

20114017B

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21年度～平成23年度 総合研究報告書

研究代表者 山西 弘一

平成24(2012)年3月

# 目 次

## I. 総合研究報告書

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. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 43

【参考資料】 ..... 67

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

研究代表者： 山西弘一（独立行政法人医薬基盤研究所・理事長兼研究所長）

【研究要旨】：2009年4月に発発生した新たなウイルス株によるインフルエンザ A (H1N1) が当初想定されていた H5N1 の型とは異なったように、今後とも新たに発生するインフルエンザの型を予め予測することは困難である。そのため、将来どのようなインフルエンザが出現しても直ちに対応できる次世代ワクチンを開発することは、極めて重要な国家的課題である。

本研究は、「次世代・感染症ワクチン・イノベーションプロジェクト」は「次世代高付加価値型ワクチン」をコンセプトに平成20年度スーパー特区に採択され、その研究計画で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の開発を提案した。

そこで我々は、世界で初めて整備されたインフルエンザ A ウイルスの全種類のライブラリーを利用した種ウイルスの保存方法ならび、それらの種ウイルスを利用したワクチン作製、接種方法を確立し、将来どのようなインフルエンザが出現しても直ちに対応できる次世代ワクチンの作成を目指し、以下の知見及び情報を得た。

- ① 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。本研究の3年間で、数多くのインフルエンザ A ウイルスを分離同定し、ウイルス株ライブラリーに保存した。また、抗原性解析などにより適切なワクチン株を選抜し、ワクチンの力価試験を行う実験系を構築した。（喜田）
- ② インフルエンザの流行を制御するため、効率的にインフルエンザワクチンを製造するシステムの確立が必要である。そのため、培養細胞（Vero 細胞）で効率よく増殖するワクチンシードウイルスを作製するための基盤研究を実施し、HA の 1 アミノ酸の変異により増殖能が高くなることを明らかにした。また、経鼻投与ワクチンのアジュバントとして、ナノエマルジョンがアジュバントとして、有効であることが明らかとなった。（河岡）

- ③ インフルエンザウイルスに対する液性免疫と細胞性免疫を同時に誘導することのできるワクチンの創製を目標として、インフルエンザウイルス (A/Uruguay/2007 (H3N2)) 由来の HA タンパク、および、インフルエンザウイルス Matrix Protein (M1) 由来の HLA-A2 拘束性 CTL エピトープペプチドを同一リポソームの表面に化学結合したワクチンを作製し、HLA-A2 トランスジェニックマウスに免疫したところ、HA タンパクに特異的な IgG 抗体の産生と CTL エピトープペプチドに特異的な CTL が誘導された。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。（内田）
- ④ 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、より良い粘膜免疫応答を誘導することを目的とし、粘膜アジュバントとして、合成二本鎖 RNA に酵母細胞壁成分 Zymosan を併用した場合、Toll 様受容体 7 (TLR7) のアゴニストについて効果を検討した。また経鼻インフルエンザワクチンでは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。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。（長谷川）
- ⑤ 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 が重要であることが示された。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。（安富）

- ⑥ 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。経鼻接種による感染防御効果について検討した。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。(岡本)
- ⑦ 経鼻ワクチンで侵入したウイルス粒子が神経細胞である、嗅上皮細胞に取り込まれるのか、また周辺の神経系に影響するのかを形態学的に解析し、挿入した不活化全粒子が、実際に、上皮に取り込まれ、どのような経路で処理されるのか形態学的に検討した。(内山)

#### 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)
- 内山安男 (順天堂大学大学院・医学研究科・教授)

#### A. 研究目的

2009年4月に発生した新型インフルエンザ(インフルエンザA(H1N1))は、日本を含む世界各地で流行・感染が拡大し、WHOも6月には警戒レベルをフェーズ6(世界的大流行)に引き上げるなど、社会に多大な影響を与えている。今回のインフルエンザA(H1N1)は当初想定されていたH5N1の型とは異なったように、今後とも新たに発生するインフルエンザの型を予め予測することは困難である。そのため、将来どの

