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金
(医療技術実用化総合研究事業：基礎研究成果の臨床応用推進研究)
総括研究報告書

経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンの臨床応用に関する研究

国立感染症研究所感染病理部第二室 室長 長谷川 秀樹

研究要旨 感染防御効果の高い経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンの臨床応用を目的とし、粘膜アジュバント候補の合成二本鎖 RNA polyI:polyC₁₂U (Ampligen)とベトナム株由来 NIBRG14 の不活化全粒子ワクチンを用い霊長類で効果を調べた。Ampligen とともに、ワクチンの鼻粘膜への定着性を向上させることにより鼻粘膜での免疫応答を増進するための添加剤として、アレルギー治療薬にも応用されているカルボキシビニルポリマー基剤 (CVP) を併用した試作ワクチンを作製した。この試作ワクチンの抗原は、新型インフルエンザ用の全粒子ウイルスワクチンとした。この Ampligen・CVP 基剤併用ワクチンは、マウス経鼻接種試験において、Ampligen 単独よりも高い免疫応答増進効果を得た。アジュバント候補である Poly (I:C)と Ampligen については、SD ラットとビーグル犬を用いた単回(皮下又は経鼻)・反復(経鼻)毒性試験を行った。設定した用法・用量はヒトで想定される数倍～100 倍程度にあたるが、Poly (I:C)または Ampligen に起因すると見られる毒性変化は見られなかった。NKT 細胞を活性化する α -galactosylceramide (α -GalCer) をアジュバントとした経鼻インフルエンザワクチンの開発に向けて、組織培養由来の抗原と α -GalCer を用い、抗体産生、T 細胞反応を指標に投与量の低減を試みた。また H5N1 に対する抗体測定法に関し抗体測定法には多くの技術的な問題点があり、国際的にも統一されていない。これが H5N1 ワクチン接種者における血清抗体価の測定方法にもそのまま大きな問題を残している。そこで HN1 ワクチンに対する抗体測定法の検討を行った。ヒトと動物のインフルエンザワクチンの開発に有用なウイルス株を収集するために、動物インフルエンザのグローバルサーベイランスを行っている。実験室で作出した遺伝子再集合ウイルスを加え、16 の HA 亜型と 9 の NA 亜型の組み合わせ 144 通り全てのウイルスをワクチンおよび診断に利用できるウイルス株として系統保存した。

分担研究者：

田代真人 (国立感染症研究所ウイルス第 3 部
部長)

喜田 宏 (北海道大学大学院獣医学研究科、
動物疾病制御学講座教授)

真鍋貞夫 (財団法人阪大微生物研究会観音寺研
究所、研究技術部 部長)

清野研一郎 (聖マリアンナ医科大学、難病治療研
究センター生体機能制御研究部門
准教授)

A. 研究目的

感染防御効果の高い経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンの臨床応用を最終目的とし以下の個々の目的で研究を推進している。(1)合成二本鎖RNA製剤 polyI:polyC₁₂U (Ampligen)を粘膜アジュバントとしてNIBRG14全粒子不活化ワクチンの経鼻接種後の応答をヒトに免疫機構の近い霊長類で調べる事を目的とする。最終的には経鼻粘膜投与型のインフルエンザワクチンの実用化に向け、製剤の決定、投与方法を決定し安全性を確認する事を目的とする。(2)H5N1に対する血清抗体価の測定方法およびその表示方法等の問題点について検討する事を目的とした。(3)アジアから家禽と野鳥に感染が拡大した高病原性鳥インフルエンザウイルスが、新型インフルエンザウイルスとして出現し、パンデミックを起こすことが危惧されている。パンデミックに備えたワクチンを準備するためには、ワクチン株と流行株の抗原性が多少異なる場合でも、高い免疫効果を示す必要がある。本研究で開発・実用化を目指す粘膜ワクチンは、全身の中和抗体のみならず、呼吸器粘膜局所の免疫を賦活してインフルエンザウイルスの感染をその侵入門戸で防御することを目的とする。

本研究の目的は安全で有効な粘膜ワクチンを開発するために、野生水禽、家禽とヒトから分離されたインフルエンザウイルス株の遺伝子、抗原性、発育鶏卵と培養細胞における増殖性、サルに対する免疫原性を評価し、ワクチン製造用候補株としてライブラリー化することである。

(4) α -GalCerを利用した経鼻インフルエンザワクチンの開発に向け、投与量や安全性に関する検討を行い、前臨床試験への準備を行う。

B. 研究方法

材料と方法

ウイルス株及びワクチン株

インフルエンザウイルス株 A/VN/1194/2004 (H5N1)を用いて感染実験を行った。H5N1のワクチン株としてはリパースジェネティクス法によ

り A/VN/1194/2004 (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 (NIBRG14) 株のホルマリン不活化全粒子ワクチンを使用した。

動物

3~4歳、体重 2,130~4,180g のカニクイザル *cynomolgus monkeys* (*Macaca fascicularis*) を用いた。カニクイザルはいずれもつくば霊長類センターで繁殖され国立感染症研究の実験動物委員会の研究所における動物使用に関するガイドラインに従って飼育された動物を用いた。これらのサルを非免疫群 (# 4668, 4669, 4672) と免疫群 (#4670, 4671, and 4673)に分けて実験を行った。H5N1 ウイルスの感染実験は BSL3 実験室で行った。

ウイルス

本実験で使用されたインフルエンザウイルス A/H5N1 株は A/Hong Kong/483/97 (A/HK/483/97), A/Vietnam/1194/2004 (A/Vietnam/1194/04), A/Indonesia/6/2005 (A/Indonesia/6/05)。HK/483/97 ウイルスは致死性 H5N1 インフルエンザ感染者から Mardin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞を用いて分離されマウスへの馴化は行っていない。A/Vietnam/1194/04 ウイルスと A/Indonesia/6/05 致死性 H5N1 インフルエンザ感染者から分離され 10 日齢の孵化鶏卵で増殖したものを使用した。これらのウイルスは -80 °C で保存され MDCK 細胞を用いたブラークアッセイでウイルス価を調べた。

ワクチン及びアジュバント

ワクチンとしてホルマリン不活化全粒子ワクチン NIBRG14, ヘマグルチニン(HA)及びノイラミニダーゼ(NA)は高病原性鳥インフルエンザウイルス A/Vietnam/1194/2004 由来でそれ以外のウイルスタンパクは A/PR/8/34 (H1N1)の物を持つ

ウイルス株を用いた。ワクチン株では HA 遺伝子の切断部位に塩基アミノ酸群が除かれている。アジュバントとして合成二本鎖 RNA poly(I:C) 及び Poly I: Poly C₁₂U (Ampligen®) を用いた。

