

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

研究代表者 長谷川 秀樹 国立感染症研究所

研究協力者 相内 章 国立感染症研究所

辻 隆裕 国立感染症研究所

澤 洋文 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター

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) と高病原性鳥インフルエンザウイルス A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) 由来 NIBRG14 の不活化全粒子ワクチンを用いヒトに免疫機構に近い霊長類であるカニクイザルでの免疫応答、感染防御能力、更に攻撃感染後の病理学的解析を行った。アジュバント併用ワクチンの経鼻接種により有効な粘膜免疫、全身の液性免疫が誘導され感染防御が可能であった。更に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。

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目的とし合成二本鎖 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に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、投与方法を決定する事を目的とする。

B. 研究方法

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バ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所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

ワクチンの経鼻接種後 2 週間目の非感染時から攻撃感染後経時的に 14 日、16 日、19 日、23 日、26 日、28 日目に採血し抗体価を測定した。ウイルス価及び抗体価測定の為カニクイザルから血清及び唾液を用いた。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。

粘膜アジュバント

経鼻投与の粘膜アジュバントとして合成二本鎖 PolyI:PolyC₁₂U (Ampligen®) は Hemispherx Biopharma (Philadelphia, PA) より分与された。

ワクチン接種とウイルス感染

カニクイザルはケタミン (0.1 ml/kg) により麻酔し 90 µg の NIBRG14 ワクチンを 500 µg の Ampligen と共に経鼻噴霧した。初回免疫から 3 週間後と 5 週間後に同量のワクチンにより経鼻免疫しその 2 週間後に 3×10^5 PFU のインフルエンザウイルス A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) を 3ml の PBS に懸濁し経気管および経鼻で感染させた。

病理学的検索

感染後 14 日目で病理解剖をおこない得られた検体をいずれも 10%ホルマリン緩衝液による固定後、常法どおりパラフィン包

埋切片を作製した。脱パラフィン後、一部はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を実施した。

C. 研究結果

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 (図 1A)。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)

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

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。感染前及び攻撃感染後 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 (図 2)。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。

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 (図 3)。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。

ヒトに免疫機構に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。

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迫、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。

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。経鼻免疫した後には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。

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っ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攻撃感染後の病態の像悪化は認められなかった。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Fukushima 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.

