

11. Masayuki Saijo, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, Noriyo Nagata, Naoko Yoshikawa, Hideki Hasegawa, Shuetsu Fukushi, Tetsuya Mizutani, Tetsutaro Sata, Ichiro Kurane, Shigeru Morikawa
 IMMUNE RESPONSES AGAINST EEV AND IMV IN NON-HUMAN PRIMATES INFECTED WITH MONKEYPOX VIRUS OR VACCINATED WITH A HIGHLY ATTENUATED SMALLPOX VACCINE LC16M8 AND PROTECTION FROM LETHAL MONKEYPOX XV
 International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
12. Noriyo Nagata, Naoko Iwata, Hideki Hasegawa, Yuko Sato, Shigeru Morikawa, Tetsutaro Sata,
 INTERFERON GAMMA PROTECTS ADULT BALB/MICE FROM LETHAL RESPIRATORY ILLNESS AFTER MOUSEADAPTED SARS-COV INFECTION XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
13. 長谷川秀樹 感染防御に効くインフルエンザワクチンを目指して 第15回日本ワクチン学会学術集会 2011年12月東京
14. 相内章、浅沼秀樹、谷本武史、小田切孝人、田村慎一、田代真人、長谷川秀樹 2009/10 季節性インフルエンザワクチンの経鼻投与による A/H1N1pdm09 ウイルスの感染防御第15回日本ワクチン学会学術集会 2011年12月東京
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得(出願)
1. 特許第 4817625 号
 粘膜免疫誘導アジュバントを含む新規ワクチン
 登録日平成 23 年 9 月 9 日
2. 特許第 4909264 号
 経鼻ワクチン 登録日平成 24 年 1 月 20 日
2. 実用新案登録
 なし

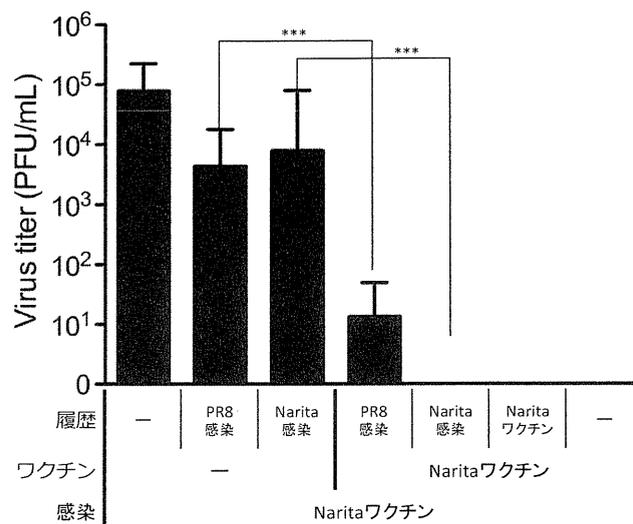


図 1. Narita 株攻撃感染 3 日後の鼻腔洗浄液におけるウイルス価
鼻腔洗浄液中のウイルス価をプラークアッセイ法により測定した。

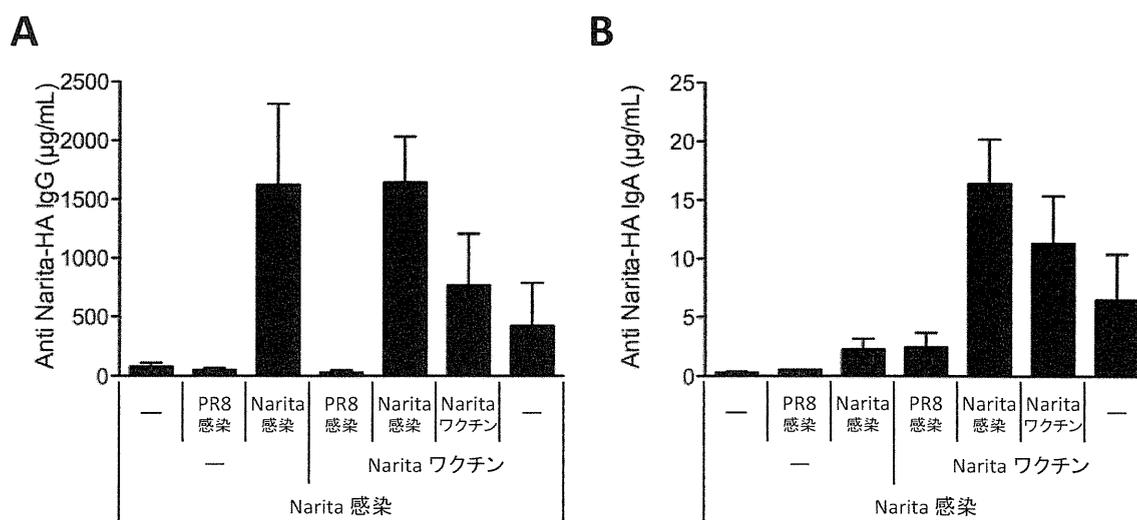


図 2. 攻撃感染 3 日後の Narita HA 特異的抗体応答
血清中 IgG 抗体(A)、および鼻腔洗浄液中 IgA 抗体応答(B)を ELISA 法により定量した。

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

(分担) 迫田 義博 北海道大学大学院獣医学研究科 動物疾病制御学講座准教授

要旨: 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。H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスは、家禽に対するワクチンを常用している国で抗原変異株が出現している。そのため準備するワクチンは、幅広い抗原性のH5N1ウイルスに対して有効であることが望まれる。そこで、近年国内外で分離されたH5N1ウイルスの遺伝子と抗原性の解析を行い、その多様性を把握した。その結果、2011年に分離されたH5N1ウイルスも抗原変異株であることがわかった。ニワトリを用いた感染実験の成績から、ワクチンの抗原量を増やすことにより抗原変異株で攻撃しても発症を抑えることがわかった。以上より、野外株と抗原性が完全に一致していなくても、ワクチンの形状、抗原量、投与方法、アジュバントなどをうまく組み合わせることによって発症防御効果を誘導できることを明らかにした。

A. 研究目的

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。特に、新型インフルエンザウイルスの出現に備えたワクチンの準備として、H5亜型ウイルスに対する安全で有効性の高いワクチンの開発が必要である。しかし、H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスは、家禽に対するワクチンを常用している国で抗原変異株が出現している。そのため準備するワクチンは、幅広い抗原性のH5N1ウイルスに対して効果があることが望まれる。そこで、ワクチン株と抗原性が異なるH5N1ウイルスに対しても効果が認められるようなワクチンの種類、投与方法、アジュバントなどを検討する必要がある。そこでまず、現在世界で流行しているH5N1亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルス感染症のサーベイランスを実施し、分離ウイルスの遺伝子と抗原性の解析を行う。さらにこれらの成績を考慮したワクチン株の選抜、ワクチンの種類、投与方法、アジュバントなどを詳細に検討する。これらの研究は、H5亜型のみならず、H9やH7亜型ウイルスなど、新型インフルエンザウイルスとして出現する可能性が高いウイルスに対するワクチン開発戦略に有用な生物学的、医学的理論基盤を構築することができる。

