

200931015A

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

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

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 長谷川 秀樹

平成22（2010）年 3月

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

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

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 長谷川 秀樹

平成22（2010）年 3月

目 次

I. 総括研究報告	
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	1
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）	
II. 分担研究報告	
1. 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	15
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）	
2. 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	21
田代 真人（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）	
3. 経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンの 臨床応用に関する研究	27
喜田 宏（北海道大学大学院獣医学研究科）	
4. 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	31
真鍋 貞夫（(財) 阪大微生物病研究会）	
5. 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	38
清野 研一郎（聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター）	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	41

I. 総括研究報告書

総括研究報告書

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

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

第六室 室長 長谷川 秀樹

研究要旨 インフルエンザウイルスの感染防御には感染の場である粘膜における分泌型 IgA 抗体に代表される粘膜免疫が重要な働きをする。臨床応用に向けた前臨床試験のための剤形を決定する事を目的としワクチン液の粘膜への付着性を高めるカルボキシビニルポリマー基剤 (CVP) [0.55% カルボキシビニルポリマー、1.2% L-アルギニン、1% グリセリンの混合物]を増粘剤として併用した試作ワクチンを作製した。試作ワクチンの抗体誘導効果およびその効果の持続をマウス及びカニクイザルで検討した。アジュバントの増量及び付着性が粘膜免疫応答を増強する事が明らかとなった。マウスを用いた経鼻接種試験により抗体応答を確認したところ、Ampligen・CVP 基剤併用ワクチン接種群では、Ampligen だけを添加したワクチンの接種群よりも高い免疫応答を得た。また、上記試作ワクチンについてラットを用いた単回・反復（経鼻投与及び静脈内投与）毒性試験を行うとともに、経鼻投与による中枢神経系・呼吸器系に対する安全性薬理試験を実施した。さらに、サルを用いた反復経鼻投与毒性試験及び安全性薬理試験(経鼻投与による心血管系および呼吸器系に及ぼす影響)も行った。各試験で設定した用量は、体重あたりで換算するとヒトで想定される数十倍以上にあたるが、ラット単回静脈内投与試験・用量 100 μ L 群(体重あたりで換算するとヒトで想定される経鼻接種量の数百倍に相当する)以外に試作ワクチンに起因する毒性変化は見られず、安全性が高いことが確認された。以上のことから、本試作ワクチンは有効性・安全性が高く、次世代ワクチン候補として有望なものであると考えられた。別のアジュバント候補として NKT 細胞を活性化する α -galactosylceramide (α -GalCer) の検討も行った。またワクチン株の準備にあたりワクチン株に適したウイルス株を迅速に提供するため、リバースジェネティクス(RG)法により、新型ウイルスと PR8 株間の遺伝子再集合ウイルスの作出を試みた。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継続実施し 82 株のインフルエンザ A ウイルスを分離同定した。

分担研究者：

田代真人 (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 センター長)

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)

真鍋貞夫 (財団法人阪大微生物研究会観音寺研究所、研究技術部 部長)

清野研一郎 (聖マリアンナ医科大学、難病治療研究センター生体機能制御研究部門 准教授)

A. 研究目的

インフルエンザウイルスの感染防御には感染の場である粘膜における分泌型 IgA 抗体に代表される粘膜免疫が重要な働きをする。ワクチン接種により粘膜を誘導するには粘膜投与型の経鼻ワクチンが有効である。本研究では高病原性鳥インフルエンザ(H5N1)の経鼻ワクチンの効果とアジュバント量や付着性等の剤形との関連をマウス及び霊長類を用いて検討し経鼻粘膜投与型のインフルエンザワクチンの実用化に向け、剤形の決定、投与方法を決定し GLP 前臨床試験を実施する事を目的とする。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、マウスや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したり RG 法により増殖性、抗原量ともに高いウイルスを GMP 準拠の環境で作出し、新型インフルエンザワクチン製造株として供給することを目的とした。

