

誘導されることを見いだした (J. Immunol. 2006; 177: 2324-2330)。

本研究においては、我々が開発した抗原-リポソーム処方をインフルエンザワクチンの創製に応用し、リポソームの表面にインフルエンザ HA タンパクと CTL エピトープペプチドを結合することにより液性免疫 (抗体) と細胞性免疫 (CTL) を同時に誘導することのできるワクチンの開発を目的とする。

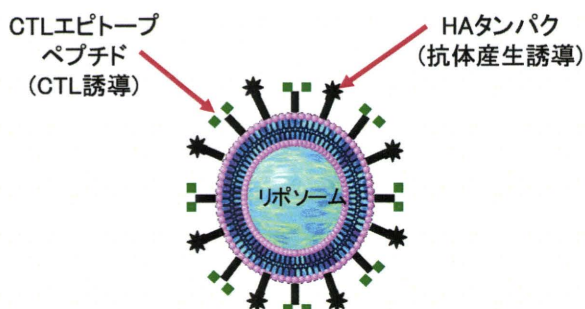
## B. 研究方法

高効率に抗原特異的抗体産生および CTL を誘導することの確認されている、不飽和脂肪酸からなるリポソームの表面に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) 由来の HLA-A2 拘束性 CTL エピトープペプチドを DSS を介して化学結合させた (図 1)。これを HLA-A2 トランスジェニックマウスに皮下投与し、抗原特異的抗体産生および CTL 誘導を検討した。血清中の HA 特異的 IgG および IgE 抗体価を ELISA によって測定し、抗原特異的 CTL 誘導を in vivo CTL assay を用いて検討した (図 2)。

(倫理面への配慮)

使用された実験動物は、国立感染症研究所動物実験委員会規定に基づき飼育され、日本動物学会が定めた、苦痛の軽減、安楽死等に配慮した指針に従って実験を行った。

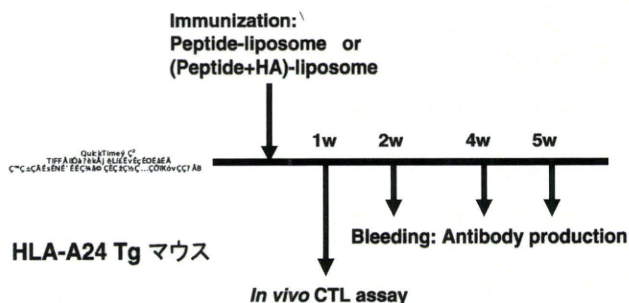
図1: リポソームワクチンの構成



CTLエピトープペプチドとHAタンパクをリポソーム表面に化学結合する。

図2: Experimental Protocol

- ・マウス: HLA-A24トランスジェニックマウス
- ・ペプチド: インフルエンザウイルス由来HLA-A24拘束性CTLエピトープ
- ・タンパク抗原: H3N2インフルエンザウイルス由来HA抗原

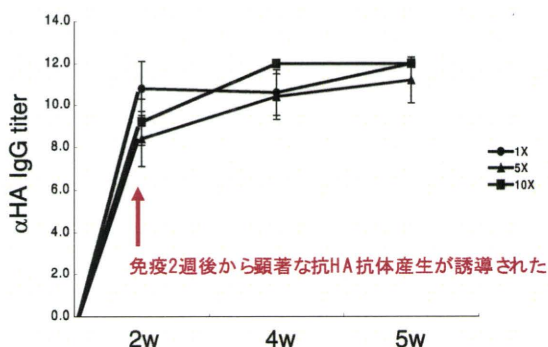


## C. 研究結果

1) HA 特異的抗体産生の誘導: HA および CTL エピトープペプチドを表面に結合させたリポソームでマウスを免疫したマウス末梢血中の抗 HA IgG 抗体産生を図 3 に示す。免疫 2 週後から顕著な抗 HA IgG 抗体産生が観察された。一方、HA をアルミニウムアジュバントとともに免疫 (HA-alum) したマウスにおいては IgG とともに顕著な抗 HA IgE 抗体産生が観察されたが、(HA + CTL エピトープペプチド) - リポソーム免疫群では HA-alum 投与群と同程度の IgG 産生が誘導されたのに対して IgE 産生は顕著に抑制された (データを省略)。

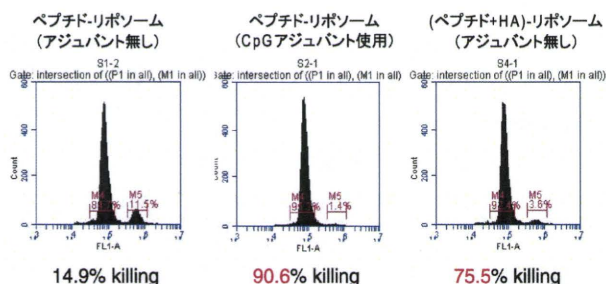
2) インフルエンザウイルス M1 由来 CTL エピトープに特異的な CTL の誘導: マウスに上記 1) と同様の免疫を行い、7 日後に CTL エピトープペプチドに特異的な CTL の誘導の有無を in vivo CTL assay を用いて検討した結果を図 4 に示す。CTL エピトープペプチド-リポソームで CTL を

図3: 抗HA抗体産生の誘導



誘導するには CpG アジュバントが必要であったが、(HA + CTL エピトープペプチド) - リポソームで免疫を行った群では CpG アジュバント非存在下で顕著な CTL が誘導された。

図4: 抗原特異的CTLの誘導



#### D. 考察

HA 抗原結合リポソームは免疫 2 週間後に顕著な抗 HA IgG 抗体産生を誘導し、かつ抗 HA IgE 抗体は誘導しなかった。この結果はこれまでに得られた知見：「リポソームに結合させた抗原は抗原特異的 IgG を誘導するが IgE は誘導しない」と一致した。このことからリポソーム結合抗原をインフルエンザスプリットワクチンに応用することにより、アレルギー反応を惹起しにくいワクチンの創製が可能になると期待された。

HA 抗原とインフルエンザウイルス由来 CTL エピトープペプチドを同時に結合したりポソームは CpG 非存在下で CTL を誘導した。このことから、HA 抗原を構成する成分に何らかのアジュバント作用を有するもの（例えばインフルエンザウイルス由来の RNA）が含まれていることが考えられた。

抗 HA 抗体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。

#### E. 結論

リポソーム表面にインフルエンザウイルス由来 HA 抗原および CTL エピトープを結合したワクチンは、アジュバント非存在下で液性免疫と細胞性免疫を同時に誘導した。

#### F. 研究発表

1. 論文発表
  1. Tetsuya Uchida (2011) Development of a cytotoxic T-lymphocyte-based, broadly protective influenza vaccine. *Microbiol. Immunol.* 55:19-27.
  2. 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.
  3. 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.
  4. 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.
  5. 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.
2. 学会発表
  1. 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.