ようなインフルエンザが出現しても直ちに  
対応できる次世代ワクチンを開発することは、極めて重要な国家的な課題である。

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

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

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

## B. 研究方法

### B-1

日本、モンゴル、ベトナム、香港において採取した渡りガモ、ハクチョウおよび家禽の糞便およびぬぐい液からウイルス分離を試みた。分離されたウイルスは、そのHAおよびNAの亜型を同定し、系統保存ウイルス株に追加した。

2009年は、分離したH1亜型ウイルスに加え、北海道大学大学院・獣医学研究科微生物学教室で系統保存している42株のH1亜型ウイルスのHA遺伝子の塩基配列を決定し、分子系統解析を行った。さらにH1ウイルスに対する様々な免疫血清を用いて赤血球凝集阻止試験を行い、豚由来H1N1亜型ウイルスの抗原性と似たウイルス株を選抜した。また、これらのウイルスを発育鶏卵に接種し、鶏胚における増殖性と病原性を比較した。得られた成績からワクチン候補

株を選抜し、このウイルスをもとに不活化全粒子ワクチンを試製した。試製ワクチンをマウスに接種した後、A/Narita/1/2009 (H1N1) pdm で攻撃し、体重変化と肺から回収されるウイルス感染価を指標にワクチンの発症防御効果を評価した。

2010年は、近年分離されたH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスの抗原性を過去に分離されたウイルスのそれとHI試験により比較した。また、同様にウイルスライブラリーに保存されているH9ウイルスの抗原性をHI試験により評価した。

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

2011年は、同年に分離された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。

B-2

a) ワクチンシードウイルスの開発

PR8(UW)株を12回継代することにより、Vero細胞に馴化させた。馴化ウイルス(PR8-Vero)の遺伝子変化を親株と比較し、リバーシジェネティクスで変異ウイルスを作製することにより、増殖性を決定する蛋白質をアミノ酸レベルで同定し、その分子機構を解析した。

b) 経鼻投与ワクチンのアジュバントの検討

ホルマリンで不活化したA/Vietnam/VN1203/04(H5N1)ウイルス( $5 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^7$ PFU)をヘモゾインと混合し、50 $\mu$ lに調整した後、4週齢のBALB/cマウスに経鼻投与した。コントロールとして、不活化ウイルスのみの経鼻投与、Alumアジュバントを用いた筋肉内投与、ウイルスのみの筋肉内投与を行ない、初回免疫後14日目に、ブースト投与した。肺胞洗浄液、鼻腔ぬぐい液、血液を採取した後、初回免疫後28日目に100MLD<sub>50</sub>のA/Vietnam/VN1203/04で攻撃し、生死、体重変化、肺のウイルス量などを観察した。

$\beta$ -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 $\cdot$  $\cdot$ 1)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の経鼻投与を行った。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。

B-3

材料と方法：

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。

2009年は、IgA抗体の粘膜上への移行が起こらないpoly Ig receptor KO (pIgR KO)マウスも一群5匹で利用した。

2009年：

・ワクチン接種

A/Puerto Rico/8/34(A/PR8, H1N1)のスプリットワクチン(1 $\mu$ g)を用いた。アジュバントとして、合成二本鎖RNA Poly(I:C)(1、5、10 $\mu$ g)、酵母細胞壁分画 Zymosan(1、10、50、100 $\mu$ g)を単独あるいは組み合わせで用いた。一回のワクチン接種において、マウス1匹あたり片鼻5 $\mu$ l(計10 $\mu$ l)を経鼻的に接種した。一回目のワクチン接種から3週後に、二回目のワクチン接種を行った。

・ウイルス感染

二回目のワクチン接種から、2週後にA/PR8のウイルス感染を行った。1000 pfuのA/PR8を片鼻2 $\mu$ l(計4 $\mu$ l)で感染をおこなう上気道感染モデルと、同量のウイル

