

図 1. 粘膜アジュバントにおける Zymosan 添加による抗体応答の比較

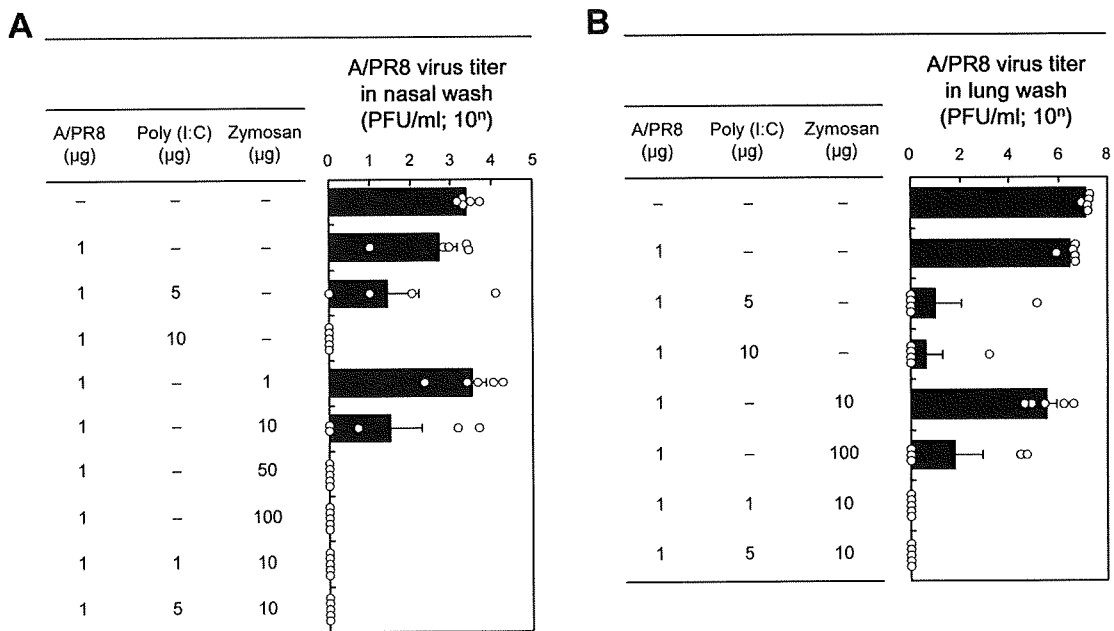


図 2. 鼻腔洗浄液および肺洗浄液中におけるウイルス価

(A; 上気道感染モデルにおける鼻腔洗浄液、B; 致死的肺炎モデルにおける肺洗浄液)

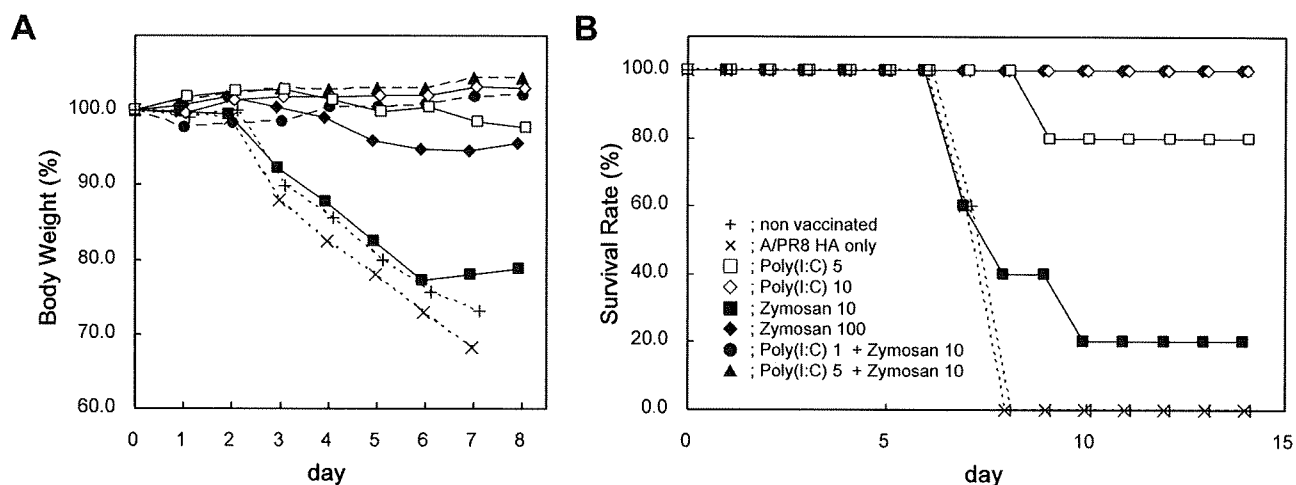


図3. 致死肺感染モデルにおけるマウスの体重変化と生存曲線
(A; 体重変化、B; 生存曲線)

D. 考察

合成二本鎖 RNA Poly (I:C) の粘膜アジュバント活性は、酵母細胞壁成分 Zyosan の添加により著しく増強された。合成二本鎖 RNA および Zyosan は、共に自然免疫を活性化する物質であり、その後誘導される適応免疫応答の活性化を促す。合成二本鎖 RNA Poly (I:C) は Toll 様レセプター 3 (TLR3) からの活性化シグナルを、また Zyosan は C 型レクチンである Dectin-1 および TLR2 からのシグナルを同時に加えることが知られている。今回、粘膜アジュバントとして Poly (I:C) と Zyosan を組み合わせることでみられた A/PR8 HA 特異的な IgA および IgG 抗体の増強には、TLR3、TLR2 および Dectin-1 を介する三つのシグナルが自然免疫細胞の活性化に相乗的に働いていると考えられる。

