

201123049A

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

経鼻インフルエンザワクチン等 粘膜ワクチンの有効性に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

平成24年 3 月

研究代表者 長谷川 秀樹

(国立感染症研究所)

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

経鼻インフルエンザワクチン等 粘膜ワクチンの有効性に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

平成24年3月

研究代表者 長谷川 秀樹

(国立感染症研究所)

平成23年度新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
経鼻インフルエンザワクチン等粘膜ワクチンの有効性に関する研究

班員名簿

長谷川 秀樹	国立感染症研究所感染病理部	部 長
奥野 良信	一般財団法人阪大微生物病研究会 観音寺研究所	所 長
田代 眞人	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	センター長
新井 洋由	東京大学大学院薬学系研究科	教 授

目 次

I. 総括研究報告書

経鼻インフルエンザワクチン等粘膜ワクチンの有効性に関する研究・・・・・・・・・・ 1

研究代表者：長谷川 秀樹（国立感染症研究所感染病理部）

II. 分担研究報告書

1. 経鼻インフルエンザワクチンの評価系の検討・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 7

研究分担者：長谷川 秀樹（国立感染症研究所感染病理部）

2. 経鼻インフルエンザワクチンの製剤化と

カニクイザルを用いた有効性に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 13

研究分担者：奥野 良信（一般財団法人阪大微生物病研究会観音寺研究所）

3. 経鼻インフルエンザワクチンの新規アジュバントに関する研究・・・・・・・・・・ 17

研究分担者：田代 真人（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）

4. 脂質代謝系を介した自然免疫賦活によりワクチンの有効性を高める研究・・・・ 23

研究分担者：新井 洋由（東京大学大学院薬学系研究科）

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 27

I. 総括研究報告書

経鼻インフルエンザワクチン等粘膜ワクチンの有効性に関する研究

総括研究報告書

研究代表者 長谷川 秀樹 国立感染症研究所感染病理部 部長

研究要旨 経鼻インフルエンザワクチンは、気道粘膜上に分泌型 IgA 抗体を誘導することでインフルエンザウイルスの感染阻止に有効であることが、主にマウスを用いた実験から明らかになっている。一方、ヒトにおける経鼻投与型インフルエンザワクチンによる気道粘膜上抗体応答の評価は、大きく遅れている。本研究では、健常人ボランティアに対して全粒子不活化ワクチンの経鼻接種を行い、誘導される抗体応答の評価を試みた。その結果、血清中の赤血球凝集反応阻止 (HI) 抗体応答は、現行ワクチンの有効性判断基準を十分満たすことが明らかとなり、かつ鼻腔洗浄液中には中和活性を有する機能的な抗体応答が強く誘導されることが明らかとなった。またサルを被験動物として、経鼻インフルエンザワクチンにより血清と鼻粘膜において感染防御上有用な免疫応答が3ヶ月以上持続することを確認した。経鼻インフルエンザワクチンの有効性を高める為の研究において、新規のアジュバント **CompB** にアジュバント活性が有ることが明らかになった。また脂質代謝系とインフルエンザ感染時の I 型インターフェロン応答、および抗体応答の増強に関連が有る事が示唆された。

研究分担者

奥野良信 一般財団法人阪大微生物病研究会観
音寺研究所 所長

田代真人 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 センター長

新井洋由 東京大学大学院薬学系研究科 教授

A. 研究目的

経鼻インフルエンザワクチンは、血中 IgG 抗体に加え、気道粘膜上に分泌型 IgA 抗体を誘導し、感染自体を防ぐことが明らかとなっている。また、この分泌型 IgA 抗体は、IgG 抗体と比較して変異ウイルスに対する交叉防御能が高いことが報告されている。本研究では、経鼻インフルエンザワクチンの有効性に

関する判断基準を提案、作成することを最終目標としている。全粒子不活化ワクチンの経鼻接種を実施した 50 名の健常人ボランティアから採取した血清ならびに鼻腔洗浄液に関して、我々が確立した方法を用い HI 抗体価および中和抗体価を測定し、EMEA の有効性判断基準を参考に評価することを目的とした。また経鼻インフルエンザワクチンの有効性を高める目的で新規アジュバント候補および免疫増強メカニズムの解明の為まったく新しい視点から脂質代謝系を介した自然免疫応答制御を解明することにより、粘膜ワクチンの有効性を高める創薬基盤を確立することを目的とした。

B. 研究方法

1) ヒトでの有効性に関する臨床研究

健康人ボランティア 50 名に対して、A/Victoria/210/09(H3N2) ウイルス全粒子不活化ワクチン 3 週間間隔で 2 回の経鼻接種を実施した。なお、本実験スケジュールは、国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会の承認を得た上で実施した。ワクチン接種開始より 3 週間毎に採血と鼻腔洗浄液の回収を行った。回収された鼻腔洗浄液は、総タンパク質量を 1 mg/ml に調製した鼻腔洗浄液を用い以下の測定を行った。血清 HI 抗体価ならびに鼻腔洗浄液 HI 抗体価の評価を行った。中和抗体価に関する基準は、現在定められていないため、同じく上記判断基準を参照し評価した。