B. 研究方法

1. 薬理・薬効試験

試作ワクチンのマウスを用いた経鼻接種試験：用量と薬効の関係調査

試験に用いた試作ワクチンのうち、高用量群用のものは、不活化全粒子 A 型インフルエンザワクチン(H5N1 株) (PR8-IBCDC-RG2 株：A/Indo/5/2005 (H5N1) の弱毒株) を抗原とし、50 μ g HA/mL を含むものとした。また、アジュバントとして Ampligen を HA 抗原の 20 倍量(1mg/mL)添加するとともに、増粘剤として CVP 基剤 [添加後の濃度:0.55% CVP、1.2% L-アルギニン、1% グリセリン]を添加した。中用量・低用量群用のワクチンについては、抗原及び Ampligen の濃度を高用量群の 3 分の 1 または 9 分の 1 とした。CVP 基剤の最終濃

度は各用量群用で同一とした。

経鼻接種試験には、BALB/c マウス(♀、試験開始時 6 週齢)を一群 10 匹用いた。接種する抗原の用量は濃度により変動させた。抗原の用量は、0.033 μ g HA/head・0.1 μ g HA/head・0.3 μ g HA/head のいずれかとした。投与回数は 1~4 回とした。比較対照として、同用量の抗原を含み、CVP 基剤・Ampligen を含まないワクチンを経鼻接種した群と、0.3 μ g HA/head の抗原を含み、CVP 基剤・Ampligen を含まないワクチンを筋肉内に接種した群も設けた。

試作ワクチンの接種方法は、以下の通りである。

- ①経鼻接種：ペントバルビタール麻酔(1.2mg を腹腔投与)下でマウスの一方の鼻孔に 6 μ l のワクチンを接種した。接種にはガスクロマトグラフ用ガラスシリンジに 30G 針を取りつけ、その先端に PE-10 チューブ(外径 0.3mm)を接続したものを使用した。
- ②筋肉内接種：大腿部の筋肉内に 50 μ l のワクチンを接種した。

ワクチンの接種間隔については、1 回目と 2 回目の間を 3 週間、その後は 2 週間とした。最終免疫の 2 週間後に鼻腔洗浄液と血清を回収し、鼻腔洗浄液からは特異的 IgA-ELISA 抗体価を、血清からは HI、中和、特異的 IgG-ELISA の抗体価を調べた。

2. 毒性試験・安全性薬理試験

試験に用いた試作ワクチンは、不活化全粒子 A 型インフルエンザワクチン(H5N1 株) (PR8-IBCDC-RG2 株：A/Indo/5/2005 (H5N1) の弱毒株) を抗原とし、300 μ g HA/mL を含むものとした。また、アジュバントとして Ampligen を HA 抗原の 20 倍量(6mg/mL)添加するとともに、増粘剤として CVP 基剤 [添加後の濃度：0.55% CVP、1.2% L-アルギニン、1% グリセリン]を添加した。

この試作ワクチンの略称を BK-NIF とした。

また、上記成分の内、抗原を含まないアジュバント対照として、BK-NIF アジュバント対照品（略称：AD-C）を作製して以下の試験を実施した。

1) 試作ワクチンのラットを用いた単回経鼻投与毒性試験

BK-NIF を CrI:CD(SD)ラットに、5 および 50 μ L/body/day の用量で単回経鼻投与し、その毒性について検討した。また、アジュバント対照群として、AD-C を、媒体対照群として、日本薬局方 生理食塩液を BK-NIF と同様に投与する群を設けた。各群の動物数は雌雄各 5 匹とした。

2) 試作ワクチンのラットを用いた 4 週間反復経鼻投与毒性試験

BK-NIF を CrI:CD(SD)ラットに、50 μ L/body/day の用量で 1 週間に 1 回投与の頻度で 4 週間反復経鼻投与し、その毒性について検討した。

また、アジュバント対照群として、AD-C を、媒体対照群として、日本薬局方 生理食塩液を BK-NIF と同様に投与する群を設けた。各群の動物数は雌雄各 10 匹とした。

検査項目として、一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、眼科的検査、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、器官重量および病理組織学的検査を設定した。

