

の経鼻ワクチンの効果とアジュバントや付着性等の剤形との関連を免疫系がヒトに近い霊長類を用いて検討しその感染防御効果の持続や交叉防御効果、clade の異なるワクチン株によるブースター効果について調べる事を目的とする。

B. 研究方法 (長谷川 秀樹)

ワクチン株

ワクチンとして不活化全粒子ワクチンにワクチン基材としてカルボキシビニルポリマー基剤 (CVP) を加えたもの及びアジュバントとして二本鎖 RNA 製剤 Ampligen, ワクチン基材としてカルボキシビニルポリマー基剤 (CVP) を含有比率を変えたものを使用した。ワクチンは不活化全粒子 A 型インフルエンザワクチン (H5N1 株) (PR8-1BCDC-RG2 株, N1BRG-14 : A/Indo/5/2005 (H5N1) 及び A/Vietnam/1194/04 の弱毒株) を抗原とし、50 μ g HA/mL を含むも、アジュバントとして Ampligen を HA 抗原の 20 倍量 (1mg/mL) 添加するとともに、増粘剤として CVP 基剤 [添加後の濃度 : 0.55% CVP、1.2% L-アルギニン、1% グリセリン] を添加した。中用量・低用量群用のワクチンについては、抗原及び Ampligen の濃度を高用量群の 3 分の 1 または 9 分の 1 とした。CVP 基剤の最終濃度は各用量群用で同一とした。

動物

3~4 歳、体重 2, 130~4, 180g のカニクイザル *cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis)* を用いた。カニクイザルはいずれもつくば霊長類センターで繁殖され国立感染症研究の実験動物委員会の研究所における動物使用に関するガイドラインに従って飼育された動物を用いた。これらのサルを非免疫群とそれぞれの用

量別免疫群に分けて 1 群 3 頭を用いて実験を行った。H5N1 ウイルスの感染実験は BSL3 実験室で行った。

ウイルス

使用したインフルエンザウイルス A/H5N1 株は A/Indonesia/6/2005 (A/Indonesia/6/05) 及び A/Vietnam/1194/04 を使用した。それぞれ致死性 H5N1 インフルエンザ感染者から分離され 10 日齢の孵化鶏卵で増殖したものを使用した。これらのウイルスは -80 ° C で保存され MDCK 細胞を用いたプラークアッセイでウイルス価を調べた。

ウイルス価及び抗体価の測定

ウイルス価及び抗体価測定の為カニクイザルから血清を採取した。IgA 抗体及び IgG 抗体の抗体価は enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法を用いて測定した。ウイルス価は MDCK 細胞を用いたプラークアッセイ法で測定した。

粘膜アジュバント

経鼻投与の粘膜アジュバントとして合成二本鎖 PolyI:PolyC₁₂U (Ampligen®) は Hemispherx Biopharma (Philadelphia, PA) より分与された。

ワクチン接種

カニクイザルはケタミン (0.1 ml/kg) により麻酔し 45 μ g HA の不活化全粒子 A 型インフルエンザワクチン (H5N1 株) (PR8-1BCDC-RG2 株 : A/Indo/5/2005 (H5N1) の弱毒株) を 10 倍量及び 20 倍量のアジュバント及び CVP 基材と共に経鼻噴霧した。

採血と血算

ワクチンの経鼻接種後2週間目の非感染時から攻撃感染後経時的に採血し抗体価を測定した。

C. 研究結果 (長谷川 秀樹)

経鼻ワクチン接種1年後のインフルエンザ A/Indonesia/5/05 H5N1 ウイルスの感染防御

高病原性鳥インフルエンザ H5N1 インドネシア株ワクチン IBCDC-RG2 及びアジュバントとして合成二本鎖 RNA Ampligen 及びワクチン基材としてカルボキシビニルポリマー (CVP) を用いた経鼻ワクチンを3週間間隔で2回接種した群と非免疫の群のカニクイザルに対し免疫から1年後にワクチン株と相同株である A/Indonesia/5/05 株を 1.5×10^6 pfu (3 ml) を経鼻及び経気管で攻撃感染を行った。咽頭ぬぐい液、鼻腔ぬぐい液、唾液、血清を感染後 0, 2, 5, 9, 12, 14 日後に採取した。非免疫群のカニクイザルではすべてのサルにおいて感染後 2, 5 日目の鼻腔ぬぐい液または咽頭ぬぐい液においてウイルスの分離がみられたが、ワクチン群のカニクイザルにおいては3頭中1頭で咽頭ぬぐい液でウイルスがみられたのみであり2頭ではウイルスはまったく分離されなかった。また攻撃感染後の血清中の H5N1 特異的 IgG 抗体価、IgA 抗体価を ELISA 法にて測定したところ免疫群のカニクイザルにおいては感染時抗体価が 40 倍を超えており感染によりさらに5日目に抗体価の上昇が認められた。非免疫群においては感染時の抗体価は0であるが、感染9日目に抗体の上昇が認められた。経鼻ワクチン接種1年後においても特異的抗体価の持続が見られさらに攻撃感染により素早く抗体の誘導がみられた。

高病原性鳥インフルエンザ H5N1 経鼻ワクチンによるブースター効果と交叉防御

経鼻インフルエンザワクチンによる免疫後、1年後に相同ワクチン株、または非相同のワクチン株によるブースター効果を調べた。インフルエンザウイルス A/H5N1 インドネシア株ワクチンである IBCDC-RG2 を経鼻接種後、1年後同株ワクチンによる追加接種、及びベトナム株由来 NIBRG-14 による追加免疫後 H5N1 ベトナム株による攻撃感染を行いその後のそれぞれのワクチン株に対する抗体応答を調べた。結果、初回免疫等同じ株であるインドネシア株で追加免疫をおこなった場合、ベトナム株の感染によりワクチン株であるインドネシア株に対する抗体が優位に上昇した。一方初回免疫と非相同ウイルス株であるベトナム株により追加免疫を行った群においてはベトナム株ウイルス感染により両方のワクチン株に対する抗体応答が同等に行われた。更に攻撃感染後の咽頭ぬぐい液及び鼻腔ぬぐい液中のウイルス価は双方ともにほとんど認められなかった。ここに非相同ワクチン株によるブースター効果と非相同ワクチン株の経鼻接種による交叉防御効果がヒトに近い霊長類で示すことができた。

D. 考察 (長谷川 秀樹)

インフルエンザワクチンにおいて重要なのは感染を防御する上で最も効果的な感染部位である上気道の粘膜上に粘膜免疫を誘導する事とその免疫の持続である。本研究においてヒトに近い免疫系を持つカニクイザルにおいて経鼻ワクチンの感染防御効果が約1年以上持続する事が示された。また、経鼻ワクチンを接種しておくことにより1年後の感染に対しても非免疫群に比較し速やかに粘膜での免疫応答が増強される事がわかった。さらに初回ワクチン接種後の追加免疫においては相同ワク

チン株によるブースター効果だけでなく、非相同の H5N1 インフルエンザワクチン株による追加免疫で初回免疫に用いたワクチン株に対する特異的抗体が誘導される事が示された。本研究の結果は経鼻インフルエンザワクチンによる基礎免疫の重要性を示すとともに clade の異なるワクチン株による広い交叉防御効果のある免疫誘導が可能であることが示された。

E. 結論 (長谷川 秀樹)

経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンにより、感染防御能力が1年以上持続する事、clade の異なるワクチン株による交叉防御効果があること、さらに clade の異なるワクチン株による追加免疫により広い交叉防御効果があることがヒトに近い免疫系を持つカニクイザルで示された。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.

4. Yamazaki T, Nagashima M, Ninomiya D, Arai Y, Teshima Y, Fujimoto A, Ainai 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.

