

201015029A

厚生労働科学研究費補助金  
医療技術実用化総合研究事業

**将来出現が予想される新型インフルエンザに即応できる  
次世代ワクチンの臨床応用に向けた研究**

**平成22年度 総括・分担研究報告書**

**研究代表者 山西 弘一**

平成23(2011)年3月

# 目 次

## I. 総括研究報告書

将来出現が予想される新型インフルエンザに即応できる次世代ワクチンの  
臨床応用に向けた研究

山西 弘一 ..... 1

## II. 分担研究報告書

1. ウイルスライブラリーを活用した種ウイルス株の作製

喜田 宏 ..... 11

2. インフルエンザウイルス抗原の解析

河岡 義裕 ..... 16

3. CTL及び抗体誘導型インフルエンザワクチンの開発

内田 哲也 ..... 18

4. 経鼻インフルエンザワクチンによる新型インフルエンザに対する交叉防御に関する研究

長谷川 秀樹 ..... 22

5. ワクチンにより必要とされる免疫反応と生体の免疫学的恒常性に関する研究

保富 康宏 ..... 28

6. ウイルスライブラリー株を用いた種ワクチン作成の検討および不活性化全粒子ワクチ  
ンの経鼻接種による交叉防御効果の解析

岡本 成史 ..... 35

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 41

【参考資料】 ..... 47

## 将来出現が予想される新型インフルエンザに即応できる次世代ワクチンの 臨床応用に向けた研究

研究代表者： 山西 弘一（独立行政法人医薬基盤研究所・理事長兼研究所長）

### 【研究要旨】

一昨年発生した新たなウイルス株によるインフルエンザ A (H1N1) が当初想定されていた H5N1 の型とは異なったように、今後とも新たに発生するインフルエンザの型を予め予測することは困難である。そのため、将来どのようなインフルエンザが出現しても直ちに対応できる次世代ワクチンを開発することは、極めて重要な国家的課題である。そこで我々は、世界で初めて整備されたインフルエンザ A ウイルスの全種類のライブラリーを利用した種ウイルスの保存方法ならび、それらの種ウイルスを利用したワクチン作製、接種方法を確立し、将来どのようなインフルエンザが出現しても直ちに対応できる次世代ワクチンの作成を目指す。本年度は、種ウイルス株による試作ワクチンの作製や経鼻接種による交叉防御能の検討、CTL 応答の検討を行い、検証を行う実験動物の樹立を行った。そして、抗原性の異なるウイルスに対しても全粒子ワクチンが高い効果を示すことや、不活性化全粒子ワクチンの経鼻接種の交叉防御能がワクチン・アジュバント併用接種の場合と同様の高い効果を示すことを明らかにした。また、ライブラリー内の 15 株が MDCK 細胞によるワクチン作製に必要とされる十分なウイルス増殖能を有することを明らかにした。

### 研究分担者

- 喜田 宏（北海道大学大学院・獣医学研究科・教授）  
（北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・センター長）
- 河岡 義裕（東京大学・医科学研究所・教授）
- 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・室長）
- 内田 哲也（国立感染症研究所・血液安全性研究部・室長）
- 保富 康宏（医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター・センター長）
- 岡本 成史（医薬基盤研究所・感染制御プロジェクト・プロジェクトリーダー）

## A. 研究目的

一昨年4月に発生した新型インフルエンザ（インフルエンザA（H1N1））は、日本を含む世界各地で流行・感染が拡大し、WHOも6月には警戒レベルをフェーズ6（世界的大流行）に引き上げるなど、社会に多大な影響を与えている。今回のインフルエンザA（H1N1）は当初想定されていたH5N1の型とは異なったように、今後とも新たに発生するインフルエンザの型を予め予測することは困難である。そのため、将来どのようなインフルエンザが出現しても直ちに対応できる次世代ワクチンを開発することは、極めて重要な国家的な課題である。

最近、喜田らは世界で初めてインフルエンザAウイルスの全種類のライブラリーを整備し公開していることから、このウイルスライブラリーを用いて新たなインフルエンザに備えるためのワクチンシードを作製、保存することが上記課題を解決しうる有力な方法であると考えられる。そこで本研究では、

- ①インフルエンザウイルスライブラリーを用いた種ウイルス株の製造と保存方法の確立
- ②試作ワクチンの開発とその抗ウイルス感染防御効果の検討
- ③霊長類を用いた試作ワクチンの有効性、安全性、安定性の評価及び前臨床試験の実施

を行い、将来どのようなインフルエンザが出現しても直ちに対応できる次世代ワクチンを作成する方法論を確立することを目的とする。

## B. 研究方法

本研究は、研究代表者山西、研究分担者6名（喜田、河岡、長谷川、内田、保富、岡本）の計7名が遂行した。当該年度においては、種ウイルス株による試作ワクチンの作製、経鼻接種による交叉防御能の検討、CTL応答の検討、検証を行う実験動物の樹立にわけて遂行された。

（倫理面への配慮）

動物実験の倫理面においては、動物愛護と動物福祉の観点から十分な配慮をする。国が定める各種の関連法律および各研究機関が制定する動物実験指針を遵守する。また、個々の動物実験については各研究機関の動物実験委員会において審査し、承認を得た上で行う。

## C. 研究結果

### 1. 種ウイルス株による試作ワクチンの作製

インフルエンザウイルスのライブラリーを用いて発育鶏卵で培養・作製したH5およびH9亜型ワクチンの効果を評価するために、攻撃株を選抜したところ、ウイルスに対して高い病原性を示し、攻撃株として適していることが確認できた。

また、ライブラリーから16ウイルス株を取り出し、MDCK細胞に継代を行ったところ、15株についてワクチン作製に十分な増殖能を有する株に馴化することを明らかにした。

### 2. 経鼻接種による交叉防御能の検討

インフルエンザ不活性化全粒子ワクチンの経鼻接種による交叉防御効果の詳細について解析し、同ワクチンによる交叉防御効果がインフルエンザHAワクチンとアジュバントとの併用接種の場合とほぼ同様であること、そして交叉防御効果の発現に鼻・気道粘膜、及び肺上皮中に分泌する交叉反応性中和抗体が関与する可能性が示された。

