

200940020B

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

粘膜投与等の新投与経路ワクチン研究における
品質管理に関する研究

平成19年度～21年度 総合研究報告書

研究代表者 板村繁之

平成22（2010）年 3月

目 次

I. 総合研究報告

粘膜投与等の新投与経路ワクチン研究における品質管理に関する研究	-----	1
板村繁之		

平成19～21年度厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
総合研究報告書

粘膜投与等の新投与経路ワクチン研究における品質管理に関する研究

研究代表者 板村繁之 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 第3室長

研究要旨

経鼻接種による粘膜免疫を誘導する粘膜ワクチンが開発されれば、従来感染阻止のできなかった急性呼吸器感染症などに対して発病予防だけでなく感染予防や流行阻止に有効なワクチンの実現が期待される。また、新型インフルエンザに対するワクチンとしても高い有効性が期待される。本研究では、アジュバント添加不活化インフルエンザ経鼻接種粘膜ワクチンを新しい投与経路ワクチンのモデルとし、安全性が高く高品質のワクチンを製造するために必要な品質管理方法の確立を目的とし、以下のような成果を得た。

(1) アジュバント添加経鼻接種不活化インフルエンザワクチンの製剤化を試み、一定の安定した製剤とすることができた。

(2) 経鼻接種ワクチンのアジュバントの安全性について経鼻連続投与及び頭蓋内直接投与の方法で粘膜アジュバント候補である合成二本鎖 RNA, poly(I:C)を調べ、コントロールのPBSと同等の毒性であることがわかった。

(3) 合成二本鎖 RNA をアジュバントとした高病原性鳥インフルエンザ (A/H5N1) に対する全粒子不活化ワクチンをカニクイザルに経鼻投与後、末梢血中の白血球数、リンパ球数、好中球数、血小板数、好酸球数を調べたところ、非接種群と比較してそれぞれの血算の値に有意な差はなくワクチン接種に伴う血球の変化は認められず、本指標はひとつの品質管理の指標となり得る。

(4) ワクチン製剤における粘膜アジュバントの品質管理上、ワクチンに添加される粘膜アジュバントは単一成分であることが望ましい。メシマコブ菌糸体の抽出液に含まれる経鼻接種型インフルエンザワクチンにおける粘膜アジュバント活性をモデルとして、どの成分によりもたらされるのかを探索し、熱湯抽出段階の上清に高いアジュバント活性が認められ分子量 12,000 以上の分子であることを明らかにした。

(5) H5 亜型 HA 特異的なモノクローナル抗体を組み合わせることで特異的な H5HA あるいは全てのクレード H5HA を定量検出するサンドイッチ ELISA システムを確立し、経鼻接種ワクチンの有効成分の含量測定に有用であることがわかった。

(6) TLR リガンド感受性を有する指示細胞を使用して脂質成分または核酸成分を含有する不活化全粒子ワクチンやアジュバントを含有するワクチンを NF- κ B レポーターアッセイや IL-1 β 、IFN- β および IL-18 のサイトカイン産生を調べることで、ワクチンの免疫原性の指標となることが示唆された。

研究組織

研究代表者

板村繁之 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 室長

分担研究者

長谷川秀樹 国立感染症研究所感染病理部 室長

横田恭子 国立感染症研究所免疫部 室長

笠井道之 国立感染症研究所血液・安全性研究部
主任研究官

谷本武史 (財) 阪大微生物病研究会観音寺研究所
課長補佐

佐藤佳代子 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

A. 研究の目的と背景

従来のワクチンの多くは皮下などの接種経路で実施されている。ところが、インフルエンザに代表される感染が身体の表層部分で起こる急性の感染症に対する有効な生体防御応答を誘導するには、現行の接種経路のワクチンは適していない。現行のインフルエンザワクチンは、皮下接種によって血中に IgG を主体としたウイルスの中和抗体を産生することによって上気道から下気道へ感染が拡大して肺炎などに重症化するのを抑制するように働く。そのために感染阻止には有効ではないが発病阻止や重症化阻止には機能する。しかしながら上気道での感染を阻止するためには粘膜局所での免疫応答を効率よく誘導する必要があるが、現行の接種経路では効率良く粘膜局所での IgA を主体とした免疫応答を誘導することができない。また、インフルエンザのように病原体の抗原性が頻繁に変化するものに対しては交差反応性に優れた防御免疫応答が重要であるが、血清中の中和抗体である IgG は粘膜局所に分泌される IgA

と比較してその交差反応性に劣る。

このような問題点を克服するために、経鼻接種による粘膜免疫を誘導する粘膜ワクチンの開発が進められ有望な結果も集積してきている。こうしたワクチンが開発できれば、従来感染阻止のできなかった急性呼吸器感染症などに対して発病予防だけでなく感染予防や流行阻止に有効なワクチンの実現が期待される。また、新型インフルエンザに対するワクチンとしても高い有効性が期待される。米国やスイスでは弱毒生ワクチンや不活化ワクチンのインフルエンザワクチンが経鼻接種ワクチンとして開発されてきたが、安全性や効果の点から問題点が残されており、新しいワクチンの接種経路としての経鼻ワクチンについて安全性やその品質を確保するために必要な品質管理の方法について確立しているとは言い難い。

本研究では、アジュバント添加不活化インフルエンザ経鼻接種粘膜ワクチンを新しい投与経路ワクチンのモデルとし、安全性が高く高品質のワクチンを製造するために必要な品質管理方法の確立を目的として実施した。