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得（出願）
なし
2. 実用新案登録
なし

図 1

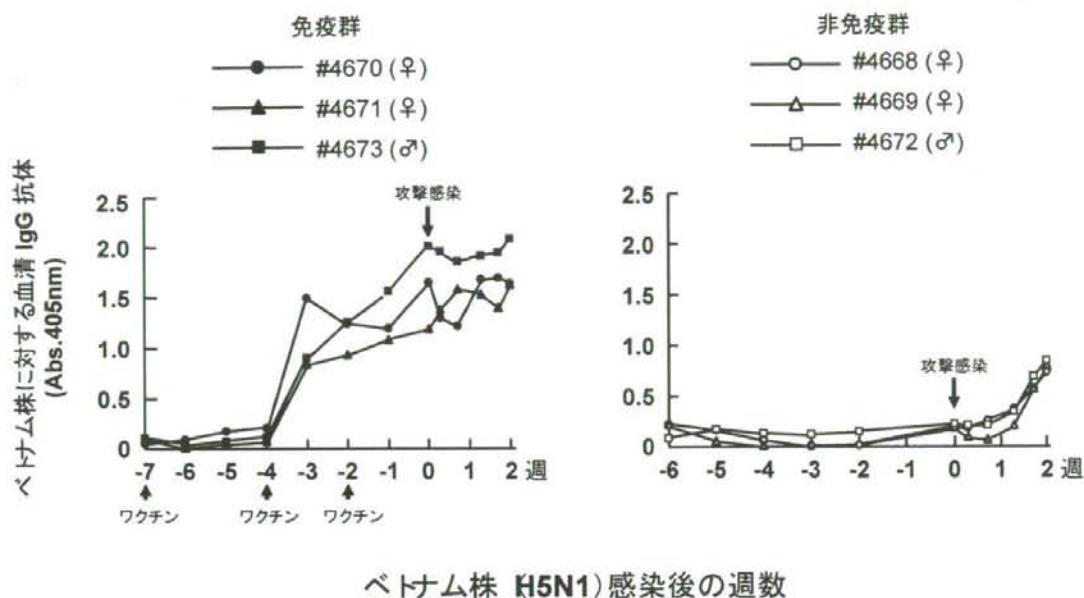