E. 結論

合成二本鎖 RNA Poly (I:C) の粘膜アジュバント活性を増強する目的で、酵母細胞壁成分 Zyosan 添加による分泌型 IgA 抗体の産生に象徴される粘膜免疫応答の増強効果を検討した。Poly (I:C) と Zyosan を併用することで、分泌

型 IgA の産生は相乗的に増強されウイルスの感染を完全に阻止することが示された。自然免疫系の細胞を活性化する物質を組み合わせは、より効果の高い粘膜アジュバント活性になりうる可能性が見出された。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Hasegawa H, Ichinohe T, Aina A, Tamura S, Kurata T. Development of an inactivated mucosal vaccine for H5N1 influenza virus. *Ther Clin Risk Manag.* 2009 Feb;5(1):125-32.
- 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.* 2009 Jun 1;199(11):1629-37.
3. Ichinohe T, Ainai A, Tashiro M, Sata T, Hasegawa H. PolyI:polyC12U adjuvant-combined intranasal vaccine protects mice against highly pathogenic H5N1 influenza virus variants. *Vaccine* 2009 Oct 23;27(45):6276-9.
 4. Ichinohe T, Ainai 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.
 5. Ainai 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.* 2010 Mar;82(3):476-84.
 6. 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.* 2010 Jan;63(1):8-15.
 7. Nakajima N, Hata S, Sato Y, Tobiume M, Katano H, Kaneko K, Nagata N, Kataoka M, Ainai 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.* 2010 Jan;63(1):67-71.
 8. 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.* 2010 Jan;63(1):72-4.
2. 学会発表
 1. 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
 2. 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
 3. 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
 4. 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

5. 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

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

CTL及び抗体誘導型インフルエンザワクチンの開発

研究分担者： 内田哲也 国立感染症研究所血液・安全性研究部 主任研究官

研究協力者： 種市麻衣子 同上 主任研究官

【研究要旨】

インフルエンザウイルスに対する液性免疫と細胞性免疫を同時に誘導することのできるワクチンの創製を目標として、インフルエンザウイルス（A/Uruguay/2007(H3N2)）由来のHAタンパク、および、インフルエンザウイルス Matrix Protein(M1) 由来のHLA-A2拘束性CTLエピトープペプチドを同一リポソームの表面に化学結合したワクチンを作製した。このワクチンをHLA-A2トランスジェニックマウスに免疫したところ、HAタンパクに特異的なIgG抗体の産生とCTLエピトープペプチドに特異的なCTLが誘導された。

A. 研究目的

現行のインフルエンザワクチンはインフルエンザウイルス表面のHA抗原に対する抗体の産生（液性免疫）を誘導し、ウイルスが宿主の細胞に吸着するのを阻止することを目的としている。インフルエンザウイルスには表面抗原の異なる複数の亜型が存在する。抗原と抗体とはいわゆる「鍵と鍵穴」の関係にあるため、ひとつのウイルス亜型に結合する抗体は他のウイルス亜型には結合しない。また、仮にウイルス亜型が一致していても、HAのタンパク構造の一部が遺伝子変異を起こすことにより抗体が結合出来ない場合もある。一方で、生体にはこの他に、ウイルスに感染した細胞を攻撃・除去することによりウイルスの複製を阻止する、細胞性免疫も備わっており、ウイルスが宿主に自然感染した際には液性免疫と細胞性免疫の双方が作用して感染防御を行っていると考えられている。液性免疫がウイルスの表面抗原を標的とするのに対して、細胞性免疫はウイルスの内部構造を含

む全タンパク抗原を標的とすることができる。また、インフルエンザウイルスにおいてウイルス表面のタンパク抗原が頻繁に変異するのに対し、ウイルス内部を構成するタンパクは変異が少なく安定しており、ウイルス亜型間で相同性が高いことが知られている。

我々はこれまでに、抗原をリポソームの表面に化学結合させてマウスに免疫することにより、高効率に抗原特異的IgG抗体産生が誘導される一方で、ワクチンに対するアレルギー反応の原因となるIgE抗体の産生が全く誘導されないことを見いだした（J. Immunol. 2002; 169:4246-4252.）。さらに、使用するリポソームの脂質組成を選択することにより、リポソーム表面に結合した抗原が抗原提供細胞によってCD8陽性T細胞に呈示され、抗原に特異的なCTLが誘導されることを見いだした（J. Immunol. 2006; 177: 2324-2330.）。

本研究においては、我々が開発した抗原-リポソーム処方をインフルエンザワクチンの創製に

応用し、リポソームの表面にインフルエンザ HA タンパクと CTL エピトープペプチドを結合することにより液性免疫 (抗体) と細胞性免疫 (CTL) を同時に誘導することのできるワクチンの開発を目的とする。

B. 研究方法

高効率に抗原特異的抗体産生および CTL を誘導することの確認されている、不飽和脂肪酸からなるリポソームの表面にインフルエンザウイルス (A/Uruguay/2007(H3N2)) 由来 HA タンパク、および、インフルエンザウイルス Matrix Protein (M1) 由来、HLA-A2 拘束性 CTL エピトープペプチドを架橋剤 DSS を介して化学結合させた (図 -1)。これを HLA-A2 トランスジェニックマウスに皮下投与し、抗原特異的抗体産生および CTL 誘導を検討した。血清中の HA 特異的 IgG および IgE 抗体価を ELISA によって測定し、抗原特異的 CTL 誘導を in vivo CTL assay を用いて検討した。

(倫理面への配慮)

