

る免疫応答の感染防御効果が限定的なものになった場合にも、同時に誘導された細胞性免疫が症状の緩和に貢献することが期待される。

2010年：

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

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

抗 HA 抗体が宿主の細胞へのインフルエンザウイルスの感染を防御し、CTL がウイルス感染細胞の排除に貢献すると考えられていることから、本研究における、抗体と CTL を同時に誘導するワクチンは高効率にインフルエンザウイルス感染防御を誘導することが期待される。

2011年：

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℃、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・g/mouseの1/4量で同等の効果が得られ、かつ1/16量にて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。

D-4

2009年：

合成二本鎖 RNA Poly(I:C)の粘膜アジュバント活性は、酵母細胞壁分画 Zymosan の

添加により著しく増強された。合成二本鎖 RNA および Zymosan は、共に自然免疫を活性化物質であり、その後誘導される適応免疫応答の活性化を促す。合成二本鎖 RNA Poly(I:C)は Toll 様レセプター3 (TLR3) からの活性化シグナルを、また Zymosan は C 型レクチンである Dectin-1 および TLR2 からのシグナルを同時に加えることが知られている。今回、粘膜アジュバントとして Poly(I:C)と Zymosan を組み合わせることでみられた A/PR8 HA 特異的な IgA および IgG 抗体の増強には、TLR3、TLR2 および Dectin-1 を介する三つのシグナルが自然免疫細胞の活性化に相乗的に働いていることが考えられる。

2010年：

本研究において、2009年にパンデミックを引き起こした新型インフルエンザウイルスの感染に対して、季節性インフルエンザワクチンの経鼻接種および皮下接種の予防効果の検討を行った。まず、2009/10 季節性インフルエンザワクチンに含まれる A/H1N1、A/H3N2 および B 型の単身スプリットワクチンを BALB/c マウスに経鼻接種し、どの亜型のワクチンが新型インフルエンザウイルスの感染抑制に効果を示すか検討した。感染に用いたマウス馴化新型インフルエンザウイルス A/Narita 株のウイルス価減少に寄与したワクチンは、A/Brisbane/59/07 (H1N1) と A/Uruguay/716/07 (H3N2) の 2 株であった。産生される抗体を比較したところ、A/Brisbane/59/07 (H1N1) と A/Uruguay/716/07 (H3N2) の経鼻接種両群においては、

ホルマリン不活化 A/Narita ウイルスに対する血清中 IgG 抗体と鼻腔洗浄液中 IgA 抗体の産生が認められた。また、組換え A/Narita HA に対する抗体は、A/Brisbane/59/07 (H1N1) ワクチンの経鼻接種群のみで検出できた。これらのことから、A/Brisbane/59/07 (H1N1) および A/Uruguay/716/07 (H3N2) ワクチンは、ウイルスの内部タンパクに対する抗体を誘導し、感染に用いた A/Narita ウイルスの増殖抑制に寄与していることが示唆され、主要防御抗原となる HA に対して反応する血清中 IgG および粘膜上 IgA 抗体は A/Brisbane/59/07 (H1N1) ワクチンの接種のみで誘導可能であることが示唆された (表 1)。

次に、A/Brisbane/59/07 (H1N1) ワクチンに関して皮下接種と経鼻接種の比較を BALB/c マウスおよび pIgR KO マウスを用いて検討した。この結果、気道粘膜上に A/Narita ウイルスに反応する分泌型 IgA 抗体の誘導はワクチンの経鼻接種により可能であった (表 2)。加えて、粘膜上への IgA 抗体の産生能を欠損した pIgR KO マウスでは、経鼻接種による感染ウイルスの増殖抑制効果を得ることはできなかった (表 3)。以上のことから、感染の場となる気道粘膜上でのウイルスの増殖抑制には分泌型 IgA 抗体が重要であり、かつ分泌型 IgA 抗体は皮下接種ではなく経鼻接種によってのみ誘導可能であることが示された。

2011年：

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いだし、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、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乗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 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。

D-5

現在、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報告されるようになった。インフルエンザワクチンにおいてもアレルギー・アトピー性疾患においてはワクチン効果が低いという報告がある。これらの事象を実験動物で検証した報告としてはサイトカインレセプターの KO マウスや、種々サイトカインの過剰発現により Th 反応を制御した報告があるが、いずれの報告においても実際にはありえない状態に生体を調節したものであり、このままヒト疾患のモデルとして考えることは困難である。また、Th 反応を明確に調節する IL-4 の投与はマウスにおいては致死的となる。本研究

における IL-4 および IL-4DM の DNA ワクチンは血中には検出できない量を持続的に分泌し、Th 反応を制御することが可能である。このことは遺伝子改変マウスやサイトカインやその抗体の投与に比較し、ヒトの臨床状態をよく反映していると考えられる。

本実験における Th 制御では Th1 により、インフルエンザウイルス感染抵抗性が増加し、Th2 により低下することは示された。このことはインフルエンザウイルス感染における抵抗性には細胞性免疫が重要であることを示している。さらにワクチン投与においても免疫反応は Th に制御されることからインフルエンザワクチンにおいても Th1 に誘導することが重要であると考えられ、今後その様な研究が必要と思われる。

感染症におけるアレルギー性疾患の誘導では RS ウイルス感染がよく知られている。RS ウイルスは細胞内レセプターを介し、自然免疫系を活性化し、その際にアレルギー性疾患を誘導する。このために RS ウイルス感染ではワクチン投与でアレルギー喘息を誘発し、病態を悪化させたことがよく知られている。本研究におけるインフルエンザウイルスでは RIG-I を介して自然免疫系を活性化させるということが知られており、その時に基礎疾患としてアレルギー・アトピー性疾患が存在すると呼吸器においてアレルギー性炎症が誘導される可能性が示唆された。本研究結果においても *in vivo*、*in vitro* の実験系においてそれを示す結果が得られた。インフルエンザウイルスでは NS

遺伝子により、RIG-I を介した反応が抑制されると考えられているが、本研究では RS ウイルスと比較すると軽度ではあるが、明らかなアレルギー性炎症の誘導が認められた。これらのことから、インフルエンザワクチンにおいてはアジュバント等の利用により Th2 反応を抑制するワクチンが必要であると考えられた。

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。

D-6

将来どのようなインフルエンザが出現しても直ちに対応できる次世代ワクチンを開

発するためには、ウイルスライブラリーを用いた次世代インフルエンザワクチン用の種ウイルスを作成、保存すると共に、確実なワクチン効果を有するために交叉防御効果を誘導するワクチン接種方法を確立する必要がある。そこで、我々はその可能性について検討を行った。その結果、ウイルスライブラリーに存在する株が MDCK 細胞に馴化することを明らかにすると共に、不活化全粒子ワクチンの経鼻接種は交叉防御効果を誘導することを見出した。さらに MDCK 細胞により馴化した H5N1 株由来の種ワクチン用ウイルスから不活化全粒子ワクチンを作成し、そのワクチン効果を検討したところ、H5N1 株の変異株に対する交叉防御効果を誘導することを明らかにした。