また、2009年にパンデミックを引き起こした新型インフルエンザウイルスの感染に対して、2009/10シーズンの季節性インフルエンザの経鼻接種の感染防御効果の検討を行ったところ、A/H1N1亜型とA/H3N2亜型のワクチンの経鼻接種により誘導される分泌型IgA抗体が鼻腔洗浄液中のウイルス値の軽減に効果があることが示された。

さらに、不活化H5N1インフルエンザワクチンにおけるヘモゾインのアジュバント効果をマ

ウスモデルで解析したところ、経鼻粘膜投与で高い液性免疫増強効果が認められた。

### 3. CTL 応答の検討

ウイルス亜型間でよく保存されている内部構造蛋白に由来した CTL エピトープ、及び現行のワクチンに含まれる HA 蛋白を同一リポソーム上に結合させ、トランスジェニックマウスに免疫したところ、顕著な抗 HA 抗体産生が誘導され、同時に M1 由来 CTL エピトープに特異的な CTL が誘導された。

さらに CTL エピトープと HA 抗原を同一リポソームに結合した場合には、CTL 誘導に必須であるアジュバントを必要としないことが分かり、HA 抗原が何らかのアジュバント能を有することが示唆された。

### 4. 検証を行う実験動物の樹立

インフルエンザウイルス感染における生体の免疫反応の解析を行い、ヘルパー T 細胞 (Th) の機能を確認し、インフルエンザウイルスの生体内での抑制には Th1 が重要であり、Th2 優位の状況ではアレルギー性炎症が誘導されることが示唆された。

さらにインフルエンザワクチンの安全性評価並びに効果判定を行う SPF カニクイザルを樹立した。

## D. 考察

将来どのようなインフルエンザが出現しても直ちに対応できる次世代ワクチンを作成する方法論を確立するためには、1. 出現するインフルエンザウイルスに遺伝学的にほぼ同じであるワクチンシードを保存する、2. いかなる状況でも迅速にワクチン製造ができるために鶏卵に頼らない、細胞培養によるウイルス増殖方法を確立する、3. ワクチン効果をより確実にするために交叉防御効果を誘導する免疫方法を確立する、が必要であると思われる。本研究では、次世代インフルエンザワクチンを作成するた

めの基盤として、上記3点に対する方法論を確立することを目的とする。

本年度は、以下の成果を得ることができた。

(1) ウイルスライブラリーとして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、試作したワクチンの評価に有用なものが含まれることが明らかになった。

(2) ウイルスライブラリーに存在する株の大部分を継代することにより、MDCK 細胞に馴化することを明らかにした。このことは、ウイルスライブラリーを用いてインフルエンザワクチンを作製することが可能であることを示すものである。

(3) これまでインフルエンザ不活性化全粒子ワクチンの交叉防御効果に抗ウイルス中和効果が関与するとの可能性について直接明らかにした報告は殆どなかったが、本年度の研究で、経鼻接種による交叉反応性の中和抗体値の大小が、交叉防御効果と相関することが明らかになった。

(4) 経鼻投与型インフルエンザワクチンは、交叉防御能を有する分泌型 IgA 抗体を誘導可能であることが改めて示され、流行するウイルス株の想定が困難であるパンデミックインフルエンザにおいて有用なワクチンになり得ると考えられる。

(5) 不活性化 H5N1 ウイルスワクチンに対して、ヘモジンがアジュバント効果を示すこと、及び、ヘモジンアジュバントワクチンの高濃度での投与により、インフルエンザウイルス感染防御効果を示すことが明らかになった。

(6) 抗 HA が宿主の細胞へのインフルエンザウイルスの感染を防御し、CTL がウイルス感染細胞の排除に貢献すると考えられていることから、本研究における、抗体と CTL を同時に誘導するワクチンは高効率にインフルエンザウイルス感染防御を誘導することが期待される。

(7) インフルエンザウイルス感染症における感

染抵抗性には Th1 反応が重要であり、Th2 優位の状況では呼吸器にアレルギー性炎症を誘導することが示唆された。

本年度の成果は、今後以下のように活用できると思われる。

(1) インフルエンザライブラリーを用いたワクチンシードの作成と保存

(2) 培養細胞を利用したワクチン用ウイルスの安定的な増殖方法の検討およびワクチン製造への応用

(3) 新たな粘膜アジュバントの活用による交叉防御効果を有するインフルエンザ HA ワクチンの経鼻接種方法の実用化への応用

(4) 交叉防御効果を誘導するインフルエンザ不活化全粒子ワクチンの経鼻接種方法の実用化への応用

(5) リポソームを利用した体液性および細胞性免疫応答双方を増強させるより効果的なインフルエンザワクチン実用化への応用

(6) インフルエンザウイルス感染に対する防御効果誘導における細胞性免疫応答の重要性と、ワクチン開発への利用

以上の成果を確立させ、組み合わせていくことで、我々の目指す次世代ワクチンを作成する方法を確立できる可能性が期待できる。

## E. 結論

本年度の研究によって、将来どのようなインフルエンザが出現しても直ちに対応できる次世代ワクチンを作成するための基盤が整備され、今後臨床応用に向けた研究が促進される。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### G-1. 論文発表

1. Matsuura M, Takemoto M, Yamanishi K, Mori Y. Human herpesvirus 6 major immediate early promoter has strong activity in T cells and is useful for heterologous gene expression. *Virology*. 407(2):360-7, 2011.
2. Tang H, Kawabata A, Yoshida M, Oyaizu H, Maeki T, Yamanishi K, Mori Y. Human herpesvirus 6 encoded glycoprotein Q1 gene is essential for virus growth. *Virology*. 407(2):360-7, 2010.
3. Koshizuka T, Ota M, Yamanishi K, Mori Y. Characterization of varicella-zoster virus-encoded ORF0 gene--comparison of parental and vaccine strains. *Virology*. 405(2):280-8, 2010
4. Somboonthum P, Koshizuka T, Okamoto S, Matsuura M, Gomi Y, Takahashi M, Yamanishi K, Mori Y. Rapid and efficient introduction of a foreign gene into bacterial artificial chromosome-cloned varicella vaccine by Tn7-mediated site-specific transposition. *Virology*. 402(1):215-21, 2010.
5. Sadaoka T, Yanagi T, Yamanishi K, Mori Y. Characterization of the varicella-zoster virus ORF50 gene, which encodes glycoprotein M. *J Virol*. 84(7):3488-502, 2010.
6. Isoda N, Tsuda Y, Sakoda Y, and Kida H. (2010) Improvement of the H5N1 influenza virus vaccine strain to decrease the pathogenicity in chicken embryos. *Arch Virol*, in press.
7. Feng F, Miura N, Isoda N, Sakoda Y, Okamatsu M, Kida H and Nishimura S. (2010) Novel trivalent