B. 研究方法

1) 新しい投与経路ワクチンのモデルとしてのアジュバント添加経鼻接種不活化インフルエンザワクチンの製剤化

パンデミック用ワクチンとして高病原性鳥インフルエンザ H5N1 ウイルスを使用した全粒子タイプの不活化ワクチンと通常期用のインフルエンザワクチンとしてスプリットタイプのインフルエンザ HA ワクチンの2種類について粘膜ワクチンのアジュバントとして合成二重鎖 RNA を用いて製剤化を試みた。

2) アジュバント添加経鼻接種不活化インフルエン

ザワクチンに使用するアジュバント及びワクチンの安全性評価

経鼻粘膜ワクチンとしての合成二本鎖 RNA アジュバントの安全性評価のために、経鼻反復投与及び鼻腔に接する脳内への直接投与での安全性を体重減少及び病理学的に解析を行った。また、パンデミック用ワクチンとして高病原性鳥インフルエンザ (A/H5N1) に対する全粒子タイプの不活化ワクチンとアジュバントとして合成二重鎖 RNA を用いて製剤化されたワクチンを使用して安全性評価方法を検討した。実験動物としてカニクイザルを用いてワクチンの経鼻接種後、更にウイルスによる攻撃感染後の末梢血中の白血球数、リンパ球数、好中球数、血小板数、ヘマトクリット値等の血算を測定し非免疫群と比較した。

3) キノコ菌糸体抽出液に含有される粘膜アジュバント活性分子の同定

メシマコブ (学名 *Phellinus linteus*, PL) の菌糸体抽出液から、段階的に抽出された5つの分画サンプルを用いた。さらに抽出液から分子量サイズにより分画したサンプルを用いた。マウスの骨髄細胞から樹状細胞を分化・誘導して、この細胞にメシマコブに由来する分画したサンプルを添加して、培養上清の各サイトカインの発現量を定量した。

4) HA 含量測定によるワクチン力価試験法の開発

A/Vietnam/1194/2004 (NIBRG-14) (H5N1) 株を発育鶏卵で増殖させたのち蔗糖密度勾配遠心法で精製し、UV またはホルマリンで不活化して免疫抗原としてマウスに免疫した。免疫したマウスの脾臓細胞とミエローマ細胞を細胞融合させてハイブリドーマを作製した。ELISA 法で NIBRG-14 (H5N1) 株に特異的に反応する抗体を産生するハイブリドーマを選択した。得られた HA 蛋白に特異的なモノクローナル抗体を

組み合わせてサンドイッチ ELISA 法による HA 抗原検出系の至適化を行って感度向上を図った。また各モノクローナル抗体の特性としてウイルス中和活性について解析した。また検出感度を高めるために特殊なアビジン吸着繊維を使用する系にモノクローナル抗体を組み合わせて化学発光法による HA 抗原検出系の感度向上を図った。

5) アジュバント添加経鼻接種不活化インフルエンザワクチンの免疫原性評価によるワクチン力価試験法の開発

転写因子 (NF- κ B) に対するレポーター遺伝子を組み込んだ人由来モノサイト細胞 (THP-Blue-CD14 細胞) を指示細胞として免疫誘導能についてスプリット、全粒子、アラムアジュバント添加インフルエンザワクチンと異なるワクチンの剤形で解析した。

C. 研究結果・考察

1) 新しい投与経路ワクチンのモデルとしてのアジュバント添加経鼻接種不活化インフルエンザワクチンの製剤化

アジュバントを混合したワクチンとして製剤化を試みた。作製したアジュバント添加ワクチンは比較的安定して特性を維持していた。

2) アジュバント添加経鼻接種不活化インフルエンザワクチンに使用するアジュバント及びワクチンの安全性評価

合成二本鎖 RNA アジュバントである poly(I:C) の経鼻ルートでの投与時の安全性を調べる為に、過剰量の poly(I:C) と実験的に使われて来た細菌性毒素由来のアジュバントである CTB* を経鼻で連続9日間投与した。それぞれのアジュバントを経鼻連続投与したマウスの経時的体重変化を測定し、また投与終

了後、安楽死させた後解剖を行い鼻腔領域の組織を採取し病理学的に解析を行った。10 μ g の poly(I:C) を 9 日間連続投与したマウスにおいてはコントロール群である PBS 投与群と比較して体重減少は認められなかった。一方細菌由来の毒素系アジュバントである CTB* を 9 日間連続投与した群ではコントロール群と比較して体重減少が認められた。Poly(I:C) 連続投与群では PBS 投与群と同様に病理学的変化は認められなかった。一方 CTB* 連続投与群では鼻腔内に炎症細胞を伴った粘液の滲出が認められた。

鼻腔領域は解剖学的に脳と嗅神経を介して接している為、経鼻粘膜アジュバントの神経毒力を調べる目的で poly(I:C) 及び CTB* を頭蓋内接種した時の体重変化及び生存、病理組織を調べた。1 群 5 匹のマウスを用い CTB* を 2.5 μ g, 10 μ g, 25 μ g 投与 poly(I:C) を 0.25 μ g, 2.5 μ g, 25 μ g、二段針を用いて頭蓋内に直接投与した。コントロールとして PBS 投与群をそれぞれおいた。CTB* 10 μ g 及び 25 μ g 投与群のマウスは投与 3 日目までに 15% の体重減少を示し 10 μ g 投与群の 1 匹及び 25 μ g 投与群のマウス 2 匹が頭蓋内投与から 4 日目で死亡した。一方 0.25 to 25 μ g の poly(I:C) を頭蓋内投与した群においてはいずれも 7 日間体重減少がみられず生存した。脳の組織を病理組織学的に解析した結果、CTB* を 10 μ g 頭蓋内投与したマウスでは脳出血が認められた。ところが、poly(I:C) を頭蓋内投与した群においては PBS 投与群と同様にいずれの量を投与した群においても病理学的な変化は認められなかった。これらの結果から粘膜アジュバントとしての poly(I:C) は経鼻的にも神経毒力の観点からも毒性の低いものであると考えられる。