B. 研究方法

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を過去に分離されたウイルスのそれと比較した。

野生水禽から分離された非病原性鳥インフルエンザウイルス由来のワクチン株 A/duck/Hokkaido/Vac-3/2007 (H5N1) (Vac-3) でニワトリ用の不活化全粒子オイルアジュバントワクチンを試製した。ワクチン試製の際には通常の抗原量(256HA相当)の3倍量の抗原 (768HA相当)を含むものを準備した。免疫後、クレード2.3.4に属するA/peregrine falcon/Hong Kong/810/2009 (H5N1) (Pf/HK/09) で攻撃し、臨床症状を14日間観察した。

C. 研究結果

家禽と野鳥の気管ぬぐい液および糞便10,166検体から合計144株のインフルエンザウイルスを分離同定した。これらのウイルスのH1からH8とH10およびH11の合計の10の亜型に、NA亜型はN1からN9のすべての亜型に区分された。ベトナムで分離されたウイルスの大半はH6亜型のウイルス (51株)であったが、H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスも分離されたウイルスにはH5N1亜型のウイルス (17株) も含まれていた。これらの分離ウイルスは当研究室のウイルス株ライブラリー (<http://virusdb.czc.hokudai.ac.jp/>) に追加保存された。これにより、自然界から分離された68通りのウイルスに、76通りの実験室内作出株を加え、16のHA亜型と9のNA亜型の組み合わせ

144通りすべてをライブラリーに系統保存した。

2011年ベトナムで分離されたH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスは、遺伝子型でクレード1.1と2.3.2.1に分類された。このクレード1.1と2.3.2.1のウイルスの抗原性を1996年香港で初めて出現したH5N1ウイルスのそれとHI試験で比較したところ、これらの株は1996年の分離株と比べ抗原性に大きな差があることがわかった。分離されたクレード1.1のウイルスは2004年にベトナムで分離されたクレード1のウイルスの子孫と考えられるが、中和エピトープを中心にアミノ酸置換が多く、抗原変異が加速していることがわかった。この抗原変異には家禽におけるワクチン接種が強く関わっていると考えられる。

通常量の抗原を含むVac-3ワクチンを接種した鶏をPf/HK/09株で攻撃したところ、12羽中2羽が攻撃株の体内増殖により死亡した。しかし、通常の3倍量の抗原を含むワクチンを接種したニワトリは、少量のウイルス排泄は認められるものの、ニワトリは臨床症状を示すことなくすべて生残した。この成績から、抗原性の離れたクレード2.3.4のウイルスに対しては不活化全粒子ワクチンに含まれる抗原量を増やすことにより発症予防効果を誘導できることがわかった。

D. 考察

抗原変異株に対しても有効なワクチン株の選定、ワクチンの種類、抗原量、投与方法、アジュバントによる免疫誘導を詳細に検討していく必要があることを確認した。特に本年は、ワクチンに含まれる抗原量の重要性を確認したことを考えると、ワクチン候補株の発育鶏卵や培養細胞での増殖性はワクチン株選抜において重要な基準になることがわかった。

E. 結論

抗原性を考慮したワクチン株の選抜、ワクチンの種類、投与方法、アジュバントなどが今後の検討課題になると考えられる。これらの研究を進めることにより、新型インフルエンザウイルスとして出現する可能性が高いウイルスに対するワクチン開発戦略に有用な生物学的、医学的理論基盤を構築することが可能となる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Soda K, Cheng MC, Yoshida H, Endo M, Lee SH, Okamatsu M, Sakoda Y, Wang CH and Kida H. (2011) A Low Pathogenic H5N2 Influenza

Virus Isolated in Taiwan Acquired High Pathogenicity by Consecutive Passages in Chickens. *J Vet Med Sci* 73, 767-772.

- (2) Soda K, Asakura S, Okamatsu M, Sakoda Y and Kida H. (2011) H9N2 influenza virus acquires intravenous pathogenicity on the introduction of a pair of di-basic amino acid residues at the cleavage site of the hemagglutinin and consecutive passages in chickens. *Virology* 438, 64.
- (3) Samad RA, Sakoda Y, Tsuda Y, Simulundu E, Manzoor R, Okamatsu M, Ito K and Kida H. (2011) Virological surveillance and phylogenetic analysis of the PB2 genes of influenza viruses isolated from wild water birds flying from their nesting lakes in Siberia to Hokkaido, Japan in autumn. *Jpn J Vet Res* 59, 15-22.
- (4) Samad RA, Nomura N, Tsuda Y, Manzoor R, Kajihara M, Tomabechi D, Sasaki T, Kokumai N, Ohgitani T, Okamatsu M, Takada A, Sakoda Y and Kida H. (2011) 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.
- (5) Sakoda Y, Ito H, Uchida Y, Okamatsu M, Yamamoto N, Soda K, Nomura N, Kuribayashi S, Shichinohe S, Sunden Y, Umemura T, Usui T, Ozaki H, Yamaguchi T, Murase T, Ito T, Saito T, Takada A and Kida H. (2012) Reintroduction of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus by migratory water birds, causing poultry outbreaks in 2010-2011 winter season in Japan. *J Gen Virol* 93, 541-550.
- (6) Nomura N, Sakoda Y, Soda K, Okamatsu M and Kida H. (2012) An H9N2 influenza virus vaccine prepared from a nonpathogenic isolate from a migratory duck confers protective immunity in mice against challenge with an H9N2 virus isolated from a girl in Hong Kong. *J Vet*

Med Sci, *in press*.

- (7) Nomura N, Sakoda Y, Endo M, Yoshida H, Yamamoto N, Okamatsu M, Sakurai K, Hoang NV, Nguyen LV, Chu HD, Tien TN and Kida H. (2012) Characterization of avian influenza viruses isolated from domestic ducks in Vietnam in 2009 and 2010. Arch Virol 157, 247-257.
- (8) Kajihara M, Matsuno K, Simulundu E, Muramatsu M, Noyori O, Manzoor R, Nakayama E, Igarashi M, Tomabechei D, Yoshida R, Okamatsu M, Sakoda Y, Ito K, Kida H and Takada A. (2011) An H5N1 highly pathogenic avian influenza virus that invaded Japan through waterfowl migration. Jpn J Vet Res 59, 89-100.
- (9) Isoda N, Sakoda Y, Okamatsu M, Tsuda Y and Kida H. (2011) Improvement of the H5N1 influenza virus vaccine strain to decrease the pathogenicity in chicken embryos. Arch Virol 156, 557-563.

