

TLR3 を発現しているという報告がある) に発現していることに起因すると考えられる。

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開発および実用化を目指し、安全で有効性の高い数種類のアジュバント候補を準備しておく必要があると考えられる。自然免疫担当細胞である樹状細胞等を活性化できる物質は、高いアジュバント活性を有する可能性が高い。免疫学的実験から明らかにされた知見をもとに、新たなアジュバント候補の探索を継続するとともに、ナノ粒子の利用等を含めたワクチンの剤形の検討も今後行う必要があると考えられる。

E. 結 論

インフルエンザウイルスゲノム同様に、形質細胞様樹状細胞に発現する TLR7 を介した刺激を加える新規合成アジュバントの粘膜アジュバント活性を検討した。すでに高い粘膜アジュバント活性を有することが示されている合成二本鎖 RNA Poly(I:C)と比較して、CompA は低いながらも粘膜アジュバント活性を有することが明らかになった。また、CompA と Poly(I:C)を混合し使用した場合には、相加的に抗体応答を増強することが明らかになった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.

2. Aina 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.

3. Nakao R, Hasegawa H, Ochiai K, Takashiba S, Aina A, Ohnishi M, Watanabe H, Senpuku H. Outer membrane vesicles of Porphyromonas gingivalis elicit a mucosal immune response. **PLoS One.** 2011;6(10):e26163. Epub 2011 Oct 14.

4. Suzuki T, Aina 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.

5. 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.

6. 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.

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 HIGHY 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
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得（出願）
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
2. 実用新案登録
なし

