

ン、1% グリセリンを含む。各群 3 頭のカニクイザルに経鼻噴霧器を用い片鼻 250 $\mu$ l の試作ワクチンを両鼻に噴霧し 3 週間後に同量のワクチンで追加免疫した。それぞれの接種群は試作ワクチンの組成は 1) PR8-IBCDC-RG2 株:A/Indo/5/2005 (H5N1) 不活化全粒子 45 $\mu$ g+Ampligen 450 $\mu$ g, 2) PR8-IBCDC-RG2 株:A/Indo/5/2005 (H5N1) 不活化全粒子 45 $\mu$ g+Ampligen 450 $\mu$ g+CVP, 3) PR8-IBCDC-RG2 株 : A/Indo/5/2005 (H5N1) 不活化全粒子 45 $\mu$ g+Ampligen 900 $\mu$ g, 4) PR8-IBCDC-RG2 株 : A/Indo/5/2005 (H5N1) 不活化全粒子 45 $\mu$ g+CVP である。

それぞれの試作ワクチンをカニクイザルに経鼻で 2 回接種後最終免疫から 2 週間後に血清を採取し相同株である A/Indonesia/5/05 株、抗原性の異なる A/Hong Kong/483/97 株及び A/Vietnam/1194/04 株に対する中和抗体価を測定した。経鼻ワクチンによる免疫後血清中にはワクチン株と相同株である A/Indonesia/6/05 株(H5N1)ウイルスに対しては Ampligen10 倍使用群で 2<sup>3</sup> 倍以上 Ampligen20 倍使用群で 2<sup>4</sup> 倍以上であった。非相同株である A/Hong Kong/483/97 (H5N1)及び A/Vietnam/5/05 に対する中和抗体はほとんど認められなかった。試作ワクチンの経鼻接種で特に副反応は認められなかった。

#### 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 45 $\mu$ g+Ampligen 900 $\mu$ g を接種した群が最も高く続いて不活化全粒子 45 $\mu$ g+Ampligen 450 $\mu$ g+CVP、不活化全粒子 45 $\mu$ g+Ampligen 450 $\mu$ g、不活化全粒子 45 $\mu$ g+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 45 $\mu$ g+Ampligen 900 $\mu$ g を接種した群と不活化全粒子 45 $\mu$ g+Ampligen 450 $\mu$ g+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。

#### 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 $\times$ 2<sup>6</sup> 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 $\times$ 2<sup>3</sup> 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。

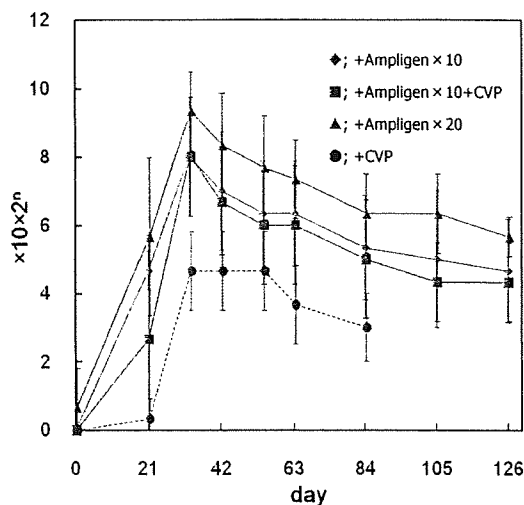


図 1 試作ワクチン経鼻接種後の血清中 IgG 抗体価

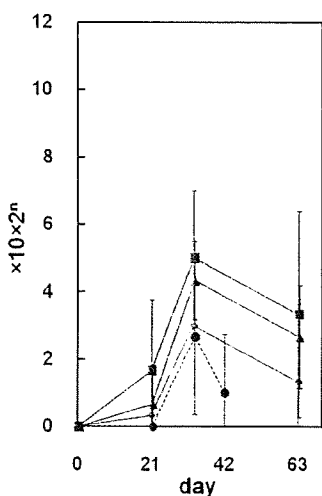


図 2 試作ワクチン経鼻接種後の血清中 IgA 抗体価

#### 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し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。その結果アジュバントに用いている二本鎖 RNA 製剤 Ampligen の量は不活化ワクチンに対し 20 倍量加えた方が 10 倍量と比較し高い抗体価が得られた、さらにアジュバント量が一定の場合粘膜により付着する剤形の方が粘膜免疫を担う IgA 抗体誘導能に優れている事があきらかとなった。以上から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。

