

H5N1ワクチンによる交叉免疫誘導

- VietNam/2004ワクチン(Clade1)接種で誘導されるヒト血清抗体は、Clade2.1(インドネシ株), Clade 2.2(青海株), Clade2.3(安徽株)のウイルスに対して1/2~8程度の交叉免疫を示す。
- マウス感染防御実験では、十分な交叉感染防御免疫を誘導できる。
- H5N1であれば、異なるClade、抗原変異ウイルスに対して、ある程度の交差免疫が期待できる。
- より効果の高いワクチンを備蓄するには、異なるClade, 抗原変異の程度に応じて、Pre-pandemic ワクチン株の更新が必要であろう。

8

現行の発育鶏卵増殖インフルエンザワクチンの問題点

- 発育鶏卵によるワクチン製造の際、ヒトからの分離ウイルスは、**増殖効率が悪い場合がある。**
- 分離ウイルスを発育鶏卵に馴化させる過程で抗原性が変化する場合があります、**ワクチンの効果が減弱する可能性がある。**
- 発育鶏卵の供給に依存するため、緊急時の大量生産が保証できない。
- ワクチン株決定から製造・供給までに半年~一年半程度かかる。
- 以上の理由から、季節性ワクチンについても2~5年以内に
 - 欧米では、組織培養ワクチンに切り替える計画がある。
 - **WHO**でもサーベイランス等を組織培養ワクチンに沿った体制に変更することを検討中。

組織培養インフルエンザワクチンにより改善される点

- パンデミック時に、ワクチンを緊急に大量生産することができる。
 - ヒトのウイルスに抗原性が近いために、より有効なワクチンが製造できる。
- ⇒ **パンデミックワクチンとして最適なワクチン製造方法である。**

(ただし国内メーカーの動きが悪く、国策として対応する必要がある)

9

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kamijuku H., Nagata, Y., Ichnose, T., Jiang X., Tashiro, T., Mori, K., Taniguchi, Y., Hase, K., Ohno, H., Shimaoka, T., Tonehara, S., Odagiri, T., Tashiro, M., Sata, T., Hasegawa, H., Seino, K. Mechanism of NKT cell activation by intranasal coadministration of α -galactosylceramide which can induce cross-protection against influenza viruses. *Mucosal Immunol.* 1: 208-218, 2008.
2. 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.
3. 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.
4. 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 1 interferon gene expression. *J. Biol. Chem.* 283: 25660-25670, 2008.
5. 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.
6. 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.
 7. Nicoll, A., Mori, K., Tashiro, M. Winston Churchill and the Russian Pandemic of 1890-91. *Br. Med. J.* 337: 2890, 2008.
 8. 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.
 9. Takahashi, Y., Hasegawa, H., Hara, Y., Ato, N., Ninomiya, A., Takagi, H., Odagiri, T., Sata, T., Tashiro, M., Kobayashi, M. Protective immunity afforded by H5N1 (NIBRG-14) - inactivated vaccine requires both antibodies against hemagglutinin and neuraminidase in mice. *J. Infect. Dis.* (2009 in press)
 10. 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)
 11. 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)
 12. 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 RT-PCR). *J. Med. Microbiol.* (2009 in press)
 13. 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)
 14. Ichinohe, T., Tashiro, M., Sata, T., Hasegawa, H. PolyI:PolyC12U adjuvant-combined intranasal vaccine protects mice against highly pathogenic H5N1 influenza virus variants. *Vaccine* (2009)
 15. 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) | なし |
| 16. 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) | 3. その他
なし |
| 17. 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) | |
| 18. Sriwilaijaroen, N., Wilairat, P.,
Hiramatsu, H., Takahashi, T., Suzuki, T.,
Ito, M., Ito, Y., Okada, H., Tashiro, M.,
Suzuki, Y. Inhibitory activity of
povidone-iodine against human and
avian influenza A viruses. Antimicrobial
Agent. Chemother. (submitted, 2009) | |

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録

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 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

研究要旨： 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。2008年の9月から11月にかけて、北海道およびモンゴルで採集した野生水禽の糞便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ず、すべて弱毒タイプのウイルスであった。今回分離された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。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。これらのうち、H7亜型のワクチン候補株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での増殖性、サルに対する免疫原性の成績より、この株がH7インフルエンザに対するワクチン株として有用であることを確認した。2008年北海道の野生オオハクチョウの斃死体から分離されたA/whooper swan/Hokkaido/1/2008 (H5N1)の抗原性を解析した結果、昨年樹立したH5亜型ワクチン候補株とは、抗原性を異にする事がわかった。