ワクチン等の予防医薬は十分に安全性が確保されたものでなくてはならない。ワクチンの経鼻接種法は現行の皮下接種ワクチンに代わり粘膜感染ウイルスの防御にはその感染防御能力が高く実用化が待た

れるが、経鼻接種特有の安全性を調べる必要がある。鼻腔は嗅神経を介して脳と接している為、鼻腔周辺組織に対する影響を鼻連続投与でまた神経毒力を頭蓋内投与した時の病理学的変化で調べた。いずれの投与方法においても実験的にもちいられてきた粘膜アジュバントである CTB* と比較し poly(I:C) は局所及び脳組織において安全性が高い事が示された。

次に合成二本鎖 RNA アジュバントである polyI:polyC12U を用いた高病原性鳥インフルエンザ (A/H5N1) に対する全粒子不活化ワクチンを経鼻投与後およびその後のウイルスによる攻撃感染時の末梢血中の白血球数、リンパ球数、好中球数、血小板数、好酸球数等を調べて、その影響を非免疫群のカニクイザルと比較した。ワクチンの経鼻接種と非接種群においてそれぞれの血算の値に有意な差はなくワクチン接種に伴う血球の変化は認められなかった。ワクチン接種後 2 週間目にワクチン株と相同株である高病原性鳥インフルエンザウイルス A/VN/1194/2004 (H5N1) 株で攻撃感染を行った。攻撃感染に伴う血球の変化は経鼻免疫群では感染後早期 (2 日目) に末梢白血球の増加がみられたのに対し非免疫群では感染 9 日目に白血球の増加が見られた。経鼻免疫群における白血球の増加は好中球数の増加によるものである事が明らかとなった。一方で非免疫群における 9 日目の白血球増加はリンパ球の増加によるものである事が明らかとなった。また感染直後には免疫群非免疫群共にリンパ球の減少が認められた。その他血小板や好酸球数には差がみとめられなかった。感染 2 週間後の病理解剖ではワクチン接種による病態の増悪は認められなかった。従って、経鼻接種経路による本ワクチン剤型では、末梢血において白血球数、リンパ球数、好中球数、血小板数、好酸球数に影響を与えることが無かった。このように実験動物への本剤型のワクチン投与による末梢血中の変化を測定すれば、本剤型のワクチンの

安全性に関する情報が得られることが分かった。今後、末梢血中の変化とワクチンの品質との関連を調べて品質管理手法として有効であるのか検討する必要があるが、ひとつの品質管理の指標となり得るものである。

3) キノコ菌糸体抽出液に含有される粘膜アジュバント活性分子の同定

ワクチン製剤における粘膜アジュバントとしての品質管理上、ワクチンに添加される粘膜アジュバントは精製された単一成分であることが望ましい。本研究では、メシマコブ菌糸体の抽出液に含まれる経鼻接種型インフルエンザワクチンにおける粘膜アジュバント活性が、どの成分によりもたらされるのかを探索した。この分子の性質を明らかにすることを目的として、各抽出段階におけるサンプルと分子量サイズで分画したサンプルを用いて検討を行った。マウス骨髄細胞から誘導した樹状細胞に対し、メシマコブ菌糸体から得られる抽出液を添加して刺激することで、TNF- α の産生が認められた。本活性を指標にアジュバント活性を有する分画を同定した。その結果、熱湯抽出段階の上清に高いアジュバント活性が認められ分子量 12,000 以上の分子であることを明らかにした。このように、アジュバント活性を有する物質について物質の特性を明らかにすることは経鼻接種粘膜ワクチンの品質管理を実施する上で重要である。今後、アジュバント活性を有する物質を同定することで粘膜アジュバントとしての実用上の有用性が期待される。

4) HA 含量測定によるワクチン力価試験法の開発

A/Vietnam/1194/2004 (NIBRG-14) (H5N1) 株を免疫抗原としてマウスに免疫し、HA 蛋白に特異的なモノクローナル抗体を作製した。得られたモノクローナル抗体を組み合わせてサンドイッチ ELISA 法による

HA 抗原検出系の至適化を行って感度向上を図った。当初検討したサンドイッチ ELISA 法では、バキュロ組換え HA 蛋白にして 100 ng/ml、ウイルス全粒子の場合、ベトナム(NIBRG-14)株で 50 ng/ml、インドネシア(Indo-RG)株で 20 ng/ml 程度の抗原が限界で、ワクチン抗原 (RT-PCR で $1\sim 3\times 10^{10}$) を 1000 倍希釈すると全く検出できなかった。しかしながら、特殊なアビジン吸着繊維を使用する系を用いて検討した結果、同じワクチン抗原を 20000~40000 倍に希釈しても陽性と判定できた。より高感度な測定法としてワクチンの力価測定に有用である。一次抗体として用いた 2C2 はウイルスの立体構造を認識しているらしいことが分かっている。従って、抗原の立体構造を担保することによって抗原の含有量だけでなく、免疫原性も反映する測定値となる可能性があり、その点についての検討も重要であろう。

これまでに作製したモノクローナル抗体の中和抗体価を測定したところ、H5N1 ウイルスの遺伝的、抗原的に異なるクレードに属するウイルスに対して異なる反応性を有することがわかった。これらを組み合わせることによって異なるクレードに属するウイルス株で製造されたワクチンの力価を測定できるだけでなく、ウイルス株の抗原性の特異性を検証できる試験法となると考えられる。