- anti-influenza reagent. *Bioorg Med Chem Lett* 20, 3772-3776.
8. Iwai A, Shiozaki T, Kawai T, Akira S, Kawaoka Y, Takada A, Kida H and Miyazaki T. (2010) Influenza A virus polymerase inhibits type I interferon induction by binding to interferon {beta} promoter stimulator 1. *J Biol Chem*. 285, 32064-32074.
  9. Okamatsu M, Tanaka T, Yamamoto N, Sakoda Y, Sasaki T, Tsuda Y, Isoda N, Kokumai N, Takada A, Umemura T and Kida H. (2010) Antigenic, genetic, and pathogenic characterization of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses isolated from dead whooper swans (*Cygnus cygnus*) found in northern Japan in 2008. *Virus Genes* 41, 351-357.
  10. Sakoda Y, Sugar S, Batchluun D, Erdene-Ochir TO, Okamatsu M, Isoda N, Soda K, Takakuwa H, Tsuda Y, Yamamoto N, Kishida N, Matsuno K, Nakayama E, Kajihara M, Yokoyama A, Takada A, Sodnomdarjaa R and Kida H. (2010) Characterization of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus strains isolated from migratory waterfowl in Mongolia on the way back from the southern Asia to their northern territory. *Virology* 406, 88-94.
  11. Tanaka T, Sunden Y, Sakoda Y, Kida H, Ochiai K and Umemura T. (2010) Lipopolysaccharide treatment and inoculation of influenza A virus results in influenza virus-associated encephalopathy-like changes in neonatal mice. *J Neurovirol* 16, 125-132.
  12. 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. (2010) 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.
  13. 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.
  14. Igarashi M, Ito K, Yoshida R, Tomabechi D, Kida H and Takada A. (2010) Predicting the antigenic structure of the pandemic (H1N1) 2009 influenza virus hemagglutinin. *PLoS One* 5, e8553.
  15. Ichinohe T, Aina A, Ami Y, Nagata N, Iwata N, Kawaguchi A, Suzaki Y, Odagiri T, Tashiro M, Takahashi H, Strayer D, Carter W, Chiba J, Tamura S, Sata T, Kurata T, and Hasegawa H. Intranasal administration of adjuvant-combined vaccine protects monkeys from challenge with the highly pathogenic influenza A H5N1 virus. *J Med Virol* 2010 Oct;82(10):1754-61.
  16. Kuroda M, Katano H, Nakajima N, Tobiume M, Aina A, Sekizuka T, Hasegawa H, Tashiro M, Sasaki Y, Arakawa Y, Hata S, Watanabe M, Sata T. Characterization of quasispecies of pandemic 2009 influenza A virus (A/H1N1/2009) by de novo sequencing using a next-generation DNA sequencer. *PLoS One*. 2010 Apr 23;5(4):e10256.
  17. Yamazaki T, Nagashima M, Ninomiya D, Arai Y, Teshima Y, Fujimoto A, Aina A, Hasegawa H, Chiba J. Passive Immune-Prophylaxis against Influenza

- Virus Infection by the Expression of Neutralizing Anti-Hemagglutinin Monoclonal Antibodies from Plasmids. *Jpn J Infect Dis.* 2011 Jan;64(1):40-9.
18. Ainai A, Tashiro M, Hasegawa H. Cross-protective immunity against influenza virus infections induced by intranasal vaccination together with a TLR3-mucosal adjuvant. *Hum Vaccin.* 2011 Jan 1;7. [Epub ahead of print]
  19. Tetsuya Uchida (2011) Development of a cytotoxic T-lymphocyte-based, broadly protective influenza vaccine. *Microbiol. Immunol.* 55:19-27.
  20. Maiko Taneichi, Yuriko Tanaka, Terutaka Kakiuchi, Tetsuya Uchida. (2010) Liposome-coupled peptides induce long-lived memory CD8+ T cells without CD4+ T cells. *PLoS ONE* 5(11): e15091.
  21. Yuriko Tanaka, Maiko Taneichi, Michiyuki Kasai, Terutaka Kakiuchi, Tetsuya Uchida. (2010) Liposome-coupled antigens are internalized by antigen-presenting cells via pinocytosis and cross-presented to CD8+ T cells. *PLoS ONE* 5(12): e15225.
  22. 内田哲也 (2010) 「細胞性免疫誘導型リポソームワクチン」 *Bio Clinica* 25:29-33.
  23. 内田哲也 (2010) 「今日の新型インフルエンザワクチンの問題点と将来展望」 *日本医師会雑誌* 139:1491-1494.
  24. Yoshida,T., Saito,A., Iwasaki,Y.,Iijima,S., Kurosawa,T., Katakai,Y., Yasutomi,Y., Reimann,K.A., Hayakawa,T. and Akari,H. Characterization of natural killer cells in tamarins: a technical basis for studies of innate immunity. *Frontiers Microbiol.* 2011 in press
  25. Xing, Li., Wang, J.C., Li, T-C., Yasutomi,Y., Lara,J., Khurdyakaov,Y., Schofield D., Emerson,S., Purcell,R., Takeda,N., Miyamura,T. and Holland,R.C. Spatial configuration of hepatitis E virus antigenic domain. *J.Virol.* 2011;85:1117-1124.
  26. Chono,H., Matsumoto,K., Tsuda,H., Saito,N., Lee,K., Kim,S., Shibata,H., Ageyama,N., Terao,K., Yasutomi,Y., Mineno J., Kim,S., Inoue,M. and Kato,I. Acquisition of HIV-1 resistance in T lymphocytes using an ACA-specific E.coli mRNA interferase. *Human Gene Ther.* 2011;22:35-43.
  27. Saito,A., Nomaguchi,M., Iijima,S., Lee,Y-J., Kono,K., Nakayama,E.E., Shioda,T., Yasutomi,Y., Adachi,A., Matano,T., Akari,H. A novel monkey-tropic HIV-1 derivative encoding only minimal SIV sequences can replicate in cynomolgus monkeys. *Micorbes Infect.* 2011;13:58-64.
  28. Naruse,T.K., Zhiyong,C., Yanagida,R., Yamashita,T., Saito,Y., Mori,K., Akari,H., Yasutomi,Y., Matano,T. and Kimura,A. Diversity of MHC class I genes in Burmese-origine rhesus macaques. *Immunogenetics* 2010;62:601-611.
  29. Okabayashi,S., Uchida,K., Nakayama,H., Ohno,C., Hanari,K., Goto,I. and Yasutomi,Y. Periventricular Leucomalacia (PVL)-like lesions in two neonatal cynomolgus monkeys (*macaca fascicularis*). *J.Comp.Pathol.* 2010 Epub
  30. Yasuhiro Yasutomi. Establishment of Specific Pathogen-Free Macaque Colonies in Tsukuba Primate Research Center of Japan for AIDS research. *Vaccine* 2010;28: B75-B77.
  31. Fujimoto,K., Takano,J., Narita,T., Hanari,K., Shimozawa,N., Sankai,T., Yoshida T., Terao,K.,