A. 研究目的

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。

B. 研究方法

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。

C. 研究結果

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。ポリクローン抗体及びモノクローン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

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

動物インフルエンザの継続的なグローバルサーベイランスによって、ヒトと動物のインフルエンザワクチン開発に有用なウイルス株ならびに高病原性鳥H5N1インフルエンザウイルスの抗原性と遺伝子の情報が得られる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 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.
- (2) 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.
- (3) 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.
- (4) 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.
- (5) Manzoor, R., Sakoda, Y., Nomura, N., Tsuda, Y., Ozaki, H., Okamatsu, 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).
- (6) 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.
- (7) Okamatsu, M., Sakoda, Y., Kishida, N., Isoda, N., and Kida, H. (2008). Antigenic structure of the hemagglutinin of H9N2 influenza viruses. *Arch Virol* (in press).
- (8) 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.
- (9) 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.
- (10) 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.
- (11) 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.
- (12) Kida, H. (2008). Ecology of influenza viruses in nature, birds, and humans. *Global Environmental Research* 12, 9-14.
2. 学会発表
- (1) 「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」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 第56回日本ウイルス学会学術集会 (2008年、岡山)
- (2) 「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」梶原将大、曾田公輔、岡松正敏、迫田義博、喜田宏 第56回日本ウイルス学会学術集会 (2008年、岡山)
- (3) 「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」曾田公輔、浅倉真吾、岡松正敏、迫田義博、喜田宏 第56回日本ウイルス学会学術集会 (2008年、岡山)
- (4) 「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」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 第56回日本ウイルス学会学術集会 (2008年、岡山)
- (5) 「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」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 第146回日本獣医学会学術集会 (2008年、宮崎)

H. 知的財産の出願、登録状況

予定なし。

厚生労働科学研究補助金（医療技術実用化総合研究事業）
分担研究報告書

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

研究分担者 清野 研一郎 聖マリアンナ医科大学

研究要旨：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。その結果、抗原、 α -GalCerともに0.05 μ gの投与で十分な抗体産生を、ともに0.2 μ gの投与で十分なT細胞反応を誘導できることを確認した。また、後者の10倍量(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所見から、本経鼻ワクチンは安全性が高いことが示唆された。

A. 研究目的

我々は以前の研究によりNKT細胞を活性化する糖脂質 α -galactosylceramide (α -GalCer) をアジュバントとして経鼻投与した場合、マウスにおいて有効な抗インフルエンザ免疫反応を誘導できることを見出した。本研究では 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

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。

(倫理面への配慮)

動物実験倫理規定を深く理解し、動物実験委員会の承認を得た後動物実験指針等を遵守して実施した。そのうえで「動物の愛護および管理に関する法律」(昭和48年法律第105号)、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」(昭和55年3月27日総理府告示第6号)の基本原則を適用した。

C. 研究結果

以前の研究ではスプリットワクチンならびに α -GalCer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。

D. 考察

当初の報告時に比べ抗原ならびに α -GalCerともに1/40の投与量(0.05 μ g)で十分な抗原特異的な抗体産生が、また1/10(0.2 μ g)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 μ g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 μ g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。

E. 結論

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ともに0.05 μ gの投与量で抗原特異的な抗体産生が、0.2 μ g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。

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

1. Ken-ichiro Seino, Case study: Novel nasal adjuvant development for pandemic and seasonal influenza vaccines, World Vaccine Congress Asia 2008, June 2008, Singapore

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

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

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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, <u>Kida H</u>	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	2008
Itoh Y, Ozaki H, Tsuchiya H, Okamoto K, Torii R, Sakoda Y, Kawaoka Y, Ogasawara K, <u>Kida H</u>	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	2008
Kishida N, Sakoda Y, Shiromoto M, Bai GR, Isoda N, Takada A, Laver G, <u>Kida H</u>	H2N5 influenza virus isolates from terns in Australia: genetic reassortants between those of the Eurasian and American lineages.	Virus Genes	37	16-21	2008
Manzoor R, Sakoda Y, Mweene A, Tsuda Y, Kishida N, Bai GR, Kameyama K, Isoda N, Soda K, Naito M, <u>Kida H</u>	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	2008
Manzoor R, Sakoda Y, Nomura N, Tsuda Y, Ozaki H, Okamatsu M, <u>Kida H</u>	PB2 protein of a highly pathogenic avian influenza virus strain A/chicken/Yamaguchi/7/2004 (H5N1) determines its replication potential in pigs.	J Virol	83	1572-1578	2009