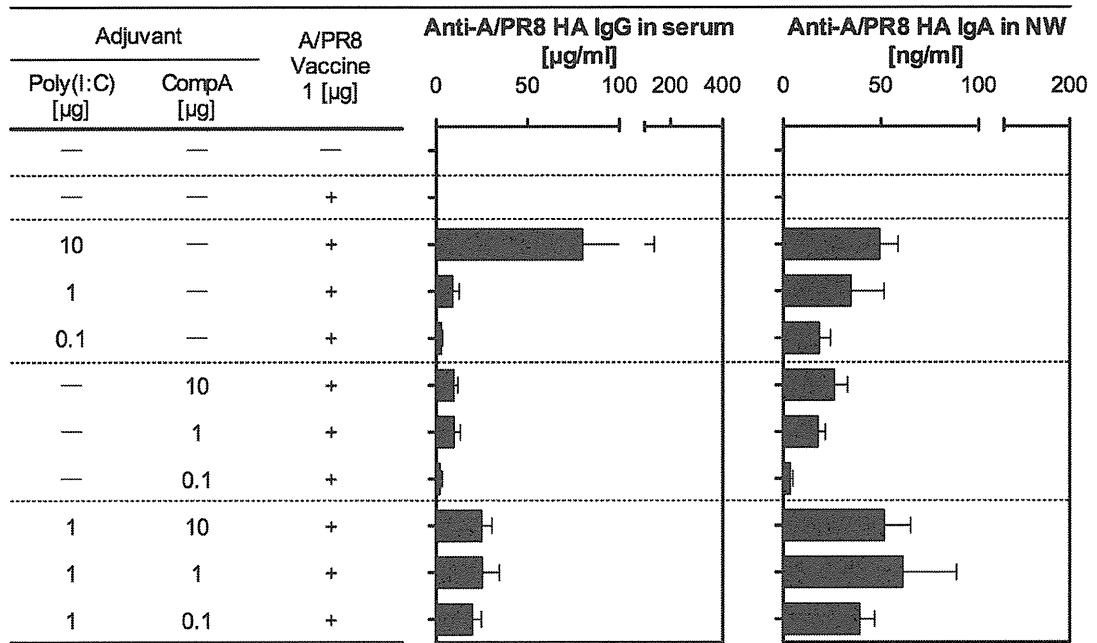


図 1. 経鼻ワクチン接種を行ったマウスにおける A/PR8 HA 特異的な血清中 IgG 抗体および IgA 抗体応答

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）
分担研究報告書

CTL 及び抗体誘導型インフルエンザワクチンの開発

研究分担者 内田哲也 国立感染症研究所血液・安全性研究部
主任研究官

研究協力者 種市麻衣子 同上 主任研究官

研究要旨

前年度までの検討の結果、我々が開発したリポソーム表面結合抗原が液性免疫（抗体産生）および細胞性免疫（細胞障害性 T 細胞：CTL）を同時に誘導可能であることが確かめられた。本年度はリポソームワクチンの実用化に向け、CMC (Chemistry, Manufacturing and Controls) における「製造法の確立」を目的として、インフルエンザウイルス由来 CTL エピトープペプチドを抗原として用い、架橋剤 DSS を誘導したリポソームとの反応時間および使用ペプチド量と結合効率との相関の検討、ペプチド結合前後のリポソームにおける粒度分布およびゼータ電位の比較、リポソームワクチンに添加するアジュバントの量と免疫誘導との相関の検討、等を行った。

A. 研究目的

現行のインフルエンザワクチンはインフルエンザウイルス表面の HA 抗原に対する抗体の産生（液性免疫）を誘導し、ウイルスが宿主の細胞に吸着するのを阻止することを目的としている。インフルエンザウイルスには表面抗原の異なる複数の亜型が存在する。抗原と抗体とはいわゆる「鍵と鍵穴」の関係にあるため、ひとつのウイルス亜型に結合する抗体は他のウイルス亜型には結合しない。また、仮にウイルス亜型が一致していても、HA のタンパク構造の一部が遺伝子変異を起こすことにより抗体が結合出来ない場合もある。一方

で、生体にはこの他に、ウイルスに感染した細胞を攻撃・除去することによりウイルスの複製を阻止する、細胞性免疫も備わっており、ウイルスが宿主に自然感染した際には液性免疫と細胞性免疫の双方が作用して感染防御を行っていると考えられている。液性免疫がウイルスの表面抗原を標的とするのに対して、細胞性免疫はウイルスの内部構造を含む全タンパク抗原を標的とすることができる。また、インフルエンザウイルスにおいてウイルス表面のタンパク抗原が頻繁に変異するのに対し、ウイルス内部を構成するタンパクは変異が少なく安定しており、ウイルス亜型間で相同性

が高いことが知られている。

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

1) ペプチド抗原と DSS 誘導リポソームとの反応時間と結合効率との相関の検討：従来のペプチド-リポソーム結合条件では、凍結乾燥状態にて冷凍保存された DSS 誘導リポソームを復水後、直ちにペプチド溶液を添加し、室温にて 6 時間攪拌した後、4℃にて 3 日間反応させた。結合至適条件を決定する目的で、反応時間を室温にて 2-6 時間、4℃にて 0-3 日の範囲で変え、それぞれの条件下でのリポソームへのペプチドの結合量をアミノ酸分析によって定量した。

2) 結合に使用するペプチド量とリポソーム結合効率との相関の検討：リポソームとの結合に使用するペプチドの量を 0.1-5.0mg の範囲で変え、それぞれの条件下での結合効率を検討した。

3) ペプチド結合前後のリポソームにおける粒径分布およびゼータ電位の検討：ペプチドの結合操作におけるリポソームの均質性・安定性を検討する目的で、ペプチド結合前および結合後のリポソームにつき、粒径およびゼータ電位を測定した。

4) リポソームワクチンに添加するアジュバントの量と免疫誘導との相関の検討：1 次免疫において CTL を誘導する際にはリポソーム結合ペプチドにアジュバント (CpG) を添加する必要があることがこれまでの naïve マウスを用いた検討によって確認されている。しかし、これまでに CpG の臨床応用を目標とした多くの試みがなされている一方で、肝障害、免疫抑制等の副反応の報告も数多くなされている。そこで、所定の効果を得るための CpG の必要最少量を決定する目的で、マウスにリポソーム結合ペプチドを 1 次免疫する際に添加する CpG の量を 0.3-5 · g/mouse の範囲で変え、それぞれの条件下での CTL 誘導を *in vivo* CTL assay を用いて検討した。