図 2

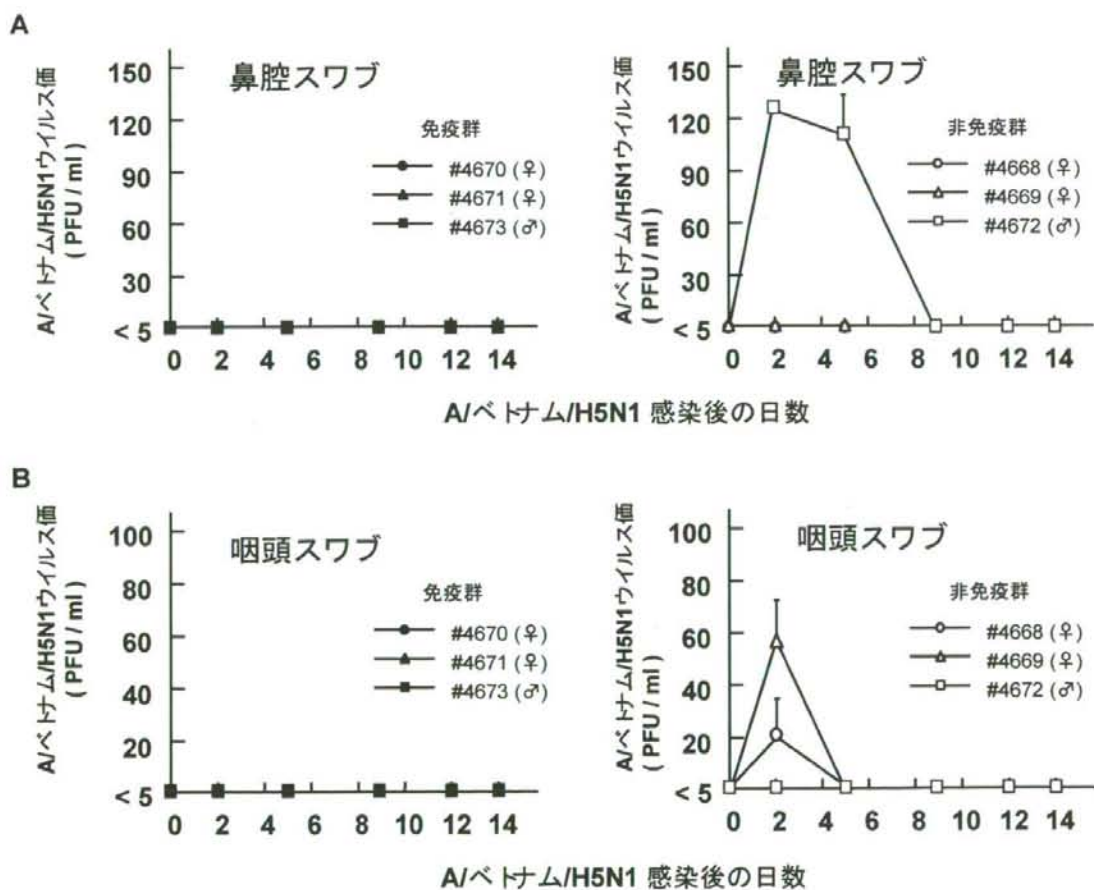
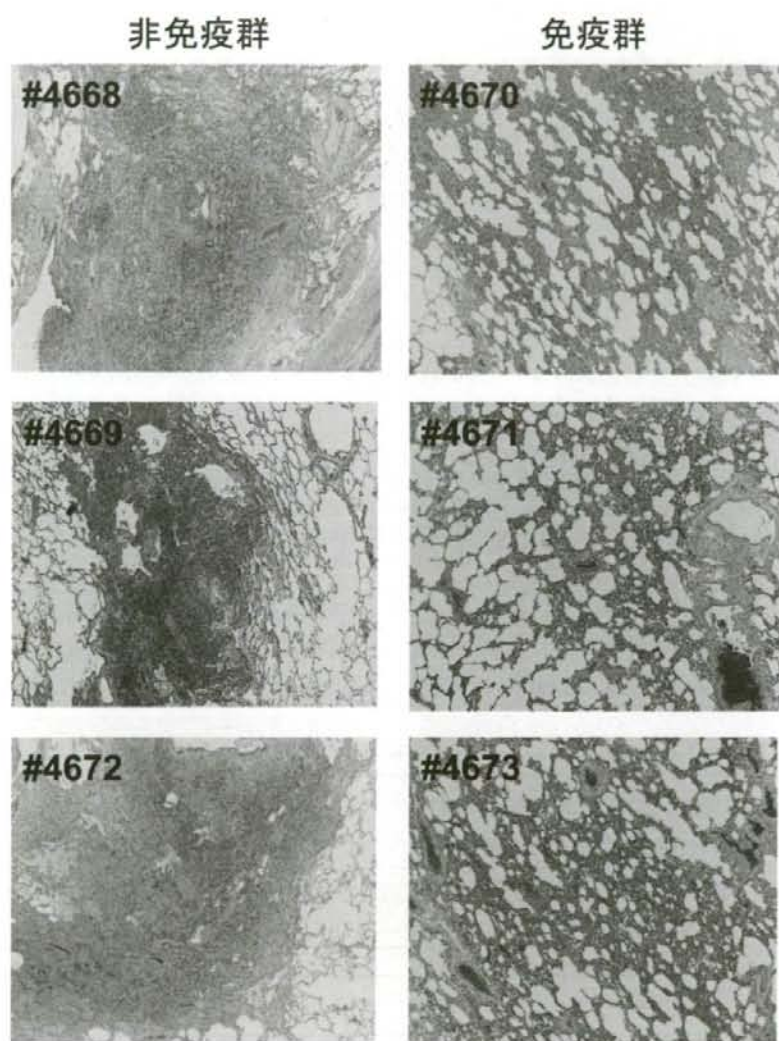