5. 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
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- γ 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
 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

1. 特許取得（出願）

なし

2. 実用新案登録

なし

A-E. 研究成果（目的、方法、結果、考察、結論）

（迫田 義博）

(1) H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスの抗原変異株が、鶏にワクチンを接種している国で出現している。我々は、グローバルサーベイランスを実施し、これらの抗原変異株を分離・同定した。

(2) これらの抗原変異株に対して、現在国内に備蓄されている H5 亜型鳥インフルエンザワクチンの発症防御効果が十分でないことを明らかにした。

(3) ワクチン効果が低い理由として、抗原変異株と従来のワクチン株 (Vac-3 株) との間に大きな抗原性のずれがあることがわかった。

(4) 従来の Vac-3 ワクチン株に、抗原変異株をワクチン株として追加する。これをもとに、2 価ワクチンを試製し、近年分離される野外分離株に対する発症防御効果を評価していく予定である。

G. 研究発表

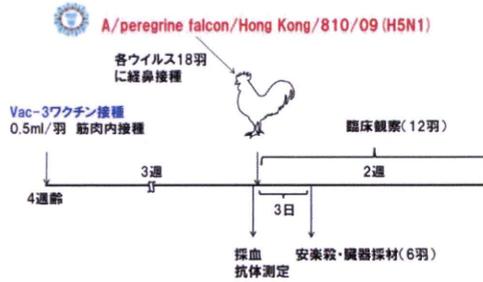
1. 論文発表

1. Okamatsu M, Tanaka T, Yamamoto N, Sakoda Y, Sasaki T, Tsuda Y, Isoda N, Kokumai N, Takada A, Umemura T, Kida H. 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*, 査読有, 41. 351-357. 2010

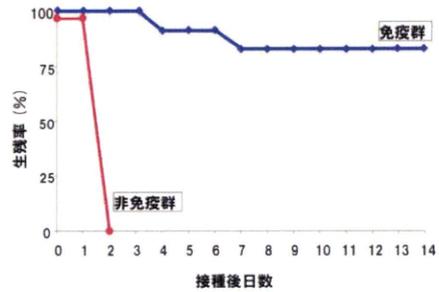
2. Sakoda Y, Sugar S, Batchluun D, Erdene-Ochir TO, Okamatsu M, Isoda N, Soda K, Takakuwa H, Tsuda Y, Yamamoto N, Kishida N, Matsuno K, Nakayama E, Kajihara M, Yokoyama A, Takada A, Sodnomdarjaa R, Kida H. Characterization of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus strains isolated from migratory waterfowl in Mongolia on the way back from the southern Asia to their northern territory. *Virology*, 査読有, 406. 88-94. 2010

ウイルス株間の防御抗原の交差反応性と防御効果について(北海道大学)

ニワトリ攻撃試験スケジュール



A/peregrine falcon/Hong Kong/810/2009 (H5N1) を接種したニワトリの生存率

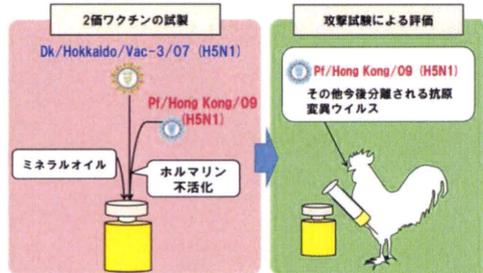


H5N1鳥インフルエンザウイルスの抗原性の比較

ウイルス	Clade	各血清のHI抗体価				
		Tn/SA	Vac-1	Vac-3	Ws/Hok	PI/HK
Duck/Hokkaido/Vac-1/04	-	160	1,280	1,280	40	80
Duck/Hokkaido/Vac-3/07	-	320	1,280	2,560	160	160
Chicken/Yamaguchi/7/04	2.5	320	1,280	2,560	320	640
Whooper swan/Mongolia/3/05	2.2	160	320	5120	320	320
Whooper swan/Hokkaido/1/08	2.3.2	40	40	40	1,280	160
Peregrine falcon/Hong Kong/810/09	2.3.4	<20	80	160	40	2,560

- はクレード0-9に分類されない古典的な系統を示す

今後の予定



I. 抗体検査

研究分担者：熊谷卓司、中山哲夫、神谷 齊、迫田義博

【研究要旨】一昨年後半から猖獗を極めたパンデミックインフルエンザに際して、インフルエンザ患者より、急性期から回復期にかけて血清検体を採取する機会を得た。さらに、パンデミックの後半に開発された、パンデミックワクチン接種を受けた医療機関従事者から接種前後に series 血清検体を採取する機会を得た。これらの検体について、インフルエンザウイルス特異的 Hemagglutination inhibition (HI)抗体, 中和(NT)抗体, IgG subclass 抗体を測定し、その獲得経緯を検討したので報告する。自然感染症例の96%以上においてその経過中2管以上のHI, NT抗体価上昇を認め一次免疫応答の態様であった。一方、ワクチン接種例では対象者の90%以上が接種前に中和抗体を有しており、無症候性に抗体を獲得したことが示唆された。さらにその後の抗体価上昇も2週目にピークを認め、二次免疫応答の特徴を有していた。IgG1は自然感染患者、ワクチン被接種者共に50%程度の抗体価上昇を示した。IgG2は両者とも殆ど誘導を認めなかった。IgG3は両者ともに30%程度で抗体上昇を示した。IgG4は自然感染、ワクチン被接種者で全く態度が異なり、前者で57%が抗体価の上昇を認めたのに対し、後者では抗体陽性率も低く、全く上昇を認めなかった。これらの結果は小児を中心とする若い世代では顕性感染で一次免疫応答を経過したのに対し、年齢の高い群では不顕性感染で一次免疫を獲得し、その後ワクチンに対して二次免疫応答を呈したことを示している。IgG subclass 抗体応答は各分画が非常に異なった応答を示しており、この免疫学的意義についてさらなる検討が必要である。

分担研究者	所属	氏名
北里生命科学研究所		中山哲夫
くまがい小児科		熊谷卓司
国立療養所三重病院		神谷 齊

から接種前後に series 血清検体を採取する機会を得た。これらの検体について、インフルエンザウイルス特異的 HI 抗体, NT 抗体, IgG subclass 抗体の獲得過程を検討したので報告する。

A. 研究目的

インフルエンザに対する液性免疫反応は従来、HI 抗体, 中和抗体誘導について検討され、またワクチンの効果判定

に用いられてきた surrogate marker も HI 抗体価がその基準となっている。しかしながら、最近動物実験の成績を中心に中和活性を有しない特異抗体の意義を示唆する成績が蓄積されつつあり、人においてもその検討が必要と思われた。しかしながら、人でインフルエンザ感染に対する IgG subclass 応答を系統的に検討した成績は殆ど見られない。

著者らは一昨年のパンデミックに際して、発熱を中心とする臨床症状を呈したインフルエンザ患者より、急性期から回復期にかけて血清検体を採取する機会を得た。さらに、パンデミックワクチン接種を受けた医療機関従事者

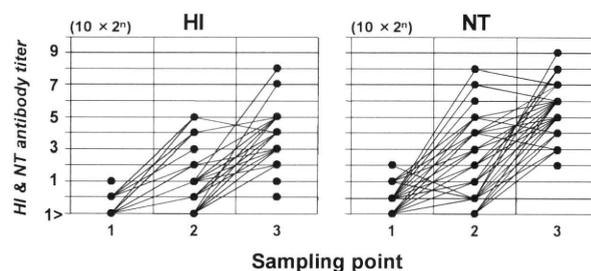


Figure 1. Hemagglutination inhibition and neutralization antibody titer specific to A/California/07/2009(H1N1). Black dot shows antibody titer. Abscissa in sampling point after onset of illness. Ordinate in serum dilution.

B. 研究方法

(1) 研究対象

対象は 2009 年夏以降、A/California/07/2009 (H1N1) による pandemic に際して、発熱を中心とする臨床症状を呈して外来を受診し、インフルエンザ迅速キットで鼻汁検体のインフルエンザウイルス陽性であつ

た患者 51 症例（男性 27 例，女性 24 例，平均年齢 7 歳 6 ヶ月 [7 ヶ月-25 歳 4 ヶ月]）である。これらの症例のインフォームドコンセントを得た上で，急性期，発熱第 10 病日 ± 4 日，第 28 病日 ± 5 日に末梢血を採取し，血清を -35°C に保存した。最終的なインフルエンザ罹患診断はウイルス分離ならびに PCR によるゲノムの検出によった。

さらに，流行当初から感染徴候無く，2009 年 10 月下旬以降 2009pdm ワクチン接種を受けた医療機関職員 74 例（男性 11 例，女性 63 例，平均年齢 38.5 歳 [19-72 歳]）から，インフォームドコンセントを得た後，接種前，接種後 2 週，接種後 4 週の 3 回末梢血採血を行い，血清を分離して保存した。

(2) ウイルス抗原

インフルエンザウイルス HI 抗原は A/California/07/2009 (H1N1) 株を発育鶏卵で増殖させ，蔗糖濃度勾配遠心法により精製しフォルマリンで不活化した whole virion である。また，ELISA 用のウイルス抗原は同様に発育鶏卵で増殖させ，蔗糖濃度勾配遠心法により精製した後，エーテルで分解 (splitting) 処理した A/California/07/2009(H1N1) 株 split product (ワクチン同等品) である。中和抗体価測定用ウイルスは HI 抗原用ウイルス精製過程の不活化前のウイルス液である。

(3) 赤血球凝集抑制(HI)抗体価及び中和抗体価測定抗体価測定は定法により，(財)阪大微研会観音寺研究所で行った。使用血球はヒト O 型赤血球である。

中和抗体価測定は Focus reduction 法によった。

(4) IgG subclass 抗体価測定

Table 1. Generation of HI, NT antibody after onset of illness.