(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。

C. 研究結果

1) ペプチド抗原と DSS 誘導リポソームとの反応時間と結合効率との相関の検討：2 種類のインフルエンザウイルス由来 CTL エピトープペプチドを用いて検討を行った。表 1 に示す様に、室温 6 時間の反応にて回収率がほぼ最大値となった。

2) 結合に使用するペプチド量とリポソーム結合効率との相関の検討：上記 1) と同じ 2 種類のペプチドを用いて反応へのペプチド添加量と回収率の関係について検討したところ、表 2 に示す様に、回収率は(1 mg/coupling)で最大となった。また、回収率は低下するものの、リポソームへのペプチド結合絶対量は(5 mg/coupling)において最大となった。

3) ペプチド結合前後のリポソームにおける粒径分布およびゼータ電位の検討：表 3 に示す様に、リポソームの粒径はペプチド結合前(試料 #0)、結合後(同 #2)で有意差が認められなかった。また、ゼータ電位についても、表 4 に示す様に、ペプチド結合前(試料 #0)、結合後(同 #2)で有意差が認められなかった。

4) リポソームワクチンに添加するアジュバントの量と免疫誘導との相関の検討：ペプチド-リポソーム結合物による免疫時に添加する CpG 量を 5 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ から 2 倍段階で希釈したところ、図 1 に示す様に、原液から 4 倍希釈(1.25 $\mu\text{g}/\text{mouse}$)まで CTL 誘導効果に変化が見られなかった。また、16 倍希釈(0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$)においても有意な CTL 誘導が観察された。

D. 考察

リポソーム結合ペプチドを作製する際のペ

プチドと DSS 誘導リポソームの反応時間は 6 時間で十分であり、従来行ってきた、室温での反応に続く 4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 日間の反応は不要であることが確かめられた。

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(5mg)で最大となったが、結合効率は 1 mg/coupling で最大となったことから、工業化に際しては結合効率と免疫誘導効果を勘案して反応条件を決定することが必要であると考えられた。

ペプチド結合操作の前後でリポソームの粒径分布とゼータ電位に有意差が見られなかったことから、現在使用しているリポソームの安定性の高さが確認された。

前述の様に、ワクチンに添加するアジュバント(CpG)の量は出来る限り少量である事が望ましいと考えられるが、リポソーム結合抗原に添加する際には、従来実験的に最も良く使用されている 5 $\cdot\text{g}/\text{mouse}$ の 1/4 量で同等の効果が得られ、かつ 1/16 量にても所定の効果が得られることが確かめられた。また、2 次免疫においては CpG 非存在下で CTL が誘導され、液性免疫(抗体産生)は 1 次免疫においてもアジュバント非存在下で誘導されることから、ワクチンの安全性を考慮に入れる時、アジュバントを必要としないワクチン構成を確立することが必要であると考えられた。

E. 結論

今年度はリポソーム結合ペプチドワクチンの実用化に向け、製造法の確立を目的とした検討を行った。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.

2. 学会発表

- 1) 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.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許出願

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

表 1 : ペプチド抗原と DSS 誘導リポソームとの反応時間と結合効率との相関

Peptide	Sample No.	R.T. (hour)	4□ (days)	理論値	計算値	回収率
PB1	1	2		57	27.2	47.6
	2	4		57	23.1	40.5
	3	6		57	28.5	50.0
	4	6	1	57	15.5	27.1
	5	6	2	57	15.9	28.0
	6	6	3	57	20	35.1
PB2	7	2		57	8.42	14.8
	8	4		57	14.6	25.6
	9	6		57	23.6	41.4
	10	6	1	57	20.2	35.4
	11	6	2	57	38.2	67.1
	12	6	3	57	27.5	48.3

($\mu\text{g/ml}$) ($\mu\text{g/ml}$)

表 2 : 結合に使用するペプチド量とリポソーム結合効率との相関

A: Peptide derived from Influenza PB1

ペプチド量 (mg/coupling)	ペプチド濃度			回収率
	計算値		理論値	
	nmol/mL	mg/mL	mg/mL	%
5	48.3	0.0465	0.83	5.6
1	27.6	0.0266	0.16	16.6
0.5	7.84	0.00755	0.08	9.4
0.1	1.80	0.00173	0.016	10.8