Kurata,T. and Yasutomi,Y. Simian Retrovirus type D infection in a colony of cynomolgus monkeys. *Comp.Med.* 2010;60:51-53.

32. Cueno,M.E., Karamatsu,K., Yasutomi, Y., Laurena,A. C. and Okamoto.T. Preferential expression and immunogenicity of HIV-1 Tat fusion protein expressed in tomato plant. *Transgenic Res.* 2010;19:889-895.
33. Kayamuro H, Yoshioka Y, Abe Y, Arita S, Katayama K, Nomura T, Yoshikawa T, Kubota-Koketsu R, Ikuta K, Okamoto S, Mori Y, Kunisawa J, Kiyono H, Itoh N, Nagano K, Kamada H, Tsunoda S, Tsutsumi Y. 2010. Systematic characterization of mucosal and systemic immune responses elicited by interleukins as mucosal vaccine adjuvant against influenza virus. *J. Virol.* 84:12703-12712.

#### G-2. 学会発表

1. 曾田公輔, Cheng Ming-Chu, 遠藤真由美, 吉田裕美, Lee Ming-Shiuh, Lee Shu-Hwae, 岡松正敏, 迫田義博, Wang Ching-Ho, 喜田宏 「台湾のニワトリから分離された低病原性 H5N2 インフルエンザウイルスの病原性獲得」第 58 回日本ウイルス学会学術集会 (2010 年、徳島)
2. 野村直樹, 迫田義博, 遠藤真由美, 吉田裕美, 山本直樹, 岡松正敏, 櫻井健二, 喜田宏 「ベトナムの家禽から分離された鳥インフルエンザウイルスの性状解析」第 58 回日本ウイルス学会学術集会 (2010 年、徳島)
3. 本島昌幸, 岡松正敏, 日尾野隆大, 迫田義博, 喜田宏 「カモとニワトリにおけるインフルエンザウイルスに対するシアル酸レセプターの局在」第 58 回日本ウイルス学会学術集会 (2010 年、徳島)
4. 吉田裕美, 迫田義博, 遠藤真由美, 本島昌幸, 吉野史,

山本直樹, 岡松正敏, 副島隆浩, 仙波晶, 神田秀俊, 櫻井健二, 喜田宏 「RT-LAMP によるインフルエンザウイルス遺伝子の検出とスクリーニング法としての有用性評価」第 58 回日本ウイルス学会学術集会 (2010 年、徳島)

5. 山本直樹, 遠藤真由美, 迫田義博, 吉田裕美, 佐藤由佳, 岡松正敏, Damdinjav Batchhluun, Ruuragchaa Sodnomdarjaa, 喜田宏 「モンゴルの野生水禽から分離された H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスの性状」第 58 回日本ウイルス学会学術集会 (2010 年、徳島)
6. M. Okamatsu, N. Yamamoto, Y. Sakoda, H. Kida. Potency of the A/2009 (H1N1) pandemic influenza vaccine prepared from an isolate of swine origin, A/swine/Hokkaido/2/1981 (H1N1). *Options for the Control of Influenza VII* (2010 年、香港)
7. K. Soda, S. Asakura, M. Okamatsu, Y. Sakoda, H. Kida. H9N2 Avian Influenza Virus Acquires High Pathogenicity by the Introduction of a Pair of Dibasic Amino Acid Residues at the Hemagglutinin Cleavage Site and Consecutive Passages in Chickens. *Options for the Control of Influenza VII* (2010 年、香港)
8. N. Nomura, Y. Sakoda, K. Soda, M. Okamatsu, H. Kida. H9N2 influenza virus vaccine prepared from a non-pathogenic isolate from a naturalreservoir conferred protective immunity against the challenge with a human H9N2 virus in mice. *Options for the Control of Influenza VII* (2010 年、香港)
9. 本島昌幸, 岡松正敏, 日尾野隆大, 迫田義博, 喜田宏 「カモとニワトリにおけるインフルエンザウイルスに対するシアル酸レセプターの局在」日本ウイルス学会北海道支部 第 44 回夏季シンポジウム (2010 年、洞爺湖)