5) アジュバント添加経鼻接種不活化インフルエンザワクチンの免疫原性評価によるワクチン力価試験法の開発

粘膜投与等の新投与経路型のワクチンのモデルとして使用している本ワクチンは、不活化全粒子型インフルエンザワクチンに TLR リガンド (合成二重鎖 RNA) をアジュバントとして加え、抗原提示細胞における抗原提示能力やタイプ I 型インターフェロン産生能力などの免疫誘導能力を高めた製剤である。従って、これまで以上に精緻な免疫原性 (免疫抗原の

質・量および免疫誘導能力)に関する評価と管理が求められる。しかしながら、人に投与した場合におけるこのワクチンの有する免疫原性の評価は、現在のところたん白質定量法によるインフルエンザウイルスたん白質抗原の量と一次放射免疫拡散法によるHA抗原量の評価のみであり、不活化全粒子インフルエンザワクチンのたん白質、脂質及び核酸に由来する免疫誘導能力とTLRリガンドに由来する免疫誘導能力についての評価は未だ不十分である。そこで、転写因子(NF- κ B)の下流にレポーター遺伝子(SEAP: secreted embryonic alkaline phosphatase)を組み込んだヒト由来モノサイト(THP細胞)細胞株を用いて、ヒト培養細胞に対する不活化型全粒子インフルエンザウイルス由来の免疫誘導能力と様々なTLRリガンドの免疫誘導能力を評価した。

まず、THP-Blue-CD14細胞をPMA処理した後、マクロファージ化へと分化させ(以下PMA-Macと略す)、様々な濃度のTLRリガンドと24時間共培養後、NF- κ B活性を調べた。PMA-MacはTLR1、TLR2、TLR4、TLR6、TLR8の各TLRリガンドに反応し、それらリガンドの濃度に依存したNF- κ B活性を示したが、TLR3、TLR7、TLR9のTLRリガンドに対してはNF- κ B活性を示さなかった。

次に、このようなTLRリガンド感受性を有する指示細胞PMA-Macに不活化程度の異なるH3N2インフルエンザワクチンまたはB型インフルエンザワクチンを様々なたん白質濃度で加えて共培養した後、NF- κ B活性を調べたところ、培養液中の最終ホルムアルデヒド濃度が0.0078%以下でないとPMA-MacはNF- κ B活性を示さなかった。PMA-Macは培養液中のホルムアルデヒド濃度が0.0078%より高い濃度でも死滅することはなく生存しているが、0.0078%以下の濃度でないとNF- κ B活性を示さない。このことから、不活化全粒子インフルエンザワクチンはPMA-Mac細胞膜上のTLRを刺激するのに加えて、不活化された

インフルエンザウイルス粒子自体を取り込むなどの動的刺激がPMA-MacのNF- κ B活性発現に必要と考えられた。培養液に加えたH3N2インフルエンザワクチンおよびB型インフルエンザワクチンのたん白質濃度の増加に依存してPMA-MacのNF- κ B活性は上昇した。このときの培養上清中にはIL-1 β が検出された。また、ワクチンの不活化期間の長さに応じてPMA-MacのNF- κ B活性の低下を示す。この活性低下の度合いは、B型よりもH3N2の場合の方が大きかった。また、不活化期間が3ヶ月以上の場合、両者のワクチンはPMA-MacのNF- κ B活性を誘導できなかった。

同様に、インフルエンザHAワクチンおよび新型インフルエンザワクチンについてもPMA-MacのNF- κ B活性を調べた。インフルエンザHAワクチンは全くPMA-MacのNF- κ B活性を誘導できなかった。一方、新型インフルエンザワクチンは、たん白質濃度依存的にPMA-MacのNF- κ B活性を誘導したが、その大きさは、55日間不活化したH3N2インフルエンザウイルスと同程度であった。H3N2インフルエンザワクチンおよびB型インフルエンザワクチンは共にホルムアルデヒドの処理時間の長さに応じてPMA-MacのNF- κ B活性の低下を示し、3ヶ月を経過すると完全にNF- κ B活性誘導能力を失う。しかし、アルミアジュバントを加えてある新型インフルエンザワクチンはNF- κ B活性を示すことから、本活性が免疫原性の指標として有用であることが示唆された。

不活化型全粒子新型インフルエンザワクチンおよびスプリットインフルエンザワクチンでは、共にIL-1 β とIFN- β の産生を認めた。これにアルミニウムアジュバントが加えられた製剤の場合はIL-18の産生も認められ、inflammasome(NALP3)を介するIL-1 β の産生も付け加えられていると考えられた。予備実験ではこれに様々なアジュバントを加えた場合、NF- κ B活性化を介したIL-1 β 産生が増強され

る場合と inflammasome (NALP3) を介する IL-1 β 産生が誘導される場合とがあることを示唆する結果が得られた。今後、これらの活性と免疫原性との関連について、より詳細に解析することが課題である。

D. 結論

(1) アジュバント添加経鼻接種不活化インフルエンザワクチンの製剤化を試み、一定の安定した製剤とすることができた。

(2) 経鼻接種ワクチンのアジュバントの安全性について経鼻連続投与及び頭蓋内直接投与の方法で粘膜アジュバント候補である合成二本鎖 RNA, poly(I:C) を調べ、コントロールの PBS と同等の毒性であることがわかった。

(3) 合成二本鎖 RNA をアジュバントとした高病原性鳥インフルエンザ (A/H5N1) に対する全粒子不活化ワクチンをカニクイザルに経鼻投与後、末梢血中の白血球数、リンパ球数、好中球数、血小板数、好酸球数を調べたところ、非接種群と比較してそれぞれの血算の値に有意な差はなくワクチン接種に伴う血球の変化は認められず、本指標はひとつの品質管理の指標となり得る。