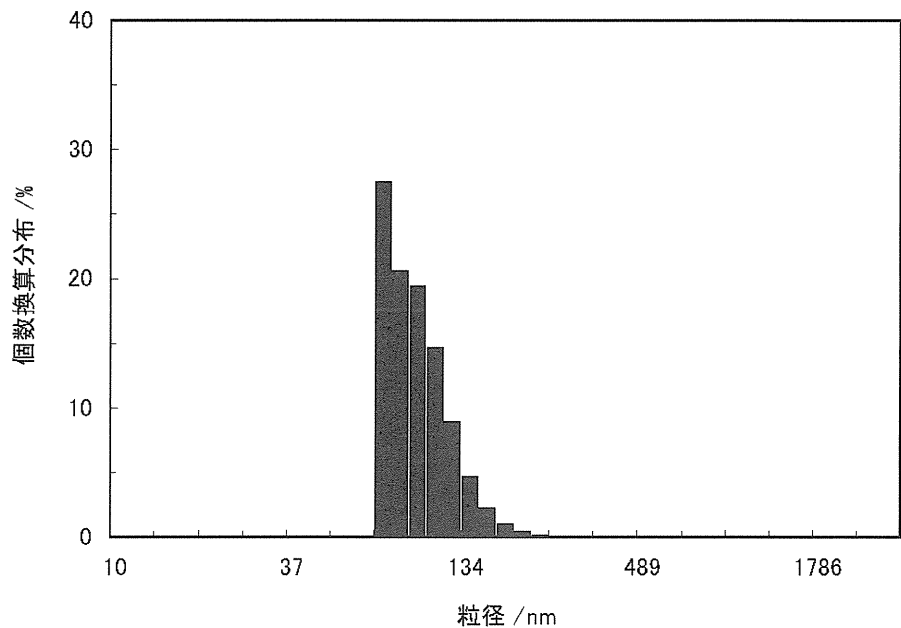
B: Peptide derived from Influenza PB2

ペプチド量 (mg/coupling)	ペプチド濃度			回収率
	計算値		理論値	
	nmol/mL	mg/mL	mg/mL	%
5	81.4	0.104	0.83	12.5
1	50.8	0.0650	0.16	40.6
0.5	24.7	0.0316	0.08	39.5
0.1	3.76	0.00481	0.016	30.1

表 3 : ペプチド結合前後のリポソームにおける粒径分布

試料名	重量平均粒径 d_w/nm	数平均粒径 d_N/nm	多分散指数 d_w/d_N
#0	118	92	1.3
#1	127	103	1.2
#2	119	100	1.2

・ 試料 #0 (結合前)



・ 試料 #2 (結合後)

