

20083804/A

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

粘膜投与等の新投与経路ワクチン研究における
品質管理に関する研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 板村繁之

平成21(2009)年 3月

目 次

I. 総括研究報告

- 粘膜炎投与等の新投与経路ワクチン研究における品質管理に関する研究 ----- 1
板村繁之

II. 分担研究報告

1. 粘膜炎投与等の新投与経路ワクチン研究における品質管理に関する研究 ----- 8
長谷川 秀樹
2. 粘膜炎ワクチンの品質管理に必要な免疫学的試験法の開発 ----- 13
横田 恭子
3. 粘膜炎投与等の新投与経路ワクチン研究における品質管理に関する研究 ----- 16
笠井道之

粘膜投与等の新投与経路ワクチン研究における品質管理に関する研究

研究代表者 板村繁之 国立感染症研究所 ウイルス第3部 第6室長

研究要旨

経鼻接種による粘膜免疫を誘導する粘膜ワクチンが開発されれば、従来感染阻止のできなかった急性呼吸器感染症などに対して発病予防だけでなく感染予防や流行阻止に有効なワクチンの実現が期待される。また、新型インフルエンザに対するワクチンとしても高い有効性が期待される。本研究では、アジュバント添加不活化インフルエンザ経鼻接種粘膜ワクチンを新しい投与経路ワクチンのモデルとし、安全性が高く高品質のワクチンを製造するために必要な品質管理方法の確立を目的とした。本年度は、以下のような研究成果を得た。

(1) 合成二本鎖 RNA をアジュバントとした高病原性鳥インフルエンザ (A/H5N1) に対する全粒子不活化ワクチンをカニクイザルに経鼻投与後、末梢血中の白血球数、リンパ球数、好中球数、血小板数、好酸球数を調べたところ、非接種群と比較してそれぞれの血算の値に有意な差はなくワクチン接種に伴う血球の変化は認められず、本指標はひとつの品質管理の指標となり得る。

(2) H5 亜型 HA 特異的なモノクローナル抗体を組み合わせることで H5 亜型特異的な HA 含量を定量検出するサンドイッチ ELISA システムの至適化を行い、ワクチンの有効成分の含量測定に有用であることを明らかにした。

(3) TLR リガンド感受性を有する指示細胞を使用して NF- κ B 活性誘導能を指標として不活化型全粒子ワクチンについて測定したところ、ワクチンの免疫原性の指標として有用であることが示唆された。

研究組織

課長補佐

研究代表者

板村繁之 国立感染症研究所ウイルス第3部 室長

A. 研究の目的と背景

従来のワクチンの多くは皮下などの接種経路で実施されている。ところが、インフルエンザに代表される感染が身体の表層部分で起こる急性の感染症に対する有効な生体防御応答を誘導するには、現行の接種経路のワクチンは適していない。現行のインフルエンザワクチンは、皮下接種によって血中に IgG を主体としたウイルスの中和抗体を産生することに

分担研究者

長谷川秀樹 国立感染症研究所感染病理部 室長

横田恭子 国立感染症研究所免疫部 室長

笠井道之 国立感染症研究所血液・安全性研究部
主任研究官

谷本武史 (財) 阪大微生物病研究会観音寺研究所

よって上気道から下気道へ感染が拡大して肺炎などに重症化するのを抑制するように働く。そのために感染阻止には有効ではないが発病阻止や重症化阻止には機能する。しかしながら上気道での感染を阻止するためには粘膜局所での免疫応答を効率よく誘導する必要があるが、現行の接種経路では効率良く粘膜局所での IgA を主体とした免疫応答を誘導することができない。また、インフルエンザのように病原体の抗原性が頻繁に変化するものに対しては交差反応性に優れた防御免疫応答が重要であるが、血清中の中和抗体である IgG は粘膜局所に分泌される IgA と比較してその交差反応性に劣る。

このような問題点を克服するために、経鼻接種による粘膜免疫を誘導する粘膜ワクチンの開発が進められ有望な結果も集積してきている。こうしたワクチンが開発できれば、従来感染阻止のできなかった急性呼吸器感染症などに対して発病予防だけでなく感染予防や流行阻止に有効なワクチンの実現が期待される。また、新型インフルエンザに対するワクチンとしても高い有効性が期待される。米国やスイスでは弱毒生ワクチンや不活化ワクチンのインフルエンザワクチンが経鼻接種ワクチンとして開発されてきたが、安全性や効果の点から問題点が残されており、新しいワクチンの接種経路としての経鼻ワクチンについて安全性やその品質を確保するために必要な品質管理の方法について確立しているとは言い難い。

本研究では、アジュバント添加不活化インフルエンザ経鼻接種粘膜ワクチンを新しい投与経路ワクチンのモデルとし、安全性が高く高品質のワクチンを製造するために必要な品質管理方法の確立を目的として実施した。

B. 研究方法

1) アジュバント添加経鼻接種不活化インフルエンザワクチンに対する安全性評価方法の検討

パンデミック用ワクチンとして高病原性鳥インフルエンザ (A/H5N1) に対する全粒子タイプの不活化ワクチンとアジュバントとして合成二重鎖 RNA を用いて製剤化されたワクチンを使用して安全性評価方法を検討した。実験動物としてカニクイザルを用いてワクチンの経鼻接種後、更にウイルスによる攻撃感染後の末梢血中の白血球数、リンパ球数、好中球数、血小板数、ヘマトクリット値等の血算を測定し非免疫群と比較した。

2) HA 含量測定によるワクチン力価試験法の開発

昨年度、A/Vietnam/1194/2004 (NIBRG-14) (H5N1) 株を発育鶏卵で増殖させたのち蔗糖密度勾配遠心法で精製し、UV またはホルマリンで不活化して免疫抗原としてマウスに免疫してハイブリドーマを作製し、NIBRG-14 (H5N1) 株に特異的に反応する抗体を産生するハイブリドーマを取得した。また、得られた HA 蛋白に特異的なモノクローナル抗体を使用してサンドイッチ ELISA 法によって HA 抗原が検出できることを示したが、本年度は得られたモノクローナル抗体を組み合わせてサンドイッチ ELISA 法による HA 抗原検出系の至適化を行って感度向上を図った。

