

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

「インフルエンザワクチンの有効性と安全性の向上のための理論基盤構築」

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 石井 健

(独) 医薬基盤研究所 アジュバント開発プロジェクトリーダー

平成24(2012)年 5月

目 次

I. 総括研究報告

インフルエンザワクチンの有効性と安全性の向上のための理論基盤構築

石井 健 ----- 1-10

II. 分担研究報告

課題 1. ワクチン・アジュバントの有効性と安全性を定義する分子レベルでの理論基盤

課題 2. 注射型と粘膜型ワクチンの有効性、安全性における相違点の理論基盤構築

課題 3. ウイルス株間の防御抗原の交差反応性と防御効果についての科学的根拠とその応用

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

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

石井健、(青枝大貴) (課題 1 & 2) ----- 11-13

長谷川秀樹 (相内 章、鈴木 忠樹)(課題 2 & 3) ----- 14-20

迫田義博 (課題 2 & 3) ----- 21-24

中山哲夫、熊谷卓司、庵原俊昭 (課題 4 & 5) ----- 25-32

庵原俊昭、菅秀 (課題 4 & 5) ----- 33-37

石井健 (鉄谷耕平) (課題 4 & 5) ----- 38-40

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 41-42

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 別紙

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

「インフルエンザワクチンの有効性と安全性の向上のための理論基盤構築」

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 石井 健

研究要旨：

インフルエンザワクチンは、季節性のワクチンのみならず、近年の新型インフルエンザ(H1N1)の影響もあり、研究開発が最も盛んで接種対象者数も多い。その種類は多岐にわたっているものの、その微生物学的、細胞生物学的、免疫学的な観点から見た「作用機序」は、ワクチンの有効性や安全性の向上にとっては非常に重要であるにもかかわらず、未知の部分が非常に大きい。

そこで本研究代表者、分担者らはワクチンの基礎研究、開発研究、臨床試験などに携わる中で上記の問題を共有し、議論を重ねた結果、インフルエンザワクチンにおいて臨床的にも重要と思われるが分子から個体レベルでの科学的根拠が特に乏しい研究項目として下記の5点を同定した。

- 1) ワクチン・アジュバントの有効性と安全性を定義する分子レベルでの理論基盤構築
 - 2) 注射型と粘膜型ワクチンの有効性、安全性における相違点の理論基盤構築
 - 3) ウイルス株間の防御抗原の交差反応性と防御効果についての科学的根拠とその応用
 - 4) ワクチン・アジュバントによる副反応と副作用の分子メカニズム解明と解決方法の模索
 - 5) ワクチンの「真」の有用性をヒトの検体を用いた免疫学的方法で検討する臨床研究
- よって本研究では、上記5課題を基礎、臨床研究、臨床医などによって形成された本研究班にて迅速かつ正確に解決を目指していく。また得られた知見や情報を、公開討論やワークショップなどを科学者、一般向けに開催して議論を深めるとともにインフルエンザワクチン開発に向けた最新情報をわかりやすく理解してもらうことを図る。平成23年度の成果として下記に詳細を報告する。

石井 健 (研究代表者) 医薬基盤研究所アジュバント開発プロジェクト
(兼) 大阪大学免疫学フロンティア研究センター

庵原俊昭 (研究分担者) 国立病院機構三重病院

清野 宏 (研究分担者) 東京大学医科学研究所

迫田義博 (研究分担者) 北海道大学大学院獣医学研究科動物疾病制御学講座

中山哲夫 (研究分担者) 北里生命科学研究所

長谷川秀樹 (研究分担者) 国立感染症研究所感染病理部

A. 研究目的

本研究は、多岐にわたるインフルエンザワクチンの種類、投与方法、アジュバントによる免疫原性誘導のメカニズムの相違点や、副反応および副作用と呼ばれる現象の作用機序を解明することにより、より安全で有効性の高いインフルエンザワクチン開発に必須な生物学的、医学的理論基盤を構築することを目的とする。

本研究代表者、分担者らはワクチンの基礎研究、開発研究、臨床試験などに携わるものとしてディスカッションを重ねた結果、特に、インフルエンザワクチンにおいて臨床的にも重要と思われるが分子、細胞、組織、個体レベルでの科学的根拠が乏しい研究項目を5項目同定した(上記)。本研究計画立案について特記すべき点は、平成21年度に行われたアラムアジュバントを含有する全粒子H5N1プレパンドミックワクチンの小児での臨床試験(神谷齊国立病院機構三重病院名誉院長を研究代表者とする「沈降新型インフルエンザワクチン(H5N1株)保存血清を使った臨床研究)での高頻度の発熱症例が見られた点を中心とした結果を基盤として臨床家と基礎研究者が一堂に介して、終日(平成21年11月3日)忌憚のない議論を重ねて浮かび上がってきた。これらの問題点はインフルエンザ感染対策として、ワクチン行政の上で最も緊急かつ重要な課題でもあり、基礎研究者と臨床研究者が本研究のような班を組んで行わなければ総括できない領域である。ただ単に「研究の為のワクチンを開発します」、ではなく「基礎研究結果や臨床治験結果による問題点を起点としてエビデンスを形成し、最終的にはワクチン行政や感染対策そして開発にその方向性の判断の理論基盤を賦与する」点が本研究課題の特色であり、独創的な点である。代表者の石井らはイ