2. 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.
3. 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.

## G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

### 1. 特許出願

#### 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）

### 2. 実用新案登録

該当無し

### 3. その他

該当無し

## 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

研究分担者： 長谷川秀樹（国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター）  
研究協力者： 相内 章、鈴木 忠樹、伊藤 良、田村 慎一（国立感染症研究所）  
梁 明秀（横浜市立大学医学部微生物学教室）

### 【研究要旨】

経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンは、感染の場となる気道粘膜上に交叉防御能を有する分泌型 IgA 抗体を誘導することで、インフルエンザウイルスの感染阻止に有効である。このことから、ワクチン株とは抗原性の異なるウイルスが流行した場合にも、感染阻止効果が期待できる。本研究では、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ワクチンの経鼻接種の感染防御効果の検討を行った。その結果、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価の軽減に効果があることが示された。

### A. 研究目的

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ヘマグルチニン（HA）は、これまでの季節性インフルエンザウイルスのHAと遺伝子配列およびアミノ酸配列が大きくことなり、その抗原性が異なる。HAはウイルス表面膜タンパク質の一つであり、ワクチンにおける主要抗原となる。現行の皮下接種ワクチンは、ワクチン株と流行株の抗原性が一致したときのみ、有効であることが既に知られている。これに対し、経鼻粘膜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 抗体を感染の場となる気道粘膜上に誘導することで、抗原性の異なる流行株に対しても感染阻止効果が期待できる。このことから、流行するウイルス株を想定できないパンデミックに対するワクチンとして期待されている。本研究におい

ては、2009/10季節性インフルエンザワクチンの経鼻接種が、2009年の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防御に有効であるか否かを、またどの亜型のワクチンが有効であることを明らかにすることを目的とした。

### B. 研究方法

#### 材料と方法：

マウス

6～8週齢、雌のBALB/cマウス、およびIgA抗体の粘膜上への移行が起こらないpoly Ig receptor KO (pIgR KO) マウスを一群5匹で利用した。動物への処置は国立感染症研究所の定める動物実験実施規定に則り、苦痛を与えないように考慮した。

## ワクチン接種

2009/10 季節性インフルエンザワクチンに含まれる A/Brisbane/59/07 (H1N1)、A/Uruguay/716/07 (H3N2)、B/Brisbane/60/08 のスプリットワクチンをそれぞれ単身で用いた。一回のワクチン接種において、HA 1 µg を BALB/c マウス 1 匹あたり片鼻 2 µl (計 4 µl) を経鼻にて接種した。A/Brisbane/59/07 (H1N1) に関しては、BALB/c マウスに皮下接種する群と、pIgR KO マウスに経鼻接種する群を同時に設けた。アジュバントとして、合成二本鎖 RNA Ampligen® (20 µg) を添加した群を準備した。1 回目のワクチン接種から 3 週後に、2 回目のワクチン接種を行った。

## ウイルス感染

2 回目のワクチン接種から、2 週後にマウス馴化新型インフルエンザウイルス A/Narita/1/09 (A/Narita, H1N1 pdm) のウイルス感染を行った。感染は、1000 pfu の A/Narita を片鼻 2 µl (計 4 µl) で感染をおこなう上気道感染モデルにて行った。感染 3 日後に、上気道感染モデルにおいては血清と鼻腔洗浄液を回収した。

## 血清および鼻腔・肺洗浄液中の抗体応答の検討

2009/10 季節性インフルエンザワクチンの各単身ワクチン、ホルマリン不活化 A/Narita ウイルス、およびバキュロウイルス発現系を用いて作製した A/Narita ウイルス組換え HA タンパク質を抗原とした ELISA により、血清中 IgG 抗体応答、鼻腔洗浄液中 IgA 抗体応答を比較した。

## ウイルスの定量

MDCK 細胞を用いたプラークアッセイ法により、鼻腔洗浄液中のウイルス価を算出した。MDCK 細胞に希釈した鼻腔洗浄液を 200 µl 添加し、37°C の培養器内で 1 時間の吸着操作を行った。その後、細胞を洗浄しアガロース添加培地を重層して 37°C で 40 時間培養した。アガロース培地

を剥離したのちに、クリスタルバイオレット染色液で染色し、プラーク数を数え、ウイルス価の算出を行った。

## C. 研究結果

BALB/c マウス、pIgR KO マウスに 2009/10 季節性インフルエンザワクチン A/Brisbane/59/07 (H1N1)、A/Uruguay/716/07 (H3N2)、B/Brisbane/60/08 をそれぞれ単身で 2 回経鼻接種あるいは皮下接種した。その後、マウス馴化新型インフルエンザウイルス A/Narita (H1N1 pdm) の上気道感染を行い、鼻腔洗浄液中のウイルス価、IgA 抗体応答、血清中 IgG 抗体応答を比較した。

BALB/c マウスへの各単身ワクチン経鼻接種群における鼻腔洗浄液中のウイルス価は、A/Brisbane/59/07 (H1N1)、A/Uruguay/716/07 (H3N2) のワクチンに Ampligen® をアジュバントとして添加した群において、ワクチン接種を行わなかったコントロール群に対して有意にウイルス価の減少がみられた。Ampligen® を添加しない群においては、ウイルス価の減少はみられなかった。A/Brisbane/59/07 (H1N1) および A/Uruguay/716/07 (H3N2) のワクチン接種群において、ホルマリン不活化 A/Narita ウイルスに対する血清中 IgG および鼻腔洗浄液中 IgA 抗体の応答がみられたが、組換え A/Narita HA に対する抗体応答は A/Brisbane/59/07 (H1N1) のワクチン接種群のみで認められた (表 1)。

BALB/c マウスにおいて A/Brisbane/59/07 (H1N1) ワクチンの経鼻接種と皮下接種を比較したところ、皮下接種の場合には Ampligen® を添加しても鼻腔洗浄液中のウイルス価の減少がみられなかった。このとき皮下接種群において、A/Narita ウイルスに反応しうる血清中 IgG 抗体は誘導されるものの、上気道領域に分泌型 IgA 抗体は誘導されないことが示された (表 2)。

