

201114017A

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23年度 総括・分担研究報告書**

**研究代表者 山西 弘一**

平成24(2012)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（未定

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 ..... 15

3. 経鼻インフルエンザワクチンのアジュバント作用に関する研究

長谷川 秀樹 ..... 17

4. 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 ..... 23

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 ..... 31

6. ウイルスライブラリー株を用いたインフルエンザウイルスワクチンの経鼻接種による  
抗ウイルス防御効果の検討

岡本 成史 ..... 38

7. サルを用いた経鼻ワクチンの安全性評価

内山 安男 ..... 42-1

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 43

【参考資料】 ..... 53

## 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 応用にむけた研究

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】

平成 21 年度に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即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即応できる次世代ワクチンの作成を目指す。本年度は、インフルエンザウイルスライブラリーに保存されている抗原性解析、ヘルパー T 細胞 (Th) の感染制御での役割解明、ワクチン経鼻投与の際のナノエマルジョンアジュバントの効果解析やリポソームワクチンの製造方法の確立を目的とし種々の関連の検討を行った。そして、N5N1 インフルエンザウイルスの抗原変異が地域ごとに加速していること、アジュバントの高い効果を明らかにした。さらに MDCK 細胞により作成されたワクチンが十分な抗ウイルス防御効果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
- ① 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
- ② 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。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、インフルエンザウイルスの抗原性の検討及びワクチンの力価試験系の構築、種々のアジュバントの検討、新規作成方法による次世代ワクチン効果検討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. インフルエンザウイルスの抗原性の検討及びワクチンの力価試験系の構築

日本、モンゴル、ベトナムにおいて採取された家禽、渡りガモ及びハクチョウの材料から合計144型のインフルエンザAウイルス分離同定し、ライブラリーに追加した。分離株の大半を占めたH5およびH6ウイルスについて抗原性解析を行った結果H5N1高病原性鳥インフルエンザの抗原変異が地域ごとに加速していることが明らかになった。また、H5ウイルスH6ウイルスの遺伝子と抗原性解析の結果及び発育卵における増殖性の結果からワクチン候補株を選抜し不活化全粒子ワクチンを試作しマウ

スに免疫したところ優位な抗体上昇が認められワクチン株としての免疫原性が確認された。

## 2. 種々のアジュバントの検討

・ノナエマルジョンアジュバントの効果をマウスモデルで解析したところ経鼻投与で高い液性免疫増強効果が認められた、また肺胞洗浄液、血清、鼻腔洗浄液中の IgA 上昇からもアジュバント効果が確認された。

・リポソームワクチンの実用化に向けて、インフルエンザ抗原とリポソームの反応時間、使用ペプチド量などの検討の結果、反応時間は室温 6 時間で回収率がほぼ一定、リポソームへのペプチドの結合量は、ペプチド最大使用量で最大となった。リポソームの粒子分布とゼータ電位に優位さがなかった。

・Toll 様レセプター 7 の新規アゴニストアジュバントは TLR3 アゴニスト比べて低い粘膜アジュバント活性が認められたが、両者を併用した場合には相加的な効果が得られることが明らかになった。

・インフルエンザの病態制御には Th 反応が大きく関係し、Th1 タイプの反応が感染制御に重要な役割があり、インフルエンザウイルス感染により粘膜でのアレルギー反応を誘導・増悪させることが示唆された。Th2 タイプに誘導されているアレルギー・アトピー性疾患罹患患者においてはインフルエンザウイルス制御に働く免疫応答が不十分である上に、感染によりアレルギー・アトピーが悪化する可能性が示唆された。これらのことからインフルエンザワクチンには Th1 タイプの免疫反応を誘導するためにアジュバント等の添加の必要性が示唆された。

## 3. 新規作成方法による次世代ワクチン効果検討

トリインフルエンザウイルス A/duck/Hokkaido/Vac-3/2007 株の MDCK 細胞への馴化に伴うアミノ酸置換インフルエンザライブラリー中の株である A/duck/Hokkaido/Vac-3/2007 株は、MDCK 細胞に 17 回継代することにより、増殖能が約 10 倍以上増強した。

また、上記株を用いて試作用のホルマリン不活化 WV ワクチンを作製し、WV ワクチンをマウスに  $1\mu\text{g}$  を 2 回経鼻接種させ、最終接種から 2 週間後に致死量 ( $100\times\text{LD}_{50}$ ) の A/HongKong/483/97 株を感染させ、感染後のマウスの体重変化および生存率の変化を観察した。ワクチン非接種群において、感染後に体重減少がみられ、全匹死亡したが、ワクチン接種群においては、体重減少も見られず、全匹生存した

## 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発現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、ヘモゾインがアジュバント効果を示すこと、及び、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た。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Murakami S, Horimoto T, Ito M, Takano R, Katsura H, Shimojima M, Kawaoka Y. Enhanced growth of influenza vaccine seed viruses in Vero cells mediated by broadening the optimal pH range for virus membrane fusion. *Journal of Virology* 86:1405-1410, 2012.

2. 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*

3. Yanagita H, Yamamoto N, Fuji H, Liu X, Ogata M, Yokota M, Takaku H, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Hoshino T. Mechanism of Drug Resistance of Hemagglutinin of Influenza Virus and Potent Scaffolds Inhibiting Its Function. *ACS Chem Biol*. 2012 Jan 13.