10. 曾田公輔、浅倉真吾、岡松正敏、迫田義博、喜田宏 「H9 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 149 回日本獣医学会学術集会 (2010 年、東京)
11. 岡松正敏、山本直樹、迫田義博、喜田宏 「豚由来 H1N1 パンデミックインフルエンザワクチン候補株の選抜」第 149 回日本獣医学会学術集会 (2010 年、東京)
12. 山本直樹、本島昌幸、吉野史、岡松正敏、迫田義博、喜田宏 「野生水禽から分離されたインフルエンザウイルス A/mallard/Hokkaido/24/2009 (H5N1) の性状解析」第 149 回日本獣医学会学術集会 (2010 年、東京)
13. 長谷川秀樹、永田典代、岩田奈緒子、辻隆裕、佐多徹太郎 新型インフルエンザウイルス A/(H1N1)pdm のフェレットにおける病原性の検討 第 99 回日本病理学会総会 2010 年 4 月東京
14. 中島典子、羽田悟、飛梅実、片野晴隆、永田典代、長谷川秀樹、岩田奈緒子、辻隆裕、渡辺正秀、佐多徹太郎 本邦初の新型インフルエンザウイルス (A/H1N1pdm) 肺炎の剖検例 第 99 回日本病理学会総会 2010 年 4 月東京
15. 瀧山晃弘、王磊、谷野美智枝、木村太一、西原広史、川岸直樹、國枝保幸、片野晴隆、長谷川秀樹、高木知敬、佐多徹太郎、田中伸哉 新型インフルエンザ (A/H1N1pdm) 肺炎によるびまん性肺胞障害により急死した 1 剖検例 第 99 回日本病理学会総会 2010 年 4 月東京
16. 岩田奈緒子、永田典代、辻隆裕、長谷川秀樹、佐藤由子、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 第 99 回日本病理学会総会 2010 年 4 月東京
17. 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によるブースター効果と高病原性 H5N1 ウイルスの感染防御の検討 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島
18. 相内章、伊藤良、浅沼秀樹、鈴木忠樹、谷本武史、小田切孝人、田村慎一、佐多徹太郎、田代真人、長谷川秀樹 2009/10 季節性インフルエンザワクチンの経鼻投与による A/H1N1pdm ウイルスの感染阻害効果の検討 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島
19. 山崎達也、二宮大輔、長島麻里亜、荒井由佳、手嶋保智、相内章、長谷川秀樹、藤本陽、千葉丈 インフルエンザ中和抗体発現プラスミドを用いた遺伝子治療による感染と重症化の阻止 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島
20. 永田典代、岩田奈緒子、長谷川秀樹、佐藤由子、森川茂、佐多徹太郎 SARS 発症マウスモデルにおける IFN- $\gamma$  の投与効果 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島
21. 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、宇田晶彦、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 の副反応について 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島
22. 酒井宏治、田丸精治、前田健、永田典代、網康至、岩田奈緒子、鈴木忠樹、水谷哲也、福士秀悦、須崎百合子、緒方もも子、長谷川秀樹、西條政幸、山田靖子、倉根一郎、森川茂 カニクイザルで致死感染症を起こしたイヌジステンパーウイルスのサル及びイヌでの病原性の解析 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島

23. 伊藤良、相内章、浅沼秀樹、鈴木忠樹、千葉丈、田村慎一、田代真人、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抗原性の異なる株による追加免疫時の免疫応答の解析 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島
24. 中島典子、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹、佐多徹太郎 日本の 2009 年 H1N1 新型インフルエンザウイルス感染症剖検例の病理 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島
25. 池辺詠美、川口晶、田口慎也、川嶋太郎、田中勇悦、堀光雄、澤洋文、西園晃、長谷川秀樹、伊波英克 分子シャペロン阻害剤による Tax と Tax 結合蛋白質の機能相関性に対する抑制的影響 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島
26. 浅沼秀樹、信澤枝里、白倉雅之、許斐奈美、山本典生、中内美奈、網康至、長谷川秀樹、相内章、高下恵美、小淵正次、徐紅、岸田典子、小田切孝人、田代真人 新型インフルエンザウイルス (H1N1pdm) の増殖性に関する検討 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月徳島
27. 相内章、田村慎一、鈴木忠樹、伊藤良、浅沼秀樹、谷本武史、五味康行、奥野良信、小田切孝人、田代真人、佐多徹太郎、倉田毅、長谷川秀樹 インフルエンザワクチン経鼻接種による成人での血清および鼻腔洗浄液中のウイルス特異的中和抗体の評価 第 14 回日本ワクチン学会学術集会 2010 年 12 月東京
28. 谷本武史、高野大輔、森本孝一、五味康行、長谷川秀樹、田村慎一、宮崎隆、真鍋貞夫、石川豊数、奥野良信 経鼻インフルエンザワクチンによる免疫獲得効果検討 第 14 回日本ワクチン学会学術集会 2010 年 12 月東京
29. 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 第 14 回日本ワクチン学会学術集会 2010 年 12 月東京
30. Toshitaka Akatsuka, Akira Takagi, Osamu Moriya, Nobuharu Kobayashi, Masanori Matsui, Maiko Taneichi, Tetsuya Uchida, A non-immunogenic hepatitis C virus peptide coupled to the surface of liposomes induces an efficient ant-viral CD8 T cell response. 17th International Symposium on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Yokohama, Sep. 10-14, 2010.
31. 赤塚俊隆、高木徹、守屋修、小林信春、松井政則、種市麻衣子、内田哲也、非免疫原性 HCV 由来ペプチドによる抗ウイルス CD8+T 細胞反応の誘導. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、Nov 7-9, 2010.
32. 赤塚俊隆、高木徹、守屋修、小林信春、松井政則、種市麻衣子、内田哲也、非免疫原性 HCV 由来ペプチドによる抗ウイルス CD8+T 細胞反応の誘導. 第 14 回日本ワクチン学会学術集会、東京、Dec 11-12, 2010.
33. 塩釜ゆみ子、松原明弘、河岡義裕、保富康宏：ヘルパー T 細胞 (Th) 制御によるインフルエンザ感染病態とワクチン効果の検討第 13 回日本ワクチン学会 東京 2010 年 12 月 11 日～12 日
34. 保富康宏：アジュバント分子組み込みエイズウイルスの開発 (シンポジウム) 第 24 回日本エイズ学会、東京、2010 年 11 月 24 日～26 日
35. 齊藤暁、河野健、黒石歩、中山英美、塩田達雄、足立昭夫、野間口雅子、保富康宏、俣野哲朗、明里宏文：カニクイザル TRIM5 allele がサル指向性 HIV-1 の増殖に与えるインパクト第 24 回日本エイズ学会、東京、2010 年 11 月 24 日～26 日
36. 下澤律浩、高橋一郎、柴田宏昭、伊奈田宏康、野