スを片鼻 20  $\mu$ l で肺へ接種する致死性肺炎モデル (1000 pfu = 40 LD<sub>50</sub>) の二つの感染実験を行った。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、致死性肺炎モデルにおいては血清と肺洗浄液を回収した。また致死性肺炎モデルにおいては、観察を継続する群を用意し、体重変化と生存率をモニターした。

・血清および鼻腔・肺洗浄液中の抗体応答の検討

精製した A/PR8 ウイルスのヘマグルチニン (HA) を固相化した ELISA にて、HA 特異的な血清中 IgG 抗体、鼻腔洗浄液中の IgA 抗体を定量した。標準物質として、濃度既知の抗 A/PR8 HA 特異的モノクローナル IgG 抗体と、HA 特異的ポリクローナル IgA 抗体を利用した。

・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・肺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あるいは肺洗浄液を 200  $\mu$ l 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。

・血清中の中和抗体価と赤血球凝集反応阻止抗体価 (HI 抗体価) の測定

中和抗体価は、上記のプラークアッセイ法をもとに測定した。段階的に希釈した血

清と A/PR8 ウイルスを混合し、MDCK 細胞に添加し、プラークアッセイを行った。この時、形成されるプラーク数を 50% 以下に抑えることのできる血清の最大希釈倍率の逆数を中和抗体価とした。

HI 抗体価の測定は、通常の赤血球凝集反応阻止試験により求めた。RDE 処理を行った段階希釈血清と 8HA 価のニワトリ赤血球を反応させ、1 時間後に赤血球の凝集反応阻止がみられた血清の最大希釈倍率の逆数を HI 抗体価とした。

2010 年 :

・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  $\mu$ g を BALB/c マウス 1 匹あたり片鼻 2  $\mu$ l (計 4  $\mu$ l) 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  $\mu$ g) 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  $\mu$ l (計 4  $\mu$ l) 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  $\mu$ l 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。

2011年:

・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。

・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  $\mu$ g、Poly(I:C) あるいは CompA を 10、1、あるいは 0.1  $\mu$ g を添加し、PBS により 12  $\mu$ l としたワクチン溶液を片鼻 6  $\mu$ l 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  $\mu$ g に対して CompA 10、1、0.1  $\mu$ g 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  $\mu$ l ずつ、計 1,000 pfu/4  $\mu$ l)。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。

・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。

B-4

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ウイルス (A/Uruguay/2007 (H3N2)) 由来 HA タンパク、および、インフルエンザ

ウイルス Matrix Protein (M1)由来、HLA-A2 拘束性 CTL エピトープペプチドを架橋剤 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)

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 の必要最小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。

B-5

・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。

・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。

・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。

・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。

・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。

・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。

・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。

B-6

・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SVワクチンおよびWV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, /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。

・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17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1ml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。さらにA/duck/Hokkaido/Vac-3/2007株(H5N1)についてMDCK細胞馴化前後の各クローンを採取し、それぞれ遺伝子解析を行い、馴化前後のアミノ酸置換の有無を検討した。

・A/duck/Hokkaido/Vac-3/2007株のMDCK細胞馴化株を用いた不活化全粒子ワクチンの作製

A/duck/Hokkaido/Vac-3/2007株(H5N1)のMDCK細胞馴化株をMDCK細胞中に培養することにより10<sup>11</sup> pfuまで増殖させ、スクロース比重遠心法により精製を行った。精製された

ウイルスに最終濃度 1mg/ml になるように 0.02%ホルマリン含有 PBS を添加し、4℃下で 28 日間静置し、ウイルス粒子を固定させた。その後、透析にて固定液を PBS に置換させたものを WV ワクチンとして用いた。なお、28 日間のホルマリン固定によりウイルスの MDCK 細胞への感染は認められないことを確認した。

#### ・マウスへの免疫

BALB/c マウス (6 週齢、雌) にインフルエンザ WV ワクチンないしインフルエンザ 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。