ンフルエンザワクチンを含めた各種ワクチン、アジュバントの自然免疫受容体、シグナル伝達経路、細胞などを同定し、分子レベルで生体のワクチン作用機序を解明してきた。

分担者の神谷らは一貫して臨床家としての視点からインフルエンザワクチンの開発研究に従事し、季節性、H5N1高病原性、新型

(H1N1)のワクチンの臨床試験を行ってきた。特に小児での全粒子ワクチン+アラムアジュバントの治験にて高頻度の発熱症例を経験し、この原因究明に取り組んでいる。

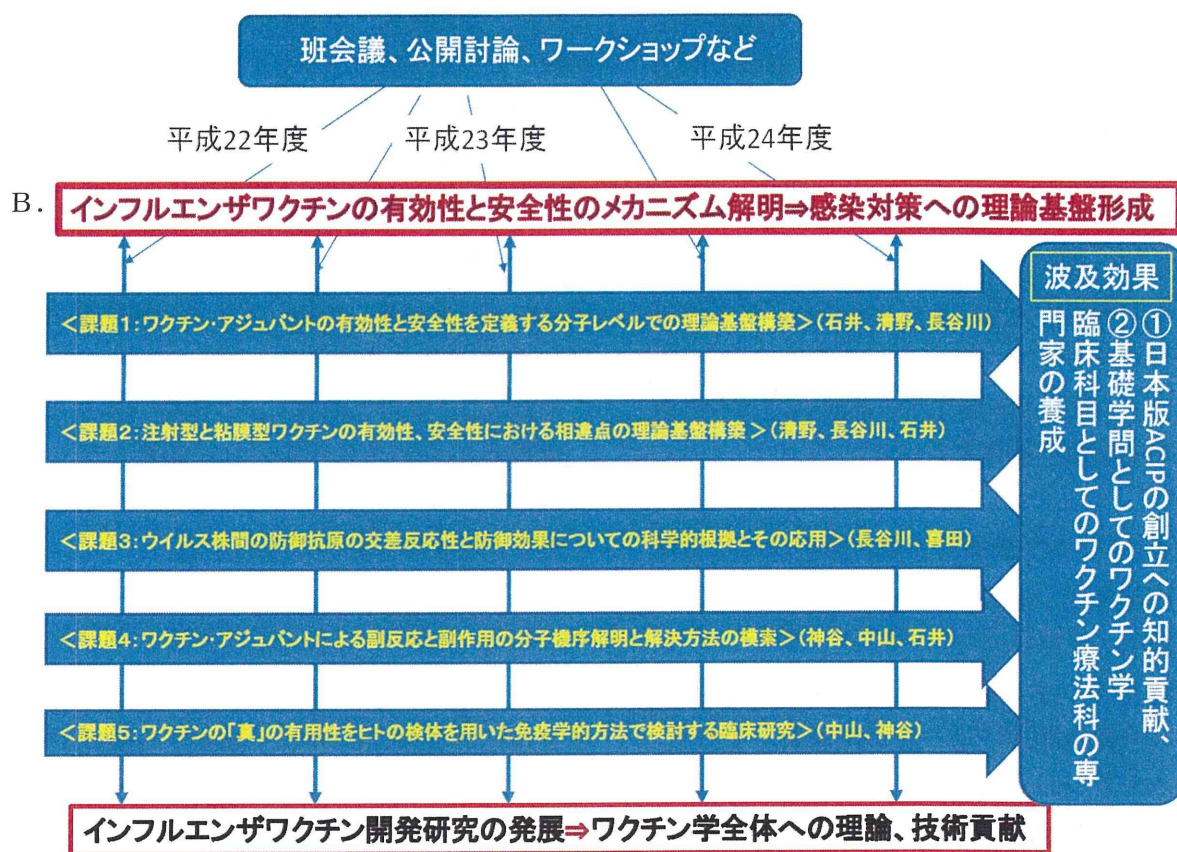
分担者の中山は、麻疹ウイルスの分子疫学、麻疹ワクチン弱毒の分子基盤の研究を一貫して行い、ワクチンの有効性、安全性に関する研究を臨床検体を用いて行っている。

分担者の清野は粘膜免疫の基礎的研究成果をもとに、経口・経鼻ワクチン開発に向けた先導的研究を行っている。

分担者の長谷川らは粘膜投与型ワクチンの交叉防御効果を示す研究成果を発表し、現在H5N1およびH1N1ウイルスに対する経鼻ワクチンの臨床開発を進めている。

分担者の迫田らはインフルエンザAウイルスの全種類のライブラリーを整備するとともに、当該ライブラリーを用いてインフルエンザワクチン開発に向けてのウイルスバンク構築を進めている。

上記のように代表者、各分担者の研究の情報を共有しディスカッションを重ねることが、本研究の課題である「ワクチンの作用、副作用の作用機序解明とその分子メカニズムに基づいた有効性、安全性の理論基盤構築」という目標達成に必要不可欠と考える(下記の流れ図参照)。



B. 研究方法

課題1：ワクチン・アジュバントの有効性と安全性を定義する分子レベルでの理論基盤構築 (石井、清野、長谷川)

インフルエンザワクチンはいくつも種類があり、生ワクチン、全粒子ワクチン、スプリットHA ワクチンなどの剤型、皮下、筋肉、経鼻、舌下などの投与方法、アジュバントの有無に至るまで多岐にわたっている。これらの有効性、安全性がどのように自然免疫によって制御されているか解明する。そこで申請者はこれら異なるワクチン形態の免疫原性とアジュバント効果のメカニズムを解明するため、1) ワクチン構成成分においていったい何がアジュバントとして働いているか、2) 生体、特に経鼻的に免疫した際のワクチンを取り込む細胞はなにか、アジュバントの自然免疫シグナルを伝える細胞がなにかを同定し、また、3) どの

ようなエフェクター因子（液性因子、細胞間相互作用を含む）が関与しているか、免疫学的、分子生物学的手法を用いて解析する。さらには現在日本で唯一認可されている H1N1 ワクチンである HA スプリットワクチンの免疫原性が全粒子や生ワクチンに比較して減弱している予備データを得ていることから、これに加えるべきアジュバントを上記 1-3) のデータをもとに効率よく、効果および安全性を改善する方法を模索する。

課題2：注射型と粘膜型ワクチンの有効性、安全性における相違点の理論基盤構築 (清野、長谷川、石井)