2) カニクイザルにおける有効性

カニクイザルを用いた経鼻接種型インフルエンザワクチン(H5N1 型)の接種及び免疫応答評価を行った。経鼻投与用ワクチン：発育鶏卵由来全粒子不活化 A 型インフルエンザワクチン(H5N1 株)原液(由来ウイルス株：A/Bar-headed Goose/Qinghai/1A/2005 (H5N1)；以下、青海株とする)を 200 μ g HA/mL となるように PBS(-)で希釈し、経鼻製剤用粘稠剤と混合したものをを用いた。被験動物はカニクイザル(*Macaca fascicularis*)を用いた。被験ワクチン、対照ワクチン、または PBS(-)のいずれかを 3 週間隔で 2 回、専用噴霧器具で片鼻あたり 50 μ L \times 3 回(合計：片鼻あたり 150 μ L、両鼻で 300 μ L)噴霧経鼻接種した。ワクチンの接種時、及び追加接種から 2 週間毎に、追加接種 12 週間までと、その 4 週後に採材した。鼻腔拭い液については蛋白濃度及び投与ワクチンを抗原とした特異的 IgA-ELISA 抗体価を、血清については中和抗体価及び投与ワクチンを抗原とした特異的 IgG-ELISA 抗体価を測定した。

(倫理面への配慮)

「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(文部科学省告示第 71 号、平成 18 年 6 月 1 日)に基づいた試験を行った。

3) 新規粘膜アジュバントの検討

ワクチンとして、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、Toll 様レセプター (Toll-like receptor, TLR) 3 に対するアゴニストである合成二本鎖 RNA Poly(I:C)、新規に合成されたコンパウンド B (CompB)を用いた。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 週後に上気道感染を行った。感染 3 日後に、血清と鼻腔洗浄液の回収を行った。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。経鼻インフルエンザワクチン接種により誘導されるサイトカインに関して、Real-time PCR 法により定量した。

4) インフルエンザウイルス感染時の自然免疫応答、および抗体応答の解析

インフルエンザウイルス感染に対する脂質代謝酵素 Type 8 PLA2 の関与を調べるために、Type 8 PLA2 ノックアウトマウス (C57BL/6J background) にインフルエンザウイルス (A/PR8) を上気道感染させた (1000 pfu/mice)。感染後 3 日目の鼻腔上皮を回収し、定量 PCR 法により I 型インターフェロン応答を評価した。また感染後 21 日目の血清を回収し、インフルエンザ HA タンパク質に対する抗体量を ELISA 法により測定した。

C. 研究結果

1) ヒトでの有効性に関する臨床研究

健康人ボランティア 50 名に対して、A/Victoria /210/09 の全粒子不活化ワクチンを 3 週間間隔で 2 回の経鼻接種 (45 μ g HA/500 μ l 接種) を実施した。1 回目ワクチン接種直

前 (0 w)、2 回目ワクチン接種直前 (3 w)、および 2 回目ワクチン接種 3 週間後 (6 w) に血清と鼻腔洗浄液を回収し、各サンプルにおける HI 抗体価と中和抗体価の測定を行った。20~60 歳に該当する被験者に関して、ワクチン接種後の血清 HI 抗体価は、ワクチン接種前の血清 HI 抗体価の 4.25 倍となった。【抗体陽転率】は 43.5% となった。【抗体保有率】は、76.1% となり EMEA のワクチン有効性判断基準をもとに評価すると、【抗体変化率】、【抗体陽転率】、および【抗体保有率】の三項目を全て満たすことが明らかになった。この時鼻腔洗浄液では、ワクチン接種後において【抗体変化率】は 3.13 倍となり、【抗体陽転率】は 44.4%、【抗体保有率】は 48.9% となった。これは、EMEA 有効性判断基準を参考にした場合、3 項目中 2 項目の条件を満たすことになる。

次に、血清および鼻腔洗浄液の A/Victoria/210/09 に対する中和抗体価を測定した。【抗体変化率】は、血清において 8.00 倍、鼻腔洗浄液において 5.88 倍となり、【抗体陽転率】は、血清で 69.6%、鼻腔洗浄液で 93.5% となった。さらに【抗体保有率】は、血清において 68.9%、鼻腔洗浄液において 82.2% となった。中和抗体価は、HI 抗体価と比較したとき常に高い値を示し、ワクチン接種前後での各抗体価の上昇率も約 2 倍高い値を示すことが示された。(長谷川)

2) カニクイザルにおける有効性

血清中の特異的中和抗体価を測定したところ免疫応答は 1 回目の接種から 5 週間後をピークとして徐々に低下する傾向を示した。中和抗体価 40 以上が持続した期間を見ると、全粒子ワクチンを噴霧投与した群では約 8 週間、全粒子ワクチンに粘稠剤を添加したワクチンを噴霧投与した群では 16 週間以上であった。血清中の特異的 IgG-ELISA 抗体価の傾向は中和抗体価と同様であった。

鼻腔拭い液中の特異的 IgA-ELISA 抗体価は、

粘稠剤添加の有無に関わらず、ほぼ同等となった。また、IgA-ELISA 抗体価は 1 回目の接種の 5 週間後から 19 週間後までほぼ同水準で持続していた。(奥野)