3) アジュバント添加経鼻接種不活化インフルエンザワクチンの免疫原性評価によるワクチン力価試験法の開発

転写因子 (NF- κ B) に対するレポーター遺伝子を組み込んだ人由来モノサイト細胞 (THP-Blue-CD14 細胞) を指示細胞として TLR アゴニストとしての免疫誘導能について全粒子インフルエンザワクチンの不活化の程度を変化させて評価した。

C. 研究結果・考察

1) アジュバント添加経鼻接種不活化インフルエンザワクチンに対する安全性評価方法の検討

合成二本鎖 RNA アジュバントである polyI:polyC12U を用いた高病原性鳥インフルエンザ (A/H5N1) に対する全粒子不活化ワクチンを経鼻投与後およびその後のウイルスによる攻撃感染時の末梢血中の白血球数、リンパ球数、好中球数、血小板数、好酸球数等を調べて、その影響を非免疫群のカニクイザルと比較した。ワクチンの経鼻接種と非接種群においてそれぞれの血算の値に有意な差はなくワクチン接種に伴う血球の変化は認められなかった。ワクチン接種後 2 週間目にワクチン株と相同株である高病原性鳥インフルエンザウイルス A/VN/1194/2004 (H5N1) 株で攻撃感染を行った。攻撃感染に伴う血球の変化は経鼻免疫群では感染後早期 (2 日目) に末梢白血球の増加がみられたのに対し非免疫群では感染 9 日目に白血球の増加が見られた。経鼻免疫群における白血球の増加は好中球数の増加によるものである事が明らかとなった。一方で非免疫群における 9 日目の白血球増加はリンパ球の増加によるものである事が明らかとなった。また感染直後には免疫群非免疫群共にリンパ球の減少が認められた。その他血小板や好酸球数には差がみとめられなかった。感染 2 週間後の病理解剖ではワクチン接種による病態の増悪は認められなかった。従って、経鼻接種経路による本ワクチン剤型では、末梢血において白血球数、リンパ球数、好中球数、血小板数、好酸球数に影響を与えることが無かった。このように実験動物への本剤型のワクチン投与による末梢血中の変化を測定すれば、本剤型のワクチンの安全性に関する情報が得られることが分かった。今後、末梢血中の変化とワクチンの品質との関連を調べて品質管理手法として有効であるのか検討する必要があるが、ひとつの品質管理の指標となり得るも

のである。

2) HA 含量測定によるワクチン力価試験法の開発

各モノクローナル抗体の濃度を検討した結果、2C2 と OM-a をそれぞれ 2 mg/ml に PBS で混合したものを 1 次抗体とした時に最もシグナルが強かった。そこで NIBRG (Vietnam H5HA), Indonesia (H5HA) の不活性化ウイルス粒子抗原と濃度の明らかなバキュロウイルス組換え HA 蛋白の検出を行った。バキュロウイルス組換え HA 蛋白にして 100 ng/ml がこのエライザ系の検出限界であることが明らかとなった。ウイルス全粒子の場合、その蛋白濃度を正確に測定することはできないが、ベトナム株で 50 ng/ml 以下、インドネシア株で 20 ng/ml 以下の抗原が測定可能であった。この感度を更に高めることが可能かどうか、マイクロビーズの系や特殊な蛋白吸着繊維を使用する系での検討を進めている。

今回至適化を行ったエライザシステムは一般的な検出系としては感度がまだ不十分であり、さらに改良する必要がある。しかしながら、ワクチンの品質管理においては、通常 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のオーダーでの管理であるので、現行法との一致度や再現性などの確認が今後の課題である。またアジュバントによる測定系の阻害の有無は重要な検討課題であろう。

今年度の検討では、精製した HA 蛋白よりもウイルス粒子の方が高感度に検出されることが示唆された。作製したモノクローナル抗体は UV 不活化したウイルス粒子を免疫原として用いたネズミ脾臓細胞から樹立したもので、特に一次抗体として用いた 2C2 はウイルスの立体構造を認識しているらしいことが分かっている。従って、ウイルス粒子全体に対する反応が HA 蛋白のみと比べて強い可能性は十分考えられる。また、抗原の立体構造を担保することによって抗原の含有量だけでなく、免疫原性も反映する測定値となる可能性があり、その点についての検討も

重要であろう。また、この系は感度を高めることにより、ワクチンの品質管理だけでなく、HA 亜型特異的であることから臨床現場での感染者の簡易鑑別診断にも応用できることが期待される。

3) アジュバント添加経鼻接種不活化インフルエンザワクチンの免疫原性評価によるワクチン力価試験法の開発

粘膜投与等の新投与経路型のワクチンのモデルとして使用している本ワクチンは、不活化全粒子型インフルエンザワクチンに TLR リガンド（合成二重鎖 RNA）をアジュバントとして加え、抗原提示細胞における抗原提示能力やタイプ I 型インターフェロン産生能力などの免疫誘導能力を高めた製剤である。従って、これまで以上に精緻な免疫原性（免疫抗原の質・量および免疫誘導能力）に関する評価と管理が求められる。しかしながら、人に投与した場合におけるこのワクチンの有する免疫原性の評価は、現在のところたん白質定量法によるインフルエンザウイルスたん白質抗原の量と一次放射免疫拡散法による HA 抗原量の評価のみであり、不活化全粒子インフルエンザワクチンのたん白質、脂質及び核酸に由来する免疫誘導能力と TLR リガンドに由来する免疫誘導能力についての評価は未だ不十分である。そこで、転写因子（NF- κ B）の下流にレポーター遺伝子（SEAP: secreted embryonic alkaline phosphatase）を組み込んだヒト由来モノサイト（THP 細胞）細胞株を用いて、ヒト培養細胞に対する不活化型全粒子インフルエンザウイルス由来の免疫誘導能力と様々な TLR リガンドの免疫誘導能力を評価した。

まず、THP-Blue-CD14 細胞を PMA 処理した後、マクロファージ化へと分化させ（以下 PMA-Mac と略す）、様々な濃度の TLR リガンドと 24 時間共培養後、NF- κ B 活性を調べた。PMA-Mac は TLR1、TLR2、TLR4、TLR6、TLR8 の各 TLR リガンドに反応し、それらリガ