次に、分泌型 IgA 抗体が欠落する pIgR KO マウスに対して、A/Brisbane/59/07 (H1N1) ワク



チンを経鼻接種し、A/Narita ウイルスの感染を行った。pIgR KO マウスにおいては、鼻腔洗浄液中に IgA 抗体の産生はみられず、感染に用い

た A/Narita ウイルスの増殖を抑制できないことが示された (表 3)。

表 1. 2009/10 季節性単身インフルエンザワクチンの経鼻接種による A/Narita ウイルス感染防御効果の比較

ワクチン	Ampligen*	鼻腔洗浄液中 ウイルス価	血清中 IgG、鼻腔洗浄液中 IgA 抗体応答	
			ホルマリン不活化 A/Narita ウイルス	組換え A/Narita HA
無	無			
A/Brisbane (H1N1)	無		IgG, IgA; ○	IgG, IgA; ○
A/Brisbane (H1N1)	有	有意に減少; ◎	IgG, IgA; ◎	IgG, IgA; ◎
A/Uruguay (H3N2)	無		IgG, IgA; △	
A/Uruguay (H3N2)	有	有意に減少; ○	IgG, IgA; ○	
B/Brisbane	無			
B/Brisbane	有			

表 2. A/Brisbane/59/07 (H1N1) ワクチン経鼻接種と皮下接種による A/Narita ウイルス感染防御効果の比較

ワクチン 接種	ワクチン	Ampligen*	鼻腔洗浄液中 ウイルス価	ELISA; ホルマリン不活化 A/Narita	
				血清中 IgG	NW中 IgA
経鼻	PBS	無			
経鼻	A/Brisbane (H1N1)	無		IgG, IgA; ○	IgG, IgA; ○
経鼻	A/Brisbane (H1N1)	有	有意に減少	IgG, IgA; ◎	IgG, IgA; ◎
皮下	PBS	無			
皮下	A/Brisbane (H1N1)	無		IgG, IgA; ○	
皮下	A/Brisbane (H1N1)	有		IgG, IgA; ◎	

表 3. 分泌型 IgA 抗体欠損マウスへの A/Brisbane/59/07 (H1N1) ワクチン経鼻接種による A/Narita ウイルス感染防御効果の比較

マウス	ワクチン	Ampligen*	鼻腔洗浄液中 ウイルス価	ELISA; ホルマリン不活化 A/Narita	
				血清中 IgG	NW中 IgA
BALB/c	PBS	無			
BALB/c	A/Brisbane (H1N1)	無		IgG, IgA; ○	IgG, IgA; ○
BALB/c	A/Brisbane (H1N1)	有	有意に減少	IgG, IgA; ◎	IgG, IgA; ◎
pIgR KO	PBS	無			
pIgR KO	A/Brisbane (H1N1)	無		IgG, IgA; ○	
pIgR KO	A/Brisbane (H1N1)	有		IgG, IgA; ◎	

#### D. 考察

本研究において、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、季節性インフルエンザワクチンの経鼻接種および皮下接種の予防効果の検討を行った。まず、2009/10 季節性インフルエンザワクチンに含まれる A/H1N1、A/H3N2 および B 型の単身スプリットワクチンを BALB/c マウスに経鼻接種し、どの亜型のワクチンが新型インフルエンザウイルスの感染抑制に効果を示すか検討した。感染に用いたマウス馴化新型インフルエンザウイルス A/Narita 株のウイルス価減少に寄与したワクチンは、A/Brisbane/59/07 (H1N1) と A/Uruguay/716 /07 (H3N2) の 2 株であった。産生される抗体を比較したところ、A/Brisbane/59/07 (H1N1) と A/Uruguay/716/07 (H3N2) の経鼻接種両群においては、ホルマリン不活化 A/Narita ウイルスに対する血清中 IgG 抗体と鼻腔洗浄液中 IgA 抗体の産生が認められた。また、組換え A/Narita HA に対する抗体は、A/Brisbane/59/07 (H1N1) ワクチンの経鼻接種群のみで検出できた。これらのことから、A/Brisbane/59/07 (H1N1) および A/Uruguay/716 /07 (H3N2) ワクチンは、ウイルスの内部タンパクに対する抗体を誘導し、感染に用いた A/Narita ウイルスの増殖抑制に寄与しうることが示唆され、主要防御抗原となる HA に対して反応しうる血清中 IgG および粘膜上 IgA 抗体は A/Brisbane/ 59/07 (H1N1) ワクチンの接種のみで誘導可能であることが示唆された (表 1)。次に、A/Brisbane/59/07 (H1N1) ワクチンに関して皮下接種と経鼻接種の比較を BALB/c マウスおよび pIgR KO マウスを用いて検討した。この結果、気道粘膜上に A/Narita ウイルスに反応する分泌型 IgA 抗体の誘導はワクチンの経鼻接種により可能であった (表 2)。加えて、粘膜上への IgA 抗体の産生能を欠損した pIgR KO マウスでは、経鼻接種による感染ウイルスの増殖抑制効果を得ることはできなかった (表 3)。以上の

ことから、感染の場となる気道粘膜上でのウイルスの増殖抑制には分泌型 IgA 抗体が重要であり、かつ分泌型 IgA 抗体は皮下接種ではなく経鼻接種よってのみ誘導可能であることが示された。

#### E. 結論

2009年に流行した新型インフルエンザウイルス A/H1N1 pdm の感染において、これまでの季節性インフルエンザワクチン (A/H1N1) の経鼻接種によって誘導される分泌型 IgA 抗体が、A/H1N1 pdm の主要防御抗原となる HA に対して反応性を有し感染ウイルスの増殖抑制に寄与する可能性が示された。経鼻噴霧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非常に有用なワクチンになりうると考えられる。

#### F. 研究発表

とくになし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Ichinohe T, Ainai 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.
2. Kuroda M, Katano H, Nakajima N, Tobiume M, Ainai 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.

3. Yamazaki T, Nagashima M, Ninomiya D, Arai Y, Teshima Y, Fujimoto A, Ainai A, Hasegawa H, Chiba J. Passive Immunity 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.

4. 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]

## 2. 学会発表

1. 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

2. 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

3. 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

4. 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

5. 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

6. 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

7. 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

8. 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
9. 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
  10. 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的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
  11. 伊藤良、相内章、浅沼秀樹、鈴木忠樹、千葉文、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
  12. 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
  13. 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
  14. 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
  15. 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
  16. 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
  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 第 14 回日本ワクチン学会学術集会 2010 年 12 月東京
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
1. 特許出願 (出願)
    - なし
  2. 実用新案登録
    - なし

## 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

研究分担者： 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）

### 【研究要旨】

感染症におけるヘルパー T 細胞 (Th) の機能は重要であり、Th 反応を制御することで著しい病態の変化を促すことが出来る。このことから Th 反応制御による病態の解析は予後判定やワクチン開発等において重要となる。本研究では Th を制御するインターロイキン 4 (IL-4) に着目し、IL-4 と IL-4 レセプター結合部位に変異を挿入したアンタゴニスト (IL-4DM) の DNA ワクチンを用い、Th を Th 1 および Th2 に誘導したときのインフルエンザウイルス感染における病態の差異をマウスにおいて検討した。IL-4 または IL-4DM DNA ワクチン投与マウスにインフルエンザウイルス PR8 (H1N1) を投与したところ IL-4 投与において生存率は低下し、IL-4DM 投与で増加した。これらマウスにおいては液性免疫以上に細胞性免疫が病態が生存率に差異をもたらしていることが示された。また、ウイルス感染マウスの肺胞洗浄液 (BAL) においては IL-4 DNA ワクチン投与で RANTES の産生が認められ、アレルギー性炎症の誘導が示された。この反応はヒト呼吸器上皮細胞を用いての *in vitro* の試験においても確認された。以上のことから本研究では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。