#### 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。不活化インフルエンザウイルス粒子を抗原とし二本鎖 RNA をアジュバントに用いた。アジュバント量は不活化抗原の 20 倍量のアジュバント用いた方が 10 倍量と比較して抗体応答が高かった。また粘膜への付着を促すワクチン基材の添加により粘膜免疫を担う IgA 抗体応答が促進する事が明らかとなり基材の添加が感染防御に有利である事が示唆された。更に免疫の持続期間については少なくともワクチン接種後 1 年間は持続が認められる事が示唆された。

#### F. 健康危険情報

とくになし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 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) 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（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、田代眞人、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、田代眞人、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、田代眞人、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

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、田代眞人：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

#### 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

## 新型インフルエンザウイルス(H1N1)v2009 ワクチン候補株の開発

研究分担者 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長  
研究協力者 信澤枝里 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四室長  
白倉雅之 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員

**研究要旨** 2009年4月、新型インフルエンザウイルス(H1N1)2009(新型ウイルス)による世界的大流行が始まり、安全かつ有効なワクチン株の選択、製剤化が緊急の課題となった。本研究では、鶏卵での増殖性、抗原量収量が高い、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。その結果、(1)HAにQ226R変異を持ち、(2)遺伝子構成が、HA遺伝子のみ新型ウイルス由来の7:1ウイルスが、増殖性、抗原量収量のいずれの点でも優れ、抗原性も維持していた。しかし、抗原量収量は、昨年の季節性インフルエンザワクチン候補株(H1N1)の約50%に留まり、更なる改善が望まれる。

### A. 研究目的

2009年4月、新型インフルエンザウイルス(H1N1)2009(新型ウイルス)の世界的大流行が始まった。新型インフルエンザ対策として、安全かつ有効なワクチンを開発し、供給することは、緊急の課題となった。しかし、ブタインフルエンザウイルスに由来する新型ウイルスは、鶏卵での増殖性が低く、ワクチン種株作出上、障害となった。WHO コラボレーションセンターでは、通常の遺伝子再集合ウイルス作出手法により、新型ウイルスと鶏卵での増殖性の高いA/PR8/34株との間で、遺伝子再集合ウイルスの作出を試みた。作出されたワクチン候補株は鶏卵で継代を繰り返すことで、増殖性に改善はみられた。しかし、抗原量は昨シーズンの季節

性ウイルスワクチン株の約30%と低かった。一方、リバースジェネティクス(RG)法を用いれば、任意の変異の導入や任意の遺伝子構成が可能となり、よりワクチン株に適したウイルスを迅速に作出することができる。本研究では、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

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)

プラスミド DNA: ① RNA 合成用プラスミド DNA—HA, NA, M 遺伝子—新型インフルエンザウイルス由来 cDNA を RNA 合成用プラスミドベクターに導入し、無菌的に精製した後、RG ウイルス作製に使用した。A/PR/8/34 株に由来する 8 遺伝子 cDNA が組み込まれた RNA 合成用プラスミド DNA (東大医科研 河岡博士より分与) は、GMP 準拠環境で精製された。(外部委託) ② 蛋白質発現用プラスミド DNA—PR8 株に由来する PB2, PB1, PA, NP 遺伝子が組み込まれた DNA (東大医科研 河岡博士より分与) は GMP 準拠環境で精製された。(外部委託) ③ 細胞への遺伝子導入—上記 12 種類のプラスミド DNA を LLCMK2 細胞 (化血研により GMP 準拠環境下で管理されていた) に導入した。12 種類の DNA のうち HA, NA, M 遺伝子 RNA 合成用プラスミド DNA は、新型ウイルス、PR8 株いずれか由来とし、その組み合わせにより 5:3、6:2、7:1 の遺伝子再集合ウイルス—NIIDRG-1, 3, 5, 6, 7 を作出した (図 1)。また、鶏卵での増殖性を高くする変異 (Q226R) を HA 遺伝子に導入したプラスミドもウイルス作出に用いた (NIIDRG-5, 6, 7)。遺伝子導入後、48 時間後の培養上清を発育鶏卵に接種し、接種後 2 日後の漿尿液の HA 価を測定し、発育鶏卵におけるウイルスの増殖性、抗原性、遺伝子の安定性を検討した。