呼吸器粘膜系に関して清野らは、マウスモデルにおいてその中心的役割を果たすNALTの組織形成メカニズムから生物学的機能を明らかにし、経鼻ワクチンの理論的基盤を構築した。し

かしヒトでは同一の組織は存在せず扁桃腺に代表されるワルダイアーリングが類似の機能を持つとされる。マウスとヒトの鼻腔、口腔のワクチン免疫機能の相違点や上気道、下気道の感染免疫、ワクチン免疫機構の解明を分子生物学的手法、細胞免疫学的手法なども用い行う。これらの解析により、インフルエンザワクチンの投与方法やアジュバントの開発のみならず、ワクチンの副反応・副作用の軽減に向けた免疫的な理論基盤の構築を目指す。

課題3：ウイルス株間の防御抗原の交差反応性と防御効果についての科学的根拠とその応用
(長谷川、迫田)

H5N1のワクチンにおいてCladeの異なるワクチンの接種順序により交叉防御能が変わるかどうかといった問題に対し、マウスを用いた実験系で接種順序による交叉防御能の違いを皮下接種及び経鼻接種を比較する事により検討を行う。特に粘膜免疫を代表とする分泌型IgAと全身系免疫を反映する血清IgG抗体レベルでそのサブクラスも考慮して検討を進める予定である。本課題での成果は上記の課題1と2にもフィードバックされ、より効果があり安全な次世代型インフルエンザワクチン開発への貴重な情報を提供する。

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

(神谷、中山、石井)

H5N1のワクチンにおいて成人での製造承認許可を受けて小児から思春期(6ヶ月~20歳まで)での使用についても検討を開始した。小児例では中和抗体価の上昇は良かったが、初回接種後24時間以内から3日目までにかけて39~40℃の発熱する症例が半数以上に見

られた。先の研究(厚労科研H5N1ワクチン治験 正式名入れる)で見られた発熱者の血清を使用して、その原因を探るため血中の炎症性・発熱性サイトカイン等の検討をする予定である。具体的にはH5N1のパンデミックワクチン接種前後の血清において同意書を取り直し、保存されている微研、北里のワクチン接種後の血清計100例前後の血清のEIA IgG subclass抗体を検査する。また、血清中から採取できる新しい情報としてマイクロRNAに注目してこれを網羅的に解析してワクチンの副反応、有効性に寄与するものがあるか検討する。

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

種々のH5N1ワクチンの形態(全粒子不活化、全粒子不活化+アルミアジュバント、スプリット、その他)を作製し各年齢層のヒト末梢リンパ球を培養しワクチン抗原で刺激し産生されるサイトカインを網羅的に解析する。Th1/Th2応答、炎症性サイトカインを測定し免疫応答、発熱等の副反応と関連性が見いだせるかどうかを検討する。また、血清中から採取できる新しい情報としてマイクロRNAに注目してこれを網羅的に解析してワクチンの副反応、有効性に寄与するものがあるか検討する。

C. 研究結果

・研究代表者(石井 健)

(1)各種インフルエンザワクチンの免疫学的機序を生体レベルで証明し、ヒトでの現象との関連性を示した(Koyama S et al *Science Translational Medicine* 2010 など, 図1参照)。

(2)インフルエンザワクチンにて最も汎用されているアラムアジュバントの作用機序の一端

を解明した (Marichal T et al. *Nature Medicine* 2011, Kuroda E et al, *Immunity* 2011)

(3) 本研究内容の「議論を深め」、「啓蒙を図る」一環として、ワクチンフォーラム 2010 を開催し、本研究班主催のアジュバントワークショップにてアジュバント開発研究の新展開や審査行政への提言を行い、また、本研究班を中心に「次世代アジュバント研究会」を発足させ、アカデミアのアジュバント研究者、企業の開発担当者、PMDA の審査担当者を招き相互の意見交換を行った。またアジュバント研究のアウトリーチ活動も積極的に行い、研究室の一般公開、アジュバントに特化した専門書の発行、アジュバントに関する講演会などを行った。平成 23 年度のワクチン学会にて本研究内容を主としたシンポジウムも開催した。

・研究分担者(神谷齊 (故)、中山哲夫、熊谷卓司、石井健)

(1) ワクチン接種後の小児の発熱の疫学的解析を行う目的で先の研究 (BK-PIFA/KIB-PIA の健康小児を対象とした臨床試験：代表研究者神谷齊) で見られた発熱者の血清を使用して、その原因を探るため血中の炎症性・発熱性サイトカイン、マイクロ RNA 等の検討をするための臨床研究を開始し一部のデータを解析した。結果として、ワクチンによる獲得免疫の誘導は自然免疫により調節されており、H5N1 パンデミックワクチンの小児臨床試験の結果高い発熱率を示したものの良好な免疫応答を誘導していた。今回の研究で H5N1 パンデミックワクチン (アルミ添加全粒子不活化抗原：WIV+Alum) は IFN- α , IL-1 β , IL-6, TNF- α を誘導していることが高い発熱率を示したものの良好な免疫応答を示したことに関連すると思われる。

(2) 上記の H 5 N 1 全粒子ウイルスおよびアラ

ムアジュバントによる小児のみ、かつ 1 回目免疫のみでの発熱に関し、マウスでの再現実験を行うため新たにマウス体温と行動を計時的に記録する装置を開発した (特許申請済)。

・研究分担者(庵原 俊昭)

(1) 2009/10 シーズンに妊婦にインフルエンザワクチンを接種することで効果的な免疫誘導が確認できた。また、妊婦と同じレベルの抗体価が児に移行することを確認した。また、特別な有害事象は認められなかった。以上の結果から、妊婦にインフルエンザワクチンを接種することで、6 ヶ月未満時児のインフルエンザ予防が期待される。

(2) 今年度は、Hib ワクチンと肺炎球菌結合型ワクチン(PCV)同時接種翌日に発熱した 8 例を対象に発熱の誘因を検討した。8 例中 6 例は好中球増多を伴う白血球数の増加があり、CRP は 0.7~2.3 と少し上昇していた。