### A. 研究目的

感染症における病態にはヘルパー T 細胞 (Th) の働きが病態に大きく寄与する。Th 細胞は通常 Th0 の状態から細胞性免疫誘導型の Th1 や液性免疫誘導の Th2、また近年では調整性 T リンパ球 (Treg) や Th17 という新たな細胞集団にも分化していくと考えられている。一方、近年アレルギー・アトピー性疾患の増加が著しく、Th がこれらに重要にかかわっていることも知られている。アレルギー性疾患では恒常的に Th2 優位の免疫反応が誘導されていることが知られているが、これに加え Th17、Treg や Th17/22 というような細胞集団にも変化があることが判明

してきた。これら細胞集団はアレルギー性疾患のみならず、感染症においても重要な働きをすることから、アレルギー性疾患と感染症の両者の関係が病態を左右していることも推察されている。本研究ではマウスを用い、遺伝子改変等の極端な免疫反応の操作ではなく、インターロイキン 4 (IL-4) およびそのアンタゴニスト (IL-4DM) の DNA ワクチンを用い、臨床上ヒトに近い状態での Th 操作によるインフルエンザウイルス感染の病態の変化を検討することを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. IL-4 および IL-4 DNA ワクチンによる Th 反応の操作

IL-4 または IL-4DM DNA ワクチンを 100  $\mu$ g、1 週間隔で 3 回投与し、Th 操作マウスとした。

### 2. Th 反応の操作による生存率の変化

IL-4、IL-4DM またはコントロール DNA ワクチン投与マウスに、インフルエンザウイルス Flu A/PR/8 (H1N1) を 0.5LD50、1LD50、1.5LD50 にて気管内接種し、マウスの生存率を検討した。

### 3. インフルエンザウイルス特異抗体の測定

インフルエンザウイルス特異抗体は ELISA 法にてインフルエンザウイルス接種マウスの血漿および肺胞洗浄液中から測定した。また、DNA ワクチン接種による Th 反応操作マウスにインフルエンザワクチンを接種したマウス血漿においても同様に測定した。

### 4. 細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 活性の測定

インフルエンザウイルスの接種マウスの縦隔リンパ節細胞を用いて NP エピトープ特異的 CTL 活性を <sup>51</sup>Cr 遊離法にて測定した。

### 5. ヒト呼吸器細胞を用いたアレルギー反応の検討

ヒト呼吸器上皮細胞に IL-4 存在下、非存在下でインフルエンザウイルスを感染させ、RANTES および Eotaxin-3 の発現を PCR にて測定した。

### 6. 倫理面への配慮

本研究は、マウスのみを使用する基礎研究でありヒトサンプル、情報等は一切用いていない。

## C. 研究結果

### 1. Th 反応制御における生存率の変化

DNA ワクチンによる Th 反応の操作を行ったマウスにおいて種々の濃度の FluA/PR/8 (H1N1) を気管内攻撃接種したところ、IL-4 投与 (Th2 誘導) において生存率は低下し、逆に

IL-4DM 投与 (Th1 誘導) においては生存率が改善された (Fig. 1)。

### 2. 特異抗体の測定

ウイルス特異的抗体を継時的に測定したところ、血漿中の IgM が IL-4 投与 (Th2 誘導) において優位に増加したが、血漿中 IgG および肺胞洗浄液中 IgA は全ての群において優位な差はなかった (Fig. 2)。

### 3. ウイルス特異抗体のサブクラス

血漿中の IgG のサブクラスを各群のマウスにおいて比較したところ Th2 型抗体の IgG1 は IL-4 投与群で、Th1 型抗体の IgG2a は IL-4DM 投与群で優位に増加していた (Fig. 3)。

### 4. 中和抗体

インフルエンザウイルス感染 Th 反応制御マウスの中和抗体価を調べたところ Th1 で高く、Th2 でコントロール群に比較し、低下することが示された (Fig. 4)。

### 5. エピトープ特異的 CTL

NP 抗原エピトープ特異的 CTL の誘導を肺縦隔リンパ節細胞において検討したところ、IL-4DM 投与にて優位に増加していた (Fig. 5)。

### 6. アレルギー反応の検討

インフルエンザウイルス感染マウスの肺胞洗浄液 (BAL) における RANTES の mRNA 発現を見たところ、インフルエンザウイルス感染で誘導されており、その誘導は IL-4WT DNA ワクチン投与で増強、IL-4 DM 投与で抑制された (Fig. 6)。この反応をヒト肺胞上皮細胞を用いて検討したところ、RANTES はインフルエンザウイルス感染で誘導され、IL-4 存在下でさらに増強された。また、Eotaxin-3 は IL-4 存在下でインフルエンザウイルスが感染したときのみ、強い誘導が認められた (Fig. 7)