免疫とウイルス攻撃感染

一群5匹のマウスを用いジエチルエーテルで麻酔し1 µg のワクチンでアジュバント有り及び無しで経鼻で4週間隔で2回ワクチン接種した。ウイルスの攻撃感染は4 µl のウイルス(H5N1ウイルス1000pfu)を含んだPBSを片鼻2 µlずつ接種した。この量は初期の感染が鼻に限局する量である。インフルエンザウイルス(H5N1)の感染実験はバイオセーフティーレベル3の封じ込め施設を用いて国立感染症研究所実験動物委員会の承認を得て行われた。

ウイルス価及び抗体価の測定

ウイルス価及び抗体価測定の為マウスから血清及び鼻腔洗浄液を用いた。IgA抗体及びIgG抗体の抗体価はenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法を用いて測定した。ウイルス価はMDCK細胞を用いたブランクアッセイ法で測定した。

アジュバント候補物質の毒性試験

アジュバント候補である Poly (I:C)と Ampligen について以下の毒性試験を行った。

1) ラットを用いた単回皮下投与毒性試験

6週齢のCrI:CD (SD)系のラットを用い、雌雄各5匹を1群とした。投与量は0.04, 0.4, 4および20 mg/body (投与用量は0.016, 0.16, 1.6および8 mL/body)とし、対照として生理食塩水8 mL/bodyを投与する群を設定した。投与後に14日間、一般状態の観察及び体重測定を行った。観察期間終了後、全例をジエチルエーテル麻酔下で放血致死させ、速やかに解剖し、すべての器官および組織について、異常の有無を観察して検査した。

イヌを用いた単回経鼻投与毒性試験

8ヶ月齢のビーグル犬を用い、雄3匹を1群、投与量は0.5 mg/body (投与用量は0.2 mL/body)とし、対照として生理食塩水0.2 mL/bodyを投与する群を設定した。投与後に14日間、一般状態の観察及び体重測定を行った。観察期間終了後にペントバルビタールナトリウムを静脈内投与して麻酔し、頸動脈にカニューレを挿入して放血致死させ、速やかに解剖してすべての器官および組織について異常の有無を綿密に検査した。

ラットを用いた反復経鼻投与毒性試験

6週齢のCrI:CD (SD)系のラットを用い、雌雄各5匹を1群、投与量は0.125 mg/body/day (投与用量は50 µL/body)とし、対照群として生理食塩水50 µL/body/dayを投与する群を設定した。1日1回の5日間投与とし、5日間投与後に14日間の一般状態の観察及び体重測定を行った。なお、試験経過日数は投与開始日を投与1日、観察開始日を観察1日と起算した。観察期間終了後、全例について、ペントバルビタールナトリウム30 mg/kgを腹腔内に投与して麻酔した後、放血致死させ、速やかに解剖し、すべての器官および組織について、異常の有無を観察して検査した。

イヌを用いた反復経鼻毒性試験

7ヶ月齢のビーグル犬を用い、雄3匹を1群とした。投与量は0.5 mg/body/day (投与用量は0.2 mL/body)とし、対照として生理食塩水0.2 mL/bodyを投与する群を設定した。1日1回の5日間投与とし、5日間投与後に14日間の一般状態の観察及び体重測定を行った。なお、試験経過日数は投与開始日を投与1日、観察開始日を観察1日と起算した。投与の際は、鎮静・鎮痛剤によって動物を沈静状態にしてフレキシブル経口ゾンデを約7cm挿入し、投与液を左右の鼻孔にそれぞれ0.1 mL注入した。観察期間終了後にペントバルビタールナトリウムを静脈内投与して麻酔し、頸動脈にカニューレを挿入して放血致死させ、速やか

に解剖してすべての器官および組織について異常の有無を検査した。

(倫理面への配慮)

「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(文部科学省告示第71号、平成18年6月1日)に基づいた試験を行った。

α -galactosylceramide (α -GalCer) のアジュバントとしての検討

北里研究所にて作製された組織培養によるインフルエンザスプリット HA ワクチン (A/New Caledonia/20/99 H1N1) と α -GalCer を投与量を変えて BALB/c マウスの鼻腔内に3週間間隔で2回投与し、最終投与から2週後に血清、脾臓細胞その他の検体を採取し、抗原特異的な IgA ならびに IgG 抗体産生量を ELISA 法で、抗原特異的な T 細胞反応 (CD8T 細胞の IFN- γ 産生) をフローサイトメトリーで解析し検討した。また、副作用の指標として血算の変化、鼻腔ならびに脳の病理学的検査を行った。

H5N1 ウイルスに対する抗体測定法の検討

世界各国のワクチンメーカーによる H5N1 ワクチンの臨床試験成績、抗体測定方法および表示方法の比較検討、並びに WHO によるヒト血清 H5N1 抗体 (中和試験、HI 試験) 測定に関する目隠し試験の結果等を検討し、問題点を抽出した。また、それらの成績による実質的な抗体価のバラつきとワクチン効果に関する評価基準の在り方を検討した。さらに、ベトナム株ワクチン (クレード1) に対するヒト血清について、トリ赤血球またはウマ赤血球を用いた際の HI 抗体価の違い、また中和抗体価の交差性について、ベトナム株、インドネシア株 (クレード2.1)、青海株 (クレード2.2)、安徽株 (クレード2.3) に対して比較し、ベトナム株ワクチン接種者のブルー血清標準品の有用性を評価検討した。

系統保存

日本、モンゴルにおいて採取した野生水禽の糞便からウイルスを分離した。分離されたウイルスの HA および NA の亜型を同定し、それらの亜型に基づいてウイルス株を系統保存した。また、これらのウイルス株の HA 遺伝子の塩基配列を決定し、HA 開裂部位のアミノ酸配列を解析した。野外から分離されない HA と NA の組み合わせのウイルスは、系統保存ウイルスを基に実験室内で遺伝子再集合体を作出し、ウイルスライブラリーに追加した。

ウイルスライブラリーから選抜された H7 インフルエンザウイルスに対するワクチン候補株、A/duck/Hokkaido/Vac-2/2004 (H7N7) の全遺伝子配列を決定し、遺伝子情報をデータベースに登録した。またモノクローナル抗体を用いた抗原性解析、発育鶏卵および培養細胞における増殖性を評価した。さらに、本ウイルス株でワクチンを試製し、サルに対する免疫原性を評価した。

2008年5月、北海道の野生オオハクチョウから H5N1 亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスが分離された。H5 ウイルスに対するポリクローナル抗体とモノクローナル抗体を用いて、分離された A/whooper swan/ Hokkaido/1/2008 (H5N1) の抗原性をこれまでの野外分離株、および H5 亜型のワクチン候補株 A/duck/Hokkaido/Vac-1/2004 (H5N1) および A/duck/Hokkaido/Vac-3/2007 (H5N1) と比較した。