3) 新規粘膜アジュバントの検討

新規アジュバント候補として合成された CompB の経鼻インフルエンザワクチンにおける抗体誘導能を検討した。CompB は、Carboxy Vinyl Polymer (CVP) 同様の定着効果をもたらす新規エマルジョン型アジュバントとして合成された。CompB の至適濃度での使用による A/PR8 HA 特異的な鼻腔洗浄液 IgA 抗体および血清 IgG 抗体応答は、粘膜アジュバントとして有効性が示されている合成二本鎖 RNA Poly(I:C) 1 μ g 相当の抗体応答であることが明らかになった。

4) インフルエンザウイルス感染時の自然免疫応答、および抗体応答の解析

脂質代謝酵素 Type 8 PLA2 の鼻腔上皮における発現を定量 PCR により調べたところ、Type 8 PLA2 は鼻腔上皮に比較的高く発現していることが明らかとなった。そこでインフルエンザウイルス感染後 3 日目の鼻腔上皮における自然免疫応答を定量 PCR 法により調べた結果、Type 8 PLA2 ノックアウトマウスではインターフェロン α (IFNA4)、インターフェロン β (IFNB)、ISG54 といったインターフェロン応答に関わる遺伝子の発現誘導が有意に増強していた。またインフルエンザウイルス感染後 21 日目の抗体応答を ELISA により調べた結果、野生型マウス、Type 8 PLA2 欠損マウスともにインフルエンザ感染により HA に対する抗体 (IgG) 産生がみられたが、Type 8 PLA2 欠損マウスでは野生型マウスに比べて、抗体の産生量が有意に増加していた。

D. 考 察

現行ワクチンの有効性は、血清 HI 抗体価

により判断されている。しかしながら、ワクチンにより誘導される抗体応答は、より機能的つまりウイルスを中和する能力により評価されることが理想的と考えられる。そこで本研究では、全粒子不活化ワクチン接種を受けた健康人ボランティアのワクチン接種前後の血清 HI 抗体に加えて、鼻腔洗浄液中 HI 抗体ならびに血清および鼻腔洗浄液中の中和抗体を測定し評価を試みた。経鼻インフルエンザワクチンで誘導される抗体応答は、少なくとも現行ワクチンの有効性判断基準を満たすことが必要と考えられる。本研究において誘導された血清 HI 抗体は、EMEA が定める有効性判断基準の三項目全てを満たすことが明らかとなった。また、鼻腔洗浄液においては、HI 活性ならびに中和活性を有する抗体が強く誘導されることが明らかとなった。上気道に機能的な中和抗体を誘導する経鼻インフルエンザワクチンは、ヒトにおいても有効なワクチン接種法であり鼻腔洗浄液の抗体価はその評価に有用である。

新規粘膜アジュバントとして合成された CompB は、粘膜アジュバントとして高い活性を有する Poly(I:C)と比較した場合、指摘濃度での使用において Poly(I:C) 1 µg 相当のアジュバント活性を有することが示され同時に TNF- α の発現が見られた。今後は、アジュバント活性を維持しながらより TNF- α の発現を押さえるような改良を加える必要があると考えられる。

今回、脂質代謝酵素 Type 8 PLA2 ノックアウトマウスではインフルエンザ感染時の鼻腔上皮のインターフェロン応答が増強されていることが分かった。Type 8 PLA2 は鼻腔上皮に発現がみられたことから、鼻腔上皮に発現する Type 8 PLA2 がウイルス感染時のインターフェロン応答を負に制御していると考えられる。また、Type 8 PLA2 ノックアウトマウスではインフルエンザ感染後の抗体応答の増強もみられた。Type 8 PLA2 ノックアウトマウスでみられた感染時のインターフェロン応

答の増強が、抗体応答の増強に寄与しているものと考えられる。

E. 結 論

健康人ボランティアに対し、全粒子不活化インフルエンザワクチンの経鼻接種を行った結果、血清中 HI 抗体は、EMEA により定められた注射型インフルエンザワクチンに対する有効性判断基準を十分満たすことが明らかとなり、かつ鼻腔洗浄液中には中和活性を有する機能的な抗体が強く誘導されることが明らかとなった。以上のことから、過去のインフルエンザウイルス感染ならびにワクチン接種による多様な基礎免疫を有するヒトに対しては、全粒子不活化ワクチン単独の経鼻接種は効果的なワクチン接種法になりうると考えられる。

また、サルを被験動物とした研究において試作した、粘稠剤を併用した、経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンは有効性の高いものであることが確認された。

また合成された新規合成 CompB のアジュバント活性は、合成二本鎖 RNA Poly(I:C) 1 µg 相当のアジュバント活性を有することが明らかになった。既知の経路と異なる系を介してアジュバント活性を発揮すると考えられた。今回の脂質代謝酵素 Type 8 PLA2 ノックアウトマウスを用いた解析から、Type 8 PLA2 の阻害剤が粘膜ワクチンの有効性を高めるアジュバントとなる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yanagita H, Yamamoto N, Fuji H, Liu X, Ogata M, Yokota M, Takaku H, Hasegawa H,