使用された実験動物は、国立感染症研究所動物実験委員会規定に基づき飼育され、日本動物

学会が定めた、苦痛の軽減、安楽死等に配慮した指針に従って実験を行った。

C. 研究結果

1) HA 特異的抗体産生の誘導：HA および CTL エピトープペプチドを表面に結合させたりポソームでマウスを免疫した後、4 週経過したマウス末梢血中の抗 HA IgG および IgE 抗体産生を図 -2 に示す。HA をアルミニウムアジュバントとともに免疫した対照群 (HA-alum) で IgG とともに顕著な抗 HA IgE 抗体産生が観察されたのに対して、(HA + CTL エピトープペプチド) - リポソーム免疫群では IgG 産生は HA-alum 投与群で同程度であったのに対して IgE 産生は顕著に抑制された。

2) インフルエンザウイルス M1 由来 CTL エピトープに特異的な CTL の誘導：マウスに上記 1) と同様の免疫を行い、7 日後に CTL エピトープペプチドに特異的な CTL の誘導の有無を in vivo CTL assay を用いて検討した結果を図 -3 に示す。(HA + CTL エピトープペプチド) - リポソームで免疫することにより、顕著な抗原特異的 CTL の誘導が認められた。

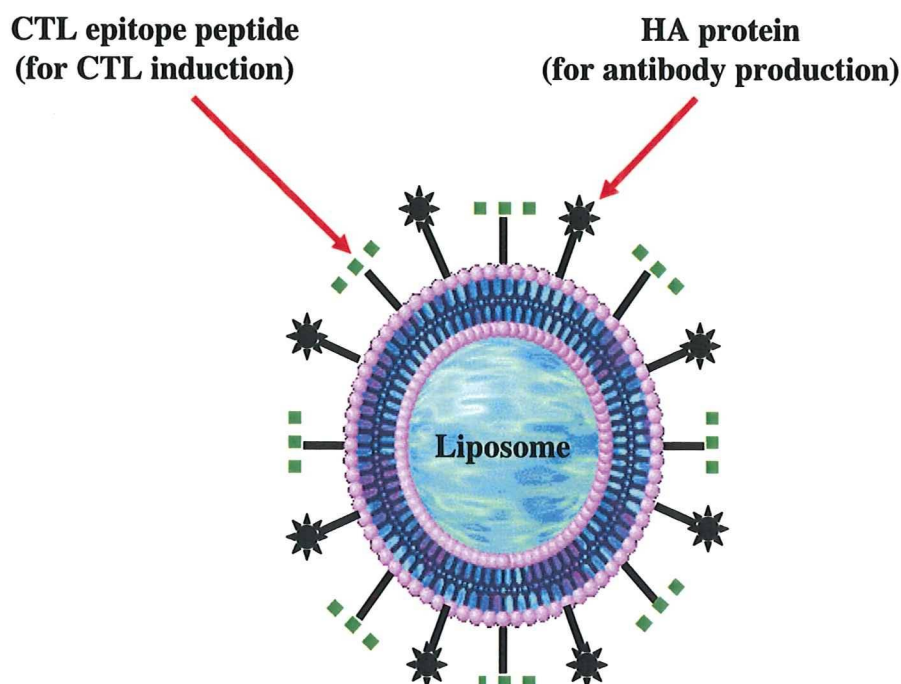


図 -1 : CTL 及び抗体誘導型インフルエンザワクチンのコンセプト

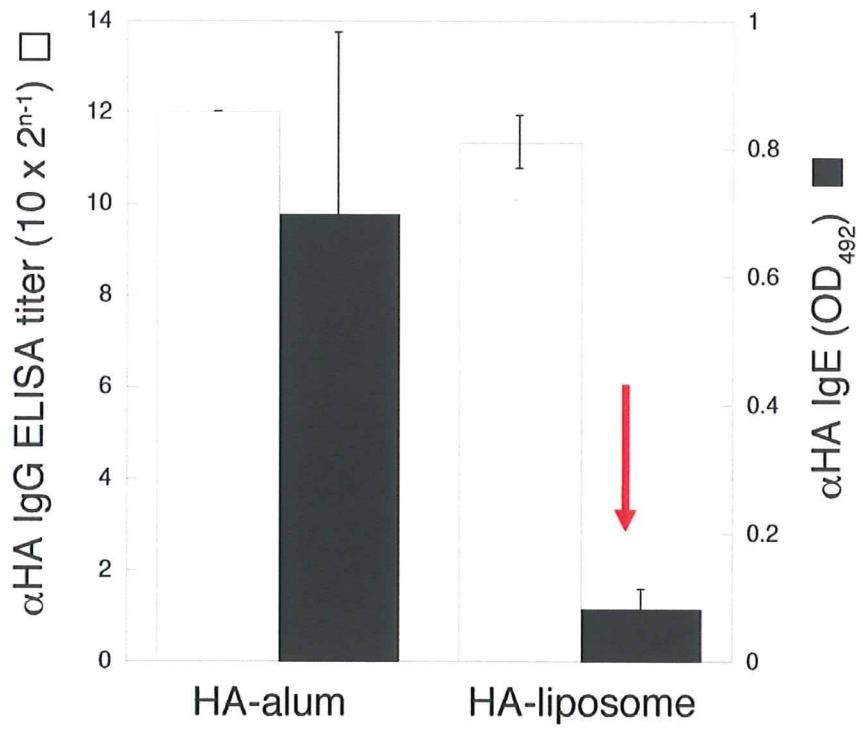


図-2：抗 HA IgG および IgE 抗体産生

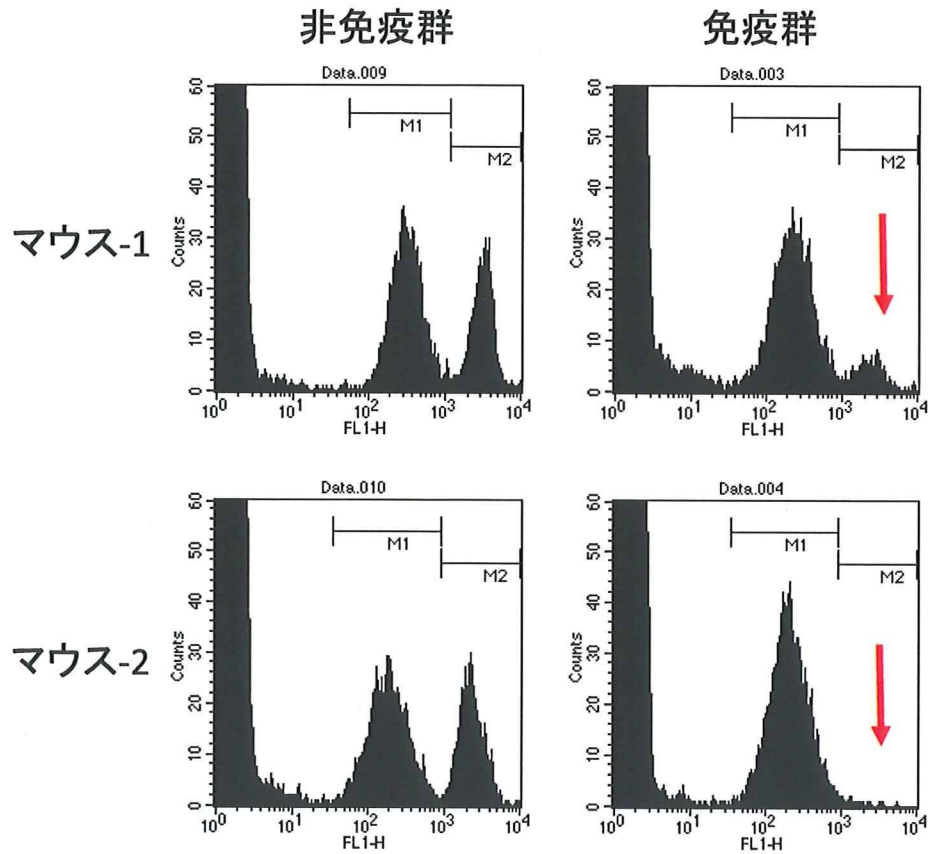


図-3：リポソームワクチンによる抗原特異的 CTL 誘導

D. 考察

現行のインフルエンザワクチンに使用されている HA 抗原、およびインフルエンザウイルス由来 CTL エピトープペプチドを同時に結合したリポソームでマウスを免疫すると、HA に特異的な抗体の産生（液性免疫）と CTL エピトープに特異的な CTL（細胞性免疫）の双方が同時に誘導されることが示された。インフルエンザウイルスに自然感染した際に宿主は液性免疫と細胞性免疫とによって感染防御を行っていると考えられており、2種類の免疫応答を同時に誘導するワクチンは液性免疫のみを誘導する現行のワクチンと比較してより効率的に感染抵抗性を誘導することが期待されるだけでなく、ウイルス表面抗原の変異によって抗体による免疫応答の感染防御効果が限定的なものになった場合にも、同時に誘導された細胞性免疫が症状の緩和に貢献することが期待される。

来年度は、インフルエンザウイルス感染実験を行い、このワクチンによるウイルス感染抵抗性の誘導効率について、現行のインフルエンザワクチン、細胞性免疫のみを誘導するワクチンと比較検討を行う予定である。

E. 結論

リポソーム表面にインフルエンザウイルス由来 HA タンパクおよび CTL エピトープを結合したワクチンは液性免疫と細胞性免疫を同時に誘導しうることが確かめられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.

