

200918037A

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

**将来出現が予想される新型インフルエンザに即応できる
次世代ワクチンの臨床応用に向けた研究**

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山西 弘一

平成22(2010)年3月

目 次

I. 総括研究報告

将来出現が予想される新型インフルエンザに即応できる次世代ワクチンの
臨床応用に向けた研究

山西 弘一 1

II. 分担研究報告

1. ウイルスライブラリーを活用した種ウイルス株の作製

喜田 宏 11

2. インフルエンザウイルス抗原の解析

河岡 義裕 15

3. 経鼻インフルエンザワクチンのアジュバント作用に関する研究

長谷川 秀樹 17

4. CTL 及び抗体誘導型インフルエンザワクチンの開発

内田 哲也 23

5. インフルエンザウイルス感染症に対するヘルパー T 細胞 (Th) の機能に関する研究

保富 康宏 28

6. インフルエンザ不活性化全粒子ワクチンの経鼻接種による交叉防御効果誘導の検討

岡本 成史 34

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 37

【参考資料】 45

将来出現が予想される新型インフルエンザに即応できる次世代ワクチンの 臨床応用に向けた研究

研究代表者： 山西 弘一（独立行政法人医薬基盤研究所・理事長兼研究所長）

【研究要旨】

昨年発生した新たなウイルス株によるインフルエンザ A (H1N1) が当初想定されていた H5N1 の型とは異なったように、今後とも新たに発生するインフルエンザの型を予測することは困難である。そのため、将来どのようなインフルエンザが出現しても直ちに対応できる次世代ワクチンを開発することは、極めて重要な国家的課題である。そこで我々は、世界で初めて整備されたインフルエンザ A ウイルスの全種類のライブラリーを利用した種ウイルスの保存方法ならび、それらの種ウイルスを利用したワクチン作製、接種方法を確立し、将来どのようなインフルエンザが出現しても直ちに対応できる次世代ワクチンの作成を目指す。本年度は、インフルエンザウイルスライブラリーに保存されている各ウイルス株の増殖性について比較、検討を行うと共に、培養細胞を用いた効率よく増殖するワクチンシードウイルスの作製、インフルエンザヘマグルチニンワクチンと新規アジュバントの併用、あるいは不活化全粒子ワクチンの経鼻接種によるウイルス交叉防御効果の誘導の各可能性について検討を行った。また、インフルエンザウイルスの生体内での抑制にはヘルパー I 型 T 細胞が重要であることを見出した。

研究分担者

- 喜田 宏（北海道大学大学院・獣医学研究科・教授）
（北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・センター長）
- 河岡 義裕（東京大学・医科学研究所・教授）
- 長谷川秀樹（国立感染症研究所・インフルエンザウイルス研究センター・室長）
- 内田 哲也（国立感染症研究所・血液安全性研究部・室長）
- 保富 康宏（（独）医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター・センター長）
- 岡本 成史（（独）医薬基盤研究所・感染制御プロジェクト・サブプロジェクトリーダー）

A. 研究目的

昨年4月に発生した新型インフルエンザ（インフルエンザ A (H1N1)）は、日本を含む世界各地で流行・感染が拡大し、WHOも6月には警戒レベルをフェーズ6（世界的大流行）に引き上げるなど、社会に多大な影響を与えている。今回のインフルエンザ A (H1N1) は当初想定されていた H5N1 の型とは異なったように、今後とも新たに発生するインフルエンザの型を予測することは困難である。そのため、将来どのようなインフルエンザが出現しても直ちに対応できる次世代ワクチンを開発することは、極めて重要な国家的な課題である。

最近、喜田らは世界で初めてインフルエンザ A ウイルスの全種類のライブラリーを整備し公開していることから、このウイルスライブラリーを用いて新たなインフルエンザに備えるためのワクチンシードを作製、保存することが上記課題を解決しうる有力な方法であると考えられる。そこで本研究では、

- ① インフルエンザウイルスライブラリーを用いた種ウイルス株の製造と保存方法の確立
- ② 試作ワクチンの開発とその抗ウイルス感染防御効果の検討
- ③ 霊長類を用いた試作ワクチンの有効性、安全性、安定性の評価及び前臨床試験の実施

を行い、将来どのようなインフルエンザが出現しても直ちに対応できる次世代ワクチンを作成する方法論を確立することを目的とする。

B. 研究方法

本研究は、主任研究者山西、分担研究者6名（喜田、河岡、長谷川、内田、保富、岡本）の計7名が遂行した。当該年度においては、インフルエンザウイルスライブラリーを用いたワクチン用種ウイルスの作製方法の検討、培養細胞による種ウイルスの増殖方法の検討、交叉防御効果を誘導するワクチンの接種方法およびその方法に適したワクチンならびにアジュバントの開発、リポソ-

ムを利用した体液性および細胞性の双方の免疫応答を誘導する新規ワクチンの検討、インフルエンザ抵抗性の免疫応答に関する解析にわけて遂行された。

（倫理面への配慮）

動物実験の倫理面においては、動物愛護と動物福祉の観点から十分な配慮をする。国が定める各種の関連法律および各研究機関が制定する動物実験指針を遵守する。また、個々の動物実験については各研究機関の動物実験委員会において審査し、承認を得た上で行う。

C. 研究結果

1. インフルエンザワクチン作製に用いる種ウイルス株作製方法の確立

これまでにウイルス株ライブラリーに保存されている、ヒト、豚および野生水禽より分離された計16株のH1N1ウイルスの遺伝子および発育鶏卵における増殖性を比較した。保存されている豚インフルエンザウイルスと豚由来パンデミックウイルスのHA遺伝子は近縁であった。さらに、その保存している株を用いて試製した不活化全粒子ワクチンがH1N1パンデミックインフルエンザのワクチン製造株として有用であることを明らかにした。

2. インフルエンザウイルスの Vero 細胞への馴化

Vero 細胞で効率よく増殖するワクチンシードウイルスを作製するための基盤研究として、増殖性を決定する因子を探索した。PR8(UW) 株を Vero 細胞で12回継代し馴化させ、分子機構を解析したところ、順化HAは野生型HAに比べ、より中性に近いpHで細胞融合能を発現することがわかった。さらに、この差はHAの1アミノ酸の変異によることが明らかになった。

3. 有効な粘膜免疫用アジュバントの検索

経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンに用いる粘膜アジュバントの効果を増強する方法を探索し、ポリガンマグルタミン酸ナノ粒子が有

効な粘膜アジュバントになること、TLR-3のリガンドである二本鎖RNAとC型レクチンであるdectin-1のリガンドであるZymosanを併用する事により既存のアジュバントより飛躍的にその効果が増強される事が明らかとなった。

4. リポソームを用いた新規ワクチンの構築

リポソーム表面に細胞傷害性T細胞(CTL)エピトープを化学結合することにより抗原特異的CTLを誘導することが出来る事が確認されているが、同一のリポソームに抗体エピトープを結合することにより、単一の免疫によって細胞性免疫(CTL)および液性免疫(抗体産生)を誘導することが可能であることを見出した。