阪哲哉、保富康宏：カニクイザル体細胞に由来する人工多能性幹細胞の作製第 57 回日本実験動物学会、京都、2010 年 5 月 12 日～14 日

37. Yusuke TSUJIMURA, Yasuhiro YASUTOMI: Therapeutic effects of Ag85B in allergic asthma by inducing not only Th1 response but also Interleukin-17, -22 production. 14th International Congress of Immunology. Kobe Japan, August 22-27, 2010.
38. Akihiro Matsubara, Kenta Watanabe, Mitsuo Kawano, Satoru Mizuno, Yusuke Tsujimura, Hiroyasu Inada, Masayuki Fukumura, Isamu Sugawara, Tetsuya Nosaka, Kazuhiro Matsuo, Yasuhiro Yasutomi: Intranasal immunization with replication-deficient recombinant human parainfluenza type 2 virus-Ag85B showed protective effects against Mycobacterium tuberculosis infection. TB Vaccines. A Second Global Forum, Tallinn, Estonia September 21-24, 2010.
39. Yasuhiro Yasutomi: Gene delivery of suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) showed therapeutic effects to autoimmune myocarditis in mice. 2nd Annual International Congress of Cardiology, Shanghai, China, December 7-9, 2010.
40. Y. Tsujimura and Y. Yasutomi. Therapeutic effects of Ag85B in allergic asthma by inducing not only Th1 response but also Interleukin-17, -22 production. Immunity in the Respiratory Tract : Challenges of the Lung Environment. Keystone Symposia, Vancouver, Canada, February 26 - March 3, 2011.
41. 岡本 成史、松岡 須美子、山田 博司、五味 康行、奥野 良信、明石 満、森 康子、山西 弘一、インフ

ルエンザ不活化全粒子ワクチン経鼻接種による交叉防御免疫応答の検討、第 14 回日本ワクチン学会 学術集会、東京都千代田区、2010 年 12 月 11-12 日。

42. Okamoto S, Matsuoka S, Yamada H, Gomi Y, Okuno Y, Akagi T, Akashi M, Mori Y, Yamanishi K, Protective immune response by intranasal immunization with split-virion influenza A vaccine with adjuvant and whole-virion influenza A vaccine, Cell Symposia: Influenza - Translating basic insights, Washington DC, USA, December 2-4, 2010.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 「C 型肝炎ウイルスリポソームワクチン」  
出願番号：特願 2010-201160  
出願日：2010 年 10 月 14 日  
発明者：赤塚俊隆（埼玉医大）、内田哲也、種市麻衣子（国立感染研）、横山晶一、桑原愛（日油株式会社）
2. 「エボラウイルスリポソームワクチン」  
出願番号：特願 2010-231918  
出願日：2010 年 10 月 14 日  
発明者：松井政則（埼玉医大）、内田哲也、種市麻衣子（国立感染研）、横山晶一、桑原愛（日油株式会社）
3. 保富康宏：パラミクソウイルスベクターを用いた経鼻噴霧型結核ワクチン  
2010 年 11 月 1 日（PCT/JP2010/069435）
4. 保富康宏：遺伝子導入用ウイルスベクターの製造方法  
2011 年 2 月 8 日（特願 2011-025234）

## ウイルスライブラリーを活用した種ウイルス株の作製

研究分担者：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】

動物インフルエンザのサーベイランスにより得られたインフルエンザウイルスのライブラリーから、将来出現が予想されるパンデミックウイルスに対するワクチン候補株を先回りで準備する体制を確立する必要がある。2010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5,642検体から合計85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からH10の10の亜型に、NA亜型はN1、N2、N3、N4、N6、N7、N8、N9の8つの亜型に区分された。分離ウイルスは当研究室のウイルス株ライブラリーに追加保存した。これらのうち、H5およびH9ウイルスについて抗原性解析を行い、H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスは、1996年香港で初めて出現したウイルスの抗原性とは異なる抗原変異株（遺伝子クレードで2.3.2と2.3.4）が存在することがわかった。またH9ウイルスについて、G1、G9、Koreaの3つの遺伝子型のウイルスは抗原的にもお互いに異なることがわかった。さらに、試製したH5およびH9亜型ワクチンの効果を評価するために、抗原性解析の成績をもとに攻撃株を選抜した。これらのウイルスはマウスに対して高い病原性を示し、攻撃株として適していることを確認した。

### A. 研究目的

2009年に豚由来H1N1亜型ウイルスが出現しパンデミックを引き起こした。また、アジアから家禽と野鳥に感染が拡大したH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスや家禽だけでなく豚でも感染が拡大しているH9N2亜型ウイルスなどがパンデミックインフルエンザウイルスとして出現することが危惧されている。これまでに出現したパンデミックインフルエンザウイルスは、すべて動物由来インフルエンザウイルスに起因している。よって、パンデミックに備えるために、動物インフルエンザのサーベイランスを実施し、分離されたウ

イルスをワクチン候補株として先回りで保管し、適切なワクチン株を迅速に提供する体制を確立することが必要である。そこで、動物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、将来出現が予想されるインフルエンザウイルスをワクチン製造用候補株としてライブラリー化することとした。

### 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。

近年分離された H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスの抗原性を過去に分離されたウイルスのそれと HI 試験により比較した。また、同様にウイルスライブラリーに保存されている H9 ウイルスの抗原性を HI 試験により評価した。

これらの抗原性解析の成績をもとに、試製した H5 および H9 亜型ワクチンの評価に適した株を選抜した。選抜されたウイルスを Balb/c マウスに経鼻接種し、体重変化と接種 3 日目の肺のウイルス感染価を測定し、マウスに対する病原性を確認した。

### C. 研究結果

家禽と野鳥の気管ぬぐい液および糞便 5,642 検体から合計 85 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 から H10 の 10 の亜型に、NA 亜型は N1、N2、N3、N4、N6、N7、N8、N9 の 8 つの亜型に区分された。分離されたウイルスには H5N1 亜型のウイルスも含まれており、モンゴル、香港、日本の野鳥から分離されたウイルスは高病原性鳥インフルエンザウイルスであった。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 68 通りのウイルスに、76 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。

近年東アジア地域で分離された H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスは、遺伝子型でクレード 2.3.2 に分類される株が多かった。このクレード 2.3.2 のウイルスの抗原性を 1996 年香港で初めて出現した H5N1 ウイルスのそれと HI 試験で比較したところ、両株には大きな抗原性の差があることがわかった。また、中国で流行している別の遺伝子型 (クレード 2.3.4) のウイルスの抗原性を