(4) ワクチン製剤における粘膜アジュバントの品質管理上、ワクチンに添加される粘膜アジュバントは単一成分であることが望ましい。メシマコブ菌糸体の抽出液に含まれる経鼻接種型インフルエンザワクチンにおける粘膜アジュバント活性をモデルとして、どの成分によりもたらされるのかを探索し、熱湯抽出段階の上清に高いアジュバント活性が認められ分子量 12,000 以上の分子であることを明らかにした。

(5) H5 亜型 HA 特異的なモノクローナル抗体を組み合わせることで特異的な H5HA あるいは全てのクレード H5HA を定量検出するサンドイッチ ELISA システムを確立し、経鼻接種ワクチンの有効成分の含量

測定に有用であることがわかった。

(6) TLR リガンド感受性を有する指示細胞を使用して脂質成分または核酸成分を含有する不活化全粒子ワクチンやアジュバントを含有するワクチンを NF- κ B レポーターアッセイや IL-1 β 、IFN- β および IL-18 のサイトカイン産生を調べることにより、ワクチンの免疫原性の指標となることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hasegawa H*, Ichinohe T, Tamura S, Kurata T Development of a mucosal vaccine for influenza viruses: preparation for a potential influenza pandemic. *Expert Review of Vaccines*, April 2007, Vol. 6, No. 2, Pages 193-201.
- 2) Ichinohe T, Nagata N, Strong P, Tamura SI, Takahashi H, Ninomiya A, Imai M, Odagiri T, Tashiro M, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H*. Prophylactic effects of chitin microparticles (CMP) on highly pathogenic H5N1 influenza virus. *J Med Virol*. 2007 Jun;79(6):811-819
- 3) Ichinohe T, Kawaguchi A, Tamura S, Ninomiya A, Imai M, Tamura S, Odagiri T, Tashiro M, Chiba J, Sata T, Kurata T and Hasegawa H* Intranasal immunization with H5N1 vaccine plus Poly I:Poly C12U, a Toll-like receptor agonist, protects mice against homologous and heterologous virus challenge. *Microbes and Infection* 2007 Sep;9(11):1333-40.
- 4) Tsunetsugu-Yokota, Y., Ishige, M., Murakami, M.: Attenuated *Salmonella Typhimurium* expressing codon-optimized HIV-1 Gag potentiated Gag-specific CD8+ T cell-response in intestinal mucosa. *Aids Res. Hum. Retro.* 23:278-286, 2007
- 5) Tsunetsugu-Yokota, Y., Ato, M., Takahashi, Y., Hashimoto, S-I., Kaji, T., Kuraoka, M.,

- Yamamoto, K-I., Mitsuki, Y-Y., Yamamoto, T., Ohshima, M., Ohnishi, K., Takemori, T. Formalin-treated UV-inactivated SARS coronavirus vaccine retains its immunogenicity and promotes Th2-type immune responses. *Jap. J. Infect. Dis.*,60:106-112, 2007
- 6) Nitahara-Kasahara, Y., Kamata, M., Zhang, X., Muneta, K., Miyamoto, Y., Yamamoto, T., Iijima, S., Yoneda, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y., Aida, Y. A novel nuclear import of Vpr promoted by importin α is crucial for HIV-1 replication in macrophage. *J. Virol.*, 81:5284-5293, 2007
- 7) Takayanagi, R., Ohashi, T., Yamashita, E., Kurosaki, Y., Tanaka, K., Hakata, Y., Komoda, Y., Ikeda, S., Tsunetsugu-Yokota, Y., Tanaka, Y., H. Shida. Enhanced replication of human T-cell leukemia virus type 1 in T cells from transgenic rats expressing human CRM1 that is regulated in a natural manner. *J Virol.*, 81:5908-5918, 2007
- 8) Takuya, Y and Tsunetsugu-Yokota, Y. Prospects for the therapeutic application of lentivirus-mediated gene therapy to HIV-1 infection. *Curr. Gene Therapy*, in press, 2008
- 9) 寺原和孝 横田 (恒次) 恭子 : 粘膜ワクチンの研究開発、ワクチンの展望 4、ワクチン感染症のコントロールに向けて、治療学 4: 67-70, 2007
- 10) Yamamoto, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Mitsuki, Y-Y, Mizukoshi, F., Terahara, K., Inagaki, Y., Yamamoto, N., Kobayashi, K. and Inoue, J-I.: Selective transmission of R5 HIV-1 over X4 HIV-1 at the dendritic cell–T cell infectious synapse is determined by the T cell activation state. *PLoS Path.* 5:e1000279, 2009
- 11) Mizukoshi, F., Yamamoto, T., Mitsuki, Y-y., Terahara, K., Kawana-Tachikawa, A., Kobayashi, K., Iwamoto, A., Morikawa, Y., and Tsunetsugu-Yokota, Y.: Activation of HIV-1 Gag-specific CD8⁺ T cells by yeast-derived VLP-pulsed dendritic cells is influenced by the level of mannose on the VLP antigen. **Microbes Infect.** 11:191-197, 2009
- 12) Ishii, K., Hasegawa, H., Nagata, N., Fukushi, Y., Taguchi, F. and Tsunetsugu-Yokota, Y.: Neutralizing antibody against SARS-CoV spike is highly effective for the protection of mice in the murine SARS model. **Microbiol. Immunol.** in press, 2009
- 13) Mitsuki, Y-Y, Ohnishi, K., Oshima, M., Yamamoto, T., Mizukoshi, F., Kobayashi, K., Yamamoto, N., Yamaoka, S., and Tsunetsugu-Yokota, Y.: Amino acids in the S1 and S2 spike protein domains determines the neutralization escape phenotype of SARS-CoV. **Microbes Infect.** 10:908-915, 2008
- 14) Yamamoto, T and Tsunetsugu-Yokota, Y.: Prospects for the therapeutic application of lentivirus-mediated gene therapy to HIV-1 infection. **Curr Gene Ther.** 8:1-8, 2008
- 15) Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Fukushi S, Harashima A, Sato Y, Saijo M, Taguchi F, Morikawa S, Sata T. Mouse-passaged severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus leads to lethal pulmonary edema and diffuse alveolar damage in adult but not young mice. **Am J Pathol.** 2008 Jun;172(6):1625-37.
- 16) Kamijuku H, Nagata Y, Jiang X, Ichinohe T, Tashiro T, Mori K, Taniguchi M, Hase K, Ohno H, Shimaoka T, Yonehara S, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Hasegawa H*, Seino KI. Mechanism of NKT cell activation by intranasal coadministration of alpha-galactosylceramide, which can induce cross-protection against influenza viruses. **Mucosal Immunol.** 2008 May;1(3):208-18. Epub 2008 Mar 5. *corresponding author
- 17) Ichinohe T, Iwasaki A, Hasegawa H. Innate sensors of influenza virus: clues to developing better intranasal vaccines. **Expert Rev Vaccines.** 2008 Nov;7(9):1435-45.
- 18) Hasegawa H, Ichinohe T, Aina A, Tamura S,