(3) 2010/11 シーズンに沈降インフルエンザワクチン接種を予定しており、1 回目接種を受ける前、受けた翌日、2 回目接種を受ける前 (初回接種 3 週後)、受けた翌日、2 回目 3 週後に血清を採取し、臨床症状とサイトカインの動きについて検討する。倫理審査委員会の承認を受けている。

・研究分担者(清野 宏)

(1) ナノゲル型デリバリーシステムを用いて、インジュウム標識¹¹¹In ワクチンやアジュバントのマウス鼻腔上皮細胞等への挙動を検討したところ、マウス鼻腔上皮細胞上へのワクチンの保持時間の大幅延長という点で、CT と同様の効果が認められた。さらに、新たに開発した 18F-PEIT、インジュウム標識¹¹¹In 法を用いてワクチン、アジュバントの可視化解析に成功した。(Nochi T et al, *Nature Material*

2010, Tokuhara D et al *PNAS* 2010)

・研究分担者(長谷川 秀樹)

(1)高病原性鳥インフルエンザ H5N1 経鼻ワクチンの効果をカニクイザルを用いて調べた。

(2)経鼻投与インフルエンザワクチンにより、感染防御能力が1年以上持続する事、cladeの異なるワクチン株による交叉防御効果が有ること、さらに clade の異なるワクチン株による追加免疫により広い交叉防御効果が有ることがカニクイザルで示された。

・研究分担者(迫田 義博)

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

これらの抗原変異株に対して、現在国内に備蓄されている H5 亜型鳥インフルエンザワクチンの発症防御効果が十分でないことを明らかにした。その理由として、抗原変異株と従来のワクチン株 (Vac-3 株) との間に大きな抗原性のずれがあることがわかった。今後の鳥インフルエンザのワクチン戦略としては、従来の Vac-3 ワクチンの抗原量を増やすか、もしくは抗原変異株をワクチン株として追加した 2 価ワクチンを準備する必要がある。

D. 考察

期待される成果：

1) 関連する世界的な先端研究を推進している免疫学、ワクチン学、感染症学、小児科学専門家がマトリックス状に研究を展開するテーマを核として、他の厚労科研関連研究班や異分野の研究者とも積極的交流を図る。その結果、次世代型インフルエンザワクチン開発研究者クラスターが形成され、新たなワクチン研究のブレークスルーと効率のよいワクチン開発が

期待される。

2) 本研究で得られた知見や知識を、定例の報告だけでなく、公開討論やワークショップなどを科学者、一般向けに開催して議論を深めるとともに啓蒙を図る。その結果として国民に対し、インフルエンザワクチンによる国の感染対策を「基礎と臨床のエビデンス」に基づいた理論基盤に基づいて提供することが可能になると期待される。

今後の課題：

<課題1：ワクチン・アジュバントの有効性と安全性を定義する分子レベルでの理論基盤構築>

生体、特に経鼻的に免疫した際のワクチンを取り込む細胞はなにか、アジュバントの自然免疫シグナルを伝える細胞がなにかを同定し、また、どのようなエフェクター因子（液性因子、細胞間相互作用を含む）が関与しているか、免疫学的、分子生物学的手法を用いて解析する。

<課題2：注射型と粘膜型ワクチンの有効性、安全性における相違点の理論基盤構築 >

マウスとヒトの鼻腔、口腔のワクチン免疫機能の相違点や上気道、下気道の感染免疫、ワクチン免疫機構の解明を分子生物学的手法、細胞免疫学的手法なども用い行う。具体的には インジウム標識¹¹¹Inと18F蛋白PETを併用して、最初にマウスを用いてワクチンとアジュバントの体内動態・脳内移行を試験するほか、上記試験系を駆使して、ヒトに近いサルを用いてワクチンとアジュバントの体内動態・脳内移行を試験する。

<課題3：ウイルス株間の防御抗原の交差反応性と防御効果についての科学的根拠とその応用>

H5N1 のワクチンにおいて Clade の異なるワクチンの接種順序により交叉防御能が変わるかどうかといった問題に対し、マウスを用いた

実験系で接種順序による交叉防御能の違いを皮下接種及び経鼻接種を比較する事により検討を行う。

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

H5N1のワクチンの小児臨床試験で見られた発熱者の血清を使用して、その原因を探るため血中の炎症性・発熱性サイトカイン、miRNA等の解析を行う。

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

種々のH5N1ワクチンの形態（全粒子不活化、全粒子不活化+アルミアジュバント、スプリット、その他）を作製し各年齢層のヒト末梢リンパ球を培養しワクチン抗原で刺激し産生されるサイトカインを網羅的に解析する。

E. 結論

平成22年度の中途にて分担研究者であり、インフルエンザワクチンの臨床研究で世界的な権威でもあられる神谷齋先生が急逝された。その後神谷先生の遺志を引き継ぐべく、平成23年度はますます本研究班の発展にまい進したつもりである。研究班のチームワークが実を結び、神谷先生の臨床研究から生まれた成果をVaccineに論文を投稿することが出来たのがもっとも特筆すべき点である。また、上記に示すような多くの成果が各分担研究者のグループより出され、最終年度の来年度終了時まで期待される成果を全て出し切れることを期待したい。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表などの成果

・研究代表者(石井 健)

学術論文(英文・すべて査読付)

1. Nakayama T, Kashiwagi Y, Kawashima H, Kumagai T, Ishii KJ, Ihara T
Alum-adjuvanted H5N1 whole virion inactivated vaccine (WIV) enhanced inflammatory cytokine productions Vaccine 2012 in press
2. Aoshi T, Koyama S, Kobiyama K, Akira S, Ishii KJ. Innate and adaptive immune responses to viral infection and vaccination. Current Opinion in Virology. 2011, 1(4):226-232.
3. Coban C, Kobiyama K, Aoshi T, Takeshita F, Horii T, Akira S, Ishii KJ. Novel Strategies to Improve DNA Vaccine Immunogenicity. Curr Gene Ther. 2011;11(6) 479-484
4. Marichal T, Ohata K, Bedoret D, Mesnil C, Sabatel C, Kobiyama K, Lekeux P, Coban C, Akira S, Ishii KJ*, Bureau F, Desmet CJ*. DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. Nat Med. 2011 17(8):996-1002. *corresponding author
5. Kuroda E, Ishii KJ, Uematsu S, Ohata K, Coban C, Akira S, Aritake K, Urade Y, Morimoto Y. Silica crystals and aluminum salts regulate the production of prostaglandin in macrophages via NALP3 inflammasome-independent mechanisms. Immunity. 2011 34(4):514-26.

