

日後に血清および鼻腔洗浄液を回収した。

5) 血清および鼻腔洗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。

C. 研究結果

カニクイザルを用いた研究

1) 経鼻ワクチン接種 1 年後の感染防御効果

高病原性鳥インフルエンザ H5N1 インドネシア株ワクチン IBCDC-RG2 経鼻ワクチンを 3 週間間隔で 2 回接種 1 年後にワクチン株と相同株である A/Indonesia/5/05 株を経鼻及び経気管で攻撃感染を行った。コントロールの未免疫群において感染後 2, 5 日目の鼻腔ぬぐい液または咽頭ぬぐい液においてウイルスの分離されたが、ワクチン群のカニクイザルにおいては 3 頭中 1 頭で咽頭ぬぐい液でウイルスがみられたのみであり 2 頭ではウイルスはまったく分離されなかった。経鼻ワクチン接種 1 年後においても特異的抗体価の持続が見られさらに攻撃感染により素早く抗体の誘導がみられた。

2) 高病原性鳥インフルエンザ H5N1 経鼻ワクチンによるブースター効果と交叉防御

経鼻インフルエンザワクチン接種 1 年後の相同ワクチン株、または非相同のワクチン株によるブースター効果を調べた。初回免疫と同じ株であるインドネシア株で追加免疫をおこなっ

た場合、ベトナム株の感染によりワクチン株であるインドネシア株に対する抗体が優位に上昇した。一方初回免疫と非相同ウイルス株であるベトナム株により追加免疫を行った群においてはベトナム株ウイルス感染によりインドネシア、ベトナム双方の株に対する抗体応答が同等に行われた。更に攻撃感染後の咽頭ぬぐい液及び鼻腔ぬぐい液中のウイルス価は双方ともにほとんど認められなかった。非相同ワクチン株によるブースター効果と非相同ワクチン株の経鼻接種による交叉防御効果がヒトに近い霊長類で示すことができた。

マウスを用いた研究

インフルエンザウイルス PR8 株の感染、経鼻あるいは皮下ワクチン接種、または NRT 株の感染、経鼻あるいは皮下ワクチン接種により基礎免疫を構築したマウスに対して、NRT 株の経鼻あるいは皮下ワクチンを接種しその後の NRT 株による攻撃感染を行った際に、ワクチン接種により誘導される抗体応答に基礎免疫が与える影響と攻撃感染ウイルスの増殖抑制効果を検討した。

各基礎免疫を有する個体に関して NRT 株の皮下ワクチン接種を施した場合、後の NRT 株の攻撃に対して防御効果が認められたのは、NRT 株の感染による基礎免疫を有する個体のみであった。同様に、各基礎免疫を有する個体に関して NRT 株の経鼻ワクチンを施した場合、NRT 株感染による基礎免疫を有する個体に加えて、PR8 株感染そして NRT 株経鼻ワクチン接種による基礎免疫を有する個体の順にウイルスの増殖抑制効果が得られた。

次に、PR8 株あるいは NRT 株の感染による基礎免疫を有する個体に対して NRT 株の経鼻あるいは皮下ワクチン接種を行った場合に誘導される NRT 株 HA 特異的な抗体応答を検討した。血清中の IgG 抗体応答は、NRT 株の経鼻あるい

は皮下ワクチン接種を行った場合においても、PR8 株の感染基礎免疫を有する個体と比べて NRT 株の感染基礎免疫を有する個体において優位に強く誘導されて誘導されていた。これに対して鼻腔洗浄液中の IgA 抗体応答は、NRT 株の皮下ワクチン接種を行う場合は PR8 株と比べて NRT 株の感染基礎免疫を有する個体において強く誘導されて誘導されていたが、NRT 株の経鼻ワクチン接種を行う場合には NRT 株感染基礎免疫とほぼ同等に PR8 株の感染基礎免疫を有する個体でも誘導されていた。

D. 考 察

インフルエンザワクチンにおいて重要なのは感染を防御する上で最も効果的な感染部位である上気道の粘膜上に粘膜免疫を誘導する事とその免疫の持続である。ヒトに近い免疫系を持つカニクイザルにおいて経鼻ワクチンの感染防御効果が約 1 年以上持続する事が示された。また、経鼻ワクチンを接種しておくことにより 1 年後の感染に対しても非免疫群に比較し速やかに粘膜での免疫応答が増強される事がわかった。さらに初回ワクチン接種後の追加免疫においては相同ワクチン株によるブースター効果だけでなく、非相同の H5N1 インフルエンザワクチン株による追加免疫で初回免疫に用いたワクチン株に対する特異的抗体が誘導される事が示された。本結果は経鼻インフルエンザワクチンによる基礎免疫の重要性を示すとともに clade の異なるワクチン株による広い交叉防御効果のある免疫誘導が可能であることが示された。

また、経鼻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。NRT 株の感染による基礎免疫があれば、経鼻あるいは皮下ワクチン接種でも NRT 株による攻

撃感染を防御することができた。PR8 株の感染履歴がある場合には、皮下ワクチン接種では攻撃感染を防御することができなかったが、経鼻ワクチン接種では気道粘膜上に分泌型 IgA 抗体を誘導することで、ウイルス増殖を抑えることができた。またワクチン接種による基礎免疫の影響を考えた場合、NRT 株の経鼻ワクチン接種による基礎免疫を有しており NRT 株の経鼻ワクチン接種を行った個体のみに、攻撃感染のウイルス増殖を抑制する効果が得られた。

E. 結 論

経鼻粘膜投与型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ヒトに近い免疫系を持つカニクイザルで示された。