4. Ainaï A, Tamura S, Suzuki T, Ito R, Asanuma H, Tanimoto T, Gomi Y, Manabe S, Ishikawa T, Okuno Y, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Kurata T, Hasegawa H. Characterization of neutralizing antibodies in adults after intranasal vaccination with an inactivated influenza vaccine. *J Med Virol*. 2012 Feb;84(2):336-44.

5. Ainaï A, Tamura S, Suzuki T, Ito R, Asanuma H, Tanimoto T, Gomi Y, Manabe S, Ishikawa T, Okuno Y, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Kurata T, Hasegawa H. Characterization of neutralizing antibodies in adults after intranasal vaccination with an inactivated influenza vaccine. *J Med Virol*. 2012 Feb;84(2):336-44.

6. Suzuki T, Ainaï A, Nagata N, Sata T, Sawa H, Hasegawa H. A novel function of the N-terminal domain of PA in assembly of influenza A virus RNA polymerase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Nov 4;414(4):719-26. Epub 2011 Oct 6.

7. Fukumoto H, Kanno T, Hasegawa H, Katano H. Pathology of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Infection. *Front Microbiol*. 2011;2:175. Epub 2011 Aug 25.

8. Nakajima N, Sato Y, Katano H, Hasegawa H, Kumasaka T, Hata S, Tanaka S, Amano T, Kasai T, Chong JM, Iiduka T, Nakazato I, Hino Y, Hamamatsu A, Horiguchi H, Tanaka T, Hasagawa A, Kanaya Y, Oku R, Oya T, Sata T. Histopathological and immunohistochemical findings of 20 autopsy cases with 2009 H1N1 virus infection. *Mod Pathol*. 2012 Jan;25(1):1-13. Epub 2011 Aug 26.

9. 内田哲也「Drug Delivery System としてのリポソーム類」-アジュバント開発研究

の新展開 シーエムシー出版, 2011,  
180-185.

10. Uchida, A., Sasaguri, H., Kimura, N., Tajiri, M., Ohkubo, T., Ono, F., Sakaue, F., Kanai, K., Hirai, T., Sano, T., Shibuya, K., Kobayashi, M., Yamamoto, M., Yokota, S., Kubodera, T., Tomori, M., Sakaki, K., Enomoto, M., Hirai, Y., Kumagai, J., Yasutomi, Y., Mochizuki, H., Kuwabara, S., Uchihara, T., Mizusawa, H. and Yokakota, T. Non-human primate model of ALS with cytoplasmic mislocalization of TDP-43. Brain in press

11. Iwasaki, Y., Mori, K., Ishii, K., Maki, N., Iijima, S., Yoshida, T., Okabayashi, S., Katakai, Y., Lee, J., Saito, A., Fukai, H., Kimura, N., Ageyama, N., Yoshizaki, S., Suzuki, T., Yasutomi, Y., Miyamura, T., Kannagi, M. and Akari, H. Long-term persistent GBV-B infection and development of a chronic and progressive hepatitis C-like disease in marmosets. Frontiers Microbiol. in press

12. Hirata, H., Kawai, S., Maeda, M., Jinnai, M., Fujisawa, K., Katakai, Y., Hikosaka, K., Tanabe, K., Yasutomi, Y. and Ishihara, C. Identification and Phylogenetic Analysis of Japanese Macaque Babesia-1 (JM-1) Detected from a Japanese Macaque (*Macaca fuscata*). Am. J. Trop. Med. Hyg. in press

13. Saito, A., Kono, K., Nomaguchi, M., Yasutomi, Y., Adachi, A., Shioda, T., Akari, H. and Nakayama, E. E. Geographic, Genetic, and Functional Diversity of Antiretroviral Host Factor TRIM5α in Cynomolgus Macaque (*Macaca fascicularis*) J. Gen. Virol. in press

14. Matsuo, K. and Yasutomi, Y. Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guérin as a vaccine vector for global infectious disease control. Tuberculosis Res. Treat. 2011 Epub

15. Chono, H., Saito, N., Yasutomi, Y., Mineno, J., and Kato, I. In vivo safety and persistence of endoribonuclease gene-transduced CD4+ T cells in cynomolgus macaques for HIV-1 gene therapy model. PLoS One 2011; 6: Epub

16. Xing, Li., Wang, J.C., Li, T-C., Yasutomi, Y., Lara, J., Purcell, R., Takeda, N., Miyamura, T. and Holland, R.C. Spatial configuration of hepatitis E virus antigenic domain. J. Virol. 2011;85:1117-1124

17. 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.