Sampling point	Onset of illness	2 weeks	4 weeks	Antibody elevation					
				HI (total number)			NT (total number)		
				4' ≤	2-4'	no elevation	4' ≤	2-4'	no elevation
Types of antibody development	1:40 ≤ +	+	+	0	0	0	1	0	1
	1:40 > +	+	+	6	1	0	28	0	0
	1:10 >	+	+	18	0	0	15	0	0
	1:10 >	1:10 >	1:10 >	27	0	0	6	0	0

北里研究所生命科学研究所感染制御 I 部で測定した。96 穴 ELISA plate に 33µg HA/well の influenza virus 抗原を分注し 4°C overnight 静置。洗浄後，post-coating として Blocking One (Nacalai Tesque) を分注，4°C 45 分間静置後，洗浄。次いで被検血清を添加した。IgG1, 2, 4 の測定は血清希釈 1:200 から，IgG3 の測定は血清希釈 1:20 から 2 倍階段希釈し，60 分静置。洗浄後，HRP-conjugated goat anti-human IgG (H+L), IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 (Invitrogen) を分注し 4°C overnight 静置。o-Phenylenediamine で発色させ，microplate reader (O.D. 450/630) で吸光度を測定。検量線を作製し抗原非添加 well の吸光度の 2 倍を示す血清希釈倍数を 2 の指数として表示した。

(5) 統計学的方法

各検体採取時期間での血清抗体価の比較は統計ソフトウェア StatFlex による nonparametric repeated-measures analysis of variance (Friedman's test) を用い，続いて post test として Dunn' test を用いた。<1 は 0.5, 8<は 9, 9<は 10 としてデータを処理した。

(倫理面への配慮)

本研究は札幌医科大学医学部倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

(1) 自然感染症例の HI 抗体価，NT 抗体価の推移 Figure 1 に自然感染における HI 抗体価，中和抗体価獲得の推移を示す。HI 抗体価の検体採取 1 回目，2 回目，3 回目の幾何平均はそれぞれ， $10 \times 2^{-0.08}$ ， $10 \times 2^{0.31}$ ，

10×2^3 ⁵⁹であった。同様に NT 抗体価のそれは $10 \times 2^{-0.2}$, $10 \times 2^{2.16}$, $10 \times 2^{5.35}$ であった。

各検体採取時の抗体価に差があることはFigure 1 および幾何平均値からも推定されるが、Friedman検定を行うと $P < 0.0001$ となり、3回の採血検体間で抗体価に変動があることが統計学的に示された。そこでpost testとして、第1回目検体採取時の抗体価を対照群としてDunn検定を行った。その結果、第2回、第3回採

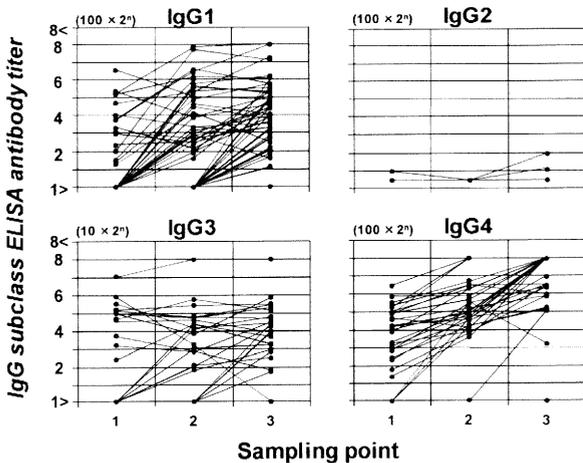


Figure 2. IgG subclass ELISA antibody titer specific to A/California/07/2009(H1N1). Black dot represents antibody titer. Abscissa in sampling point after onset of illness. Ordinate in serum dilution.

Table 2. Generation of IgG subclass antibody after onset of illness.

Sampling point	Onset of illness	2 weeks	4 weeks	Antibody elevation											
				IgG1			IgG2			IgG3			IgG4		
				4 <	2-4	no elevation	4 <	2-4	no elevation	4 >	2-4	no elevation	4 >	2-4	no elevation
					16			0			15			25	
	+	+	+	9	2	5	0	0	0	2	3	10	21	4	0
Types of antibody generation					17			0	0		7			3	
	-	-	-	17	0	0	0	0	0	7	0	0	3	0	0
					17			2			6			1	
	-	-	-	15	2	0	1	1	0	5	1	0	1	0	0
					1			49			23			22	
	-	-	-	0	0	1	0	0	49	0	0	23	0	0	22

取時の検体におけるHI,中和抗体価が接種前値に比して有意に高値であり、かつそのピークは3回目採取検体にあったことが明らかとなった ($P < 0.001$)。

抗体獲得経緯を詳細に検討すると(Table 1), HI では51 症例中6 例で1 回目採取時に抗体価が陽性であり、いずれもその値は40 倍未満であった。うち5 例で2 管以上の上昇, 1 例で1 管の上昇を示した。2 回目, 3 回目検体でHI 抗体が陽性化した例が各々18 例, 27 例有り, いずれも2 管以上の上昇を示した。NT 抗体を見ると, 1 回目検体で抗体価40 倍以上を示した症例は2 例有り, 1 例でその後2 管以上上昇, 1 例で抗体価は動かなかった。28 例で40 倍未満の抗体が1 回目採血検体で検出され, 全例その後2 管以上の抗体上昇を示した。第2回, 3回

目検体から抗体が陽性になった症例は各々15 例, 6 例有り, いずれもその後2 管以上の上昇を示した。

(2) 自然感染におけるIgG subclass 抗体価の推移

Figure 2 に自然感染におけるIgG subclass 抗体価の推移を示す。IgG1 抗体価の検体採取1 回目, 2 回目, 3 回目の幾何平均はそれぞれ, $100 \times 2^{1.45}$, $100 \times 2^{2.89}$, $100 \times 2^{4.16}$ であった。同様にIgG3 抗体価のそれは $10 \times 2^{1.74}$, $10 \times 2^{1.99}$, $10 \times 2^{2.33}$ であった。さらにIgG4 では $100 \times 2^{2.25}$, $100 \times 2^{3.19}$, $100 \times 2^{4.15}$ となった。IgG2 抗体価陽性例は2 例のみで, 平均値は全て $100 \times 2^{0.5}$ であった。IgG1, IgG3, IgG4 はいずれも検体採取時によって抗体価の変動を認め(各々 $P < 0.0001$, 0.0067 , $P < 0.0001$) , その全てで第3 回目採取検体にピーク値があることが明らかとなった ($P < 0.001$)。IgG2 については $P = 0.3679$ と変動を認めず, 殆ど抗体誘導が見られなかったことを裏付けた。

Table 2 に抗体獲得の詳細な経過を示す。IgG1 は16 症例で, 第1 回目採取検体から抗体価が陽性であったが, そのうち11 例でその後の抗体価の上昇を認めた。第2 回目, 第3 回目から抗体価陽性となった例は各々17 例

あったが, その全てで2 管以上の抗体価上昇を認めた。

IgG3 は15 症例で第1 回目検体から抗体価が陽性であったが, さらなる抗体上昇を認めたのはそのうち5 例のみであった。第2 回目, 第3 回目から抗体価陽性となった例は各々7 例, 6 例認めたが, その殆どで2 管以上の抗体価上昇を認めた。抗体価の上昇を認めなかったのは23 例であった。

IgG4 では25 例において第1 回目検体から抗体価が陽性であったが, その大部分は2 管以上の上昇を示した。第2 回目, 第3 回目から抗体価陽性となった例は各々3 例, 1 例と少なく, いずれも2 管以上の上昇を認めた。22 例でIgG4 抗体は検出されなかった。