6. Jounai N, Kobiyama K, Shiina M, Ogata K, Ishii KJ, Takeshita F. NLRP4 negatively regulates autophagic processes through an association with beclin1. *J Immunol.* 2011 186(3):1646-55.
7. Ezoe H, Akeda Y, Piao Z, Aoshi T, Koyama S, Tanimoto T, Ishii KJ, Oishi K. Intranasal vaccination with pneumococcal surface protein A plus poly(I:C) protects against secondary pneumococcal pneumonia in mice. *Vaccine.* 201129(9):1754-61.
2. 城内直、小檜山康司、石井健、武下文彦 「NLRP4による autophagy の抑制」 *臨床免疫・アレルギー科* 第57巻 第1号 2011
3. 青枝大貴、石井健 「ワクチン基礎研究の最新動向と展望；ワクチンアジュバント」 *日本臨床* 69巻9号 1547-53 2011
4. 鉄谷耕平、石井健 「アジュバント一開発研究の現状と課題」 *総合臨床* 60(11):2184-2191 2011
5. 鉄谷耕平、石井健 「ワクチンアジュバントの現状と今後」 *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス* 42(8):650-658 2011

書籍

1. 石井健、山西弘一（編） 「アジュバント開発研究の新展開」 CMC 出版 2011年
うち、石井健、青枝大貴、鉄谷耕平、小檜山康司が各章執筆を担当。
2. 青枝大貴、審良静男、石井健 「生体防御機構—Toll-like receptors ノックアウトマウス」 完全版マウス・ラット疾患モデル活用ハンドブック 羊土社、2011年
3. 小檜山康司、石井健 「インフルエンザワクチン」 ドラッグデリバリーシステムの新展開 II 永井恒司、岡田弘晃監修 CMC 出版 2011年
4. 小檜山康司、石井健 「バイオ医薬品における新規アジュバントの開発」 次世代バイオ医薬品の製剤設計と開発戦略 森下真莉子監修 CMC 出版 2011年
6. 鉄谷耕平、石井健 「新たなアジュバントの臨床応用へむけて」 *ファーマメデイカ* 29(4): 9-16 2011
7. 鉄谷耕平、石井健 「アジュバント」 感染症のワクチン新戦略 *Bioclinica* Vol.26 No13 ; 34-39 2011

分担研究者 （中山哲夫）

1. Nakayama T, Kashiwagi Y, Kawashima H, Kumagai T, Ishii KJ, Ihara T
Alum-adjuvanted H5N1 whole virion inactivated vaccine (WIV) enhanced inflammatory cytokine productions *Vaccine* 2012 in press
2. Nagai M, Xin JY, Yoshida N, Miyata A, Fujino M, Ihara T, Yoshikawa T, Asano Y, Nakayama T. Modified adult measles in outbreaks in Japan, 2007-2008. *J Med Virol* 2009; 81: 1094-1101.
3. Nakamura A, Sakano T, Nakayama T, (他9名), Ohta T. Neonatal pertussis presenting as acute bronchitis: direct detection of the *Bordetella*

総説

1. 青枝大貴、石井健 「自然免疫と次世代ワクチン開発」 *Drug Delivery System* Vol.27, No.1 19-27 2012

pertussis using loop-mediated isothermal amplification. *Europ J Ped* 2009; 168 (3) 347-349.

4. Sakata M, Komase K, Nakayama T. Histidine at position 1042 of the p150 region of a KRT live attenuated rubella vaccine strain is responsible for the temperature sensitivity. *Vaccine* 2009; 27: 234-242
5. Shinjoh M, Miyairi I, Hoshino K, Takahashi T, Nakayama T. Effective and safe immunizations with live-attenuated vaccines for children after living donor liver transplantation. *Vaccine* 2008; 26: 9859-9863
6. Yoshida N, (他 9 名), Nakayama T. Mumps virus reinfection is not a rare event confirmed by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *J Med Virol* 2008; 80: 517-523

研究分担者 (清野 宏)

1. Sato S, Kiyono H. The mucosal immune system of the respiratory tract. *Curr Opin Virol*. 2012 in press
2. Nochi T, (他 15 名), Kiyono H. Nanogel antigenic protein-delivery system for adjuvant-free intranasal vaccines. *Nat Mater*. 2010 9:572-8.
3. Tokuhara D, (他 10 名), Kiyono H. Secretory IgA-mediated protection against V. cholerae and heat-labile enterotoxin-producing enterotoxigenic Escherichia coli by rice-based vaccine. *PNAS*. 2010 107:8794-9.
4. Kayamuro H, (他 11 名), Kiyono H. (他 4 名) Tsunoda SI Interleukin-1 family cytokines as mucosal vaccine adjuvants for induction of protective immunity against

influenza virus. *J Virol*. 2010 84(24):12703-12.

5. Obata T, (他 21 名), Kiyono H. Indigenous opportunistic bacteria inhabit mammalian gut-associated lymphoid tissues and share a mucosal antibody-mediated symbiosis. *PNAS* 2010 20;107:7419-24.