3) 試作ワクチンのラットを用いた単回静脈内投与毒性試験

BK-NIF を CrI:CD(SD)ラットに、10 および 100 μ L/body/day の用量で単回静脈内投与し、その毒性について検討した。

また、アジュバント対照群として、AD-C を、媒体対照群として、日本薬局方 生理食塩液を BK-NIF と同様に投与する群を設けた。各群の動物数は雌雄各 5 匹とした。

4) 試作ワクチンのラットを用いた 4 週間反復静脈内投与毒性試験

BK-NIF を CrI:CD(SD)ラットに、10 μ L/body/day の用量で 1 週間に 1 回投与の頻度で 4 週間反復静脈内投与し、その毒性を検討した。

また、アジュバント対照群として、AD-C を、媒体対照群として、日本薬局方 生理食塩液を BK-NIF と同様に投与する群を設けた。各群の動物数は雌雄各 10 匹とした。

検査項目として、一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、眼科的検査、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、器官重量および病理組織学的検査を設定した。

5) 試作ワクチンの安全性薬理試験：ラットを用いた単回経鼻投与による一般症状および行動に及ぼす影響

中枢神経系に関する安全性薬理試験として、一般症状および行動に及ぼす BK-NIF の影響を、ラットを用いて検討した。被験物質群は 50 μ L/body の 1 用量とし、媒体対照群には同量の生理食塩液を投与した。

6) 試作ワクチンの安全性薬理試験：無麻酔ラットの呼吸機能に及ぼす影響

呼吸系に関する安全性薬理試験として、BK-NIF がラットの 1 分間の呼吸数、1 回換気量、1 分間あたりの換気量および気道狭窄の指標である Penh に及ぼす影響を検討した。被験物質群は 50 μ L/body の 1 用量とし、媒体群には同量の生理食塩液を投与した。

7) 試作ワクチンのカニクイザルを用いた 4 週間反復経鼻投与毒性試験

BK-NIF をカニクイザルに 0.2

mL/body/day の用量で1週間に1回の頻度で4週間反復経鼻投与し、その毒性を検討した。また、アジュバント対照群としてAD-Cを、媒体対照群として日本薬局方生理食塩液をBK-NIFと同様に投与する群を設けた。各群の動物数は雌雄各3頭とした。

検査項目として、一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、心電図検査、体温測定、眼科的検査、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、器官重量および病理組織学的検査を設定した。

8) 試作ワクチンの安全性薬理試験：覚醒サルの心血管系および呼吸器系に及ぼす影響 [テレメトリー法]

心血管系に関する安全性薬理試験として、BK-NIFの心拍数、血圧及び心電図に及ぼす影響を覚醒サルを用いて検討した。また同時に動脈血の血液ガス(pO₂、pCO₂、ヘモグロビン O₂ saturation および pH)を測定することにより、呼吸器系に及ぼす影響についても検討した。被験物質群は0.2 mL/bodyの1用量とし、同量の生理食塩水を投与する媒体対照群を設けた。媒体対照、被験物質の順に、10日間の間隔をあけて投与した。

(倫理面への配慮)

「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(文部科学省告示第71号、平成18年6月1日)に基づいた試験を行った。

系統保存

野生ウイルス株の採取には日本、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。

RG法によるワクチン株作成には以下の材料を用いた。

ウイルス：A/California/04/2009(H1N1)v (MDCK分離株)(Cal4)、A/California/07/2009(H1N1)v(発育鶏卵分離株)(Cal7)

不活化抗原：A/Narita/1/2009

細胞：LLCMK2細胞(GMP基準に従って維持管理されている)