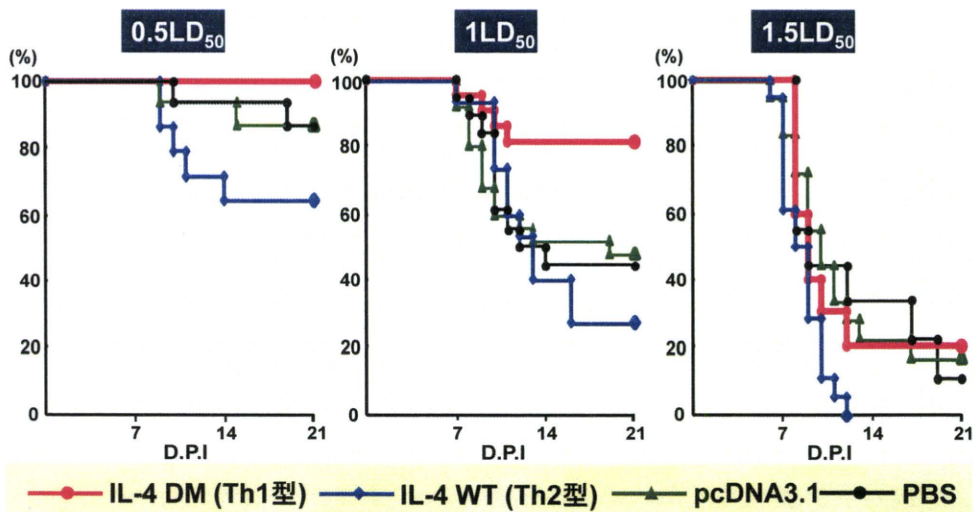


Fig. 1 IL-4 WTおよびIL-4 DM接種マウスにおけるインフルエンザウイルス (Flu A/PR/8) 感染後の生存率

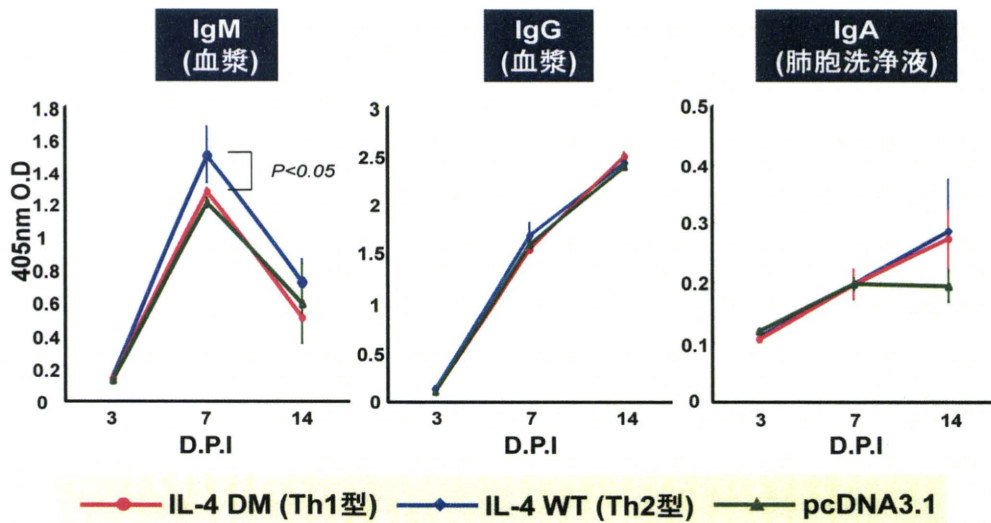


Fig. 2 PR8特異的抗体産生能の経時的解析

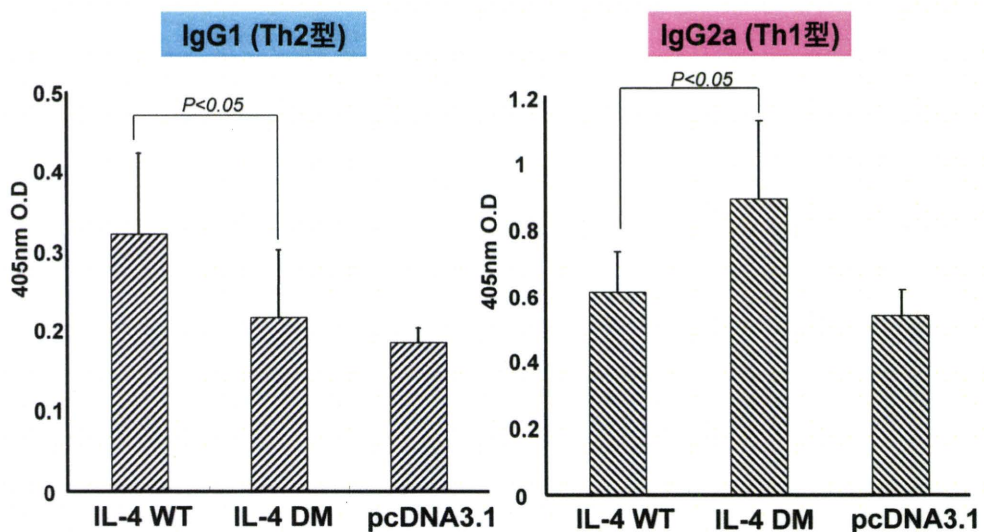


Fig. 3 血中におけるPR8特異的IgGのSubclass (D.P.I 14)

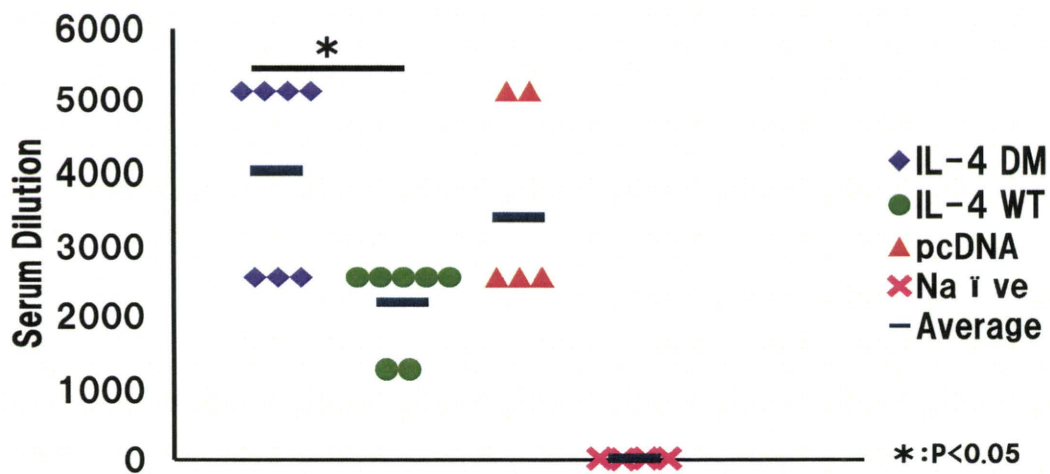


Fig. 4 血清中におけるPR8特異的中和抗体価(D.P.I 14)

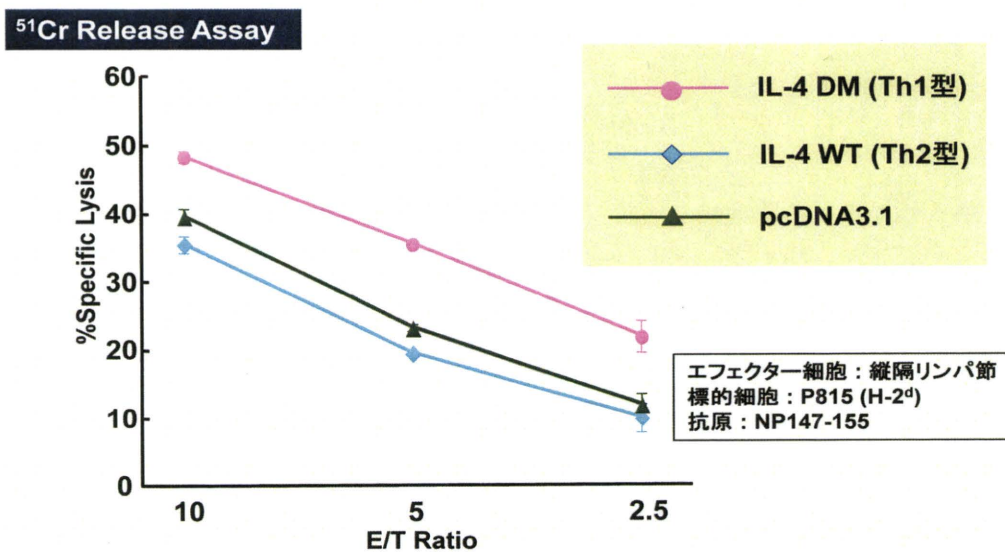


Fig. 5 PR8に対するCTL活性 (D.P.I 14)