18. Okabayashi, S., Uchida, K., Ohno, C., Hanari, K., Goto, I. and Yasutomi, Y. Periventricular Leucomalacia (PVL)-like lesions in two neonatal cynomolgus monkeys (*macaca fascicularis*). *J. Comp. Pathol.* 2011;144:204-211.
19. 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 and Infection* 2011;13:58-64.
20. Okamoto S, Yoshii H, Matsuura M, Kojima A, Ishikawa T, Akagi T, Akashi M, Takahashi M, Yamanishi K, Mori Y. Poly- $\gamma$ -glutamic acid nanoparticles and aluminum adjuvant used as an adjuvant with a single dose of Japanese encephalitis virus-like particles provide effective protection from Japanese encephalitis virus. *Clin Vaccine Immunol* 18:17-22, 2012.
21. Okamoto S, Matsuoka S, Takenaka N, Haredy AM, Tanimoto T, Gomi Y, Ishikawa T, Akagi T, Akashi M, Okuno Y, Mori Y, Yamanishi K: Intranasal immunization with formalin-inactivated human influenza A whole-virion vaccine alone and with split-virion vaccine with mucosal adjuvants shows similar cross-protection *Clin Vaccine Immunol* In press.
- G-2. 学会発表
1. 長谷川秀樹、成人 T 細胞性白血病 (ATL) モデルマウスを用いた新規治療法の試み 第 100 回日本病理学会総会 2011 年 4 月横浜
  2. 中島典子、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹、熊坂利夫、羽田悟、田中伸哉、笠井孝彦、鄭子文、飯塚利彦、仲里巖、樋野陽子、濱松晶彦、堀尚、田中智之、長谷川章雄、尾矢剛志、佐多徹太郎 2009H1N1 パンデミックインフルエンザウイルス感染症 20 剖検例の臨床病理学的解析 第 100 回日本病理学会総会 2011 年 4 月横浜
  3. Akira Ainai, Ryo Ito, Hideki Asanuma, Tadaki Suzuki, Takeshi Tanimoto, Takato Odagiri, Shin-Ichi Tamura, Tetsutaro Sata, Masato Tashiro, Hideki Hasegawa INTRANASAL ADMINISTRATION OF 2009/10 ANNUAL INFLUENZA VACCINE INDUCE THE CROSS-PROTECTION AGAINST 2009 PANDEMIC INFLUENZA VIRUS INFECTION, XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
  4. Elly van Riet, Akira Ainai, Ryo Ito, Tadaki Suzuki, Shin-Ichi Tamura, Masato Tashiro, Hideki Hasegawa, INFLUENZA SPECIFIC IGA PRODUCING SERUM MEMORY B CELLS CORRELATE TO PROTECTIVE ANTIBODIES IN THE SERUM AS WELL AS LOCAL IGA RESPONSES, XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
  5. Ryo Ito, Akira Ainai, Hideki Asanuma, Tadaki Suzuki, Joe Chiba, Shin-Ichi

- Tamura, Masato Tashiro, Tetsutaro Sata, Hideki Hasegawa ANALYSIS OF THE IMMUNE RESPONSES AFTER INTRANASAL BOOSTER INFLUENZA VACCINE WITH HETEROLOGOUS VIRUS PRIMING XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
6. Hideki Hasegawa, Akira Ainai, Elly van Riet, Tadaki Suzuki, Ryo Ito, Takeshi Tanimoto, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Tetsutaro Sata, Takeshi Kurata, Shin-Ichi Tamura, INTRANASAL ADMINISTRATION OF AN INACTIVATED WHOLE-VIRION INFLUENZA VACCINE EFFECTIVELY INDUCES THE NEUTRALIZING ANTIBODIES BOTH IN THE SERUM AND THE NASAL WASH IN HUMAN XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
7. Hideki Asanuma, Mina Nakauchi, Kayoko Sato, Eri Nobusawa, Akira Ainai, Norio Yamamoto, Nami Konomi, Hideki Hasegawa, Masato Tashiro COMPARISON OF INFLUENZA A/H1N1 PDM09 VACCINE PRODUCTIONS IN EGGS VERSUS CELL CULTURES AND THE PROTECTIVE IMMUNE RESPONSES INDUCE IN MICE XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
8. Tadaki Suzuki, Akira Ainai, Noriyo Nagata, Tetsutaro Sata, Hideki Hasegawa ROLE OF THE N-TERMINAL REGION OF THE PA SUBUNIT IN NUCLEAR IMPORT AND ASSEMBLY OF INFLUENZA A VIRUS RNA POLYMERASE XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
9. Tatsuya Yamazaki, Yasutomo Teshima, Daisuke Ninomiya, Maria Nagashima, Yuka Arai, Akira Fujimoto, Akira Ainai, Hideki Hasegawa, Joe Chiba PASSIVE IMMUNOTHERAPY AGAINST INFLUENZA VIRUS INFECTION USING THE EXPRESSION OF NEUTRALIZING ANTI-HEMAGGLUTININ MONOCLONAL ANTIBODIES FROM PLASMIDS BY HYDRODYNAMICS-BASED PROCEDURE XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
10. Hidekatsu Iha, Emi Ikebe, Akira Kawaguchi, Shinya Taguchi, Akira Nishizono, Yuetsu Tanaka, Hirofumi Sawa, Masao Ogata, Mitsuo Hori, Jun-Ichi Fujisawa, Hideki Hasegawa MOLECULAR CHAPERON INHIBITOR-BASED TREATMENT AGAINST ATL:ITS IN VITRO AND IN VIVO EVALUATION XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
11. Masayuki Saijo, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, Noriyo Nagata, Naoko Yoshikawa, Hideki Hasegawa, Shuetsu Fukushi, Tetsuya Mizutani, Tetsutaro Sata, Ichiro Kurane, Shigeru Morikawa IMMUNE RESPONSES AGAINST EEV AND IMV IN NON-HUMAN PRIMATES INFECTED WITH MONKEYPOX VIRUS OR VACCINATED WITH A HIGHLY ATTENUATED SMALLPOX VACCINE LC16M8 AND PROTECTION FROM LETHAL MONKEYPOX XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
12. Noriyo Nagata, Naoko Iwata, Hideki

Hasegawa, Yuko Sato, Shigeru Morikawa, Tetsutaro Sata, INTERFERON GAMMA PROTECTS ADULT BALB/MICE FROM LETHAL RESPIRATORY ILLNESS AFTER MOUSEADAPTED SARS-COV INFECTION XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo

13. 長谷川秀樹 感染防御に効くインフルエンザワクチンを目指して 第 15 回日本ワクチン学会学術集会 2011 年 12 月東京

14. 相内章、浅沼秀樹、谷本武史、小田切孝人、田村慎一、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/H1N1pdm09 ウイルスの感染防御第 15 回日本ワクチン学会学術集会 2011 年 12 月東京

15. 種市麻衣子、内田哲也「リポソーム結合抗原による液性免疫と細胞性免疫の誘導における TLR リガンド依存性の相違」 第 40 回日本免疫学会学術集会、千葉、Nov 27-29, 2011.