統計

実験群間の比較は t-test 検定を行い $P < 0.05$ を有意差有りとした。

C. 研究結果

1. カニクイザルでの合成二本鎖 RNA polyI-polyC₁₂U アジュバント併用経鼻ワクチン接種後の抗体応答

霊長類におけるアジュバント併用経鼻インフルエンザワクチン (H5N1) の効果を調べる目的で

A/Vietnam/1194/04 株を弱毒化して作成された NIBRG14 の全粒子不活化ワクチンをカニクイザルに経鼻接種した後の抗体応答を調べた。カニクイザルを NIBRG14 不活化全粒子ワクチン 90 µg とアジュバントとして合成二本鎖 RNA である polyI:polyC₁₂U (Ampligen) 500 µg をスプレーで噴霧接種し初回免疫から 3 週間後と更に 2 週間後に同量のワクチンを追加接種した。NIBRG14 全粒子不活化ワクチンと polyI:polyC₁₂U (Ampligen) の経鼻接種で特に副反応は認められなかった。Ampligen 併用ワクチンを 2 回経鼻接種後に NIBRG14 特異的 IgG 抗体の上昇が認められた。一方非免疫群のカニクイザルにおいては A/Vietnam/1194/04 インフルエンザウイルスの攻撃感染後 2 週間後に NIBRG14 特異的な血清中の IgG 抗体の上昇が認められた(図 1A)。経鼻ワクチンによる免疫後の血中の中和抗体価を相同株である A/Vietnam/1194/04(H5N1)ウイルスと非相同株である A/Hong Kong/483/97 (H5N1) 及び A/Indonesia/6/05 (H5N1) ウイルスに対する中和抗体価を測定した。血清中にはワクチン株と相同株である A/Vietnam/1194/04(H5N1)ウイルス及び非相同株である A/Hong Kong/483/97 (H5N1) 及び A/Indonesia/6/05 に対する中和抗体が認められた。中和抗体価は相同ウイルス株に対して 40 倍、非相同ウイルス 株に対してそれぞれ 10 倍であった。非免疫群のサルでは中和抗体価が認められなかった。(<10)

2. NIBRG14 経鼻ワクチン接種によるカニクイザルにおける感染防御効果

1) 感染防御効果

次に Ampligen をアジュバントに用いた NIBRG14 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ウイルス A/Vietnam/1194/04 (H5N1) に対する感染防御効果を調べる目的で最終免疫の 2 週間後に高病原性鳥インフルエンザウイルス A/Vietnam/1194/04 (H5N1) による攻撃感染を行った。感染前及びウ

撃感染後 2, 5, 9, 12, 14 日目に鼻腔スワブ、咽頭スワブ、直腸スワブを用いてウイルスの分離を試みた。結果感染 2 日目の咽頭スワブでは非免疫カニクイザル全てにおいてウイルス分離が可能であったが経鼻ワクチン接種したカニクイザルでは 3 匹ともどこからも生きたウイルスが分離されなかった。非免疫群では咽頭スワブの他鼻腔スワブや直腸スワブでも生きたウイルスが分離された個体があった。また、攻撃感染後 14 日目に解剖されたカニクイザルの検体中大脳前頭葉、頭頂葉、小脳、脳幹、三叉神経節、肺、小腸の組織からウイルス分離を試みたが免疫群非免疫群共にこれらの臓器からのウイルスは分離されなかった。このように NIBRG14 ワクチンを polyI:polyC₁₂U と共に経鼻接種する事により高病原性鳥インフルエンザ A/Vietnam/1194/04 (H5N1) の攻撃感染に対し感染防御する事が示された。

2) 組織病理学的解析

非免疫群のカニクイザル及び polyI:polyC₁₂U 併用 NIBRG14 全粒子不活化ワクチン接種群で高病原性鳥インフルエンザ A/Vietnam/1194/04 (H5N1) による攻撃感染後 14 日目の病理学的解析を行った。非免疫群のカニクイザルは全ての個体において肺胞の崩壊とリンパ球中心の炎症細胞浸潤、及び II 型肺胞細胞の増殖像を伴った肺炎の所見が認められた。一方、免疫群において肺炎は認められず初期感染の痕が見られるのみであった。

ヒトに免疫機構が近い霊長類であるカニクイザルにおいて polyI:polyC₁₂U 併用 NIBRG14 全粒子不活化ワクチン経鼻接種群において高病原性鳥インフルエンザ A/Vietnam/1194/04 (H5N1) による攻撃感染による肺炎を防御できる事が病理学的に示された。

3) その他の所見

非免疫群のカニクイザル及び polyI:polyC₁₂U 併用 NIBRG14 全粒子不活化ワクチン接種群で高病原性鳥インフルエンザ A/Vietnam/1194/04

(H5N1)による攻撃感染後の摂食行動の変化を調べた。非免疫群では感染後1~4日目で有意に摂食行動が低下したがワクチン接種群では感染前後で摂食行動に変化が見られなかった。また非免疫群では感染後5日目で顕著な白血球減少が見られたが免疫群では認められなかった。その他の臨床的所見として非免疫群は呼吸促進、咳嗽、震顫が見られたが免疫群のカニクイザルではそれらの症状は見られなかった。

3. アジュバント候補物質の毒性試験

1) ラットを用いた単回皮下投与毒性試験

Poly (I:C)または Ampligen を投与したラットは、一般状態、体重、剖検所見、病理組織学的検査のいずれにおいても対照群と比較して異常は見られなかった。このため、本試験条件下における Ampligen の概略の致死量は雌雄ともに 20 mg/body(雌の場合、約 1400mg/kg)を上回ると判断された。

2) ラットを用いた Poly (I:C)及び Ampligen の反復経鼻投与毒性試験

Poly (I:C)または Ampligen を投与したラットは、一般状態、体重、剖検所見、病理組織学的検査のいずれにおいても対照群と比較して異常は見られなかった。このため、Ampligen の概略の致死量は雌雄ともに 0.125 mg/body/day (雌の場合、約 0.9 mg/kg/day、5日間投与総量; 0.625 mg/body、雌の場合、約 4.5mg/kg)を上回ると判断された。

3) イヌを用いた単回経鼻投与毒性試験

Poly (I:C)または Ampligen を投与したビーグル犬は、一般状態、体重、剖検所見、病理組織学的検査のいずれにおいても対照群と比較して異常は見られなかった。このため、投与量を 0.5 mg/body(約 0.06mg/kg)とした本試験条件下では Ampligen 投与に起因した毒性変化は認められなかったと判断された。

4) イヌを用いた反復経鼻投与毒性試験

Poly (I:C)または Ampligen を投与したビーグル犬は、一般状態、体重、剖検所見、病理組織学的検査のいずれにおいても対照群と比較して異常は見られなかった。このため、投与量を 0.5 mg/body (5日間投与総量; 2.5 mg/body、約 0.3mg/kg)とした本試験条件下では Ampligen 投与に起因した毒性変化は認められなかったと判断された。