2. 学会発表

- (1) 「Rapid replication of H7 highly pathogenic avian influenza virus induces hyper expressions of cytokine mRNAs, leading sudden death of chickens」S. Kuribayashi, Y. Sakoda, M. Okamatsu, T. Umemura, H. Kida KEYSTONE SYMPOSIA-Pathogenesis of Influenza: Virus-Host Interactions (2011年、香港)
- (2) 「Potency of an inactivated avian influenza vaccine prepared from a non pathogenic H5N1 virus against the challenge with an antigenically drifted virus of clade 2.3.4」 S. Shichinohe, Y. Sakoda, N. Yamamoto, M. Okamatsu, Y. Noda, Y. Nomoto, T. Honda, Y. Takigawa, H. Kida KEYSTONE SYMPOSIA-Pathogenesis of Influenza: Virus-Host Interactions (2011年、香港)
- (3) 「H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses have perpetuated at their nesting lakes in Siberia?」 Y. Sakoda, M. Kajihara, S. Sugar, M. Okamatsu, R. Sodnomdarjaa, K. Ito, A. Takada, H. Kida KEYSTONE SYMPOSIA-Pathogenesis of Influenza: Virus-Host Interactions (2011年、香港)

- (4) 「2010-2011年に日本で野鳥から分離されたH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルス」岡松正敏、伊藤啓史、内田裕子、迫田義博、山本直樹、曾田公輔、笛吹達史、尾崎弘一、山口剛士、村瀬敏之、高田礼人、伊藤壽啓、西藤岳彦、喜田宏 第152回日本獣医学会学術集会 (2011年、大阪)
- (5) 「H5N1非病原性鳥インフルエンザウイルスを用いて試製したワクチンの異なる系統のウイルス攻撃に対する効果」七戸新太郎、岡松正敏、山本直樹、野田優、野元由佳、瀧川義康、迫田義博、喜田宏第152回日本獣医学会学術集会 (2011年、大阪)
- (6) 「カモの非病原性インフルエンザウイルスがニワトリに感染し増殖する条件」日尾野隆大、岡松正敏、迫田義博、喜田宏 第152回日本獣医学会学術集会 (2011年、大阪)
- (7) 「Characterization of H9N2 influenza viruses isolated from domestic ducks in Vietnam in 2009 and 2010」 N. Nomura, Y. Sakoda, M. Endo, H. Yoshida, N. Yamamoto, M. Okamatsu, K. Sakurai, Hoang Van Nam, Ngyuyen Van Long, Chu Duc Huy, Tien Ngoc Tien, H. Kida 第59回日本ウイルス学会学術集会、国際微生物学連合2011会議 (2011年、札幌)
- (8) 「Rapid replication of H7 highly pathogenic avian influenza virus induces hyper expression of cytokine mRNA in chickens」 S. Kuribayashi, Y. Sakoda, M. Okamatsu, T. Umemura, H. Kida 第59回日本ウイルス学会学術集会、国際微生物学連合2011会議 (2011年、札幌)
- (9) 「Potency of an inactivated avian influenza vaccine prepared from a non-pathogenic H5N1 virus against the challenge with an antigenically drifted virus of clade 2.3.4」 S. Shichinohe, Y. Sakoda, N. Yamamoto, M. Okamatsu, Y. Noda, Y. Nomoto, T. Honda, Y. Takigawa, H. Kida 第59回日本ウイルス学会学術集会、国際微生物学連合2011会議 (2011年、札幌)
- (10) 「H5N1 highly pathogenic avian influenza virus infections in wild birds and poultry in 2010-2011 winter season in Japan」 Y. Sakoda, H. Ito, Y. Uchida, T. Saito, T. Ito, H. Kida

第59回日本ウイルス学会学術集会、国際微生物学連合2011会議（2011年、札幌）

- (11) 「Brisk growth of H7 highly pathogenic avian influenza virus induces hyper expression of cytokine mRNA in chickens」 S. Kuribayashi, Y. Sako da, T. Tanaka, T. Kawasaki, N. Yamamoto, N. Isoda, Y. Tsuda, M. Okamatsu, T. Umemura, H. Kida 15th US-Japan Acute Respiratory Infections Panel Meeting (2011年、和歌山)

G. 知的財産の出願、登録状況

予定なし。

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

研究分担者 : 中山哲夫、熊谷卓司、庵原俊昭

【研究要旨】

H5N1 パンデミックワクチンは全粒子不活化抗原にアルミアジュバントを添加したワクチンが製造され成人では副反応を少なく中和抗体の陽転率は 70%以上を示し製造承認をえた。しかし同じワクチンを小児に臨床試験を行ったところ、中和抗体は成人よりも良好な反応を示したが、ワクチン接種後の発熱率が小児では 50-60%と高く申請は取り消した。H5N1 パンデミックワクチン接種前後の血清について同意文書を取り直し IgG subclass 抗体の変動を検討した。H5N1 パンデミックワクチンは Reverse genetics 法で作製され外殻タンパクは H5N1 で内部タンパクは PR8/H1N1 に由来している。IgG1 抗体は 67/193(34.7%) , IgG4 は 42/193(21.8%)において有意な上昇を認め 6 歳以下において良好な反応を示した。7 歳以上の血清の大部分は接種前から陽性で接種後の血清において有意な上昇は認めなかった。7 歳を境にインフルエンザワクチンに対する反応には差が認められアルミアジュバントを用いた H5N1 パンデミックウイルス全粒子不活化は 1 回のワクチン接種で既往歴のない乳幼児にも抗体誘導を示し、自然感染と同様の免疫応答を示した。

分担研究者	所属	氏名
北里生命科学研究所		中山哲夫
くまがい小児科		熊谷卓司
国立病院機構三重病院		庵原俊昭

A.研究目的

インフルエンザ感染の診断には通常 HI 抗体が測定され、ワクチンの効果判定も HI 抗体法が行われ 1:40 以上で感染防御に有効に働くといわれている。H5N1 パンデミックワクチンは全粒子不活化+アルミニウムアジュバントの製剤で製造され、成人の臨床試験の結果、抗体反応は弱いものの 2 回接種で中和抗体価の 4 倍以上の上昇が 70%に認められ製造承認が得られた。小児での臨床試験の結果では特に 6 歳以下の幼児では 60%に発熱が認められた。一方、抗体反応は成人に比較して予想外に良好な成績であった。こうした抗体反応の差、ワクチンの副反応として発熱の頻度の差を解明することは重要な課題であるとともに小児での反応を科学的に解明することはより有効で安全なインフルエンザワクチンの開発につな

がるものである。ヒトでインフルエンザ感染に対する IgG subclass 応答を系統的に検討した成績は殆ど見られない。昨年度の研究班では 2009-10 年の H1N1 パンデミックに罹患した小児 53 例と、ワクチン接種を受けた医療機関従事者 74 例から接種前後に血清検体をシリーズで採取し HI 抗体、中和抗体、インフルエンザウイルス特異的 IgG subclass 抗体の獲得過程を検討した。H1N1 パンデミックインフルエンザ罹患小児においては IgG1, IgG3, IgG4 subclass 抗体に有意な変動を認めたが、ワクチン接種者では IgG1 抗体のみで IgG4 抗体の有意な上昇が観察されなかった。

マウスではインフルエンザワクチン接種により Th1 応答では IgG2 subclass 抗体が上昇し、IgG subclass 抗体を解析することで Th1, Th2 応答を解析できるがヒトにおいて IgG1 は Th1,

Th2 応答で、IgG4 は Th2 応答によるといわれている。アジュバント添加全粒子不活化 H5N1 パンデミックワクチン接種後の IgG subclass 抗体を測定し、パンデミック 2009 H1N1 パンデミックワクチンと H1N1 パンデミック自然感染例と比較検討し、年齢別の抗体反応を検討することでインフルエンザワクチンあり方を考えた。