16. 渡邊健太、松尾和浩、保富康宏：ヒトパラインフルエンザ 2 型ウイルスをベクターとした新規結核ワクチンの開発 第 15 回日本ワクチン学会 東京 2011 年 12 月 10 日-11 日

17. 塩釜ゆみ子、保富康宏：Th 制御とインフルエンザ感染の関係 第 40 回日本免疫学会 千葉 2011 年 11 月 27 日-29 日

18. 岡村智崇、保富康宏：カニクイザルを用いたアジュバント組み込みサルヒト免疫

不全ウイルスの効果 第 40 回日本免疫学会 千葉 2011 年 11 月 27 日-29 日

19. 和田剛、小原道法、保富康宏：C 型慢性肝炎モデルマウスを用いた治療用 DNA ワクチンの評価 第 40 回日本免疫学会 千葉 2011 年 11 月 27 日-29 日

20. 辻村佑祐、保富康宏：好酸菌分泌抗原 Ag85B は局所にインターロイキン-17、-22 を誘導することでアレルギー喘息の治療効果を促す 第 40 回日本免疫学会 千葉 2011 年 11 月 27 日-29 日

21. 渡邊健太、保富康宏：ヒトパラインフルエンザ 2 型ウイルスベクターを用いた新規結核ワクチンの開発 第 40 回日本免疫学会 千葉 2011 年 11 月 27 日-29 日

22. 田尻和子、保富康宏：SOCS1 遺伝子治療による自己免疫性心筋炎の制御効果の検討 第 40 回日本免疫学会 千葉 2011 年 11 月 27 日-29 日

23. 塩釜ゆみ子、河岡義裕、保富康宏：ヘルパー T 細胞反応制御によるインフルエンザウイルス感染に対する免疫反応 第 152 回日本獣医学会 大阪 2011 年 9 月 19 日-21 日

24. 岡本成史、松岡須美子、Ahmad M. Haredy、山田博司、谷本武史、五味康行、石川豊数、奥野良信、赤木隆美、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の経鼻接種による交叉防御効果と抗ウイルス中和抗体産生との関連性. 第 25 回

インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム (2011年6月2-4日 富山県富山市)

25. 岡本成史、谷本武史、高野大輔、松岡須美子、Ahmad M. Haredy、竹中延之、田村慎一、奥野良信、森 康子、山西弘一. 抗インフルエンザ IgA モノクローナル抗体による交叉防御効果の可能性. 第15回日本ワクチン学会学術集会 (2011年12月10-11日 東京都千代田区)

26. 松岡須美子、岡本成史、Ahmad M. Haredy、谷本武史、五味康行、石川豊数、奥野良信、森 康子、山西弘一. インフルエンザ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範囲と抗ウイルス中和抗体との関連性. 第15回日本ワクチン学会学術集会 (2011年12月10-11日 東京都千代田区)

27. Okamoto S, Yamada H, Matsuoka S, Haredy AM, Tanimoto T, Gomi Y, Ishikawa T, Akashi M, Okuno Y, Mori Y, Yamanishi K. Intranasal immunization with formalin inactivated influenza A whole-virion vaccine alone induces Ssufficient cross-protection, correlating with cross-reactive neutralizing antibody production. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sep 11 - Sep 16, 2011 (Sapporo, Japan)

「国際」

28. Akatsuki SAITO, Masako NOMAGUCHI, Ken KONO, Emi E. NAKAYAMA, Tatsuo SHIODA, Tomoyuki YOSHIDA, Yasuhiro YASUTOMI,

Naofumi TAKAHASHI, Tetsuro MATANO, Akio ADACHI, Hirofumi Akari: Susceptibility of cynomolgus monkeys to monkey-tropic HIV-1 infection is determined by TRIM5 $\alpha$  genotypes. Non-Human Primate model for AIDS Oct. 25-28, 2011, Seattle, WA.

29. Kenta WATANABE, Akihiro MATSUBARA, 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. Interantional Union of Microbiological Societies 2011Sep. 11-17, 2011, Sapporoo.