### C. 研究結果

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 (図 1 参照)。

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 (図 1 参照)。

4. 作出したウイルスの抗原性を、フェレットの感染血清を用いて血球凝集阻止反応で検討した結果、いずれも新型ウイルス Cal7、A/Narita/1/2009 および 新型ワクチン候補株 NYMC-179A に対する血清と特異的な高い反応性を示し、昨シーズンのワクチン候補株に対する血清とは反応性を示さなかった (表参照)。

5. 抗原量収量は、ウイルスの増殖性に対応して増加するが、増殖性が最も高い NIIDRG-7 ウイルス (7:1 構成、HA:226R 変異) も、昨シーズンのワクチン候補株に比し、抗原量の収量は約 50% であった。

### D. 考察

今回の新型ウイルスは、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。昨シーズンのワクチン候補株 A/Brisbane/59/07 (H1N1) 株 (A/Brisbane07 株) と同程度の増殖性を示す RG ウイルスを作出しても抗原量の収量は、A/Brisbane07 株の 50% 程度に留まった。また、今回作出したワクチン株では、HA に加え Cal7 の遺伝子 (NA, M) を加えるに従い、増殖性の低下が見られたことから、Cal7 の遺伝子構成が必ずしも鶏卵での増殖性

に適していない可能性が示唆された。

## E. 結論

新型ウイルスワクチン候補株を RG 法により作出した結果、増殖性、抗原量収量、抗原性が最も適した株として、7:1 構成で HA に 226R 変異を有する NIIDRG-7 株が作出した。しかし、同株の抗原量収量は、昨シーズンワクチン候補株の 50% 程度にすぎず、ワクチン生産の観点からは、さらに収量が改善された株の作出が望まれる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

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.

Takahashi, Y., Hasegawa, H., Hara, Y., Ato, N., Ninomiya, A., Takagi, H., Odagiri, T., Sata, T., Tashiro, M., Kobayashi, M. :Protective immunity afforded by H5N1 (NIBRG-14) – inactivated vaccine requires both antibodies against hemagglutinin and neuraminidase in mice. *J. Infect. Dis.* 199; 1629-1637, 2009

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

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.

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.

Ichinohe, T., Tashiro, M., Sata, T., Hasegawa, H. :PolyI:PolyC<sub>12</sub>U adjuvant-combined intranasal vaccine protects mice against highly pathogenic H5N1 influenza virus variants. *Vaccine* 27; 6276-6279, 2009

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

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.

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

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

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 an intranasal vaccine with extracts of mushroom mycelia J. Med. Virol. 82: 128-137, 2010.

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)

Aina, A., Ichinohe, T., Tamura, S. Kurata, T., Sata, T., Tashiro, M., Hasegawa, H.:Zymosan enhances the mucosal adjuvant activity of Poly(I:C) in a nasal influenza vaccine, J. Med. Virol.82:476-484.2010

Nakajima, N., Hata, S., Sato, Y., Tobiume, M., Katano, H., Kaneko, K., Nagata, N., Kataoka, M., Aina, A., Hasegawa, H., Tashiro, M., Odai, T., Urasawa, N., Ogino, T., Hanaoka, H., Watanabe, M., Sata, T. :First autopsy case with pandemic influenza (A/H1N1pdm) virus infection in Japan: Detection of high copy number of the virus in type II alveolar epithelial cells by pathological and virological examination. Jpn. J. Infect. Dis.63;67-71.2010

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.