5. Tヘルパー(Th)反応制御における生存率の変化と免疫応答

DNAワクチンによるTh反応の操作を行ったマウスにおいて種々の濃度のインフルエンザウイルス株A/PR/8/34を気管内攻撃接種したところ、IL-4投与(Th2誘導)において生存率は低下し、逆にIL-4DM投与(Th1誘導)においては生存率が改善された。

6. インフルエンザ不活化全粒子ワクチンの経鼻接種による交叉防御効果

A/Solomon Islands/3/2006株由来の不活化全粒子ワクチンをマウスに経鼻接種し、その後致死量のA/PR/8/34株を感染させ、マウスの生存率の変化を検討したところ、全例感染死を免れた。また、全粒子ワクチンを経鼻免疫したマウスの肺および鼻洗浄液中から交叉反応性のIgA抗体が検出された。

D. 考察

将来どのようなインフルエンザが出現しても直ちに対応できる次世代ワクチンを作成する方法論を確立するためには、1. 出現するインフルエンザウイルスに遺伝学的にほぼ同じであるワクチンシードを保存する、2. いかなる状況でも迅速にワクチン製造ができるために鶏卵に

頼らない、細胞培養によるウイルス増殖方法を確立する、3. ワクチン効果をより確実にするために交叉防御効果を誘導する免疫方法を確立する、が必要であると思われる。本研究では、次世代インフルエンザワクチンを作成するための基盤として、上記3点に対する方法論を確立することを目的とする。

本年度は、以下の成果を得ることができた。

(1) インフルエンザウイルスライブラリーからヒト、豚および野生水禽より分離された計16株のH1N1ウイルスを培養し、その遺伝学的解析を行ったところ、豚由来の株のHAが昨年流行したH1N1型インフルエンザウイルスのそれと近縁であることを見出した。

(2) Vero細胞で効率よく増殖するために必要なアミノ酸変異をHAに同定した。そしてその変異がHAの細胞融合性状の変化によることを明らかにした。この結果は、季節性ワクチンの製造効率向上に有用である。

(3) 合成二本鎖RNA Poly(I:C)と酵母細胞壁成分Zymosanを併用することによって、分泌型IgAの産生が相乗的に増強され、ウイルスの感染を完全に阻止された。このことは、自然免疫系の細胞を活性化する物質の併用がより効果の高い粘膜アジュバント活性になり得る可能性を示すものである。

(4) リポソーム表面に細胞傷害性T細胞(CTL)エピトープと抗体エピトープを結合することにより、単一の免疫で体液性、細胞性の双方の免疫応答を誘導した。

(5) インフルエンザウイルス感染症における感染抵抗性は、Th1反応により増強され、Th2反応により抑制された。このことは、インフルエンザ感染における抵抗性の発現には細胞性免疫が重要であることを示すものである。さらにワクチン投与においても免疫反応はThに制御されることから、インフルエンザワクチンにおいてもTh1に誘導することが重要であることが考えられる。

(6) インフルエンザ全粒子ワクチンの経鼻接種により、アジュバントを併用することなく有効な交叉防御効果を示した。現在、臨床では安全性などの問題からアルミニウム製剤によるアジュバント以外にアジュバントの使用は認められておらず、今後も新規に開発したアジュバントが早急に認可され、臨床で使用する可能性は極めて低いと思われる。その点で、粘膜アジュバントを必要とせず交叉防御効果を誘導するインフルエンザ不活化全粒子ワクチンは、より臨床応用しやすい適当な接種方法であることが考えられる。

本年度の成果は、今後以下のように活用できると思われる。

(1) インフルエンザライブラリーを用いたワクチンシードの作成と保存

(2) 培養細胞を利用したワクチン用ウイルスの安定的な増殖方法の検討およびワクチン製造への応用

(3) 新たな粘膜アジュバントの活用による交叉防御効果を有するインフルエンザHAワクチンの経鼻接種方法の実用化への応用

(4) 交叉防御効果を誘導するインフルエンザ不活化全粒子ワクチンの経鼻接種方法の実用化への応用

(5) リポソームを利用した体液性および細胞性免疫応答双方を増強させるより効果的なインフルエンザワクチン実用化への応用

(6) インフルエンザウイルス感染に対する防御効果誘導における細胞性免疫応答の重要性と、ワクチン開発への利用

以上の成果を確立させ、組み合わせていくことで、我々の目指す次世代ワクチンを作成する方法を確立できる可能性が期待できる。

E. 結論

本年度の研究によって、将来どのようなイン

フルエンザが出現しても直ちに対応できる次世代ワクチンを作成する方法を作出するための研究の方向性が定まった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Okamoto, S., Matsuura, M., Akagi, T., Akashi, M., Tanimoto, T., Ishikawa, T., Takahashi, M., Yamanishi, K., Mori, Y. Poly(γ -glutamic acid) nano-particles combined with mucosal influenza virus hemagglutinin vaccine protects against influenza virus infection in mice. *Vaccine* 27(42):5896-5905, 2009.
2. Itoh, Y., Ozaki, H., Ishigaki, H., Sakoda, Y., Nagata, T., Soda, K., Isoda N., Miyake, T., Ishida, H., Okamoto, K., Nakayama, M., Tsuchiya, H., Torii, R., Kida, H., and Ogasawara, K. (2010). Subcutaneous inoculation of a whole virus particle vaccine prepared from a non-pathogenic virus library induces protective immunity against H7N7 highly pathogenic avian influenza virus in cynomolgus macaques. *Vaccine* 28, 780-789.
3. Itoh, Y., Shinya, K., Kiso, M., Watanabe, T., Sakoda, Y., Hatta, M., Muramoto, Y., Tamura, D., Sakai-Tagawa, Y., Noda, T., Sakabe, S., Imai, M., Hatta, Y., Watanabe, S., Li, C., Yamada, S., Fujii, K., Murakami, S., Imai, H., Kakugawa, S., Ito, M., Takano, R., Iwatsuki-Horimoto, K., Shimojima, M., Horimoto, T., Goto, H., Takahashi, K., Makino, A., Ishigaki, H., Nakayama, M.,