- Odagiri T, Tashiro M, Hoshino T. Mechanism of Drug Resistance of Hemagglutinin of Influenza Virus and Potent Scaffolds Inhibiting Its Function. *ACS Chem Biol*. 2012 Jan 13.
- 2) Ainai 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, Ainai 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, Ainai 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.
- 7) M.Ujike, M.Ejima, A.Anraku, K.Shimabukuro, M.Obuchi, N.Kishida, X.Hong, E.Takashita, S.Fujisaki, K.Yamashita, H.Horikawa, Y.Kato, A.Oguchi, N.Fujita, M.Tashiro, T.Odagiri and Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Monitoring and characterization of oseltamivir-resistant pandemic (H1N1) 2009 virus, Japan, 2009-2010. *Emerging infectious diseases*. 17: 470-479, 2011
- 8) M.Nakauchi, M.Ujike, M.Obuchi, E.Takashita, I.Takayama, M.Ejima, K.Oba, N.Konomi, T.Odagiri, M.Tashiro, T.Kageyama and the influenza virus surveillance group of Japan. Rapid discrimination of oseltamivir-resistant 275Y and -susceptible 275H substitutions in the neuraminidase gene of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus by duplex one-step RT-PCR assay. *Journal of Medical Virology*. 83(7): 1121-1127, 2011
- 9) Nongluk Sriwilaijaroen, A.Kadowaki, Y. Onishi, N. Gato, M.Ujike, T. Odagiri, M.Tashiro, Y.Suzuki. Mumefuralandrelated HMF derivatives from Japanese apricot fruitjuice concentrate show multiple inhibitory effects on pandemic influenza A(H1N1) virus *Food Chemistry* 127, 1-9, 2011
- 10) Ikeno D, Kimachi K, Ibaragi K, Kudo Y, Goto S, Odoh K, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Kino Y. Differences in the priming effect of various clades/subclades of

inactivated H5N1 vaccine for booster injection with heterologous clades of vaccine strains *Vaccine*. :29: 4156-4161, 2011

- 11) Harada Y, Ninomiya-Mori A, Takahashi Y, Shirakura M, Kishida N, Kageyama T, Tada Y, Tashiro M, Odagiri T. Inactivated and adjuvanted whole-virion clade 2.3.4 H5N1 pre-pandemic influenza vaccine possesses broad protective efficacy against infection by heterologous clades of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus in mice. *Vaccine*. 2011 Oct 26;29(46):8330-8337
- 12) Nakauchi M, Yasui Y, Miyoshi T, Minagawa H, Tanaka T, Tashiro M, Kageyama T. One-step real-time reverse transcription-PCR assays for detecting and subtyping pandemic influenza A/H1N1 2009, seasonal influenza A/H1N1, and seasonal influenza A/H3N2 viruses. *J Virol Methods*. 171(1):156-162, 2011.
- 13) Nakauchi M, Yoshikawa T, Nakai H, Sugata K, Yoshikawa A, Asano Y, Ihira M, Tashiro M and Kageyama T.: Evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays for rapid diagnosis of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus. *Journal of Medical Virology* 83, 10–15 (2011)
- 14) A Novel Role for α -Tocopherol Transfer Protein (α -TTP) in Protecting against Chloroquine Toxicity. Shichiri M., Kono N., Shimanaka Y., Tanito M., Rotzoll D.E., Yoshida Y., Hagihara Y., Tamai H. and Arai H. *J. Biol. Chem.* (2012) 287:2926-34.

2. 学会発表

各研究分担者の報告書参照。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得（出願）

特許第 4817625 号 粘膜免疫誘導アジュバントを含む新規ワクチン
登録日平成 23 年 9 月 9 日

2. 実用新案登録

なし

II. 分担研究報告書

経鼻インフルエンザワクチンの評価系の検討

研究分担者 長谷川 秀樹 国立感染症研究所感染病理部 部長

協力研究者 田村 慎一（国立感染症研究所 感染病理部）
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 経鼻インフルエンザワクチンは、気道粘膜上に分泌型 IgA 抗体を誘導することでインフルエンザウイルスの感染阻止に有効であることが、動物実験から明らかになっている。一方、ヒトにおける経鼻インフルエンザワクチンによる気道粘膜上抗体応答の評価方法は、まだ整備されていない。本研究では、健常人ボランティアに対して全粒子不活化ワクチンの経鼻接種を行い、誘導される抗体応答の評価を試みた。その結果、血清中の赤血球凝集反応阻止（HI）抗体応答は、現行ワクチンの有効性判断基準を十分満たすことが明らかとなり、かつ鼻腔洗浄液中には中和活性を有する機能的な抗体応答が強く誘導されることが明らかとなった。

A. 研究目的

経鼻インフルエンザワクチンは、血中 IgG 抗体に加え、気道粘膜上に分泌型 IgA 抗体を誘導し、感染自体を防ぐことが明らかとなっている。また、この分泌型 IgA 抗体は、IgG 抗体と比較して変異ウイルスに対する交叉防御能が高いことが報告されている。これらの知見は主にマウスを主体とした動物実験により明らかにされたが、ヒトにおける経鼻投与型インフルエンザワクチンが鼻腔粘膜上に誘導する抗体応答の評価は、採材が困難であること、評価系が存在しないことから大きく遅れている。この問題を解決するため、すでに我々は、ヒトの気道粘膜上に分泌される IgA 抗体を、生理的条件下で存在する抗体量と同等レベルで測定する系を確立している(Ainai et al., J Med Virol. 84 (2):336-44, 2012)。