またヒトは、マウスと異なり免疫学的にナイーブな状態にはない。したがって、ワクチンにより誘導される防御効果は、すでに有する基礎免疫の状態が影響を及ぼすことが考えられる。現行の注射によるワクチン接種だけで獲得される基礎免疫では、新しい抗原性を有するウイルスが流行った時には効果が得られない可能性が示唆された。NRT 株の上気道攻撃感染の系においては、全粒子不活化ワクチンを用いた経鼻インフルエンザワクチン接種により防御効果を得るためには 2 回の接種を必要としたが、ウイルス感染の経験があれば 1 回のワクチン接種で防御効果が得られることが明らかになった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ichinohe T, Ainai A, Ami Y, Nagata N, Iwata N, Kawaguchi A, Suzaki Y, Odagiri T, Tashiro M, Takahashi H, Strayer D, Carter W, Chiba J, Tamura S, Sata T, Kurata T, and 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.
2. Kuroda M, Katano H, Nakajima N, Tobiume M, Ainai A, Sekizuka T, Hasegawa H, Tashiro M, Sasaki Y, Arakawa Y, Hata S, Watanabe M, Sata T. Characterization of quasispecies of pandemic 2009 influenza A virus (A/H1N1/2009) by de novo sequencing using a next-generation DNA sequencer. **PLoS One**. 2010 Apr 23;5(4):e10256.
3. Yamazaki T, Nagashima M, Ninomiya D, Arai Y, Teshima Y, Fujimoto A, Ainai A, Hasegawa H, Chiba J. Passive Immune-Prophylaxis against Influenza Virus Infection by the Expression of Neutralizing Anti-Hemagglutinin Monoclonal Antibodies from Plasmids. **Jpn J Infect Dis**. 2011 Jan;64(1):40-9.
4. Ainai 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. [Epub ahead of print]
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.

9. 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.
 10. 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.
 11. Nakajima N, Van Tin N, Sato Y, Thach HN, Katano H, Diep PH, Kumasaka T, Thuy NT, Hasegawa H, San LT, Kawachi S, Liem NT, Suzuki K, Sata T. Pathological study of archival lung tissues from five fatal cases of avian H5N1 influenza in Vietnam. **Mod Pathol.** 2012 Nov 23. doi: 10.1038/modpathol.2012.193. [Epub ahead of print]
 12. Sasaki I, Hoshino K, Sugiyama T, Yamazaki C, Yano T, Iizuka A, Hemmi H, Tanaka T, Saito M, Sugiyama M, Fukuda Y, Ohta T, Sato K, Ainai A, Suzuki T, Hasegawa H, Toyama-Sorimachi N, Kohara H, Nagasawa T, Kaisho T. Spi-B is critical for plasmacytoid dendritic cell function and development. **Blood.** 2012 Oct 11. [Epub ahead of print]
 13. van Riet E, Ainai A, Suzuki T, Hasegawa H. Mucosal IgA responses in influenza virus infections: thoughts for vaccine design. **Vaccine.** 2012 Aug 31;30(40):5893-900. Epub 2012 Jul 24.
 14. 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.
 15. 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.
2. 学会発表
1. 長谷川秀樹、永田典代、岩田奈緒子、辻隆裕、佐多徹太郎 新型インフルエンザウイルス A/(H1N1)pdm のフェレットにおける病原性の検討 第 99 回日本病理学会総会 2010 年 4 月東京
 2. 中島典子、羽田悟、飛梅実、片野晴隆、永田典代、長谷川秀樹、岩田奈緒子、辻隆裕、渡辺正秀、佐多徹太郎 本邦初の新型インフルエンザウイルス

- (A/H1N1pdm)肺炎の剖検例 第99回日本病理学会総会 2010年4月東京
3. 瀧山晃弘、王磊、谷野美智枝、木村太一、西原広史、川岸直樹、國枝保幸、片野晴隆、長谷川秀樹、高木知敬、佐多徹太郎、田中伸哉 新型インフルエンザ(A/H1N1pdm)肺炎によるびまん性肺胞障害により急死した1剖検例 第99回日本病理学会総会 2010年4月東京
 4. 岩田奈緒子、永田典代、辻隆裕、長谷川秀樹、佐藤由子、佐多徹太郎 SARS-CoV感染動物モデルを用いたUV不活化SARS-CoVの免疫効果と副反応 第99回日本病理学会総会 2010年4月東京
 5. 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によるブースター効果と高病原性H5N1ウイルスの感染防御の検討 第58回日本ウイルス学会学術集会 2010年11月徳島
 6. 相内章、伊藤良、浅沼秀樹、鈴木忠樹、谷本武史、小田切孝人、田村慎一、佐多徹太郎、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/H1N1pdmウイルスの感染阻害効果の検討 第58回日本ウイルス学会学術集会 2010年11月徳島
 7. 山崎達也、二宮大輔、長島麻里亜、荒井由佳、手嶋保智、相内章、長谷川秀樹、藤本陽、千葉丈 インフルエンザ中和抗体発現プラスミドを用いた遺伝子治療による感染と重症化の阻止 第58回日本ウイルス学会学術集会 2010年11月徳島
 8. 永田典代、岩田奈緒子、長谷川秀樹、佐藤由子、森川茂、佐多徹太郎 SARS発症マウスモデルにおけるIFN- γ の投与効果 第58回日本ウイルス学会学術集会 2010年11月徳島
 9. 岩田奈緒子、永田典代、辻隆裕、長谷川秀樹、佐藤由子、横田恭子、宇田晶彦、水谷哲也、西條政幸、森川茂、佐多徹太郎 SARS-CoV感染動物モデルを用いたUV不活化SARS-CoVの副反応について 第58回日本ウイルス学会学術集会 2010年11月徳島
 10. 酒井宏治、田丸精治、前田健、永田典代、網康至、岩田奈緒子、鈴木忠樹、水谷哲也、福士秀悦、須崎百合子、緒方もも子、長谷川秀樹、西條政幸、山田靖子、倉根一郎、森川茂 カニクイザルで致死の感染症を起こしたイヌジステンパーウイルスのサル及びヒスでの病原性の解析 第58回日本ウイルス学会学術集会 2010年11月徳島
 11. 伊藤良、相内章、浅沼秀樹、鈴木忠樹、千葉丈、田村慎一、田代真人、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抗原性の異なる株による追加免疫時の免疫応答の解析 第58回日本ウイルス学会学術集会 2010年11月徳島
 12. 中島典子、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹、佐多徹太郎 日本の2009年H1N1新型インフルエンザウイルス感染症剖検例の病理 第58回日本ウイルス学会学術集会 2010年11月徳島
 13. 池辺詠美、川口晶、田口慎也、川嶋太郎、田中勇悦、堀光雄、澤洋文、西園晃、長谷川秀樹、伊波英克 分子シャペロン阻害剤によるTaxとTax結合蛋白質の機能相関性に対する抑制的影響 第58回日本ウイルス学会学術集会 2010年11月徳島
 14. 浅沼秀樹、信澤枝里、白倉雅之、許斐奈美、山本典生、中内美奈、網康至、長谷川秀樹、相内章、高下恵美、小淵正次、徐紅、岸田典子、小田切孝人、田代真人 新型インフルエンザウイルス(H1N1pdm)の増殖性に関する検討 第58回日本ウイルス学会学術集会 2010年11月徳島
 15. 相内章、田村慎一、鈴木忠樹、伊藤良、浅沼秀樹、谷本武史、五味康行、奥野良信、小田切孝人、田代真人、佐多徹太郎、倉田毅、長谷川秀樹 インフルエンザワ