- Okamatsu, M., Warshauer, D., Shult, P. A., Saito, R., Suzuki, H., Furuta, Y., Yamashita, M., Mitamura, K., Nakano, K., Nakamura, M., Brockman-Schneider, R., Mitamura, H., Yamazaki, M., Sugaya, N., Suresh, M., Ozawa, M., Neumann, G., Gern, J., Kida, H., Ogasawara, K., and Kawaoka, Y. (2009). In vitro and in vivo characterization of new sine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature* 460, 1021-1025.
4. Kashima, Y., Ikeda, M., Itoh, Y., Sakoda, Y., Nagata, T., Miyake, T., Soda, K., Ozaki, H., Nakayama, M., Shibuya, H., Okamatsu, M., Ishigaki, H., Ishida, H., Sawai, T., Kawaoka, Y., Kida, H., and Ogasawara, K. (2009). Intranasal administration of alive non-pathogenic avian H5N1 influenza virus from a virus library confers protective immunity against H5N1 highly pathogenic avian influenza virus infection in mice: Comparison of formulations and administration routes of vaccines. *Vaccine* 27, 7402-7408.
 5. Manzoor, R., Sakoda, Y., Nomura, N., Tsuda, Y., Ozaki, H., Okamatsu, M., and Kida, H. (2009). 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.
 6. Miyake, T., Soda, K., Itoh, Y., Sakoda, Y., Ishigaki, H., Nagata, T., Ishida, H., Nakayama, M., Ozaki, H., Tsuchiya, H., Torii, R., Kida, H., and Ogasawara, K. (2009). Amelioration of pneumonia with *Streptococcus pneumoniae* infection by inoculation with a vaccine against highly pathogenic avian influenza virus in a non-human primate mixed infection model. *J Med Primatol* 39, 58-70.
 7. Moritoh, K., Yamauchi, H., Asano, A., Yoshii, K., Kariwa, H., Takashima, I., Isoda, N., Sakoda, Y., Kida, H., Sasaki, N., and Agui, T. (2009). Generation of congenic mouse strains by introducing the virus-resistant genes, Mx1 and Oasl1, of feral mouse-derived inbred strain MSM/Ms into the common strain C57BL/6J. *Jpn J Vet Res* 57, 89-99.
 8. Sasaki, T., Isoda, N., Soda, K., Sakamoto, R., Saijo, K., Hagiwara, J., Kokumai, N., Ohgitali, T., Imamura, T., Sawata, A., Lin, Z., Sakoda, Y., and Kida, H. (2009). Evaluation of the potency, optimal antigen level and lasting immunity of inactivated avian influenza vaccine prepared from H5N1 virus. *Jpn J Vet Res* 56, 189-198.
 9. Sasaki, T., Kokumai, N., Ohgitali, T., Sakamoto, R., Takikawa, N., Lin, Z., Okamatsu, M., Sakoda, Y., and Kida, H. (2009). Long lasting immunity in chickens induced by a single shot of influenza vaccine prepared from inactivated non-pathogenic H5N1 virus particles against challenge with a highly pathogenic avian influenza virus. *Vaccine* 27, 5174-5177.
 10. Simulundu, E., Mweene, A. S., Tomabeche, D., Hang'ombe, B. M., Ishii, A., Suzuki, Y., Nakamura, I., Sawa, H., Sugimoto, C., Ito, K., Kida, H., Saiwana, L., and Takada, A. (2009). Characterization of H3N6 avian influenza

- virus isolated from a wild white pelican in Zambia. *Arch Virol* 154, 1517-1522.
11. Tsuda, Y., Isoda, N., Sakoda, Y., and Kida, H. (2009). Factors responsible for plaque formation of A/duck/Siberia/272/1998 (H13N6) influenza virus on MDCK cells. *Virus Res* 140, 194-198.
 12. Yoshida, R., Igarashi, M., Ozaki, H., Kishida, N., Tomabechi, D., Kida, H., Ito, K., and Takada, A. (2009). Cross-protective potential of a novel monoclonal antibody directed against antigenic site B of the hemagglutinin of influenza A viruses. *PLoS Pathog* 5, e1000350.
 13. Hasegawa H, Ichinohe T, Aina A, Tamura S, Kurata T. Development of an inactivated mucosal vaccine for H5N1 influenza virus. *Ther Clin Risk Manag.* 5(1):125-132., 2009
 14. 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.* 199(11):1629-1637, 2009.
 15. Ichinohe T, Aina A, Tashiro M, Sata T, Hasegawa H. PolyI:polyC12U adjuvant-combined intranasal vaccine protects mice against highly pathogenic H5N1 influenza virus variants. *Vaccine* 27(45):6276-6279, 2009.
 16. Ichinohe T, Aina A, Nakamura T, Akiyama Y, Maeyama J, Odagiri T, Tashiro M, Takahashi H, Sawa H, Tamura S, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H. Induction of cross-protective immunity against influenza A virus H5N1 by intranasal vaccine with extracts of mushroom mycelia. *J Med Virol.* 82:128-137, 2010.
 17. Aina A, Ichinohe T, Tamura S, Kurata T, Sata T, Tashiro M and Hasegawa H. Zymosan enhances the mucosal adjuvant activity of Poly(I:C) in a nasal influenza vaccine. *J Med Virol.* 82(3):476-484, 2010.
 18. Tamura S, Hasegawa H, Kurata T. Estimation of the effective doses of nasal-inactivated influenza vaccine in humans from mouse-model experiments. *Jpn J Infect Dis.* 63(1):8-15, 2010.
 19. Nakajima N, Hata S, Sato Y, Tobiume M, Katano H, Kaneko K, Nagata N, Kataoka M, Aina A, Hasegawa H, Tashiro M, Kuroda M, Odai T, Urasawa N, Ogino T, Hanaoka H, Watanabe M, Sata T. The First Autopsy Case of Pandemic Influenza (A/H1N1pdm) Virus Infection in Japan: Detection of a High Copy Number of the Virus in Type II Alveolar Epithelial Cells by Pathological and Virological Examination. *Jpn J Infect Dis.* 63(1):67-71, 2010.
 20. Takiyama A, Wang L, Tanino M, Kimura T, Kawagishi N, Kunieda Y, Katano H, Nakajima N, Hasegawa H, Takagi T, Nishihara H, Sata T, Tanaka S. Sudden