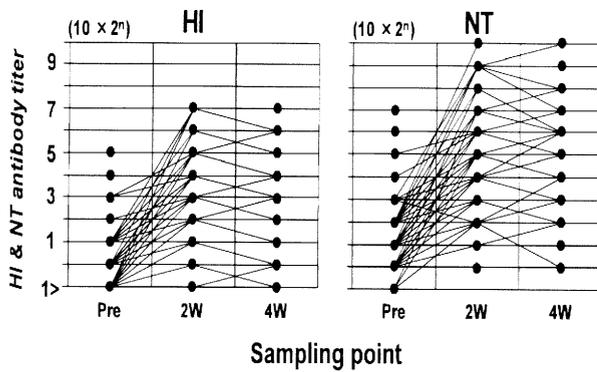


Figure 3. Hemagglutination inhibition and neutralization antibody titer specific to A/California/07/2009(H1N1). Black dot shows antibody titer. Abscissa in sampling point before and after vaccination. Ordinate in serum dilution

(3) ワクチン接種例のHI抗体価, NT抗体価の推移

Figure 3にワクチン接種時のHI抗体, NT抗体獲得の推移を示す。HI抗体価の接種前, 2週目, 4週目の幾何平均はそれぞれ, $10 \times 2^{0.18}$, $10 \times 2^{2.81}$, $10 \times 2^{2.65}$ であった。同様にNT抗体価のそれは $10 \times 2^{1.93}$, $10 \times 2^{5.04}$, $10 \times 2^{4.93}$ であった。

接種後2, 4週の抗体価が接種前値に比して上昇していることは明らかであるが, 統計学的検定でもそれが証明された ($P < 0.0001$)。post testでは接種後2, 4週の検体におけるHI, 中和抗体価が接種前値に比して有意に高値であり, かつそのピークは接種後2週目であったことが明らかとなった ($P < 0.001$)。

抗体価推移を詳細に検討すると (Table 3), 接種前検体ですでに陽性を示した被接種者が, HIで40例 (54.1%), 中和抗体で70例 (94.6%)あった。その中で2週目ないし4週目の検体が接種前値に対して2管以上の上昇を示した例が各々27例, 51例, 1管上昇が各々7例, 13例認められた。次に接種前値が陰性で, 第2週目に

陽性となった例が, HIで30例 (40.5%), 中和抗体で4例 (5.4%)あり, 抗体価の上昇が2管を超えた例は各々23例, 4例であった。第4週目検体で初めて抗体が陽転した例はHI抗体の2例にとどまった。また抗体価の上昇を認めなかった例がHIで2例あった。

(4) ワクチン接種例におけるIgG subclass抗体価の推移

Figure 4にワクチン接種前後のIgG subclass抗体価の推移を示す。IgG1抗体価の接種前, 接種後2週目, 3週目の幾何平均はそれぞれ, $100 \times 2^{3.44}$, $100 \times 2^{4.30}$, $100 \times 2^{4.34}$ であった。同様にIgG3抗体価のそれは $10 \times 2^{3.14}$, $10 \times 2^{3.75}$, $10 \times 2^{3.68}$ であった。さらにIgG4では $100 \times 2^{0.79}$, $100 \times 2^{0.78}$, $100 \times 2^{0.78}$ となった。IgG2抗体価陽性例は6例のみで, 平均値は採血時ごとに各々 $100 \times 2^{0.14}$, $100 \times 2^{0.18}$, $100 \times 2^{0.17}$ であった。IgG1では接種前値に比して抗体価の上昇は明らかで ($P < 0.0001$), そのピーク値は3回目採血時であった ($P < 0.001$)。IgG3では接種前値に比べて抗体価は接種後有意に上昇し ($P = 0.0001$), そのピーク値は接種後2週目であった ($P < 0.001$)。IgG4では接種前後に抗体価の有意な変動は認められず ($P = 0.7351$), IgG2はその挙動を統計学的に検討することができるほどの抗体陽性者数が得られなかった。

Table 2に抗体獲得の詳細な経過を示す。IgG1は70例で, 接種前検体から抗体価が陽性であったが, そのうち36例でその後1管ないし2管以上の抗体価の上昇を認めた。2週目から抗体価陽性となった例は4例あり, その全てで2管以上の抗体価上昇を認めた。

IgG2は6例のみが抗体陽性であり, そのうち2例のみが抗体価の上昇を示した。

Table 3. Generation of HI, NT antibody after vaccination.

Sampling point	Day of vaccination	2 weeks post vaccination	4 weeks post vaccination	Antibody elevation					
				HI (total number)			NT (total number)		
				4'≤	2-4'	no elevation	4'≤	2-4'	no elevation
Types of antibody generation	1:40≤+	+	+	11			42		
				3	4	4	29	9	4
	1:40>+	+	+	29			28		
				24	3	2	22	4	2
	1:40>	+	+	30			4		
			23	7	0	4	0	0	
	1:10>	1:10>	+	2			0		
				0	2	0	0	0	0
	1:10>	1:10>	1:10>	2			0		
				0	0	2	0	0	0

IgG3 は 49 例で接種前検体から抗体価が陽性であったが、抗体上昇を認めたのはそのうち 15 例のみであった。第 2 週目から抗体価陽性となった例は 7 例認め、その全てで 2 管以上の抗体価上昇を認めた。抗体価の上昇を認めなかったのは 18 例であった。

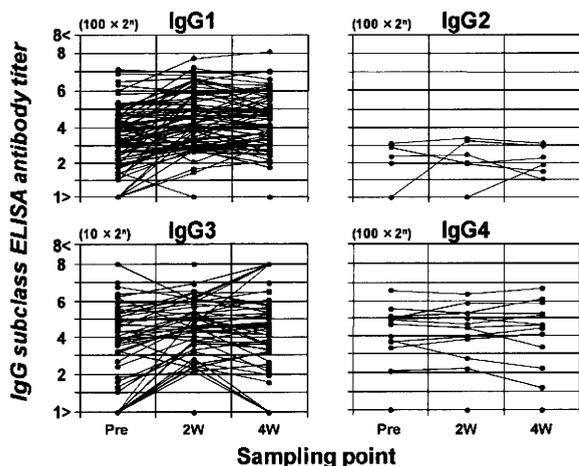


Figure 4. IgG subclass ELISA antibody titer specific to A/California/07/2009(H1N1). Black dot represents antibody titer. Abscissa in sampling point before and after vaccination. Ordinate in serum dilution.

IgG4 では 13 例において接種前検体から抗体価が陽性であったが、その全てで抗体価の変動がなかった。残る 61 例は抗体価の上昇がなかった。

D. 考察

著者らは一昨年パンデミックに際して、自然感染インフルエンザ患者ならびにパンデミックワクチン被接種者からなる 2 つの集団から series 血清検体を採取し、抗体価の推移を検討する機会を得た。得られた結果はそれぞれの研究対象群について HI, NT および IgG subclass 抗体価であった。これらの抗体価推移の検討結果を以下の様にまとめることができる。

(1) 自然感染における抗体応答は大部分の症例で 2 管以上の上昇を示し、そのピークは症状発現後 4 週目にあり、一次免疫応答を示唆する態様を示した。

(2) 医療機関職員におけるパンデミックワクチン接種成績では、90%以上の対象者が接種前から中和抗体を有しており、かつワクチン接種後の抗体活性ピークは接種後第 2 週目にあることが分かった。この事実は被接種者が既にウイルス曝露を受け、いずれかの時点で一次免疫応答を経過して抗体を獲得していたことが示されており、その後のワクチン接種に対する態度は二次免疫応答を示すものであった。

(3) IgG subclass 抗体の応答は HI, NT 抗体応答と一致しているとは言い難く、マウスにおける HI 抗体応答がほぼ IgG1 のそれと一致するという成績とは異なる結果であった。また、抗原刺激で booster がかかる IgG subclass と変化のない subclass があり、これらの抗体に対応する抗原 epitope の検索とこれらの抗体の担っている役割についての検討が必要となる。

今回の成績では、自然感染症例は比較的若年者であり、インフルエンザに対する基礎免疫がなかったことが想定され、発症と共に一次免疫応答が惹起され、その経過を観察したことになる。これに対して、医療機関職員は比較的年長であり、かつ職業的事情からインフルエンザに対する曝露は充分であったことが想定される。しかしながら、今回のワクチン接種対象者はパンデミックに際して無症候であったものが選択されており、接種前の高い抗体価は臨床的発症に伴って得られたものとは言えない。この高い抗体価は無症候性不顕性感染あるいは A ソ連 (H1N1) との共通抗原に対するものであることが考えられる。しかし、A/ California/07/2009 (H1N1) と A ソ連 (H1N1) の HA 上の交差反応性は小さいことが知られているので、不顕性感染によって基礎免疫を得たと考えるのが妥当であろう。どのようなメカニズムが大多数のものに無症候性感染をもたらしたのかは大変興味深い研究対象である(発症阻止効果とも言い換え可能である)。これらの対象者が接種前に有していた防御能力はある意味では理想的な免疫能とも言える状態であり、検討対