- クチン経鼻接種による成人での血清および鼻腔洗浄液中のウイルス特異的中和抗体の評価 第14回日本ワクチン学会学術集会 2010年12月東京
16. 谷本武史、高野大輔、森本孝一、五味康行、長谷川秀樹、田村慎一、宮崎隆、真鍋貞夫、石川豊数、奥野良信 経鼻インフルエンザワクチンによる免疫獲得効果検討 第14回日本ワクチン学会学術集会 2010年12月東京
17. 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 第14回日本ワクチン学会学術集会 2010年12月東京
18. 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
19. 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 2011年4月横浜
20. 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
21. 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
22. 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
23. 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
24. 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
25. 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
26. 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
27. 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
28. 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
29. 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
30. 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
31. 相内章、浅沼秀樹、谷本武史、小田切孝人、田村愼一、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
32. 長谷川秀樹：次世代ワクチンとしての経鼻インフルエンザワクチン。第60回日本ウイルス学会学術集会（大阪）2012年11月
33. 山本典生、浅沼秀樹、佐藤佳代子、中内美奈、高橋仁、許斐奈美、相内章、長谷川秀樹、田代真人：細胞培養もしくは鶏卵で製造されたインフルエンザワクチンの品質管理試験および免疫応答への影響。第60回日本ウイルス学会学術集会（大阪）2012年11月
34. 川口晶、鈴木忠樹、相内章、佐藤由子、信澤枝里、田代真人、長谷川秀樹：喘息発作誘発モデルを用いたインフルエンザウイルス感染症の病態解析。第60回日本ウイルス学会学術集会（大阪）2012年11月
35. 池田千将、伊藤良、相内章、鈴木忠樹、田村愼一、田代真人、浅沼秀樹、長谷川秀樹：基礎免疫を有する個体に対する経鼻投与型インフルエンザワクチン効果。第60回日本ウイルス学会学術集会（大阪）2012年11月

36. 泉地恭輔、相内章、鈴木忠樹、浅沼秀樹、長谷川秀樹：経鼻投与型インフルエンザワクチンによるマウス母子免疫の解析。第 60 回日本ウイルス学会学術集会（大阪）2012 年 11 月
37. 鈴木忠樹、川口晶、相内章、田村慎一、伊藤良、小田切孝人、田代真人、長谷川秀樹：インフルエンザワクチン経鼻接種により鼻腔内に誘導される分泌型 IgA 抗体の性状解析。第 16 回日本ワクチン学会学術総会（横浜）2012 年 11 月
38. 相内章、池田千将、伊藤良、鈴木忠樹、泉地恭輔、田村慎一、田代真人、浅沼秀樹、長谷川秀樹：感染あるいはワクチン接種歴が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与える影響。第 16 回日本ワクチン学会学術総会（横浜）2012 年 11 月
39. Elly van Riet, Ainai A, Ito R, Senchi K, Suzuki T, Tamura S-I, Tashiro M, Hasegawa H: Characteristics of IgA versus IgG human monoclonal antibodies cloned from human plasma cells induced upon intranasal H5N1 vaccination. 第 16 回日本ワクチン学会学術総会（横浜）2012 年 11 月
40. Hasegawa H, Ainai A, Suzuki T, Tamura S-I, Tashiro M, Kurata T: Analysis of protective immune responses after intranasal administration of an inactivated whole-virion influenza vaccine in human. 第 16 回日本ワクチン学会学術総会（横浜）2012 年 11 月
41. 浅沼秀樹、相内章、佐藤佳代子、許斐奈美、岸田典子、長谷川秀樹、山本典生、田代真人：野外株より細胞培養インフルエンザワクチンの種候補株を選定する基準の検討。第 16 回日本ワクチン学会学術総会（横浜）2012 年 11 月
42. 山崎達也、二宮大輔、長島麻里亜、荒井由佳、手嶋保智、長谷川秀樹、相内章、藤本陽、千葉丈：インフルエンザ中和抗体発現プラスミドを用いた受動免疫法の応用研究～長期的なウイルス防御効果と免疫不全マウスへのウイルス防御効果の検討～第 16 回日本ワクチン学会学術総会（横浜）2012 年 11 月