ンドの濃度に依存した NF- κ B 活性を示したが、TLR3、TLR7、TLR9 の TLR リガンドに対しては NF- κ B 活性を示さなかった。これらの TLR はいずれも細胞内にエンドソーム発現し、その場で TLR リガンドと結合する。従って、培養条件の検討などで、抗原取り込み、TLR 発現量の増強などを図り、特に TLR3 リガンドである polyI:C に対する反応性について検討を進める必要がある。

次に、このような TLR リガンド感受性を有する指示細胞 PMA-Mac に不活化程度の異なる H3N2 インフルエンザワクチンまたは B 型インフルエンザワクチンを様々なたん白質濃度で加えて共培養した後、NF- κ B 活性を調べたところ、培養液中の最終ホルムアルデヒド濃度が 0.0078% 以下でないと PMA-Mac は NF- κ B 活性を示さなかった。PMA-Mac は培養液中のホルムアルデヒド濃度が 0.0078% より高い濃度でも死滅することなく生存しているが、0.0078% 以下の濃度でないと NF- κ B 活性を示さない。このことから、不活化全粒子インフルエンザワクチンは PMA-Mac 細胞膜上の TLR を刺激するのに加えて、不活化されたインフルエンザウイルス粒子自体を取り込むなどの動的刺激が PMA-Mac の NF- κ B 活性発現に必要と考えられた。培養液に加えた H3N2 インフルエンザワクチンおよび B 型インフルエンザワクチンのたん白質濃度の増加に依存して PMA-Mac の NF- κ B 活性は上昇した。このときの培養上清中には IL-1 β が検出された。また、ワクチンの不活化期間の長さに応じて PMA-Mac の NF- κ B 活性の低下を示す。この活性低下の度合いは、B 型よりも H3N2 の場合の方が大きかった。また、不活化期間が 3 ヶ月以上の場合、両者のワクチンは PMA-Mac の NF- κ B 活性を誘導できなかった。

同様に、インフルエンザ HA ワクチンおよび新型インフルエンザワクチンについても PMA-Mac の NF- κ B 活性を調べた。インフルエンザ HA ワクチンは全く

PMA-Mac の NF- κ B 活性を誘導できなかつた。一方、新型インフルエンザワクチンは、たん白質濃度依存的に PMA-Mac の NF- κ B 活性を誘導したが、その大きさは、55 日間不活化した H3N2 インフルエンザウイルスと同程度であつた。H3N2 インフルエンザワクチンおよび B 型インフルエンザワクチンは共にホルムアルデヒドの処理時間の長さに応じて PMA-Mac の NF- κ B 活性の低下を示し、3 ヶ月を経過すると完全に NF- κ B 活性誘導能力を失う。しかし、アルミアジュバントを加えてある新型インフルエンザワクチンは NF- κ B 活性を示すことから、本活性が免疫原性の指標として有用であることが示唆された。今後、本活性と免疫原性との関連について、より詳細に解析することが課題である。

D. 結論

(1) 合成二本鎖 RNA をアジュバントとした高病原性鳥インフルエンザ (A/H5N1) に対する全粒子不活化ワクチンをカニクイザルに経鼻投与後、末梢血中の白血球数、リンパ球数、好中球数、血小板数、好酸球数を調べたところ、非接種群と比較してそれぞれの血算の値に有意な差はなくワクチン接種に伴う血球の変化は認められず、本指標はひとつの品質管理の指標となり得る。

(2) H5 亜型 HA 特異的なモノクローナル抗体を組み合わせて H5 亜型特異的な HA 含量を定量検出するサンドイッチ ELISA システムの至適化を行い、ワクチンの有効成分の含量測定に有用であることを明らかにした。

(3) TLR リガンド感受性を有する指示細胞を使用して NF- κ B 活性誘導能を指標として不活化型全粒子ワクチンについて測定したところ、ワクチンの免疫原性の指標として有用であることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamamoto, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Mitsuki, Y-Y, Mizukoshi, F., Terahara, K., Inagaki, Y., Yamamoto, N., Kobayashi, K. and Inoue, J-I.: Selective transmission of R5 HIV-1 over X4 HIV-1 at the dendritic cell-T cell infectious synapse is determined by the T cell activation state. **PLoS Path.** 5:e1000279, 2009
- 2) Mizukoshi, F., Yamamoto, T., Mitsuki, Y-y., Terahara, K., Kawana-Tachikawa, A., Kobayashi, K., Iwamoto, A., Morikawa, Y., and Tsunetsugu-Yokota, Y.: Activation of HIV-1 Gag-specific CD8⁺ T cells by yeast-derived VLP-pulsed dendritic cells is influenced by the level of mannose on the VLP antigen. **Microbes Infect.** 11:191-197, 2009
- 3) Ishii, K., Hasegawa, H., Nagata, N., Fukushi, Y., Taguchi, F. and Tsunetsugu-Yokota, Y.: Neutralizing antibody against SARS-CoV spike is highly effective for the protection of mice in the murine SARS model. **Microbiol. Immunol.** in press, 2009
- 4) Mitsuki, Y-Y, Ohnishi, K., Oshima, M., Yamamoto, T., Mizukoshi, F., Kobayashi, K., Yamamoto, N., Yamaoka, S., and Tsunetsugu-Yokota, Y.: Amino acids in the S1 and S2 spike protein domains determines the neutralization escape phenotype of SARS-CoV. **Microbes Infect.** 10:908-915, 2008
- 5) Yamamoto, T and Tsunetsugu-Yokota, Y.:

Prospects for the therapeutic application of lentivirus-mediated gene therapy to HIV-1 infection. **Curr Gene Ther.** 8:1-8, 2008

- 6) 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.
- 7) 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
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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) Ami, Y., Ishii, K., Tsunetsugu-Yokota, Y., Nagata, N., Hasegawa, H. and Taguchi, F. : Fatal exacerbated pneumonia of mice induced by co-infection of respiratory bacterium and SARS-CoV, XIth International Symposium on Nidoviruses, Oxford, UK, June 22-27, 2008

