

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。

以上の結果をまとめ、ヒトの予定投与量(成人で[15 μg HA/dose + Ampligen 300 μg] /dose, 成人のヒト体重を 50kg とする)と対比すると以下の表のようになった。

動物	試験	平均体重(試験開始時)	投与量(μL)	体重あたり投与量(μg HA/kg)	ヒトとの投与量比 (15 μg HA/50kg = 0.3 μg/kgを基準として)	結果
ラット	単回経鼻投与	120	5	12.5	42	毒性なし
ラット	反復経鼻投与	120	50	125.0	417	毒性なし
ラット	単回静脈内投与	150	10	20.0	67	毒性なし
ラット	反復静脈内投与	150	100	200.0	667	毒性確認
ラット	一般状態	120	50	125.0	417	異状なし
ラット	呼吸機能	120	50	125.0	417	異状なし
サル	反復経鼻投与	2000	200	30.0	100	毒性なし
サル	心血管呼吸器系	3000	200	20.0	67	異状なし

これらのことから、経鼻接種により、ヒトで有害事象が見られると予想される投与量は、予定投与量の 100 倍以上であると考えられた。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

「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

なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特許公開 2 0 0 9 - 2 4 2 3 6 7

「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

3. その他

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

分担研究者 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・副センター長

研究要旨 NKT 細胞を活性化する α -galactosylceramide (α -GalCer) をアジュバントとした経鼻インフルエンザワクチンの開発に向けて、鶏卵培養または組織培養由来のウイルス抗原と α -GalCer を用い、抗体産生、T 細胞反応を指標に投与量に関して詳細な検討を行った。その結果、 α -GalCer およびウイルス抗原それぞれ 0.05 ~ 0.1 μ g の投与で免疫反応がみられた。当初実験に用いた 2 μ g の 1/10 量である 0.2 μ g ずつの投与で再現性よく確実に T 細胞反応ならびに抗体産生が見られることが確認された。また、組織培養を用いたパンデミックインフルエンザ H5N1 抗原の培養方法、精製方法を確立した。

A. 研究目的

我々は以前の研究により NKT 細胞を活性化する糖脂質 α -galactosylceramide (α -GalCer) をアジュバントとして経鼻投与した場合、マウスにおいて有効な抗インフルエンザ免疫反応を誘導できることを見出した (Kamijuku, et al. Mucosal Immunology 2008)。本研究では α -GalCer を利用した経鼻インフルエンザワクチンの開発に向け、投与量や安全性に関する検討を行い、前臨床試験への準備を行う。

B. 研究方法

北里研究所にて作製された鶏卵培養ウイルスをホルマリンおよび熱により不活化したインフルエンザ全粒子不活化ワクチン (A 型; H1N1, H3N2, B 型) と α -GalCer の投与量を変えて BALB/c マウスの鼻腔内に 3 週間間隔で 2 回投与し、最終投与から 2 週後に血清、および鼻洗浄液を回収し、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 抗体応答を ELISA により測定した。また、脾臓か

ら T 細胞を抽出し、抗原特異的な T 細胞の反応を 3 H 取り込み法にて検討した。陽性コントロールとしては、CTB* (0.1 μ g) 併用鶏卵培養スプリットワクチン (0.1 μ g) を用いた。

ウイルスの組織培養に関する検討として ATCC (American Type Culture Collection) より MDCK 細胞を導入し、無血清培地を用いて継代培養を行い、マスター・セル・バンク (MCB) 及びワーキング・セル・バンク (WCB) を作製した。更に、両バンクについては、WHO で規定された要求事項に従って細胞特性試験、細胞安全性試験を一部実施した。

(倫理面への配慮)

動物実験倫理規定を深く理解し、動物実験委員会の承認を得た後動物実験指針等を遵守して実施した。そのうえで「動物の愛護および管理に関する法律」(昭和 48 年法律第 105 号)、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」(昭和 55 年 3 月 27 日総理府告示第 6 号) の基本原則を適用した。