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

課題2. 注射型と粘膜型ワクチンの有効性と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

(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

研究要旨: 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の出現が加速している。そのため H5 プレパンデミックワクチンは、将来出現する H5 パンデミックウイルスとは抗原性が異なることが前提と考えられる。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、その多様性を継続して調べた。その結果、現在流行している H5N1 ウイルスは、1996 年香港で初めて出現したウイルスの抗原性とは異なる変異株がその主流であった。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。次に A/duck/Hokkaido/Vac-3/2007 (H5N1)株から不活化全粒子ワクチンを試製し、経鼻接種によりマウスを免疫後、これらの抗原変異株で攻撃した。その結果、今回用いた H5N1 抗原変異株に対しても不活化全粒子ワクチンは有効な免疫を誘導できることが分かった。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。しかし、ウイルスの抗原変異が速いので、今後もワクチンの有効性の評価を継続する必要がある。また、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 H5 亜型以外のウイルスに対しても同様の準備を強化する必要がある。

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、ロシア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、2008年に北海道でオオハクチョウから分離されたクレード2.3.2に属するA/whooper swan/Hokkaido/1/2008 (H5N1) (Ws/Hok/08) および2009年に香港でハヤブサから分離されたクレード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。

Vac-3ワクチン株でマウス用の不活化全粒子経鼻ワクチンを試製した。免疫後、クレード2.3.2.1に属するA/duck/Vietnam/OIE-2533/2011 (H5N1)で攻撃し、攻撃3日目の肺からのウイルス回収と14日間の臨床症状を観察した。

野生水禽から分離されたA/duck/Hokkaido/5/1977 (H3N2)を豚の鼻腔内に接種し、回収した鼻腔ぬぐい液中のウイルスを次の豚に接種継代した。継代したウイルスのHA上のアミノ酸変異とヒト型のシアル酸レセプターに対する親和性の変化を解析した。

C. 研究結果

家禽と野鳥の気管ぬぐい液および糞便24, 124検体から合計394株のインフルエンザウイルスを分離同定した。これらのウイルスのHA亜型はH1からH13の13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およびH9亜型の低病原性鳥インフルエンザウイルスであったが、H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスも含まれていた。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。また2010-2011年冬に日本で分離されたH5N1ウイルスもクレード2.3.2.1に分類された。これらの分離ウイルスは当研究室のウイルス株ライブラリー (<http://virusdb.czc.hokudai.ac.jp/>) に追加保存した。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。

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。また、中国で流行している別の遺伝子型 (クレード2.3.4) のウイルスの抗原性を同様に評価したところ、このウイルスもこれまでに分離されているH5N1ウイルスと大きな抗原性の差があることがわかった。さらに、クレード2.3.2.1と2.3.4のウイルスの間にも抗原性の差があることがわかった。

ワクチン免疫鶏をWs/Hok/08株で攻撃したところ、14日間症状を示さず生残した。またワクチン免疫鶏を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。この成績から、不活化全粒子ワクチンにより抗原性の離れたクレード2.3.2.1のウイルスに対しても発症予防効果が認められたが、クレード2.3.4のウイルスに対してはその効果が低いことがわかった。そこで、通常の3倍量の抗原を含むワクチンをニワトリに接種したところ、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。

Vac-3ワクチンを経鼻接種したマウスの鼻腔中からワクチン株に対する分泌型IgA抗体が検出された。またA/duck/Vietnam/OIE-2533/2011 (H5N1)で攻撃3日後の肺乳剤中のウイルス感染価を調べたところ、ワクチンに含まれる抗原量に比例してウイルスの回収量が下がった。この傾向は攻撃後のマウスの体重変化でも認められた。以上より、不活化全粒子ワクチンの経鼻接種は、現在野外で流行している抗原変異株に対して有効なワクチン効果を賦与することが証明された。

A/duck/Hokkaido/5/1977(H3N2)を豚の鼻腔内で3代継代したウイルスはHAの226番目と228番目にアミノ酸の置換が認められ、トリ型シアル酸レセプターからヒト型シアル酸レセプターへの親和性が上昇した。本結果はH5亜型以外の鳥インフルエンザウイルスも豚での増殖脳を獲得す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あることを示している。

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、投与方法について成績が得られた。しかし、ウイルスの抗原変異が速いので、今