## 2. 学会発表

1. 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
2. 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

3. 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

4. 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

5. 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

6. 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

7. 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

8. 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

#### G. 知的所有権の取得状況

- |           |   |
|-----------|---|
| 1. 特許取得   | 無 |
| 2. 実用新案登録 | 無 |
| 3. その他    | 無 |

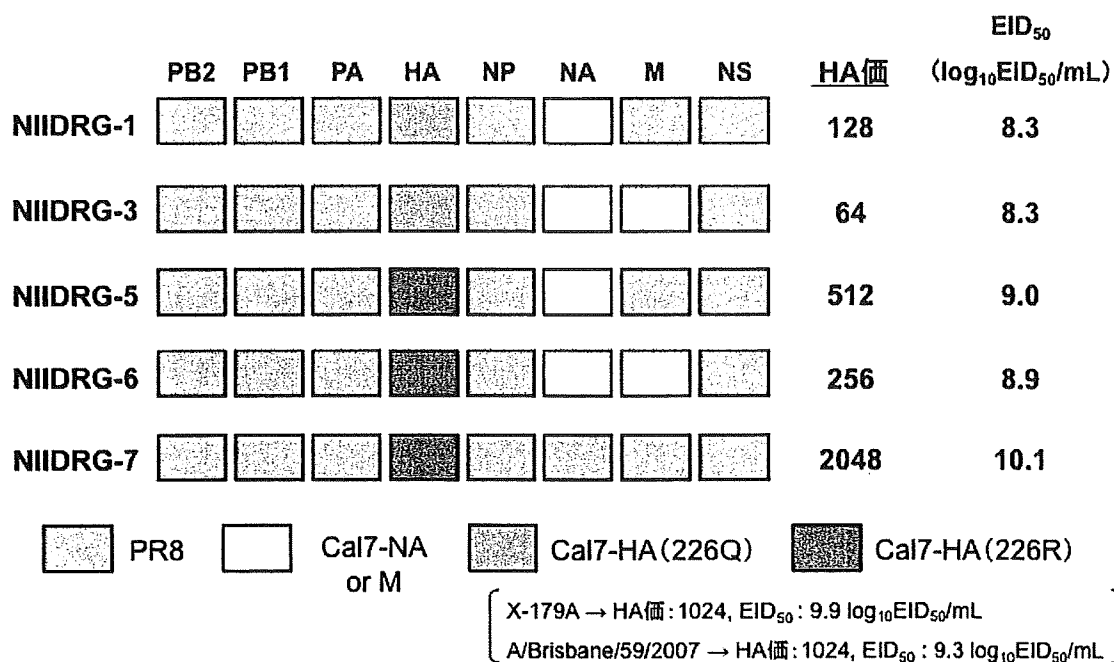


図 1. NIIDRG ウイルスの遺伝子構成と増殖性

Reference Antigens	Passage history	Ferret antisera			
		A/Brisbane/59/2007	A/California/07/2009	A/Narita/1/2009	NYMC X-179A
A/Brisbane/59/2007	E4	1280	< 10	< 10	< 10
A/California/07/2009	E2/E4	< 10	2560	5120	2560
A/Narita/1/2009	E3	< 10	2560	10240	2560
NYMC X-179A	E7/E1/E6	< 10	5120	10240	5120
Test Antigens					
NIIDRG-1	LLC1E2	< 10	5120	10240	5120
NIIDRG-3	LLC1E2	< 10	2560	5120	2560
NIIDRG-5	LLC1E4	< 10	5120	10240	5120
NIIDRG-6	LLC1E5	< 10	2560	5120	2560
NIIDRG-7	LLC1E5	< 10	2560	2560	2560

表 NIIDRG ウイルスの抗原解析

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

（分担）喜田 宏 北海道大学大学院獣医学研究科 動物疾病制御学講座教授

**研究要旨：** ヒトと動物のインフルエンザワクチンの開発に有用なウイルス株を収集するために、動物インフルエンザのグローバルサーベイランスを継続実施している。2009年は日本、モンゴル、ベトナム、香港において採取された家禽、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。H9亜型ウイルスは、アジア・中東地域の家禽で流行が続いており、パンデミックインフルエンザウイルスの候補の1つに考えられている。そこで、本年分離したH9N2ウイルスに加え、当教室で系統保存しているH9ウイルスの遺伝子と抗原性を解析するとともに、発育鶏卵における増殖性を調べた。その結果、A/duck/Hokkaido/49/1998 (H9N2) 株をワクチン製造用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/Hong Kong/1073/1999 (H9N2) 株で攻撃した。その結果、ワクチン接種により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抑制され、試製ワクチンの発症防御効果が確認された。以上の成績より、A/duck/Hokkaido/49/1998 (H9N2)はH9インフルエンザウイルスワクチン製造用候補株として有用であることが明らかとなった。