以上の結果は、全粒子ワクチンの経鼻接種が、将来新しいインフルエンザが出現した際に緊急に使用するワクチンの接種方法として、適当であることを示唆するものである。

E. 結論

E-1

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。

E-2

Vero 細胞で効率よく増殖するために必要なアミノ酸変異を同定した。この結果は、季節性ワクチンの創造効率向上に有用である。

また、ヘモゾインおよび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。

E-3

2009年:

合成二本鎖 RNA Poly(I:C)の粘膜アジュバント活性を増強する目的で、酵母細胞壁分画 Zymosan 添加による分泌型 IgA 抗体の産生に象徴される粘膜免疫応答の増強効果を検討した。Poly(I:C)と Zymosan を併用することで、分泌型 IgA の産生は相乗的に増強されウイルスの感染を完全に阻止することが示された。自然免疫系の細胞を活性化物質を組み合わせは、より効果の高い粘膜アジュバント活性になりうる可能性が見出された。

2010年:

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

体を誘導可能であることが改めて示され、流行するウイルス株の想定が困難であるパンデミックインフルエンザにおいて非常に有用なワクチンになりうると考えられる。

2011年：

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。

E-4

リポソーム表面にインフルエンザウイルス由来 HA タンパクおよび CTL エピトープを結合したワクチンは液性免疫と細胞性免疫を同時に誘導しうることが確かめられた。

E-5

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。

E-6

1. インフルエンザ全粒子ワクチンの経鼻接種により、アジュバントを併用すること

なく有効な交叉防御効果を示した。

2. インフルエンザライブラリーの株を用いて培養細胞で高い増殖能を有するワクチン用種ウイルスを得ることを確認した
3. WV ワクチン単独での経鼻接種は、SV ワクチンとアジュバントとの併用経鼻接種と同様の十分な交叉防御効果を示すことを明らかにした。
4. H5N1 型のトリインフルエンザウイルス株を MDCK 細胞に馴化させることによるウイルス増殖能の増強に PB1 および PA の 4 つのアミノ酸置換が関与することを明らかにした。
5. MDCK 細胞に馴化し高い増殖能を得た種ウイルスから作製した不活化全粒子ワクチンの経鼻接種は、高い抗ウイルス防御効果を誘導することを見出した。

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方法を作出するための研究の方向性が定まった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Okamoto, S., Matsuura, M., Akagi, T., Akashi, M., Tanimoto, T., Ishikawa, T., Takahashi, M., Yamanishi, K., Mori, Y. Poly (gamma-glutamic acid) nano-particles combined with mucosal influenza virus

- hemagglutinin vaccine protects against influenza virus infection in mice. *Vaccine* 27(42):5896-5905, 2009.
2. Itoh, Y., Ozaki, H., Ishigaki, H., Sakoda, Y., Nagata, T., Soda, K., Isoda N., Miyake, T., Ishida, H., Okamoto, K., Nakayama, M., Tsuchiya, H., Torii, R., Kida, H., and Ogasawara, K. (2010). Subcutaneous inoculation of a whole virus particle vaccine prepared from a non-pathogenic virus library induces protective immunity against H7N7 highly pathogenic avian influenza virus in cynomolgus macaques. *Vaccine* 28, 780-789.
 3. Itoh, Y., Shinya, K., Kiso, M., Watanabe, T., Sakoda, Y., Hatta, M., Muramoto, Y., Tamura, D., Sakai-Tagawa, Y., Noda, T., Sakabe, S., Imai, M., Hatta, Y., Watanabe, S., Li, C., Yamada, S., Fujii, K., Murakami, S., Imai, H., Kakugawa, S., Ito, M., Takano, R., Iwatsuki-Horimoto, K., Shimojima, M., Horimoto, T., Goto, H., Takahashi, K., Makino, A., Ishigaki, H., Nakayama, M., Okamatsu, M., Warshauer, D., Shult, P. A., Saito, R., Suzuki, H., Furuta, Y., Yamashita, M., Mitamura, K., Nakano, K., Nakamura, M., Brockman-Schneider, R., Mitamura, H., Yamazaki, M., Sugaya, N., Suresh, M., Ozawa, M., Neumann, G., Gern, J., Kida, H., Ogasawara, K., and Kawaoka, Y. (2009). In vitro and in vivo characterization of new sine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature* 460, 1021-1025.
 4. Kashima, Y., Ikeda, M., Itoh, Y., Sakoda, Y., Nagata, T., Miyake, T., Soda, K., Ozaki, H., Nakayama, M., Shibuya, H., Okamatsu, M., Ishigaki, H., Ishida, H., Sawai, T., Kawaoka, Y., Kida, H., and Ogasawara, K. (2009). Intranasal administration of alive non-pathogenic avian H5N1 influenza virus from a virus library confers protective immunity against H5N1 highly pathogenic avian influenza virus infection in mice: Comparison of formulations and administration routes of vaccines. *Vaccine* 27, 7402-7408.
 5. Manzoor, R., Sakoda, Y., Nomura, N., Tsuda, Y., Ozaki, H., Okamatsu, M., and Kida, H. (2009). PB2 protein of a highly pathogenic avian influenza virus strain A/chicken/Yamaguchi/7/2004 (H5N1) determines its replication potential in pigs. *J Virol* 83, 1572-1578.
 6. Miyake, T., Soda, K., Itoh, Y., Sakoda, Y., Ishigaki, H., Nagata, T., Ishida, H., Nakayama, M., Ozaki, H., Tsuchiya, H., Torii, R., Kida, H., and Ogasawara, K. (2009). Amelioration of pneumonia with *Streptococcus pneumoniae* infection by inoculation with a vaccine against highly pathogenic avian influenza virus in a non-human primate mixed infection model. *J Med Primatol* 39, 58-70.
 7. Moritoh, K., Yamauchi, H., Asano, A., Yoshii, K., Kariwa, H., Takashima, I., Isoda, N., Sakoda, Y., Kida, H., Sasaki, N.,