- Death of a Patient with Pandemic Influenza (A/H1N1pdm) Virus Infection by Acute Respiratory Distress Syndrome. *Jpn J Infect Dis.* 63(1):72-74, 2010.
21. Ohno, S., S. Kohyama, M. Taneichi, O. Moriya, H. Hayashi, H. Oda, M. Mori, A. Kobayashi, T. Akatsuka, T. Uchida, and M. Matsui. Synthetic peptides coupled to the surface of liposomes effectively induce SARS coronavirus-specific cytotoxic T lymphocytes and viral clearance in HLA-A*0201 transgenic mice. *Vaccine* 27:3912-3920, 2009.
 22. Kohyama, S., S. Ohno, T. Suda, M. Taneichi, S. Yokoyama, M. Mori, A. Kobayashi, H. Hayashi, T. Uchida, and M. Matsui. Efficient induction of cytotoxic T lymphocytes specific for severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus by immunization with surface-linked liposomal peptides derived from a non-structural polyprotein 1a. *Antiviral Res.* 84:168-177, 2009.
 23. Matsui, M., S. Kohyama, T. Suda, S. Yokoyama, M. Mori, A. Kobayashi, M. Taneichi, and T. Uchida. A CTL-based liposomal vaccine capable of inducing protection against heterosubtypic influenza viruses in HLA-A*0201 transgenic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391:1494-1499, 2010.
 24. Takagi, A., M. Matsui, S. Ohno, H. Duan, O. Moriya, N. Kobayashi, H. Oda, M. Mori, A. Kobayashi, M. Taneichi, T. Uchida, and T. Akatsuka. Highly efficient anti-viral CD8+ T cell induction by peptides coupled to the surface of liposomes. *Clin. Vaccine Immunol.* 16:1383-1392, 2009.
 25. 内田哲也、種市麻衣子：「インフルエンザと抗原」*メディカル・サイエンス・ダイジェスト* 35,566-567,2009.
 26. 「リポソームを用いた感染症ワクチンの開発」*DDS* 25, 29-36, 2010.
 27. 「季節性及び新型インフルエンザに有効な CTL 誘導型リポソームワクチン」*ファルマシア* 46, 119-123, 2010.
 28. 「新発想のインフルエンザワクチン：細胞性免疫誘導型インフルエンザワクチンの開発」*化学* 64, 26-29, 2010.
 29. Mori, H., Yamanaka, K., Matsuo, K., Yasutomi, Y. and Mizutani, H. Administration of Ag85B showed therapeutic effects to Th2-type cytokine-mediated acute phase atopic dermatitis by inducing regulatory T cells. *Arch Dermatol. Res.* 301:151-157, 2009.
 30. Okabayashi, S., Ohno, C. and Yasutomi, Y. Acute megakaryocytic leukemia (AMKL)-like disease in a Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *J. Comp. Pathol.* 140:212-216, 2009.
 31. Morioka, T., Yamanaka, K., Mori, H., Omoto, Y., Tokime, K., Kakeda, M., Kurokawa, I., Gabazza, E., Tsubura, A., Yasutomi, Y. and Mizutani, H. IL-4/IL-13 antagonist DNA vaccination successfully suppresses Th2 type chronic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* 160:1172-1179, 2009.

32. Takano, J.I., Tachibana, H., Kato, M., Narita, T., Yanagi, T., Yasutomi, Y. and Fujimoto, K. DNA characterization of simian *Entamoeba histolytica*-like strains to differentiate them from *Entamoeba histolytica*. *Parasitol.Res.* 105:929-937, 2009.
33. Yasuhiro Yasutomi. Establishment of specific pathogen-free macaque colonies in Tsukuba Primate Research Center of Japan for AIDS research. *Vaccine* in press
34. Fujimoto,K., Takano,J., Narita,T., Hanari,K., Shimozawa,N., Sankai,T., Yoshida T., Terao,K., Kurata,T. and Yasutomi,Y. Simian Retrovirus type D infection in a colony of cynomolgus monkeys. *Comp.Med.* in press
35. Cueno,M.E., Karamatsu,K., Yasutomi, Y., Laurena,A.C. and Okamoto.T. Preferential expression and immunogenicity of HIV-1 Tat fusion protein expressed in tomato plant. *Transgenic Res.* in press
4. 曾田公輔, 浅倉真吾, 岡松正敏, 迫田義博, 喜田宏 「H9N2 インフルエンザウイルスはニワトリに対する病原性を獲得するか?」 第57回日本ウイルス学会学術集会 (2009年、東京)
5. 野村直樹, 迫田義博, 岡松正敏, 曾田公輔, 喜田宏 「H9 インフルエンザウイルスワクチン候補株選抜のための遺伝子と抗原性解析」 第57回日本ウイルス学会学術集会 (2009年、東京)
6. 栗林沙弥, 田中智久, 迫田義博, 坂部沙織, 磯田典和, 津田祥美, 岡松正敏, 梅村孝司, 喜田宏 「H7 高病原性鳥インフルエンザウイルスのニワトリに対する病原性の解析」 第57回日本ウイルス学会学術集会 (2009年、東京)

G-2. 学会発表

1. 野村直樹, 迫田義博, 岡松正敏, 曾田公輔, 喜田宏 「H9 インフルエンザウイルスワクチン候補株選抜のための遺伝子と抗原性解析」 第13回日本ワクチン学会学術集会 (2009年、札幌)
2. 山本直樹, 遠藤真由美, 迫田義博, 喜田宏 「A/2009 (H1N1) インフルエンザウイルスに対するワクチン候補株の選抜」 岡松正敏, 第57回日本ウイルス学会学術集会 (2009年、東京)
3. 山本直樹, 佐々木崇, 岡松正敏, 迫田義博, 林志鋒, 坂元隆一, 西條加須江, 国米則秀, 喜田宏 「不活化鳥インフルエンザ Vac-1 (H5N1) ワクチンは2008年に野鳥から分離された高病原性鳥インフルエンザウイルスによる鶏の感染発症を予防した」 第57回日本ウイルス学会学術集会 (2009年、東京)
7. 本島昌幸, 岡松正敏, 浅倉真吾, 伊藤美加, 前田友起子, 福田奈穂, R. Sodnomdarjaa, 迫田義博, 喜田宏 「近年流行を起こしている H3N8 馬インフルエンザウイルスの遺伝子と抗原性の解析」 第43回日本ウイルス学会北海道支部会シンポジウム (2009年、帯広)
8. 村上晋, 堀本泰介, 桂廣亮, 下島昌幸, 河岡義裕 「Vero 細胞における高増殖性インフルエンザワクチンシードウイルス開発のための基盤研究」 日本ウイルス学会学術集会, 2009年10月26日、東京
9. 相内章, 一戸猛志, 田村慎一, 倉田毅,