2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 内田哲也、種市麻衣子：「インフルエンザと抗原」メデイカル・サイエンス・ダイジェスト 35,566-567,2009.
6. 「リポソームを用いた感染症ワクチンの開

発」D D S 25, 29-36, 2010.

「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.

8. 「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.

2. 学会発表

1. 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
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
第 13 回日本ワクチン学会 札幌 2009年 9 月
2. 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

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許出願

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）

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

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

研究分担者： 保富康宏 独立行政法人医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター センター長

【研究要旨】

感染症におけるヘルパー T 細胞(Th)の機能は重要であり、Th 反応を制御することで著しい病態の変化を促すことが出来る。このことから Th 反応制御による病態の解析は予後判定やワクチン開発等において重要となる。本研究では Th を制御するインターロイキン 4(IL-4)に着目し、IL-4 と IL-4レセプター結合部位に変異を挿入したアンタゴニスト(IL-4DM)の DNA ワクチンを用い、Th を Th1 および Th2 に誘導したときのインフルエンザウイルス感染およびインフルエンザワクチンにおける病態の差異をマウスにおいて検討した。IL-4 または IL-4DM DNA ワクチン投与マウスにインフルエンザウイルス PR8 (H1N1) を投与したところ IL-4 投与において生存率は低下し、IL-4DM 投与で増加した。これらマウスにおける特異抗体を検討したところ血中 IgM においては IL-4 投与マウスで優位に増加が認められたが IgG および肺胞洗浄液中の IgA においては差が認められなかった。誘導された IgG サブクラスの解析では IL-4 投与では IgG1、IL-4DM 投与では IgG2a が優位に増加していた。インフルエンザウイルス特異的細胞障害性 T リンパ球 (CTL) の誘導においては IL-4DM 投与マウスで優位に増加していた。以上のことから本研究ではインフルエンザウイルスの生体内での抑制には Th1 が重要であることが示された。