C. 研究結果

1. カルボキシルビニルポリマー(CVP)基材によるIgA抗体応答の増強効果

ヒトの鼻腔に経鼻ワクチンを噴霧した時に咽頭へ流れてしまう事が危惧される。そこでワクチンが粘膜に付着するような剤形としてカルボキシルビニルポリマー(CVP)を添加し鼻腔内で流れずに粘膜に留まる試作ワクチンを用意した。それぞれの試作ワクチンを2週間間隔で経鼻接種後血中のワクチン特異的IgG抗体及びIgA抗体をELISA法で測定した。結果、試作ワクチン経鼻接種後最終免疫から2週間後に血清中IgG抗体価が最も高かった。IgG抗体価は不活化全粒子45µg+Ampligen 900µgを接種した群が最も高く続いて不活化全粒子45µg+Ampligen 450µg+CVP、不活化全粒子45µg+Ampligen 450µg、不活化全粒子45µg+CVPの順であった。一方、血清中のワクチン特異的IgA抗体価は不活化全粒子45µg+Ampligen 900µgを接種した群と不活化全粒子45µg+Ampligen 450µg+CVPを接種した群がほぼ同じ値を示した。これらの事から粘膜に付着する基材であるカルボキシルビニルポリマー(CVP)を加える事により粘膜免疫を担うIgA抗体の産生能が高まる事が示された。またアジュバント量としては抗原の10倍量より20倍量のほうが高い抗体応答が得られた事

からワクチン抗原に対して 20 倍量のアジュバントと更にカルボキシルビニルポリマー (CVP) を加えた剤形が効果的なワクチンとなる事が示唆された。

2. 経鼻インフルエンザワクチンによる抗体応答の持続

経鼻ワクチン接種後抗体応答がどのくらいの期間持続するのかがワクチンの有効性の評価時に重要な要素になる。そこでそれぞれの試作ワクチンを経鼻免疫し血清中のワクチン特異的 IgG 抗体価および IgA 抗体価を約 1 年間に渡って経時的に測定した。結果 IgG 抗体価 IgA 抗体価共に最終免疫から 2 週間目が最も高く高値で維持され半年経過した時点でもっとも高い IgG 抗体価を示した Ampligen20 倍使用群で 10×2^6 倍以上を維持しその値はワクチン接種 1 年後でも維持されていた。また血清中の IgA 抗体価は半年経過時点で 10×2^3 倍以上でその値は 1 年経過後にも維持されていた。これらの事より本試作ワクチンの経鼻接種により誘導される IgG 抗体及び IgA 抗体はワクチン接種後約 1 年経過しても維持されることがわかった。

3. 系統保存

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。HA 遺伝子解析の結果、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。

4. ワクチン株製造

1. MDCK 分離株 Cal4 由来の遺伝子を導入した 6:2 (HA, NA のみ新型 Cal4 由来) ウイルスは、鶏卵での増殖が認められなかったため、Cal7 由来遺伝子導入ウイルスを用いて、鶏卵での増殖性、遺伝子構成の検討を行なった。
2. 鶏卵での増殖性を改善するため、HA に D225G 変異、Q226R 変異をそれぞれ導入したウイルスの増殖性を検討した結果、Q226R 変異で改善が見られた。
3. 遺伝子構成が、ウイルスの増殖性に及ぼす影響を検討した結果、 $5:3 < 6:2 < 7:1$ の順で増殖性が改善された。

5. GalCer アジュバント

全粒子不活化ワクチンに α -GalCer をアジュバントとして併用することにより、全粒子不活化ワクチン単独と比較してその応答は明らかに増強された。 α -GalCer は全粒子不活化ワクチン 0.1 μ g に対するアジュバントとして、今回の検討した 0.2 μ g 以上の全ての投与量で、3 種類全てのワクチン株において血清中の抗 HA ワクチン特異的 IgG 抗体応答および鼻洗浄液中の抗 HA ワクチン特異的 IgA 抗体応答共を有意に増強させた。

D. 考察

インフルエンザウイルスの感染を防御する最も効果的な戦略は感染部位である上気道の粘膜上に粘膜免疫を誘導する事である。臨床治験を踏まえた GLP 前臨床試験を行うにあたり剤形の決定が不可欠である。そこで本研究においてアジュバントを加える割合や粘膜へ付着する基材を加えたりした試作ワクチンを作成

シヒトに近い免疫系を持つカニクイザルでの抗体応答能を調べた。アジュバント量を不活化抗原の 20 倍量にし、更にワクチン基材であるカルボキシルビニルポリマー (CVP) を添加したものが IgG 抗体応答、IgA 抗体応答共に有利であると考えられた。