30. Tomotaka OKAMURA, Yuya SHIMIZU, Kazuhiro MATSUO, Yasuhiro YASUTOMI: Adjuvant molecule Ag85B cDNA insertion into live attenuated simian -human immunodeficiency virus enhances the SHIV-specific immune responses in Cynomologous monkeys. Interantional Union of Microbiological Societies 2011Sep. 11-17, 2011, Sapporoo.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許第4817625号 粘膜免疫誘導アジュバントを含む新規ワクチン 登録日平成23年9月9日

## 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

（分担）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

**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。2011年は日本、モンゴル、ベトナム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10,166検体から合計144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H8とH10およびH11の合計の10の亜型に、NA亜型はN1からN9のすべて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、分離株の大半を占めたH5およびH6ウイルスについて抗原性解析を行った結果、H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスの抗原変異が地域ごとに加速していることが明らかになった。また今回分離されたH6ウイルスは、これまで中国を中心としたアジア地域で分離されているウイルスとは遺伝的に離れており（Vietnam系統）、H6標準ウイルスと抗原性も異なることが分かった。これらの野外株と抗原的に交差するウイルス株をワクチン候補株として選抜し、ワクチンの力価試験を行う実験系を構築した。

### 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。

2011年に分離されたH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスの遺伝子と抗原性の解析を行い、過去に分離されたウイルスのそれと比較した。また、同様に2011年に分離されたH6ウイルスの遺伝子と抗原性の解析を行い、過去に分離されたウイルスのそれと比較した。これらの遺伝子および抗原性解析の成績および発育鶏卵における増殖性を考慮してワクチン株として有用なウイルス株を選抜した。試製したH5およびH6亜型ワクチンをマウスに接種し、免疫原性を確認した。

### C. 研究結果

家禽と野鳥の気管ぬぐい液および糞便10,166検体から合計144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H1からH8とH10およびH11の合計の10の亜型に、NA亜型はN1からN9のすべての亜型に区分された。ベトナムで分離されたウイルスの大半はH6亜型のウイルス（51株）であったが、H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスも分離されたウイルスにはH5N1亜型のウイルス（17株）も含まれていた。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。

2011年ベトナムで分離された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1.1と2.3.2.1に分類された。このクレード1.1と2.3.2.1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、これらの株は1996年の分離株と比べ抗原性に大きな差があることがわかった。分離されたクレード1.1のウイルスは2004年にベトナムで分離されたクレード1のウイルスの子孫と考えられるが、中和エピトープを中心にアミノ酸置換が多く、抗原変異が加速していることがわかった。この抗原変異には家禽におけるワクチン接種が強く関わっていると考えられる。

これまでアジア地域で分離されたH6ウイルスは遺伝子型としてGroup I、Group II、Group III、W312の4つの系統に大別されてきた。今回ベトナムで分離されたH6ウイルス(H6N2 46株、H6N6 3株、H6N9 2株)のHA遺伝子は独自の遺伝子系統(Vietnam系統)に分類されることがわかった。またこのVietnam系統のウイルスは他のH6ウイルスとも抗原的に異なることがわかった。

H5ウイルスとH6ウイルスの遺伝子と抗原性解析の結果および発育鶏卵における増殖性の結果から、各血清型を代表するウイルス株を選抜し、ワクチン候補株とした。H5ウイルスについてはA/duck/Hokkaido/Vac-3/2007 (H5N1)とA/peregrine falcon/Hong Kong/810/2009 (H5N1)を、H6ウイルスについてはA/teal/Hong Kong/W312/1997 (H6N1)とA/duck/Vietnam/OIE-4033/2011 (H6N2)をワクチン候補株として選抜し、不活化全粒子ワクチンを試製した。これらの試製ワクチンをマウスに免疫したところ、優位な抗体上昇が認められ、ワクチン株としての免疫原性が確認された。

#### 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、試製したワ

クチンの評価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) Yamamoto N, Sakoda Y, Motoshima M, Yoshino F, Soda K, Okamatsu M and Kida H. (2011) Characterization of a non-pathogenic H5N1 influenza virus isolated from a migratory duck flying from Siberia in Hokkaido, Japan, in October 2009. *Virology* 8, 65.
- (3) Soda K, Cheng MC, Yoshida H, Endo M, Lee SH, Okamatsu M, Sakoda Y, Wang CH and Kida H. (2011) A Low Pathogenic H5N2 Influenza Virus Isolated in Taiwan Acquired High Pathogenicity by Consecutive Passages in Chickens. *J Vet Med Sci* 73, 767-772.
- (4) Soda K, Asakura S, Okamatsu M, Sakoda Y and Kida H. (2011) H9N2 influenza virus acquires intravenous pathogenicity on the introduction of a pair of di-basic amino acid residues at the cleavage site of the hemagglutinin and consecutive passages in chickens. *Virology* 8, 64.
- (5) Simulundu E, Ishii A, Igarashi M, Mweene AS, Suzuki Y, Hang'ombe BM, Namangala B, Moonga L, Manzoor R, Ito K, Nakamura I, Sawa H, Sugimoto C, Kida H., Simukonda C, Chansa W, Chulu J and Takada A. (2011) Characterization of influenza A viruses isolated from wild