- 佐多徹太郎、長谷川秀樹 「経鼻インフルエンザワクチンにおける Zymosan 添加によるアジュバント活性の亢進」 第 13 回日本ワクチン学会学術集会 2009 年 9 月札幌
10. 長谷川秀樹、相内章、網康至、永田典代、田村慎一、谷本武史、真鍋貞夫、石川豊数、宮崎隆、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剤形と効果検討」 第 13 回日本ワクチン学会学術集会 2009 年 9 月札幌
11. 相内章、伊藤良、岸田典子、小淵正次、高下恵美、小田切孝人、千葉丈、田村慎一、倉田毅、佐多徹太郎、田代真人、長谷川秀樹 「経鼻インフルエンザワクチンの新型インフルエンザウイルスに対する交叉防御能の検討」 第 57 回日本ウイルス学会学術集会 2009 年 10 月東京
12. 岸田典子、小淵正次、高下恵美、徐紅、氏家誠、永田典代、岩田奈緒子、相内章、長谷川秀樹、田代真人、齋藤玲子、鈴木宏、池松秀之、小田切孝人 「季節性インフルエンザワクチンにより誘導される中和抗体の新型インフルエンザウイルスに対する交差反応性および新型インフルエンザウイルスの性状」 第 57 回日本ウイルス学会学術集会 2009 年 10 月東京
13. 長谷川秀樹、相内章、永田典代、岩田奈緒子、網康至、小淵正次、岸田典子、小田切孝人、佐多徹太郎、田代真人 「新型インフルエンザ H1N1 のフェレットにおける病原性の検討」 第 57 回日本ウイルス学会学術集会 2009 年 10 月東京
14. 高山俊輔、須田達也、種市麻衣子、赤塚俊隆、内田哲也、松井政則 「SARS コロナウイルスの polyprotein 1a 由来 HLA-A*0201 拘束性 CTL エピトープの同定と、そのペプチドを結合したリポソームによる細胞傷害性 T 細胞の誘導」 第 13 回日本ワクチン学会 札幌 2009 年 9 月
15. Efficient induction of SARS coronavirus-specific CTLs by immunization with surface-linked liposomal peptides derived from nucleocapsid and a non-structural polyprotein 1a. Shunsuke Kohyama, Tatsuya Suda, Maiko Taneichi, Tetsuya Uchida, and Masanori Matsui 第 39 回日本免疫学会 大阪 2009 年 12 月
16. 岡林佐知、大野智恵子、保富康宏 「実験用カニクイザルに認められた急性巨核芽球性白血病 (AMKL) の一例」 第 147 回日本獣医病理学会、栃木、2009 年 4 月 2 日～4 日
17. 岡林佐知、小野文子、羽成光二、大野智恵子、加藤美代子、保富康宏 「実験用カニクイザルに見られた下垂体腫瘍の一例」 第 56 回日本実験動物学会総会、埼玉県、2009 年 5 月 14 日
18. 松原明弘、高村史記、加藤翔太、保富康宏 「SIVmac239 Env gp120 アスパラギン (N) 結合型糖鎖の宿主免疫応答に対する影響」 第 57 回日本ウイルス学会、東京、2009 年 10 月 25 日～27 日
19. 松原明弘、高村史記、草川茂、武部豊、森一泰、永井美之、保富康宏 「SIVmac239 Env gp120 アスパラギン結合型糖鎖の宿主免疫応答に対する影響」 第 23 回日本エイズ学会、名古屋、2009 年 11 月 26 日～28 日
20. Yusuke TSUJIMURA, Yasuhiro YASUTOMI : Administration of Ag85B

showed therapeutic effects to allergic asthma by inducing Th1 response and Interleukin-17 第38回日本免疫学会、大阪、2009年12月1日～3日

21. Nienke E. van Houten, Yasuhiro Yasutomi, and Masahiro Niikura : Protective Mucosal Immunity against a Model Viral Enteric Infection by a Generic Chimeric Hepatitis E Virus-like Particle Vaccine System. The American Society for Virology 28th Annual Meeting, Vancouver, 2009, July 11-15.
22. Yusuke TSUJIMURA, Yasuhiro YASUTOMI : Administration of Ag85B showed therapeutic effects to allergic asthma by inducing Th1 response and Interleukin-17. 9th International Conference on New trends in Immunosuppression & Immunotherapy 2010. February. 4-6.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 鳥インフルエンザワクチン (国際特許)
出願番号 : PCT/JP2009/70053

出願日 : 2009年11月27日

発明者 : 内田哲也、種市麻衣子 (国立感染研)、松井政則 (埼玉医大)、梶野喜一 (北海道大学)、小田洋 (日油)

2. SARS コロナウイルスの細胞傷害性 T 細胞 エピトープペプチド及びその用途 (国際特許)
出願番号 : PCT/JP2009/70043
出願日 : 2009年11月27日
内田哲也、種市麻衣子 (国立感染研)、松井政則 (埼玉医大)、小田洋 (日油)
3. 鳥インフルエンザウイルスワクチン (国内特許、追加出願)
出願日 : 2009年12月21日
発明者 : 内田哲也、種市麻衣子 (国立感染研)、松井政則 (埼玉医大)、梶野喜一 (北海道大学)、小田洋 (日油)
4. 保富康宏 : パラミクソウイルスベクターを用いた経鼻噴霧型結核ワクチン (特願 2009 - 252218)
5. 保富康宏 : パラインフルエンザ 2 型ウイルスベクター (hPIV2) を用いたアトピー性皮膚炎治療薬 (特願 2009 - 235915)

ウイルスライブラリーを活用した種ウイルス株の作製

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】

動物インフルエンザのサーベイランスにより得られたインフルエンザウイルスのライブラリーから、将来出現が予想されるパンデミックウイルスに対するワクチン候補株を先回りで準備する体制を確立する必要がある。2009年は、日本、モンゴル、ベトナム、香港においてサーベイランスを実施した。採取された家禽、渡りガモおよびハクチョウの材料4,674検体から合計82株のインフルエンザAウイルスを分離同定した。これらのウイルスのHA亜型はH1、H3、H4、H5、H6、H8、H9、H11、H12の9つに、NA亜型はN1、N2、N3、N4、N5、N6、N8、N9の8つに区分された。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保存した。本ウイルスライブラリーから42株のH1亜型ウイルスの遺伝子および抗原性解析、さらに発育鶏卵における増殖性の成績を基に、A/swine/Hokkaido/2/1981（H1N1）をワクチン候補株として選抜した。このウイルスをもとに不活化全粒子ワクチンを試製し、本ワクチンで免疫したマウスをA/Narita/1/2009（H1N1）pdm株で攻撃した。その結果、ワクチン接種による発症防御が認められた。以上より、A/swine/Hokkaido/2/1981（H1N1）が豚由来H1N1亜型ウイルスに対するワクチン候補株として有用であることが証明された。

A. 研究目的

2009年に豚由来H1N1亜型ウイルスが出現しパンデミックを引き起こした。また、アジアから家禽と野鳥に感染が拡大したH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスや家禽だけでなく豚でも感染が拡大しているH9N2亜型ウイルスなどがパンデミックインフルエンザウイルスとして出現することが危惧されている。これまでに出現したパンデミックインフルエンザウイルスは、すべて動物由来インフルエンザウイルスに起因している。よって、パンデミックに備えるために、動物インフルエンザのサーベイランスを実施し、分離されたウ

イルスをワクチン候補株として先回りで保管し、適切なワクチン株を迅速に提供する体制を確立することが必要である。そこで、動物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、マウスやサルに対する免疫原性を評価し、将来出現が予想されるインフルエンザウイルスをワクチン製造用候補株としてライブラリー化することとした。