研究分担者 (長谷川 秀樹)

1. 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 in press*
2. Aina A, Tashiro M, Hasegawa H. Cross-protective immunity against influenza virus infections induced by intranasal vaccination together with a TLR3-mucosal adjuvant. *Hum Vaccin*. 2011 Jan 1;7:174-82
3. Ichinohe T, (他 15 名), Hasegawa H. Intranasal administration of adjuvant-combined vaccine protects monkeys from challenge with the highly pathogenic influenza A H5N1 virus. *J Med Virol* 2010 Oct;82(10):1754-61
4. Aina A, Ichinohe T, Tamura S, Kurata T, Sata T, Tashiro M, Hasegawa H. Zymosan enhances the mucosal adjuvant activity of Poly(I:C) in a nasal influenza vaccine. *J Med Virol* 2010 Mar;82(3):476-84

研究分担者 (迫田 義博)

1. Okamoto M, Tanaka T, Yamamoto N, Sakoda Y. (他 6 名) Kida H. Antigenic, genetic, and pathogenic characterization of H5N1 highly

pathogenic avian influenza viruses isolated from dead whooper swans (*Cygnus cygnus*) found in northern Japan in 2008. *Virus Genes*, 41. 351-357. 2010

2. Sakoda Y. (他 16 名), Kida H. Characterization of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus strains isolated from migratory waterfowl in Mongolia on the way back from the southern Asia to their northern territory. *Virology*, 406. 88-94. 2010
3. Sakoda Y. (他 17 名), Kida H. 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*, 2011 in press
4. Nomura N, Sakoda Y. (他 9 名), Kida H. Characterization of avian influenza viruses isolated from domestic ducks in Vietnam in 2009 and 2010. *Arch Virol*, 2011 in press
5. Nomura N, Sakoda Y. Soda K, Okamatsu M, Kida H. 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*, 2011 in press
6. Samad RA, (他 10 名), Sakoda Y. Kida H. A vaccine 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. 2011

課題 1. ワクチン・アジュバントの有効性と安全性を定義する分子レベルでの理論基盤

「ワクチンによる発熱機構に関する研究」

研究分担者 石井健 医薬基盤研究所 プロジェクトリーダー

研究協力者 青枝大貴 同上 主任研究員

研究要旨

ワクチンによる発熱はワクチン接種による副反応として比較的高頻度に認められるが、発熱が獲得免疫誘導にどのような影響を与えるのかについては不明な点が多い。現行のワクチン製剤による発熱試験はウサギを用いて行われており、投与後わずか 3 時間の発熱状況のみが試験され、臨床上認められる 24 時間から 72 時間後の発熱については検査されていない点も問題である。本研究では、発熱と獲得免疫誘導について研究を進めるための基盤として、マウスを用いて非侵襲的かつ連続的に体温をモニタリングするシステムを開発した。

A. 研究目的

発熱と獲得免疫誘導について研究を進めるための基盤として、マウスを用いて非侵襲的かつ連続的に体温および行動をモニタリングするシステムを開発する。

B. 研究方法

マウスにおいて体温変化を非侵襲的かつ経時的にモニター可能な測定システムを構築するため、既存のマウス体温測定法の検索、およびそれをもとに独自の測定法を開発・構築する。具体的には、マウスにモデル発熱物質として LPS を投与し、その後の体温変化を温度測定プローブによる直腸温度測定など様々な既存の測定法を用いて測定し実用に資するかどうかを検討した。結果としては、既存の測定系では十分な信頼性を確保したマウス体温

測定は難しく、最終的に、サーモグラフィーカメラと飼育環境(音、光、環境温度)をコントロール可能な独自のシステムを構築した。

(倫理面への配慮)

使用された実験動物は、医薬基盤研究所および大阪大学微生物病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) 温度測定プローブを用いた直腸音の測定は、マウスを保定する必要がある、ハンドリングに伴うマウスの体温変化が LPS 投与による体温変化を上回り、信頼できる測定結果

を得ることは出来なかった。

2) 赤外線体温測定器による体温測定も試みたが、直腸温度測定と同様にハンドリングに伴うマウスの体温変化が LPS 投与による体温変化を上回り、信頼できる測定結果を得ることは出来なかった。

3) テレメトリーシステムを用いた体内埋め込み型体温測定プローブについても使用を検討したが、①非常に高価であること、②マウスに対する侵襲が大きいこと、の 2 点から使用するには至らなかった。

4) サーモカメラを用いて体表面温度変化の測定を試み、耳穴部が最も温度が高く深部体温に近い温度を示すと考えられた。しかしながら、通常の飼育環境では、飼育管理者が出入りすることによる影響、ケージからマウスを取り出して撮影する際のハンドリングの影響から、マウス耳穴部の温度変化を信頼性を担保して測定することは非常に難しかった。

5) 上記の結果をもとに検討を続けた結果、マウス背部を除毛し、かつ光と環境温度をコントロールできる密閉型のインキュベーター内でマウスを飼育し、その上部からサーモグラフィカメラで撮影することで、数日間にわたって連続的にマウス体温をモニタリングする測定システムを構築することが出来た(特願 2011-102045)。LPS 投与前と投与後の体温変化の測定例を図に示す。LPS 投与後の発熱は、約 5 時間後に一過性にピークを示し、その後少なくとも一週間にわたって再び発熱することはなかった。また、LPS による体温の最高温度は、夜間活動期の最高温度を超えることはなかった。

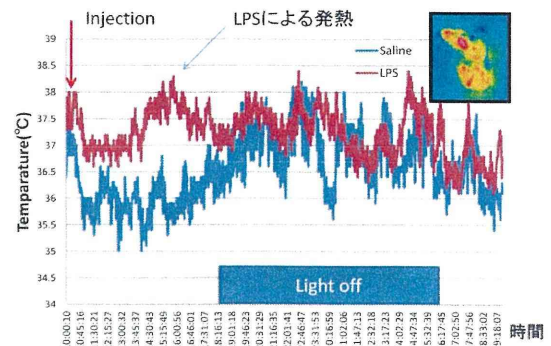


図. LPS 投与によるマウス体温変化

D. 考察

本研究で開発・構築したマウス体温測定システムは、ハンドリングなどによる外的要因に影響されることなく、非侵襲的で経時的にマウス体温を測定することができ、ワクチン投与後の発熱反応測定に有用と考えられた。今後、インフルエンザワクチンをはじめとして、様々なアジュバントを含めて、発熱と獲得免疫応答の相関について、研究を進展したい。