Manzoor R, Sakoda Y, Sakabe S, Mochizuki T, Namba Y, Tsuda Y, <u>Kida H</u>	Development of a pen-site test kit for the rapid diagnosis of H7 highly pathogenic avian influenza.	J Vet Med Sci	70	557-562	2008
Okamatsu M, Sakoda Y, Kishida N, Isoda N, <u>Kida H</u>	Antigenic structure of the hemagglutinin of H9N2 influenza viruses.	Arch Virol	153	2189-2195	2008
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, <u>Kida H</u>	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	2008
Sawai T, Itoh Y, Ozaki H, Isoda N, Okamoto K, Kashima Y, Kawaoka Y, Takeuchi Y, <u>Kida H</u> , Ogasawara K	Induction of cytotoxic T-lymphocyte and antibody responses against highly pathogenic avian influenza virus infection in mice by inoculation of a pathogenic H5N1 influenza virus particles inactivated with formalin.	Immunology	124	155-165	2008
Soda K, Ozaki H, Sakoda Y, Isoda N, Haraguchi Y, Sakabe S, Kuboki N, Kishida N, Takada A, <u>Kida H</u>	Antigenic and genetic analysis of H5 influenza viruses isolated from water birds for the purpose of vaccine use.	Arch Virol	153	2041-2048	2008
Soda K, Sakoda Y, Isoda N, Kajihara M, Haraguchi Y, Shibuya H, Yoshida H, Sasaki	Development of vaccine strains of H5 and H7 influenza viruses.	Jpn J Vet Res	55	93-98	2008

T, Sakamoto R, Saijo K, Hagiwara J, <u>Kida H</u>					
<u>Kida H</u>	Ecology of Influenza Viruses in Nature, Birds, and Humans.	Global Environmental Research	12 (1)	9-14	2008
Kamijuku H, Nagata Y, Jiang X, Ichinohe T, Tashiro T, Mori K, Taniguchi M, Hase K, Ohno H, Shimaoka T, Yonehara S, Odagiri T, <u>Tashiro M</u> , Sata T, <u>Hasegawa H</u> , <u>Seino KI</u>	Mechanism of NKT cell activation by intranasal coadministration of α -galactosylceramide, which can induce cross-protection against influenza viruses.	Mucosal Immunol	1	208-218	2008
Russell CA, Jones TC, Barr IG, Cox NJ, Garten RJ, Gregory V, Gust ID, Hampson AW, Hay AJ, Hurt AC, de Jong JC, Kelso A, Klimov AI, Kageyama T, Komadina N, Lapedes AS, Lin YP, Mosterin A, Obuchi M, Odagiri T, Osterhaus AD, RimmelzwaanGF, Shaw MW, Skepner E, Stohr K, <u>Tashiro M</u> , Fouchier RA, Smith DJ	The global circulation of seasonal influenza A (H3N2) viruses.	Science	320 (5874)	340-6	2008
Ogata T, Yamazaki Y, Okabe N, Nakamura Y, <u>Tashiro M</u> , Nagata N,	H5N2 influenza infection to human in Japan and association of seasonal influenza vaccination with positive H5N2 neutralizing antibody.	J. Epidemiol.	18	160-166	2008