- 2) Ishii, K., Hasegawa, H., Nagata, N., Ami, Y., Fukushi, S., Taguchi, F. and Tsunetsugu-Yokota, Y.: SARS-CoV Spike-reactive neutralizing antibody is highly effective for the protection of mice in the murine SARS model, XIth International Symposium on Nidoviruses, Oxford, UK, June 22-27, 2008
- 3) Yamamoto, T., Iwamoto, N., Yamamoto, H., Tsukamoto, T., Kuwano, T., Takeda, A., Kawada, M., Tsunetsugu-Yokota, Y. and Matano, T.: SIV-specific functional T-cell induction after passive neutralizing antibody immunization postinfection. The 8th Awaji International Forum of Infection and Immunity, September 7-11, 2008
- 4) Terahara, K., Mizukoshi, F., Yamamoto, T., Mitsuki, Y-Y, Tsuchiya, T., Kobayashi, K. and Tsunetsugu-Yokota, Y.: HIV-1 Nef dysregulates the innate immune function of macrophages, The 8th Awaji International Forum of Infection and Immunity, September 7-11, 2008
- 5) Mitsuki, Y-Y, Yamamoto, T., Tsunetsugu-Yokota, Y. : Selective transmission of R5 HIV-1 over X4 HIV-1 at the dendritic cell? T cell infectious synapse is determined by the T cell activation state. The 9th Seminar in Kumamoto, Kumamoto, September 16-17, 2008
- 6) 山本拓也、光木裕也、水越文徳、寺原和孝、稲垣好雄、山本直樹、横田(恒次)恭子: 樹状細胞の抗原提示に伴う感染シナプスを介した R5 型 HIV-1 選択的伝播機構の解析。第 56 回ウイルス学会、岡山、平成 20 年 10 月
- 7) 水越文徳、山本拓也、光木裕也、寺原和孝、小林和夫、横田(恒次)恭子: Nef 蛋白質発現に伴うマクロファージの自然免疫機能異常に関する解析。第 22 回日本エイズ学会、大阪、平成 20 年 11 月。山本拓也、光木裕也、水越文徳、寺原和孝、稲垣好雄、山本直樹、横田(恒次)恭子: 樹状細胞の抗原提示に伴う感染シナプス

を介した R5 型 HIV-1 選択的伝播機構の解析。
第 56 回ウイルス学会、岡山、平成 20 年 10 月

- 8) 水越文徳、山本拓也、光木裕也、寺原和孝、小林和夫、横田（恒次）恭子:Nef 蛋白質発現に伴うマクロファージの自然免疫機能異常に関する解析。第 22 回日本エイズ学会、大阪、平成 20 年 11 月。
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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（予定を含む。）

なし

粘膜投与等の新投与経路ワクチン研究における品質管理に関する研究

分担研究者：長谷川 秀樹（国立感染症研究所感染病理部）

研究要旨：感染阻止を目的としたインフルエンザワクチンの開発には従来の投与経路では限界があり新しい接種経路でのワクチン接種が必要である。感染阻止が期待され更に事ワクチン株と異なるウイルスに対する交叉防御効果が期待できる粘膜投与型インフルエンザワクチンの安全性及び品質管理に関する研究が必須である。本研究では経鼻粘膜ワクチンとしての合成二本鎖 RNA アジュバントの安全性評価の為、カニクイザルを用いワクチンの経鼻接種後、更に攻撃感染後の末梢血中の白血球数、リンパ球数、好中球数、血小板数、ヘマトクリット値等の血算を測定し非免疫群と比較した。

A. 研究目的

本研究では、感染防止を目指したアジュバント併用粘膜投与型経鼻インフルエンザワクチンの開発にあたり安全性が高く高品質のワクチンを製造するために必要な基礎的検討のため、ワクチンの新規接種ルートとしての経鼻経路での接種に対する安全性を調べる事を目的とする。そのために、ワクチン投与による生体反応をカニクイザルを用いて解析しその評価法の開発を目的とする。

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イクス法により 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 2130~4180g 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 実験室で行った。

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 Poly I: Poly C₁₂U (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 3 ml の PBS に懸濁し経気管および経鼻で感染させた。

採血と血算

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日目に採血し末梢血中の白血球数、リンパ球数、好中球数、血小板数、ヘマトクリット値等の血算を測定した。

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

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末梢血血算

合成二本鎖 RNA アジュバントである polyI:polyC₁₂U を用いた高病原性鳥インフルエンザ H5N1 ワクチンの経鼻ルートでの投与後およびその後の攻撃感染時の末梢血中の白血球数、リンパ球数、好中球数、血小板数、好酸球数等をしらべその影響を非免疫群のカニクイザルと比較した。ワクチンの経鼻接種と非接種群においてそれぞれの血算の値は有意な差はなくワクチン接種に伴う血球の変化は認められなかった。ワクチン接種後2週間目にワクチン株と相同株である高病原性鳥インフルエンザウイルス A/VN/1194/2004 (H5N1) 株で攻撃感染を行った。攻撃感染に伴う血球の変化は経鼻免疫群では感染後早期 (2日目) に末梢白血球の増加がみられたのに対し非免疫群では感染9日目に白血球の増加が見られた。経鼻免疫群における白血球の増加は好中球数の増加によるものである事が明らかとなった。一方で非免疫群における9日目の白血球増加はリンパ球の増加によるものである事が明らかとなった。また感染直後には免

疫群非免疫群共にリンパ球の減少が認められた。その他血小板や好酸球数には差がみとめられなかった。

感染2週間後の病理解剖ではワクチン接種による病態の増悪は認められなかった。

D. 考察

Toll like receptor 3(TLR3)のリガンドをアジュバントに用いた経鼻インフルエンザワクチンを経鼻粘膜投与する事自身では末梢血の白血球数や赤血球数、リンパ球数、好中球数等の血算への影響はほとんど無かった。一方ワクチン接種に続くウイルス感染ではワクチン接種群において早期に好中球数の増加が認められた。ワクチン接種による増悪は認められなかった。

E. 結論

合成 RNA アジュバント併用経鼻接種ワクチンの接種により末梢血の血算への影響はほとんどなく、ワクチン接種による攻撃感染後の病態の増悪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, 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.