C. 研究結果

以前の研究ではスプリットワクチンならびに α -GalCer とともに一回あたり 2.0 μ g の投与量で実験を行った (Kamijuku, et al. *Mucosal Immunology* 2008)。今回はこれから各試薬の投与量を減少させ、抗体産生と T 細胞反応を検討した。

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 抗体応答を有意に増強させた。その応答は陽性コントロールである CTB*併用スプリット HA ワクチンに匹敵していた。T 細胞反応については、第 3 者抗原である OVA には全く反応しない条件で、免疫に用いた HA 抗原特異的に有意な増殖反応が見られることを指標に検討を行ったところ、抗原・ α -GalCer とともに 0.2 μ g 投与した際に再現性よく確実に T 細胞の反応が検出された。

有効な防御免疫応答誘導に必要な最小有効ワクチン量およびアジュバント量について評価した。検討には全粒子不活化ワクチンとして A 型; H1N1 株を用いた。ホルマリンおよび熱処理により不活化した全粒子不活化ワクチンの場合、アジュバントの併用なしにワクチン単独でも抗体応答誘導能を持つ。本検討においても全粒子不活化ワクチンの投与量が 0.05~0.2 μ g と増加するに従って、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 抗体応答ともに、投与量依存的な応答が見られた。さらに、その応答は α -GalCer を粘膜アジュバントとして添加することにより、何れの投

与量でもワクチン単独と比較して増強された。今回検討を行った不活化全粒子ワクチンの最小量である 0.05 μ g の投与量でも、 α -GalCer と併用することにより有意な特異的抗体応答の増強がみられた。そして今回検討に用いたアジュバント α -GalCer の最小量である 0.2 μ g でも、その応答は陽性コントロールである CTB*添加スプリット HA ワクチンに匹敵した。

無血清培地とマイクロキャリアを用いたパーフュージョン法による高密度培養法で、MDCK 細胞の培養条件を検討し、小規模だけでなく 200L スケールでの培養も可能であった。

パーフュージョン法を用いた高密度培養による MDCK 細胞にインフルエンザウイルス (季節性株、H5N1 株) を感染させ、ウイルス培養を行った結果、発育鶏卵と同等或いはそれ以上の高い感染価を得ることが出来た。

D. 考察

当初の報告時に比べ抗原ならびに α -GalCer とともに 1/40~1/10 の投与量で抗体産生ならびに T 細胞反応が見られ、再現性よく確実にこれらの反応を得ることを考えると、1/10 量である 0.2 μ g 程度が妥当であると考えられた。実際にヒトに投与する際にも α -GalCer の併用により抗原量は現在よりも少ない投与量で生体防御効果が得られると考えられた。また、本年度の検討により今なお脅威である H5N1 型インフルエンザの MDCK 細胞への感染によるウイルス精製法が確立できた。パンデミック時の対応も含め、この方法の標準化によりインフルエンザ抗原の迅速な調製法の確立が期待された。

E. 結論

α -GalCer をアジュバントとして用いた場合、スプリット抗原、 α -GalCer とともに 0.2 μ g

の投与量で再現性よく抗原特異的な抗体産生および T 細胞反応が観察された。MDCK 細胞を用い、H5N1 型インフルエンザウイルスの精製法が確立された。

F. 健康危険情報

(総括研究報告書に記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

2. 学会発表

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（予定を含む。）

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

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
喜田 宏	パンデミックインフルエンザと鳥インフルエンザの関係	鈴木宏、松本慶蔵編	インフルエンザの最新知識 Q & A 2009	医薬ジャーナル社	日本	2009	27-28

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
Hasegawa H, Ichinohe T, Ainai A, Tamura S, Kurata T	Development of an inactivated mucosal vaccine for H5N1 influenza virus.	Ther Clin Risk Manag	5(1)	125-32	2009
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)	1629-37	2009
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	27(45)	6276-9	2009
Sasaki T et al.	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	5174-77	2009
Simulundu E et al.	Characterization of H3N6 avian influenza virus isolated from a wild white pelican in Zambia.	Arch Virol	154	1517-22	2009
Tsuda Y et al.	Factors responsible for plaque formation of A/duck/Siberia/272/1998 (H13N6) influenza virus on	Virus Res	140	194-8	2009