後もワクチンの有効性の評価を継続する必要がある。

E. 結論

本研究結果から、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た。今後H5のみならず、新型インフルエンザウイルスとして出現する可能性のある亜型ウイルスに対して抗原性を考慮したワクチン株の選抜と試製ワクチンの評価が引き続き必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Okamatsu M, Tanaka T, Yamamoto N, Sakoda Y, Sasaki T, Tsuda Y, Isoda N, Kokumai N, Takada A, Umemura T and Kida H. (2010) 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.
- (2) Sakoda Y, Sugar S, Batchluun D, Erdene-Ochir TO, Okamatsu M, Isoda N, Soda K, Takakuwa H, Tsuda Y, Yamamoto N, Kishida N, Matsuno K, Nakayama E, Kajihara M, Yokoyama A, Takada A, Sodnomdarjaa R and Kida H. (2010) 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.
- (3) Tanaka T, Sunden Y, Sakoda Y, Kida H, Ochiai K and Umemura T. (2010) Lipopolysaccharide treatment and inoculation of influenza A virus results in influenza virus-associated encephalopathy-like changes in neonatal mice. *J Neurovirol* 16, 125-132.
- (4) 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. (2010) 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.
- (5) 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.
- (6) Isoda N, Tsuda Y, Sakoda 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.
- (7) Yamamoto N, Sakoda Y, Motoshima M, Yoshino F, Soda K, Okamatsu M and Kida H. (2011) Characterization of a non-pathogenic H5N1 influenza virus isolated from a migratory duck flying from Siberia in Hokkaido, Japan, in October 2009. *Virology* 418, 65.
- (8) 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* 8, 64.
- (9) 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.
- (10) Samad RA, Nomura N, Tsuda Y, Manzoor R, Kajihara M, Tomabechi D, Sasaki T, Okumai N, Ohgitani T, Okamatsu M, Takada A, Sakoda Y and Kida H. (2011) 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.
- (11) Kajihara M, Matsuno K, Simulundu E, Muramatsu M, Noyori O, Manzoor R, Nakayama E, Igarashi M, Tomabechi 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.
- (12) Sakoda Y, Okamatsu M, Isoda N, Yamamoto N, Ozaki K, Umeda Y, Aoyama S, Kida H: Purification of human and avian influenza viruses using cellulose sulfate ester (Cellufine Sulfate) in the process of vaccine production. *Microbiol Immunol* 56, 490-495, 2012
- (13) 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, 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* 93, 541-550, 2012.
- (14) 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* 74, 441-447, 2012.
- (15) Nomura N, Sakoda Y, Endo M, Yoshida H, Yamamoto N, Okamatsu M, Sakurai K, Hoang NV, Nguyen LV, Chu HD, Tien TN, Kida H: Characterization of avian influenza viruses isolated from domestic ducks in Vietnam in 2009 and 2010. *Arch Virol* 157, 247-257, 2012.
- (16) Arikata M, Itoh Y, Okamatsu M, Maeda T, Shiina T, Tanaka K, Suzuki S, Nakayama M, Sakoda Y, Ishigaki H, Takada A, Ishida H, Soda K, Pham VL, Tsuchiya H, Nakamura S, Torii R, Shimizu T, Inoko H, Ohkubo I, Kida H, Ogasawara K: Memory immune responses against pandemic (H1N1) 2009 influenza virus induced by a whole particle vaccine in cynomolgus monkeys carrying Mafa-A1*052ratio02. *PLoS One* 7, e37220, 2012.
- (17) Okamatsu M, Sakoda Y, Hiono T, Yamamoto N and Kida H: Potency of a vaccine prepared from A/swine/Hokkaido/2/1981 (H1N1) against A/Narita/1/2009 (H1N1) pandemic influenza virus strain. *Virology* 47, 2013.
- (18) Shichinohe S, Okamatsu M, Yamamoto N, Noda Y, Nomoto Y, Honda T, Takikawa N, Sakoda Y and Kida H: Potency of an inactivated influenza vaccine prepared from a non-pathogenic H5N1 virus against a challenge with antigenically drifted highly pathogenic avian influenza viruses in chickens. *Vet Microbiol*, in press,

2013.

2. 学会発表

- (1) 「ベトナムの家禽から分離された鳥インフルエンザウイルスの性状解析」野村直樹、迫田義博、遠藤真由美、吉田裕美、山本直樹、岡松正敏、櫻井健二、喜田宏 第58回日本ウイルス学会学術集会 (2010年、徳島)
- (2) 「カモとニワトリにおけるインフルエンザウイルスに対するシアル酸レセプターの局在」本島昌幸、岡松正敏、日尾野隆大、迫田義博、喜田宏 第58回日本ウイルス学会学術集会 (2010年、徳島)
- (3) 「モンゴルの野生水禽から分離されたH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスの性状」山本直樹、遠藤真由美、迫田義博、吉田裕美、佐藤由佳、岡松正敏、Damdinjav Batchhluun, Ruuragchaa Sodnomdarjaa、喜田宏 第58回日本ウイルス学会学術集会 (2010年、徳島)
- (4) 「Potency of the A/2009 (H1N1) pandemic influenza vaccine prepared from an isolate of swine origin, A/swine/Hokkaido/2/1981 (H1N1)」M. Okamatsu, N. Yamamoto, Y. Sakoda, H. Kida Options for the Control of Influenza VII (2010年、香港)
- (5) 「H9N2 Avian Influenza Virus Acquires High Pathogenicity by the Introduction of a Pair of Di-basic Amino Acid Residues at the Hemagglutinin Cleavage Site and Consecutive Passages in Chickens」K. Soda, S. Asakura, M. Okamatsu, Y. Sakoda, H. Kida Options for the Control of Influenza VII (2010年、香港)
- (6) 「H9N2 influenza virus vaccine prepared from a non-pathogenic isolate from a natural reservoir conferred protective immunity against the challenge with a human H9N2 virus in mice」N. Nomura, Y. Sakoda, K. Soda, M. Okamatsu, H. Kida Options for the Control of Influenza VII (2010年、香港)
- (7) 「カモとニワトリにおけるインフルエンザウイルスに対するシアル酸レセプターの局在」本島昌幸、岡松正敏、日尾野隆大、迫田義博、喜田宏 日本ウイルス学会北海道支部 第44回夏季シンポジウム (2010年、洞爺湖)
- (8) 「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)
- (9) 「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)
- (10) 「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)
- (11) 「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)
- (12) 「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)
- (13) 「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 V