- and Agui, T. (2009). Generation of congenic mouse strains by introducing the virus-resistant genes, Mx1 and Oas1b, of feral mouse-derived inbred strain MSM/Ms into the common strain C57BL/6J. *Jpn J Vet Res* 57, 89-99.
8. Sasaki, T., Isoda, N., Soda, K., Sakamoto, R., Saijo, K., Hagiwara, J., Kokumai, N., Ohgitani, T., Imamura, T., Sawata, A., Lin, Z., Sakoda, Y., and Kida, H. (2009). Evaluation of the potency, optimal antigen level and lasting immunity of inactivated avian influenza vaccine prepared from H5N1 virus. *Jpn J Vet Res* 56, 189-198.
 9. Sasaki, T., Kokumai, N., Ohgitani, T., Sakamoto, R., Takikawa, N., Lin, Z., Okamatsu, M., Sakoda, Y., and Kida, H. (2009). Long lasting immunity in chickens induced by a single shot of influenza vaccine prepared from inactivated non-pathogenic H5N1 virus particles against challenge with a highly pathogenic avian influenza virus. *Vaccine* 27, 5174-5177.
 10. Simulundu, E., Mweene, A. S., Tomabeche, D., Hang'ombe, B. M., Ishii, A., Suzuki, Y., Nakamura, I., Sawa, H., Sugimoto, C., Ito, K., Kida, H., Saiwana, L., and Takada, A. (2009). Characterization of H3N6 avian influenza virus isolated from a wild white pelican in Zambia. *Arch Virol* 154, 1517-1522.
 11. Tsuda, Y., Isoda, N., Sakoda, Y., and Kida, H. (2009). Factors responsible for plaque formation of A/duck/Siberia/272/1998 (H13N6) influenza virus on MDCK cells. *Virus Res* 140, 194-198.
 12. Yoshida, R., Igarashi, M., Ozaki, H., Kishida, N., Tomabeche, D., Kida, H., Ito, K., and Takada, A. (2009). Cross-protective potential of a novel monoclonal antibody directed against antigenic site B of the hemagglutinin of influenza A viruses. *PLoS Pathog* 5, e1000350.
 13. Hasegawa H., Ichinohe T, Ainai A, Tamura S, Kurata T. Development of an inactivated mucosal vaccine for H5N1 influenza virus. *Ther Clin Risk Manag.* 5(1):125-132., 2009
 14. Takahashi Y, Hasegawa H., Hara Y, Ato M, Ninomiya A, Takagi H, Odagiri T, Sata T, Tashiro M, Kobayashi K. Protective immunity afforded by H5N1 (NIBRG-14)-inactivated vaccine requires both antibodies against hemagglutinin and neuraminidase in mice. *J Infect Dis.* 199(11):1629-1637, 2009.
 15. Ichinohe T, Ainai A, Tashiro M, Sata T, Hasegawa H. PolyI:polyC12U adjuvant-combined intranasal vaccine protects mice against highly pathogenic H5N1 influenza virus variants. *Vaccine* 27(45):6276-6279, 2009.

16. Ichinohe T, Aina A , Nakamura T , Akiyama Y, Maeyama J, Odagiri T , Tashiro M, Takahashi H, Sawa H, Tamura S, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H. Induction of cross-protective immunity against influenza A virus H5N1 by intranasal vaccine with extracts of mushroom mycelia. *J Med Virol*. 82:128-137, 2010.
17. Aina A, Ichinohe T, Tamura S, Kurata T, Sata T, Tashiro M and Hasegawa H. Zymosan enhances the mucosal adjuvant activity of Poly(I:C) in a nasal influenza vaccine. *J Med Virol*. 82(3):476-484, 2010.
18. Tamura S, Hasegawa H, Kurata T. Estimation of the effective doses of nasal-inactivated influenza vaccine in humans from mouse-model experiments. *Jpn J Infect Dis*. 63(1): 8-15, 2010.
19. Nakajima N, Hata S, Sato Y, Tobiume M, Katano H, Kaneko K, Nagata N, Kataoka M, Aina A, Hasegawa H, Tashiro M, Kuroda M, Odai T, Urasawa N, Ogino T, Hanaoka H, Watanabe M, Sata T. The First Autopsy Case of Pandemic Influenza (A/H1N1pdm) Virus Infection in Japan: Detection of a High Copy Number of the Virus in Type II Alveolar Epithelial Cells by Pathological and Virological Examination. *Jpn J Infect Dis*. 63(1):67-71, 2010.
20. Takiyama A, Wang L, Tanino M, Kimura T, Kawagishi N, Kunieda Y, Katano H, Nakajima N, Hasegawa H, Takagi T, Nishihara H, Sata T, Tanaka S. Sudden Death of a Patient with Pandemic Influenza (A/H1N1pdm) Virus Infection by Acute Respiratory Distress Syndrome. *Jpn J Infect Dis*. 63(1):72-74, 2010.
21. Ohno, S., S. Kohyama, M. Taneichi, O. Moriya, H. Hayashi, H. Oda, M. Mori, A. Kobayashi, T. Akatsuka, T. Uchida, and M. Matsui. Synthetic peptides coupled to the surface of liposomes effectively induce SARS coronavirus-specific cytotoxic T lymphocytes and viral clearance in HLA-A*0201 transgenic mice. *Vaccine* 27:3912-3920, 2009.
22. Kohyama, S., S. Ohno, T. Suda, M. Taneichi, S. Yokoyama, M. Mori, A. Kobayashi, H. Hayashi, T. Uchida, and M. Matsui. Efficient induction of cytotoxic T lymphocytes specific for severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus by immunization with surface-linked liposomal peptides derived from a non-structural polyprotein 1a. *Antiviral Res*. 84:168-177, 2009.
23. Matsui, M., S. Kohyama, T. Suda, S. Yokoyama, M. Mori, A. Kobayashi, M. Taneichi, and T. Uchida. A CTL-based liposomal vaccine capable of inducing protection against heterosubtypic influenza viruses in HLA-A*0201 transgenic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 391: 1494-1499, 2010.

24. Takagi, A., M. Matsui, S. Ohno, H. Duan, O. Moriya, N. Kobayashi, H. Oda, M. Mori, A. Kobayashi, M. Taneichi, T. Uchida, and T. Akatsuka. Highly efficient anti-viral CD8⁺ T cell induction by peptides coupled to the surface of liposomes. *Clin. Vaccine Immunol.* 16:1383-1392, 2009.
25. 内田哲也、種市麻衣子：「インフルエンザと抗原」*メディカル・サイエンス・ダイジェスト* 35, 566-567, 2009.
26. 「リポソームを用いた感染症ワクチンの開発」*DDS* 25, 29-36, 2010.
27. 「季節性及び新型インフルエンザに有効な CTL 誘導型リポソームワクチン」*ファルマシア* 46, 119-123, 2010.
28. 「新発想のインフルエンザワクチン：細胞性免疫誘導型インフルエンザワクチンの開発」*化学* 64, 26-29, 2010.
29. Mori, H., Yamanaka, K., Matsuo, K., Yasutomi, Y. and Mizutani, H. Administration of Ag85B showed therapeutic effects to Th2-type cytokine-mediated acute phase atopic dermatitis by inducing regulatory T cells. *Arch Dermatol.Res.* 301:151-157, 2009.
30. Okabayashi, S., Ohno, C. and Yasutomi, Y. Acute megakaryocytic leukemia (AMKL)-like disease in a Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *J.Comp.Pathol.* 140: 212-216, 2009.
31. Morioka, T., Yamanaka, K., Mori, H., Omoto, Y., Tokime, K., Kakeda, M., Kurokawa, I., Gabazza, E., Tsubura A., Yasutomi, Y. and Mizutani, H, IL-4/IL-13 antagonist DNA vaccination successfully suppresses Th2 type chronic dermatitis. *Br.J.Dermatol.* 160:1172-1179, 2009
32. Takano, J.I., Tachibana, H., Kato, M., Narita, T., Yanagi, T., Yasutomi, Y. and Fujimoto, K. DNA characterization of simian *Entamoeba histolytica*-like strains to differentiate them from *Entamoeba histolytica*. *Parasitol.Res.* 105:929-937, 2009.
33. Yasuhiro Yasutomi. Establishment of specific pathogen-free macaque colonies in Tsukuba Primate Research Center of Japan for AIDS research. *Vaccine* in press
34. Fujimoto, K., Takano, J., Narita, T., Hanari, K., Shimozawa, N., Sankai, T., Yoshida T., Terao, K., Kurata, T. and Yasutomi, Y. Simian Retrovirus type D infection in a colony of cynomolgus monkeys. *Comp.Med.* in press
35. Cueno, M. E., Karamatsu, K., Yasutomi, Y., Laurena, A. C. and Okamoto, T. Preferential expression and immunogenicity of HIV-1 Tat fusion protein expressed in tomato plant. *Transgenic Res.* in press