B. 研究方法

(1) 研究対象

対象はパンデミックワクチンの小児臨床試験に参加した 374 例のうち IgG subclass 抗体の測定について再同意の得られた 193 例を対象とした。また、再同意の得られた一部成人の血清を使用した。

(2) ウイルス抗原

インフルエンザウイルス H5N1 抗原は HA, NA タンパクは 2004 Vietnam 株、内部タンパクは PR8 由来の reverse genetics (RG) 法により NIBR で作製された H5N1 パンデミックワクチン NIBRG-14 を使用した。

(3) IgG subclass 抗体価測定

96 穴 ELISA plate に 33 µg HA/well の influenza virus 抗原を 4°C overnight 静置し固相化した。翌日洗浄後、Blocking One (Nacalai Tesque) を添加し 4°C 45 分間静置して post-coating をおこなった。洗浄、被検血清を添加した。IgG1, 2, 4 の測定は血清希釈 1:200 から、IgG3 の測定は血清希釈 1:20 から 2 倍階段希釈し、60 分静置した。洗浄後、HRP- conjugated goat anti-human IgG (H+L) IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 (Invitrogen) を添加し 4°C overnight 静置、o-Phenylene-diamine で発色させ、microplate reader (O.D. 450/630) で吸光度を測定。検量線を作製し抗原非添加 well の

吸光度の 2 倍を示す血清希釈倍数を 2 の指数として表示した。

(倫理面への配慮) 本研究は国立病院機構三重病院の倫理委員会で承認された。H5N1 の臨床試験で保存してあった血清の IgG subclass EIA 抗体の再検査に関しては再同意の得られた例のみを対象とした。

C. 研究結果

1) 中和抗体の再評価

臨床試験の結果を発熱に注目して再解析し結果を表 1 に示した。H5N1 パンデミックワクチンを接種した成人の中和抗体陽転率は筋注接種群で 140/169 (82.8%)、皮下接種群で 120/168 (71.4%) を示し発熱を認めた例は両群とも 2% 以下であった。小児では 374 例全例が抗体を獲得した。しかしながら、37.5°C 以上の発熱を認めた例は 203/374 (54%) で、特に 38°C 以上の高熱は 147/374 (39%) と高率に発熱を認めた。年齢別の 37.5°C 以上の発熱率を検討すると 1 歳以下では 5/5 (100%)、1-3 歳では 68/92 (74%)、4-6 歳では 57/90 (63%)、7-12 歳では 63/134 (47%)、13 歳以上では 10/53 (19%) と年齢が上がると発熱率が下がってくるということがわかった。

次に発熱と抗体反応の関係を調べると発熱を認めた 200 例の平均抗体価は $10 \times 2^{3.56 \pm 1.30}$ (95%CI: $10 \times 2^{3.38-3.73}$) と発熱を認めなかった 170 例の平均抗体価は $10 \times 2^{2.76 \pm 1.26}$ (95%CI: $10 \times 2^{2.58-2.95}$) で有意に高い抗体反応を示した。また、発熱の程度と相関して高熱を認めた例ほど高い抗体反応を示した。

表1 H5N1 パンデミックワクチン接種後の発熱と中和抗体価の関係

H5N1 pandemic vaccine の免疫原性と発熱

成人 337 例	NT抗体で変化率4倍以上	140/169 (82.8%) im
		120/168 (71.4%) sc
小児 374 例		374/374 (100%)
	N=	Fever +
<1 year	5	5 (100%)
1-3 years	92	68 (74%)
4-6 years	90	57 (63%)
7-12 years	134	63 (47%)
≥13 years	53	10 (19%)
Total	374	203 (54%)
		>38 C
		5 (100%)
		52 (57%)
		48 (53%)
		39 (29%)
		3 (6%)
		147 (39%)
	N=	Mean ± SD
Fever -	170	2.76 ± 1.26
Fever +	200	3.56 ± 1.30
>37.5	56	3.11 ± 1.27
>38	79	3.53 ± 1.32
>39	65	3.98 ± 1.17
		95% CI
		2.58 - 2.95
		3.38 - 3.74
		2.77 - 3.45
		3.24 - 3.82
		3.70 - 4.27

小児の臨床試験は厚生労働省科学研究費補助金による日本医師会の治験推進研究事業により実施した。

2) IgG subclass 抗体

IgG subclass は血中濃度としては IgG 1 がもっと最も多く IgG2, IgG3 はほぼ同じレベルで IgG4 の量は最も少ない。H5N1 パンデミックワクチン接種前 1 回接種後 1 か月後の 2 回目接種前、2 回接種 1 か月後で採血し IgG1 インフルエンザ IgG EIA 抗体を図 1 に示した。接種前 100X2⁶以上の陽

性血清においては接種後の EIA 抗体は 1 回接種後、2 回接種後でも変化はなかった。一方、100X2⁴以下の血清では 1 回接種後でも良好な抗体反応を示した。一方成人の血清の IgG1 EIA 抗体は接種前から高い値を示し 2 回接種後でも抗体反応は認めなかった。

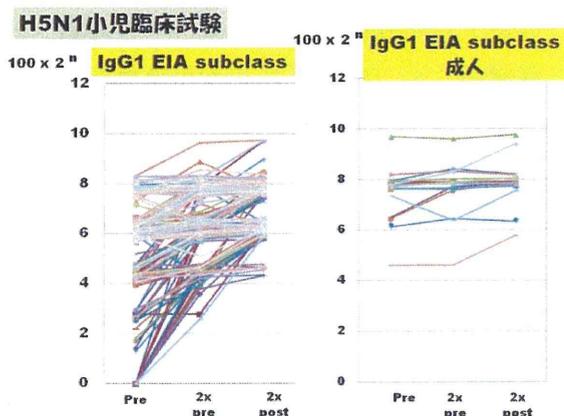


図 1. H5N1 パンデミックワクチン接種前後の IgG1 EIA 抗体の推移

小児における H5N1 パンデミックワクチンの抗体反応を 2009 年 H1N1 パンデミックワクチン接種前後、2009 年 H1N1 パンデミックインフルエンザの自然感染例の IgG subclass 抗体の推移を昨年度に報告し比較

して図 2 に示した。2009 年 H1N1 パンデミック自然感染例は小児では 2 週後に抗体反応を認める群、4 週後に陽転する群に分かれていた。接種前に高い抗体価を示した例でも抗体反応を示した例も認められた。