A. 研究目的

感染症におけるヘルパー T 細胞 (Th) の働きは病原体や感染宿主において病態に大きく反映する。Th 細胞は通常 Th0 の状態から細胞性免疫誘導型の Th1 や液性免疫誘導の Th2、また近年では調整性 T リンパ球 (Treg) や Th17 という新たな細胞集団にも分化していくと考えられている。インフルエンザウイルス感染症では、このような視点からの研究は少なく、遺伝子改変マウスを用いた研究において推察されるのみである。このような状況において近年アレルギー性

疾患との関連性を示唆する結果がヒトにおいて報告されている。アレルギー性疾患では恒常的に Th2 優位の免疫反応が誘導され、この状態が影響していることが示唆されている。本研究ではマウスを用い、遺伝子改変等の極端な免疫反応の操作ではなく、インターロイキン 4 (IL-4) およびそのアンタゴニスト (IL-4DM) の DNA ワクチンを用い、臨床ヒトに近い状態での Th1、Th2 操作によるインフルエンザウイルス感染の病態の変化を検討することを目的とした。

B. 研究方法

1. IL-4 および IL-4 DNA ワクチンによる Th 反応の操作

IL-4 または IL-4DM DNA ワクチンを 100 μ g、1 週間隔で 3 回投与し、Th 操作マウスとした。

2. Th 反応の操作による生存率の変化

IL-4、IL-4DM またはコントロール DNA ワクチン投与マウスに、インフルエンザウイルス Flu A/PR/8(H1N1) を 0.5LD50、1LD50、1.5LD50 にて気管内接種し、マウスの生存率を検討した。

3. インフルエンザウイルス特異抗体の測定

インフルエンザウイルス特異抗体は ELISA 法にてインフルエンザウイルス接種マウスの血漿および肺胞洗浄液中から測定した。また、DNA ワクチン接種による Th 反応操作マウスにインフルエンザワクチンを接種したマウス血漿においても同様に測定した。

4. 細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 活性の測定

インフルエンザウイルスの接種マウスの縦隔リンパ節細胞を用いて NP エピトープ特異的 CTL 活性を ⁵¹Cr 遊離法にて測定した。

5. 倫理面への配慮

本研究は、マウスのみを使用する基礎研究でありヒトサンプル、情報等は一切用いていない。

C. 研究結果

1. Th 反応制御における生存率の変化

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 FluA/PR/8(H1N1) 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。(Fig. 1)。

2. 特異抗体の測定

ウイルス特異的抗体を継時的に測定したところ、血漿中の IgM が IL-4 投与 (Th2 誘導) に

おいて優位に増加したが、血漿中 IgG および肺胞洗浄液中 IgA は全ての群において優位な差はなかった (Fig. 2)。

3. ウイルス特異抗体のサブクラス

血漿中の IgG のサブクラスを各群のマウスにおいて比較したところ Th2 型抗体の IgG1 は IL-4 投与群で、Th1 型抗体の IgG2a は IL-4DM 投与群で優位に増加していた (Fig. 3)。

4. エピトープ特異的 CTL

NP 抗原エピトープ特異的 CTL の誘導を肺縦隔リンパ節細胞において検討したところ、IL-4DM 投与にて優位に増加していた (Fig. 4)。

5. インフルエンザワクチン投与における IgG サブクラスの検討

DNA ワクチン投与マウスにインフルエンザワクチンを投与し、抗体の産生を検討したところ、IL-4 および IL-4DM いずれの投与でもワクチン特異的総 IgG 量に優位さは認められなかったが、IgG1 では IL-4 投与群が、IgG2a では IL-4DM 投与群が優位に高い反応を示した (Fig. 5)。

D. 考察

現在、先進国を中心にアレルギー・アトピー性疾患が急増しており、それによる感染症の病態に対する影響が報告されるようになった。インフルエンザワクチンにおいてもアレルギー・アトピー性疾患においてはワクチン効果が低いという報告がある。これらの事象を実験動物で検証した報告としてはサイトカインレセプターの KO マウスや、種々サイトカインの過剰発現により Th 反応を制御した報告があるが、いずれの報告においても実際にはありえない状態に生体を調節したものであり、このままヒト疾患のモデルとして考えることは困難である。また、Th 反応を明確に調節する IL-4 の投与はマウスにおいては致死的となる。本研究における IL-4 および IL-4DM の DNA ワクチンは血中には検出できない量を持続的に分泌し、Th 反応を制御する

ことが可能である。このことは遺伝子改変マウスやサイトカインやその抗体の投与に比較し、ヒトの臨床状態をよく反映していると考えられる。

本実験における Th 制御では Th1 により、インフルエンザウイルス感染抵抗性が増加し、Th2 により低下することは示された。このことはイ

ンフルエンザウイルス感染における抵抗性には細胞性免疫が重要であることを示している。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と考えられ、今後その様な研究が必要と思われる。