**A. 研究目的**

アジアから家禽と野鳥に感染が拡大した高病原性鳥インフルエンザウイルスが、新型インフルエンザウイルスとして出現し、パンデミックを起こすことが危惧されている。同様にH9亜型ウイルスもアジア地域で広く流行しており、ヒトへの感染例も報告されている。パンデミックに備えたワクチンを準備するためには、ワクチン株と流行株の抗原性が多少異なる場合でも、高い免疫効果を示す必要がある。本研究で開発・実用化を目指す粘膜ワクチンは、全身の中和抗体のみならず、呼吸器粘膜局所の免疫を賦活してインフルエンザウイルスの感染をその侵入門戸で防御することを目的とする。

本研究の目的は安全で有効な粘膜ワクチンを開発するために、野生水禽、家禽とヒトから分離されたインフルエンザウイルス株の遺伝子、抗原性、発育鶏卵と培養細胞における増殖性、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することである。

**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H9N2ウイルス株に加え、当教室で系統保存しているH9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H9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、H9ウイルスの抗原性を広くカバーできるウイルス株を選抜した。また、これらのH9ウイルスを発育鶏卵にそれぞれ接種し、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完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/Hong Kong/1073/1999 (H9N2)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。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。

H9亜型インフルエンザウイルスは、G1、G9、韓国および北米系統の4系統に分類される。韓国系統のA/duck/Hokkaido/49/1998 (H9N2)は、異なる系統のH9ウイルスHAに対する免疫を誘導し、鶏胚で高い増殖性を示すことがわかった。このウイルス株から不活化全粒子ワクチンを試製し、マウスに接種した。その後A/Hong Kong/1073/1999 (H9N2)で攻撃したところ、2 $\mu$ gタンパク量のワクチンを接種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/duck/Hokkaido/49/1998 (H9N2) 株を用いて試製した不活化全粒子ワクチンはH9ウイルス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粘膜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、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. 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 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.
- (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., Okamoto, 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., Okamoto, 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 Oasl1, 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. Sodnom darjaa、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）

**G. 知的財産の出願、登録状況**

予定なし。

## 経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンの臨床応用に関する研究

研究分担者 真鍋貞夫 （財）阪大微生物病研究会 研究・技術部長  
研究協力者 谷本武史 （財）阪大微生物病研究会 研究・技術部 研究グループ 課長補佐

**研究要旨** 昨年度の本研究で、鼻粘膜での免疫応答を増強するため、二本鎖 RNA (dsRNA) である AmpligenR [Poly (I:C12U)] をアジュバントとし、アレルギー治療薬にも応用されてい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。これについて、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。そこで、本年度はこの試作ワクチンと同様の組成のワクチンについて、マウスを用いた経鼻接種試験で用量・投与回数による免疫応答を確認した。検討したいずれの用量 (0.033~0.3  $\mu$ g HA) でも、2 回以上の接種により鼻腔粘膜と血清の両方に感染防御に有用なレベルの抗体産生を誘導できることが確認された。また、このときの血清の獲得免疫抗体価は、無添加のワクチンを筋肉内に接種したものと同等であった。

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  $\mu$ 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。

### A. 研究目的

インフルエンザは、毎年抗原を変化させつつ流行を繰り返すウイルス感染症である。本邦において、その予防のためのワクチンは皮下接種するもののみが認可されている。このワクチン接種によって血清中に中和活性を持つ IgG 抗体が誘導されるため、肺炎などの重症化の予防には有効性が高い。しかし、感染箇所である上

気道粘膜においては、IgA が感染防御の主体であり、これは皮下接種では誘導されないため、感染防御効果は十分とは言えない。そのため、感染を防御できるワクチンの開発が長年の課題となっている。粘膜への免疫誘導のためには、粘膜への抗原刺激が必須であるが、抗原単独では大量の抗原を必要とし、現実的ではない。そこで、アジュバントを添加して実用に足るワク