- waterfowl in Zambia. *J Gen Virol* 92, 1416- 1427.
- (6) Samad RA, Sakoda Y, Tsuda Y, Simulundu E, Manzoor R, Okamatsu M, Ito K and Kida H. (2011) Virological surveillance and phylogenetic analysis of the PB2 genes of influenza viruses isolated from wild water birds flying from their nesting lakes in Siberia to Hokkaido, Japan in autumn. *Jpn J Vet Res* 59, 15-22.
- (7) Samad RA, Nomura N, Tsuda Y, Manzoor R, Kajihara M, Tomabechei D, Sasaki T, Kokumai N, Ohgitani T, Okamatsu M, Takada A, Sakoda Y and Kida H. (2011) Avaccine prepared from a non-pathogenic H5N1 influenza virus strain from the influenza virus library conferred protective immunity to chickens against the challenge with antigenically drifted highly pathogenic avian influenza virus. *Jpn J Vet Res* 59, 23-29.
- (8) Sakoda Y, Ito H, Uchida Y, Okamatsu M, Yamamoto N, Soda K, Nomura N, Kuribayashi S, Shichinohe S, Sunden Y, Umemura T, Usui T, Ozaki H, Yamaguchi T, Murase T, Ito T, Saito T, Takada A and Kida H. (2012) Reintroduction of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus by migratory water birds, causing poultry outbreaks in 2010-2011 winter season in Japan. *J Gen Virol* 93, 541-550.
- (9) Nomura N, Sakoda Y, Soda K, Okamatsu M and Kida H. (2011) An H9N2 Influenza Virus Vaccine Prepared from a Non-Pathogenic Isolate from a Migratory Duck Confers Protective Immunity in Mice against Challenge with an H9N2 Virus Isolated from a Girl in Hong Kong. *J Vet Med Sci, in press*.
- (10) Nomura N, Sakoda Y, Endo M, Yoshida H, Yamamoto N, Okamatsu M, Sakurai K, Hoang NV, Nguyen LV, Chu HD, Tien TN and Kida H. (2011) Characterization of avian influenza viruses isolated from domestic ducks in Vietnam in 2009 and 2010. *Arch Virol, in press*.
- (11) Kajihara M, Matsuno K, Simulundu E, Muramatsu M, Noyori O, Manzoor R, Nakayama E, Igarashi M, Tomabechei D, Yoshida R, Okamatsu M, Sakoda Y, Ito K, Kida H and Takada A. (2011) An H5N1 highly pathogenic avian influenza virus that invaded Japan through waterfowl migration. *Jpn J Vet Res* 59, 89-100.
- (12) Isoda N, Sakoda Y, Okamatsu M, Tsuda Y and Kida H. (2011) Improvement of the H5N1 influenza virus vaccine strain to decrease the pathogenicity in chicken embryos. *Arch Virol* 156, 557-563.
- ## 2. 学会発表
- (1) 「Rapid replication of H7 highly pathogenic avian influenza virus induces hyper expressions of cytokine mRNAs, leading sudden death of chickens」 S. Kuribayashi, Y. Sakoda, M. Okamatsu, T. Umemura, H. Kida KEYSTONE SYMPOSIA-Pathogenesis of Influenza: Virus-Host Interactions (2011年、香港)
- (2) 「Potency of an inactivated avian influenza vaccine prepared from a non-pathogenic H5N1 virus against the challenge with an antigenically drifted virus of clade 2.3.4」 S. Shichinohe, Y. Sakoda, N. Yamamoto, M. Okamatsu, Y. Noda, Y. Nomoto, T. Honda, Y. Takigawa, H. Kida KEYSTONE SYMPOSIA-Pathogenesis of Influenza: Virus-Host Interactions (2011年、香港)
- (3) 「H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses have perpetuated at their nesting lakes in Siberia?」 Y. Sakoda, M. Kajihara, S. Sugar, M. Okamatsu, R. Sodnomdarjaa, K. Ito, A. Takada, H. Kida KEYSTONE SYMPOSIA-Pathogenesis of Influenza: Virus-Host Interactions (2011年、香港)
- (4) 「2010-2011年に日本で野鳥から分離されたH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルス」岡松正敏、伊藤啓史、内田裕子、迫田義博、山本直樹、曾田公輔、笛吹達史、尾崎弘一、山口剛士、村瀬敏之、高田礼人、伊藤壽啓、西藤岳彦、喜田宏 第152回日本獣医学会学術集会 (2011年、大阪)

- (5) 「H5N1非病原性鳥インフルエンザウイルスを用いて試製したワクチンの異なる系統のウイルス攻撃に対する効果」七戸新太郎、岡松正敏、山本直樹、野田優、野元由佳、瀧川義康、迫田義博、喜田宏 第152回日本獣医学会学術集会 (2011年、大阪)
- (6) 「カモの非病原性インフルエンザウイルスがニワトリに感染し増殖する条件」日尾野隆大、岡松正敏、迫田義博、喜田宏 第152回日本獣医学会学術集会 (2011年、大阪)
- (7) 「Characterization of H9N2 influenza viruses isolated from domestic ducks in Vietnam in 2009 and 2010」 N. Nomura, Y. Sakoda, M. Endo, H. Yoshida, N. Yamamoto, M. Okamatsu, K. Sakurai, Hoang Van Nam, Ngyuyen Van Long, Chu Duc Huy, Tien Ngoc Tien, H. Kida 第59回日本ウイルス学会学術集会、国際微生物学連合2011会議 (2011年、札幌)
- (8) 「Rapid replication of H7 highly pathogenic avian influenza virus induces hyper expression of cytokine mRNA in chickens」 S. Kuribayashi, Y. Sakoda, M. Okamatsu, T. Umemura, H. Kida 第59回日本ウイルス学会学術集会、国際微生物学連合2011会議 (2011年、札幌)
- (9) 「Potency of an inactivated avian influenza vaccine prepared from a non-pathogenic H5N1 virus against the challenge with an antigenically drifted virus of clade 2.3.4」 S. Shichinohe, Y. Sakoda, N. Yamamoto, M. Okamatsu, Y. Noda, Y. Nomoto, T. Honda, Y. Takigawa, H. Kida 第59回日本ウイルス学会学術集会、国際微生物学連合2011会議 (2011年、札幌)
- (10) 「H5N1 highly pathogenic avian influenza virus infections in wild birds and poultry in 2010-2011 winter season in Japan」 Y. Sakoda, H. Ito, Y. Uchida, T. Saito, T. Ito, H. Kida 第59回日本ウイルス学会学術集会、国際微生物学連合2011会議 (2011年、札幌)
- (11) 「鳥インフルエンザとパンデミック対策」喜田宏 第59回日本ウイルス学会学術集会、国際微生物学連合2011会議市民公開講座 (2011年、札幌)
- (12) 「Brisk growth of H7 highly pathogenic avian influenza virus induces hyper expression of cytokine mRNA in chickens」 S. Kuribayashi, Y. Sakoda, T. Tanaka, T. Kawasaki, N. Yamamoto, N. Isoda, Y. Tsuda, M. Okamatsu, T. Umemura, H. Kida 15th US-Japan Acute Respiratory Infections Panel Meeting (2011年、和歌山)
- (13) 「How to control avian and pandemic influenza」 H. Kida 15th US-Japan Acute Respiratory Infections Panel Meeting (2011年、和歌山)