本研究では、経鼻インフルエンザワクチンの有効性に関する判断基準を提案、作成する

ことを最終目標としている。経鼻インフルエンザワクチンは、少なくとも現行の注射型季節性インフルエンザワクチンの有効性判断基準を満たす必要があると考えられる。現行ワクチンは、血清中に誘導される HI 抗体に関して、欧州医薬品審査庁（EMA）あるいはアメリカ食品医薬品局（FDA）が定める有効性判断基準をもとに評価されている。

そこで本研究では、全粒子不活化ワクチンの経鼻接種を実施した 50 名の健常人ボランティアから採取した血清ならびに鼻腔洗浄液に関して、我々が確立した方法を用い HI 抗体価および中和抗体価を測定し、EMA の有効性判断基準をもとに評価することを目的とした。

B. 研究方法

1) ワクチン接種

健康人ボランティア 50 名（22～68 歳、男性 36 名、女性 14 名）に対して、A/Victoria/210/09(H3N2) ウイルス全粒子不活化ワクチン（阪大微生物病研究会より提供）を片鼻 250 μ l ずつ（計 500 μ l）、3 週間間隔で 2 回の経鼻接種を実施した。現行ワクチンは、亜型毎に 15 μ g のヘマグルチニン（HA）を含む（各亜型 HA 15 μ g/接種）が、使用した全粒子不活化ワクチンには A/Victoria/210/09 株に関してのみ 3 倍量の HA が含まれる（45 μ g HA/500 μ l 接種）。A/Victoria/210/09 株は、2010/11 シーズン季節性インフルエンザワクチンに含まれる株の一つである。なお、本実験スケジュールは、国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会の承認を得た上で実施した。

2) 採材とサンプル調製

ワクチン接種開始より 3 週間毎に採血と鼻腔洗浄液の回収を行った。鼻腔洗浄液は、市販の鼻うがい器具を用い、生理食塩水にて洗浄することにより回収した。回収した鼻腔洗浄液から粗雑物の除去を行い、次いで遠心型濃縮チューブ（Vivaspin）を用い濃縮した。この方法により回収された鼻腔洗浄液は、総タンパク質量を 1 mg/ml に調製した場合に、生理的条件下にある鼻腔粘膜 IgA 抗体量（約 2.21 mg/ml）の 1/10 量が含まれることが明らかになっている（Kurono *et al.*, *Ann Otol Rhinol Laryngol* 96(4):419-424, 1987; Ainai *et al.*, *J Med Virol*. 84(2):336-44, 2012)。したがって、総タンパク質量を 1 mg/ml に調製した鼻腔洗浄液を用い以下の測定を行った。

3) 中和抗体価と HI 抗体価の測定

中和抗体価の測定は、マイクロ中和試験により行った。RDE 処理を行った血清あるいは鼻腔洗浄液の段階希釈系列を調製し、100 TCID₅₀（50%組織培養感染量の 100 倍量）のウイルス液と混合後、30 分間インキュベーションした。その後、この混合液を MDCK 細胞

に添加し 4 日間培養を行い、顕微鏡下でインフルエンザウイルスによる細胞変性効果が確認できないサンプル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 処理を行った血清あるいは鼻腔洗浄液の段階希釈系列を同様に調製し、8HA 価のウイルス液と混合後、1 時間インキュベーションした。その後 0.5%七面鳥血球を添加し、その 45 分後に赤血球の凝集反応阻害がみられたサンプル最大希釈倍率の逆数を HI 抗体価とした。

なおサンプルは、血清は 1/10 倍希釈からの 2 倍希釈系列、鼻腔洗浄液は 1/20 倍希釈相当液からの 2 倍希釈系列である。

4) 抗体応答の評価

EMEA の定める現行の注射型季節性インフルエンザワクチンに関する有効性判断基準は、18～60 歳の健康被験者において、

- ① 【抗体変化率】；ワクチン接種後の血清 HI 抗体価の幾何平均値（Geometric mean titer, GMT）がワクチン接種前に比べて 2.5 倍より大きいこと
- ② 【抗体陽転率】；ワクチン接種後に血清 HI 抗体価が 4 倍以上の陽転を示した被験者の割合が 40%より高いこと
- ③ 【抗体保有率】；ワクチン接種後の血清 HI 抗体価が 40 倍以上を示す被験者の割合が 70%より高いこと

の 3 項目において、いずれか一つを満たすことである。本研究で得られた血清 HI 抗体価ならびに鼻腔洗浄液 HI 抗体価を、上記判断基準に当てはめ評価を行った。中和抗体価に関する基準は、現在定められていないため、同じく上記判断基準を参照し評価した。

C. 研究結果

健康人ボランティア 50 名に対して、A/Victoria /210/09 の全粒子不活化ワクチンを 3 週間間隔で 2 回の経鼻接種（45 μ g HA/500

μl 接種) を実施した。1 回目ワクチン接種直前 (0 w)、2 回目ワクチン接種直前 (3 w)、および 2 回目ワクチン接種 3 週間後 (6 w) に血清と鼻腔洗浄液を回収し、各サンプルにおける HI 抗体価と中和抗体価の測定を行った。