チンの開発を目指すこととなった。昨年度、アジュバント添加ワクチンにカルボキシビニルポリマー基剤 (CVP) を併用することで、粘膜での保持性が高まり、免疫応答がさらに向上したことが確認されたため、本年度はその有効性・安全性を調査し、実用性を評価することとなった。

## 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  $\mu$ 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  $\mu$ g HA/head・0.1  $\mu$ g HA/head・0.3  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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 生理食塩水を 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 Cr1:CD(SD) ラットに、 $50 \mu\text{L/body/day}$  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 Cr1:CD(SD) ラットに、 $10$  および  $100 \mu\text{L/body/day}$  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 Cr1:CD(SD) ラットに、 $10 \mu\text{L/body/day}$  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  $50 \mu\text{L/body}$  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  $50 \mu\text{L/body}$  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  $0.2 \text{ mL/body/day}$  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 ( $pO_2$ 、 $pCO_2$ 、ヘモグロビン  $O_2$  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)

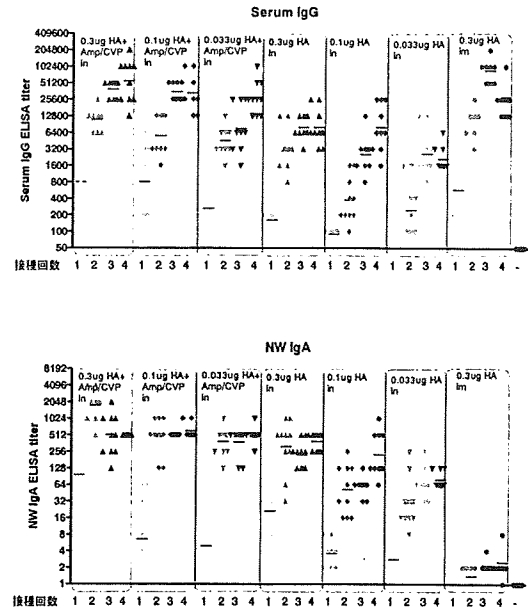
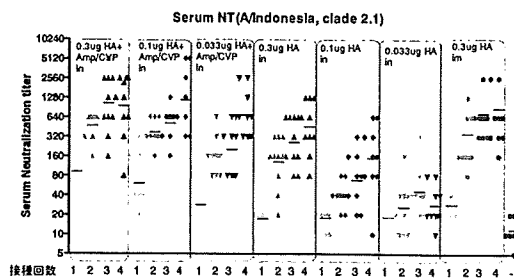
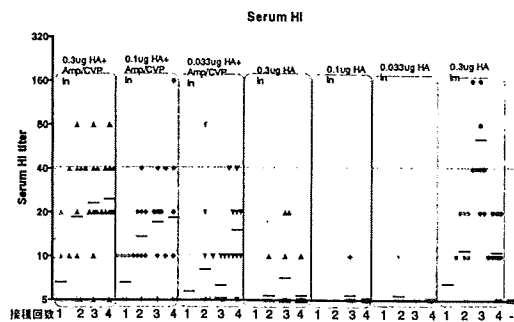
「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(文部科学省告示第 71 号、平成 18 年 6 月 1 日) に基づいた試験を行った。

## C. 研究結果

### 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 基剤を含む試作ワクチンを経鼻接種した群での免疫獲得は以下のグラフのようになった。(血中の抗体価:上段 3 種、鼻腔粘膜の抗体価:最下段)



これにより、次のようなことがわかった。

- ① 血清の獲得抗体レベルは、用量によるが、いずれの場合も 2 回以上の接種で感染防御レベルに達する個体が現れ、接種 3 回で頭打ちとなった。また、その抗体価は無添加ワクチンを筋肉内接種したものに匹敵する強度で、中和抗体価は感染防御に有用なレベルとなっていた。
- ② 鼻粘膜の特異的 IgA 抗体価は、概ね接種 2 回で頭打ちとなった。経験的な感染防御レベルである 32 単位の抗体価を獲得するには、0.3  $\mu$ g HA(最大用量)群では 1 回、その他は 2 回接種が必要であった。
- ③ 獲得免疫レベルを無添加のワクチンを経鼻接種したものと比較すると、抗原量を 1/9 としても同等以上の免疫応答が得られていた。