#### ・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。

#### ・ワクチン免疫マウスにおけるウイルス攻撃試験

上述のワクチンの経鼻接種方法により免疫を行ったマウスについて、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させ、感染後のマウスの体重および生存率の変化を観察した。

## C. 研究結果

### C-1

2009 年 :

野鳥と家禽の糞便および気管ぬぐい液 4,674 検体から 82 株のインフルエンザウイルスを分離同定した。これらのウイルスの HA 亜型は H1、H3、H4、H5、H6、H8、H9、H11 および H12 の 9 つに、NA 亜型は N1、N2、N3、N4、N5、N6、N8 および N9 の 8 つに区分された。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 65 通りのウイルスに、79 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。

H1 亜型インフルエンザウイルスは、ヒトの季節性インフルエンザウイルス、野生水禽由来の鳥インフルエンザウイルス、豚インフルエンザウイルスの 3 系統に分類される。2009 年に出現した H1N1 パンデミックインフルエンザウイルスは豚インフルエンザウイルスと遺伝的、抗原的に近縁であることがわかっている。そこで、当研究室に保管されている H1N1 亜型のインフルエンザウイルス 42 株から、H1N1 パンデミックインフルエンザウイルスと抗原的に近縁で、鶏胚で高い増殖性を示す A/swine/Hokkaido/2/1981 (H1N1) をワクチン候補株として選抜した。このウイルス株から不活化全粒子ワクチンを試製し、マウスに免疫した。その後

A/Narita/1/2009 (H1N1) pdm で攻撃したところ、 $2.0\mu\text{g}$  以上のタンパク量で免疫したマウスでは、攻撃ウイルスによる体重減少や肺におけるウイルス増殖が有意に抑制され、ワクチンの発症防御効果が確認された。以上の成績から、A/swine/Hokkaido/2/1981 (H1N1) 株を用いて試製した不活化全粒子ワクチンはH1N1 パンデミックインフルエンザのワクチン製造株として有用であることが明らかとなった。

2010年：

家禽と野鳥の気管ぬぐい液および糞便5,642検体から合計85株のインフルエンザウイルスを分離同定した。これらのウイルスのHA亜型はH1からH10の10の亜型に、NA亜型はN1、N2、N3、N4、N6、N7、N8、N9の8つの亜型に区分された。分離されたウイルスにはH5N1亜型のウイルスも含まれており、モンゴル、香港、日本の野鳥から分離されたウイルスは高病原性鳥インフルエンザウイルスであった。これらの分離ウイルスは当研究室のウイルス株ライブラリー (<http://virusdb.czc.hokudai.ac.jp/>) に追加保存された。これにより、自然界から分離された68通りのウイルスに、76通りの実験室内作出株を加え、16のHA亜型と9のNA亜型の組み合わせ144通りすべてをライブラリーに系統保存した。

近年東アジア地域で分離されたH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスは、遺伝子型でクレード2.3.2に分類される株が多かった。このクレード2.3.2のウイルスの

抗原性を1996年香港で初めて出現したH5N1ウイルスのそれとHI試験で比較したところ、両株には大きな抗原性の差があることがわかった。また、中国で流行している別の遺伝子型(クレード2.3.4)のウイルスの抗原性を同様に評価したところ、このウイルスも1996年香港で初めて出現したH5N1ウイルスと大きな抗原性の差があることがわかった。さらに、クレード2.3.2と2.3.4のウイルスの間にも大きな抗原性の差があることがわかった。

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

H5ウイルスとH9ウイルスの抗原性解析の結果から、各血清型を代表するウイルス株を選抜し、マウスに対する病原性を比較した。その結果、抗原変異株であるA/whooper swan/Hokkaido/4/2011 (H5N1) (クレード2.3.2)とA/peregrine falcon/Hong Kong/810/09 (H5N1) (クレード2.3.4)はともにマウスに対して致死的な病原性を示した。また、H9ウイルスの中ではヒトからの分離例が多いG1グループに属するA/Hong Kong/1073/1999 (H9N2)がマウスに対して致死的な病原性を示すことがわかった。以上