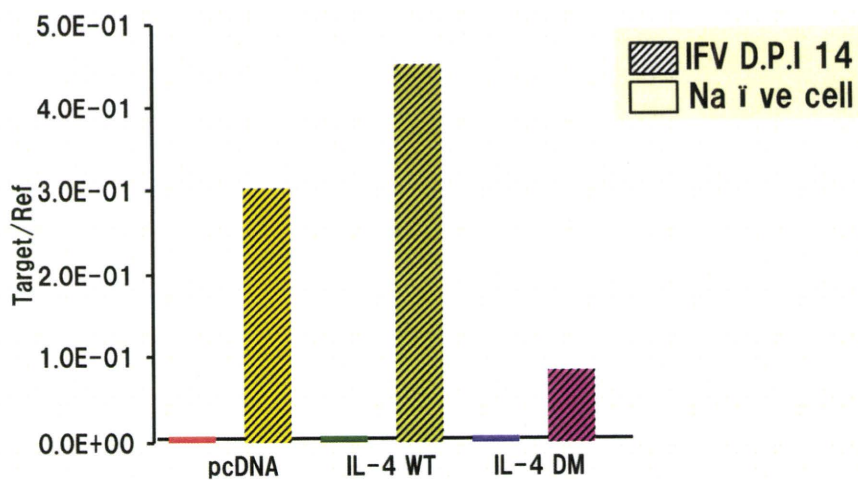


Fig. 6 肺胞洗浄液(BAL)におけるRANTESのmRNA発現



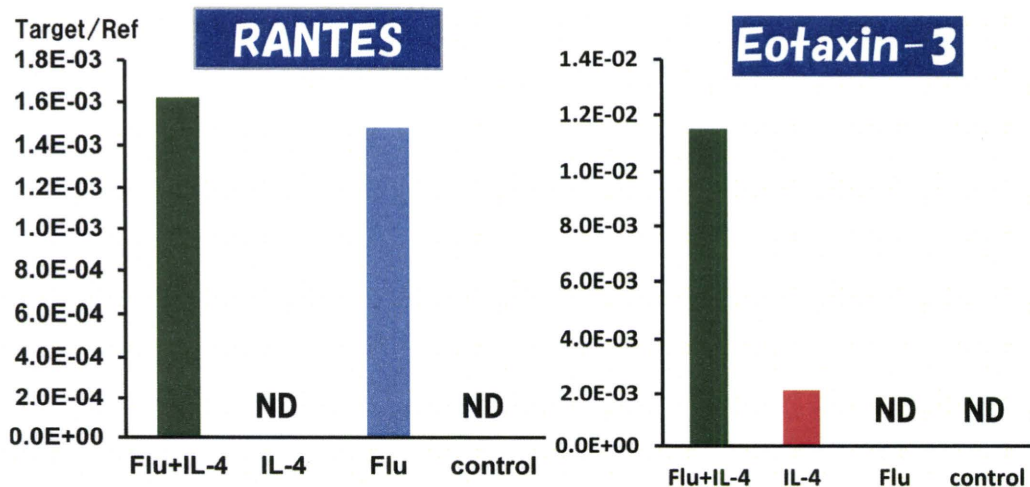


Fig. 7 ヒト肺胞上皮細胞におけるケモカインの発現

#### D. 考察

近年、先進国を中心にアレルギー・アトピー性疾患が急増しており、それによる感染症の病態に対する影響が示唆されるようになってきた。感染症におけるアレルギー性疾患の誘導ではRSウイルス感染がよく知られている。RSウイルスは細胞内レセプターを介し、自然免疫系を活性化し、その際にアレルギー性疾患を誘導する。このためにRSウイルス感染ではワクチン投与でアレルギー喘息を誘発し、病態を悪化させたことがよく知られている。本研究におけるインフルエンザウイルスではRIG-Iを介して自然免疫系を活性化させるということが知られており、その時に基礎疾患としてアレルギー・アトピー性疾患が存在すると呼吸器においてアレルギー性炎症が誘導される可能性が示唆された。本研究結果においても *in vivo*、*in vitro* の実験系においてそれを示す結果が得られた。インフルエンザウイルスではNS遺伝子により、RIG-Iを介した反応が抑制されると考えられているが、本研究ではRSウイルスと比較すると軽度ではあるが、明らかなアレルギー性炎症の誘導が認められた。これらのことから、インフルエンザワクチンにおいてはアジュバント等の利用によりTh2反応を抑制するワクチンが必要であると考えられた。

#### E. 結論

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。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 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
2. 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.
3. 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.
  4. 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.
  5. 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-origene rhesus macaques. *Immunogenetics* 2010;62:601-611.
  6. 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
  7. Yasuhiro Yasutomi. Establishment of Specific Pathogen-Free Macaque Colonies in Tsukuba Primate Research Center of Japan for AIDS research. *Vaccine* 2010; B75-B77.
  8. 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.
  9. 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.
2. 学会発表
- 「国内」
1. 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
  2. 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
  3. 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
  4. 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

「国際」

1. 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.
  2. 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.
  3. 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.
  4. 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.
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

特許出願

1. 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)
2. 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株を用いた種ワクチン作成の検討および 不活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

研究分担者： 岡本 成史（独立行政法人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）

### 【研究要旨】

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ためには、ウイルスライブラリーを用いた次世代インフルエンザワクチン用の種ウイルスを作成、保存すると共に、確実なワクチン効果を有するために交叉防御効果を誘導するワクチン接種方法を確立する必要がある。今回我々は、両者についてそれぞれ検討を行った。インフルエンザワクチン用の種ウイルスを作成するためにはライブラリーに存在するウイルス株が培養細胞上で効率よく増殖する株に馴化できることが必要である。そこで我々は、H1-15型の合計16株のウイルス株をライブラリーから取り出し、MDCK細胞に継代を行った。そしてそのうちH13型株を除く15株についてワクチン作製に十分な増殖能をもつ株に馴化することを明らかにした。また、不活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および気道粘膜、およ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唆された。