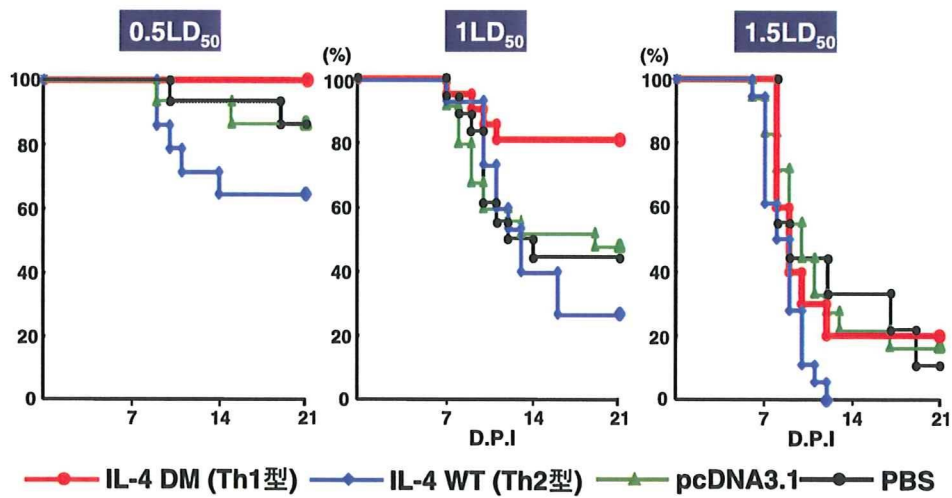


Fig. 1 IL-4 WT および IL-4 DM 接種マウスにおけるインフルエンザウイルス (Flu A/PR/8) 感染後の生存率

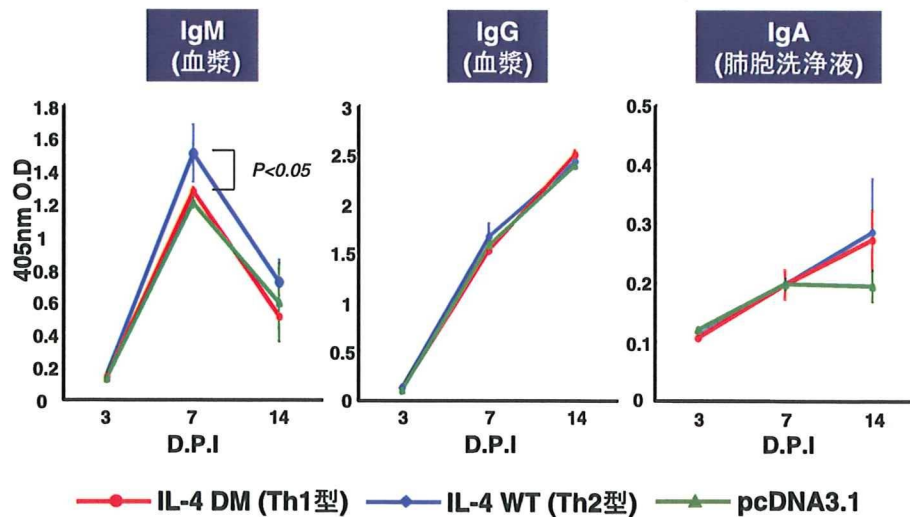


Fig. 2 PR8 特異的抗体産生能の経時的解析

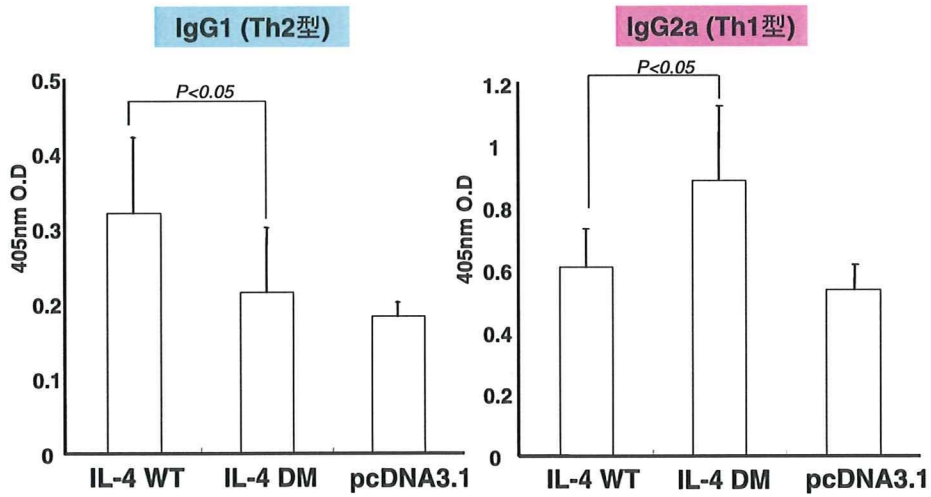


Fig. 3 血中における PR8 特異的 IgG の Subclass (D.P.I 14)

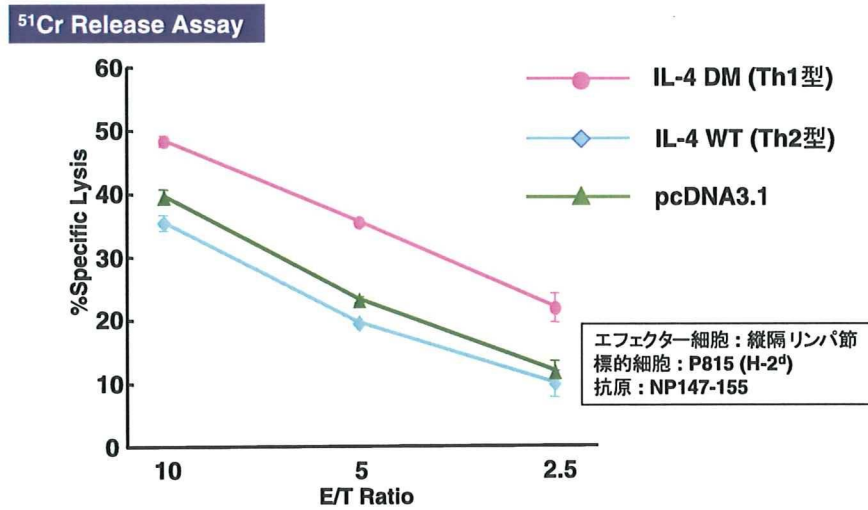


Fig. 4 PR8 に対する CTL 活性 (D.P.I 14)