**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の抗原の解析」

研究者 河岡義裕 東京大学 医科学研究所 教授

**研究要旨:**不活化 Pandemic (H1N1) 2009 インフルエンザワクチンにおけるナノエマルジョ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、経鼻投与で高い液性免疫増強効果が認められた。また、肺胞洗浄液、血清、鼻腔洗浄液中の IgA 上昇率からも、アジュバント効果が確認され、致死量のマウスアダプトウイルスを用いた攻撃試験でも、体重減少の抑制が確認できたことから、ナノエマルジョンが、Pandemic (H1N1) 2009 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。

#### 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。ナノエマルジョンは大豆油と水を超高速で混合させ、表面活性剤によって安定化されたもので、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、Pandemic (H1N1)2009 不活化ワクチンの経鼻投与におけるナノエマルジョ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

$\beta$ -propiolactone で不活化した Pandemic (H1N1) 2009 ウイルス A/WI/WSLH34939/09 (A/Wisc/09;  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^6$ PFU) をナノエマルジョン W<sub>80</sub>5EC と混合し、最終濃度 20% (10  $\mu$ l) に調整した後、CD1 マウスに経鼻投与した。コントロールとして、不活化ウイ

ルスのみを経鼻投与を行った。初回免疫後 28 日目に、ブースト投与した。

肺胞洗浄液、鼻腔洗浄液、血液を採取した後、初回免疫から 56 日目に 100MLD<sub>50</sub> の Mouse adapted A/Wisc/09 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

ナノエマルジョンアジュバントを用いた不活化 A/Wisc/09 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、 $5 \times 10^5$  および  $5 \times 10^6$ PFU のウイルス量を用いた際に、活性上昇が認められた。また、肺胞洗浄液、血清、鼻腔洗浄液中のインフルエンザウイルス特異的な IgA 量を測定したところ、ナノエマルジョンアジュバントを用いて経鼻投与したマウスでは、不活化ウイルスのみを投与した場合に比べ、IgA 量の高い上昇が認められた。特に、 $5 \times 10^6$ PFU の不活化ウイルスのみ (アジュバントなし) では、血清中の IgA は全く認められなかったが、ナノエマルジョンアジュバントを用いた際は、IgA 量の高い上昇がみられた。

$5 \times 10^6$ PFU の不活化ウイルスのみを免疫原として経鼻投与したマウスは、致死量の A/Wisc/09 ウイルスによる攻撃後、体重減少が認められたが、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、体重減少率の抑制が認められた。

#### **D. 考察**

ナノエマルジョ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、血清、鼻腔洗浄液中の IgA 量は、ナノエマルジョンアジュバントワクチンを経鼻投与したマウスで高い上昇が認められ、攻撃試験により体重減少の抑制が認められたことから、不活化 Pandemic (H1N1) 2009 ウイルスワクチンに対して、ナノエマルジョンがアジュバント効果を示すことが明らかとなった。

#### **E. 結論**

ナノエマルジョンは、マウスモデルで Pandemic (H1N1) 2009 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

Murakami S, Horimoto T, Ito M, Takano R, Katsura H, Shimojima M, Kawaoka Y. Enhanced growth of influenza vaccine seed viruses in Vero cells mediated by broadening the optimal pH range for virus membrane fusion. *Journal of Virology* 86:1405-1410, 2012.

##### 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



経鼻インフルエンザワクチンの新規アジュバントに関する研究

分担研究者：長谷川 秀樹（国立感染症研究所 感染病理部）

協力研究者：相内 章（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）

研究要旨：経鼻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。不活化ワクチンを使用する場合には、粘膜アジュバントの添加が必要と考えられている。本研究では、Toll 様レセプター7 (Toll-like receptor 7, TLR7) の新規アゴニストのアジュバント活性を検討することを目的とした。この結果、TLR7 アゴニストには TLR3 アゴニストに比べて低い粘膜アジュバント活性が認められ、両者を併用した場合には相加的な効果が得られることが明らかになった。