4. α -GalCerの粘膜アジュバントとしての検討

以前の研究ではスプリットワクチンならびに α -GalCer とともに一回あたり 2.0 μ g の投与量で実験を行った。今回はこれから各試薬の投与量を減少させ、抗体産生と T 細胞反応を検討した。抗体産生に関しては抗原を 0.1 μ g、コレラ毒素 B サブユニット 0.1 μ g をアジュバントとして使用した際の産生量を陽性コントロールとした。T 細胞反応に関しては免疫に用いた抗原特異的に CD8T 細胞に IFN- γ 産生が見られることを陽性反応とした。その結果、スプリットワクチン投与量を一回あたり 0.2 μ g まで減少させた場合、 α -GalCer を一回あたり 0.025 μ g 同時に投与すれば抗原特異的な抗体の産生が十分に観察された。スプリットワクチン投与量を一回あたり 0.1 μ g まで減少させた場合、 α -GalCer を一回あたり 0.05~0.1 μ g 同時に投与すれば抗原特異的な抗体の産生が十分に観察された。スプリットワクチン投与量を一回あたり 0.025 μ g まで減少させた場合、抗原特異的な抗体の産生は有意に減弱した。T 細胞の反応は抗原量 0.05~0.1 μ g の投与で見られる動物もあったが確実ではなかった。抗原量が 0.2 μ g の場合 α -GalCer を 0.05~0.2 μ g 同時に投与した場合確実に IFN- γ 産生が見られた。本経鼻ワクチンにより副作用が起こるかどうかを見るため、一回あたり抗原ならびに α -GalCer とともに 2.0 μ g を投与した際の血算、鼻腔粘膜ならびに脳の病理検査を行ったところ、コントロール (生理食塩水を投与した動物) と有意な差はなかった。

5. H5N1 抗体測定法の問題

H5N1 ウイルスに対するヒト血清抗体の測定方法については多くの問題点がある。これは、H5N1 ウイルスがヒトに対して免疫原性が非常に低いことに起因している。従って、通常の季節性インフルエンザウイルス (A/H1N1,A/H3N2,B) に対する血清抗体測定法は必ずしも適用できない。

1) HI 試験

通常の季節性インフルエンザウイルスがニワトリや七面鳥の赤血球を凝集するのに対して、H5N1 鳥インフルエンザウイルスはこれらの赤血球に対する凝集性は非常に低い。従って、これらの血球を使用した通常の赤血球凝集抑制 (HI) 試験を H5N1 ウイルス (ワクチン) に対する抗体測定に応用することは出来ない。

そこで、様々な動物の赤血球が検討された結果、ウマ赤血球が比較的効率よく凝集されることガ示され、その結果、ウマ血球を用いた HI 試験が汎用されている。しかし、大型の有核細胞であるトリ血球に対して、無核のウマ血球は非常に小さいために、同じ 0.5% の容量に相当する血球を反応系に加えた場合に得られる抗体価を、そのまま同等性をもって比較はできない。これらは全く異なる測定系であると認識しておく必要がある。従って、ウマ血球を用いた H5N1 ウイルスに対する HI 抗体価と、季節性インフルエンザにおける HI 抗体価を、同じ物差しで数値比較することは出来ないと結論される。

さらに、海外においては、ウマ血球はウマの個体差が大きいので、その結果には再現性が乏しいとされている。我が国では、市販されているウマ血球については、比較的再現性が高いと判断される。従って、ウマ血球を用いた HI 抗体価については信頼性が乏しいと判断せざるを得ない。

一方、HI 抗体価の表示方法については、現在季節性インフルエンザに対しては WHO 標準法 (抗体を 2 倍階段希釈したレベルでの HI を示す最終濃度) で統一されている。H5N1 に対する H

I 抗体価についても、日本を含めて多くの国、メーカーでは WHO 標準法を準用しているが、これに対して、何社かの海外ワクチンメーカーでは、希釈血清に、等量のウイルス液 (16HA/ml) を添加した段階での希釈倍率を以って、HI 抗体価として表示している。その結果、これらのメーカーによる抗体価は、WHO 標準法の 2 倍の数値を示すこととなり、特に FDA や EMEA による有効性判定基準 (抗体価 40 倍) に照らすとき、その見かけ上の効果は、他社の成績よりも高く表示されることとなる。

従って、海外各社の HI 抗体価に基づく H5N1 ワクチンの有効性を比較検討する際には、最新の注意が必要である。現在、WHO では HI 抗体価を WHO 標準法で統一することを進めている。

2) 中和試験

H5N1 ウイルスに対するヒト血清中和抗体の測定法に関しては、1997 年の香港における H5N1 高病原性鳥インフルエンザ流行においても、大きな問題となった。HI 試験に信頼性が無いことから、マイクロ中和方法が開発された。しかし、1. 血清中に非特異性インヒビターが含まれしかも個人差が大きいこと、2. カットオフ値を高く設定すると、一般に中和抗体価が低いために、偽陰性例が多数を占めること、3. ウエスタンプロット法などにより抗体であることを確認する必要があること、4. 手技、方法などが国際的に標準化、統一されていないこと、5. 国際的な標準血清が設定されておらず、試験の品質管理が行われていないこと、などが問題点をして指摘されたが、そのほとんどは未解決のままである。

中和試験については、3 年前に WHO が、17 か所の検査機関、ワクチンメーカーなどが参加した目隠し試験を行った。その結果、抗 H3N2 の同じ試験血清についても、検査機関によって中和抗体価には 100 倍程度のバラつきがあることが示された。そこで、昨年、H5N1 についても同様の目隠し試験を実施した。この際に、H5N1 ワクチン

の臨床試験の接種被験者から提供されたプール標準血清を用いた際の校正後の抗体価も検討された。(ちなみに、この血清については、個々の血清を交換して抗体価をダブルチェックするとWHOの提案は、海外のメーカー側から拒否されたため、複数の血清をプールした標準血清をして整備された。)

この目隠し試験の結果、H5N1に対する中和抗体価においても、検査機関の精度管理試験結果には100倍以上の差異があることが明らかになった。従って、海外メーカーによるH5N1ワクチンの有効性に関する成績についても、慎重に評価する必要性が示された。また標準血清を用いて校正をした場合には、このバラつきは減少したが、それでもまだかなりのバラつきが残っていた。

さらに、この標準血清は、同じクレードであるベトナム株に対する中和抗体価の校正にはかなりの程度有用であるが、他のクレードのウイルスに対する交差反応性を校正するには不適当であることが示された。

6. ヒトにおける抗体価 (HI, 中和, SRD) と防御効果との関連性

現在ヨーロッパにおいては、季節性ワクチンに含まれるウイルス抗原(ウイルス株)が変更される度に、200名程度を対象とした臨床試験が実施され、その結果3つの評価基準のいずれかを満たしていれば、ワクチンとして認可される体制がある。一方、日本、米国においては、一旦製造承認されたワクチン製法については、このようなワクチン製造株の変更に応じた製造承認の変更は要求されていない。