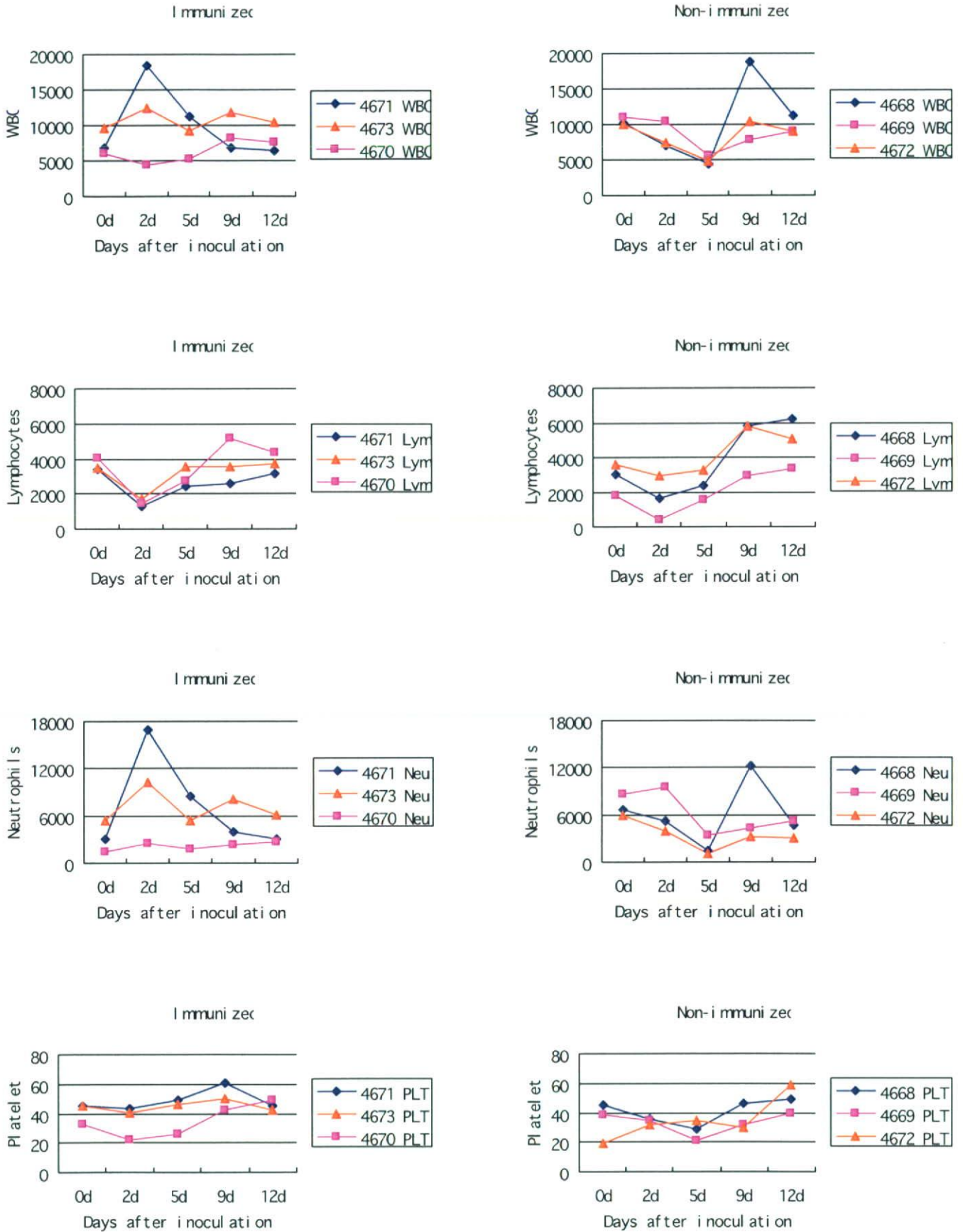
2. 実用新案登録
なし

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



粘膜投与等の新投与経路ワクチン研究における品質管理に関する研究
粘膜ワクチンの品質管理に必要な免疫学的試験法の開発

分担研究者 横田 恭子 国立感染症研究所・免疫部・第一室長

研究要旨 H5N1 ワクチン株(NIBRG-14)のHAに反応するモノクローナル抗体を樹立し、Clade 1 及び Clade 2 を同時に検出できる(2C2 系)サンドイッチエライザ測定系の感度を高めるために抗体の組み合わせを検討した。最も感度が高い組み合わせにおいてエライザ測定を標準化するため、NIBRG-14 の濃度と rec HA の濃度の対比を行った。

A. 研究目的

粘膜に投与する新型インフルエンザワクチンの品質管理に有用な免疫学的試験法を確立する。

B. 材料と方法

1. ハイブリドーマの培養とモノクローナル抗体の精製

抗 HA 抗体を産生するハイブリドーマを無血清培地(GIBCO-Invitrogen)に馴化増殖させ、その培養上清に産生するモノクローナル抗体をプロテイン A アフィニティーカラムで精製した。2D3 以外の 5 つは H5HA を認識し、その他の HA には反応しないことを昨年度報告した。これらのモノクローナル抗体は国立感染症研究所免疫部

2. 抗原検出エライザ

2次抗体(OM-b)を1 μ g/mlの濃度で用いる条件は一定にし、1次抗体として1A1, 2C2, OM-a, OM-cを単独あるいは組合わせて様々な濃度に調整し、エライザプレート(Nunc:Maxisorp)に一晩反応させた。翌日1%BSA/PBS-0.05%Tweenで室温1時間ブロッキングした後、洗浄して抗原を段階希釈して加え、室温で2時間反応させ、ついでビオチン化した2次抗体(OM-b)を加えて室温1時間反応させた。最後にHRP標識Streptoavidin(1:2000)を加えて洗浄し、TMB(+)基質を加え、エライザリーダーのOD₄₅₀で検出した。

C. 研究結果

各モノクローナル抗体の濃度を検討した結果、2C2とOM-aをそれぞれ2mg/mlにPBSで混合したものを1次抗体とした時に最もシグナルが強かった。そこでNIBRG(Vietnam H5HA), Indonesia(H5HA)の不活性化ウイルス粒子抗原と濃度の明らかなバキュロ組換えHA蛋白(免疫部・高橋宜聖主任研究官作製)の検出を行った。図1に示す