E. 結論

我々の開発した体温測定システムは従来のウサギ発熱試験では測定出来なかった日単位での体温変化を非侵襲的に連続的に測定することができ、今後のワクチンの安全性評価や、発熱と獲得免疫反応の関連に対する基礎研究の進展に貢献すると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Innate and adaptive immune responses to viral infection and vaccination. Aoshi T, Koyama S, Kobiyama K, Akira S, Ishii KJ. Current Opinion

in Virology. 2011, 1(4):226-232.

2011年8月

2. CD8 α (+) Dendritic Cells Are an Obligate Cellular Entry Point for Productive Infection by *Listeria monocytogenes*. Edelson BT, Bradstreet TR, Hildner K, Carrero JA, Frederick KE, Kc W, Belizaire R, Aoshi T, Schreiber RD, Miller MJ, Murphy TL, Unanue ER, Murphy KM. *Immunity*. 2011 Aug 26;35(2):236-48.
3. A new subset of CD103+CD8 α + dendritic cells in the small intestine expresses TLR3, TLR7, and TLR9 and induces Th1 response and CTL activity. Fujimoto K, Karupuchamy T, Takemura N, Shimohigoshi M, Machida T, Haseda Y, Aoshi T, Ishii KJ, Akira S, Uematsu S. *J Immunol*. 2011 Jun 1;186(11):6287-95.

2. 学会発表

なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許出願

実験用小動物のための体温測定装置および体温測定方法。青枝大貴、石井健、長谷田泰成 特願 2011-102045。

日本語総説

4. 【ワクチン基礎研究の最新動向と展望】
ワクチンアジュバント。青枝大貴、石井健。日本臨床 69 巻 9 号
Page1547-53(2011.09)

書籍

1. 完全版マウス・ラット疾患モデル活用ハンドブック(秋山徹, 奥山隆平, 河府和義 / 編). 第 2 部 免疫 10 章 生体防御機構—Toll-like receptors ノックアウトマウス【青枝大貴 / 審良静男 / 石井 健】
羊土社、2010 年 12 月
2. アジュバント開発研究の新展開(監修: 石井健・山西弘一). 第 3 章 2.1 インフルエンザウイルスの内因性アジュバント.
小山正平、青枝大貴、シーエムシー出版、

課題 2. 注射型と粘膜型ワクチンの有効性、安全性における相違点の理論基盤構築

課題 3. ウイルス株間の防御抗原の交差反応性と防御効果についての科学的根拠とその応用

「経鼻インフルエンザワクチン効果に感染歴が与える影響についての研究」

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)

鈴木 忠樹(国立感染症研究所 感染病理部)

研究要旨： インフルエンザワクチン接種において、接種者のインフルエンザウイルス感染歴やワクチン接種歴が、誘導される免疫応答に影響を及ぼす可能性がある。経鼻投与型インフルエンザワクチンにおいて、先行する感染歴やワクチン接種歴が及ぼす影響は明らかになっていない。そこで、感染歴あるいはワクチン接種歴を有するマウスに経鼻投与型ワクチン接種を施し、誘導される抗体応答を検討した。その結果、ウイルス感染のみで誘導される気道粘膜上 IgA 抗体はその後のウイルス感染阻止には不十分であり、感染歴に加えて全粒子不活化ワクチンの追加接種がウイルスの感染防御に効果的であることが明らかになった。

A. 研究目的

2009 年、我々はこれまでの季節性インフルエンザウイルス[A(H1N1)]とは抗原性が大きく異なる新型インフルエンザウイルス[A(H1N1)pdm09]による世界的大流行(パンデミック)を経験した。この抗原性の違いにより、当初、新型インフルエンザウイルスに対するワクチンは 2 回の接種が推奨された。しかしながら、健康成人では 1 回の接種で十分な抗体応答がみられることが明らかとなった。健康成人は、これまでのインフルエンザウイルス感染やワクチン接種に依存した基礎免疫が既に構築されていると考えられ、その基礎免疫が今回のワクチン接種に影響を及ぼした結果と考えられる。

我々が研究中的経鼻投与型インフルエンザワクチンは、上気道粘膜上に分泌型 IgA 抗体を誘導することで、感染自体を阻止できることが明らかになっている。しかしながら、本ワクチン接種法において、既存の基礎免疫が及ぼす影響は現在明らかになっていない。そこで、本研究では経鼻投与型インフル

エンザワクチンにより誘導される抗体応答に対して、先行する感染あるいはワクチン接種が与える影響を検討した。

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) ウイルスおよびワクチン

従来の季節性インフルエンザウイルス H1N1 と比較して類似した抗原性を示す実験室株である A/Puerto Rico/8/34 (PR8 株、H1N1)、および季節性インフルエンザウイルス H1N1 と抗原性が大きく異なるマウス馴化新型インフルエンザウイルス A/Narita/1/09 (Narita 株、(H1N1)pdm09) を用いた。また、全粒子不活化ワクチンとして、ホ

ルマリンによる不活化処理を行った Narita 株を用いた。

3) ウイルス感染とワクチン接種

ウイルス感染歴あるいはワクチン接種歴を構築するため、PR8 株、Narita 株、あるいは Narita 株全粒子不活化ワクチンの接種を行った。マウス 1 匹あたり、ウイルス感染は 1000 pfu、ワクチン接種は総タンパク量 1 μg を片鼻 2 μl ずつ (計 4 μl) で接種した。両株のウイルスを本方法で上気道感染した場合には、ウイルスの増殖は感染 3 日前後で最大となり、その後 1 週間ほどで完全に排除されることがこれまでの実験から明らかになっている。その 3 週間後に、Narita 株の全粒子不活化ワクチンの接種を同様の方法により行った。