- Kurata T. Development of an inactivated mucosal vaccine for H5N1 influenza virus. **Therapeutic and Clinical Risk Management** 2009, in press.
- 19) 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.
 - 20) 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.
 - 21) 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.
 - 22) 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, and 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.
 - 23) 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.* *J Med Virol.* 2010 Mar;82(3):476-84.
 - 24) 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.
 - 25) Yamamoto, T., Samri, A., Mitsuki, Y-Y., Mizukoshi, F., Kobayashi, K., Inoue, J-I., Autran, B. and Tsunetsugu-Yokota, Y.: siRNA inhibiting HIV-1 reactivation restores function of HIV-specific CD4+ T cells in chronically HIV-infected individuals. *AIDS*, 23:2265-2275, 2009
 - 26) Konno, H., Yamamoto, T., Yamazaki, K., Gohda, J., Akiyama, T., Semba, K., Goto, H., Kato, A., Yujiri, T., Imai, T., Kawaguchi, Y., Su, B., Takeuchi, O., Akira, S., Tsunetsugu-Yokota, Y., Inoue, J-I.: TRAF6 established innate immune responses by activating NF-kB and IRF7 upon sensing cytosolic viral RNA and DNA. *PLoS One*, 4:e5674, 2009
 - 27) Terahara, K., Yoshida, M., Taguchi, F., Igarashi, O., Nochi, T., Gotoh, Y., Yamamoto, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Beauchemin, N., Kiyono, H.: Expression of newly identified secretory CEACAM1 isoforms in the intestinal epithelium. *BBRC*, 383:340-346, 2009
 - 28) Yamamoto, T., Iwamoto, N., Yamamoto, H., Tsukamoto, T., Kuwano, T., Takeda, A., Kawada, M., Tsunetsugu-Yokota, Y., Matano, T.: Polyfunctional T-cell induction in neutralizing antibody-triggered simian immunodeficiency virus control., *J. Virol.*, 83:5514-5524, 2009
 - 29) Ogata, T, Yamazaki, Y, Okabe, N, Nakamura, Y, Tashiro, M, Nagata, N, Itamura, S, Yasui, Y, Nakashima, K, Doi, M, Izumi, Y, Fujieda, T, Yamato, S, Kawada, Y. Human H5N2 avian influenza infection in Japan and the factors associated with high H5N2-neutralizing antibody titer. *J Epidemiol*, 18:160-166 (2008)
 - 30) Ikeno D, Kimachi K, Kudo Y, Goto S, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Kino Y. A prime-boost vaccination of mice with heterologous H5N1 strains. *Vaccine* 27: 3121-3125 (2009)
 - 31) 緒方剛、山崎良直、岡部信彦、中村好一、田代真人、永田紀子、板村繁之、安井良則、中島一敏、土井幹雄、泉陽子、藤枝隆、大和慎一、川田論一、一般住民のインフルエンザ予防接種歴と H5N2 鳥インフルエンザウイルス中和抗体 厚生の指標 56: 33-38 (2009)
 - 32) 板村繁之：インフルエンザワクチン。化学療法の領域 25: 1453-1458 (2009)
 - 33) 板村繁之：インフルエンザワクチンの現状と課題。診断と治療 97: 2073-2077 (2009)
 - 34) 影山努、板村繁之：新型インフルエンザウイルス。臨床と微生物 36：193-198 (2009)
 - 35) 信澤枝里、板村繁之：新型インフルエンザに対するワクチン開発。呼吸器内科 17:51-57 (2010)