Table 4. Generation of IgG subclass antibody after vaccination

Sampling point	Onset of illness	2 weeks	4 weeks	Antibody elevation											
				IgG1			IgG2			IgG3			IgG4		
				4 ⁺	2-4	no elevation	4 ⁺	2-4	no elevation	4 ⁺	2-4	no elevation	4 ⁺	2-4	no elevation
	+	+	+	70			4			49			13		
				19	17	34	0	0	4	5	10	34	0	0	13
Types of antibody generation	-	+	+	4			1			7			0		
				4	0	0	1	0	0	7	0	0	0	0	0
	-	-	+	0			1			0			0		
				0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	-	-	-	0			68			18			61		
				0	0	0	0	0	68	0	0	18	0	0	61

象として重要である。

IgG subclass 抗体応答の検討ではいくつかの興味ある知見が得られた。自然感染では、急性期(第一回目検体採取時)から陽性であった例の多くは2管以上の抗体価上昇を示さなかった。これに対して急性期陰性でその後、陽性になった例の大部分では2管以上の上昇を認めた。一方、ワクチン被接種者の極めて多数において、接種前値からIgG1陽性であり、これは中和抗体活性と共通していた。一方、ピーク値が中和抗体が2週目であるのに対し、IgG1抗体は第4週であり、挙動が異なっていることから、必ずしも同じ抗体とは言えないかも知れない。IgG3は自然感3-3を示す例は少なかった。IgG4は自然感染の半数で陽性かつ2管以上上昇する例が多かったが、ワクチン被接種者では抗体価の変動を示した例はなかった。すなわちワクチン抗原でboostされなかったことを示す。IgG2は自然感染、ワクチン被接種者とも極めて限られた数の陽性者が認められたに過ぎない。これらの知見はインフルエンザで誘導される抗体が極めて多様な性格を有するheterogeneousな分子から構成されていることを示しており、有効な免疫に寄与している抗体分子の性状解析が必要である。なお、今回用いたELISA抗原はインフルエンザHAワクチン同等品であるが、このsplit productにはその呼称に反して、HAのみではなく、脂質の多くの部分を除く全てのウイルス構成成分が3次元構造が破壊された状態で含まれている。従って、得られた免疫応答はHA以外の成分に対する免疫応答が相当含まれていることを勘案しなければならない。さらに、また抗体の活性は抗原との結合能ばかりではないので、インフルエンザウイルスに対する抗体の生物学的な活性の検討も今後必要になる^{1,2)}。

パンデミックを経過して一年以上が過ぎようとしているが、その評価に不可欠な血清抗体の検討成績は余り多く発表されていない。その原因として、医療機関の多くが臨床の対応に追われ、研究のための検体採取を行う余裕がなかったことが推定される。著者らの臨床グルー

プは多年に涉って多くの臨床検体採取を行ってきた経験から、時を逃がすことなく対象者の協力を得て検体を保存することができた。このような検体は臨床現場でしか得ることができず、今後は一部グループに依存することなく、公的対応として臨床検体を採取してゆく態勢作りも求められていると考える。

E. 文献

- 1) Huber VC, McKeon RM, Brackin MN, et al. Distinct contributions of vaccine-induced immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG2a antibodies to protective immunity against influenza. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13:981-90.
- 2) Hagens N, Mastrobattista E, Glansbeek H, et al. Head-to-head comparison of four nonadjuvanted inactivated cell culture-derived influenza vaccines: Effect of composition, spatial organization and immunization route on the immunogenicity in a murine challenge model. *Vaccine* 2008;26:6555-6563.

2. 知的財産の出願、登録状況

なし

班員外研究協力者

- 奥野良信 (財団法人阪大微生物病研究会)
加瀬哲男 (大阪府立公衆衛生研究所)
尾崎隆男, 西村直子 (江南厚生病院こども医療センター)
宮田章子 (医療法人社団みやた小児科)
鈴木英太郎 (医療法人社団鈴木小児科医院)
岡藤輝夫, 岡藤隆夫 (医療法人社団岡藤小児科医院)
落合 仁 (医療法人彰仁会落合小児科医院)
由利賢次 (医療法人北耀会あさぶ小児科)
長田伸夫 (医療法人社団恒仁会ひらおか公園小児科)
堤 裕幸 (札幌医科大学小児科学教室)
佐藤昇志 (札幌医科大学第一病理学教室)
岡松正敏, 喜田 宏 (北大獣医学部大学院微生物)

課題 4：ワクチン・アジュバントによる副反応と副作用の分子メカニズム解明と解決方法の模索

課題 5：ワクチンの「真」の有用性をヒトの検体を用いた免疫学的方法で検討する臨床研究

沈降新型インフルエンザワクチン(H5N1 株)保存血清を使った、サイトカイン解析臨床研究

研究分担者：熊谷卓司、中山哲夫、神谷 齊

【研究要旨】

H5N1 パンデミックワクチンは全粒子不活化ウイルス抗原にアルミニウムアジュバントを加えた製剤で成人に認可された。しかしながら同じワクチン製剤の小児での治験では成人の試験と比較し 6 歳以下の幼児で約 60% において発熱を認めたが、抗体応答は良好であった。その原因を究明するためにリンパ球を刺激し 24 時間後のサイトカイン産生能を検討した。アルミニウム単独刺激ではサイトカイン産生能はコントロールと差は認めなかったが、全粒子不活化抗原では IL-1 β , IL-6, IL-17, IFN- γ , MCP-1, MIP-1 β , TNF- α の産生が増加し、全粒子不活化抗原+アルミニウムアジュバントで IL-1 β の産生がさらに増強された。全粒子不活化ワクチンは炎症性サイトカイン、ケモカインを誘導しアルミニウムアジュバントの添加はインフラゾームを刺激し IL-1 β の産生を増強させ、発熱、免疫応答に関与している可能性が推察された。

分担研究者

北里生命科学研究所	中山哲夫
くまがい小児科	熊谷卓司
国立療養所三重病院	神谷 齊

ムアジュバントの剤型で成人において臨床試験

が実施された。成人の臨床試験の結果では抗体反応は弱いものの 2 回接種で中和抗体価の 4 倍以上の上昇が 70% に認められ認可され 3000 万人分が備蓄された。しかしながら、小児での臨床試験の結果では、特に 6 歳以下の幼児では 60% に発熱が認められたが、抗体反応は成人に比較して予想外に良好な成績であった。仮に H5N1 インフルエンザがヒトに感染し重篤な症状を起こす一方、ワクチンの副反応が発熱のみであるなら、自然感染の重症度とのバランスで発熱程度は容認できるものではある。しかしながら、全粒子不活化+アルミニウムワクチンの副反応の原因の解明は重要な課題であるとともに小児での反応を科学的に解明することはより安全で有効なインフルエンザワクチンの開発につながるものである。

A. 研究目的

H5N1 パンデミックワクチンは現行のスプリットワクチンでは免疫効果がなく Sanofi Aventis はベトナム株スプリット抗原 90ug を 2 回投与で HI 抗体陽転率 57% であったと報告している 1)。ウイルス抗原を減量するためにアジュバント添加を検討し、スプリットウイルス抗原 30ug+アルミニウムで HI 抗体陽転率が 40% と EU committee for Proprietary Medical Products (CPMP) の基準の一つである HI 抗体陽転率>40% をかろうじてクリアしている 2)。H5N1 ウイルスはヒトに感染したことがなく、現行のスプリットワクチンは免疫記憶を刺激するブースターのワクチンであることから免疫効果を高めるためにアジュバントが必要と考えられ MF59 をはじめとした oil emulsion type のアジュバントが諸外国では開発されその有用性が報告されている 3)。しかしながら、開発当時、わが国で認可されているアジュバントはアルミニウムアジュバントのみであった。