同様に評価したところ、このウイルスも 1996 年香港で初めて出現した H5N1 ウイルスと大きな抗原性の差があることがわかった。さらに、クレード 2.3.2 と 2.3.4 のウイルスの間にも大きな抗原性の差があることがわかった。

H9 ウイルスは遺伝子型として G1、G9、Korea の 3 つサブグループに分けられ、これらは互いに抗原性も異なることがわかった。しかし、Korea グループのウイルス株に対する抗血清は、他のグループのウイルスも広く交差することがわかった。この結果から、Korea グループのウイルス株が H9 ウイルスに対するワクチン株として適切であることがわかった。

H5 ウイルスと H9 ウイルスの抗原性解析の結果から、各血清型を代表するウイルス株を選抜し、マウスに対する病原性を比較した。その結果、抗原変異株である A/whooper swan/Hokkaido/4/2011 (H5N1) (クレード 2.3.2) と A/peregrine falcon/Hong Kong/810/09 (H5N1) (クレード 2.3.4) はともにマウスに対して致死的な病原性を示した。また、H9 ウイルスの中ではヒトからの分離例が多い G1 グループに属する A/Hong Kong/1073/1999 (H9N2) がマウスに対して致死的な病原性を示すことがわかった。以上の結果から、今後 H5 および H9 亜型の試製ワクチンの効果を評価する際に、これらのウイルス株を攻撃株として試験を行い、全粒子ワクチンの高い免疫原性を証明することができる。

### 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。

### 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、さらにその評価試験に有用なウ

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、より安全で有効なワクチンの開発が早急に求められている。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Isoda N, Tsuda Y, Sakoda Y, and Kida H. (2010) Improvement of the H5N1 influenza virus vaccine strain to decrease the pathogenicity in chicken embryos. Arch Virol, in press.
2. Feng F, Miura N, Isoda N, Sakoda Y, Okamatsu M, Kida H and Nishimura S. (2010) Novel trivalent anti-influenza reagent. Bioorg Med Chem Lett 20, 3772-3776.
3. Iwai A, Shiozaki T, Kawai T, Akira S, Kawaoka Y, Takada A, Kida H and Miyazaki T. (2010) Influenza A virus polymerase inhibits type I interferon induction by binding to interferon {beta} promoter stimulator 1. J Biol Chem.
4. Okamatsu M, Tanaka T, Yamamoto N, Sakoda Y, Sasaki T, Tsuda Y, Isoda N, Kokumai N, Takada A, Umemura T and Kida H. (2010) Antigenic, genetic, and pathogenic characterization of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses isolated from dead whooper swans (*Cygnus cygnus*) found in northern Japan in 2008. Virus Genes 41, 351-357.
5. Sakoda Y, Sugar S, Batchluun D, Erdene-Ochir TO, Okamatsu M, Isoda N, Soda K, Takakuwa H, Tsuda Y, Yamamoto N, Kishida N, Matsuno K, Nakayama E, Kajihara M, Yokoyama A, Takada A, Sodnomdarjaa R and Kida H. (2010) Characterization of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus strains isolated from migratory waterfowl in Mongolia on the way back from the southern Asia to their northern territory. Virology 406, 88-94.
6. Tanaka T, Sunden Y, Sakoda Y, Kida H, Ochiai K and Umemura T. (2010) Lipopolysaccharide treatment and inoculation of influenza A virus results in influenza virus-associated encephalopathy-like changes in neonatal mice. J Neurovirol 16, 125-132.
7. 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. (2010) 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.
8. 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.
9. Igarashi M, Ito K, Yoshida R, Tomabechi D, Kida H and Takada A. (2010) Predicting the antigenic structure of the pandemic (H1N1)

- 2009 influenza virus hemagglutinin. PLoS One 5, e8553.
2. 学会発表
1. 「台湾のニワトリから分離された低病原性 H5N2 インフルエンザウイルスの病原性獲得」曾田公輔、Cheng Ming-Chu、遠藤真由美、吉田裕美、Lee Ming-Shiuh、Lee Shu-Hwae、岡松正敏、迫田義博、Wang Ching-Ho、喜田宏 第 58 回日本ウイルス学会学術集会(2010 年、徳島)
  2. 「ベトナムの家禽から分離された鳥インフルエンザウイルスの性状解析」野村直樹、迫田義博、遠藤真由美、吉田裕美、山本直樹、岡松正敏、櫻井健二、喜田宏 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 (2010 年、徳島)
  3. 「カモとニワトリにおけるインフルエンザウイルスに対するシアル酸レセプターの局在」本島昌幸、岡松正敏、日尾野隆大、迫田義博、喜田宏 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 (2010 年、徳島)
  4. 「RT-LAMP によるインフルエンザウイルス遺伝子の検出とスクリーニング法としての有用性評価」吉田裕美、迫田義博、遠藤真由美、本島昌幸、吉野史、山本直樹、岡松正敏、副島隆浩、仙波晶、神田秀俊、櫻井健二、喜田宏 第 58 回日本ウイルス学会学術集会(2010 年、徳島)
  5. 「モンゴルの野生水禽から分離された H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスの性状」山本直樹、遠藤真由美、迫田義博、吉田裕美、佐藤由佳、岡松正敏、Damdinjav Batchhluun, Ruuragchaa Sodnomdarjaa、喜田宏 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 (2010 年、徳島)
  6. 「Potency of the A/2009 (H1N1) pandemic influenza vaccine prepared from an isolate of swine origin, A/swine/Hokkaido/2/1981 (H1N1)」M. Okamatsu, N. Yamamoto, Y. Sakoda, H. Kida Options for the Control of Influenza VII (2010 年、香港)
  7. 「H9N2 Avian Influenza Virus Acquires High Pathogenicity by the Introduction of a Pair of Di-basic Amino Acid Residues at the Hemagglutinin Cleavage Site and Consecutive Passages in Chickens」K. Soda, S. Asakura, M. Okamatsu, Y. Sakoda, H. Kida Options for the Control of Influenza VII(2010 年、香港)
  8. 「H9N2 influenza virus vaccine prepared from a non-pathogenic isolate from a naturalreservoir conferred protective immunity against the challenge with a human H9N2 virus in mice」N. Nomura, Y. Sakoda, K. Soda, M. Okamatsu, H. Kida Options for the Control of Influenza VII(2010 年、香港)
  9. 「カモとニワトリにおけるインフルエンザウイルスに対するシアル酸レセプターの局在」本島昌幸、岡松正敏、日尾野隆大、迫田義博、喜田宏 日本ウイルス学会北海道支部 第 44 回夏季シンポジウム (2010 年、洞爺湖)
  10. 「H9 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 149 回日本獣医学会学術集会 (2010 年、東京)
  11. 「豚由来 H1N1 パンデミックインフルエンザワクチン候補株の選抜」岡松正敏、山本直樹、迫田義博、喜田宏 第 149 回日本獣医学会学術集会 (2010 年、東京)