B. 研究方法

日本、モンゴル、ベトナム、香港において採取した渡りガモ、ハクチョウおよび家禽の糞便

およびぬぐい液からウイルス分離を試みた。分離されたウイルスは、そのHAおよびNAの亜型を同定し、系統保存ウイルス株に追加した。

本年分離したH1亜型ウイルスに加え、当教室で系統保存している42株のH1亜型ウイルスのHA遺伝子の塩基配列を決定し、分子系統解析を行った。さらにH1ウイルスに対する様々な免疫血清を用いて赤血球凝集阻止試験を行い、豚由来H1N1亜型ウイルスの抗原性と似たウイルス株を選抜した。また、これらのウイルスを発育鶏卵に接種し、鶏胚における増殖性と病原性を比較した。得られた成績からワクチン候補株を選抜し、このウイルスをもとに不活化全粒子ワクチンを試製した。試製ワクチンをマウスに接種した後、A/Narita/1/2009 (H1N1) pdmで攻撃し、体重変化と肺から回収されるウイルス感染価を指標にワクチンの発症防御効果を評価した。

C. 研究結果

野鳥と家禽の糞便および気管ぬぐい液4,674検体から82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H1、H3、H4、H5、H6、H8、H9、H11およびH12の9つに、NA亜型はN1、N2、N3、N4、N5、N6、N8およびN9の8つに区分された。これらの分離ウイルスは当研究室のウイルス株ライブラリー (<http://virusdb.czc.hokudai.ac.jp/>) に追加保存された。これにより、自然界から分離された65通りのウイルスに、79通りの実験室内作出株を加え、16のHA亜型と9のNA亜型の組み合わせ144通りすべてをライブラリーに系統保存した。

H1亜型インフルエンザウイルスは、ヒトの季節性インフルエンザウイルス、野生水禽由来の鳥インフルエンザウイルス、豚インフルエンザウイルスの3系統に分類される。2009年に出現したH1N1パンデミックインフルエンザウイルスは豚インフルエンザウイルスと遺伝的、抗原的に近縁であることがわかっている。そこで、当研究室に保管されているH1N1亜型の

インフルエンザウイルス42株から、H1N1パンデミックインフルエンザウイルスと抗原的に近縁で、鶏胚で高い増殖性を示すA/swine/Hokkaido/2/1981(H1N1)をワクチン候補株として選抜した。このウイルス株から不活化全粒子ワクチンを試製し、マウスに免疫した。その後A/Narita/1/2009(H1N1) pdmで攻撃したところ、2.0 μ g以上のタンパク量で免疫したマウスでは、攻撃ウイルスによる体重減少や肺におけるウイルス増殖が有意に抑制され、ワクチンの発症防御効果が確認された。以上の成績から、A/swine/Hokkaido/2/1981(H1N1)株を用いて試製した不活化全粒子ワクチンはH1N1パンデミックインフルエンザのワクチン製造株として有用であ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。またこれらのウイルスから調整した抗原を用いて、現行のエーテルスプリットワクチンよりも有効なワクチン（不活化全粒子ワクチンや粘膜投与型ワクチン）の開発をさらに進めることが求められる。

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が得られる。選抜したワクチン株を用いて抗原を調製し、より安全で有効なワクチンの開発が求められる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Itoh, Y., Ozaki, H., Ishigaki, H., Sakoda, Y., Nagata, T., Soda, K., Isoda N., Miyake, T., Ishida, H., Okamoto, K., Nakayama, M., Tsuchiya, H., Torii, R., Kida, H., and

- Ogasawara, K. (2010). Subcutaneous inoculation of a whole virusparticle vaccine prepared from a non-pathogenic virus library induces protective immunity against H7N7 highly pathogenic avian influenza virus in cynomolgus macaques. *Vaccine* 28, 780-789.
2. Itoh, Y., Shinya, K., Kiso, M., Watanabe, T., Sakoda, Y., Hatta, M., Muramoto, Y., Tamura, D., Sakai-Tagawa, Y., Noda, T., Sakabe, S., Imai, M., Hatta, Y., Watanabe, S., Li, C., Yamada, S., Fujii, K., Murakami, S., Imai, H., Kakugawa, S., Ito, M., Takano, R., Iwatsuki-Horimoto, K., Shimojima, M., Horimoto, T., Goto, H., Takahashi, K., Makino, A., Ishigaki, H., Nakayama, M., Okamatsu, M., Warshauer, D., Shult, P. A., Saito, R., Suzuki, H., Furuta, Y., Yamashita, M., Mitamura, K., Nakano, K., Nakamura, M., Brockman-Schneider, R., Mitamura, H., Yamazaki, M., Sugaya, N., Suresh, M., Ozawa, M., Neumann, G., Gern, J., Kida, H., Ogasawara, K., and Kawaoka, Y. (2009). In vitro and in vivo characterization of new sine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature* 460, 1021-1025.
 3. Kashima, Y., Ikeda, M., Itoh, Y., Sakoda, Y., Nagata, T., Miyake, T., Soda, K., Ozaki, H., Nakayama, M., Shibuya, H., Okamatsu, M., Ishigaki, H., Ishida, H., Sawai, T., Kawaoka, Y., Kida, H., and Ogasawara, K. (2009). Intranasal administration of alive non-pathogenic avian H5N1 influenza virus from a virus library confers protective immunity against H5N1 highly pathogenic avian influenza virus infection in mice: Comparison of formulations and administration routes of vaccines. *Vaccine* 27, 7402-7408.
 4. Manzoor, R., Sakoda, Y., Nomura, N., Tsuda, Y., Ozaki, H., Okamatsu, M., and Kida, H. (2009). 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.
 5. Miyake, T., Soda, K., Itoh, Y., Sakoda, Y., Ishigaki, H., Nagata, T., Ishida, H., Nakayama, M., Ozaki, H., Tsuchiya, H., Torii, R., Kida, H., and Ogasawara, K. (2009). Amelioration of pneumonia with *Streptococcus pneumoniae* infection by inoculation with a vaccine against highly pathogenic avian influenza virus in a non-human primate mixed infection model. *J Med Primatol* 39, 58-70.
 6. Moritoh, K., Yamauchi, H., Asano, A., Yoshii, K., Kariwa, H., Takashima, I., Isoda, N., Sakoda, Y., Kida, H., Sasaki, N., and Agui, T. (2009). Generation of congenic mouse strains by introducing the virus-resistant genes, *Mx1* and *Oasl1b*, of feral mouse-derived inbred strain MSM/Ms into the common strain C57BL/6J. *Jpn J Vet Res* 57, 89-99.
 7. Sasaki, T., Isoda, N., Soda, K., Sakamoto, R., Saijo, K., Hagiwara, J., Kokumai, N., Ohgitani, T., Imamura, T., Sawata, A., Lin, Z., Sakoda, Y., and Kida, H. (2009). Evaluation of the potency, optimal antigen level and lasting immunity of inactivated avian influenza vaccine prepared from H5N1 virus. *Jpn J Vet Res* 56, 189-198.
 8. Sasaki, T., Kokumai, N., Ohgitani, T., Sakamoto, R., Takikawa, N., Lin, Z., Okamatsu, M., Sakoda, Y., and Kida, H.