图 3



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

研究分担者 真鍋貞夫 （財）阪大微生物病研究会

研究協力者 谷本武史 （財）阪大微生物病研究会

研究要旨 昨年度の本研究で、二本鎖 RNA (dsRNA) である Polyriboinosinic polyribocytidylic acid [poly (I:C)] をアジュバントとしたインフルエンザ HA ワクチンを試作してマウスを用いた経鼻接種試験を行ったところ、鼻粘膜において感染防御に有意な免疫応答が得られ、また血清の免疫応答も上昇していることが明らかになった。この結果を受けて、医薬品としての開発が進行し、安全性や応用の点で実用化に近い dsRNA である Ampligen® [Poly (I:C₁₂U)] をアジュバントとして同様の試験を実施した。Ampligen の免疫応答増強のレベルは Poly (I:C) と同等であった。

また、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) [0.55% カルボキシビニルポリマー、1.2% L-アルギニン、1% グリセリンの混合物] 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。

A. 研究目的

インフルエンザは、毎年抗原を変化させつつ流行を繰り返すウイルス性感染症である。本邦において、その予防のためのワクチンは皮下接種するもののみが認可されている。このワクチン接種によって血清中に中和活性を持つ IgG 抗体が誘導されるため、肺炎などの重症化の予防には有効性が高い。しかし、感染箇所である上気道粘膜においては、IgA が感染防御の主体であり、これは皮下接種では誘導されないため、感染防御効果は十分とは言えない。そのため、感染を防御できるワクチンの開発が長年の課題となっている。粘膜への免疫誘導のためには、粘膜への抗原刺激が必須であるが、抗原単独では大量の抗原を必要とし、現実的ではない。そこで、アジュバントを添加して実際に足るワクチンの開発を目指すこととなった。

B. 研究方法

1. 薬理・薬効試験

1) アジュバントとして Poly (I:C) または Ampligen を添加した単味インフルエンザ HA ワクチンのマウスを用いた経鼻接種試験

インフルエンザ HA ワクチン (A/広島/52/2005 (H3N2)) に dsRNA である poly (I:C) または Ampligen を 0.1～10 μg 添加した試作ワクチンを作製し、マウスによる経鼻接種試験を実施した。接種試験には 7 週齢、雌の BALB/c マウスを一群 5 匹用い、アモバルビタール麻酔 (2mg を腹腔投与) して、マイクロピペットで両鼻孔に点鼻投与 (2 μl/鼻孔、0.1 μg HA/head) した。ワクチンは 3 週間隔で 2 回接種し、追加免疫の 10 日後に鼻腔洗浄液と血清を回収した。前者からは特異的 IgA-ELISA 抗体価を、後者からは特異的 IgG-ELISA 抗体価及び HI 抗体価を測定した。

2) AmpligenとCVPを併用した新型インフルエンザ用全粒子ウイルスワクチンのマウスを用いた経鼻接種試験

経鼻接種型インフルエンザワクチンの開発においては、新型インフルエンザに対応したワクチンの方が季節性インフルエンザ用のワクチンよりも、重要性・緊急性が高いため、これを優先することとなった。そこで、季節性インフルエンザHAワクチンと同様にして、新型インフルエンザワクチン（PR8-IBDC-RG2株：A/Indo/5/2005（H5N1）の弱毒株）にAmpligenをHA抗原の10倍量添加した試作ワクチンを作製した。この試作ワクチンは、ワクチンの鼻粘膜からのクリアランスを遅ら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CVP基剤 [0.55% CVP, 1.2% L-アルギニン, 1% グリセリンの混合物] を含むものとした。経鼻接種試験には、7週齢、雌のBALB/cマウスを一群5匹用い、接種抗原量は0.033~1 µg HA/headとした。この際に比較対照としてCVP基剤を併用せずワクチンにAmpligenをHA抗原の10倍量添加した群、CVP基剤を併用せずワクチンにAmpligenをHA抗原の20倍量添加した群、ワクチンにCVPのみを添加した群、無添加ワクチン・経鼻接種群、無添加ワクチン・筋肉内接種群、も設けた。ワクチンは3週間隔で2回接種し、追加免疫の2週間後に鼻腔洗浄液と血清を回収した。前者からは特異的IgA-ELISA抗体価を、鼻腔洗浄液から（IgA-ELISA）と血清（HI、中和、IgG-ELISA）の抗体価を調べた。試作ワクチンの接種は、ワクチンの粘性が高まったため、これまでのマイクロピペットによる点鼻からマイクロシリンジにプラント針（27G, 0.4mm×38mm）を接続したものを約4mm挿入して注入する手法に変更した。

2. 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Cr1: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。