20~60 歳に該当する被験者に関して、ワクチン接種後 (6 w) の血清 HI 抗体価は、ワクチン接種前 (0 w) の血清 HI 抗体価の 4.25 倍となった (表 1)。抗体陽転は 46 名中 20 名で認められ、【抗体陽転率】は 43.5% となった (表 1)。また、ワクチン接種後 (6 w) の【抗体保有率】は、76.1% (46 名中 35 名) に達した (表 1)。以上のことから、EMEA のワクチン有効性判断基準をもとに評価すると、【抗体変化率】、【抗体陽転率】、および【抗体保有率】の三項目を全て満たすことが明らかになった。この時鼻腔洗浄液では、ワクチン接種後において【抗体変化率】は 3.13 倍となり、【抗体陽転率】は 44.4% (45 名中 20 名)、【抗体保有率】は 48.9% (45 名中 22 名) となった (表 1)。これは、EMEA 有効性判断基準を参考にした場合、3 項目中 2 項目の条件を満たすことになる。

次に、血清および鼻腔洗浄液の A/Victoria/210/09 に対する中和抗体価を測定した (表 2)。【抗体変化率】は、血清において 8.00 倍、鼻腔洗浄液において 5.88 倍となり、【抗体陽転率】は、血清で 69.6%、鼻腔洗浄液で 93.5% となった。さらに【抗体保有率】は、血清において 68.9%、鼻腔洗浄液において 82.2% となった。また、中和抗体価は、HI 抗体価と比較したとき常に高い値を示し、ワクチン接種前後での各抗体価の上昇率も約 2 倍高い値を示すことが示された (表 1、2)。

D. 考 察

現行ワクチンの有効性は、血清 HI 抗体つまりウイルス凝集効果を有する抗体により判断されている。しかしながら、ワクチンにより誘導される抗体応答は、より機能的つまり

ウイルスを中和する能力により評価されることが理想的と考えられる。そこで本研究では、全粒子不活化ワクチン接種を受けた健常人ボランティアのワクチン接種前後の血清 HI 抗体に加えて、鼻腔洗浄液中 HI 抗体ならびに血清および鼻腔洗浄液中の中和抗体を測定し評価を試みた。経鼻インフルエンザワクチンで誘導される抗体応答は、少なくとも現行ワクチンの有効性判断基準を満たすことが必要と考えられる。本研究において誘導された血清 HI 抗体は、EMEA が定める有効性判断基準の三項目 (抗体変化率、抗体陽転率、および抗体保有率) 全て満たすことが明らかとなった。また、鼻腔洗浄液においては、HI 活性ならびに中和活性を有する抗体が強く誘導されることが明らかとなった。現行の注射型インフルエンザワクチンでは上気道に抗体応答がみられないことから、有効性判断基準を満たす HI 抗体応答に加えて、上気道に機能的な中和抗体を誘導する経鼻インフルエンザワクチンは、ヒトにおいても有効なワクチン接種法であると考えられる。

現行の注射型インフルエンザワクチンで用いられる HA ワクチン (エーテル処理スプリットワクチン) は適応免疫誘導能が低く、マウス等を用いた経鼻投与型インフルエンザワクチン接種実験では、アジュバントの添加が必要である。これに対して全粒子不活化ワクチンは、HA ワクチンに比べて高い適応免疫誘導能を有することが明らかにされ (Koyama et al., *Sci Transl Med.* 2(25):25ra24, 2010)、アジュバントの添加が必要ないと考えられる。本研究では、健常人ボランティアに対して全粒子不活化ワクチンの経鼻接種を行い、十分な抗体応答が得られることが示された。この結果から、過去のインフルエンザウイルス感染ならびにワクチン接種による多様な基礎免疫を有するヒトに対する全粒子不活化ワクチン単独の経鼻接種は、効果的なワクチン接種法であると考えられる。

E. 結 論

健常人ボランティアに対し、全粒子不活化インフルエンザワクチンの経鼻接種を行った結果、血清中 HI 抗体は、EMEA により定められた注射型インフルエンザワクチンに対する有効性判断基準を十分満たすことが明らかとなり、かつ鼻腔洗浄液中には中和活性を有する機能的な抗体が強く誘導されることが明らかとなった。以上のことから、過去のインフルエンザウイルス感染ならびにワクチン接種による多様な基礎免疫を有するヒトに対しては、全粒子不活化ワクチン単独の経鼻接種は効果的なワクチン接種法になりうると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

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) Ainai 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, Ainai 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, Ainai 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 (横浜) 2011 年 4 月
 - 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、瀧松晶彦、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 (横浜) 2011 年 4 月

- 3) Akira Ainai, Ryo Ito, Hideki Asanuma, Tadaki Suzuki, Takeshi Tanimoto, Takato Odagiri, Shin-Ichi Tamura, Tetsutaro Sata, Masato Tashiro, Hideki Hasegawa: INTRANASAL ADMINISTRATION OF 2009/10 ANNUAL INFLUENZA VACCINE INDUCE THE CROSS-PROTECTION AGAINST 2009 PANDEMIC INFLUENZA VIRUS INFECTION. XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
- 4) Elly van Riet, Akira Ainai, Ryo Ito, Tadaki Suzuki, Shin-Ichi Tamura, Masato Tashiro, Hideki Hasegawa: INFLUENZA SPECIFIC IGA PRODUCING SERUM MEMORY B CELLS CORRELATE TO PROTECTIVE ANTIBODIES IN THE SERUM AS WELL AS LOCAL IGA RESPONSES. XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
- 5) Ryo Ito, Akira Ainai, Hideki Asanuma, Tadaki Suzuki, Joe Chiba, Shin-Ichi Tamura, Masato Tashiro, Tetsutaro Sata, Hideki Hasegawa: ANALYSIS OF THE IMMUNE RESPONSES AFTER INTRANASAL BOOSTER INFLUENZA VACCINE WITH HETEROLOGOUS VIRUS PRIMING. XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
- 6) Hideki Hasegawa, Akira Ainai, Elly van Riet, Tadaki Suzuki, Ryo Ito, Takeshi Tanimoto, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Tetsutaro Sata, Takeshi Kurata, Shin-Ichi Tamura: INTRANASAL ADMINISTRATION OF