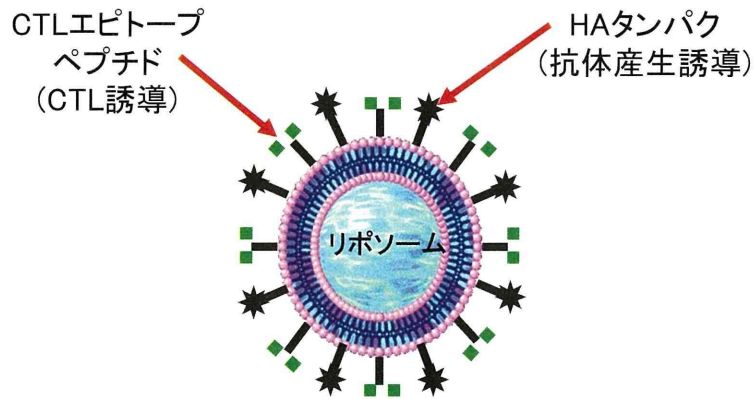
G-2. 学会発表

1. 野村直樹、迫田義博、岡松正敏、曾田公輔、喜田宏 「H9 インフルエンザウイルスワクチン候補株選抜のための遺伝子と抗原性解析」第 13 回日本ワクチン学会学術集会 (2009 年、札幌)
2. 山本直樹、遠藤真由美、迫田義博、喜田宏 「A/2009 (H1N1) インフルエンザウイルスに対するワクチン候補株の選抜」岡松正敏、第 57 回日本ウイルス学会学術集会 (2009 年、東京)
3. 山本直樹、佐々木崇、岡松正敏、迫田義博、林志鋒、坂元隆一、西條加須江、国米則秀、喜田宏 「不活化鳥インフルエンザ Vac-1 (H5N1) ワクチンは 2008 年に野鳥から分離された高病原性鳥インフルエンザウイルスによる鶏の感染発症を予防した」第 57 回日本ウイルス学会学術集会 (2009 年、東京)
4. 曾田公輔、浅倉真吾、岡松正敏、迫田義博、喜田宏 「H9N2 インフルエンザウイルスはニワトリに対する病原性を獲得するか？」第 57 回日本ウイルス学会学術集会 (2009 年、東京)
5. 野村直樹、迫田義博、岡松正敏、曾田公輔、喜田宏 「H9 インフルエンザウイルスワクチン候補株選抜のための遺伝子と抗原性解析」第 57 回日本ウイルス学会学術集会 (2009 年、東京)
6. 栗林沙弥、田中智久、迫田義博、坂部沙織、磯田典和、津田祥美、岡松正敏、梅村孝司、喜田宏 「H7 高病原性鳥インフルエンザウイルスのニワトリに対する病原性の解析」第 57 回日本ウイルス学会学術集会 (2009 年、東京)
7. 本島昌幸、岡松正敏、浅倉真吾、伊藤美加、前田友起子、福田奈穂、R. Sodnomdarjaa、迫田義博、喜田宏 「近年流行を起こしている H3N8 馬インフルエンザウイルスの遺伝子と抗原性の解析」第 43 回日本ウイルス学会北海道支部会シンポジウム (2009 年、帯広)
8. 村上晋、堀本泰介、桂廣亮、下島昌幸、河岡義裕 「Vero 細胞における高増殖性インフルエンザワクチンシードウイルス開発のための基盤研究」日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 26 日、東京
9. 相内章、一戸猛志、田村慎一、倉田毅、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 Zymosan 添加によるアジュバント活性の亢進」第 13 回日本ワクチン学会学術集会 2009 年 9 月札幌
10. 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の剤形と効果検討」 第 13 回日本ワクチン学会学術集会 2009 年 9 月札幌
11. 相内章、伊藤良、岸田典子、小淵正次、高下恵美、小田切孝人、千葉丈、田村慎一、倉田毅、佐多徹太郎、田代真人、長谷川秀樹 「経鼻インフルエンザワクチンの新型インフルエンザウイルスに対する交叉防御能の検討」 第 57 回日本ウイルス学会学術集会 2009 年 10 月東京
12. 岸田典子、小淵正次、高下恵美、徐紅、氏家誠、永田典代、岩田奈緒子、相内章、長谷川秀樹、田代真人、齋藤玲子、鈴木宏、池松秀之、小田切孝人 「季節性インフルエンザワクチンにより誘導される中和抗体の新型インフルエンザウイルスに対する交差反応性および新型インフルエンザウイルスの性状」 第 57 回日本ウイルス学会学術集会 2009 年 10 月東京
13. 長谷川秀樹、相内章、永田典代、岩田奈緒子、網康至、小淵正次、岸田典子、小田切孝人、佐多徹太郎、田代真人 「新型インフルエンザ H1N1 のフェレットにおける病原性の検討」 第 57 回日本ウイルス学会学術集会 2009 年 10 月東京
14. 高山俊輔、須田達也、種市麻衣子、赤塚俊隆、内田哲也、松井政則 「SARS コロナウイルスの polyprotein 1a 由来 HLA-A*0201 拘束性 CTL エピトープの同定と、そのペプチドを結合したリポソームによる細胞傷害性 T 細胞の誘導」 第 13 回日本ワクチン学会 札幌 2009 年 9 月
15. Efficient induction of SARS coronavirus-specific CTLs by immunization with surface-linked liposomal peptides derived from nucleocapsid and a non-structural polyprotein 1a. Shunsuke Kohyama, Tatsuya Suda, Maiko Taneichi, Tetsuya Uchida, and Masanori Matsui 第 39 回日本免疫学会 大阪 2009 年 12 月
16. 岡林佐知、大野智恵子、保富康宏 「実験用カニクイザルに認められた急性巨核芽球性白血病 (AMKL) の一例」 第 147 回日本獣医病理学会、栃木、2009 年 4 月 2 日～4 日
17. 岡林佐知、小野文子、羽成光二、大野智恵子、加藤美代子、保富康宏 「実験用カニクイザルに見られた下垂体腫瘍の一例」 第 56 回日本実験動物学会総会、埼玉県、2009 年 5 月 14 日
18. 松原明弘、高村史記、加藤翔太、保富康宏 「SIVmac239 Env gp120 アスパラギン (N) 結合型糖鎖の宿主免疫応答に対