2) 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。

3) ラットを用いた反復経鼻投与毒性試験

6週齢のCr1: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。

4) 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。

C. 研究結果

1. 薬理・薬効試験

1) アジュバントとしてPoly (I:C)またはAmpligenを添加した単味インフルエンザHAワクチンのマウスを用いた経鼻接種試験

アジュバント無添加の場合、抗原単独では感染防御に有効と見られる程度の特異的粘膜免疫(IgA-ELISA抗体価 ≥ 32)を誘導しなかったが、Poly (I:C)またはAmpligenを添加した群では鼻腔洗浄液の特異的IgA-ELISA抗体価を抗原単独の場合より増強し、ほぼ感染防御レベルに達した。血清HI抗体価が感染防御レベル以上(HI ≥ 40)の個体は、Poly (I:C)併用・10 μ g/ml群の一部で見られた。血清の特異的IgG-ELISA抗体価は、抗原単独接種群では検出されなかったが、Poly (I:C)またはAmpligen併用群では有意に上昇が見られ、そのレベルは両者でほぼ同等であった。

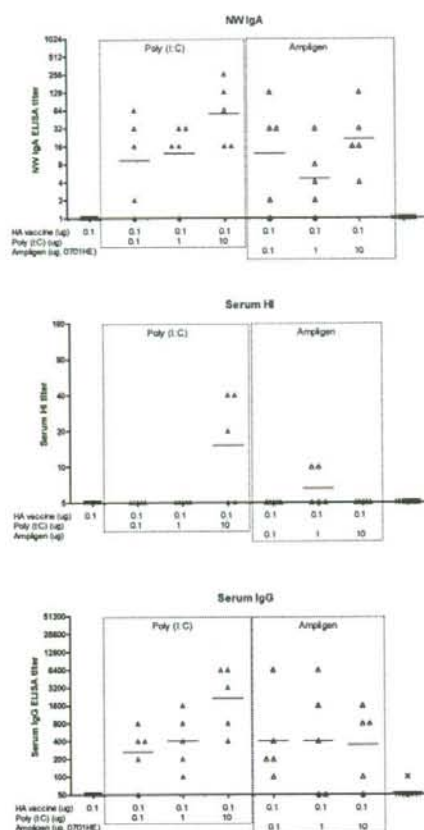


図1 Poly (I:C)またはAmpligenを添加した単味インフルエンザHAワクチンの経鼻接種試験の免疫応答

2) AmpligenとCVP基剤を併用した新型インフルエンザ用全粒子ウイルスワクチンのマウスを用いた経鼻接種試験

AmpligenとCVP基剤を併用したワクチンを接種した群において、粘膜と血清に、Ampligen単独添加群には見られなかった顕著な免疫増強効果を確認した。血清の特異的IgG・HI・中和抗体価(NT)は、筋肉内注射群(アジュバント無)と同等のレベルまで上昇した。

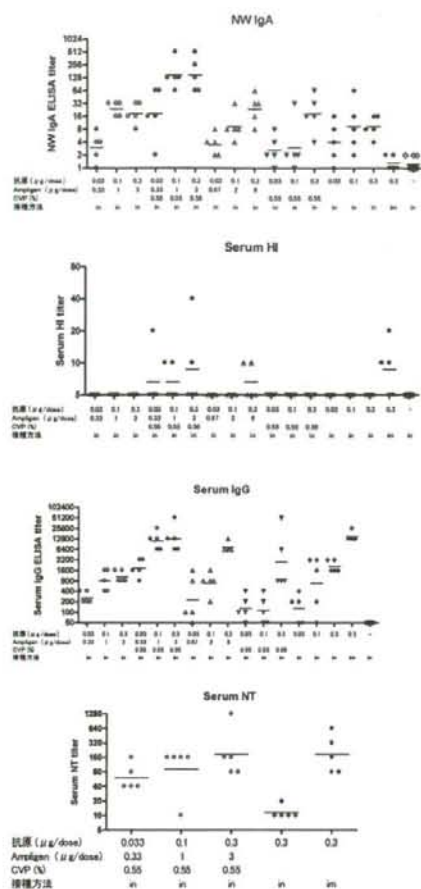


図2 AmpligenとCVP基剤を併用添加した新型インフルエンザワクチンの経鼻接種試験の免疫応答

2. 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。

D. 考察

dsRNAを添加した単味インフルエンザHAワクチンの経鼻接種試験は、ワクチンに添加するアジュバント候補としてPoly (I:C)とAmpligenの両者を比較し、その免疫応答増強能を比較するために実施したが、その成績はほぼ同等であった。このため、医薬品としての開発が進み、医薬品グレードでの入手が容易なAmpligenをアジュバントの候補とすることになった。