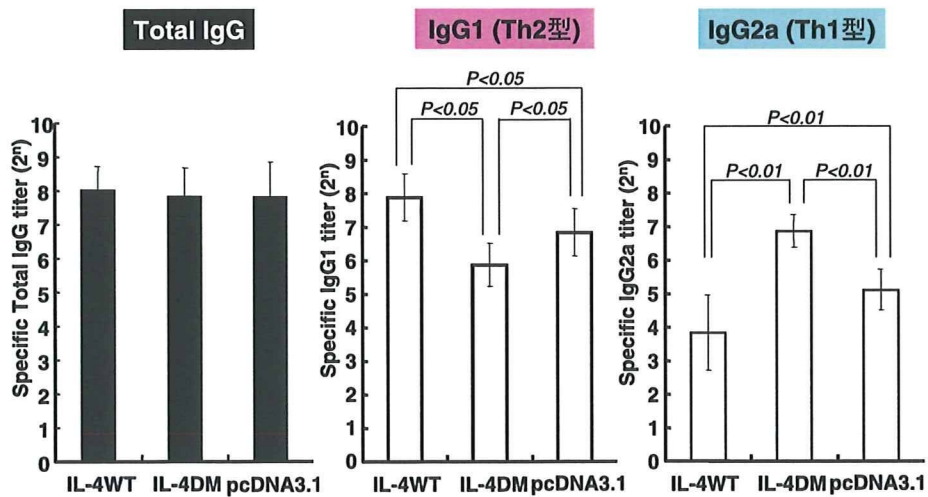


Fig. 5 不活化インフルエンザワクチン免疫における Th1/Th2 の IgG 抗体価に対する影響

E. 結論

インフルエンザウイルス感染症における感染抵抗性には Th1 反応が重要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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. 2009 : 301 ; 151-157.
2. Okabayashi, S., Ohno, C. and Yasutomi, Y. Acute megakaryocytic leukemia (AMKL)-like disease in a Cynomolgus monkey (Macaca fascicularis). J.Comp.Pathol. 2009 : 140 ; 212 -216.
3. 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. 2009 : 160 ; 1172-1179.
4. 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. 2009 : 105 ; 929-937.

5. Yasuhiro Yasutomi. Establishment of specific pathogen-free macaque colonies in Tsukuba Primate Research Center of Japan for AIDS research. Vaccine 2009 in press

6. 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. 2009 in press

7. 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. 2010 in press

2. 学会発表

「国内」

1. 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
2. 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
3. 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
4. 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

5. 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

「国際」

1. 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.

2. 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. 知的財産の出願・登録状況

1. 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)
2. 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)

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誘導の検討

研究分担者： 岡本成史（独立行政法人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）

【研究要旨】

本研究において、ウイルスライブラリーを用いた次世代インフルエンザワクチン用の種ウイルスを作成、保存し、その中から新たに発生するインフルエンザウイルスに抗原的、遺伝子学的に近い保存株をワクチン株として作成することを検討しているが、それには交叉防御効果を誘導するワクチンの接種方法の確立が不可欠である。本研究において、インフルエンザヘマグルチニン（HA）ワクチンおよび全粒子ワクチンによる経鼻接種による交叉防御効果の誘導の有無について検討を行い、全粒子ワクチンにおいて、粘膜アジュバントなしで交叉防御効果が誘導されることを見出した。

A. 研究目的

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。その戦略として、ウイルスライブラリーを用いた次世代インフルエンザワクチン用の種ウイルスを作成、保存し、その中から新たに発生するインフルエンザウイルスに抗原的、遺伝子学的に近い保存株をワクチン株として作成することがあげられる。しかし、これまでのインフルエンザワクチンの皮下接種による投与方法では、ワクチン株と発生しているウイルス株が同一でなければ十分な感染防御効果を誘導することができず、同一なウイルスを予想することが不可能である。そのため上記戦略の達成には、交叉防御効果を示す接種方法を確立する必要がある。

これまでの報告でインフルエンザワクチンの経鼻接種が交叉防御効果を誘導することが動物実験により明らかにされている。今回、我々は季節性のインフルエンザヘマグルチニン（HA）ワクチンおよび不活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可能性について検討した。

B. 研究方法

1. ウイルスおよび全粒子ワクチン

A/Solomon Islands/3/2006 (H1N1) 株由来のHAワクチンおよび全粒子ワクチンは、マウスへの感染実験に用いるインフルエンザウイルスは、財団法人阪大微生物病研究会観音寺研究所より御供与頂いたものを使用した。

2. マウスへの免疫およびウイルス感染

BALB/c マウス（6週齢、雌）に各種ワクチン 10 ng ~ 1 μ g/20 μ l を4週間間隔で2回経

鼻接種した。そして最終接種から2週間後に A/PR/8/34 を 2000 pfu (200 x LD50) 経鼻感染し、その後のマウスの生死を観察した。

D. 研究結果

1) HA ワクチンおよび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 全粒子ワクチンを図1に示す量をマウスに経鼻接種し、その後

致死量の A/PR/8/34 を感染させ、マウスの生存率の変化を検討したところ、1回あたりのワクチン量を 100 ng 以上を2回接種したマウスについて全例感染死を免れた(図1)。一方、A/Solomon Islands/3/2006 由来の HA ワクチンを経鼻接種したマウスでは、感染に対する防御効果が認められなかった(図1)。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(図2)