- する影響」 第 57 回日本ウイルス学会、東京、2009 年 10 月 25 日～27 日
19. 松原明弘、高村史記、草川茂、武部豊、森一泰、永井美之、保富康宏「SIVmac239 Env gp120 アスパラギン結合型糖鎖の宿主免疫応答に対する影響」第 23 回日本エイズ学会、名古屋、2009 年 11 月 26 日～28 日
20. Yusuke TSUJIMURA, Yasuhiro YASUTOMI: Administration of Ag85B showed therapeutic effects to allergic asthma by inducing Th1 response and Interleukin-17 第 38 回日本免疫学会、大阪、2009 年 12 月 1 日～3 日
21. Nienke E. van Houten, Yasuhiro Yasutomi, and Masahiro Niikura: Protective Mucosal Immunity against a Model Viral Enteric Infection by a Generic Chimeric Hepatitis E Virus-like Particle Vaccine System. The American Society for Virology 28th Annual Meeting, Vancouver, 2009, July 11-15.
22. Yusuke TSUJIMURA, Yasuhiro YASUTOMI: Administration of Ag85B showed therapeutic effects to allergic asthma by inducing Th1 response and Interleukin-17. 9th International Conference on New trends in Immunosuppression & Immunotherapy 2010. February. 4-6.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 鳥インフルエンザワクチン (国際特許)
出願番号: PCT/JP2009/70053
出願日: 2009 年 11 月 27 日
発明者: 内田哲也、種市麻衣子 (国立感染研)、松井政則 (埼玉医大)、梶野喜一 (北海道大学)、小田洋 (日油)
2. SARS コロナウイルスの細胞傷害性 T 細胞エピトープペプチド及びその用途 (国際特許)
出願番号: PCT/JP2009/70043
出願日: 2009 年 11 月 27 日
内田哲也、種市麻衣子 (国立感染研)、松井政則 (埼玉医大)、小田洋 (日油)
3. 鳥インフルエンザウイルスワクチン (国内特許、追加出願)
出願日: 2009 年 12 月 21 日
発明者: 内田哲也、種市麻衣子 (国立感染研)、松井政則 (埼玉医大)、梶野喜一 (北海道大学)、小田洋 (日油)
4. 保富康宏: パラミクソウイルスベクターを用いた経鼻噴霧型結核ワクチン (特願 2009-252218)
5. 保富康宏: パラインフルエンザ 2 型ウイルスベクター (hPIV2) を用いたアトピー性皮膚炎治療薬 (特願 2009-235915)

図1: リポソームワクチンの構成



CTL エピトープペプチドと HA タンパクをリポソーム表面に化学結合する。

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

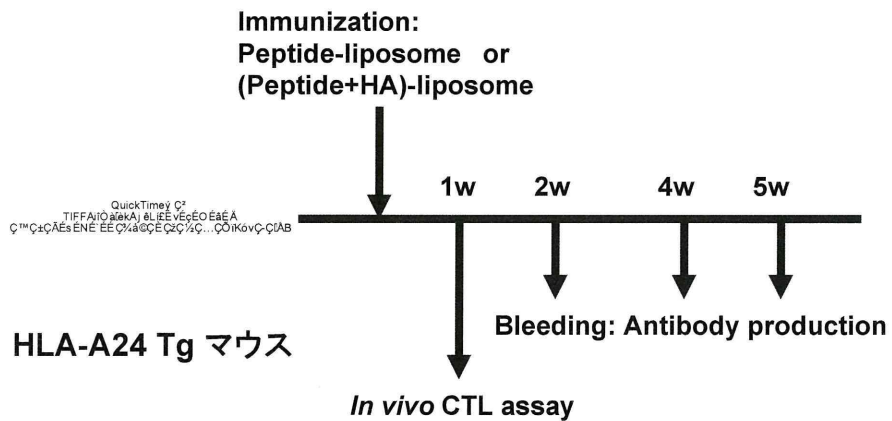


図2: Experimental Protocol

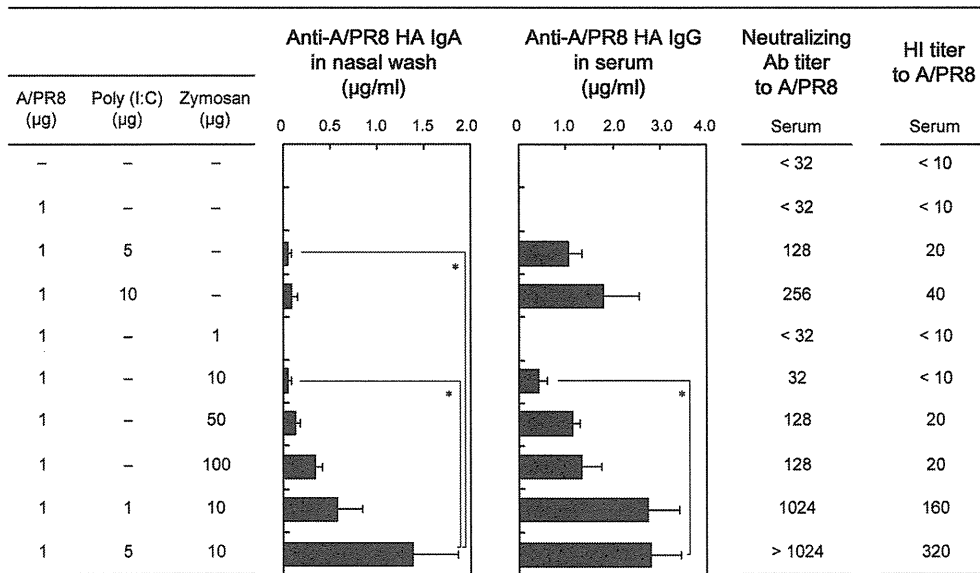


図-3 粘膜アジュバントにおける Zymosan 添加による抗体応答の比較

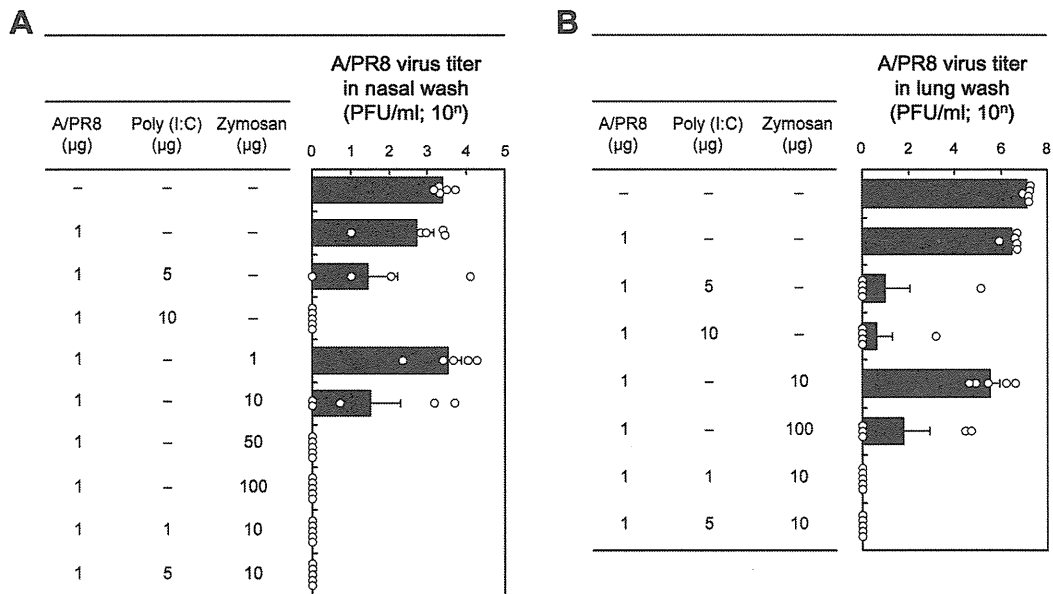


図-4 鼻腔洗浄液および肺洗浄液中におけるウイルス価
(A; 上気道感染モデルにおける鼻空洗浄液、B; 致死的肺炎モデルにおける肺洗浄液)