1. 薬理・薬効試験

試作ワクチンのマウスを用いた経鼻接種試験：用量と薬効の関係調査

Ampligen と CVP 基剤を併用した試作ワクチンを経鼻接種すると、鼻腔粘膜に感染防御レベルの局所 IgA 抗体産生を誘導することが出来ることが確認された。粘膜での特異的抗体産生は注射法では得られない効果であり、感染予防に有用に働くと考えられた。さらに、血清中に産生された特異的抗体価レベルは、上記の添加剤を使用しないワクチンを筋肉内に接種した場合とほぼ同等で、感染防御に有効な水準であった。これまで、経鼻接種法では、血清中の抗体産生は不十分なレベルにしかないと考えられていたが、Ampligen と CVP 基剤の併用により、この問題についても解決できたものと考えられた。

2. 毒性試験・安全性薬理試験

1) 試作ワクチンのラットを用いた単回経鼻投与毒性試験

本試験条件下における BK-NIF の毒性は AD-C と明らかな差は認められず、概略の致死量は雌雄ともに 50 μ L/body/day を上回ると考えられた。

2) 試作ワクチンのラットを用いた 4 週間反復経鼻投与毒性試験

本試験条件下では BK-NIF 投与に起因する毒性変化は認められず、BK-NIF の無毒性量は 50 μ L/body を上回ると考えられた。

3) 試作ワクチンのラットを用いた単回静脈

内投与毒性試験

本試験条件下において BK-NIF と AD-C の毒性に明らかな差は認められず、BK-NIF の概略の致死量は雌雄ともに 100 μ L/body/day と考えられた。なお、本試験は、鼻腔内に投与した被験物質が全て血中に移行すると仮定して実施したものであるため、実際に経鼻投与で毒性が発現する用量は、本試験よりも高用量になるとみられる。

4) 試作ワクチンのラットを用いた 4 週間反復静脈内投与毒性試験

本試験条件下では BK-NIF 群の脾臓において免疫系の活性化を示唆する変化がみられたが、これらは AD-C 群にも同様に認められる変化であった。したがって、BK-NIF の無毒性量は 10 μ L/body を上回ると考えられた。

5) 試作ワクチンの安全性薬理試験：ラットを用いた単回経鼻投与による一般症状および行動に及ぼす影響

本試験条件下では、BK-NIF はラットの中樞神経系に対して影響を及ぼさないと考えられた。

6) 試作ワクチンの安全性薬理試験：無麻酔ラットの呼吸機能に及ぼす影響

本試験条件下では、BK-NIF はラットの呼吸系に対して影響を及ぼさないと考えられた。

7) 試作ワクチンのカニクイザルを用いた 4 週間反復経鼻投与毒性試験

本試験条件下では BK-NIF 投与に起因する毒性変化は認められず、BK-NIF の無毒性量は 0.2 mL/body を上回ると考えられた。

8) 試作ワクチンの安全性薬理試験：覚醒サルの心血管系および呼吸器系に及ぼす影響 [テレメトリー法]

本試験条件下では、BK-NIF は覚醒サルの心血管系及び呼吸器系に対して影響を及ぼさないと考えられた。

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。また新型ウイルスは、鶏卵での増殖性が悪くワクチン株の開発が困難であった。また、野生株を鶏卵で継代し続けると、増殖性の改善と同時に抗原性の変化を伴うという問題も指摘されていた。さらに、鶏卵での増殖性の改善は、必ずしも抗原量の収量の改善を伴わなかった。