ように、バキュロ組換えHA蛋白にして100ng/mlがこのエライザ系の検出限界であることが明らかとなった。ウイルス全粒子の場合、その蛋白濃度を正確に測定することはできないが、ベトナム株で50ng/ml以下、インドネシア株で20ng/ml以下の抗原が測定可能であった。この感度を更に高めることが可能かどうか、マイクロビーズの系や特殊な蛋白吸着繊維を使用する系での検討を進めている。

D. 考察

確立されたエライザシステムは感度としてはまだ不十分であり、さらに改良する必要がある。今年度の検討では、精製したHA蛋白よりもウイルス粒子の方が高感度に検出されることが示唆された。我々の作製した抗体はUV不活化したウイルス粒子を免疫原として用いたネズミ脾臓細胞から樹立したもので、特に一次抗体として用いた2C2はウイルスの立体構造を認識しているらしいことが分かっている。従って、ウイルス粒子全体に対する反応がHA蛋白のみと比べて強い可能性は十分考えられる。この系は感度を高めることにより、ワクチンの品質管理だけでなく、臨床現場での感染者の簡易鑑別診断にも応用できることが期待される。

E. 結論

我々はH5型HA特異的なモノクローナル抗体を組み合わせることでクレード特異的なH5HAあるいは全てのクレードH5HAを検出するサンドイッチエライザシステムを確立し、不活化ウイルス前粒子と組換えHA蛋白の検出感度を比較した。我々の抗体の組み合わせでは、精製した組換えHA蛋白よりもウイルス粒子の方が高感度に検出されることが示唆された。このエライザ系の感度を

更に高めることにより、新型インフルエンザワクチンの品質管理にも役立てることは可能であろう。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamamoto, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Mitsuki, Y-Y, Mizukoshi, F., Terahara, K., Inagaki, Y., Yamamoto, N., Kobayashi, K. and Inoue, J-I.: Selective transmission of R5 HIV-1 over X4 HIV-1 at the dendritic cell-T cell infectious synapse is determined by the T cell activation state. **PLoS Path.** 5:e1000279, 2009
 - 2) Mizukoshi, F., Yamamoto, T., Mitsuki, Y-y., Terahara, K., Kawana-Tachikawa, A., Kobayashi, K., Iwamoto, A., Morikawa, Y., and Tsunetsugu-Yokota, Y.: Activation of HIV-1 Gag-specific CD8⁺ T cells by yeast-derived VLP-pulsed dendritic cells is influenced by the level of mannose on the VLP antigen. **Microbes Infect.** 11:191-197, 2009
 - 3) Ishii, K., Hasegawa, H., Nagata, N., Fukushi, Y., Taguchi, F. and Tsunetsugu-Yokota, Y.: Neutralizing antibody against SARS-CoV spike is highly effective for the protection of mice in the murine SARS model. **Microbiol. Immunol.** in press, 2009
 - 4) Mitsuki, Y-Y, Ohnishi, K., Oshima, M., Yamamoto, T., Mizukoshi, F., Kobayashi, K., Yamamoto, N., Yamaoka, S., and Tsunetsugu-Yokota, Y.: Amino acids in the S1 and S2 spike protein domains determines the neutralization escape phenotype of SARS-CoV. **Microbes Infect.** 10:908-915, 2008
 - 5) Yamamoto, T and Tsunetsugu-Yokota, Y.: Prospects for the therapeutic application of lentivirus-mediated gene therapy to HIV-1 infection. **Curr Gene Ther.** 8:1-8, 2008
- ### 2. 学会発表
- 1) Ami, Y., Ishii, K., Tsunetsugu-Yokota, Y., Nagata, N., Hasegawa, H. and Taguchi, F.: Fatal exacerbated pneumonia of mice induced by co-infection of respiratory bacterium and SARS-CoV, XIth International Symposium on Nidoviruses, Oxford, UK, June 22-27, 2008
 - 2) Ishii, K., Hasegawa, H., Nagata, N., Ami, Y., Fukushi, S., Taguchi, F. and Tsunetsugu-Yokota, Y.: SARS-CoV Spike-reactive neutralizing

antibody is highly effective for the protection of mice in the murine SARS model, XIth International Symposium on Nidoviruses, Oxford, UK, June 22-27, 2008

- 3) Yamamoto, T., Iwamoto, N., Yamamoto, H., Tsukamoto, T., Kuwano, T., Takeda, A., Kawada, M., Tsunetsugu-Yokota, Y. and Matano, T.: SIV-specific functional T-cell induction after passive neutralizing antibody immunization postinfection. The 8th Awaji International Forum of Infection and Immunity, September 7-11, 2008
- 4) Terahara, K., Mizukoshi, F., Yamamoto, T., Mitsuki, Y-Y, Tsuchiya, T., Kobayashi, K. and Tsunetsugu-Yokota, Y.: HIV-1 Nef dysregulates the innate immune function of macrophages, The 8th Awaji International Forum of Infection and Immunity, September 7-11, 2008
- 5) Mitsuki, Y-Y, Yamamoto, T., Tsunetsugu-Yokota, Y.: Selective transmission of R5 HIV-1 over X4 HIV-1 at the dendritic cell? T cell infectious synapse is determined by the T cell activation state. The 9th Seminar in Kumamoto, Kumamoto, September 16-17, 2008
- 6) 山本拓也、光木裕也、水越文徳、寺原和孝、稲垣好雄、山本直樹、横田（恒次）恭子：樹状細胞の抗原提示に伴う感染シナプスを介した R5 型 HIV-1 選択的伝播機構の解析。第 56 回ウイルス学会、岡山、平成 20 年 10 月
- 7) 水越文徳、山本拓也、光木裕也、寺原和孝、小林和夫、横田（恒次）恭子:Nef 蛋白質発現に伴うマクロファージの自然免疫機能異常に関する解析。第 22 回日本エイズ学会、大阪、平成 20 年 11 月。山本拓也、光木裕也、水越文徳、寺原和孝、稲垣好雄、山本直樹、横田（恒次）恭子：樹状細胞の抗原提示に伴う感染シナプスを介した R5 型 HIV-1 選択的伝播機構の解析。第 56 回ウイルス学会、岡山、平成 20 年 10 月
- 8) 水越文徳、山本拓也、光木裕也、寺原和孝、小林和夫、横田（恒次）恭子:Nef 蛋白質発現に伴うマクロファージの自然免疫機能異常に関する解析。第 22 回日本エイズ学会、大阪、平成 20 年 11 月。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