我が国でも H5N1 ワクチンの開発研究が行われスプリット、全粒子不活化ワクチンの免疫原性が低かったことから全粒子不活化+アルミニウ

B. 研究方法

1) 対象

東京医大小児科のスタッフ、入院患者の退院前の血液検査に採血した一部の静脈血 3ml を対象とした。25 例の背景を図 1 に示した。

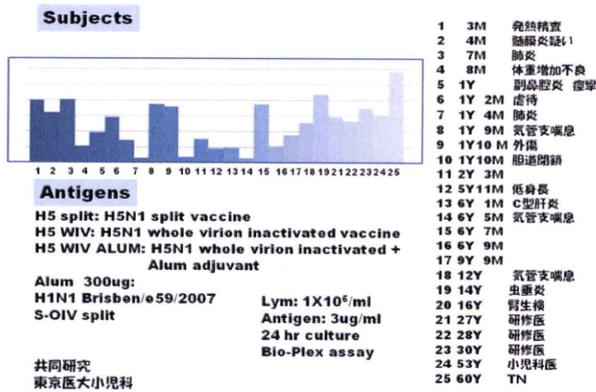


図 1. 対象と使用したワクチン製剤

2) リンパ球培養

定法によりリンパ球を分離し 10^6 /well に調整し RPMI 1640 5%FCS を用いて培養した。アルミニウム 300ug/ml, H5N1 全粒子不活化ワクチン (WIV)、H5N1 全粒子不活化+アルミアジュバント (WIV+Alum)、H5N1 スプリットワクチン (Split)、A/Brisbane/H1N1 split、A/California/SO-H1N1split ワクチン製剤を作製し HA 抗原として 3ug/well で刺激した。予備実験によりリンパ球数として 10^6 と 2×10^6 では差がなく刺激後 16 時間からサイトカインが産生され始め 24 時間まで増加したことから、ヒトリンパ球を刺激し培養 24 時間後の上清を採取し -80°C に保存した。

3) サイトカインの測定

上清中のサイトカイン反応パターンを Bio Plex サイトカインパネルを用いて 17 種類(IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, Hu-G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , MCP-1, MIP-1 β , TNF- α)を網羅的に解析した。

C. 研究結果

1) アルミニウムアジュバントの単独作用

16 例の健康小児から成人 (3 か月~60 歳) を対象にリンパ球を 10^6 /ml に調整しアルミニウムアジュバント 300ug/ml, 30ug/ml に調整しその 0.1ml でリンパ球を刺激しサイトカイン産生パターンを測定し、結果 wo 図 2 に示した。ワクチン製剤にはアルミニウムアジュバントが 300ug/ml の濃度で含まれている。アルミニウム単独刺激ではコントロール培養と同様で顕著なサイトカインの動きは検出できなかった。

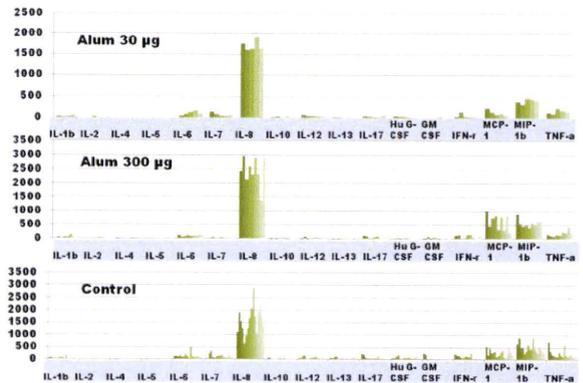


図 2. アルミニウムアジュバント単独刺激によるサイトカイン産生パターン

2) インフルエンザウイルスによる違い

16 例において 2008/09 年度の H1N1 ワクチンに含まれていた A/Brisbane/H1N1 split、2009 年のパンデミックワクチン A/California/SO-H1N1 split、2004 ベトナム株から作製した H5N1split ワクチンを HA タンパクとして 30ug/ml に調整し 0.1ml で刺激した。異なるインフルエンザウイルス株の現行ワクチン製剤と H5N1 ベトナム株を同様に split 製剤にしたものではサイトカイン産生パターンには差が認められなかった。

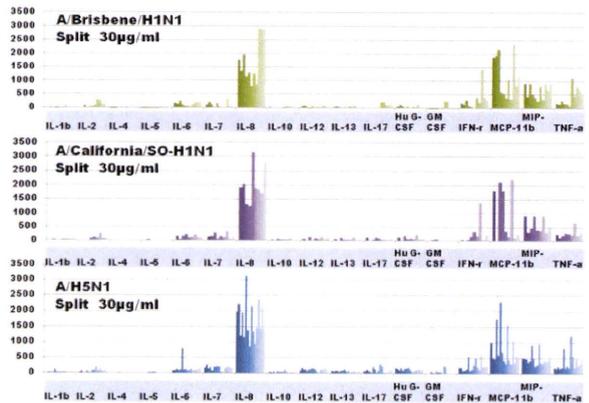


図 3. 異なるインフルエンザウイルス株のスプリット製剤によるサイトカイン産生パターン

3) H5N1 ワクチン製剤によるサイトカイン産生

25 例の健康小児、成人のリンパ球を H5N1 全粒子不活化ワクチン(WIV)、H5N1 全粒子不活化+アルミアジュバント(WIV+Alum)、H5N1 スプリットワクチン(Split)の製剤(HA タンパク量 30ug/ml に調整)0.1ml で刺激し 24 時間後のサイトカイン産生パターンを測定し図 4,5 に示した。

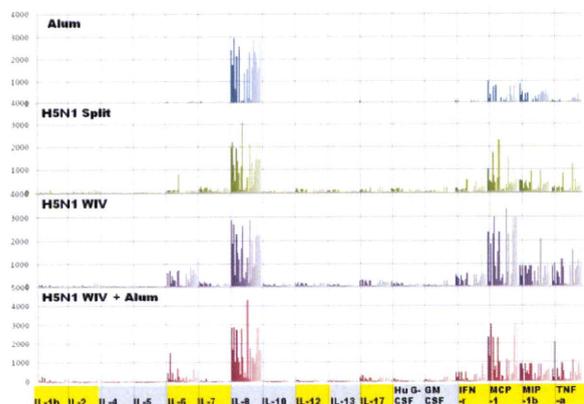


図 4. H5N1 スプリット、全粒子不活化(WIV)、全粒子不活化+アルミ(WIV+Alum)刺激によるサイトカイン産生パターン

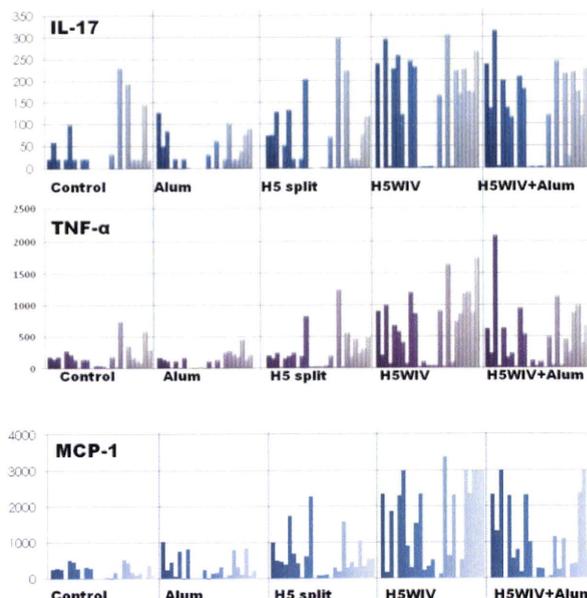
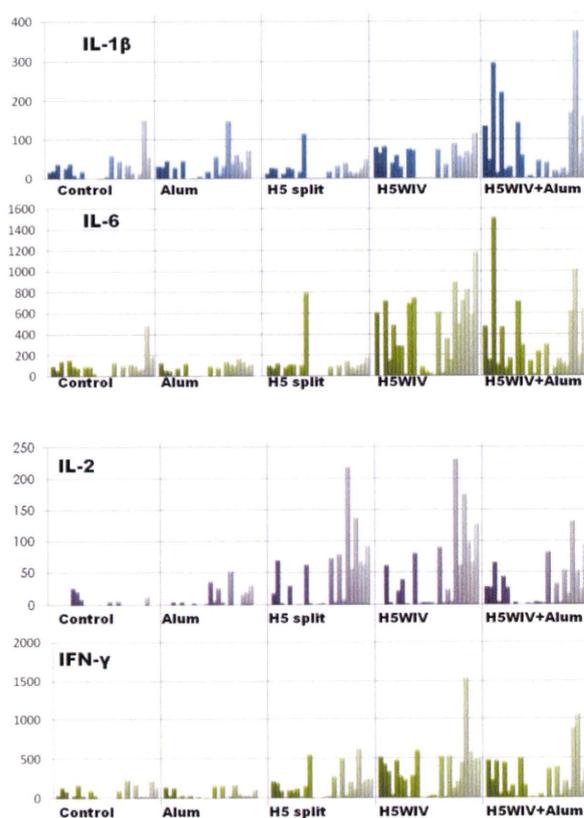