新型インフルエンザワクチンの場合には、緊急性を要するために、ヨーロッパにおいても、予めプロトタイプワクチンとして認可を取っており、実際のワクチン製造株が変わっても、臨床試験の実施は必要なく、短期間の事務処理で対応するというモックアップの体制が導入された。日本、米国については、従来通りの体制で対応できるので、

もの問題は生じていない。

しかし、季節性インフルエンザウイルスとは異なり、H5N1ウイルスの場合には、上記のような抗体測定法、表示法の問題があり、季節性ワクチンの認可基準がそのまま適用できるのか否かは、大きな疑問として残っている。季節性ワクチンの有効性基準としては、HIや中和試験よりも、一次元免疫拡散法によるHAタンパク量が頻用されており、これを応用した抗体測定法も採用されている。

ヨーロッパにおいては、3つのすべての要件を満たすことが要求されており、一方、米国では3つのうちのいずれか1つ以上を満たせばよいとされている。米国の根拠は、季節性インフルエンザとは異なり、1. 血清抗体価と防御効果との関連例に関する成績が全くないこと、2. 季節性ワクチンについても、効果には限界があり、新型ワクチンについても、ほぼ同様の効果の限界があると予想されると、などから、基礎免疫(プライミング)が賦与されたと判断できれば良い、との判断である。日本においても、医薬品総合機構の判断はほぼこれに準じている。

さらに、大きな問題は、このような季節性ワクチンの有効性基準が、H5N1を含む他の亜型のワクチンにも同様に適用できるのかとの疑問である。これに対しては、直接に比較できる成績はないのであるが、1. マウス、フェレット、サルなどの実験動物モデルにおける抗体価と感染防御との関連性、2. 季節性ワクチンからの帰納などからの、暫定的な判断にとどまっている。基準が曖昧である以上、個々の数値を以って有効性の比較をすること自体が意味を持たないのかもしれない。

ヒトの感染に対する適当な動物感染モデル系が無いことも大きな隘路である。さらに、全身感染とサイトカインストームを起こすと予想されるH5N1などの強毒型新型ウイルスに対して、呼吸器感染にとどまる弱毒型インフルエンザに対する季節性インフルエンザワクチンの有効性基準が、はたして準用できるのか?これについては大きな

課題として残されている。

7. H5N1 ワクチンに対するワクチンの有効性に対する問題

1) 強毒型ウイルスに対するワクチンの効果

H5N1 ウイルスは新型インフルエンザになった際にも、全身感染をサイトカインストームを起こす性状を保持し、強い病原性の多くの性状は引きずられる可能性が高い。その際の H5N1 ワクチンの有効性については正確には分かっていない。現行の季節性ワクチンについては、その有効性には限界がある。しかし、血清抗体は、肺胞への感染やウイルス血症、全身感染に対しては有効であることが期待されるので、H5N1 ウイルスによる重症化はかなりの程度抑制できるとの期待もあるが、呼吸器におけるウイルス感染そのものを完全には阻止できないので、個人での発症および社会での感染伝播流行に対する効果には限界があろう。

2) ウイルス抗原変異に対するワクチンの効果

一方、トリの間で既に大流行状態となっている H5N1 ウイルスについては、2003 年以来、同じ H5N1 ウイルスではあるものの、HA 遺伝子の変異によって、HA の遺伝子塩基配列の上から大きく区別される 10 のクレードに岐分しており、これらが地域的にトリの間で土着している。さらに内部遺伝子分節の組み換え（再集合）も頻繁に起こっている。これらの異なるクレード間には、抗原性にも大きな相違が認められており、クレード間にはほとんど交差性が無いものも多い（図 7）。そこで、これらのクレードのうちであるウイルス株に基づいたワクチンを開発して事前備蓄しておいても、実際の流行ウイルスの抗原性が異なれば、有効性は期待できないとの心配が起こった。

そこで、ベトナム株（クレード 1）ワクチンを接種された被験者の血清について、他のクレードに対する交差反応性を検討した。

8. 系統維持

野生水禽の糞便 1,312 検体から 75 株のインフルエンザウイルスを分離同定した。これらのウイルスの HA 亜型は H3、H4、H6、H7、H9、H10、H11 の 7 つの亜型に、NA 亜型は N1、N2、H5、N6、N7、N8、N9 の 7 つの亜型に区分された。分離されたウイルス株の HA 開裂部位に塩基性アミノ酸の挿入は認められなかった。これらの分離ウイルスを当研究室のウイルス株ライブラリーに追加した。16 の HA 亜型と 9 の NA 亜型の組み合わせ 144 通り全てのウイルスをワクチンおよび診断に利用できるウイルス株として系統保存した（<http://virusdb.czc.hokudai.ac.jp/vdbportal/view/index.jsp>）。

H7 亜型のワクチン候補ウイルスとして選抜された A/duck/Hokkaido/Vac-2/2004 (H7N7) の全遺伝子の塩基配列を決定し、遺伝子情報をデータベースに登録した。またモノクローナル抗体を用いた抗原性解析、発育鶏卵と培養細胞における増殖性、サルに対する免疫原性の成績より、本ウイルス株が H7 亜型のインフルエンザウイルスワクチン株として有用であることを確認した。

野生オオハクチョウから分離された H5N1 ウイルスは HA 遺伝子の解析から clade 2.3.2 に区分され、2007 年末に香港、また 2008 年初頭に韓国で分離されたウイルスと近縁であった。ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を用いた成績から、今回分離されたウイルスは近年分離されている強毒 H5N1 ウイルスや、ワクチン候補株である A/duck/Hokkaido/Vac-1/2004 (H5N1) および A/duck/Hokkaido/Vac-3/2007 (H5N1) と抗原性が異なることが明らかとなった。

D. 考察

インフルエンザウイルスの感染を防御する最も効果的な戦略は感染部位である上気道の粘膜上に粘膜免疫を誘導する事である。不活化ワクチンにより粘膜免疫を誘導する為には粘膜アジュバントが必要であるが従来粘膜アジュバントとしては最近の毒素由来のアジュバント (Cholera toxin