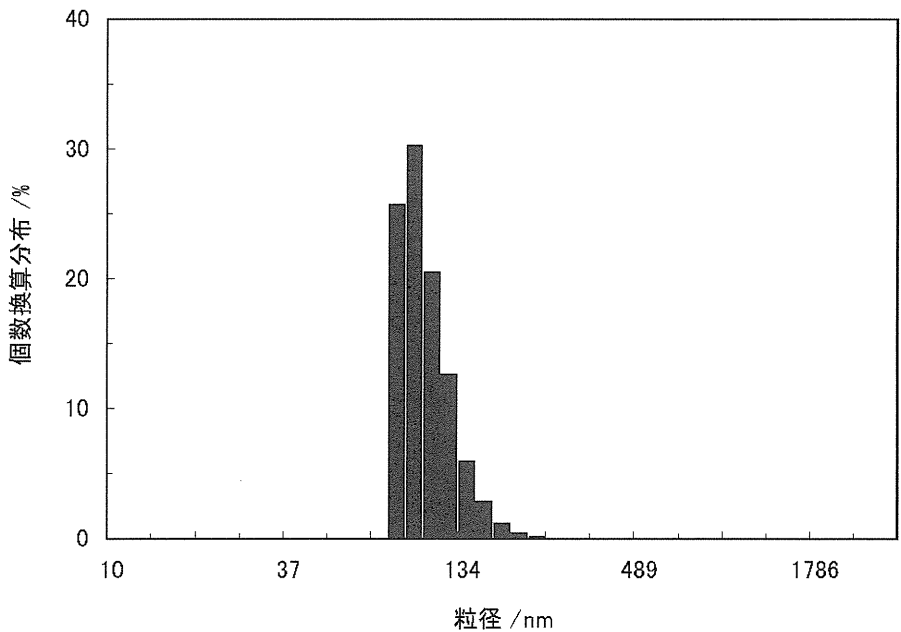
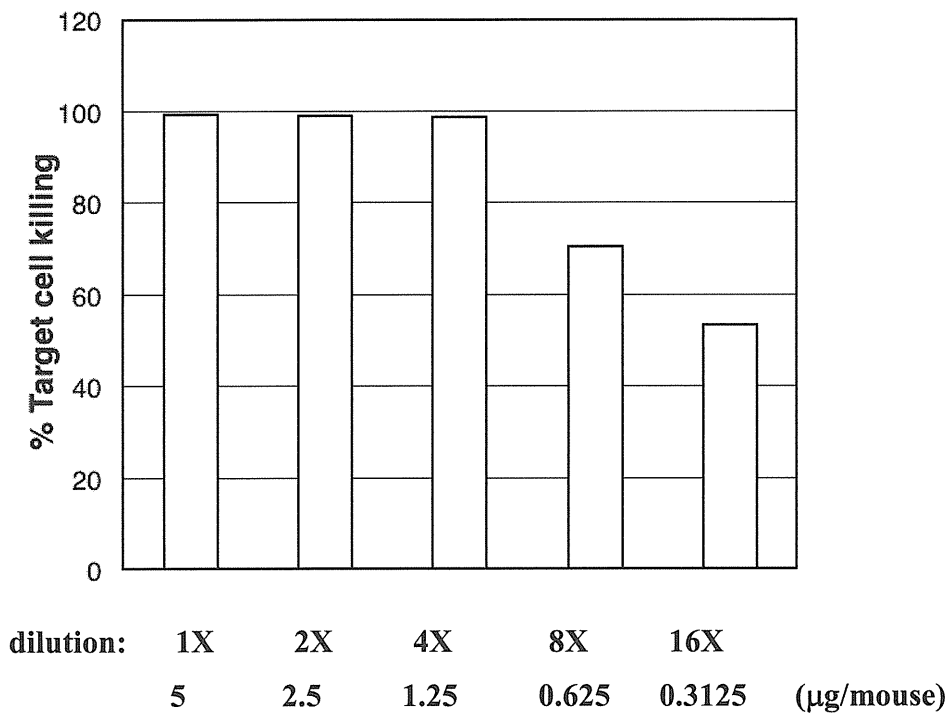


表 4 : ペプチド結合前後のリポソームにおけるゼータ電位

試料名	測定 No.	ゼータ電位 /mV	
		実測値	平均値
#0	1-1	-67.6	-67.3
	1-2	-68.8	
	1-3	-68.7	
	1-4	-65.0	
	1-5	-66.4	
	2-1	-68.2	-68.0
	2-2	-68.1	
	2-3	-68.1	
	2-4	-67.4	
	2-5	-68.3	
平均値	---	-67.7	
#1	1-1	-66.3	-66.7
	1-2	-66.0	
	1-3	-67.2	
	1-4	-66.6	
	1-5	-67.3	
	2-1	-68.3	-68.0
	2-2	-67.8	
	2-3	-69.2	
	2-4	-65.9	
	2-5	-68.7	
平均値	---	-67.4	
#2	1-1	-70.5	-69.8
	1-2	-69.0	
	1-3	-69.6	
	1-4	-69.6	
	1-5	-70.3	
	2-1	-67.8	-68.5
	2-2	-68.1	
	2-3	-68.0	
	2-4	-70.3	
	2-5	-68.2	
平均値	---	-69.2	