図 5.変動を認めたサイトカイン産生パターン

H5 split で刺激することでアルミニウムアジュバント刺激よりも IL-2, IFN- γ , IL-17, TNF- α , MCP-1, の産生が増強した。全粒子不活化ワクチン刺激で IL-1 β , IL-6, IL-17, IFN- γ , MCP-1, MIP-1 β , TNF- α の産生が増加した。全粒子不活化抗原+アルミニウムアジュバントで IL-1 β の産生が増強された。

D. 考案

H5N1 全粒子不活化アルミニウムアジュバント添加ワクチンは成人の臨床試験では発熱等の副反応は認めなかったものの抗体反応は十分なものではなかった。一方、小児での臨床試験では特に 6 歳以下では約 60% に接種当日の夜間に発熱を認めた。インフルエンザワクチンはウイルス特異的抗体産生を誘導することを目的とするが、生体には侵入してきた微生物をパターン認識する自然免疫能が早期に働きケモカイン、サイトカインを産生することで獲得免疫能を修飾する働きがある。全粒子不活化インフルエンザワクチンは粒子内にウイルス RNA が存在し樹状細胞に取り込まれることで Toll like receptor (TLR)-7 による一本鎖 RNA が認識され IFN- α/β を産生する 4)。マウスモデルでは全粒子不活化ワクチンはこの自然免疫系を介し良好な感染防御免疫を誘導することが知られている 4)。ヒトにおいて全粒子不活化ワクチンは 1970 年代にはその副反応とし

て発熱率が高いところから不活化スプリットワクチンに置き換わった。過去の全粒子不活化ワクチンの副反応は原材料に混入している LPS に由来するのではと考えられ精製技法の進んだ現在の全粒子不活化ワクチンの評価はされていない。

アルミニウムアジュバントは接種された組織に抗原を長く留める働きがあり抗原提示されやすくすることでアジュバント作用を発揮するとされてきた。それ以外にアルミニウムは細胞内センサーの NOD-like receptor の NLRP-3 を介し **Inflammasome** を刺激することで **caspase** を刺激し **pro-inflammatory cytokine** を成熟型 **IL-1 β** として産生させる働きが知られている。また **Th2 cytokine** を誘導すると考えられている 5)。マウスモデルでは **IL-1 β** は発熱の原因となると考えられている。アルミニウムアジュバント単独刺激ではコントロール培養と差はなく **H5 Split** ワクチン製剤でもコントロール培養と大きな変化は認めなかった。**H5N1** 全粒子不活化ワクチン刺激では **IL-1 β** , **IL-6**, **IL-17**, **IFN- γ** , **MCP-1**, **MIP-1 β** , **TNF- α** の産生が増加した。全粒子不活化抗原+アルミニウムアジュバントで **IL-1 β** の産生が増強された。この **Inflammasome** を刺激する機序が **H5** パンデミックワクチンの小児での発熱と良好な抗体産生と関連しているのではないかと考えられる。しかしながら成人のリンパ球を刺激しても同様に **IL-1 β** を産生増強が認められることから乳幼児と成人で **IL-1 β** に対する反応性の差があるかどうか課題となる。

H5N1 のワクチン製剤をマウスに接種してサイトカイン応答を検討しヒトのリンパ球と同様に全粒子不活化+アルミニウムアジュバント刺激で **IL-1 β** の産生と抗体産生能との関連性を検討する必要がある。

E. 結論

全粒子不活化 **H5** パンデミックインフルエンザワクチンにはアルミニウムアジュバントが使用されており乳幼児では発熱率が高く、一方免疫原性は優れており、その原因を推定するためにリンパ球のサイトカイン産生能をしらべた。全粒子不活化抗原+アルミニウムアジュバントで **IL-1 β** の産生が増強された。この **Inflammasome** を刺激する機序が **H5** パンデミックワクチンの小児での発熱と

良好な抗体産生と関連しているのではないかと考えられる。

本研究は東京医大倫理委員会で承認された。

班員外研究協力者

河島尚志、柏木保代(東京医大小児科)

F. 文献

- 1) Treanor JJ, Campbell JD, Zangwill KM, et al. Safety and immunogenicity of an inactivated subvirion influenza A (H5N1) vaccine. *N Engl J Med* 354: 1343-1351, 2006
- 2) Bresson JL, Perronne C, Launay O, et al. Safety and immunogenicity of an inactivated split-virion influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) vaccine: phase I randomized trial. *Lancet* 367:1657-1664, 2006.
- 3) Stephenson I, Bugarini R, Nicholson KG, et al. Cross-reactivity to highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses after vaccination with nonadjuvanted and MF59-adjuvanted influenza A/Duck/Singapore/97 (H5N3) vaccine: a potential priming strategy. *J Infect Dis* 191: 1210-1215, 2005.
- 4) Koyama S, Aoshi T, Tanimoto T, et al. Plasmacytoid dendritic cells delineate immunogenicity of influenza vaccine subtypes. *Sci Trend Med* 2010 Mar 31 2:25
- 5) Bryant C, Fitzgerald KA. Molecular mechanisms involved in inflammasome activation. *Trends in Cell Biology* 19: 455-464, 2009

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okada K, Komiya T, Yamamoto A, Takahashi M, Kamachi K, Nakano T, Nagai T, Okabe N, Kamiya H, Nakayama T. Safe and effective booster immunization using DTaP in teenagers. *Vaccine* 28: 7626-7633, 2010

- 2) Sakata M, Nakayama T. Protease and helicase domains are related to the temperature sensitivity of wild-type rubella viruses. *Vaccine* 29: 1107-1113, 2011
- 3) Sawada A, Komase K, Nakayama T. AIK-C measles vaccine expressing fusion protein of respiratory syncytial virus induces protective antibodies in cotton rats. *Vaccine* 29: 1481-1490, 2011

知的財産の出願、登録状況

1. 特許取得 なし

厚生労働科学研究費補助金

「インフルエンザワクチンの有効性と安全性の向上のための理論基盤構築」

課題 4: ワクチン・アジュバントによる副反応と副作用の分子メカニズム解明と解決方法の模索
課題 5: ワクチンの「真」の有用性をヒトの検体を用いた免疫学的方法で検討する臨床研究

沈降新型インフルエンザワクチン(H5N1株)保存血清を使った、microRNA チップ解析臨床研究

(独) 医薬基盤研究所 アジュバント開発プロジェクト 石井 健、鉄谷耕平

要旨

本研究は故神谷齊国立病院機構三重病院名誉院長を研究代表者とする「沈降新型インフルエンザワクチン (H5N1 株) 保存血清を使った臨床研究」の分担研究として、過去に行われた上記ワクチン臨床試験およびそれに付随する臨床研究において、既に得られた保存血清を用い、血清中マイクロ RNA の解析を行なうものである。

2010 年 12 月に独立行政法人医薬基盤研究所倫理審査委員会の承認を得、2011 年 2 月に使用する血清サンプルを選択、2011 年 3 月に測定を実施し、現在結果を解析中である。本報告では実施の経緯および今後の方針案について概説する。

A. 研究目的

国立感染症研究所より 2004 年にベトナムで分離された A/Viet Nam/1194/2004 (H5N1) 株を抗原に、アジュバントとして水酸化アルミニウムゲルを添加した沈降新型インフルエンザワクチン (以下、プレパンデミックワクチン) が国内 4 社により作製され、非臨床試験及び健康成人に対する臨床試験 (以下、成人治験) が実施された。うち学校法人北里研究所及び一般財団法人阪大微生物病研究会のワクチンについては、2007 年 10 月に薬事法上の製造販売承認を取得した。

その後、成人治験成績に対する承認審査で求められた対応として、小児に対する適切な用法及び用量の設定を行うため、学校法人北里研究所及び一般財団法人阪大微生物病研究会のプレパンデミックワクチンについて 6 ヶ月以上 20 歳未満の健康小児に対する免疫原性及び安全性を検討するための臨床試験 (以下、小児治験) が実施された。この成績に基づき、小児への用法及び用量の設定について現在承認審査中である。

小児治験の結果、抗体価は成人に匹敵する、あるいはそれ以上の上昇が確認された一方、約半数の被験者に発熱が観察された。そこで、その発熱の原因を探ること、ひいてはより安全性の高い