4) 攻撃ウイルス感染と採材

Narita 株全粒子不活化ワクチン 2 週後に、一匹あたり 1000 pfu の Narita 株の感染を行った。感染は、ウイルス液を片鼻 2 μl ずつ (計 4 μl) 滴下する上気道感染モデルにて行った。感染 3 日後に、安楽殺を行い血清および鼻腔洗浄液を回収した。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。

5) 血清および鼻腔浄液中の抗体応答の検討

バキュロウイルス発現系を用いて作製した A/Narita ウイルス組換えヘマグルチニン(HA)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 抗体応答を定量した。

6) 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 μl 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。

C. 研究結果

PR8 株、Narita 株、あるいは Narita 株全粒子不活化ワクチンを接種し、ウイルス感染歴あるいはワクチン接種歴を構築したマウスに対して、初回接種の 3 週間後に Narita 株の全粒子不活化ワクチンの経鼻接種を行った。この 2 週間後に Narita 株の攻撃感染を行い、感染 3 日目に血清および鼻腔洗浄液を回収した。

鼻腔洗浄液中に含まれるウイルスを測定したところ、PR8 株あるいは Narita 株の感染歴を有するマウスにおいて攻撃感染に用いた Narita 株のウイルス価の減少はみられなかった (図 1)。また、Narita 株の感染歴を有する群に対して Narita 株の全粒子不活化ワクチンの経鼻接種を行った群では、攻撃感染に用いた Narita 株の増殖は完全に抑えられた。しかしながら、PR8 株の感染歴を有し Narita 株の全粒子不活化ワクチンの接種を行った群では、感染歴のみを有する群と比較して有意に攻撃ウイルス Narita 株の増殖を抑制するものが完全に排除することができなかった (図 1)。この時、Narita 株全粒子不活化ワクチンの経鼻接種を 1 回のみ行った群、ならびに Narita 株ワクチン接種歴を有しさらに追加のワクチン接種を行った群においては、攻撃ウイルスの増殖はみられなかった (図 1)。

次に、Narita 株の HA (Narita HA) に特異的な血清中 IgG 抗体と鼻腔洗浄液中 IgA 抗体の定量を行った。血清中 IgG 抗体応答は、Narita 株の感染歴を有する群が、その後の Narita 株全粒子不活化ワクチンの経鼻接種の有無に関わらず最も高かつ

た(図 2A)。しかしながら、鼻腔洗浄液中 IgA 抗体応答は、Narita 株の感染履歴があり全粒子不活化ワクチンの経鼻接種を行った群で最も高かったのに対し、Narita 株の感染歴のみの群では IgA 抗体の応答が得られないことが明らかになった(図 2B)。さらに、Narita 株の全粒子不活化ワクチン経鼻接種 1 回のみ群と比較した場合、以前に同ワクチンの接種歴がある場合は高い Narita HA 特異的血清中 IgG 抗体ならびに鼻腔洗浄液中 IgA 抗体応答が得られたが、PR8 感染歴がある場合はこれらの抗体応答が低下することが明らかになった(図 2A、2B)。

D. 考察

本研究では、経鼻投与型インフルエンザワクチン接種において、以前のウイルス感染歴やワクチン接種歴が与える影響を検討した。

一度感染が成立したウイルスに対しては、ウイルス特異的な抗体産生形質細胞や記憶 B 細胞が免疫記憶として残るため、再感染時には速やかな抗体応答が誘導されウイルスは排除されるものと考えられている。しかしながら本研究では、一度 Narita 株の感染を経験したマウスに対して、同株の再感染を行った場合、ウイルスの増殖を抑制できないことが明らかとなった。これは、これら個体においては Narita HA 特異的血清中 IgG 抗体応答がみられるのに対して、感染の阻止に働く上気道粘膜上への Narita HA 特異的 IgA 抗体の応答がみられないことが原因と考えられる。また、Narita 株の全粒子不活化ワクチンの経鼻接種を行う以前に同株の感染履歴がある個体は、同株のワクチン接種歴がある個体と比較して、高い Narita HA 特異的 IgG および IgA 抗体応答がみられることが明らかとなった。これらの結果は、あるインフルエンザウイルスの感染歴を有する個体は、同じウイルス株の感染を阻止することができないことを示し、十分な防御効果を得るためには抗原性の類似したウイルス株の全粒子不活化ワクチンの追加経鼻接種が有効であると考えられ

る。

また、Narita 株全粒子不活化ワクチンの経鼻接種 1 回で得られる Narita HA 特異的 IgG および IgA 抗体応答は、先行する抗原性の大きく異なる PR8 株の感染歴により低下することが明らかになった。これに伴い、攻撃感染後のウイルス増殖抑制効果が低下した。同じ亜型に属するインフルエンザウイルスでも、株によって大きく特性が異なることが知られているため、様々なウイルス株の組み合わせで検討を行う必要があると思われる。

E. 結論

マウスを用いた実験において、Narita 株感染で獲得される免疫応答(抗体応答)は、Narita 株の再感染防御には不十分であった。また、感染防御に有効な分泌型 IgA 抗体応答は、Narita 株全粒子不活化ワクチンの経鼻接種以前に、同株の感染歴がある場合は増強され、大きく抗原性の異なる PR8 株の感染歴がある場合は逆に抑制されることが明らかになった。この事実は、感染歴によってはその後のワクチン効果が十分得られないことを示唆しており、経鼻投与型インフルエンザワクチンの開発において今後十分に検討する必要がある。

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 Aina, 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 Aina, 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 Aina, 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 Aina, 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 Aina, 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 Aina, 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 Aina, 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