図 1：リポソームワクチンに添加するアジュバントの量と免疫誘導



厚生労働省科学研究補助金（医療技術実用化総合研究事業）
分担研究報告書

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

研究概要：近年、先進国を中心にアレルギー・アトピー性疾患が増加しており、これら疾患では恒常的に免疫反応が Th2 優位となっている。また、アレルギー・アトピー性疾患罹患患者ではインフルエンザワクチンの効果が減弱しているという報告もある。本研究では Th を制御するインターロイキン 4 (IL-4) に注目し、IL-4 と IL-4 レセプター結合部位に変異を起こしたアンタゴニスト (IL-4DM) の DNA ワクチンを用いて、Th1 および Th2 に非特異的に誘導したときのインフルエンザウイルスの感染病態について検討した。Th1 反応を誘導する IL-4DM 投与群ではコントロール群と比較し、有意な生存率の増加が認められ、Th2 反応が誘導される IL-4WT 投与群では生存率が低下した。液性免疫反応を検討したところ、IL-4DM 投与群ではインフルエンザウイルス特異的に Th1 タイプの IgG2a が誘導されており、IL-4WT 投与群では IgM と Th2 タイプの IgG1 が誘導されていた。細胞性免疫反応では IL-4DM 投与により、ウイルス特異的な細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 活性が優位に増加していた。また、HNBE を用いた *in vitro* での実験では、IL-4 存在下でインフルエンザウイルスを感染させたところ、IL-8 および eotaxin の誘導が認められた。本研究では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。以上のことから、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。

A. 研究目的

感染症制御においてヘルパーT細胞(Th)の機能は重要であり、Th反応制御は病態に大きく関わっている。近年、先進国を中心にアレルギー・アトピー性疾患が増加しており、これら疾患では恒常的に免疫反応がTh2優位となっている。本研究ではThを制御するインターロイキン4(IL-4)に注目し、IL-4とIL-4レセプター結合部位に変異を起こしたアンタゴニスト(IL-4DM)のDNAワクチンを用いて、Th1およびTh2に非特異的に誘導したときのインフルエン

ザウイルスの感染病態について検討した。

【材料と方法】マウスIL-4(IL-4WT)またはマウスIL-4変異体Q116D/Y119D(IL-4アンタゴニスト:IL-4DM)をpcDNA3.1(+に組み込んだDNAワクチンを作製した。これらのDNAワクチンをBALB/cマウスに1週間隔で計3回腹腔内投与し、最終免疫の6時間後にInfluenza/A/PR/8/34(PR8)を経鼻感染させ、その後の生存率、液性免疫および細胞性免疫反応を測定した。また、正常なヒトの気道上皮細胞(NHBE)を用いて、インフルエンザウイルス感染24時間

後にヒト IL-4 を反応させ、細胞上清中の IL-8 および eotaxin を測定した。

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 μ 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 ^{51}Cr 遊離法にて測定した。

5. アレルギー炎症の検討

肺胞においてギムザ染色により好酸球の浸潤を検討し、FACS により浸潤細胞を比較検討した。

6. 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。

7. 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. 組織学的解析

感染マウスの肺をギムザ染色にて観察したところ、IL-4 投与マウスでは好酸球の浸潤が著明であった。(Fig. 6)

7. アレルギー反応の検討

インフルエンザウイルスをヒト肺胞上皮細胞を用いて検討したところ、RNATES 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)。これらの反応は RIG-I 依存的であった。

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。本研究では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ることが示された。また、NHBE においてインフルエンザ感染時に IL-4 が存在している場合には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。以上のことから、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。

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. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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 fascicularis*). Am.J.Trop.Med.Hyg. in press
- 4) 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 TRIMCyp in *Cynomolgus* Macaque (*Macaca fascicularis*) J.Gen.Virol. in press
- 5) Matsuo, K. and Yasutomi, Y. Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guérin as a vaccine vector for global infectious disease control. Tuberculosis Res. Treat. 2011 Epub
- 6) 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-I gene therapy model. PloS One 2011; 6: Epub

- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.