Itamura S, Yasui Y, Nakashima K, Doi M, Izumi Y, Fujieda T, Yamato S, Kawada Y					
Kubota T, Matuoka M, Chang T-H, Taylor P, Sasaki T, <u>Tashiro M</u> , Kato A, Ozato K	Virus infection triggers SUMOylation of IRF3 and IRF7, leading to the negative regulation of type 1 interferon gene expression.	J Biol Chem	283	25660-25670	2008
Russell CA, Jones TC, Barr IG, Cox NJ, Garten RJ, Gregory V, Gust ID, Hampson AW, Hay AJ, Hurt AC, de Jong JC, Kielso A, Klimov AI, Kageyama T, Komadina N, Lapedes AS, Lin YP, Mosterin A, Obuchi M, Odagiri T, Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF, Shaw MW, Skepner E, Stohr K, <u>Tashiro M</u> , Fouchier RA, Smith DJ	Influenza vaccine strain selection and recent studies on the global migration of seasonal influenza viruses.	Vaccine	26 Suppl 4	D31-4	2008
Makizumi K, Kimachi K, Fukada K, Nishimura T, Kudo Y, Goto S, Odagiri T, <u>Tashiro M</u> , 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(52)	6852-6858	2008
Nicoll A, Mori K, <u>Tashiro M</u>	Winston Churchill and the Russian Pandemic of 1890-91.	Br Med J	337	2890	2008
Kawakami C, Obuchi M, Saikusa M,	Outbreaks of oseltamivir-resistant influenza A/H1N1 virus in	Jpn J Infect Dis	62	83-86	2009

Noguchi Y, Ujike M, Odagiri T, <u>Tashiro M</u>	an elementary school and a family in Yokohama City, Japan during the 2007-2008 season.				
Takahashi Y, <u>Hasegawa H</u> , Hara Y, Ato N, Ninomiya A, Takagi H, Odagiri T, Sata T, <u>Tashiro M</u> , Kobayashi M	Protective immunity afforded by H5N1 (NIBRG-14) - inactivated vaccine requires both antibodies against hemagglutinin and neuraminidase in mice.	J Infect Dis		(in press)	2009
Wada T, Morishima T, Okumura A, <u>Tashiro M</u> , Hosoya M, Shiomi M, Okuno Y	Differences by age in clinical manifestations of influenza-associated encephalopathy.	Microbiol Immunol		(in press)	2009
Ikeno D, Kimachi K, Kudo Y, Goto S, Itamura S, Odagiri T, <u>Tashiro M</u> , Kino Y	The prime-boost vaccination of H5N1 heterologous strains in a mouse model.	Vaccine		(in press)	2009
Akiyama M, Kimura H, Tsukagoshi H, Taira K, Mizuta K, Saitoh M, Nagano M, Sutoh A, Noda M, Morita Y, Sakatsume O, Okabe N, <u>Tashiro M</u>	Development of assay for the detection and quantitation of measles virus nucleoprotein (N) gene using real-time reverse transcription polymerase chain reaction (real-time RT-PCR).	J. Med. Microbiol.		(in press)	2009
Thongratsaku S, Songserm T, Poolkhet C, Kondo S, Yagi H, Hiramatsu H, <u>Tashiro M</u> , 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		(in press)	2009
<u>Tashiro M</u> , McKimm	Surveillance for Neuraminidase	Antiviral Therapy		(in press)	2009

Breschkin J, Saito T, Klimov A, Macken C, Zambon M, Hayden F	Inhibitor-Resistant Influenza Viruses in Japan, 1996-2007.				
WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group: Brown IH, Capua I, Cattoli G, Chen H, Cox N, Davis T, Donis RO, Fouchier RAM, Garten R, Guan Y, Kawaoka Y, Mackenzie J, McCauley J, Mumford E, Olsen C, Perdue M, Russell CA, Smith C, Smith D, Smith GJD, Shu Y, <u>Tashiro M</u> , 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		(in press)	2009
Hishinuma- Igarashi I, Mizuta K, Saito Y, Ohuchi Y, Noda M, Akihama M, Sato H, Tsukagoshi H, Okabe N, <u>Tashiro M</u> , Kimura H	Phylogenetic analysis of human bocavirus (HBoV) detected from children with acute respiratory infection in Japan.	J Infection		(in press)	2009
Ichinohe T, Iwasaki A, <u>Hasegawa H</u>	Innate sensors of influenza virus: clues to developing better intranasal vaccines.	Expert Rev Vaccines	7(9)	1435-1445	2008
Nagata N, Iwata N, <u>Hasegawa H</u> , Fukushi S, Harashima A, Sato Y, Saijo M, Taguchi F, Morikawa S, Sata	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.	172(6)	1625-37.	2008

T.					
<u>Hasegawa H</u> , Ichinohe T, Aina A, Tamura S, Kurata T.	Development of an inactivated mucosal vaccine for H5N1 influenza virus.	Therapeutic and Clinical Risk Management	5	125–132	2009