(CT) や *Escherichia coli* heat-labile toxin (LT) が実験的に用いられていた。しかしスイスにおけるヒトでの使用で顔面神経麻痺の副作用が報告された事によりヒトでの使用ができなくなった。今回我々が本研究において用いた粘膜アジュバントである合成二本鎖 RNA polyI:polyC₁₂U (Ampligen®)は既に他の用途でヒトでの安全性が証明されている RNA 製剤である。昨年度報告したとおりマウスを用いた実験ではpolyI:polyC₁₂U (Ampligen®)を粘膜アジュバントに用いたベトナム株(A/Vietnam/1194/2004)由来のワクチンであるNIBRG14の経鼻接種で株の異なる香港株(A/Hong Kong/483/97)やインドネシア株(A/Indonesia/6/2005)の高病原性鳥インフルエンザウイルスに対して交叉防御を示している。本年度は免疫機構がより複雑でヒトに近い霊長類であるカニクイザルを用い polyI:polyC₁₂U (Ampligen®)併用のNIBRG14(H5N1)全粒子不活化ワクチンの経鼻接種により高病原性鳥インフルエンザウイルス(A/Vietnam/1194/2004(H5N1))の攻撃感染に対し感染防御しうる免疫を誘導する事が可能である事が示された。経鼻免疫した後に攻撃感染させたカニクイザルの咽頭スワブや鼻腔スワブからは生きたウイルスは分離されておらず、経鼻ワクチンにより免疫した個体が守られるだけでなく他の個体へのウイルスの放出も防ぐ事が可能であり感染拡大を防ぐ働きが期待される。また今回の polyI:polyC₁₂U (Ampligen®)を粘膜アジュバントに用いた全粒子不活化ワクチンの経鼻接種により接種によると思われる副作用は認められず、接種方法としても安全である事が示唆された。

アジュバント候補である Poly (I:C)及び Ampligen は、今回の毒性試験において、全く毒性が確認されなかった。現在想定しているヒトでの投与量(HA 抗原 15 µg×3 価/dose の 10 倍=450 µg)は、成人の体重を 50 kg と想定した場合、9 µg/kg である。これは、今回ラット単回皮下投与毒性試験で設定し、毒性の確認されなかった 1 回

あたりの投与量の約 1/15000、ラット反復経鼻投与毒性試験で設定し、毒性の確認されなかった 1 回あたりの投与量の約 1/100、イス単回/反復経鼻投与毒性試験で設定し、毒性の確認されなかった 1 回あたりの投与量の約 1/7、となることから、Poly (I:C)及び Ampligen の毒性はきわめて低く、安全なアジュバントであると考えられる。また α-GalCer の粘膜アジュバント作用に関し当初の報告時に比べ抗原ならびに α-GalCer とともに 1/40 の投与量 (0.05 µg) で十分な抗原特異的抗体産生が、また 1/10 (0.2 µg) の投与量で T 細胞反応が見られることが判明した。後者の場合、α-GalCer のみ 0.05 µg 程度まで減量することは可能と考えられた。このことより、実際にヒトに投与する際にも少ない投与量で生体防御効果が得られる可能性があり、今後実際の感染防御能等について検討していく必要があると考えられた。また、当初の報告時の投与量 2.0 µg においても末梢血の各種血算に異常はなく、鼻腔や脳組織における細胞浸潤、浮腫等は見られず、本経鼻ワクチンは安全性が高いことが示唆された。

系統保存しているウイルス株には、ヒトと動物のインフルエンザワクチン開発に有用なものが含まれる。今後もウイルス収集を継続して、ウイルスライブラリーの充実を図る計画である。また、近年流行している H5N1 ウイルスは、中国やベトナムにおけるワクチンの使用により抗原変異が加速されていることがわかった。今後とも分離ウイルスの抗原性と遺伝子解析ならびにワクチン候補株の有効性の評価を継続して実施する必要がある。

E. 結論

ヒトに免疫機構が類似している霊長類であるカニクイザルにおいて合成二本鎖 RNA アジュバント併用全粒子不活化インフルエンザワクチンの経鼻接種により高病原性鳥インフルエンザによる攻撃感染に対し感染防御しうる粘膜免疫及び全身性の免疫が誘導された。その結果、免疫されたカニクイザルは病的症状、病理学的所見を示さなかつ

たのみならずウイルス粒子の放出が無くなり二次感染の予防にも効果が高い事が示された。ワクチン接種によると思われる副作用は認められず、接種方法としても安全である事が示唆された。

今回報告のアジュバント候補である Ampligen と添加剤(CVP 基剤)は、いずれも医薬品グレードでの入手が可能であり、安全性の高い物質である。これを併用することで、従来の皮下接種と同程度の抗原を経鼻免疫して、血清と粘膜に感染防御レベルの免疫応答を引き出すことができたという点で、本プロジェクトの経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンは、更に一步、実用に近づいたと見られる。今後は試作ワクチンの安全性のデータ収集、より免疫応答性の優れた接種方法の検討、及び製造を想定した品質管理の検討を進め、実用化・臨床試験に向けた取り組みを行う。α-GalCer をアジュバントとして用いた場合、スプリット抗原、α-GalCer とともに 0.05 μg の投与量で抗原特異的な抗体産生が、0.2 μg の投与量で抗原特異的な T 細胞反応が観察された。血液検査ならびに病理学的検討から、本経鼻ワクチンは安全性が高いと考えられた。H5N1 ウイルスに対するヒト血清抗体の測定法には多くの技術的な問題点があり、国際的にも統一されていない。これが H5N1 ワクチン接種者における血清抗体価の測定方法にもそのまま大きな問題を残している。そこで、H5N1 ワクチンの有効性の基準に関する問題点とその解決法を検討した。H5N1 抗体については、抗体価の表示法も国際的に不統一であり、一部のメーカーによっては、抗体価を高く表示するために、敢えて通常使用されない方法も使用されている。従って、ワクチン効果の評価成績は、横並びで評価できない状況にある。さらに、H5N1 ワクチンについては、季節性ワクチンにおける効果判定基準がそのまま適用できる根拠はなく、製造承認等における評価基準の設定にも大きな問題がある。これらの背景を認識したうえで、パンデミックワクチンの効果に関する討議が必要である。

系統保存しているウイルス株には、ヒトと動物

のインフルエンザワクチン開発に有用なものが含まれる。今後もウイルス収集を継続して、ウイルスライブラリーの充実を図る計画である。また、近年流行している H5N1 ウイルスは、中国やベトナムにおけるワクチンの使用により抗原変異が加速されていることがわかった。今後とも分離ウイルスの抗原性と遺伝子解析ならびにワクチン候補株の有効性の評価を継続して実施する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Fukushi S, Harashima A, Sato Y, Saijo M, Taguchi F, Morikawa S, Sata T. Mouse-passaged severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus leads to lethal pulmonary edema and diffuse alveolar damage in adult but not young mice. *Am J Pathol*. 2008 Jun;172(6):1625-37.
2. Kamijuku H, Nagata Y, Jiang X, Ichinohe T, Tashiro T, Mori K, Taniguchi M, Hase K, Ohno H, Shimaoka T, Yonehara S, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Hasegawa H*, Seino KI. Mechanism of NKT cell activation by intranasal coadministration of alpha-galactosylceramide, which can induce cross-protection against influenza viruses. *Mucosal Immunol*. 2008 May;1(3):208-18. Epub 2008 Mar 5.
*corresponding author
3. Ichinohe T, Iwasaki A, Hasegawa H. Innate sensors of influenza virus: clues to developing better intranasal vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2008 Nov;7(9):1435-45.