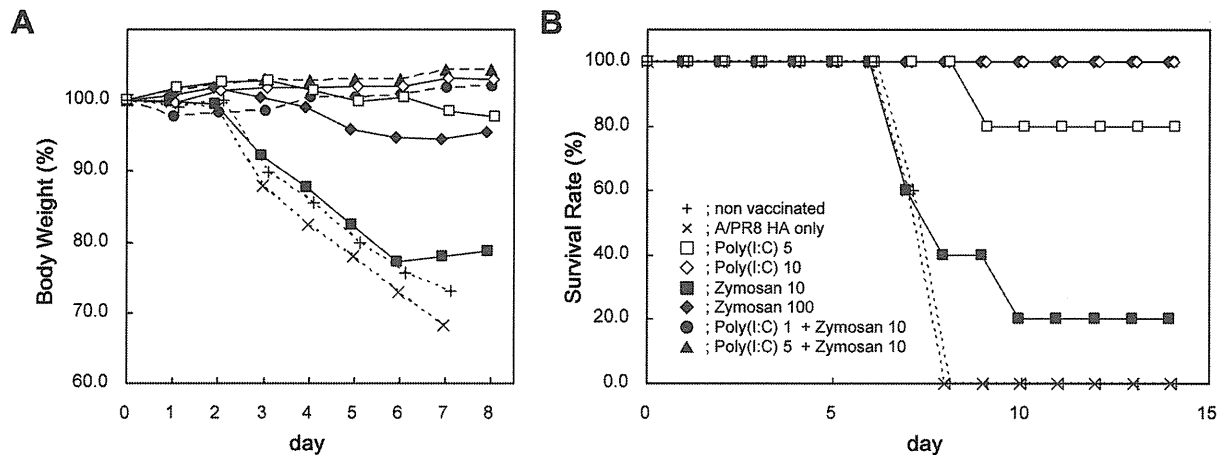


図-5 致死肺感染モデルにおけるマウスの体重変化と生存曲線
(A; 体重変化、B; 生存曲線)