	MDCK cells.				
Yoshida R et al.	Cross-protective potential of a novel monoclonal antibody directed against antigenic site B of the hemagglutinin of influenza A viruses.	PLoS Pathogen	5	e1000350	2009
喜田 宏	鳥,ブタ,そしてパンデミックインフルエンザにいかに対応すべきか	INFECTIO N FRONT	17	16-8	2009
喜田 宏	鳥,ブタ,そしてパンデミックインフルエンザ:実はすべてインフルエンザ	月刊薬事	51	51-5	2009
岡松正敏、喜田 宏	A型インフルエンザウイルスと動物社会	治療学	43	14-6	2009
磯田典和、迫田義博、喜田 宏	H5 亜型ウイルスに対する鳥インフルエンザワクチンの開発	化学と生物	47	302-4	2009
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 Influenza Season.	Jpn J Infect Dis	62	83-6	2009
Takahashi Y, Hasegawa H, Hara Y, Ato N, Ninomiya Ai, 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	1629-37	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	83-8	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	3121-5	2009

Thongratsaku S, Songserm T, Poolkhet C, Kondo S, Yagi H, Hiramatsu H, Tashiro M, Okada H, Kato K, Suzuki Y	Determination of <i>N</i> -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
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	751-61	2009
WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group: Brown IH, Capua I, Cattoli G, Chen H, Cox N, Davis T, Donis RO, Fouchier RAM, Garten R, Guan Y, Kawaoka Y, Mackenzie J, McCauley J, Mumford E, Olsen C, Perdue M, Russell CA, Smith C, Smith D, Smith GJD, 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.	Influenza and Other Respiratory Viruses	3	59-62	2009
Sriwilaijaroen N, Wilairat P, Hiramatsu H, Takahashi T,	Mechanisms of the action of povidone-iodine against human and avian influenza A viruses: its effects on	Virology Journal	6	124	2009

Suzuki T, Ito M, Ito Y, <u>Tashiro M</u> , Suzuki Y	hemagglutination and sialidase activities.				
Bertozzi S, Kelso A, <u>Tashiro M</u> , Savy V, Farrar J, Osterholm M, Jameel S, Muller CP	Pandemic flu: from front lines.	Nature	461	20-1	2009
Wada H, Yasuda T, Miura I, Watabe K, Sawa C, Kamijuku H, Kojo S, Taniguchi M, Nishino I, Wakana S, Yoshida H, <u>Seino K</u>	Establishment of an improved mouse model for infantile neuroaxonal dystrophy bearing a point mutation in <i>Pla2g6</i> which shows early disease onset.	Am J Pathol	175	2257-63	2009
Ichinohe T, Ainai A , Nakamura T , Akiyama Y, Maeyama J, Odagiri T, <u>Tashiro M</u> , Takahashi H, Sawa H, Tamura S, Chiba J, Kurata T, Sata T, <u>Hasegawa H</u>	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
Ainai A, Ichinohe T, Tamura S, Kurata T, Sata T, <u>Tashiro M</u> , <u>Hasegawa H</u>	Zymosan enhances the mucosal adjuvant activity of Poly(I:C) in a nasal influenza vaccine.	J Med Virol	82(3)	476-84	2010
Tamura S, <u>Hasegawa H</u> , 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

Nakajima N, Hata S, Sato Y, Tobiume M, Katano H, Kaneko K, Nagata N, Kataoka M, Ainai A, <u>Hasegawa H</u> , <u>Tashiro M</u> , 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
Takiyama A, Wang L, Tanino M, Kimura T, Kawagishi N, Kunieda Y, Katano H, Nakajima N, <u>Hasegawa H</u> , 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)	72-4	2010
Barr IG, McCauley J, Cox N, Daniel R, Engelhardt OG, Fukuda K, Grohmann G, Hay A, Kelso A, Klimov A, Odagiri T, Smith D, Russell C, <u>Tashiro M</u> , Webby R, Wood J, Ye Z, Zhang W	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	1156–67	2010
谷本武史	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