プレパンデミックワクチンの製造に向けた情報を収集することを目的に、成人治験、成人治験後の抗体価追跡調査及び小児治験で得られ、保存されている血清検体を用いた H5N1 血清研究が 2010 年に開始された。H5N1 血清研究には血清サイトカイン濃度の解析などとなり、本研究のマイクロ RNA 解析が分担研究として含まれる。

本研究はまず小規模数の被験者血清をもちいて、網羅的に解析を行う探索的パイロットスタディとしてデザインした。

B. 研究方法 (サンプル選択)

H5N1 血清研究は上記治験の被験者のうち、①同意が得られた者又は血清検体の利用について倫理審査委員会等の承認及び組織の代表者等 (臨床研究機関の長に組織の代表者等の権限又は事務委任がなされている場合は臨床研究機関の長に読み替える。以下同じ。) の許可が得られた者、かつ②血清検体が十分量保存されている者、を対象とした。本研究は H5N1 血清研究の分担研究として、H5N1 血清研究の目標症例数として成人治験参加者 150 例、小児治験参加者 200 例とし、そのうち小児 15 症例においてマイクロ RNA 解析を実施した。

15 症例の選択は、小児治験被験者を「接種後発熱 (1 回目発熱 38 度以上) の有無」および「抗体値上昇 (HI 抗体価上昇比 8 倍以上) の有無」で 4 群に分け、各群から 3~4 人を抽出した。各群内での抽出においては、探索的パイロットスタディという本研究のデザインから、年齢や過去のインフルエンザワクチン接種歴などの各群の性格を代表する症例を選択し、交絡因子を排除しなかった。各症例において治験薬接種前および後の 2 時点の血清を用い、総計 30 サンプルを解析対象とした。サンプルは国立病院機構三重病院に凍結保存されている血清サンプルから、RNA 抽出および miRNA 測定に必要な 500 マイクロリットルの容量を満たすものを 2011 年 2 月 22 日に選択し、業務委託先である株式会社東レに移送した。

C. 研究結果 (マイクロ RNA 解析)

マイクロ RNA (miRNA) は、タンパク質をコードしていないが転写をうける non-coding RNA で、20~25 塩基長の 1 本鎖である。多くは標的遺伝子を抑制的に制御するとされ、標的遺伝子の同定 (機能解析) も miRNA ごとに進んでいる。血清中で miRNA は、微量ながら細胞が放出する小胞内に安定して存在することが知られている¹⁾。本研究では株式会社東レに業務委託して、血清サンプルから RNA を抽出し、そのうち、現在知られている 1212 種のヒト型 miRNA (miRNA のデータベースである miRBase による) の包含量を網羅的チップ解析として測定した (図 1)。

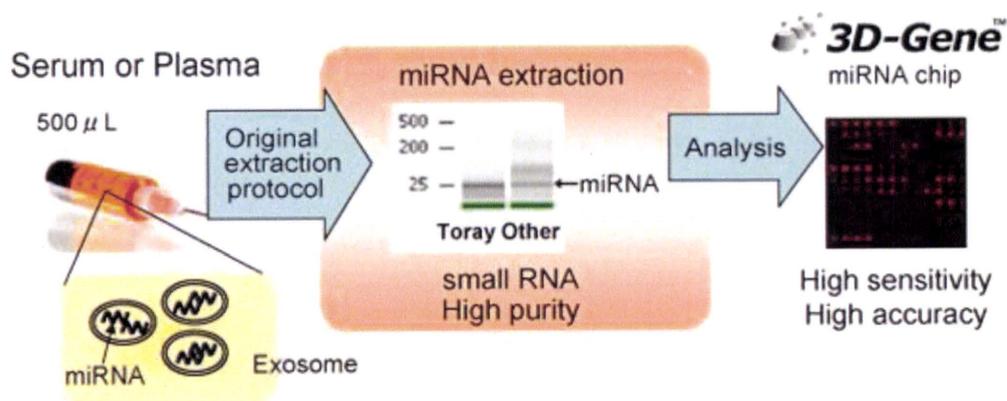


図 1

結果詳細

1. 30 検体すべてで RNA の抽出に成功した (平均 7.2 (4.26~28.4) ng/microL)。

2. 粗解析の結果、群内で発現量にばらつきが大きい miRNA が散見されるものの、弱い傾向として以下のようなふるまいをする miRNA を認めた。

A) 接種によって変動する miRNA (接種前後比較において増加ないし減少など、15 症例の大部分で同様の変動傾向を示すもの)

B) 発熱の有無に相関する miRNA (発熱ある群と発熱ない群との比較において、接種前の miRNA 発現量に差があるもの)

C) 抗体値上昇の有無に相関する miRNA (抗体値上昇群と低上昇群との比較において、接種前の miRNA 発現量に差があるもの)

D) 4 群のうちのある 1 群に特異的な変動を示す miRNA (発熱なしかつ抗体価低上昇群でのみ、他群に比較して時系列非依存的に高い発現量を

示す miRNA、発熱なしかつ抗体価上昇群でのみ、他群に比較して接種前発現が検出されなかった miRNA、など)

D.E. 結論および考察

今回 15 例において実施した網羅的チップ解析では、いくつか興味深いふるまいをする miRNA を検索し拾い上げることができた。ただし各群対象者数が限られたこと、群内ばらつきが大きいものもあることから、15 例対象の本解析は探索的パイロットスタディという枠をこえなかった。

今後の方針として、まず各 miRNA の定量的 PCR 解析を行い、本研究手法である網羅的チップ解析の検証をおこなう。その結果がチップ解析結果と整合する miRNA について、今後解析対象症例を拡大して、検証の臨床研究を実施したい。後ろ向き研究としては、本研究対象者の母集団である小児治験および成人治験被験者の保存血清を対象とした研究を、また前向き研究としては、今後実施

予定のインフルエンザワクチン治験に付随した臨床研究を、それぞれ立案・実施することによって、ワクチン接種による発熱あるいは抗体値上昇と関連する miRNA を同定したい。

長期的目的としては、上記検証的臨床研究で同定される発熱関連 miRNA を、ワクチン接種による発熱の危険を予測できるバイオマーカーとして利用すること、すなわち、ワクチン接種前に個々の被験者でこれら miRNA を測定検討することによって、「接種関連発熱要注意者」を同定し必要な対症法をあらかじめとるなど、より安全な予防接種の実施につなげたい。その際、ワクチン接種による抗体価上昇の予測因子として、抗体価上昇関連 miRNA を併用できれば、よりきめ細かい予防接種法に結びつくと期待している。

F. 文献

1. Gilad, S. *et al.* Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS. One.* **3**, e3148 (2008).

G. 研究発表

1. Ezoe, H. *et al.* Intranasal vaccination with pneumococcal surface protein A plus poly(I:C) protects against secondary pneumococcal pneumonia in mice. *Vaccine*(2011).

2. Jounai, N. *et al.* NLRP4 Negatively Regulates Autophagic Processes through an Association with Beclin1. *J. Immunol.*(2011).

3. Kawashima, A. *et al.* Fragments of genomic DNA released by injured cells activate innate immunity and suppress endocrine function in the thyroid. *Endocrinology* **152**, 1702-1712 (2011).

4. Fujimoto, K. *et al.* A New Subset of CD103⁺CD8^α⁺ Dendritic Cells in the Small Intestine Expresses TLR3, TLR7, and TLR9 and Induces Th1 Response and CTL Activity. *J. Immunol.*(2011).

5. Kuroda, E. *et al.* Silica Crystals and Aluminum Salts Regulate the Production of Prostaglandin in Macrophages via NALP3 Inflammasome-Independent Mechanisms. *Immunity.* **34**, 514-526 (2011).

6. Kobiyama, K. *et al.* Extrachromosomal histone H2B mediates innate antiviral immune responses induced by intracellular double-stranded DNA. *J. Virol.* **84**, 822-832 (2010).

7. Coban, C. *et al.* Immunogenicity of whole-parasite vaccines against *Plasmodium falciparum* involves malarial hemozoin and host TLR9. *Cell Host. Microbe* **7**, 50-61 (2010).

8. Koyama, S. *et al.* Plasmacytoid Dendritic Cells Delineate Immunogenicity of Influenza Vaccine Subtypes. *Science Translational Medicine* **2**, (2010).

9. Kobiyama, K. *et al.* Modulation of intracellular signaling using protein-transduction technology. *Crit Rev. Immunol.* **30**, 395-421 (2010).

10. Yamaguchi, T. *et al.* Induction of type I interferon by adenovirus-encoded small RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **107**, 17286-17291 (2010).