### A. 研究目的

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。そのために、本研究班ではウイルスライブラリーを用いた次世代インフルエンザワクチン用の種ウイルスを培養細胞を用いて作成、保存し、その中から新たに発生するインフルエンザウイルスに抗原的、遺伝子学的に近い保存株をワクチン株として作成する手法の確立および、交叉防御効果を示すワクチン接種方法の確立を目指している。

本年度は、ウイルスライブラリーを用いて作製されるワクチン用種ウイルスがワクチン製造に必要なとする培養細胞上での高い増殖能を有するかについて検討すると共に、インフルエンザ不活化全粒子ワクチンの単独経鼻接種による交叉防御効果誘導に関する詳細な解析を行った。

### B. 研究方法

#### 1. ウイルスおよび全粒子ワクチン

A/PR/8/34 (H1N1) 株 および A/Solomon Islands/3/2006 (H1N1) 株由来のHAワクチンおよび全粒子ワクチンは、財団法人阪大微生物病研究会観音寺研究所より御供与頂いたものを

使用した。また、A/PR/8/34 (H1N1) は国立感染症研究所の長谷川秀樹博士より、A/Solomon Islands/3/2006, A/Brisbane/59/2007, A/New Caledonia/20/99, A/Hiroshima/52/2005, B/Malaysia/2506/2004 株は、国立感染症研究所の小田切孝人博士よりそれぞれ御供与頂いた。

## 2. インフルエンザウイルスの培養細胞への馴化

北大・喜田 宏博士より御供与頂いたインフルエンザライブラリーの株 16 株を MDCK 細胞中に 18 回継代を行った。各継代で採取したウイルス含有培養上清 1 ml 中に存在するウイルス価を MDCK 細胞によるプラーク法により測定した。

## 3. マウスへの免疫

BALB/c マウス (6 週齢、雌) にインフルエンザ不活化全粒子ワクチン (WV ワクチン) ないしインフルエンザ HA ワクチン (SV ワクチン) 1  $\mu$ g/20  $\mu$ l を 3 週間間隔で 2 回経鼻接種した。また、SV ワクチンに併用接種するアジュバントとしてポリ- $\gamma$ -グルタミン酸ナノ粒子 (NP; 100  $\mu$ g) を用いた。

## 4. マウス肺洗浄液および鼻洗浄液中の抗体価測定

最終免疫から 2 週間後に 1ml の PBS を用いてマウス肺洗浄液および鼻洗浄液を採取した。各洗浄液中の抗ウイルス IgA 並びに IgG 抗体価は、ELISA 法により測定した。中和抗体価については、各洗浄液を RDE 処理を行い、その後、濃縮遠心ろ過フィルターを用いて洗浄液容量に対して 20 倍に濃縮したものをを用いて行った。中和抗体価測定は MDCK 細胞による TCID<sub>50</sub> 測定法を基に行った。

## 5. ワクチン免疫マウスにおけるウイルス攻撃試験

ワクチンの最終経鼻接種から 2 週間後に各種インフルエンザウイルスを経鼻感染した。感染 48 時間後にマウス肺洗浄液を採取し、洗浄液中のウイルス価をプラーク法により測定した。

## C. 研究結果

### 1) インフルエンザウイルスの MDCK 細胞への馴化

インフルエンザライブラリーの株 16 株の MDCK 細胞への初代継代ではほとんどの株で 106 pfu/ml 以下しかウイルスの増殖がみられなかったが、継代を繰り返すことで増殖能が上がり、18 代継代後では H13 株以外のすべての株について 108 pfu/ml 以上の高い増殖能を有するウイルスに変化した (図 1)。

### 2) インフルエンザ WV ワクチンによる交叉防御効果

WV ワクチンの経鼻接種によって交叉防御効果を有する。そこで同ワクチンの SV ワクチン接種のアジュバントとの併用接種と比べての交叉防御効果の相違について検討した。まず、交叉防御効果を有する範囲について検討を行ったところ、双方のワクチン (A/PR/8/34 株 [H1N1 型]) とともにワクチン株と異なる型 (B/Malaysia/2506/2004 株) および亜型 (H3N2 型 A/Hiroshima/52/2005 株) に対する交叉防御効果を示すことができなかった (データ示さず)。一方、A/Solomon Islands/3/2006 株 (H1N1 株) 由来ワクチン接種による解析で、A/PR/8/34 株を除く同じ亜型の変異株に対して高い交叉防御効果を示した (図 2)。双方のワクチン接種との間に防御効果の程度の差があまり認められなかった。また、WV ワクチンの皮下接種の場合ではワクチン由来株 (A/Solomon Islands/3/2006) と A/Brisbane/59/2007 株にのみわずかながら有意な防御効果が見られたが、その程度は経鼻接種の場合よりはるかに弱いものであった (図 2)。

### 3) WV ワクチン経鼻接種マウスの鼻、肺中の抗ウイルス交叉反応性 IgA 抗体価および中和抗体価

WV ワクチン経鼻接種後の鼻洗浄液および肺洗浄液中の抗ウイルス IgA および IgG 抗体価を測定したところ、両洗浄液中に交叉反応性の IgA 抗体が検出を認めた (図 4)。一方、交叉反

応性の IgG 抗体は肺洗浄液中に認められたが、鼻洗浄液中には認められなかった (図3)。さらに、交叉反応性の中和抗体価を検討したところ、両洗浄液中での検出を認めた (図4)。その検出