また、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应用されているCVP基剤を併用した新型インフルエンザワクチンを試作して経鼻接種試験を実施した。鼻粘膜の免

疫応答が顕著に向上するとともに、血清の特異的抗体価もアジュバント無添加の筋肉内注射と同等となるなど、より実用に近いワクチンになったと考えられた。しかし、血清のHI抗体価が感染防御レベル以上になったのは一部の個体にとどまったため、更に接種方法を検討する必要があると見られる。

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 μ g \times 3価/doseの10倍=450 μ g)は、成人の体重を50kgと想定した場合、9 μ g/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、イヌ単回/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。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
特許公開2005-97267(審査中)
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

新型インフルエンザワクチン臨床試験成績の判定および評価に関する研究

研究分担者 田代 真人 国立感染症研究所ウイルス第三部長

研究要旨 H5N1 ウイルスに対する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。さらに、抗体価の表示法も不統一であり、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。

分担研究者

田代真人 国立感染研 ウイルス第3部長

協力研究者

板村繁之 国立感染研ウイルス3部第6室長

信澤里枝 国立感染研ウイルス第3部主任研

影山 努 国立感染研ウイルス第3部第6室

原田 誠 国立感染研ウイルス第3部第6室

佐藤千恵子 国立感染研ウイルス第3部第6室

A. 研究目的

新型インフルエンザワクチンに対する有効性評価判定の基準については、予め設定しておく必要がある。現在危惧されているH5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスに由来するパンデミックに対しては、甚大な健康被害が生じることが危惧されているために、WHOはプロトタイプワクチンの開発と、これに基づいたプレパンデミックワクチンの備蓄を進めている。しかし、H5N1 ワクチンはヒトに対する

免疫原性が非常に低く、現行の季節性ワクチンと同じ製法では、9～12 倍の抗原量もの大量の抗原を接種する必要があると示されている。一方、アジュバントを添加することで、免疫原性を高め、一人当たりの抗原量を6～12 分の1に減らせることも示されてきた。

しかし、一方、H5N1 ウイルスに対する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、本研究では、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した。

B. 研究方法

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プール血清標準品の有用性を評価検討した。

C. 研究結果とD. 考察

1. 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(図1)。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HI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EMA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. ウエスタンブ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較正後の抗体価も検討された(図2上)。(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較正をした場合には、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(図2下)。

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較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較正するには不適當であることが示された。

2. 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(図3)。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、こ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 (図3)。

ヨーロッパにおいては、3つのすべての要件と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 (図4)。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。

3. 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 (図5)。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るろう。

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のクレードに分岐しており、これらが地域的にトリの間で土着している (図6)。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 (図8)。

4. 発育鶏卵増殖ワクチンの限界

現在のインフルエンザワクチンの製造は、基本的には発育鶏卵で分離、増殖されたウイルスを用いて行われる。従って、ワクチンの抗原性は、多かれ少なかれ「卵型」のものであり、ヒトの間で流行するウイルスとは、必ずしも一致していない。ここにも、現行ワクチンの効果の限界がある。

一方、発育鶏卵増殖ワクチンでは、高品質の発育鶏卵の大量供給が、新型インフルエンザへの対応において大きな足かせとなっている。季節性ワクチン用に一年前から農家と契約していた発育鶏卵を、季節用ワクチン製造に使用し終わった8月ごろから、新型ワクチンの製造を