2009 パンデミックワクチン接種成人例では接種前抗体陽性例が多く 1 回ワクチン接種 2, 4 週後でも大きな変動は示す例は少な

かった。H5N1 パンデミックワクチンは接種前に高値の例では変動しないものの 1 回接種 4 週で良好な抗体反応を示した。

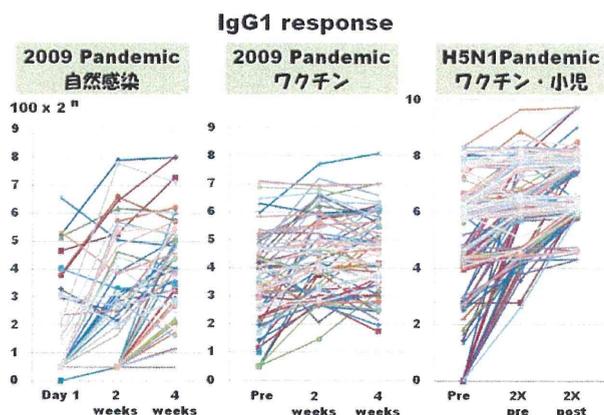


図 2. 2009 パンデミック自然感染、ワクチン接種、H5N1 パンデミックワクチンの免疫応答の比較

3) 年齢別 IgG1 抗体の推移

2009H1N1 パンデミックウイルスは今まで近縁ウイルスがヒトに感染したことがあるウイルスで成人のワクチン接種例では接種前から IgG1 EIA 抗体が陽性であった。一方、H5N1 パンデミックウイルスはヒトに感染の歴史がないにもかかわらず接種前から IgG1 EIA 抗体が検出された。H5N1 パンデミックワクチンは RG 法で作製され内部タンパクは PR8 (H1N1)である。EIA 抗原は全粒子不活化抗原であるが内部タンパクは PR8/H1N1 である。図 1 に示したように小児でも接種前に抗体陽性例が認められた。IgG1EIA 抗体の年齢別の抗体反応を図 3 に

示した。<1 歳-3 歳、3-6 歳、7-12 歳、>13 歳の 4 群に分けて検討した。3 歳までは接種前の抗体は 100×2^6 以下の例が多く H5N1 パンデミックワクチン接種により 4 倍以上の抗体応答を認めた。4-6 歳群では接種前から 100×2^6 以上の抗体価を示す例が多くなりワクチン接種後に抗体反応を認めない例が増えてくる。7 歳以上では多くの例において接種前から高い抗体価を示し 4 倍以上の反応は認めず、年齢が上がるにつれて EIA 抗体反応を認める例が減少した。13 歳以上の EIA 抗体反応は成人における反応と同様に接種前から高値を示し EIA 抗体反応は認められなかった。

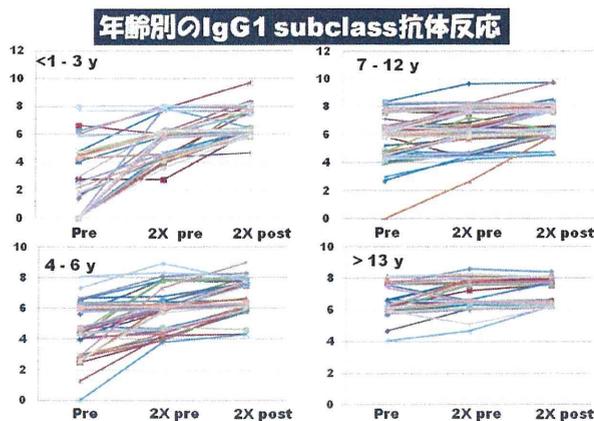


図 3. 年齢別の EIA 抗体反応

4) IgG4 抗体の推移

IgG4 EIA 抗体の推移を H5N1 パンデミック ワクチン接種前後、2009H1N1 パンデミック 自然感染の小児、2009H1N1 パンデミック ワクチンを接種した成人例を比較して 図 4 に示した。

2009H1N1 パンデミック ワクチン接種の 成人例では接種前、2 週後、4 週後での抗体

反応は認めなかった。一方、2009 パンデミック 自然感染では接種前の抗体が 100×2^4 以上と比較的高い抗体でも罹患後 2 週、4 週で抗体反応を認めた。H5N1 パンデミック ワクチン接種後では 134/193 (69.4%) では IgG4 抗体反応は認められなかったが、42/193 (21.8%) で 4 倍以上の抗体反応を認めた。

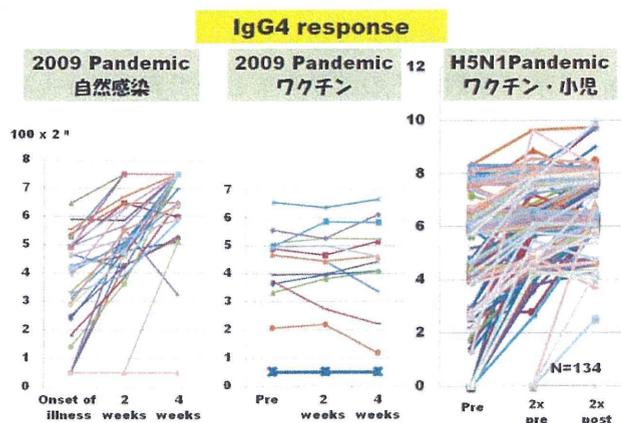


図 3. IgG4 抗体反応の比較

H5N1 パンデミック ワクチン接種前後、2009H1N1 パンデミック 自然感染の小児、2009H1N1 パンデミック ワクチンを接種した成人例における IgG subclass 抗体反応をまとめて表 2 に示した。自然感染例では中和抗体陽転率は 50/53(94.3%)を示し、

IgG2 は 2 例、IgG3 は 16/53 (30.2%)、IgG4 は 24/53 (45.3%)において有意な抗体反応を示した。H1N1 パンデミック ワクチンでは IgG4 の抗体応答は認めなかった。H5N1 パンデミック ワクチンでは IgG1 67/193 (34.7%)、IgG4 では 42/193 (21.8%)の抗体

反応を示し、2009H1N1 パンデミックの自然感染の反応に近い抗体応答パターンを示した。

表 2. IgG subclass EIA 抗体反応の比較

IgG subclass抗体の検出のまとめ

	NT	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
2009 Pdm 自然感染(n=53)	50 (94.3%)	42 (79.2%)	2 (3.8%)	16 (30.2%)	24 (45.3%)
2009 Pdm Vac. split(n=74)	55 (74.3%)	23 (41.8%)	6 (8.1%)	12 (16.2%)	0 (0%)
H5 WIV Alum Vac. 小児(n=193)	193 (100%)	67 (34.7%)	12 (6.2%)	4 (2.1%)	42 (21.8%)
H5 WIV Alum Vac. 成人(n=19)	19 (100%)	0 (0%)	1 (5.3%)	0 (0%)	2 (10.5%)

いずれも4倍以上の抗体応答

D. 考察

H5N1 パンデミックワクチンは成人において抗体反応は 70%前後と十分なものではなかったが発熱率は 2%と低く認可されて備蓄されている。同じワクチンを小児に接種すると 100%の抗体陽転率であったが 37.5°C以上の発熱が高率に認められた。発熱と抗体価の関係を再調査すると発熱を認めた群では接種後の抗体価が高く、発熱の程度が高い程高い抗体価を示した。

ワクチン接種による獲得免疫の誘導には自然免疫系への刺激が必須であり自然免疫系への刺

激は IFN- α/β の他に IL-1 β , IL-6, TNF- α の炎症性サイトカインが引き金となることが知られている。ヒト末梢リンパ球をインフルエンザ H5N1 全粒子不活化抗原にアルミアジュバントを加えた H5N1 パンデミックワクチン製剤 (H5WIV+Alum), H5N1 全粒子不活化抗原 (H5WIV), アルミアジュバント (Alum)、従来のスプリットワクチン (H5 split) 抗原で刺激し産生されるサイトカインプロファイルを昨年度に検討しその結果をまとめて表 3 に示した。