2. 学会発表

「国内」

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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

- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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

「国際」

- 1) 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 TRIM5α genotypes. *Non-Human Primate model for AIDS* Oct. 25-28, 2011, Seattle, WA.
- 2) 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*

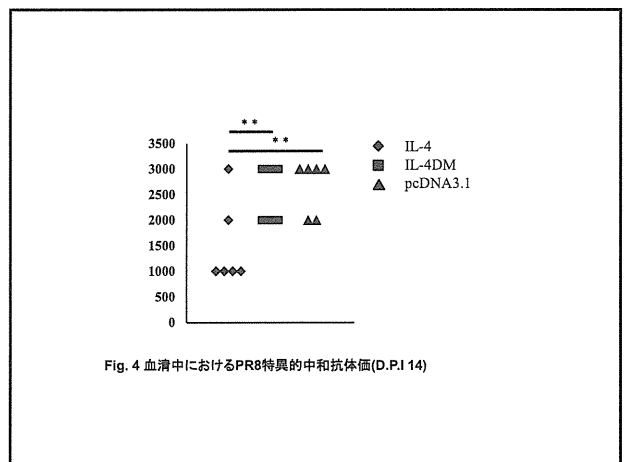
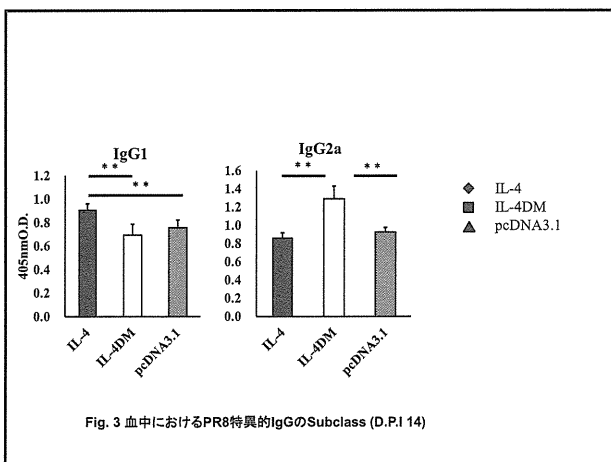
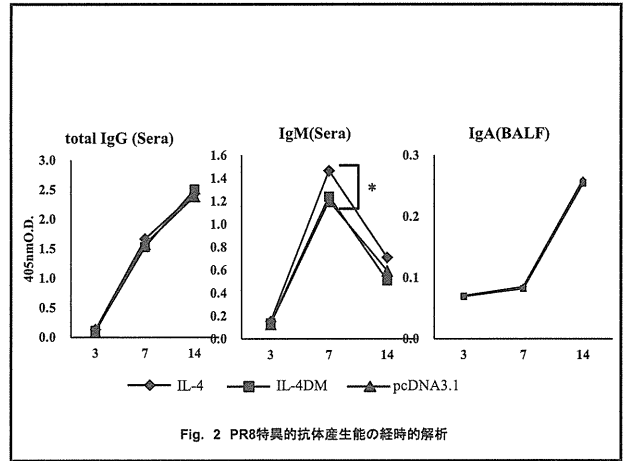
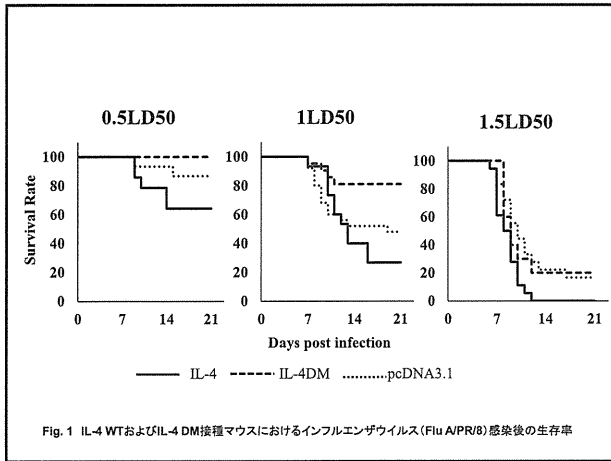
of Microbiological Societies 2011Sep. 11-17,
2011, Sapporo.