A. 研究目的

経鼻投与型インフルエンザワクチンは、現行の注射型インフルエンザワクチンで誘導される血中 IgG 抗体に加えて、気道粘膜上に分泌型 IgA 抗体を誘導することが可能である。この分泌型 IgA 抗体はウイルスの感染自体を阻止することが可能であるため、経鼻投与型インフルエンザワクチンは新規ワクチン接種法として期待されている。現行ワクチンに用いられている不活化ワクチンを経鼻投与型ワクチンに用いる場合には、その免疫原性の低さを補うために粘膜アジュバントの添加が必要になる。我々は、すでに合成二本鎖 RNA に高い粘膜アジュバント活性があることを示している。アジュバント併用経鼻投与型インフルエンザワクチンの実用化を考えた場合に、安全性ならびに有効性の高いアジュバントは現時点において決定しておらず、合成二本鎖 RNA に加えた新規アジュバント候補を準備しておく必要がある。

インフルエンザウイルスの自然感染では、自然免疫担当細胞である形質細胞様樹状細胞に対

し、ウイルスゲノムである一本鎖 RNA により TLR7 を介した刺激が加えられることで、適応免疫応答が誘導されることが明らかになっている。そこで本研究では、TLR7 に対する新規合成アゴニストに粘膜アジュバント活性があるか否かを明らかにすることを目的とし、実験を行った。

B. 研究方法

1) マウス

6～8 週齢、雌の BALB/c 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。

2) ワクチンとアジュバント

ワクチンとして、エーテル不活化処理を行った実験室株 A/Puerto Rico/8/34 (A/PR8) ウイルスの HA ワクチンを用いた。粘膜アジュバントとして、TLR3 に対するアゴニストである合成二本鎖 RNA の Poly(I:C)、TLR7 に対する新規アゴニストであるコンパウンド A (CompA)

を用いた。

### 3) ワクチン接種とウイルス感染

BALB/c マウス 1 匹に対して、A/PR8 ワクチン 1 µg、Poly(I:C)あるいは CompA を 10、1、あるいは 0.1 µg を添加し、PBS により 12 µl としたワクチン溶液を片鼻 6 µl ずつ滴下しワクチンの経鼻接種を行った。またこの時、アジュバントとして Poly(I:C) 1 µg に対して CompA 10、1、0.1 µg を添加した併用群を設けた。初回のワクチン接種から 3 週間後に同様のワクチン接種を行った。2 回目のワクチン接種から、2 週後に 1,000 plaque forming unit (pfu)のウイルスを滴下し上気道感染を行った (片鼻 2 µl ずつ、計 1,000 pfu/4 µl)。感染 3 日後に、安楽殺のうえ血清と鼻腔洗浄液の回収を行った。鼻腔洗浄液は、1% BSA を含む PBS(-) 1 ml で上気道を繰り返し 3 回洗浄することで回収した。

### 4) 血清および鼻腔洗浄液中の抗体応答の測定

血清中 IgG 抗体応答および鼻腔洗浄液中 IgA 抗体応答は、A/PR8 HA に対する ELISA により測定した。

## C. 研究結果

本研究では、インフルエンザウイルスゲノム同様に TLR7 により認識される新規合成アゴニストのアジュバント活性を、マウスを用いた経鼻投与型インフルエンザワクチンのモデル実験で検討した。誘導される抗体応答は A/PR8 HA 特異的な血中 IgG ならびに鼻腔洗浄液中 IgA 抗体は、CompA 10 µg をアジュバントとして使用した場合、Poly(I:C) 1 µg をアジュバントとして用いた時と同レベルとなることが示された (図 1)。またアジュバントとして Poly(I:C) 1 µg に対して、CompA を 10、1 あるいは 0.1 µg 添加した場合、Poly(I:C) 1 µg に対して CompA 1 µg を混合した場

合に最も高い IgA 抗体応答が鼻腔洗浄液に認められた。この抗体応答は、Poly(I:C)あるいは CompA を単独で使用した時に得られる抗体応答の相加的な上昇であることが明らかになった (図 1)

## D. 考 察

本研究では、自然免疫担当細胞の一つである形質細胞様樹状細胞が、インフルエンザウイルスの感染時にそのゲノム一本鎖 RNA を認識し、その後の適応免疫応答を誘導する現象にヒントを見だし、新規合成 TLR7 アゴニストの粘膜アジュバント活性に関して検討を行った。

経鼻投与型インフルエンザワクチンのマウスを用いた評価系において、その粘膜アジュバント活性を検討した。既に粘膜アジュバントとして高い活性が示されている合成二本鎖 RNA である Poly(I:C)と比較した場合、CompA を 10 µg 使用した時に Poly(I:C) 1 µg 相当の A/PR8 HA 特異的な抗体応答を血清中および鼻腔洗浄液中に誘導可能であることが明らかになった。

我々は、酵母細胞壁分画 Zymosan に関する粘膜アジュバント作用の検討実験において、Zymosan と Poly(I:C)を混合しアジュバントとして用いた時に、相乗的な A/PR8 HA 特異的な抗体応答が得られることを見いだしている。これは、樹状細胞に対して、Zymosan に含まれる TLR2 アゴニストによる MyD88 を介したシグナルと Poly(I:C)による TRIF を介したシグナルが同時に入ることで、サイトカイン応答が強く誘導された結果であると考えられた。本研究では、Poly(I:C)と CompA を混合し、粘膜アジュバントとしての使用を試みた。この結果、抗体応答は増強されたものの相加的な効果しか得られないことが明らかになった。これは、TLR7 は形質細胞様樹状細胞に発現しており、TLR3 は異なる古典的樹状細胞 (近年、CD8 陽性古典的樹状細胞が選択的に