表 3 H5N1 ワクチン製剤によるサイトカイン産生能

	IL-1 β	IL-6	IL-17	IFN- γ	TNF- α	MCP-1
Control	26.8 (13.3-40.3)	86.9 (46.4-127.3)	26.4 (13.3-39.5)	73.5 (45.7-101.3)	224.1 (148.4-299.9)	194.1 (120.8-267.4)
Alum	36.3 (21.6-51.0)	71.8 (50.7-92.9)	40.3 (26.1-54.5)	75.1 (56.6-93.7)	151.4 (114.4-188.4)	294.8 (154.5-435.0)
H5 split	21.6 (12.3-30.8)	145.4 (88.3-202.5)	69.3 (38.0-100.6)	182.3 (118.8-245.7)	328.5 (226.9-430.2)	544.3 (299.9-788.6)
H5 WIV	50.1 (38.1-62.2)	503.6 (370.8-636.3)	180.0 (154.8-215.3)	354.4 (226.2-482.5)	843.4 (681.4-1005.4)	1452.5 (927.2-1977.8)
H5 WIV + Alum	142.7 (63.0-22.4)	467.6 (306.3-628.8)	159.2 (133.5-185.0)	274.8 (169.0-380.5)	624.0 (424.3-823.7)	1023.2 (576.5-1469.9)

Alum 単独のリンパ球刺激ではサイトカインの産生の増加はみとめず、H5 split では IL-6, IFN- γ , TNF- α の産生の増加が認められた。H5WIV 刺激では更に IL-6, IL-17, IFN- γ ,

TNF- α , MCP-1 のサイトカインの産生増加が認められた。H5WIV+Alumで刺激するとIL-1 β の産生の増加が認められた。他のサイトカインの産生は H5WIV 刺激と同じレベルであった。

IL-1 β , IL-6といった炎症性サイトカインはMHC II に提示される抗原と同時に認識される co-stimulatory molecule の発現を高めることで CD4 陽性の helper T 細胞に認識されやすくなり Th2 型の免疫応答を誘導することになる。

マウスにおいては IgG2 subclass 抗体の存在は Th1 応答を示唆するものであり IgG1 は Th2 優位の反応と考えられている。ヒトにおいては厳密には Th1, Th2 応答が区別されてなく IgG1 は Th1, Th2 応答で IgG4 が Th2 応答と考えられている。今回、解析した H5 パンデミックワクチンの小児臨床試験の結果は成人の結果と比較して良好な中和抗体を誘導しており IgG subclass の解析でも接種後 IgG1 EIA 抗体では 34.7%, IgG4 は 21.8%が 4 倍以上の抗体反応を示した。一方、2009 パンデミックの自然感染時では IgG1 が 79.2%、IgG4 が 45%に検出され、2009 パンデミックワクチンでは IgG1 抗体は 41.8%において 4 倍以上の EIA 抗体反応を認めたが IgG4 EIA 抗体の反応は認めなかった。サイトカイン応答の検討では split ワクチン製剤によるサイトカイン誘導は低く特に IL-1 β の誘導はなく MHC と共に認識される co-stimulatory molecule の発現が低く CD4 helper T 細胞に認識され難いため Th2 応答が低く IgG4 抗体の産生が認められないものと考えられる。H5WIV ではこうした炎症性サイトカインが産生され Th2 応答が誘導され H5N1WI+Alum のワクチン製剤では更に IFN- α , IL-1 β 産生の増加が認められ Th1/Th2 双方への刺激が入り、2009 パンデミック自然感染に近い応答を誘導したものと考えられる。H5N1WIV+Alum 製剤は自然感染に近い免疫応答を示しているものと考えられサイトカインの産生が免疫応答を誘導すると共に発熱にも関係しているものと考えられる。

IgG subclass 抗体誘導パターンは Th1 と Th2 のバランスを反映しておりサイトカイン産生が免疫応答を調節しておりワクチンの immunogenicity と immunotoxicity として

の発熱は表裏一体の反応としてワクチンの成分・アジュバントの自然免疫への刺激が関与している。WIV は粒子内の RNA が TLR7 のリガンドとして働き IFN- α を誘導し Alum は Inflammasome の NOD like receptor を刺激し IL-1 β を誘導する。H5N1 WIV+Alum 接種で発熱をきたし良好な免疫応答を示した小児の発熱時の血清サイトカイン profile を調査することが直接的な関連性を証明することになるが、発熱時期の血清は採取されてなく関連性を推測するにすぎない。H5N1WIV+Alum は IFN- α と共に IL-1 β , IL-6, TNF- α の炎症性サイトカインを誘導し Th1, Th2 双方の免疫応答を誘導するものと今回のサイトカインの産生と IgG subclass 抗体の解析からその関連性が推測される。

E. 結論

H5N1 パンデミックワクチン接種前後の血清 IgG subclass 抗体の変動を検討した。IgG1 抗体は 67/193(34.7%) , IgG4 は 42/193(21.8%)において有意な上昇を認め 6 歳以下において良好な反応を示した。7 歳以上での大多数の血清は接種前から陽性で接種後の血清において有意な上昇は認めなかった。7 歳を境にインフルエンザワクチンに対する反応には差が認められアルミアジュバントを用いた H5N1 パンデミックウイルス全粒子不活化は 1 回のワクチン接種で既往歴のない乳幼児にも抗体誘導を示し、自然感染と同様の免疫応答を示した。

F. 2011 年度研究業績

1 論文発表

- 1) Ji Yi-Xin, Ihara T, Komase K, Nakayama T. Amino acid substitutions in Matrix, Fusion, and Hemagglutinin proteins of wild measles virus for adaptation to Vero cells. Intervirology 54, 217-228, 2011.
- 2) Seki F, Yamada K, Nakatsu Y,

Okamura K, Yanagi Y, Nakayama T, Komase K, Takeda M. The SI strain of measles virus derived from a patient with subacute sclerosing panencephalitis possesses typical genome alterations and unique amino acid changes that modulate

receptor specificity and reduce membrane fusion activity. J Virol 85, 11871-11882, 2011.