開始せざるを得ないという最悪のシナリオの場合には、国民全体へのワクチン供給には1年半程度を要するものと判断される。

そこで、組織培養細胞を基盤としたワクチン抗原の製造が必要となる。この方法によれば、上記の2つの問題点は、大幅に解決できると期待できる。そこで、5年以内に国内においても組織培養細胞ワクチンの実用化を目指した研究が開始されている(図9)。

組織培養細胞で製造したワクチン抗原を、経鼻投与型粘膜ワクチンに応用することを計画している。

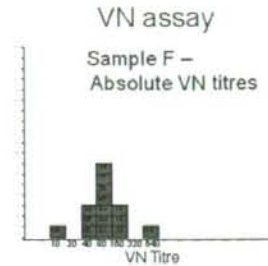
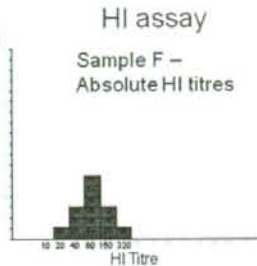
H5N1ワクチン効果判定の問題点

- H5N1抗体測定法の問題(WHOで検討中)
 - HI試験には再現性・信頼性がない(馬血球を使用)
 - HI抗体表示法の不統一
 - 中和試験法が国際的に標準化されていない
 - 精度管理試験結果に100倍以上の差異がある
 - 各メーカーの試験成績をそのまま比較できない
 - ヒト陽性標準プール血清を配布して較正する
- ヒトにおける抗体価(HI, 中和, SRD)と防御効果との関連性は不明
- 適当な動物感染モデル系が無い
- 全身感染とサイトカインストームを起こす強毒型新型ウイルスに対して、季節性インフルエンザの有効性基準が準用できるのか?

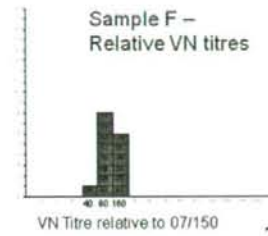
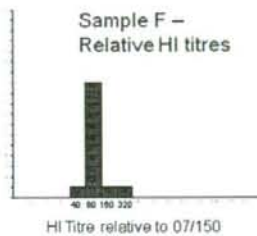
Between laboratory variability for clade 1 virus –
use of standard 07/150

Test serum F –
EU post vaccination
serum

A/Vietnam/2004
titres



A/Vietnam/2004
titres relative to
07/150



2

EMA Committee of Human Medical Products (CHMP) criteria
for the annual update of human seasonal influenza vaccines
(based on HI or SRH test results)



Applied to

MNT results are also applicable for the criteria.

'Mock-up' pandemic vaccines

1. Based on animal experiments.
2. Correlation of antibody titres among HI, MNT and SRH tests remains to be clarified.
3. Correlation of the immunogenicity and protection between seasonal vaccines and pandemic vaccines is not necessarily clear.

3

• **For seasonal influenza vaccines;** (EMEA)

At least one of the following serological criteria must be met in the following age groups (each of at least 50 individuals):

	Adults 18-60 yrs	Adults ≥60 yrs
Seroconversion rate	≥40%	≥30%
Seroprotection rate	≥70%	≥60%
Mean geometric increase	≥2.5	≥2.0