- an 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)
- (14) 「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)
- (15) 「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)
- (16) 「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)
- (17) 「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)
- (18) 「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)
- (19) 「Characterization of H9N2 influenza A 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)
- (20) 「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)
- (21) 「日本における高病原性鳥インフルエンザの流行疫学について」迫田義博 第153回日本獣医学会学術集会学術シンポジウム「高病原性鳥インフルエンザ流行」 (2012年、埼玉)
- (22) 「Reintroduction of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus by migratory water birds, causing outbreaks in 2010-2011 winter season in Japan」 Sakoda Y, Ito T, Saito T, Kida H. 8th International Symposium on Avian Influenza (2012年、イギリス)
- (23) 「ベトナムの家禽から分離されたインフルエンザウイルスの遺伝子と抗原性の解析」西達也、岡松正敏、野村直樹、山本直樹、Nam Van Hoang、Long Van Nguyen、Huy Duc Chu、Tien Ngoc Tien、櫻井健二、迫田義博、喜田宏 日本ウイルス学会北海道支部第46回夏季シンポジウム (2012年、伊達)
- (24) 「Chicken influenza virus recognizes SA α 2,3 Gal of different carbohydrate structure from that recognized by duck influenza virus as the receptor」 Hiono T, Okamatsu M, Sakoda Y, Kida H. The 4th International Young Researcher Seminar for Zoonosis Control 2012 (2012年、札幌)
- (25) 「鳥インフルエンザウイルスがブタに感染するとSA α 2,6Galレセプターを認識するウイルスが選択される」七戸新太郎、岡松正敏、迫田義博、喜田宏 第60回日本ウイルス学会学術集会 (2012年、大阪)
- (26) 「ベトナムの家禽から分離されたインフルエンザウイルスの遺伝子と抗原性の解析」西達也、岡松正敏、野村直樹、山本直樹、Nam Van Hoang、Long Van Nguyen、Huy Duc Chu、Tien Ngoc Tien、櫻井健二、迫田義博、喜田

宏 第60回日本ウイルス学会学術集会 (2012年、大阪)

- (27) 「Global and national surveillance of animal influenza」 National to Regional to Global Surveillance - a Path to One Health, Sakoda Y, Prince mahidol Award Conference 2013 (2013年、バンコク)
- (28) 「ニワトリのインフルエンザウイルスはニワトリ気管上皮に発現するフコシル化 α 2,3シアル酸糖鎖をレセプターとして認識する」 日尾野隆大、岡松正敏、西原祥子、高瀬明、迫田義博、喜田宏 2nd Negative Strand Virus-Japan Symposium (2013年、沖縄)
- (29) 「鳥インフルエンザウイルスがブタに感染するとSA α 2,6Galレセプターを認識するウイルスが選択される」 七戸新太郎、岡松正敏、迫田義博、喜田宏 2nd Negative Strand Virus-Japan Symposium (2013年、沖縄)

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

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に対する IgE 抗体の感作は？

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ウイルス(WIV)にアルミアジュバント(Alum)を添加した剤型で製造され、成人では発熱率低く中和抗体の陽転率が 70%以上を示したことから製造承認を得た。しかし同じワクチンで小児における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ものの、ワクチン接種後の発熱率が、50-60%と高く申請を取りやめた。この原因を検討するとともに各種ワクチンに対するサイトカイン応答を検討し以下の結果を得た。

- 1) H5 WIV+Alum ワクチン接種により IgG1 抗体は 67/193(34.7%) , IgG4 は 42/193(21.8%)という有意な上昇を認めとくに 6 歳以下の被接種者では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さらなる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 1 回のワクチン接種で既往歴のないと思われる小児にも抗体誘導を示した。
- 2) ワクチン接種による免疫応答や副反応と考えられてきた発熱にはサイトカインが関与しており、リンパ球を H5N1 の種々ワクチン製剤で刺激し 24 時間後のサイトカイン産生能を検討した。Alum 単独刺激ではサイトカイン産生能はコントロールと差は認めなかったが、H5 WIV では IL-1 β , IL-6, IL-17, IFN- α , MCP-1, MIP-1 β , TNF- α の産生を誘導した。Alum 添加により IL-1 β の産生がさらに増強されたことから Alum の存在が inflammasome を刺激し IL-1 β の産生を増強し、発熱、免疫応答に関与している可能性が推察された。
- 3) インフルエンザワクチン以外に DPT, Hib, PCV7 ワクチン単独、同時刺激についてサイトカイン産生能を検討し DPT, Hib は IL-1 β , IL-6, TNF- α の炎症性サイトカインを誘導し、PCV7を含む複数のワクチン刺激で IL-1 β , G-CSF, TNF- α 産生能が増加した。複数のワクチンを同時接種し24時間以内に発熱を認めた 52 例と発熱を認めなかった20例の血清中サイトカインを比較すると炎症性サイトカインには有意差を認めなかったが発熱群で G-CSF 濃度が有意に高値を示した。

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
班員外研究協力者		
鈴木英太郎、宮田章子、尾崎隆男、西村直子		

粒子不活化+アルミニウムアジュバント (WIV+Alum)の剤型で製造され、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%以上の被接種者に認められ製造承認が得られた。小児での臨床試験結果では特に6歳以下の幼児では60%に発熱が認められたという事実が注目される。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、パンデミック対策の一環として予防対策の重要な課題であり、小児での反応を科学的に解明することはより安全で有効なインフ

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

ルエンザワクチンの開発につながるものと考えられる。この様な課題を究明するために以下の検討を行った。

- 1) マウスではインフルエンザワクチン接種により Th1 応答による IgG2 subclass 抗体が産生され、IgG subclass 抗体を解析することで Th1, Th2 応答を解析できる。一方、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。H5N1WIV+Alum 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た。
- 2) H5N1 WIV は粒子内のウイルス RNA が TLR7/8 の ligand として作用し、IFN- α/β を誘導し、一方 Alum は NOD-like receptor を刺激し IL-1 β , TNF- α の炎症性サイトカインを誘導することで CD4 依存性に抗体を誘導する。H5N1WIV, H5WIV+ Alum によるリンパ球のサイトカイン誘導能を検討した。
- 3) 有効なワクチンは自然免疫系に刺激を入れサイトカインを誘導する事で獲得免疫を調節する事が知られている。一方、こうしたサイトカインの誘導は発熱等の副反応と関連している可能性があり DPT, Hib, PCV7 の単独刺激、複数の刺激によるヒト末梢リンパ球のサイトカイン誘導能を検討し、ワクチン接種後に発熱を認めた例と発熱を認めなかった例の血清サイトカインを比較した。