の結果から、今後 H5 および H9 亜型の試製ワクチンの効果を評価する際に、これらのウイルス株を攻撃株として試験を行い、全粒子ワクチンの高い免疫原性を証明することができる。

2011 年：

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。

## C-2

### a) ワクチンシードウイルスの開発

PR8(UW)はVero細胞で、 $10^3$  PFU/ml程度しか増殖しなかったのに対して、PR8-Veroは $10^8$  PFU/ml以上まで増殖した。PR8-Veroのアミノ酸配列をPR8(UW)と比較したところ、HA、NA、PB2のそれぞれ一か所ずつが異なっていた。1アミノ酸置換の変異ウイルスを作製した結果、主にHAの1アミノ酸の変異が高増殖性に関与することが分かった。このHAのアミノ酸置換はHA2領域に存在する。そこで、野生型HAと変異HAをそれぞれVero細胞で発現させ、それらの細胞融合能を比較した。その結果、変異HAは野生型HAに比べ、より中性に近いpHで細胞融合能を発現することがわかった。

### b) 経鼻投与ワクチンのアジュバントの検討

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

$5 \times 10^6$  PFUの不活化ウイルスのみ（アジュバントなし）を免疫原として経鼻投与したマウスは、致死量のH5N1ウイルスによる攻撃後、9日目まで全て死亡したが、同量の不活

化ウイルスをヘモジンアジュバントを用いて投与したマウスでは、60%が生残した。しかし、ヘモジンアジュバントによる肺でのウイルス増殖抑制は認められなかった。

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、 $5 \times 10^5$  PFUの不活化ウイルスのみの投与では、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ジ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。

## C-3

2009年：

経鼻噴霧型インフルエンザワクチンにおける粘膜アジュバントとして、合成二本鎖RNA Poly(I:C)に対する酵母細胞壁成分 Zymosan の添加による粘膜免疫応答の増強

効果を検討した。Poly(I:C) (1、5、10  $\mu$ g)、Zymosan (1、10、50、100  $\mu$ g)を単独あるいは組み合わせ、A/PR8 ワクチンと共に二回経鼻的に接種した。A/PR8 ウイルス感染の3日目に血清および鼻腔洗浄液を回収し、A/PR8 HA 特異的な抗体応答を測定した (図-3)。これまでの結果により、粘膜アジュバントとして Poly(I:C) 単独での利用の場合は、10  $\mu$ g の利用で感染防御には十分な抗体応答を誘導することが示されている。これに対し Zymosan 単独では、50  $\mu$ g を粘膜アジュバントとして利用した場合に、鼻腔洗浄液中において有効なレベルの A/PR8 HA 特異的 IgA 抗体応答がみられた (図-3)。しかし、単独では有効な抗体応答を誘導できない Poly(I:C) 1 あるいは 5  $\mu$ g と、Zymosan 10  $\mu$ g を組み合わせた場合には、A/PR8 HA 特異的な鼻腔洗浄液中 IgA 抗体および血清中 IgG 抗体応答は、相乗的に増強されることが明らかになった (図 1)。この時、血清中における中和抗体価および HI 抗体価も相乗的に増強されることが明らかとなった (図-3)。

次に、A/PR8 ウイルスの上気道感染モデルと致死性肺炎モデルにおけるウイルス価を測定した (図-4)。図 1 に示した抗体応答と関連し、両感染モデルにおいて高い抗体応答を示した群でウイルス価が低く、粘膜アジュバントとして単独での使用で効果が不十分だった Poly(I:C) 1 あるいは 5  $\mu$ g と Zymosan 10  $\mu$ g の併用においてウイルスの増殖は全く認められなかった (図 2)。また、致死性肺炎モデルにおいては、この併用群