2. 知的財産の出願、登録状況
なし

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

インフルエンザワクチン接種後アナフィラキシーの原因究明に関する検討

研究分担者：庵原俊昭、菅秀（国立病院機構三重病院）

研究要旨

インフルエンザワクチン接種後にアナフィラキシーをきたした2名の小児症例について原因精査を行った。アナフィラキシーを来したワクチンと、その成分となるウイルス、添加剤についての IgE 抗体の測定、活性化好塩基球(CD203c)の測定および皮膚のプリックテストを行った。2名ともに、プリックテスト、特異的 IgE、および活性化好塩基球試験においてワクチン溶液に対する陽性反応を示した。他社製ワクチンに対しても同様の反応であった。ワクチンコンポーネントに対する反応を検討した結果、インフルエンザウイルス抗原に対する特異的 IgE 抗体依存性のアレルギー反応であることが判明した。今後、健常人を含めた多数症例の解析を行うことにより、アナフィラキシー例に対する必要な検査、診断基準を明確にし、アナフィラキシーを起こした患者の今後のワクチン接種のリスクを軽減すること、更にはハイリスク者の予知およびリスクに応じた接種が可能になることが期待される。

A. 研究目的

ワクチン接種によるアナフィラキシーの診断には、皮膚テストや IgE 抗体などが報告されているが^{1,2}、ワクチンのどの成分によるものかの検討は少ない。薬剤アレルギーに関しては DLST や活性化好塩基球試験の有用性などの報告があるが^{3,4}、ワクチンについての検討は少ない。

本研究では、インフルエンザワクチン接種後にアナフィラキシーを来した症例について原因精査を行い、その原因を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

本研究において対象とした患者は、2011

年に A 社のインフルエンザワクチン接種後にアナフィラキシーをきたした、3歳男児と6歳男児の2名である。コントロールとして健常小児3名についても、同様のアレルギー検査を行った。

同意取得後、採血を行い、アナフィラキシーを来したワクチンと、その成分となるウイルス、添加剤についての IgE 抗体の測定、活性化好塩基球(CD203c)の測定および皮膚のプリックテストを行った。

使用製剤とワクチンコンポーネントを、表1に示した。各ワクチンの刺激濃度については、インフルエンザワクチンの HA 含量が各コンポーネントで大凡 30 μ gHA/ml であるため、ワクチンは原液を希釈してコン

ポーネントが 30 μ gHA/ml になるように調整してから使用した。

a. 皮膚テスト (プリックテスト)

陰性コントロールとして生理食塩水、陽性コントロールとしてヒスタミンを用いた。各ワクチンやその成分でプリックを行い、紅斑径、膨疹径を測定した。

b. 活性化好塩基球試験

陰性コントロールとして PBS、陽性コントロールとして IgE 抗体を用いて、各ワクチンやそのコンポーネントを抗原とした。Allergenicity kit を使用し、フローサイトメーターにより末梢血好塩基球の 3 カラー測定を行い、CD203+/CD3-/CD294+細胞分画を定量的に評価した。

c. 特異的 IgE 抗体測定

①抗原の蛋白量を 100ug/ml に調整してから固相。

②SuperBlocking Buffer でブロッキング

③ヒト抗体標準溶液または血清 (血漿) 検体で抗原抗体反応

④抗ヒト抗体 (ビオチン標識) で標識

⑤ストレプトアビジン溶液で結合

⑥吸光度を測定し定量。

C. 研究結果

皮膚テスト (プリックテスト)

プリックテストの結果 (各種ワクチンコンポーネントでの刺激による紅斑長径) を、図 1 に示した。Case1(6 歳男児)は、アナフィラキシーを来した A 社のインフルエンザワクチンに対して、陽性反応を示した (紅斑長径 19.0mm)。また、フェノキシエタノールフリーの A 社のインフルエンザワクチン、B 社のインフルエンザワクチン (士

フェノキシエタノール) に対しても、同程度の反応を示した。興味深いことに、H1N1 インフルエンザウイルスには強い反応を示したが、H3N2 および B インフルエンザウイルスには、極めて弱い反応しか示さなかった。Case2 (3 歳男児) も A 社インフルエンザワクチンに同程度強さの反応を示した。ウイルスタイプ別では、Case 1 とは対照的に、H1N1 には無反応であったが、H3N2 および B インフルエンザウイルスには陽性反応を示した。健常児 (Control 1 および 2) ではワクチンおよびそのコンポーネントに対して、ほとんど皮膚反応を示さなかった。ホルムアルデヒドに対する反応は非特異的刺激によるものと推察された。

抗原特異的 IgE 抗体測定

患者血清中の抗原特異的 IgE 抗体を、ELISA 法を用いて測定した。図 2 に示すように、Case1、2 ともにインフルエンザワクチン (およびウイルスそのもの) に対する特異的 IgE が血清中に存在することが明らかになった。ウイルスタイプ別の検討では、血清中 IgE 濃度とプリックテスト反応性に相関を認めた。

活性化好塩基球試験

CD203c はヌクレオチド分解酵素の一つであり、末梢血では好塩基球のみに発現し、IgE を介したアレルギー反応による好塩基球活性化表面マーカーである。今回、各種抗原刺激後 15 分、1 時間、24 時間後に患者血液中の好塩基球表面 CD203c 発現レベルを測定し、解析を行った。抗原は 4 段階の希釈系列を使用し、陽性コントロールとして anti-IgE 抗体、陰性コントロールと

して PBS を使用した。図 3 に Case1, 2 および Control 1 の CD203c 陽性細胞割合を示した。10%以上の発現を陽性として、赤字で示した。Case1 では、刺激後 15 分の時点でインフルエンザワクチン溶液およびウイルス溶液に対して抗原濃度依存性に好塩基球活性化が起こっていることが明らかになった。Case2 でも同様の活性化が観察されたが、その程度は Case1 に比して弱いものであった。またウイルスタイプ別の検討結果は、プリックテストおよび抗原特異的 IgE の結果と同様の傾向を示した。

D. 考察

ワクチンの副反応としてのアナフィラキシーは、ワクチン製剤のいずれかの成分に対して産生された IgE 抗体を介する即時型アレルギー反応である。その頻度は、例えばインフルエンザワクチンでは海外で 10 万接種につき 1.7 回⁵、日本で 61 万回接種当たり 1 回程度と多くはないが、発症が急激であること、ときに致死的事であることから適切な対応が求められる。接種の現場では不測のアナフィラキシー発症に対して、アドレナリン注射など迅速に対応できる体制を整えておくのは当然であるが、予防のためには、原因抗原（アレルゲン）を特定することが重要である。鶏卵アレルギー患者では発育鶏卵でウイルスを増殖させるインフルエンザワクチンがアナフィラキシーを起こしやすいとされてきたが、実際は、その精製過程でほとんどの卵白アレルゲンが除去されるためほとんどの例では安全に接種できる。一方で、原因が特定されないアナフィラキシー例は確かにあり、インフルエンザワクチンでは 2009 年のパンデミ

ック以来の H1N1pdm の抗原を含む製剤でアナフィラキシーが多いのではないかとの懸念がある。さらに、最近では Hib ワクチンや肺炎球菌ワクチン、ロタウイルスワクチン等、乳幼児期に接種するワクチンの種類が増え、同時接種も必要になっていることから、ワクチンによるアナフィラキシーの原因究明は急務である。

本研究では、インフルエンザワクチン接種後にアナフィラキシーを起こした 2 名の小児患者を対象に、3 種類のアレルギー検査を実施し、原因抗原について検討を行った。

2 名ともに、プリックテスト、特異的 IgE、および活性化好塩基球試験においてワクチン溶液に対する陽性反応を示した。他社製ワクチンに対しても同様の反応であった。ワクチンコンポーネントに対する反応を検討した結果、インフルエンザウイルス抗原に対する特異的 IgE 抗体依存性のアレルギー反応であることが判明した。ウイルス特異的 IgE 抗体産生のメカニズムは現時点では不明であり、アナフィラキシー発症との関連を含めて今後の検討課題である。