AN INACTIVATED WHOLE-VIRION INFLUENZA VACCINE EFFECTIVELY INDUCES THE NEUTRALIZING ANTIBODIES BOTH IN THE SERUM AND THE NASAL WASH IN HUMAN. XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo

- 7) Hideki Asanuma, Mina Nakauchi, Kayoko Sato, Eri Nobusawa, Akira Ainai, Norio Yamamoto, Nami Konomi, Hideki Hasegawa, Masato Tashiro: COMPARISON OF INFLUENZA A/H1N1 PDM09 VACCINE PRODUCTIONS IN EGGS VERSUS CELL CULTURES AND THE PROTECTIVE IMMUNE RESPONSES INDUCE IN MICE. XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
- 8) Tadaki Suzuki, Akira Ainai, Noriyo Nagata, Tetsutaro Sata, Hideki Hasegawa: ROLE OF THE N-TERMINAL REGION OF THE PA SUBUNIT IN NUCLEAR IMPORT AND ASSEMBLY OF INFLUENZA A VIRUS RNA POLYMERASE. XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
- 9) Tatsuya Yamazaki, Yasutomo Teshima, Daisuke Ninomiya, Maria Nagashima, Yuka Arai, Akira Fujimoto, Akira Ainai, Hideki Hasegawa, Joe Chiba: PASSIVE IMMUNOTHERAPY AGAINST INFLUENZA VIRUS INFECTION USING THE EXPRESSION OF NEUTRALIZING ANTI-HEMAGGLUTININ MONOCLONAL ANTIBODIES FROM PLASMIDS BY HYDRODYNAMICS-BASED PROCEDURE. XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
- 10) Hidekatsu Iha, Emi Ikebe, Akira Kawaguchi,

Shinya Taguchi, Akira Nishizono, Yuetsu Tanaka, Hirofumi Sawa, Masao Ogata, Mitsuo Hori, Jun-Ichi Fujisawa, Hideki Hasegawa: MOLECULAR CHAPERON INHIBITOR-BASED TREATMENT AGAINST ATL: ITS IN VITRO AND IN VIVO EVALUATION. XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo

- 11) Masayuki Saijo, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, Noriyo Nagata, Naoko Yoshikawa, Hideki Hasegawa, Shuetsu Fukushi, Tetsuya Mizutani, Tetsutaro Sata, Ichiro Kurane, Shigeru Morikawa: IMMUNE RESPONSES AGAINST EEV AND IMV IN NON-HUMAN PRIMATES INFECTED WITH MONKEYPOX VIRUS OR VACCINATED WITH A 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（東京）2011年12月

- 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（東京）2011年12月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得（出願）
特許第4817625号 粘膜免疫誘導アジュバントを含む新規ワクチン
登録日平成23年9月9日
2. 実用新案登録
なし

経鼻インフルエンザワクチンの製剤化と カニクイザルを用いた有効性に関する研究

研究分担者 奥野 良信（財阪大微生物病研究会 観音寺研究所長）

研究要旨 サルを被験動物として、専用に設計した器具により経鼻インフルエンザワクチンを3週間間隔で2回噴霧投与したところ、血清と鼻粘膜において感染防御上有用な免疫応答が3ヶ月以上持続することを確認した。

A. 研究目的

1. 鼻粘膜における経鼻インフルエンザワクチンの有効性を判定する基準を作る
2. 有効な経鼻インフルエンザワクチンの開発に寄与する

B. 研究方法

カニクイザルを用いた経鼻接種型インフルエンザワクチン(H5N1型)の接種及び免疫応答評価

経鼻投与用ワクチン：発育鶏卵由来全粒子不活化A型インフルエンザワクチン(H5N1株)原液（由来ウイルス株：A/Bar-headed Goose/Qinghai/1A/2005(H5N1)；以下、青海株とする）を200 μ g HA/mLとなるようにPBS(-)で希釈し、経鼻製剤用粘稠剤と混合したものをを用いた。対照として、①HA抗原の濃度が被験ワクチンと同様になるようにワクチン原液を粘稠剤ではなくPBS(-)で希釈したもの、および②ワクチンを含まないPBS(-)のいずれかを投与する群を設けた。

経鼻接種に用いたサル経鼻投与専用噴霧器具：Spray Pump; Apta Pharma 製 VP-7型 50 μ L 噴霧用 Actuator; 東興薬品工業(株)改良小動物用アクチュエーター

被験動物：カニクイザル(Macaca fascicularis)