においては体重減少も見られず 100%の生存がみられた (図-5)。

2010年:

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



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 ウイルスに反応する血清中 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)。

2011年:

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  $\mu$ g をアジュバントとして使用した場合、Poly (I:C) 1  $\mu$ g 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  $\mu$ g に対して、CompA を 10、1 あるいは 0.1  $\mu$ g 添加した場合、Poly (I:C) 1  $\mu$ g に対して CompA 1  $\mu$ g 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-6)。

C-4

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りリポソームでマウスを免疫した後、4 週経過したマウス末梢血中の抗 HA IgG および IgE 抗体産生を図-7 に示す、免疫 2 週間後から顕著な抗 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した対照群 (HA-alum) で IgG とともに顕著な抗 HA IgE 抗体産生が観察されたのに対して、(HA + CTL エピトープペプチド) - リポソーム免疫群では IgG 産生は HA-alum 投与群と同程度であったのに対して 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-8 に示す。(HA + CTL エピトープペプチド) - リポソームで免疫することにより、顕著な抗原特異的 CTL の誘導が認められた。

C-5

・ 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 (図-9)。

#### ・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ていたが、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（図-10）。

#### ・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-4 DM投与群で優位に増加していた（図-11）。

#### ・インフルエンザワクチン投与における IgG サブクラスの検討

DNA ワクチン投与マウスにインフルエンザワクチンを投与し、抗体の産生を検討したところ、IL-4 および IL-4DM いずれの投与でもワクチン特異的総 IgG 量に優位さは認められなかったが、IgG1 では IL-4 投与群が、IgG2a では IL-4DM 投与群が優位に高い反応を示した。

#### ・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（図-12）。

#### ・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（図-13）。

#### ・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（図-15）。この反応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（図-16）

#### ・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。

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（図-16）。これらの反応は RIG-I 依存的であった。

#### C-6

#### 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  $10^6$  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、17代継代後ではH13株以外のすべての株について $10^8$  pfu/ml以上の高い増殖能を有するウイルスに変化した(図-16)。

## 2. 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(図17)。MDCK細胞での馴化によるウイルスのアミノ酸置換について検討を行った。その結果、PB2の145番目、472番目、632番目、さらにPAの319番目のアミノ酸が置換されていることを明らかにした。

## 3. 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])とも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-18)。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-18)。

## 4. 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-19)。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-18)。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-19)。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。

## 5. 試作用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

A/duck/Hokkaido/Vac-3/2007株を用いて試作用のホルマリン不活化WVワクチンを作

製した。そして、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 株を感染させた。そして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 (図-20)。

#### D. 考察

##### D-1

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。

##### D-2

###### a) ワクチンシードウイルスの開発

馴化ウイルスの解析から、HA の細胞融合性状の変化により、ウイルスの Vero 細胞での増殖性が上昇することが示唆された。

###### b) 経鼻投与ワクチンのアジュバントの検討

ヘモジ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。肺胞洗浄液と鼻腔ぬぐい液中の IgA 量の上昇は、ヘモジンアジュバントワクチンを経鼻投与したマウスのみで認められたことから、不活化 H5N1 ウイルスワクチンに対して、ヘモジンアジュバント効果を示すことが明らか

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

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、ナノエマルジョンアジュバント効果を示すことが明らかとなった。

##### D-3

2009年:

現行のインフルエンザ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由来 CTL エピトープペプチドを同時に結合したリポソームでマウスを免疫すると、HA に特異的な抗体の産生 (液性免疫) と CTL エピトープに特異的な CTL (細胞性免疫) の双方が同時に誘導されることが示された。インフルエンザウイルスに自然感染した際に宿主は液性免疫と細胞性免疫とによって感染防御を行っていると考えられており、2 種類の免疫応答を同時に誘導するワクチンは液性免疫のみを誘導する現行のワクチンと比較してより効率的に感染抵抗性を誘導することが期待されるだけでなく、ウイルス表面抗原の変異によって抗体によ