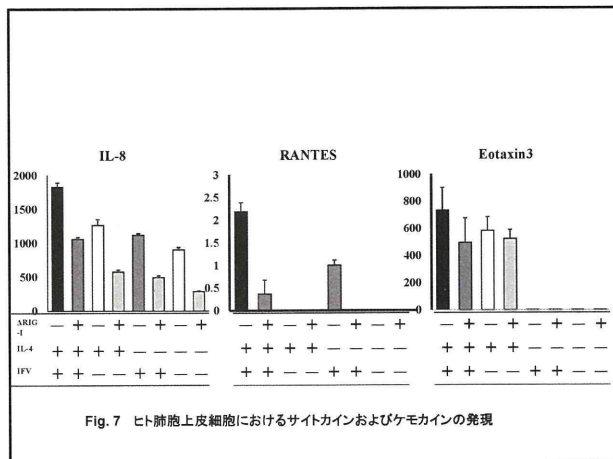
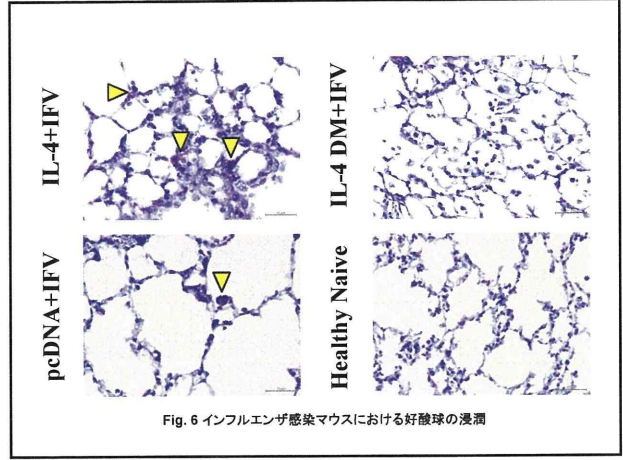
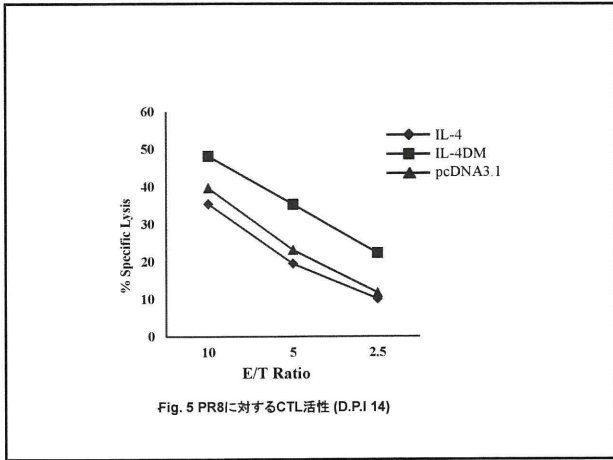
- 3)Tomotaka OKAMURA, Yuya SHIMIZU,
Kazuhiro MATSUO, Yasuhiro YASUTOMI:
Adjuvant molecule Ag85B cDNA
insertion into live attenuated simian-human
immunodeficiency virus enhances the SHIV-
specific immune responses in Cynomolgous
monkeys. Interantional Union of Microbiological
Societies 2011Sep. 11-17,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

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を
含む)

特許出願

- 1)遺伝子導入用ウイルスベクターの製造方
法(特願 2011-025234)
- 2)新規な組換え BCG ワクチン(特願
2011-199422)





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）

（分担）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

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

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:昨年度我々は、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細胞に継代を行い、すべ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。今回我々はそのうち A/duck/Hokkaido/Vac-3/2007 株 (H5N1) について MDCK 細胞での継代によるウイルス遺伝子の変異の有無と、馴化株から作製した不活化全粒子ワクチンの経鼻接種による抗ウイルス防御効果について検討を行った。MDCK 細胞での継代により増殖能が増強された馴化株は、馴化前と比べて PB2 の 3 か所、PA の 1 か所のアミノ酸に変異があることを明らかにした。次に A/duck/Hokkaido/Vac-3/2007 株をホルマリン処理することにより不活化全粒子ワクチンを作製した。そのワクチンをマウスに 2 回経鼻接種したところ、1 μ g/回以上の接種により、高病原性鳥インフルエンザウイルス株 A/HongKong/483/97 株 (H5N1) に対する感染防御効果が認められた。以上の結果は、我々が進めているインフルエンザライブラリーを用いた次世代ワクチンの作製方法並びに接種方法が抗ウイルス防御効果を示すことを強く示唆するものである。

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について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