- (2009). Long lasting immunity in chickens induced by a single shot of influenza vaccine prepared from inactivated non-pathogenic H5N1 virus particles against challenge with a highly pathogenic avian influenza virus. *Vaccine* 27, 5174-5177.
9. Simulundu, E., Mweene, A. S., Tomabeche, D., Hang'ombe, B. M., Ishii, A., Suzuki, Y., Nakamura, I., Sawa, H., Sugimoto, C., Ito, K., Kida, H., Saiwana, L., and Takada, A. (2009). Characterization of H3N6 avian influenza virus isolated from a wild white pelican in Zambia. *Arch Virol* 154, 1517-1522.
 10. Tsuda, Y., Isoda, N., Sakoda, Y., and Kida, H. (2009). Factors responsible for plaque formation of A/duck/Siberia/272/1998 (H13N6) influenza virus on MDCK cells. *Virus Res* 140, 194-198.
 11. Yoshida, R., Igarashi, M., Ozaki, H., Kishida, N., Tomabeche, D., Kida, H., Ito, K., and Takada, A. (2009). Cross-protective potential of a novel monoclonal antibody directed against antigenic site B of the hemagglutinin of influenza A viruses. *PLoS Pathog* 5, e1000350.
2. 学会発表
 1. 「H9 インフルエンザウイルスワクチン候補株選抜のための遺伝子と抗原性解析」野村直樹、迫田義博、岡松正敏、曾田公輔、喜田宏 第13回日本ワクチン学会学術集会 (2009年、札幌)
 2. 「A/2009 (H1N1) インフルエンザウイルスに対するワクチン候補株の選抜」岡松正敏、山本直樹、遠藤真由美、迫田義博、喜田宏 第57回日本ウイルス学会学術集会(2009年、東京)
 3. 「不活化鳥インフルエンザ Vac-1 (H5N1) ワクチンは2008年に野鳥から分離された高病原性鳥インフルエンザウイルスによる鶏の感染発症を予防した」山本直樹、佐々木崇、岡松正敏、迫田義博、林志鋒、坂元隆一、西條加須江、国米則秀、喜田宏 第57回日本ウイルス学会学術集会 (2009年、東京)
 4. 「H9N2 インフルエンザウイルスはニワトリに対する病原性を獲得するか？」曾田公輔、浅倉真吾、岡松正敏、迫田義博、喜田宏 第57回日本ウイルス学会学術集会 (2009年、東京)
 5. 「H9 インフルエンザウイルスワクチン候補株選抜のための遺伝子と抗原性解析」野村直樹、迫田義博、岡松正敏、曾田公輔、喜田宏 第57回日本ウイルス学会学術集会 (2009年、東京)
 6. 「H7 高病原性鳥インフルエンザウイルスのニワトリに対する病原性の解析」栗林沙弥、田中智久、迫田義博、坂部沙織、磯田典和、津田祥美、岡松正敏、梅村孝司、喜田宏 第57回日本ウイルス学会学術集会 (2009年、東京)
 7. 「近年流行を起こしている H3N8 馬インフルエンザウイルスの遺伝子と抗原性の解析」本島昌幸、岡松正敏、浅倉真吾、伊藤美加、前田友起子、福田奈穂、R. Sodnomdarjaa、迫田義博、喜田宏 第43回日本ウイルス学会北海道支部会シンポジウム (2009年、帯広)
- G. 知的財産の出願、登録状況**
 予定なし。

インフルエンザウイルス抗原の解析

研究分担者： 河岡義裕 東京大学 医科学研究所 教授

【研究要旨】

インフルエンザの流行を制御するためには、効率的にインフルエンザワクチンを製造するシステムの確立が必要である。そこで、培養細胞（Vero 細胞）で効率よく増殖するワクチンシードウイルスを作製するための基盤研究として、シードウイルスのドナーとなる A/Puerto Rico/8/34 株を Vero 細胞に馴化させることにより生じる変化を解析し、Vero 細胞におけるウイルス増殖性を決定する因子を解析した。その結果、HA の 1 アミノ酸の変異により増殖能が高くなることが明らかとなった。

A. 研究目的

インフルエンザの制御には、抗ウイルス薬とワクチンが用いられるが、近年のタミフル耐性 H1N1 ウイルスの流行をみても、ワクチンの重要性が認識できる。しかしながら、今回の新型 H1N1 ウイルスに対するワクチン製造でも明らかのように、現在の発育鶏卵を用いたシステムではその製造能力の限界から、我が国の全人口分のワクチンを単年度中に供給することは出来ない。従って、発育鶏卵に加えて、Vero 細胞などの培養細胞を用いたワクチン製造システムの確立が必要である。その際、培養細胞でのワクチンシードウイルスの増殖性が、ワクチン供給量を決定する重要な要素となる。そこで、私たちは Vero 細胞で効率よく増殖するワクチンシードウイルスを作製するための基盤研究として、シードウイルスのドナーとなる A/Puerto Rico/8/34 (PR8; H1N1) 株を Vero 細胞に馴化させることで生じる変化を解析し、Vero 細胞におけるウイルス増殖性を決定する因子を探索した。

B. 研究方法

PR8 (UW) 株を 12 回継代することにより、Vero 細胞に馴化させた。馴化ウイルス (PR8-Vero) の遺伝子変化を親株と比較し、リバーシジェネティクスで変異ウイルスを作製することにより、増殖性を決定する蛋白質をアミノ酸レベルで同定し、その分子機構を解析した。

C. 研究結果

PR8 (UW) は Vero 細胞で、103 PFU/ml 程度しか増殖しなかったのに対して、PR8-Vero は 108 PFU/ml 以上まで増殖した。PR8-Vero のアミノ酸配列を PR8 (UW) と比較したところ、HA、NA、PB2 のそれぞれ一か所ずつが異なっていた。1 アミノ酸置換の変異ウイルスを作製した結果、主に HA の 1 アミノ酸の変異が高増殖性に関与することが分かった。この HA のアミノ酸置換は HA2 領域に存在する。そこで、野生型 HA と変異 HA をそれぞれ Vero 細胞で発現させ、それらの細胞融合能を比較した。その結果、変異 HA

は野生型 HA に比べ、より中性に近い pH で細胞融合能を発現することがわかった。

D. 考察

馴化ウイルスの解析から、HA の細胞融合性状の変化により、ウイルスの Vero 細胞での増殖性が上昇することが示唆された。今後同様な変異を H1N1、H3N2、H5N1 などのワクチンシード様ウイルスの HA に導入し、Vero 細胞における増殖性が変化するかどうかを調べる予定である。

E. 結論

今回、Vero 細胞で効率よく増殖するために必要なアミノ酸変異を同定した。この結果は、季節性ワクチンの創造効率向上に有用である。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

村上晋、堀本泰介、桂廣亮、下島昌幸、河岡義裕「Vero 細胞における高増殖性インフルエンザワクチンシードウイルス開発のための基盤研究」日本ウイルス学会学術集会、2009年10月26日、東京