4. Hasegawa H, Ichinohe T, Aina A, Tamura S, Kurata T. Development of an inactivated mucosal vaccine for H5N1 influenza virus. *Therapeutic and Clinical Risk Management* 2009, in press.
5. Takahashi Y, Hasegawa H, Hara Y, Ato M, Ninomiya A, Takagi H, Odagiri T, Sata T, Tashiro M, Kobayashi K. Protective immunity afforded by H5N1 (NIBRG-14)-inactivated vaccine requires both antibodies against hemagglutinin and neuraminidase in mice. *J Infect Dis*, in press.
6. Russell, C. A., Jones, T. C., Barr, I. G., Cox, N. J., Gregory, V., Gust, I. D., Hampson, A. W., Hay, A. J., Hurt, A. C., de Jong, J. C., Kelso, A., Klimov, A. I., Kageyama, T., Komadina, N., Lapedes, A. S., Lin, Y. P., Mosterin, A., Obuchi, M., Odagiri, T., Osterhaus, A. D.M.E., Rimmelzwaan, G. F., Shaw, M. W., Skepner, E., Stohr, K., Tashiro, M., Fouchier, R. A.M., Smith, D. J. The global circulation of seasonal influenza A(H3N2) viruses. *Science* 320: 340-346, 2008.
7. Ogata, T., Yamazaki, Y., Okabe, N., Nakamura, Y., Tashiro, M., Nagata, N., Itamura, S., Yasui, Y., Nakashima, K., Doi, M., Izumi, Y., Fujieda, T., Yamato, S., Kawada, Y. H5N2 influenza infection to human in Japan and association of seasonal influenza vaccination with positive H5N2 neutralizing antibody. *J. Epidemiol.* 18: 160-166, 2008.
8. Kubota, T., Matuoka, M., Chang, T.-H., Taylor, P., Sasaki, T., Tashiro, M., Kato, A., Ozato, K. Virus infection triggers SUMOylation of IRF3 and IRF7, leading to the negative regulation of type I interferon gene expression. *J. Biol. Chem.* 283: 25660-25670, 2008.
9. Russell, C. A., Jones, T. C., Barr, I. G., Cox, N. J., Gregory, V., Gust, I. D., Hampson, A. W., Hay, A. J., Hurt, A. C., de Jong, J. C., Kelso, A., Klimov, A. I., Kageyama, T., Komadina, N., Lapedes, A. S., Lin, Y. P., Mosterin, A., Obuchi, M., Odagiri, T., Osterhaus, A. D.M.E., Rimmelzwaan, G. F., Shaw, M. W., Skepner, E., Stohr, K., Tashiro, M., Fouchier, R. A.M., Smith, D. J. Influenza vaccine strain selection and recent studies on the global migration of seasonal influenza viruses. *Vaccine* 26: 31-34, 2008.
10. Makizumi, K., Kimachi, K., Fukada, K., Nishimura, T., Kudo, Y., Goto, S., Odagiri, T., Tashiro, M., Kino, Y. Timely production of A/Fujian-like influenza vaccine matching the 2003-2004 epidemic strain may have been possible using Madin-Darby canine kidney cells. *Vaccine*, 26: 6852-6858, 2008.
11. Nicoll, A., Mori, K., Tashiro, M. Winston Churchill and the Russian Pandemic of 1890-91. *Br. Med. J.* 337: 2890, 2008.
12. Kawakami, C., Obuchi, M., Saikusa, M., Noguchi, Y., Ujike, M., Odagiri, T., Tashiro, M. Outbreaks of oseltamivir-resistant influenza A/H1N1 virus in an elementary school and a family in Yokohama City, Japan during the 2007-2008 season. *Jpn. J. Infect. Dis.* 62: 83-86, 2009.
13. Wada, T., Morishima, T., Okumura, A., Tashiro, M., Hosoya, M., Shiomi, M., Okuno, Y. Differences by age in clinical manifestations of influenza-associated encephalopathy. *Microbiol. Immunol.* (2009 in press)

14. Ikeno, D., Kimachi, K., Kudo, Y., Goto, S., Itamura, S., Odagiri, T., Tashiro, M., Kino, Y. The prime-boost vaccination of H5N1 heterologous strains in a mouse model. *Vaccine* (2009 in press)
15. Akiyama, M., Kimura, H., Tsukagoshi, H., Taira, K., Mizuta, K., Saitoh, M., Nagano, M., Sutoh, A., Noda, M., Morita, Y., Sakatsume, O., Okabe, N., Tashiro, M. Development of assay for the detection and quantitation of measles virus nucleoprotein (N) gene using real-time reverse transcription polymerase chain reaction (real-time RTPCR). *J. Med. Microbiol.* (2009 in press)
16. Thongratsaku, S., Songserm, T., Poolkhet, C., Kondo, S., Yagi, H., Hiramatsu, H., Tashiro, M., Kato, K., Suzuki, Y. Determination of N-linked sialyl-sugar chains in the lungs of domestic cats and dogs in Thailand susceptible to the highly pathogenic avian influenza virus (H5N1). *Biochem. J* (2009)
17. Tashiro, M., McKimm-Breschkin, J., Saito, T., Klimov, A., Macken, C., Zambon, M., Hayden, F. Surveillance for Neuraminidase Inhibitor-Resistant Influenza Viruses in Japan, 1996-2007. *Antiviral Therapy* (2009)
18. WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group: Brown, I. H., Capua, I., Cattoli, G., Chen, H., Cox, N., Davis, T., Donis, R. O., Fouchier, R. A. M. Garten, R., Guan, Y., Kawaoka, Y., Mackenzie, J., McCauley, J., Mumford, E., Olsen, C., Perdue, M., Russell, C. A., Smith, C., Smith, D., Smith, G. J. D., Shu, Y., Tashiro, M., Vijaykrishna, D., Webster, R. Continuing progress towards a unified nomenclature for the highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses: divergence of clade 2.2 viruses. *J. Influenza. Resp. Viral Infect.* (2009, in press)
19. Hishinuma-Igarashi, I., Mizuta, K., Saito, Y., Ohuchi, Y., Noda, M., Akihama, M., Sato, H., Tsukagoshi, H., Okabe, N., Tashiro, M., Kimura, H. Phylogenetic analysis of human bocavirus (HBoV) detected from children with acute respiratory infection in Japan. *J. Infection.* (2009, in press)
20. Isoda, N., Sakoda, Y., Kishida, N., Soda, K., Sakabe, S., Sakamoto, R., Imamura, T., Sakaguchi, M., Sasaki, T., Kokumai, N., Ohgitani, T., Saijo, K., Sawata, A., Hagiwara, J., Lin, Z., and Kida, H. (2008). Potency of an inactivated avian influenza vaccine prepared from a non-pathogenic H5N1 reassortant virus generated between isolates from migratory ducks in Asia. *Arch Virol* 153, 1685-1692.
21. Itoh, Y., Ozaki, H., Tsuchiya, H., Okamoto, K., Torii, R., Sakoda, Y., Kawaoka, Y., Ogasawara, K., and Kida, H. (2008). A vaccine prepared from a non-pathogenic H5N1 avian influenza virus strain confers protective immunity against highly pathogenic avian influenza virus infection in cynomolgus macaques. *Vaccine* 26, 562-572.
22. Kishida, N., Sakoda, Y., Shiromoto, M., Bai, G. R., Isoda, N., Takada, A., Laver, G., and Kida, H. (2008). H2N5 influenza virus isolates from terns in Australia: genetic reassortants between those of the Eurasian and American lineages. *Virus Genes* 37, 16-21.
23. Manzoor, R., Sakoda, Y., Mweene, A.,