E. 結論

GLP 前臨床試験を行うにあたり剤形を決定する為に経鼻インフルエンザワクチンの試作ワクチンを作成し抗体応答能、免疫の持続についてカニクイザルを用いて検討した。Ampligen と CVP 基剤を併用した、経鼻接種型の不活化全粒子 A 型インフルエンザワクチン(H5N1 株)は安全性が高く、従来の注射型ワクチンでは得られない粘膜の免疫応答を誘導できるだけでなく、血中への特異的抗体の産生誘導についても注射型と同等以上の有効性を持つものであることが確認された。本研究は今年度までの計画であるが、本ワクチンについては、次世代ワクチン候補として今後も臨床応用に向けて、ヒトで高い有効性を得られる接種方法、及び有効性の評価方法を開発するとともに、製造を想定した品質管理方法を確立し、実用化につなげていくことが有用であると考えられる。また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、安全で有効な粘膜ワクチンを開発できる目途が立った。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hasegawa H, Ichinohe T, Ainai 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.
- 2) 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) 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* 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, 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* 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.
- 9) 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., Ogasawara K. 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, 2010.
- 10) 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, Okamoto M, Warshauer D, Shult PA, 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, Kawaoka Y. In vitro and in vivo characterization of new sine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature* 460, 1021-1025, 2009.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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 Oas1b, of feral mouse-derived inbred strain MSM/Ms into the common strain C57BL/6J. *Jpn J Vet Res* 57, 89-99.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) 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 Pathogen* 5, e1000350.
- 20) 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.
- 21) Wada, T., Morishima, T., Okumura, A., Tashiro, M., Hosoya, M., Shiomi, M., Okuno, Y.: Differences in clinical manifestations of influenza-associated encephalopathy by age. *Microbiol Immunol* 53: 83-88, 2009.
- 22) 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* 27: 3121-3125, 2009.
- 23) Thongratsaku, S., Songserm, T., Poolkhet, C., Kondo, S., Yagi, H., Hiramatsu, H., Tashiro, M., Okada, H., 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). *Open Glycoscience* , 2:28-36, 2009.
- 24) 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* 14: 751-761, 2009 WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution
- 25) 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.* 3: 59-62, 2009.
- 26) Sriwilaijaroen, N., Wilairat, P., Hiramatsu, H., Takahashi, T., Suzuki, T., Ito, M., Ito, Y., Tashiro, M., Suzuki, Y.: Mechanisms of the action of povidone-iodine against human and avian influenza A viruses: its effects on hemagglutination and sialidase activities. *Virology Journal.* 6: 124, 2009.

- 27) Bertozzi, S., Kelso, A., Tashiro, M., Savy, V., Farrar, J., Osterholm, M., Jameel, S., Muller, C.P. :Pandemic flu: from front lines. *Nature* 461: 20-21, 2009.
- 28) Ujike, M., Shimabukuro, K., Mochizuki, K., Obuchi, M., Kageyama, T., Shirakura, M., Kishida, N., Yamashita, K., Horikawa, H., Kato, Y., Fujita, J., Tashiro, M., Odagiri, T., the working group of influenza virus surveillance in Japan. :Detection of Oseltamivir-resistant influenza viruses in Japan during the 2007-2009 influenza seasons *Emerging Infectious Dis.* (submitted)
- 29) Barr, I. G., McCauley, J., Cox, N., Daniel, R., Engelhardt, O. G., Fukuda, K., Grohmann, G., Hay, A., Kelso, A., Klimov, A., Odagiri, T., Smith, D., Russell, C., Tashiro, M., Webby, R., Wood, J., Ye, Z., Zhang, W., Writing Committee of the World Health Organization Consultation on Northern Hemisphere Influenza Vaccine Composition for 2009–2010
Epidemiological, antigenic and genetic characteristics of seasonal influenza A(H1N1), A(H3N2) and B influenza viruses: Basis for the WHO recommendation on the composition of influenza vaccines for use in the 2009–2010 Northern Hemisphere season. *Vaccine* 28: 1156–1167, 2010.
- 30) Wada H, Yasuda T, Miura I, Watabe K, Sawa C, Kamijuku H, Kojo S, Taniguchi M, Nishino I, Wakana S, Yoshida H, and Seino K. Establishment of an improved mouse model for infantile neuroaxonal dystrophy bearing a point mutation in *Pla2g6* which shows early disease onset. *Am J Pathol* 175: 2257-63, 2009.
- 31) 「経鼻吸収型インフルエンザワクチンの開発」, *Drug Delivery System* 25(1) 15-21 (2010)
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（札幌）2009 年 9 月
- 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（札幌）2009 年 9 月
- 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（東京）2009 年 10 月
- 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（東京）2009年10月
- （2009年、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（東京）2009年10月
- 6) 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）
- 7) 岡松正敏、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 第57回日本ウイルス学会学術集会（2009年、東京）
- 8) 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）
- 9) 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
- 10) 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）
- 11) 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）
- 12) 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57回日本ウイルス学会学術集会（2009年、東京）
- 13) 白倉雅之、信澤枝里、田代真人：リバーシジェネティクス(RG)法による新型インフルエンザワクチン製造株の作成 第57回日本ウイルス学会学術集会（東京）2009年10月
- 14) 原田勇一、高橋 仁、佐藤佳代子、信澤枝里、河野直子、板村繁之、田代真人、奥野良信、佐々木学、庵原俊昭、小田切孝人：沈降H5N1 インフルエンザワクチン接種者の野生型ウイルス株及び弱毒ワクチン株に対する抗体応答の評価 第57回日本ウイルス学会学術集会（東京）2009年10月
- 15) 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（東京）2009 年 10 月