の範囲と交叉防御効果が見られる範囲が一致した他、中和抗体価の大小が交叉防御効果のそれと相関することを見出した。

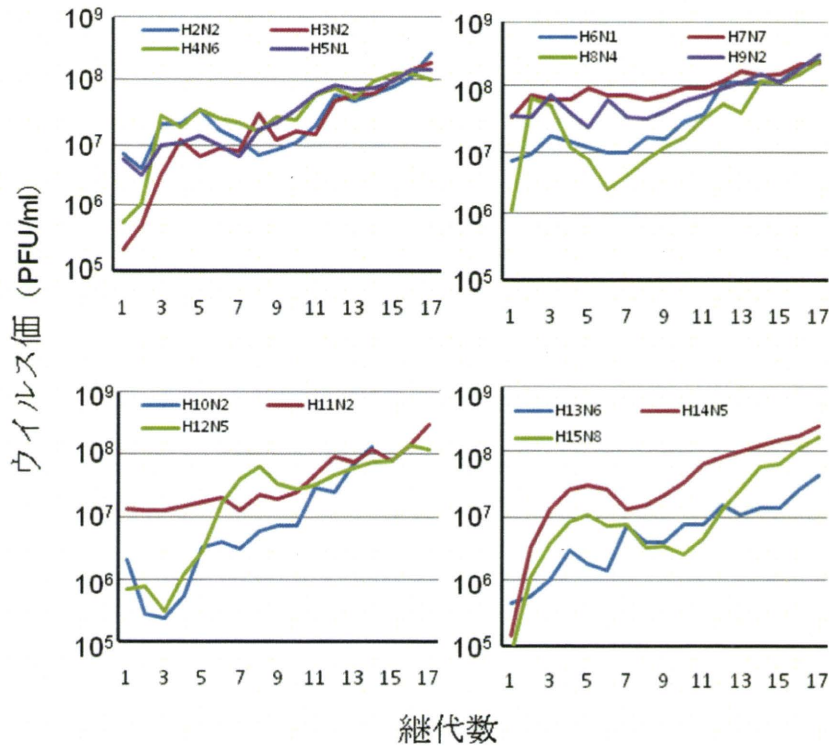


図1 インフルエンザウイルスライブラリーから選択した株の継代によるウイルス増殖能の変化。各ウイルス株を MDCK 細胞で培養、継代し、各代での培養上清中のウイルス価をプラーク法により測定した。なお、H1N1 株 2 株も 10 代以上の継代により  $10^8$  pfu/ml 以上のウイルス価を得た (データ示さず)。

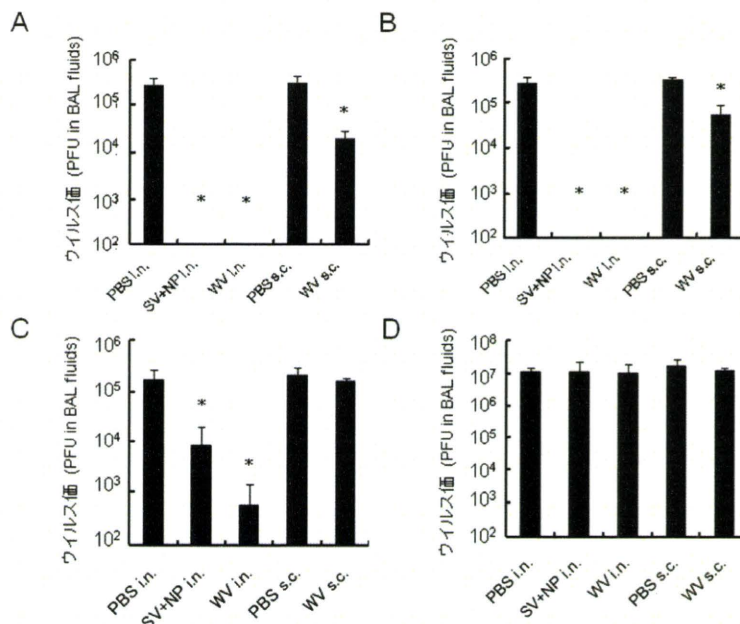


図2 WV ワクチンないしSV ワクチンとポリグルタミン酸ナノ粒子の経鼻接種による交叉防御効果。A/Solomon Islands/3/2006 株 (H1N1) 由来のワクチンを 2 回経鼻接種し、その後 A/Solomon Islands/3/2006 (A), A/Brisbane/59/2007 (B), A/New Caledonia/20/99 (C), A/PR/8/34 (D) を経鼻感染し、感染 2 日後の肺洗浄液中のウイルス価を測定した。\*;  $p < 0.05$ 。

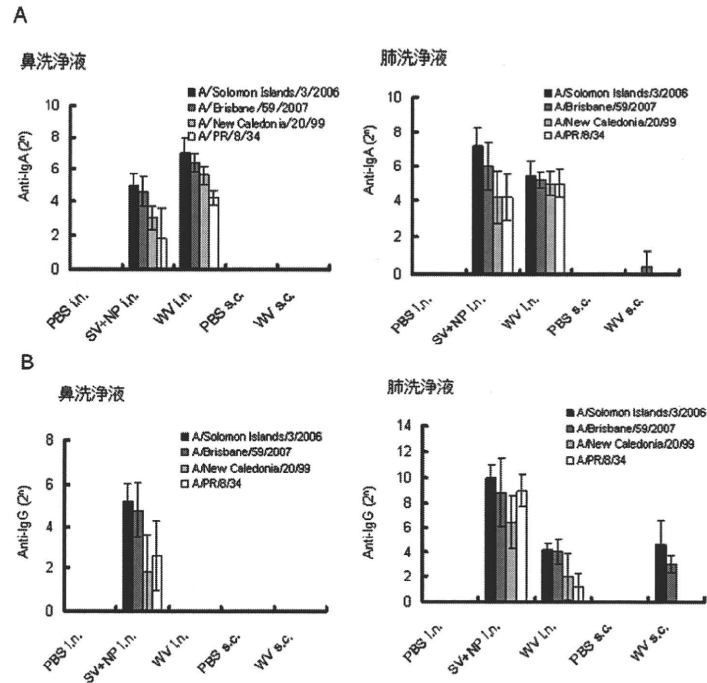


図3 WV ワクチンないしSV ワクチンとポリグルタミン酸ナノ粒子の経鼻接種による交叉反応性 IgA ならびに IgG 抗体の産生。A/Solomon Islands/3/2006 株 (H1N1) 由来のワクチンを 2 回経鼻接種した後、鼻洗浄液ならびに肺洗浄液中の抗ウイルス IgA 抗体 (A) および、IgG 抗体 (B) を ELISA 法により測定した。

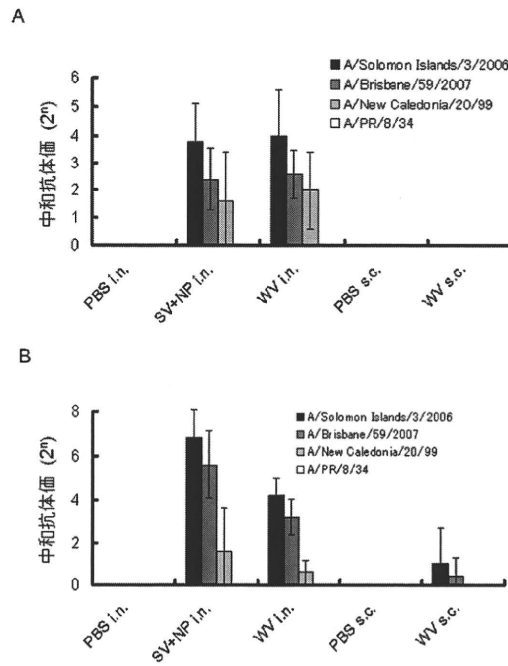


図4 WV ワクチンないしSV ワクチンとポリグルタミン酸ナノ粒子の経鼻接種による交叉反応性 IgA ならびに IgG 抗体の産生。A/Solomon Islands/3/2006 株 (H1N1) 由来のワクチンを 2 回経鼻接種した後、鼻洗浄液 (A) ならびに肺洗浄液 (B) 中の抗ウイルス中和抗体価を測定した。