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 例である。また、再同意の得られた一部成人の血清を使用した。

2009H1N1 パンデミック自然感染、パンデミックワクチン接種後に採取し保存してあった血清も検討対象として用いた

リンパ球のサイトカイン産生能の検討は東京医大小児科のスタッフ、入院患者の退院前の血液検査に採血した一部の静脈血 3ml を対象とした。インフルエンザ桿菌(Hib), 肺炎球菌ワクチン(PCV7)を含めた同時接種により 24 時間以内に発熱を認めた 52 例、発熱を認めなかった 20 例を対象に血清を

採取しサイトカインを測定した。この臨床試験は北里研究所病院倫理委員会で審議され承認を受けた。

(2) ウイルス抗原

H5N1 パンデミックワクチンは HA, NA タンパクが 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 μ g 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。洗浄後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) を添加し室温で 1 時間静置、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。

(4) リンパ球培養

ヘパリン加静脈血からリンパ球を分離し 10⁶/ml に調整し 24 穴プレートに 0.5 ml 培養しワクチン製剤 50 μ l で刺激し 24 時間後の培養上清を採取した。

(5) サイトカインの測定

血清、リンパ球培養のサイトカインは BioPlex human cytokine 17 plex を用いて測定した。

(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。

2009 年 H1N1 パンデミック自然感染、ワクチン接種の血清の抗体価測定は札幌医科大学倫理委員会で承認された。

ワクチン製剤のサイトカイン産生能の試験は東京医科大学病院の倫理委員会で審議され承認を受けた。

ワクチン接種後の血清サイトカインの検査は北里

研究所病院倫理委員会で審議され承認を受けた。

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%) と年長児ほど発熱率が下がってくるのがわかった。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	
小児 374 例	120/168 (71.4%) sc	374/374 (100%)	
	N=	Fever +	>38 C
<1 year	5	5 (100%)	5 (100%)
1-3 years	92	68 (74%)	52 (57%)
4-6 years	90	57 (63%)	48 (53%)
7-12 years	134	63 (47%)	39 (29%)
>13 years	53	10 (19%)	3 (6%)
Total	374	203 (54%)	147 (39%)
	N=	Mean ± SD	95% CI
Fever -	170	2.76 ± 1.26	2.58 - 2.95
Fever +	200	3.56 ± 1.30	3.38 - 3.74
>37.5	56	3.11 ± 1.27	2.77 - 3.45
>38	79	3.53 ± 1.32	3.24 - 3.82
>39	65	3.98 ± 1.17	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療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 がもっとも最も高く 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 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 100×2^6 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、 100×2^4 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 回接種後でも抗体価の変動は認めなかった。

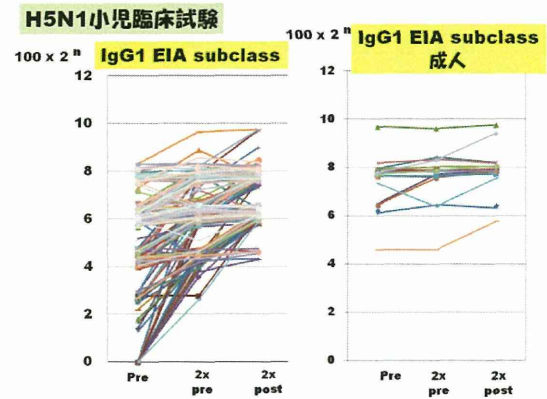


図 1. H5N1 パンデミックワクチン接種前後の IgG1 EIA 抗体の推移

小児における IgG1 subclass 抗体の推移について、2009 年 H1N1 パンデミックワクチン被接種者、ならびに 2009 H1N1 パンデミック自然感染例において比較検討し報告した (図 2)。2009 年 H1N1 パンデミックワクチン接種インフルエンザの自然感染例の IgG1 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小児例では、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 回ワクチン接種後、2 回接種後でも大きな変動を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 週後で良好な抗体反応を示した。

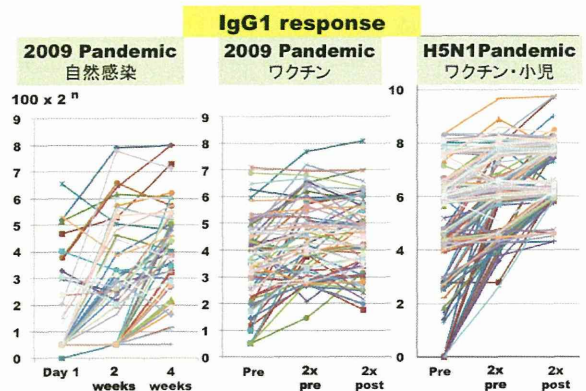


図 2. 2009 パンデミック自然感染、ワクチン接種、H5N1 パンデミックワクチンの免疫応答の比較

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既往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遺伝子組み換え法で作製され内部タンパクは PR8 (H1N1)由来である。EIA 抗原は全粒子不活化スプリット抗原で内部タンパクは PR8/ H1N1 である。従って、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上昇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、さらなる EIA 抗体上昇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さらに EIA 抗体が上昇する例は認められなかった。