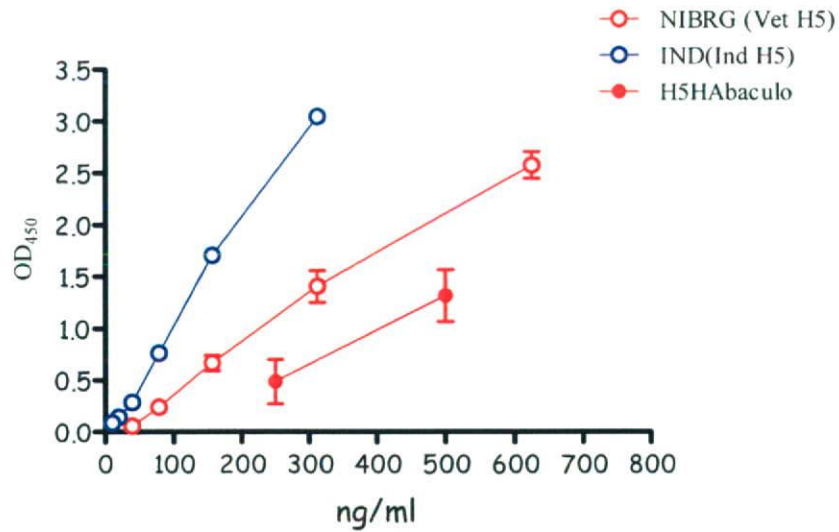


図1 H5N1のエライザ検出感度

H5HAを認識する2のモノクローナル抗体（1A1と2C2）を最終濃度2 μg/mlになるようにPBSに溶解して一次抗体として用い、biotin化OM-bを二次抗体とするサンドイッチエライザを行った。抗原としてホルマリン不活化したベトナム(NIBRG)及びインドネシア(IND)由来ウイルス全粒子抗原と、精製したバキュロ組換えHA蛋白を段階希釈して用い、TMB(+)で発色させて吸光度(OD450)を測定した。

粘膜投与等の新投与経路ワクチン研究における品質管理に関する研究

分担研究者 笠井道之 国立感染症研究所血液・安全性研究部 主任研究官

研究要旨：経鼻投与型インフルエンザワクチンは不活化全粒子型インフルエンザウイルスにTLRリガンド（合成二重鎖RNA）をアジュバントとして加え、すでに認可された新型インフルエンザワクチンよりも免疫原性を高めた製剤である。従って、そのワクチンの免疫原性評価は、たん白質定量法によるインフルエンザウイルスたん白質抗原の量および一次放射免疫拡散法によるHA抗原量についての評価に加え、ヒト培養細胞系で主成分の不活化型全粒子インフルエンザウイルスのたん白質、脂質及び核酸に由来する免疫誘導能力とアジュバントであるTLRリガンドに由来する免疫誘導能力についての評価を行う必要がある。そこで、これらに由来する免疫誘導能力を評価することを目的として、転写因子（NF- κ B）の下流にレポーター遺伝子（SEAP: secreted embryonic alkaline phosphatase）を組み込んだヒト由来モノサイト細胞株（THP細胞）を用いて不活化型全粒子インフルエンザウイルスとTLRリガンドにおける免疫誘導能力の評価をおこなった。THP細胞をマクロファージ細胞に分化させた後、不活化型全粒子インフルエンザウイルスやTLRリガンドでその細胞に誘導されるNF- κ B活性発現を指標にした免疫誘導能力の評価系を構築することができた。この評価系により不活化型全粒子インフルエンザワクチンの免疫原性評価をより精緻に管理することが可能である。

A. 研究目的：粘膜投与等の新投与経路型のワクチンである経鼻投与型インフルエンザワクチンは不活化全粒子型インフルエンザウイルスにTLRリガンド（合成二重鎖RNA）をアジュバントとして加え、抗原提示細胞における抗原提示能力やタイプIインターフェロン産生能力などの免疫誘導能力を高めた製剤である。従って、これまで以上に精緻な免疫原性（免疫抗原の質・量および免疫誘導能力）に関する評価と管理が求められる。しかしながら、人に投与した場合におけるこのワクチンの有する免疫原性の評価は、現在のところたん白質定量法によるインフルエンザウイルスたん白質抗原の量と一次放射免疫拡散法によるHA抗原量の評価のみであり、不活化型全粒子インフルエンザウイルスのたん白質、脂質及び核酸に由来する免疫誘導能力とTLRリガンドに由来する免疫誘導能力についての評価は未だ不十分である。そこで、ヒト培養細胞に対する不活化型全粒子

インフルエンザウイルス由来の免疫誘導能力と様々なTLRリガンドの免疫誘導能力を評価することを目的として、転写因子（NF- κ B）の下流にレポーター遺伝子（SEAP: secreted embryonic alkaline phosphatase）を組み込んだヒト由来モノサイト（THP細胞）細胞株を用いて不活化型全粒子インフルエンザウイルスの免疫誘導能力とTLRリガンドの免疫誘導能力を評価した。

B. 研究方法：転写因子NF- κ Bの下流にレポーター遺伝子を組み込んだヒト由来モノサイト（THP-Blue-CD14）はinvivogenより購入し、manufacture's protocolに従い培養した。この細胞はTLR 2, 4, 6, 7, 8, 9とCD14を強く発現する。培養液中にPMAを加えることによりマクロファージ様細胞へと分化し、TLRに対する感受性が高まる。さらに、転写因子NF- κ B下流にレポーター遺伝子、SEAP

をコードするレポーター遺伝子を組み込んである。NF-κB転写因子の活性化に伴い培養上清中に分泌されるSEAP活性を測定することにより、TLRからのシグナル伝達によるNF-κB転写因子の活性化の度合いを調べることが可能である。