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

経鼻インフルエンザワクチンのアジュバント作用に関する研究

研究分担者： 長谷川 秀樹（国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター）
研究協力者： 相内 章（国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター）
梁 明秀（横浜市立大学医学部微生物学教室）

【研究要旨】

合成二本鎖 RNA を粘膜アジュバントとしたインフルエンザワクチンの経鼻接種は、インフルエンザウイルスの感染の場となる気道粘膜上に分泌型 IgA 抗体を誘導し、感染自体を阻止する。本研究では、より強い粘膜免疫応答を誘導することを目的とし、粘膜アジュバントとして、合成二本鎖 RNA に対し酵母細胞壁分画 Zymosan 添加の効果を検討した。その結果、合成二本鎖 RNA と Zymosan を併用することで、気道粘膜上に分泌される IgA 抗体量は相乗的に充進し、インフルエンザウイルスの感染を完全に阻止することが明らかとなった。

A. 研究目的

インフルエンザウイルスの自然感染では、気道粘膜領域に分泌型 IgA 抗体に代表される粘膜免疫応答が誘導され、免疫記憶が成立する。粘膜アジュバント添加型インフルエンザワクチンを経鼻的に接種することで、自然感染と同様の免疫応答を誘導し、その後のインフルエンザウイルス感染を防御できることが知られている。これまでの研究により、合成二本鎖 RNA に高い粘膜アジュバント活性があることが示された。本研究では、合成二本鎖 RNA による粘膜アジュバント活性を増強することを目的とし、自然免疫細胞の活性化レセプターの一つである C 型レクチン Dectin-1 に対するリガンドの添加によるアジュバント活性について検討した。

B. 研究方法

材料と方法：

マウス

6～8 週齢、雌の BALB/c マウスを一群 5 匹

で利用した。動物への処置は国立感染症研究所の定める動物実験実施規定に則り、苦痛を与えないように考慮した。

ワクチン接種

A/Puerto Rico/8/34 (A/PR8, H1N1) のスプリットワクチン (1 μ g) を用いた。アジュバントとして、合成二本鎖 RNA Poly (I:C) (1、5、10 μ g)、酵母細胞壁分画 Zymosan (1、10、50、100 μ g) を単独あるいは組み合わせて用いた。一回のワクチン接種において、マウス 1 匹あたり片鼻 5 μ l (計 10 μ l) を経鼻的に接種した。一回目のワクチン接種から 3 週後に、二回目のワクチン接種を行った。

ウイルス感染

二回目のワクチン接種から、2 週後に A/PR8 のウイルス感染を行った。1000 pfu の A/PR8 を片鼻 2 μ l (計 4 μ l) で感染をおこなう上気道感染モデルと、同量のウイルスを片鼻 20 μ l で

肺へ接種する致死肺炎モデル (1000 pfu = 40 LD50) の二つの感染実験を行った。感染3日後に、上気道感染モデルにおいては血清と鼻腔洗浄液を、致死肺炎モデルにおいては血清と肺洗浄液を回収した。また致死肺炎モデルにおいては、観察を継続する群を用意し、体重変化と生存率をモニターした。

血清および鼻腔・肺洗浄液中の抗体応答の検討

精製した A/PR8 ウイルスのヘマグルチニン (HA) を固相化した ELISA にて、HA 特異的な血清中 IgG 抗体、鼻腔洗浄液中の IgA 抗体を定量した。標準物質として、濃度既知の抗 A/PR8 HA 特異的モノクローナル IgG 抗体と、HA 特異的ポリクローナル IgA 抗体を利用した。

ウイルスの定量

MDCK 細胞を用いたプラークアッセイ法により、鼻腔・肺洗浄液中のウイルス価を算出した。MDCK 細胞に希釈した鼻腔あるいは肺洗浄液を 200 μ l 添加し、37°C の培養器内で1時間の吸着操作を行った。その後、細胞を洗浄しアガロース添加培地を重層して 37°C で 40 時間培養した。アガロース培地を剥離したのちに、クリスタルバイオレット染色液で染色し、プラーク数を数え、ウイルス価の算出を行った。

血清中の中和抗体価と赤血球凝集反応阻止抗体価 (HI 抗体価) の測定

中和抗体価は、上記のプラークアッセイ法をもとに測定した。段階的に希釈した血清と A/PR8 ウイルスを混合し、MDCK 細胞に添加し、プラークアッセイを行った。この時、形成されるプラーク数を 50% 以下に抑えることのできる血清の最大希釈倍率の逆数を中和抗体価とした。

HI 抗体価の測定は、通常の赤血球凝集反応阻止試験により求めた。RDE 処理を行った段階希釈血清と 8HA 価のニワトリ赤血球を反応させ、1 時間後に赤血球の凝集反応阻止がみられた血清の最大希釈倍率の逆数を HI 抗体価とした。

C. 研究結果

経鼻噴霧型インフルエンザワクチンにおける粘膜アジュバントとして、合成二本鎖 RNA Poly (I:C) に対する酵母細胞壁分画 Zymosan の添加による粘膜免疫応答の増強効果を検討した。Poly (I:C) (1, 5, 10 μ g)、Zymosan (1, 10, 50, 100 μ g) を単独あるいは組み合わせ、A/PR8 ワクチンと共に二回経鼻的に接種した。A/PR8 ウイルス感染の3日目に血清および鼻腔洗浄液を回収し、A/PR8 HA 特異的な抗体応答を測定した (図1)。これまでの結果により、粘膜アジュバントとして Poly (I:C) 単独での利用の場合は、10 μ g の利用で感染防御には十分な抗体応答を誘導することが示されている。これに対し Zymosan 単独では、50 μ g を粘膜アジュバントとして利用した場合に、鼻腔洗浄液中において有効なレベルの A/PR8 HA 特異的 IgA 抗体応答がみられた (図1)。しかし、単独では有効な抗体応答を誘導できない Poly (I:C) 1 あるいは 5 μ g と、Zymosan 10 μ g を組み合わせた場合には、A/PR8 HA 特異的な鼻腔洗浄液中 IgA 抗体および血清中 IgG 抗体応答は、相乗的に増強されることが明らかになった (図1)。この時、血清中における中和抗体価および HI 抗体価も相乗的に増強されることが明らかとなった (図1)。次に、A/PR8 ウイルスの上気道感染モデルと致死肺炎モデルにおけるウイルス価を測定した (図2)。図1に示した抗体応答と関連し、両感染モデルにおいて高い抗体応答を示した群でウイルス価が低く、粘膜アジュバントとして単独での使用で効果が不十分だった Poly (I:C) 1 あるいは 5 μ g と Zymosan 10 μ g の併用においてウイルスの増殖は全く認められなかった (図2)。また、致死肺炎モデルにおいては、この併用群においては体重減少も見られず 100% の生存がみられた (図3)。