（日本野生動物研究所より2007年8月21日入荷、♀、4匹/群、試験開始時生後46~58ヶ月齢、試験開始時の体重2.7~3.7kg）

投与方法：鎮静剤としてエマサス®2%（塩酸キシラジン、DSファーマアニマルヘルス）を用い、塩酸キシラジンとして1.3mg/kgを大腿部筋肉内に注射することにより鎮静化させ、被験ワクチン、対照ワクチン、またはPBS(-)のいずれかを3週間隔で2回、専用噴霧器具で片鼻あたり50 μ L \times 3回(合計：片鼻あたり150 μ L、両鼻で300 μ L)噴霧経鼻接種した。

採材及び抗体価評価方法：ワクチンの接種時、及び追加接種から2週間毎に、追加接種12週後までと、その4週間後(追加接種16週後)に採材(鼻腔拭い液採取及び採血)した。鼻腔粘液の採取には、ジョンソン・アブソーベントポイント#20(ジョンソン・エンド・ジョンソン)を片鼻あたり1本用いた。その両鼻分(2本)を1mLのPBS(-)に浸した後の遠心上清を鼻腔拭い液とした。

鼻腔拭い液については蛋白濃度及び投与ワクチンを抗原とした特異的IgA-ELISA抗体価を、血清については中和抗体価及び投与ワクチンを抗原とした特異的IgG-ELISA抗体価を

測定した。特異的 IgG-ELISA 抗体価については、検体の吸光度が陰性対照の吸光度平均 +2SD をこえる吸光度を得る最大希釈倍率を検体の抗体価とした。特異的 IgA-ELISA 抗体価については、特異的 IgG-ELISA 抗体価と同様に抗体価を求めた後、鼻腔拭い液の蛋白濃度を測定し、鼻腔粘液の原液の蛋白濃度がヒトと同様の 10mg/mL (1%) であるとみなし、検体の希釈された倍率を求めて、得られた抗体価に乗じて補正したものを鼻腔粘液の抗体価として表記した。

(倫理面への配慮)

「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(文部科学省告示第 71 号、平成 18 年 6 月 1 日) に基づいた試験を行った。

C. 研究結果

中和抗体価

血清中の特異的中和抗体価とその推移を図 1 に示す。免疫応答は 1 回目の接種から 5 週間後 (2 回目の接種から 2 週間後) をピークとして徐々に低下する傾向を示した。中和抗体価 40 以上が持続した期間を見ると、全粒子ワクチンを噴霧投与した群では約 8 週間、全粒子ワクチンに粘稠剤を添加したワクチンを噴霧投与した群では 16 週間以上であった。

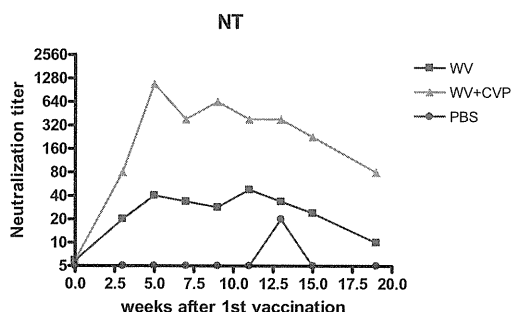


図 1 特異的中和抗体価

特異的IgG-ELISA抗体価

血清中の特異的IgG-ELISA抗体価とその推移を図 2 に示す。免疫応答は1回目の接種から5

～7週間後 (2回目の接種から2～4週間後) をピークとして徐々に低下する傾向を示した。接種群ごとの免疫応答の強さの傾向は中和抗体価と同様であった。

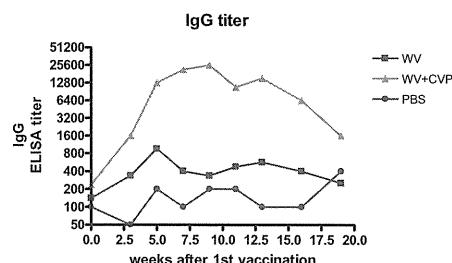


図 2 特異的 IgG-ELISA 抗体価

特異的 IgA-ELISA 抗体価

鼻腔拭い液中の特異的 IgA-ELISA 抗体価は、図 3 の通り、粘稠剤添加の有無に関わらず、ほぼ同等となった。また、IgA-ELISA 抗体価は 1 回目の接種の 5 週間後 (2 回目の接種の 2 週間後) から 1 回目の接種から 19 週間後 (2 回目の接種から 16 週間後) までほぼ同水準で持続していた。

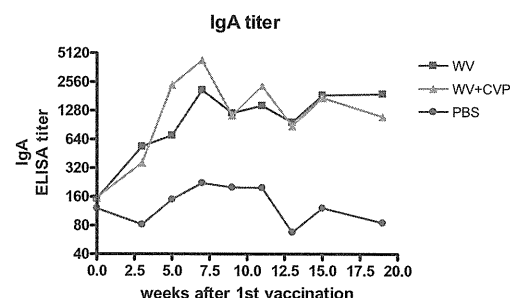


図 3 特異的 IgA-ELISA 抗体価

D. 考 察

これまでの試験から、抗原が全粒子ワクチンである場合は、添加物を加えなくとも鼻腔粘膜の IgA 抗体価が感染防御レベルまで誘導可能であるものの、血清の抗体価を皮下・筋肉内接種に匹敵するレベルまで産生誘導させるためにはアジュバントが必須であると考えられていた。しかし、今回の試験では粘稠剤を添加するだけでも粘膜と血清の両方に免疫を