16) 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（東京）2009 年 10 月

17) 岸田典子、小淵正次、高下恵美、徐 紅、氏家 誠、永田典代、岩田奈織子、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（東京）2009 年 10 月

18) 影山 努、中内美名、田代真人：新型インフルエンザウイルス(H1N1)核酸検出法の構築 第 57 回日本ウイルス学会学術集会（東京）2009 年 10 月

19) 小淵正次、氏家 誠、岸田典子、徐 紅、高下恵美、伊東玲子、松浦純子、菅原裕美、安樂 茜、江島美穂、田代真人、小田切孝人：2008/09 シーズンの季節性インフルエンザウイルス流行株と平成 21 年度のワクチン株 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月

20) 氏家 誠、島袋 梢、安樂 茜、江島美穂、小淵正次、岸田典子、徐 紅、高下恵美、伊東玲子、松浦純子、菅原裕美、田代真人、堀川博司、加藤裕美子、小口晃央、山崎

秀司、藤田信之、小田切孝人：2008/09 シーズンにおけるインフルエンザ(A/H1N1)オセルタミビル耐性株(H275Y*)の国内発生状況 第 57 回日本ウイルス学会学術集会（東京）2009 年 10 月

21) 清野研一郎：“NK T細胞を利用した新しい経鼻投与型インフルエンザワクチンの研究開発” 第 23 回日本臨床内科医学会、シンポジウム 2「臨床内科医・産業医のためのインフルエンザ対策」1) 新型インフルエンザ基調講演Ⅱ、大宮ソニックシティ、2009 年 10 月 11 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得（出願）

特許公開 2009-242367
「混合免疫賦活剤を含む新規ワクチン」

2. 実用新案登録

なし

Ⅱ. 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

研究代表者 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
田村 慎一 国立感染症研究所 感染病理部
澤 洋文 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター

研究要旨 インフルエンザウイルスの感染防御には感染の場である粘膜における分泌型 IgA 抗体に代表される粘膜免疫が重要な働きをする。ワクチン接種により粘膜を誘導するには粘膜投与型の経鼻ワクチンが有効である。本研究では経鼻インフルエンザワクチンのアジュバント量や付着性等の剤形と効果の関連を検討し臨床応用に向けた前臨床試験のための剤形を決定する事を目的とした。ワクチン液の粘膜への付着性を高めるワクチン基材を用い抗体誘導効果およびその効果の持続をヒトと同様に広い鼻腔を持つカニクイザルで検討した。アジュバント量を 1:10 から 1:20 に増やした群でより強い抗体応答がみられ更に粘膜への付着性を増した剤形を用いた場合付着性の低い剤形と比較し抗体応答が有意に高かった。アジュバントの増量及び付着性が粘膜免疫応答を増強する事が明らかとなった。粘膜免疫の変異株に対する交叉防御の優位性を考えるインフルエンザウイルス感染防御の為の粘膜投与型ワクチンの剤形の工夫への応用が考えられる。