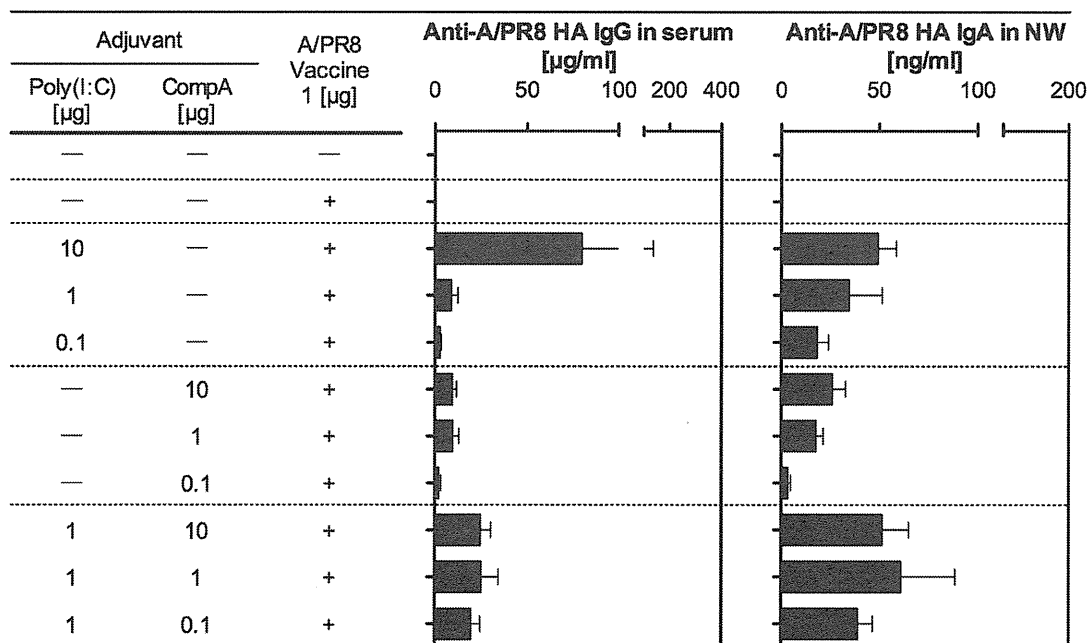


図-6 経鼻ワクチン接種を行ったマウスにおける A/PR8 HA 特異的な血清中 IgG 抗体および IgA 抗体応答

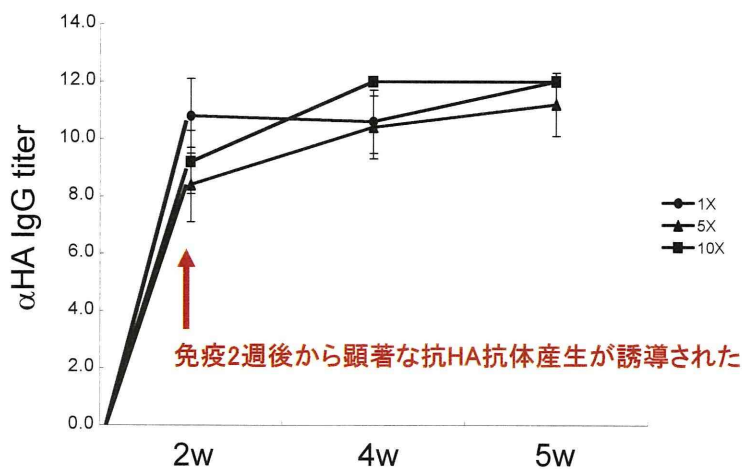


図-7 抗HA抗体産生の誘導

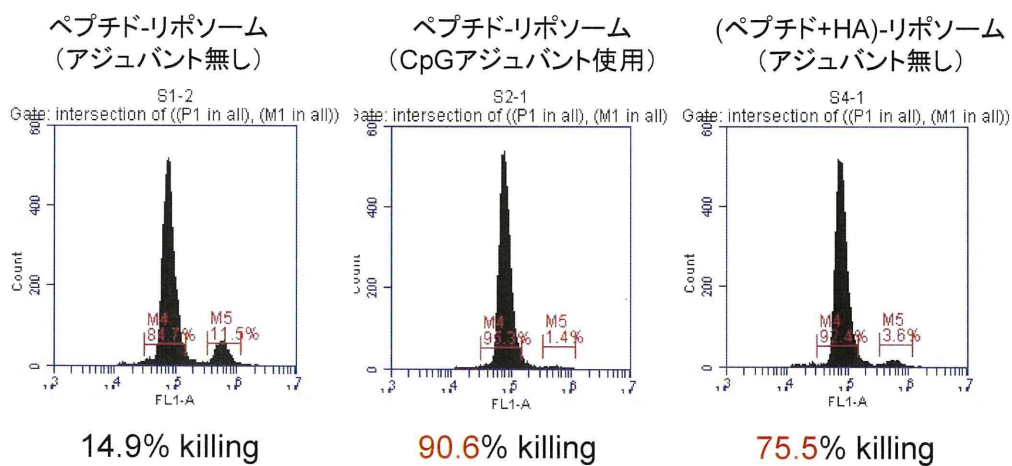


図-8 抗原特異的CTLの誘導

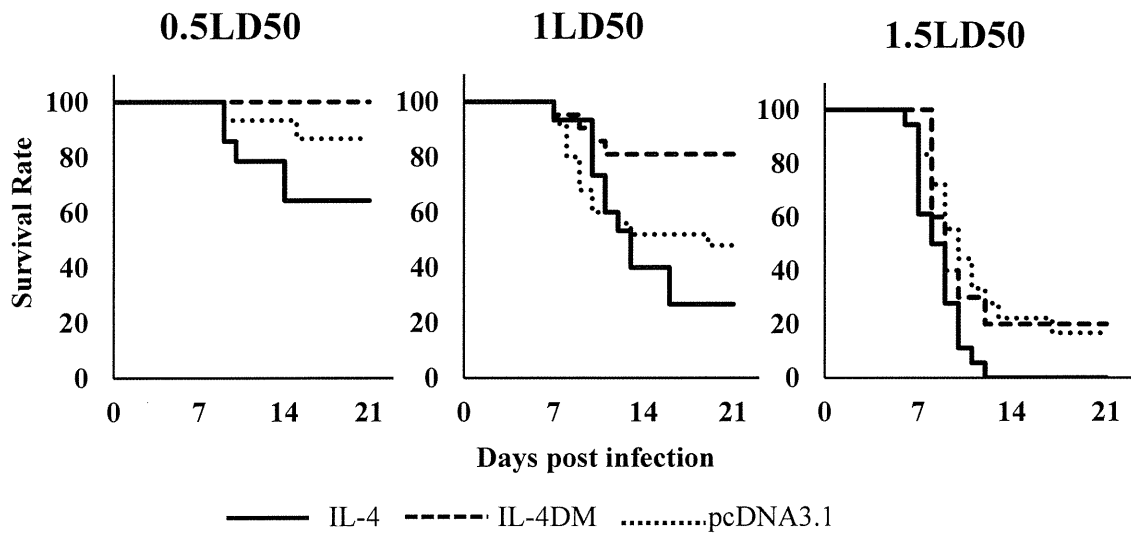


図-9 IL-4 WT および IL-4 DM 接種マウスにおけるインフルエンザウイルス (Flu A/PR/8) 感染後の生存率

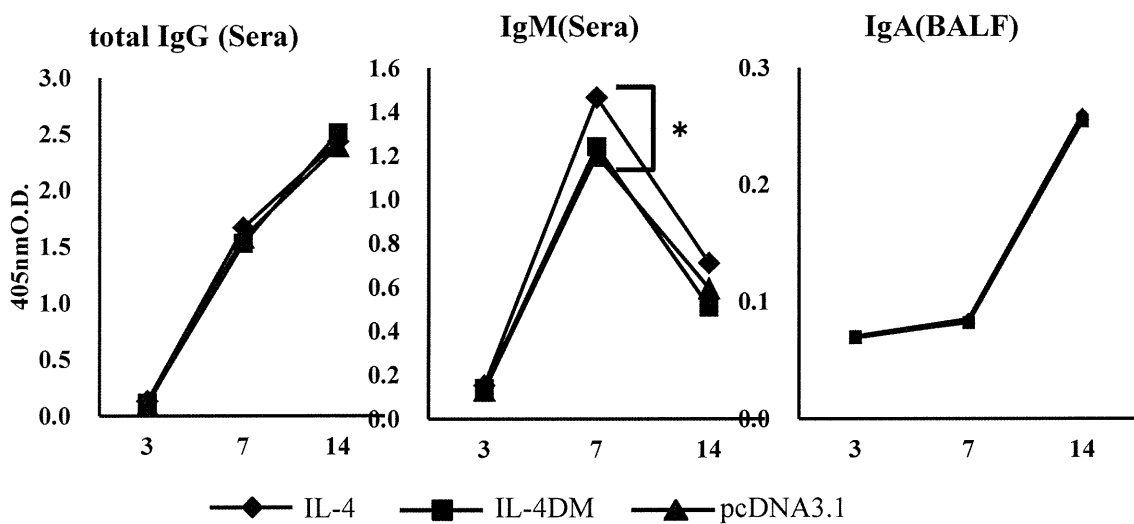


図-10 PR8 特異的抗体産生能の経時的解析

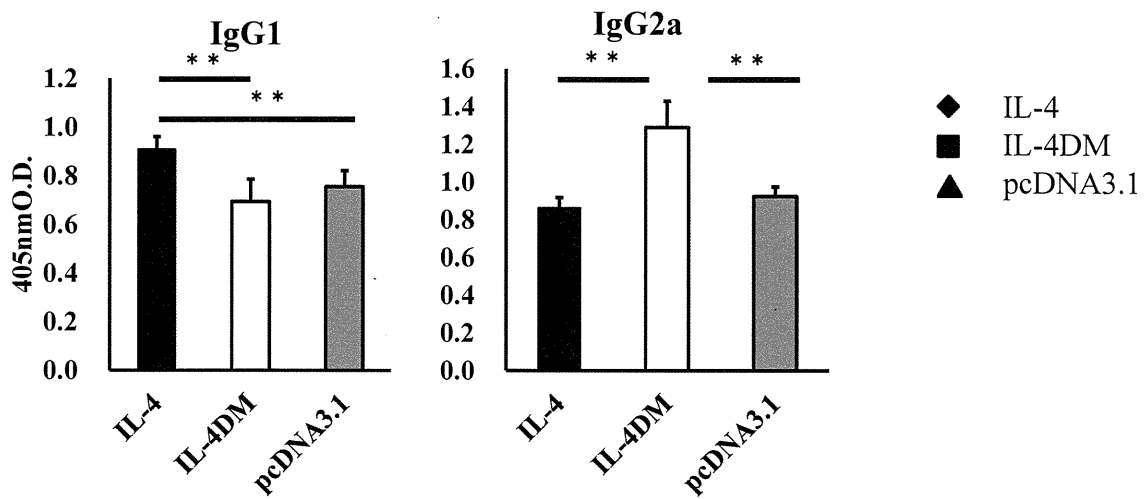


図-11 血中における PR8 特異的 IgG の Subclass (D.P. I 14)