• **For 'mock-up' pandemic vaccines and pre-pandemic vaccines;**

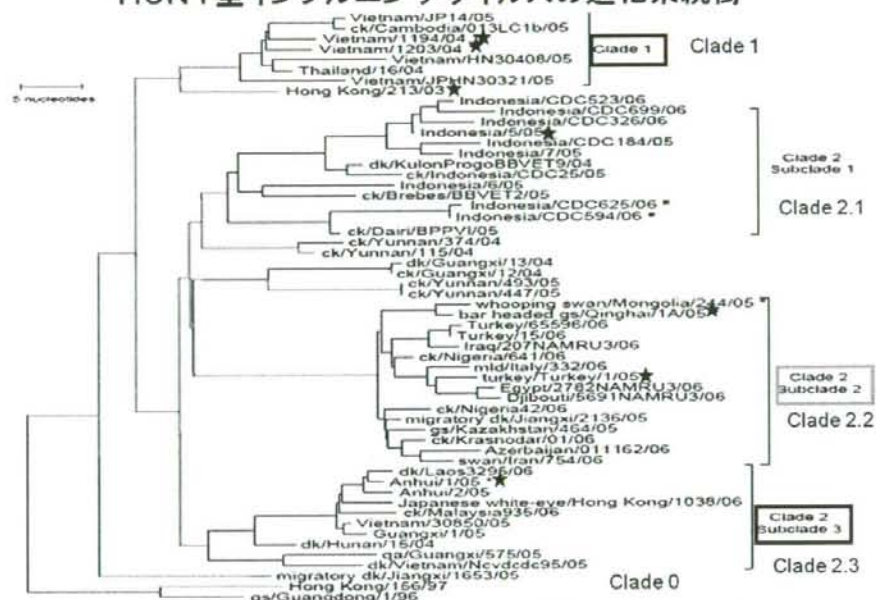
All three criteria will be met (EMEA)

At least one of the three criteria will be met (FDA)*

季節性インフルエンザワクチンの効果

- 65歳未満
70～90%のインフルエンザ発症を予防
(ウイルス感染は完全には防げない)
- 65歳以上
30～70%の肺炎による入院を予防
80%のインフルエンザに関連する死亡を予防
- 6か月以上の小児
2回接種後、82%のインフルエンザ発症を予防
現行ワクチンの効果には限界がある。

H5N1型インフルエンザウイルスの進化系統樹



H5N1ウイルスは遺伝子変異を続けて、10以上の系統に分岐している。
このうち4系統がヒトにも感染している。

6

H5N1トリインフルエンザウイルスの抗原解析 (HI試験)

Reference Ferret Antisera

	A/VN/1194/04	A/VN/1203/04	A/TH/16/04	A/INDO/5/05	A/INDO/357/06	A/INDO/625/06	A/TURKEY/15/05	A/ws/MG/244/05	A/bhg/QINGHAI/1/05	A/ty/TURKEY/1/05	A/dk/HUNAN/15/04	A/ANHUI/1/05	A/GUANGXI/1/05
1 A/VIETNAM/1194/04	640	nd	nd	20	nd	nd	nd	20	20	<20	nd	nd	nd
2 A/VIETNAM/1203/04	320	160	160	10	<10	80	<10	<10	40	<20	160	10	20
3 A/THAILAND/16/04	nd	160	160	10	<10	40	<10	<10	40	nd	80	<10	10
4 A/INDONESIA/5/05	80	<10	<10	320	320	160	40	20	80	40	40	40	20
5 A/INDONESIA/CDC357/06	nd	40	20	320	640	80	40	40	80	nd	20	20	10
6 A/INDONESIA/CDC625/06*	nd	40	10	80	40	1280	40	40	160	nd	40	40	20
7 A/TURKEY/15/05	80	20	<10	40	40	1280	640	640	1280	320	20	40	40
8 A/w.swan/MG/244/05 RG	80	20	10	40	80	640	320	320	640	320	20	10	10
9 A/b-h gs/QINGHAI/1/05	80	10	<10	40	80	320	80	1260	320	160	40	20	20
10 A/turkey/TURKEY/1/05	80	nd	nd	80	nd	nd	nd	160	160	320	nd	nd	nd
11 A/duck/HUNAN/15/04	nd	80	80	20	20	20	<10	<10	20	nd	160	160	nd
12 A/ANHUI/1/05	nd	40	20	<10	<10	20	10	10	40	nd	160	640	160
13 A/GUANGXI/1/05	nd	10	20	20	10	10	<10	<10	40	nd	nd	320	160

H5N1ウイルスは抗原変異グループに分岐している。

7