12. 「野生水禽から分離されたインフルエンザウイルス A/mallard/Hokkaido/24/2009 (H5N1) の性状解析」山本直樹、本島昌幸、吉野史、岡松正敏、迫田義博、喜田宏 第 149 回日本獣医学会学術集会（2010 年、東京）

G. 知的財産の出願、登録状況  
予定なし。

## インフルエンザウイルス抗原の解析

研究分担者： 河岡義裕 東京大学 医科学研究所 教授

### 【研究要旨】

不活化 H5N1 インフルエンザワクチンにおけるヘモゾインのアジュバント効果をマウスモデルで解析したところ、経鼻粘膜投与で高い液性免疫増強効果が認められた。さらに、ヘモゾインアジュバントワクチンの高濃度投与により、インフルエンザウイルス感染防御効果が認められた。

### A. 研究目的

インフルエンザの制御には、抗ウイルス薬とワクチンが用いられるが、近年のタミフル耐性 H1N1 ウイルスの流行をみても、ワクチンの重要性が認識される。しかしながら、現行のスプリット型ワクチンの筋肉内投与では、血中 IgG が誘導されるのみであり、ワクチン作製に用いたウイルスの型と、実際に流行した型が異なった場合、十分な予防効果が得られない可能性がある。そのため、多少型が異なっても免疫効果を発揮し得る粘膜免疫誘導型の経鼻投与ワクチンの開発が望まれている。ヘモゾイン（ $\beta$ -hematin）は、マラリア原虫により赤血球代謝産物で、TLR9 リガントであり、アジュバント効果を有することが明らかとなっている。そこで、H5N1 不活化ワクチンの経鼻投与におけるヘモゾインのアジュバント効果を解析することを目的とし、本研究を行った。

### B. 研究方法

ホルマリンで不活化した A/Vietnam/VN1203/04 (H5N1) ウイルス ( $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $5$

$\times 10^7$ PFU) をヘモゾインと混合し、50 $\mu$ l に調整した後、4 週齢の BALB/c マウスに経鼻投与した。コントロールとして、不活化ウイルスのみの経鼻投与、Alum アジュバントを用いた筋肉内投与、ウイルスのみの筋肉内投与を行った。初回免疫後 14 日目に、ブースト投与した。

肺胞洗浄液、鼻腔ぬぐい液、血液を採取した後、初回免疫後 28 日目に 100MLD50 の A/Vietnam/VN1203/04 で攻撃し、生死、体重変化、肺のウイルス量などを観察した。

### C. 研究結果

ヘモゾインアジュバントを用いた不活化 H5N1 ウイルスを投与したマウスの液性免疫活性を、血中 HI titer により調べたところ、 $5 \times 10^6$ PFU のウイルス量を用いた際に、Alum アジュバントと同程度の活性上昇が認められた。また、肺胞洗浄液と、鼻腔ぬぐい液中のインフルエンザウイルスに特異的な IgA 量を測定したところ、ヘモゾインアジュバントを用いて経鼻投与したマウスのみで、IgA 量の上昇が認められた。

$5 \times 10^6$ PFU の不活化ウイルスのみ（アジュバ

ントなし)を免疫原として経鼻投与したマウスは、致死量のH5N1ウイルスによる攻撃後、9日目で全て死亡したが、同量の不活化ウイルスをヘモゾインアジュバントを用いて投与したマウスでは、60%が生残した。しかし、ヘモゾインアジュバントによる肺でのウイルス増殖抑制は認められなかった。

#### D. 考察

ヘモゾインアジュバントにより、液性免疫効果の増強が認められた。また、肺胞洗浄液と鼻腔ぬぐい液中のIgA量の上昇は、ヘモゾインアジュバントワクチンを経鼻投与したマウスのみで認められたことから、不活化H5N1ウイルスワクチンに対して、ヘモゾインがアジュバント効果を示すことが明らかとなった。

また、ヘモゾインアジュバントワクチンの高濃度での投与により、インフルエンザウイルス感染防御効果を示すことが明らかとなった。

#### E. 結論

ヘモゾインは、マウスモデルでH5N1ワクチンのアジュバントとして、有効であることが明らかとなった。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし
3. その他  
該当なし

## CTL 及び抗体誘導型インフルエンザワクチンの開発

研究分担者： 内田 哲也（国立感染症研究所血液・安全性研究部 主任研究官）

研究協力者： 種市麻衣子（国立感染症研究所血液・安全性研究部 主任研究官）

### 【研究要旨】

インフルエンザウイルスに対する液性免疫と細胞性免疫を同時に誘導することのできるワクチンの創製を目標として、現行のインフルエンザスプリットワクチンに使用されている HA 抗原およびインフルエンザウイルス内部タンパク、Matrix Protein (M1) 由来 HLA-A2 拘束性 CTL エピトープペプチドを同一リポソームの表面に化学結合したワクチンを作製し、HLA-A2 トランスジェニックマウスに免疫して液性免疫応答（抗 HA 抗体産生）および細胞性免疫応答（抗原特異的 CTL 誘導）を検討したところ、免疫 2 週後から顕著な抗 HA 抗体産生が誘導され、同時に M1 由来 CTL エピトープに特異的な CTL が誘導された。さらに、CTL エピトープと HA 抗原を同一リポソームに結合させた場合には CTL 誘導に必須であるアジュバントを必要としないことがわかり、HA 抗原が何らかのアジュバント能を有する事が示唆された。

### A. 研究目的

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

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

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