1 mg/mLのH1N1インフルエンザウイルス、H3N2インフルエンザウイルスおよびB型インフルエンザウイルスを4℃で0.5%ホルムアルデヒドを様々な処理時間で反応させることにより、不活化処理時間の異なる不活化型全粒子インフルエンザウイルスを作製し、実験に用いた。不活化型全粒子インフルエンザウイルスの粒子性については、光散乱装置を用いて確認すると同時にその粒径を測定した。

(倫理面への配慮) 特になし。

C. 研究結果：THP-Blue-CD14細胞をPMA処理した後、マクロファージ化へと分化させ（以下PMA-Macと略す）、様々な濃度のTLRリガンドと24時間共培養後、NF-κB活性を調べた。

PMA-Macは

0.078~10 μ g/mLの Pam3CSK4 (TLR1/2)、
7.8 $\times 10^6$ ~2 $\times 10^8$ /mLの HKLM (TLR2)、
0.16~1000ng/mLの LPS (TLR4)、
0.16~10 μ g/mLの FSL-1 (TLR2/6)、
0.78~50 μ g/mLの ssRNA40 (TLR8) の各TLRリガンドに反応し、それらリガンドの濃度に依存したNF-κB活性を示したが（図1）、polyI:C (TLR3)、CLO87 (TLR7)、ODN2006 (TLR9) のTLRリガンドに対してはNF-κB活性を示さなかった。

以上のTLRリガンド感受性を有するPMA-Macに不活化程度の異なる H3N2インフルエンザウイルスまたはB型インフルエンザウイルスを様々なたん白質濃度で加えて共培養した後、NF-κB活性を調べ、次の結果を得た。

1. 培養液中のホルムアルデヒド濃度は0.0078%以下でないとPMA-MacはNF-κB活性を示さない（図2,3）。
2. 培養液に加えたH3N2インフルエンザウイルス

およびB型インフルエンザウイルスのたん白質濃度の増加に依存してPMA-MacのNF-κB活性は上昇する（図2,3）。このときの培養上清中にはIL-1 β を検出した。

3. 培養液に加えたH3N2インフルエンザウイルスおよびB型インフルエンザウイルスは共に不活化期間の長さに応じてPMA-MacのNF-κB活性の低下を示す。この活性低下の度合いは、B型よりもH3N2の場合の方が大きかった（図2,3）。また、不活化期間が3ヶ月以上の場合、両者のウイルスはPMA-MacのNF-κB活性を誘導できなかった。

4. インフルエンザHAワクチンおよび新型インフルエンザワクチンについても免疫誘導能力を調べた。インフルエンザHAワクチンは全くPMA-MacのNF-κB活性を誘導できなかった。一方、新型インフルエンザワクチンはたん白質濃度依存的にPMA-MacのNF-κB活性を誘導したが、その大きさは、55日間不活化したH3N2インフルエンザウイルスと同程度であった（図4）。

D. 考察：

1. 培養液にPam3CSK4 (TLR1/2)、HKLM (TLR2)、LPS (TLR4)、FSL-1 (TLR2/6)、ssRNA (TLR8) の各TLRリガンドを加えた場合、PMA-MacはNF-κB活性を示した。一方、polyI:C (TLR3)、CLO87 (TLR7)、ODN2006 (TLR9) のTLRリガンドの場合はいずれもNF-κB活性を示さなかった。これらのTLRはいずれも細胞内にエンドソーム発現し、その場でTLRリガンドと結合する。従って、培養条件の検討などで、抗原取り込み、TLR発現量の増強などを図り、特にTLR3リガンドであるpolyI:Cに対する反応性を改善したい。

2. PMA-Macは培養液中のホルムアルデヒド濃度が0.0078%より高い濃度でも死滅することはないが、0.0078%以下の濃度でないとNF-κB活性を示さない。このことから、不活化全粒子インフルエンザウイルスはPMA-Mac細胞膜上のTLRを刺激するのに加えて、不活化全粒子インフルエンザウイルス自体を取り込むなどの動的刺激がPMA-MacのNF-κB活性発現に必要と考えられた。

3. H3N2インフルエンザウイルスおよびB型インフルエンザウイルスは共にホルムアルデヒドの処理時間の長さに応じてPMA-MacのNF- κ B活性の低下を示し、3ヶ月を経過すると完全にNF- κ B活性誘導能力を失う。しかし、アルミアジュバントを加えてある新型インフルエンザワクチンはNF- κ B活性を示すこと、ホルムアルデヒドされたウイルスたん白質の量的な変化はないと考えられることから、免疫原性の高いワクチン実現のためには、免疫誘導能力の高いアジュバントを選択し、これを用いる必要があると考えられる。

E. 結論: 不活化型全粒子インフルエンザウイルスによるマクロファージ様細胞のNF- κ B活性誘導を指標にして、TLRリガンドおよび不活化全粒子型インフルエンザウイルスの免疫誘導能力の評価系を構築することができた。この評価系は、TLRリガンドの選択とその容量の管理において、また、インフルエンザウイルスの不活性化プロセスとその免疫誘導能力の管理において有用である。

今後、抗原提示細胞の転写因子活性を測定することにより次のようなより高次な免疫原性の管理が出来ると考えられる。

1. 抗原提示細胞の転写因子活性を指標にしたその不活化全粒子型インフルエンザウイルス取り込み・分解・提示プロセスの解析とTLRリガンドの検索
2. 不活化全粒子型インフルエンザウイルスにおけるTLRリガンド様分子の生化学的分離・解析。
3. 不活化全粒子型インフルエンザウイルスから分離される核酸成分を用いたTLRリガンド様分子のクローニング。
4. 転写因子 (NF- κ B) の下流にレポーター遺伝子を組み込んだマウスを用いた不活化全粒子型インフルエンザウイルスの体内動態とアジュバントの効果の検証。特に、接種部位から下流リンパ節への移行過程とそれに関するアジュバント効果の解析。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表: 第38回 日本免疫学会総会・学術集会 2008年12月

H. 知的財産権の出願・登録状況 特になし。

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他