2. 学会発表

- 1) Kawaguchi A, Orba Y, Sawa H, Sata T, Hall WW, Hasegawa H, Adult T cell leukemia/lymphoma(ATLL): Exploitation of transgenic mouse model to understand disease pathogenesis and for the development of rational therapeutics. 13th International Conference on Human Retrovirology 21th-25th May 2008 Hakone
- 2) 長谷川秀樹、一戸猛志、田村慎一、板村繁之、小田切孝人、田代真人、佐多徹太郎、倉田毅 2005/2006 シーズナルインフルエンザワクチンの経鼻接種による高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)感染の交叉防御効果の検討 第11回日本ワクチン学会学術集会(2007年11月横浜)
- 3) Tsunetsugu-Yokota, Y. and Yamamoto, T. Immune control of HIV-1 by restoring HIV-specific CD4+ T-cell function: a vaccine strategy against chronic HIV/SIV infection. The 8th Seminar in Kumamoto, Kumamoto, September, 2007
- 4) 光木裕也、山本拓也、水越文徳、山岡昇司、山本直樹、横田(恒次)恭子: マクロファージにおける Nef 蛋白質発現に伴う自然免疫機構異常に関する解析。第55回ウイルス学会、札幌、平成19年10月。
- 5) 光木裕也、山本拓也、水越文徳、寺原和孝、稲垣好雄、山岡昇司、山本直樹、横田(恒次)恭子: EGFP と DsRed を発現する X4 型及び R5 型 HIV-1 の作製とその応用。第55回ウイルス学会、札幌、平成19年10月。
- 6) 石井孝司、横田恭子、長谷川秀樹、永田典代、森川茂、福士秀悦、水谷哲也、鈴木哲郎、田代真人、田口文広: 高度弱毒化ワクチニアウイルス株 DIs の組換え SARS ワクチンとしての検討。第55回ウイルス学会、札幌、平成19年10月。
- 7) 山本拓也、光木裕也、水越文徳、小林和夫、井上純一郎、横田(恒次)恭子: HIV 特異的な免疫担当細胞に HIV 抵抗性を賦与しうる RNAi 誘導型エイズワクチンの開発。第55回ウイルス学会、札幌、平成19年10月。
- 8) Yamamoto, T., Tachikawa-Kawana, A., Iwamoto, A., Kobayashi, K., Inoue, J-I, Autran, B., and Yokota-Tsunetsugu, Y.: Development of a novel IFN-gamma detection system of virus-specific T cell activation by flow cytometry. 第37回免疫学会、東京、平成19年11月。
- 9) Konno, H., Yamamoto, T., Yamazaki, K., Qin J., Ghoda, J., Akiyama, T., Yokota-Tsunetsugu, Y., Inoue, J-I.: ウイルス感染時のインターフェロン及び炎症性サイトカイン産生に対する TRAF6 の役割。第37回免疫学会、東京、平成19年11月。
- 10) 横田(恒次)恭子、山本拓也、Brigitte Autran: HIV 慢性感染期における HIV 特異的 CD4 陽性 T 細胞の機能障害—ワクチン開発に向けての考察。第21回日本エイズ学会、広島、平成19年11月。
- 11) 水越文徳、山本拓也、立川(川名)愛、岩本愛吉、森川裕子、横田(恒次)恭子: 抗原の糖鎖による樹状細胞の cross-presentation の影響。第21回日本エイズ学会、広島、平成19年11月。
- 12) Ami, Y., Ishii, K., Tsunetsugu-Yokota, Y., Nagata, N., Hasegawa, H. and Taguchi, F.: Fatal exacerbated pneumonia of mice induced by co-infection of respiratory bacterium and SARS-CoV, XIth International Symposium on Nidoviruses, Oxford, UK, June 22-27, 2008