インフルエンザワクチンでは、製造会社により、チメロサルやフェノキシエタノールが添加剤として使用されている。フェノキシエタノールに対するアレルギーを皮膚反応で証明している報告がある一方で⁶、フェノキシエタノールは接触性皮膚炎の原因薬剤に添加されていても影響は無い⁷、と報告されているものもある。今回の検討では、チメロサルやフェノキシエタノールに対する特異的アレルギー反応は検出されず、アナフィラキシーを起こした原因として添加剤の影響は不明であった。

今回実施した検査の中で、一つの検査を行うのみで診断できるほど確立されたものはまだなく、正常値も確立されていない。IgE 抗体が証明されることと、実際にアナフィラキシーを起こすことは必ずしも一致しないことから、今後はいくつかの検査を組み合わせ、症状が誘発されない健常人と比較することで検討する予定である。これらの検討により、アナフィラキシーを起こした患者の今後のワクチン接種のリスクを軽減することができる。さらに、アナフィラキシー例に対する必要な検査、診断基準が明確になれば、ワクチン接種のハイリスク者を予知することができ、リスクに応じた接種が可能になることが期待できる。

E. 結論

インフルエンザワクチン接種後にアナフィラキシーをきたした2名の小児症例について、原因精査を行った。2名ともに、プリックテスト、特異的 IgE、および活性化好塩基球試験においてワクチン溶液に対する陽性反応を示した。ワクチンコンポーネントに対する反応を検討した結果、インフルエンザウイルス抗原に対する特異的 IgE 抗体依存性のアレルギー反応であることが判明した。今後、健常人を含めた症例の解析を重ねることにより、アナフィラキシー例に対する必要な検査、診断基準を明確にし、ハイリスク者の予知およびリスクに応じた接種が可能になることが期待される。

参考文献

1. Ponvert C, Scheinmann P, de Blic J. Anaphylaxis to the 23-valent pneumococcal

vaccine: a second explored case by means of immediate-reading skin tests with pneumococcal vaccines. *Vaccine* 2010;28:8256-7.

2. Novadzki IM, Rosario Filho N. Anaphylaxis associated with the vaccine against measles, mumps and rubella. *Revista de saude publica* 2010;44:372-6.

3. Hausmann OV, Gentinetta T, Bridts CH, Ebo DG. The basophil activation test in immediate-type drug allergy. *Immunol Allergy Clin North Am* 2009;29:555-66.

4. Ebo DG, Hagendorens MM, Bridts CH, De Clerck LS, Stevens WJ. The basophil activation test in immediate drug allergy. *Acta Clin Belg* 2009;64:129-35.

5. Vellozzi C, Burwen DR, Dobardzic A, Ball R, Walton K, Haber P. Safety of trivalent inactivated influenza vaccines in adults: background for pandemic influenza vaccine safety monitoring. *Vaccine* 2009;27:2114-20.

6. Nunez Orjales R, Carballas Vazquez C, Carballada Gonzalez F, Boquete Paris M. 2-phenoxyethanol-induced contact urticaria and anaphylaxis. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2010;20:354-5.

7. Lundov MD, Zachariae C, Johansen JD. Methylisothiazolinone contact allergy and dose-response relationships. *Contact dermatitis* 2011;64:330-6.

F. 研究発表

(著書)

庵原俊昭：インフルエンザワクチンは本当に有効か？安本和正、滝澤 始 編. 呼吸器感染症における不思議. アトムス、東京、

p274-27、2011

(論文)

庵原俊昭：インフルエンザワクチンの効果。
化学療法領域 27:2684-2693, 2011

(学会発表)

庵原俊昭：インフルエンザワクチン：開発
戦略と接種戦略. 第 26 回日本環境感染症学
会 2011.2.18-19 横浜

渡辺正博、伊藤正寛、庵原俊昭：pandemic
(H1N1) 2009 流行期における小児インフル
エンザ様患者からマルチプレックス PCR
を用いたウイルスの検出. 第 5 2 回日本臨
床ウイルス学会 2011.6.11-12 津

菅 秀、長尾みづほ、藤澤隆夫、庵原俊昭、
中野貴司：インフルエンザパンデミックデ
ータベースの構築. 第 114 回日本小児科学
会学術集会 2011.8.12-14 東京

菅 秀、長尾みづほ、庵原俊昭：リアルタ
イムデータベースを用いた 2010/11 インフ
ルエンザ小児入院症例の解析. 第 43 回日本
小児感染症学会総会・学術集会
2011.10.28-29 岡山

二井立恵、伊佐地真知子、菅谷亜弓、二井
栄、庵原俊昭、前田一洋、奥野良信：妊婦
におけるインフルエンザワクチンの安全
性・免疫原性に関する研究(2010/2011 シー
ズン). 第 1 5 回日本ワクチン学会学術集会
2011.12.7-8 東京

G. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を
含む)

なし

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

「沈降新型インフルエンザワクチン（H5N1株）治験保存血清を使った、
microRNA チップ解析臨床研究」

(独)医薬基盤研究所 アジュバント開発プロジェクト 石井健・鉄谷耕平

要旨

本研究は故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）保存血清を使った臨床研究」の分担研究として、過去に行われた上記ワクチン臨床治験及びそれに付随する臨床研究において、すでに得られた保存血清を用い、血清中マイクロRNAの解析を行うものである。

2010年12月に独立行政法人医薬基盤研究所倫理審査委員会の承認を得、昨年度15例30検体の解析を行い、複数の興味深いふるまいを示す複数のmiRNAを検索した。今年度はその検証を定量的PCRで行うとともに、解析対象を15例30サンプル追加して拡大したところ、ワクチン関連発熱の予測因子となる候補miRNAを複数検索することができた。今後解析対象を上記ワクチン治験の被検者のみならず、他の関連する他の臨床検体にも拡大して、候補miRNAの有用性の検証を進めていきたい。

A.研究目的

国立感染症研究所より2004年にベトナムで分離されたA/Viet Nam/1194/2004（H5N1）株をリバーズ・ジェネティクスで弱毒したNIBRG-14株の分与を受け、アジュバントとして水酸化アルミニウムゲルを添加した沈降新型インフルエンザワクチン（以下、プレパンデミックワクチン）が国内4社により作製され、非臨床試験及び健康成人に対する臨床試験（以下、成人治験）が実施された。そのうち、学校法人北里研究所及び一般財団法人阪大微生物病研究会のワクチンについては、2007年10月に薬事法上の製造販売承認を取得した。

その後、成人治験成績に対する承認審査で求められた対応として、小児に対する適切な用法及び

用量の設定を行うため、学校法人北里研究所及び一般財団法人阪大微生物病研究会のプレパンデミックワクチンについて6ヵ月以上20歳未満の健康小児に対する免疫原性及び安全性を検討するための臨床試験（以下、小児治験）が実施された。

小児治験の結果、抗体価は成人に匹敵する、あるいはそれ以上の上昇が確認されたが、一方で、約半数の被験者に発熱が観察された。そこで、その発熱の原因を探ること、およびより安全性の高いプレパンデミックワクチンの製造に向けた情報を収集することを目的に、成人治験、成人治験後の抗体価追跡調査及び小児治験で得られ、保存されている血清検体を用いたH5N1血清研究が2010年に開始された。H5N1血清研究には血清