A. 研究目的

インフルエンザウイルスの感染防御には感染の場である粘膜における分泌型 IgA 抗体に代表される粘膜免疫が重要な働きをする。ワクチン接種により粘膜を誘導するには粘膜投与型の経鼻ワクチンが有効である。本研究では高病原性鳥インフルエンザ(H5N1)の経鼻ワクチンの効果とアジュバント量や付着性等の剤形との関連を免疫系がヒトに近い霊長類を用いて検討する事を目的とする。最終的には経鼻粘膜投与型のインフルエンザワクチンの実用化に向け、剤形の決定、投与方法を決定する事を目的とする。

B. 研究方法

ワクチン株

試作ワクチンとして不活化全粒子ワクチン及びアジュバントとして二本鎖 RNA 製剤 Ampligen, ワクチン基材としてカルボキシビニルポリマー基剤 (CVP) を含有比率を変え用意した。高用量試作ワクチンは不活化全粒子 A 型インフルエンザワクチン(H5N1 株) (PR8-IBCDC-RG2 株 : A/Indo/5/2005 (H5N1) の弱毒株) を抗原とし、50 μ g HA/mL を含むも、アジュバントとして Ampligen を HA 抗原の 20 倍量(1mg/mL)添加するとともに、増粘剤として CVP 基剤 [添加後の濃度 : 0.55% CVP、1.2% L-アルギニン、1% グリ

セリン]を添加した。中用量・低用量群用のワクチンについては、抗原及び Ampligen の濃度を高用量群の3分の1または9分の1とした。CVP 基剤の最終濃度は各用量群用で同一とした。

動物

3~4 歳、体重 2,130~4,180g のカニクイザル *cynomolgus monkeys* (*Macaca fascicularis*) を用いた。カニクイザルはいずれもつくば霊長類センターで繁殖され国立感染症研究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とそれぞれの用量別免疫群に分けて 1 群 3 頭を用いて実験を行った。H5N1 ウイルスの感染実験は BSL3 実験室で行った。

ウイルス

本実験で使用されたインフルエンザウイルス A/H5N1 株は A/Indonesia/6/2005 (A/Indonesia/6/05)。A/Indonesia/6/05 は致死性 H5N1 インフルエンザ感染者から分離され 10 日齢の孵化鶏卵で増殖したものを使用した。これらのウイルスは -80°C で保存され MDCK 細胞を用いたプラークアッセイでウイルス価を調べた。

ウイルス価及び抗体価の測定

ウイルス価及び抗体価測定の為カニクイザルから血清を採取した。IgA 抗体及び IgG 抗体の抗体価は enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法を用いて測定した。ウイルス価は MDCK 細胞を用いたプラークアッセイ法で測定した。

粘膜アジュバント

経鼻投与の粘膜アジュバントとして合成二

本鎖 PolyI:PolyC₁₂U (Ampligen®) は Hemispherx Biopharma (Philadelphia, PA) より分与された。

ワクチン接種

カニクイザルはケタミン (0.1 ml/kg) により麻酔し 45µgHA の不活化全粒子 A 型インフルエンザワクチン (H5N1 株) (PR8-IBCDC-RG2 株 : A/Indo/5/2005 (H5N1) の弱毒株) を 10 倍量及び 20 倍量のアジュバント及び CVP 基剤と共に経鼻噴霧した。

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採血し抗体価を測定した。

C. 研究結果

試作ワクチンの剤形と中和抗体誘導能

臨床治験に向けた GLP 前臨床試験の為、いくつかの剤形の試作ワクチンを作成しその中和抗体誘導能をカニクイザルを用い調べた。ワクチン抗原として不活化全粒子 A 型インフルエンザワクチン (H5N1 株) (PR8-IBCDC-RG2 株 : A/Indo/5/2005 (H5N1)) を用いアジュバントとして二本鎖 RNA 製剤 Ampligen を用いた。ワクチン抗原とアジュバントの量比を 1:10 にした製剤と 1:20 にした製剤、また ワクチン基剤としてカルボキシビニルポリマー基剤 (CVP) を含有した製剤を用意した。ワクチン接種量はそれぞれ 45µgHA 相当のワクチン抗原を使用した。ワクチン基剤に用いたカルボキシビニルポリマー (CVP) は既に経鼻投与医薬品等で使われているものを使用、CVP 基剤は添加後の濃度 : 0.55% CVP、1.2% L-アルギニ