- 13) Ishii, K., Hasegawa, H., Nagata, N., Ami, Y., Fukushi, S., Taguchi, F. and Tsunetsugu-Yokota, Y.: SARS-CoV Spike-reactive neutralizing antibody is highly effective for the protection of mice in the murine SARS model, XIth International Symposium on Nidoviruses, Oxford, UK, June 22-27, 2008
- 14) Yamamoto, T., Iwamoto, N., Yamamoto, H., Tsukamoto, T., Kuwano, T., Takeda, A., Kawada, M., Tsunetsugu-Yokota, Y. and Matano, T.: SIV-specific functional T-cell induction after passive neutralizing antibody immunization postinfection. The 8th Awaji International Forum of Infection and Immunity, September 7-11, 2008
- 15) Terahara, K., Mizukoshi, F., Yamamoto, T., Mitsuki, Y-Y, Tsuchiya, T., Kobayashi, K. and Tsunetsugu-Yokota, Y.: HIV-1 Nef dysregulates the innate immune function of macrophages, The 8th Awaji International Forum of Infection and Immunity, September 7-11, 2008
- 16) Mitsuki, Y-Y, Yamamoto, T., Tsunetsugu-Yokota, Y. :Selective transmission of R5 HIV-1 over X4 HIV-1 at the dendritic cell? T cell infectious synapse is determined by the T cell activation state. The 9th Seminar in Kumamoto, Kumamoto, September 16-17, 2008
- 17) 山本拓也、光木裕也、水越文徳、寺原和孝、稲垣好雄、山本直樹、横田 (恒次) 恭子 : 樹状細胞の抗原提示に伴う感染シナプスを介した R5 型 HIV-1 選択的伝播機構の解析。第 56 回ウイルス学会、岡山、平成 20 年 10 月
- 18) 水越文徳、山本拓也、光木裕也、寺原和孝、小林和夫、横田 (恒次) 恭子: Nef 蛋白質発現に伴うマクロファージの自然免疫機能異常に関する解析。第 22 回日本エイズ学会、大阪、平成 20 年 11 月。山本拓也、光木裕也、水越文徳、寺原和孝、稲垣好雄、山本直樹、横田 (恒次) 恭子 : 樹状細胞の抗原提示に伴う感染シナプスを介した R5 型 HIV-1 選択的伝播機構の解析。第 56 回ウイルス学会、岡山、平成 20 年 10 月
- 19) 水越文徳、山本拓也、光木裕也、寺原和孝、小林和夫、横田 (恒次) 恭子: Nef 蛋白質発現に伴うマクロファージの自然免疫機能異常に関する解析。第 22 回日本エイズ学会、大阪、平成 20 年 11 月。
- 20) 長谷川秀樹、一戸猛志、相内 章、田村慎一、小田切孝人、田代真人、倉田 毅、佐多徹太郎 : キノコ類菌糸体抽出物を用いた経鼻粘膜ワクチンによる粘膜免疫増強作用とインフルエンザウイルスの感染防御。第 56 回日本ウイルス学会総会 (岡山) 2008 年 10 月
- 21) 相内 章、一戸猛志、田村慎一、倉田 毅、佐多徹太郎、長谷川秀樹 : 経鼻ワクチンにおける Dectin-1 リガンドによるアジュバント効果の亢進。第 56 回日本ウイルス学会総会 (岡山) 2008 年 10 月
- 22) 永田典代、岩田奈緒子、長谷川秀樹、福士秀悦、西條政幸、森川 茂、佐藤由子、佐多徹太郎 : SARS-CoV 感染動物モデルを用いた SARS 発症機序の解明と治療法の検討。第 56 回日本ウイルス学会総会 (岡山) 2008 年 10 月
- 23) 長谷川秀樹、一戸猛志、網 康至、永田典代、田村慎一、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カニクイザルを用いた効果検討。第 12 回日本ワクチン学会学術集会 (熊本) 2008 年 11 月
- 24) 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
- 25) 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
- 26) 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
- 27) 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
- 28) 光木裕也、水越文徳、渋谷謙太郎、寺原和孝、竹田誠、柳雄介、森川裕子、山岡昇司、横田(恒次)恭子：HIV-1 感染と麻疹ウイルス感染が相互の及ぼす影響およびその機構の解析、第 57 回ウイルス学会、東京、平成 21 年 11 月。
- 29) 岩田奈緒子、永田典代、辻隆裕、長谷川秀樹、佐藤由子、横田恭子、水谷哲也、西條政幸、森川茂、佐多徹太郎：SARS-CoV 感染動物モデルを用いた UV 不活化 SARS-CoV の免疫効果と副反応について、第 57 回ウイルス学会、東京、平成 21 年 11 月。
- 30) 森一泰、杉本知恵、横田恭子、鈴木康夫、山本直樹、永井美之：糖鎖修飾による組織・細胞指向性はエイズウイルスの病原性・感染防御免疫誘導を決定する、第 57 回ウイルス学会、東京、平成 21 年 11 月。
- 31) 渋谷謙太郎、光木裕也、寺原和孝、柳雄介、小林和夫、横田(恒次)恭子：樹状細胞を標的とした HIV-1 増殖抑制 shRNA 発現レンチウイルスの開発、第 39 回日本免疫学会、大阪、平成 21 年 12 月。
- 32) 土屋貴嗣、光木裕也、寺原和孝、渋谷謙太郎、小林和夫、渡邊俊樹、横田(恒次)恭子：CD4 標的レンチウイルスベクターの開発、第 32 回日本分子生物学会、横浜、平成 21 年 12 月。
- 33) 池野大介、来海和彦、工藤康博、後藤修郎、板村繁之、小田切孝人、田代真人、城野洋一郎：マウスにおけるプレパデミックワクチンによるプライミング効果の検討 第 11 回日本ワクチン学会学術集会、横浜、2007 年 12 月
- 34) 小田切孝人、小淵正次、影山努、板村繁之、今井正樹、二宮愛、氏家誠、田代真人：2006/07 シーズンのインフルエンザ流行株と平成 19 年度のワクチン株 第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007 年 10 月
- 35) 池野大介、来海和彦、後藤修郎、板村繁之、小田切孝人、田代真人、城野洋一郎：BALB/c マウスを用いたパンデミックワクチン投与法の検討 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008 年 10 月
- 36) 小淵正次、氏家誠、板村繁之、影山努、白倉雅之、原田勇一、岸田典子、堀川博司、加藤裕美子、細山哲、原田健史、矢代勲、山田隆一、藤田信之、小田切孝人、田代真人：2007/08 シーズンのインフルエンザ流行株と平成 20 年度のワクチン株 第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008 年 10 月
- 37) 河野直子、板村繁之、小田切孝人、田代真人、多田善一、城野洋一郎、池田富夫、五反田亨：新型インフルエンザワクチンの効果判定の指標としての抗体価測定法（HI 試験及び中和試験）の再現性と感度の比較 第 12 回日本ワクチン学会学術集会、熊本、2008 年 11 月
- 38) 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

- 39) 河野直子、板村繁之、小田切孝人、田代真人：インフルエンザワクチンの力価測定に用いる一元放射免疫拡散 (SRD) 試験法の精度評価 第 13 回日本ワクチン学会学術集会、札幌、2009 年 9 月
- 40) 高橋仁、原田勇一、佐藤佳代子、河野直子、板村繁之、田代真人：インフルエンザワクチンの力価測定に使用する標準抗原の HA 含量決定に重要な HA 含有率のエンドグリコシダーゼを用いた測定法の検討 第 13 回日本ワクチン学会学術集会、札幌、2009 年 9 月
- 41) 池野大介、来海和彦、工藤康博、後藤修郎、板村繁之、小田切孝人、田代真人、城野洋一郎：マウスを用いた H5N1 株インフルエンザワクチンのプライムブースト効果の検討 第 13 回日本ワクチン学会学術集会、札幌、2009 年 9 月
- 42) 原田勇一、河野直子、板村繁之、小田切孝人、城野洋一郎、五反田亨、多田善一、池田富夫、田代真人：沈降新型インフルエンザワクチン (H5N1 株) 接種者の血清ウイルス中和抗体の交叉反応性の検討 第 13 回日本ワクチン学会学術集会、札幌、2009 年 9 月
- 43) 板村繁之：シンポジウム「インフルエンザワクチン」パンデミックワクチンの現状と課題 第 13 回日本ワクチン学会学術集会、札幌、2009 年 9 月

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