### 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

BK-NIF 投与の結果、投与日および観察期間を通して、死亡の発生はなく、全例で異常は認められなかった。体重では、投与日および観察期間を通して、BK-NIF 群は AD-C

群および対照群とほぼ同様の増加推移を示した。14日の観察期間終了後の剖検において全例で被験物質投与に起因した変化は認められなかった。鼻腔、喉頭、咽頭、肺（気管支を含む）、気管、食道における病理組織学的検査のいずれにおいても、全例で被験物質投与に起因した変化は認められなかった。

## 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投与の結果、各群の雌雄全例で、投与期間を通して死亡の発生はなく、一般状態に異常は認められなかった。体重、摂餌量、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では、BK-NIF群およびAD-C群とも被験物質およびアジュバント対照物質投与の影響は認められなかった。

## 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投与の結果、BK-NIF 100  $\mu$ L/body 群の雄1例および雌2例、AD-C群の雄4例が投与後6時間または投与後1日に死亡した。一般状態では、死亡例を含めBK-NIF 100  $\mu$ L/body 群およびAD-C群で雌雄とも投与後1時間あるいは投与後3時間から主に活動性低下、皮膚潮紅、流涙および軟便が認められたが、生存例では投与後1または2日までにはいずれも消失した。BK-NIF 10  $\mu$ L/body 群でも、投与後3時間に皮膚潮紅または軟便が雌雄各1例のみにみられたが、いずれも投与後6時間には消失した。そのほか、投与部位の変化として、BK-NIF 100  $\mu$ L/body 群の雌2例で尾の紫色化および黒色化がみられ、最終的に断節した。体重では、BK-NIF群の雌雄およびAD-C群の雌雄で投与後1日に減少したが、投与後3日以

降は体重増加がみられ、対照群とほぼ同様の推移を示した。剖検では、BK-NIF 100  $\mu$ L/body 群およびAD-C群の死亡例では腺胃粘膜の暗赤色化がみられたが、生存例では、投与部位を除く器官および組織の肉眼的観察において、異常は認められなかった。

## 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投与の結果、各群の雌雄全例で、投与期間を通して死亡の発生はなく、一般状態に異常は認められなかった。体重、摂餌量、眼科的検査、尿検査、血液学的検査および剖検では、BK-NIF群およびAD-C群とも被験物質およびアジュバント対照物質投与の影響は認められなかった。血液生化学的検査では、BK-NIF群の雌雄で $\gamma$ -グロブリン比の高値がみられた。器官重量では、BK-NIF群およびAD-C群の雌雄で脾臓の絶対および相対重量の高値が認められた。病理組織学的検査では、BK-NIF群の雌雄およびAD-C群の雌で、脾臓のリンパ濾胞の過形成が認められた。

## 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

BK-NIFを片側鼻腔に経鼻投与したところ、投与後24時間までラットの一般症状および行動に影響を及ぼさなかった。

## 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

BK-NIFを経鼻投与したところ、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Penhに影響を及ぼさなかった。

## 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 投与の結果、各群の雌雄全例で、投与期間を通して死亡の発生はなく、一般状態、体重、摂餌量、心電図、体温、眼科的検査所見、尿検査項目、血液学的検査項目、血液生化学的検査項目、器官重量、剖検所見および病理組織学的検査所見のいずれにも異常は認められなかった。また、AD-C 投与群および媒体対照群においても、いずれの検査項目にも異常は認められなかった。

#### 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]

BK-NIF は、投与後 24 時間まで収縮期血圧、平均血圧、心拍数及び心電図(PR 間隔、QRS 時間、QT 間隔および QTc)に影響を及ぼさなかった。また、血液ガスのパラメータ ( $pO_2$ 、 $pCO_2$ 、pH およびヘモグロビン  $O_2$  saturation)にも影響を及ぼさなかった。

### D. 考察

#### 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  $50 \mu\text{L/body/day}$  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  $50 \mu\text{L/body}$  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  $100 \mu\text{L/body/day}$  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  $10 \mu\text{L/body}$  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。