- Tsuda, Y., Kishida, N., Bai, G. R., Kameyama, K., Isoda, N., Soda, K., Naito, M., and Kida, H. (2008). Phylogenetic analysis of the M genes of influenza viruses isolated from free-flying water birds from their Northern Territory to Hokkaido, Japan. *Virus Genes* 37, 144-152.
24. Manzoor, R., Sakoda, Y., Nomura, N., Tsuda, Y., Ozaki, H., Okamoto, M., and Kida, H. (2008). PB2 protein of a highly pathogenic avian influenza virus strain A/chicken/Yamaguchi/7/2004 (H5N1) determines its replication potential in pigs. *J Virol* (in press).
25. Manzoor, R., Sakoda, Y., Sakabe, S., Mochizuki, T., Namba, Y., Tsuda, Y., and Kida, H. (2008). Development of a pen-site test kit for the rapid diagnosis of H7 highly pathogenic avian influenza. *J Vet Med Sci* 70, 557-562.
26. Okamoto, M., Sakoda, Y., Kishida, N., Isoda, N., and Kida, H. (2008). Antigenic structure of the hemagglutinin of H9N2 influenza viruses. *Arch Virol* (in press).
27. Sakabe, S., Sakoda, Y., Haraguchi, Y., Isoda, N., Soda, K., Takakuwa, H., Saijo, K., Sawata, A., Kume, K., Hagiwara, J., Tuchiya, K., Lin, Z., Sakamoto, R., Imamura, T., Sasaki, T., Kokumai, N., Kawaoka, Y., and Kida, H. (2008). A vaccine prepared from a non-pathogenic H7N7 virus isolated from natural reservoir conferred protective immunity against the challenge with lethal dose of highly pathogenic avian influenza virus in chickens. *Vaccine* 26, 2127-2134.
28. Sawai, T., Itoh, Y., Ozaki, H., Isoda, N., Okamoto, K., Kashima, Y., Kawaoka, Y., Takeuchi, Y., Kida, H., and Ogasawara, K. (2008). Induction of cytotoxic T lymphocyte and antibody responses against highly pathogenic avian influenza virus infection in mice by inoculation of apathogenic H5N1 influenza virus particles inactivated with formalin. *Immunology* 124, 155-165.
29. Soda, K., Ozaki, H., Sakoda, Y., Isoda, N., Haraguchi, Y., Sakabe, S., Kuboki, N., Kishida, N., Takada, A., and Kida, H. (2008). Antigenic and genetic analysis of H5 influenza viruses isolated from water birds for the purpose of vaccine use. *Arch Virol* 153, 2041-2048.
30. Soda, K., Sakoda, Y., Isoda, N., Kajihara, M., Haraguchi, Y., Shibuya, H., Yoshida, H., Sasaki, T., Sakamoto, R., Saijo, K., Hagiwara, J., and Kida, H. (2008). Development of vaccine strains of H5 and H7 influenza viruses. *Jpn J Vet Res* 55, 93-98.
31. Kida, H. (2008). Ecology of influenza viruses in nature, birds, and humans. *Global Environmental Research* 12, 9-14.
2. 学会発表
1. 長谷川秀樹、一戸猛志、相内 章、田村慎一、小田切孝人、田代真人、倉田 毅、佐多徹太郎：キノコ類菌糸体抽出物を用いた経鼻粘膜ワクチンによる粘膜免疫増強作用とインフルエンザウイルスの感染防御。第56回日本ウイルス学会総会（岡山）2008年10月
2. 相内 章、一戸猛志、田村慎一、倉田 毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹：経鼻ワクチンにおけるDectin-1リガンドによるアジュバント効果の亢進。第56回日本ウイルス学会総会（岡山）2008年10月
3. 永田典代、岩田奈緒子、長谷川秀樹、福士秀悦、西條政幸、森川 茂、佐藤由子、佐多徹太郎：

SARS-CoV 感染動物モデルを用いた SARS 発症機序の解明と治療法の検討。第 56 回日本ウイルス学会総会（岡山）2008 年 10 月

4. 長谷川秀樹、一戸猛志、網 康至、永田典代、田村慎一、小田切孝人、田代真人、倉田 毅、佐多徹太郎：経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンのカニクイザルを用いた効果検討。第 12 回日本ワクチン学会学術集会（熊本）2008 年 11 月
5. 岡松正敏、迫田義博、田中智久、津田祥美、磯田典和、中山絵里、苫米地大輔、松野啓太、梅村孝司、高田礼人、喜田宏：2008 年北海道で発見された斃死オオハクチョウから分離した H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスの性状。第 56 回日本ウイルス学会学術集会（2008 年、岡山）
6. 梶原将大、曾田公輔、岡松正敏、迫田義博、喜田 宏：インフルエンザウイルスのカモに対する病原性の分子基盤の解析。第 56 回日本ウイルス学会学術集会（2008 年、岡山）
7. 曾田公輔、浅倉真吾、岡松正敏、迫田義博、喜田 宏：鳥インフルエンザウイルスの病原性獲得メカニズムの解析。第 56 回日本ウイルス学会学術集会（2008 年、岡山）
8. 迫田義博、Rashid Manzoor、野村直樹、津田祥美、岡松正敏、尾崎弘一、喜田 宏：高病原性鳥インフルエンザウイルス Ck/Yamaguchi/7/04 (H5N1) のブタにおける増殖能獲得の分子基盤。第 56 回日本ウイルス学会学術集会（2008 年、岡山）
9. 岡松正敏、迫田義博、吉田裕美、田中智久、津田祥美、磯田典和、中山絵里、苫米地大輔、松野啓太、梅村孝司、高田礼人、喜田 宏：2008 年北海道で発見された斃死オオハクチョウから分離した H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスの性状。第 146 回日本獣医学会学術集会（2008 年、宮崎）

1. 特許取得
特許公開 2005-97267 (審査中)
投与量、投与方法について申請を検討中
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

II. 分担研究報告書