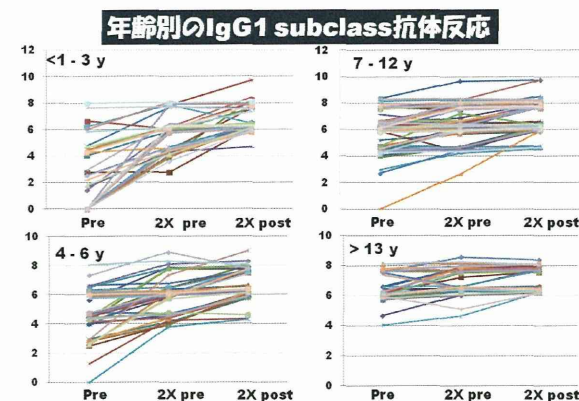


図 3. 年齢別の EIA 抗体反応

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。

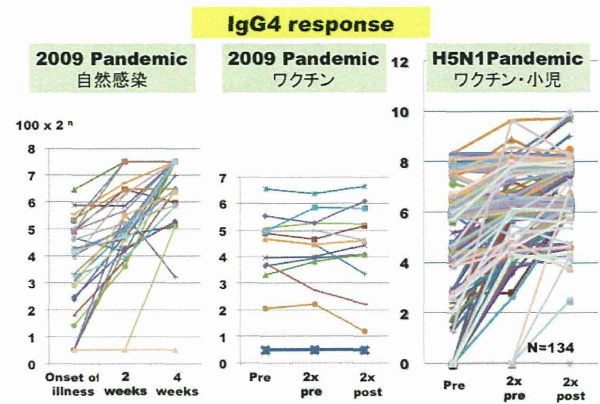


図 4. IgG4 抗体反応の比較

2009H1N1 パンデミックワクチン接種の成人例では接種前、1 回接種後、2 回接種後での抗体上昇は認めなかった。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 週で抗体上昇を認めた。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。

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%) に抗体反応を示し、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

	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

5) インフルエンザワクチン製剤によるサイトカン産生能

健康小児から成人(3 か月～58 歳)を対象にアルミニウムアジュバント 300 μ g/ml, 30 μ g/ml に調整しリンパ球を刺激しサイトカイン産生パターンを測定した。ワクチン製剤にはアルミニウムアジュバントが 300 μ g/ml の濃度で含まれている。アルミニウム単独刺激ではコントロール培養と同様で顕著なサイトカインの産生の増加は認めなかった。

16 例において 2008/09 年度の H1N1 ワクチンに含まれていた A/Brisbane/H1N1 split、2009 年のパンデミックワクチン A/California/2007 H1N1 split、2004 ベトナム株から作製した H5N1split ワクチンを HA タンパクとして 30 μ g/ml に調整し 0.1ml で刺激した。異なるインフルエンザウイルス株の split 製剤と H5N1 ベトナム株を同様に split 製剤にしたものではサイトカイン産生パターンには差を認めず、株間のサイトカン誘導能には差がなかった(図 5)。

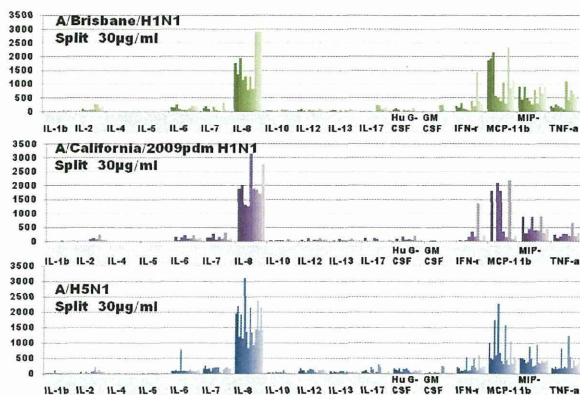


図 5. 異なるインフルエンザウイルス株の split 製剤によるサイトカン産生パターン

6) H5N1 ワクチン製剤によるサイトカン産生

25 例の健康小児、成人のリンパ球を H5N1 全粒子不活化ワクチン(WIV)、H5N1 全粒子不活化+アルミアジュバント(WIV+Alum)、H5N1 スプリットワクチン(Split)の製剤(HA タンパク量 30 μ g/ml に調整)0.1ml で刺激し 24 時間後のサイトカイン産生パターンを測定し profile を図 6 に示した。

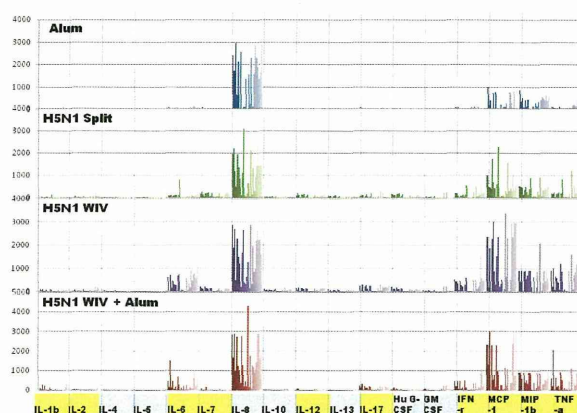


図 6. H5N1 スプリット、全粒子不活化(WIV)、全粒子不活化+アルミ(WIV+Alum)刺激によるサイトカイン産生パターン

Alum 単独の刺激ではサイトカインの産生の増加は認めず、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-1 β , IL-6, IL-17, IFN- α , 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。25 例のサイトカイン profile の平均値と 95%CI を表 3 に示した。Alum 単独刺激では MCP-1 の産生増加、H5 split の刺激 TNF- α , MCP-1 の産生量が増加し、H5WIV 刺激でサイトカインが産生され Alum 添加する事で IL-1 β 産生量が増加したが他のサイトカインの産生増量は認めなかった。

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 (169.0-390.5)	624.0 (424.3-823.7)	1023.2 (576.5-1469.9)

7) DPT, Hib, PCV7 ワクチン成分刺激によりサイトカイン産生能

インフルエンザワクチン製剤により炎症性サイトカインの産生が認められ Alum 添加製剤で IL-1 β 産生を増強させる事が明らかとなりワクチン剤型によりサイトカイン産生パターンが異なる事から現在使用されているワクチンについても検討が必要である事が推察された。