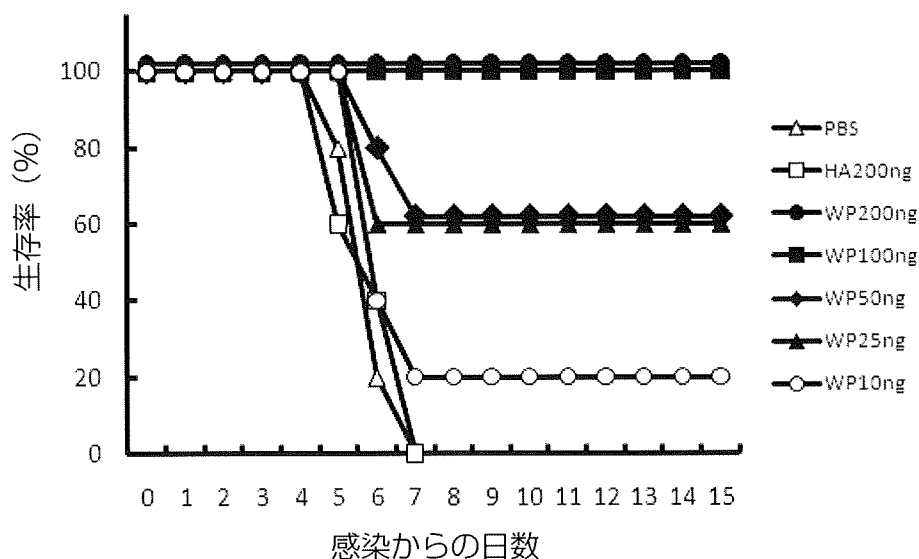


図1 インフルエンザ不活化全粒子ワクチンによる交叉防御効果. A/Solomon Islands/3/2006 株由来の不活化全粒子ワクチン(WP)を経鼻接種した後、2000pfuのA/PR/8/34株を感染させ、感染後のマウスの生存率を観察した。

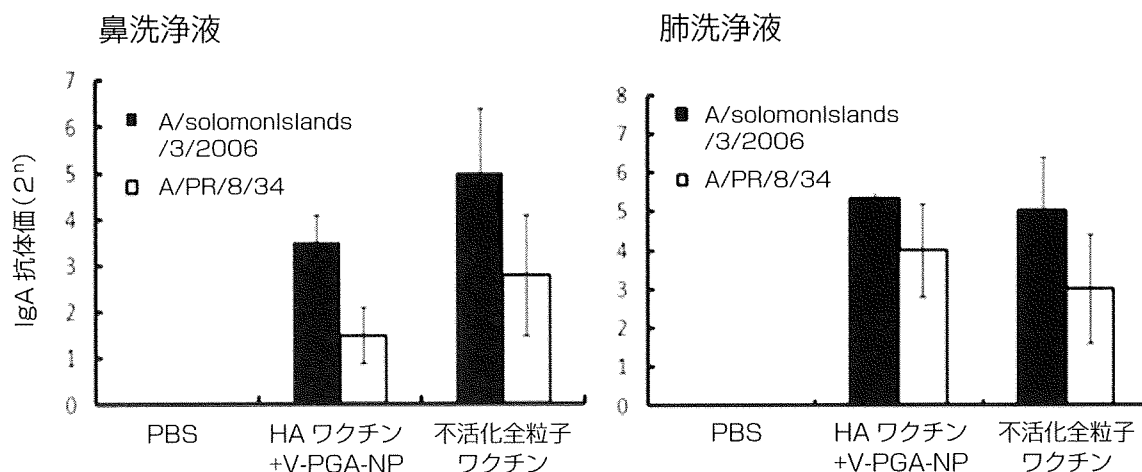


図2 インフルエンザ不活化全粒子ワクチンによる交叉反応性 IgA 抗体の産生. A/Solomon Islands/3/2006 株由来の不活化全粒子ワクチン(WP)を経鼻接種した。最終接種から2週間後に鼻及び肺洗浄液を回収し、両洗浄液中のA/Solomon Islands/3/2006 および A/PR/8/34 に対する IgA 抗体価を測定した。

D. 考察

21世紀になってからインフルエンザ全粒子ワクチンの経鼻接種がアジュバントなしで十分な防御効果を誘導する可能性を示唆する報告がいくつかなされている。そこで今回、我々は現在季節性ワクチンとして使用している株由来のインフルエンザHAワクチンおよび全粒子ワクチンによる経鼻接種による交叉防御効果の有無について検討をおこなった。その結果、インフルエンザHAワクチンでは有効な粘膜アジュバントとの併用接種により交叉防御効果を誘導するが、インフルエンザ全粒子ワクチンでは、粘膜アジュバントなしで効果防御効果を誘導することを確認した。このことは、全粒子ワクチンの経鼻接種が、将来新しいインフルエンザが出現した際に緊急に使用するワクチンの接種方法として、適当であることを示唆するものである。

E. 結論

1. 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。

F. 研究発表

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. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Okamoto,S., Matsuura,M., Akagi,T., Akashi,M., Tanimoto,T., Ishikawa,T., Takahashi,M., <u>Yamanishi,K.</u> , Mori,Y.,	Poly(gamma-glutamic acid)nano-particles combined with mucosalinfluenza virus hemagglutinin vaccine Protects against influenza Virus infection in mice	Vaccine	27(42)	5896-5905	2009
Itoh, Y., Ozaki, H.,Ishigaki, H., Sakoda, Y., Nagata,T., Soda, K., IsodaN., Miyake, T., Ishida, H., Okamoto, K.,Nakayama,M., Tsuchiya, H., Torii, R., <u>Kida, H.</u> , and Ogasawara, K	Subcutaneous inoculation of a wholevirusparticle vaccine preparedfrom a non-pathogenic virus library induces protective immunity against H7N7 highly pathogenic avian influenza virus in cynomolgus macaques.	Vaccine	28	780-789	2010

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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., <u>Kida, H.</u> , Ogasawara, K., and Kawaoka, Y.	In vitro and in vivo characterization of newsine-origin H1N1 influenza viruses.	Nature	460	1021-1025	2009
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., <u>Kida, H.</u> , and Ogasawara, K.	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	2009