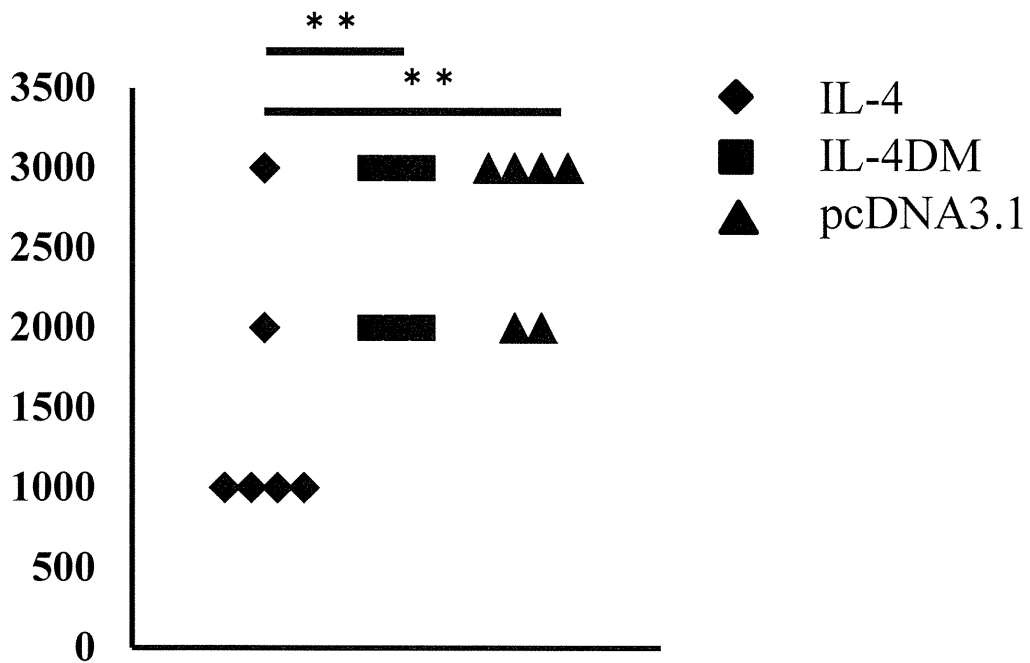


図-12 血清中における PR8 特異的中和抗体価 (D.P. I 14)

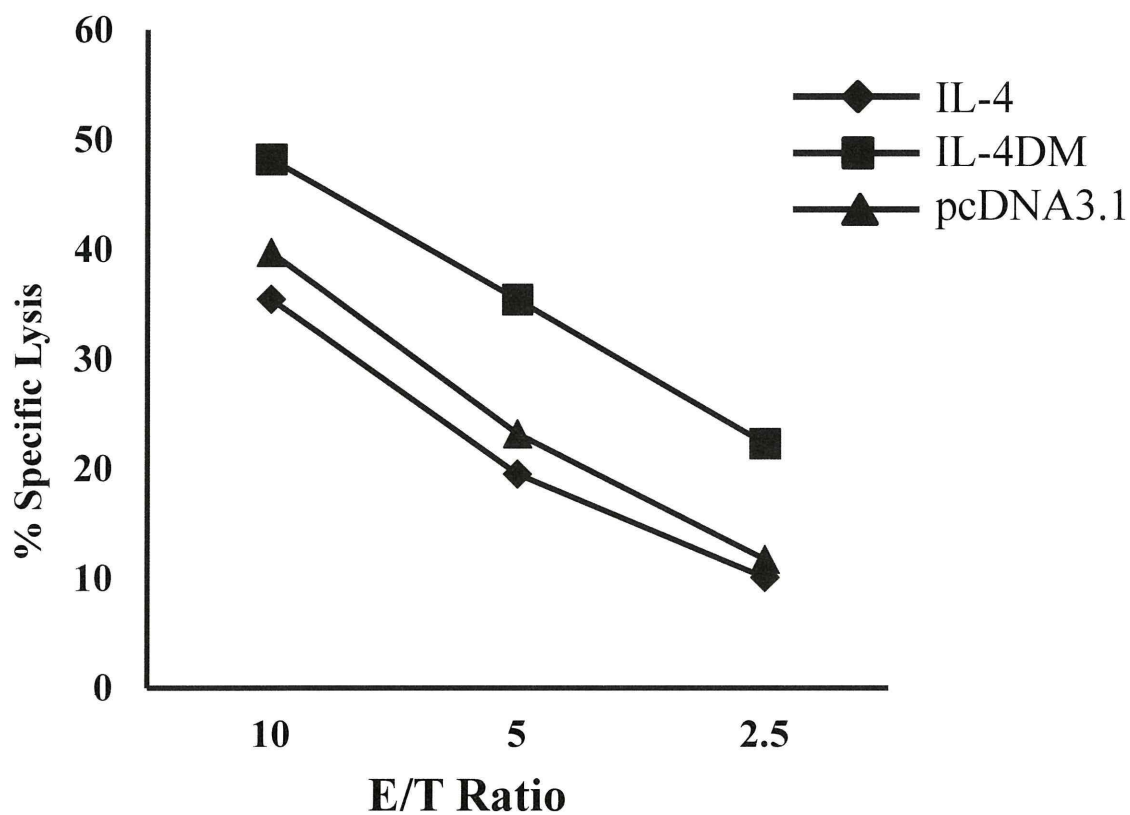


図-13 PR8 に対する CTL 活性 (D. P. I 14)

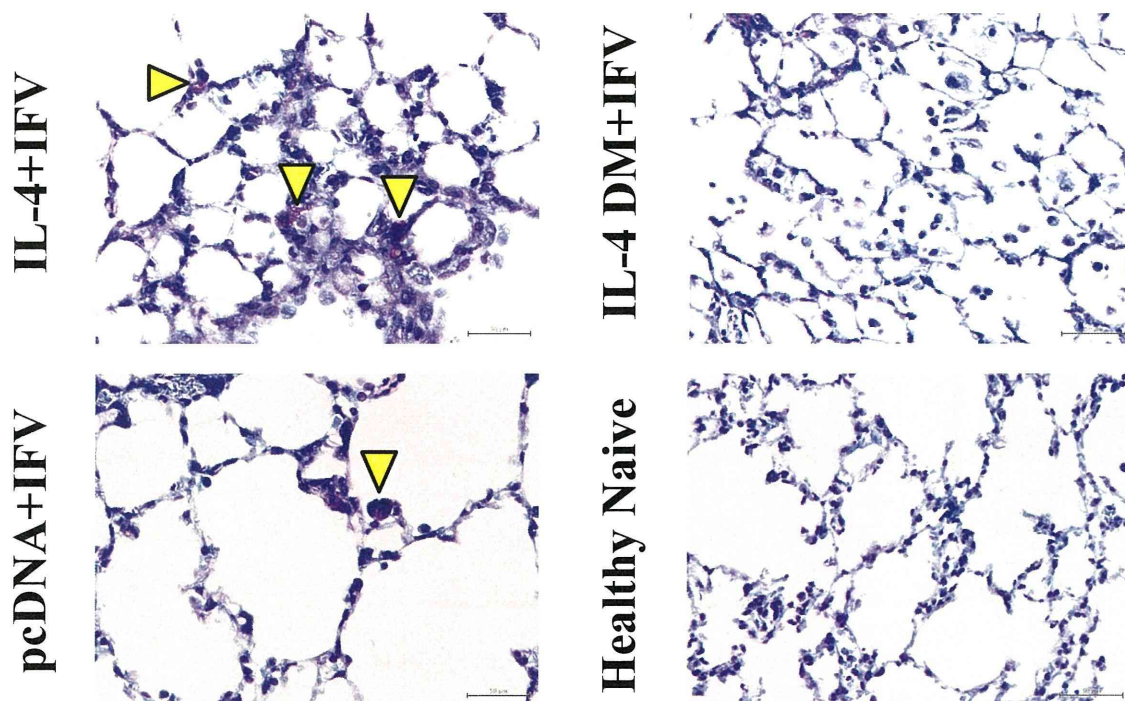


図-14 インフルエンザ感染マウスにおける好酸球の浸潤