

201225037A

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24年度 総括・分担研究報告書

平成25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24年度 総括・分担研究報告書

平成25年 3 月

研究代表者 長谷川 秀樹

(国立感染症研究所)

平成24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 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

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等粘膜ワクチンの有効性に関する研究・・・・・・・・・・ 1 1

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等粘膜ワクチンの有効性に関する研究・・・・・・・・・・ 1 7

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接種で誘導される抗体産生細胞の
評価に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1 9

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・・・・・・・・ 2 7

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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 3 1

I. 総括研究報告書

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

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、インフルエンザウイルスの感染阻止に働く気道粘膜上の分泌型 IgA 抗体を誘導することから、血清中の IgG 応答のみを誘導する現行の注射によるワクチンと比べて有効性が高いことが期待されている。実用化に向けた経鼻インフルエンザワクチンの臨床研究において、副反応の評価、年齢あるいは性別が有効性に与える影響を調べた。重篤な副反応は認められず誘導される抗体応答は年齢とともに減弱し、女性において高い傾向にあった。また、ワクチン接種により獲得される抗体産生形質細胞と記憶 B 細胞の解析を行った。2012-2013 シーズン用季節性インフルエンザウイルスから免疫応答評価用のワクチン原液を作製し、その品質管理試験及び安定性試験を行った結果、抗体価調査用として使用できることを確認した。また、ワクチン原液からヒトへの投与を想定した経鼻投与用試作ワクチン製剤を作製し、非臨床試験を開始した。粘膜ワクチンの有効性を高める創薬基盤研究では Type 8 PLA2 が RIG-I like receptor 経路を負に制御する因子であることが明らかとなった。

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

とがマウスを主体とした動物実験により明らかにされている。

ヒトにおける経鼻インフルエンザワクチンの実用化を考えた時、実験動物を用いた実験により得られた現象と同じことが、ヒトにおいて再現できるかが課題となる。また、経鼻インフルエンザワクチンは、現在、筋中ないし皮下に注射により接種される現行インフルエンザワクチンとは異なり、鼻腔領域内にワクチンを接種するために鼻腔領域を中心とした局所的な副反応を誘導する可能性がある。以上から、抗体応答に加えて接種に伴う副反応を十分に調査することが、経鼻ワクチン実用化に向けた重要な課題として考えられる。これらの課題に取

A. 研究目的

経鼻投与型インフルエンザワクチンは現行の注射によるワクチンとは異なり、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可能である。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

り組むため、ヒトの気道粘膜上に分泌される IgA 抗体応答を実際の生理的条件下にあ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)。

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に対して実施した副反応調査をもとに、生じる局所的あるいは全身性副反応を総括することと、年齢や性別が経鼻インフルエンザワクチンにより誘導される抗体応答等有効性に与える影響を評価することを目的とした。また不活化全粒子インフルエンザワクチンの経鼻接種を受けた被験者において、抗原特異的な抗体を産生する形質細胞と記憶 B 細胞の解析を行うことを目的とした。経鼻ワクチンの有効性評価の為の臨床研究に安全な材料の提供と安全性の確認を目的とした。有効性の基盤研究では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する。

B. 研究方法

1) ワクチン接種

健常人ボランティア 50 名 (22~68 歳、男性 36 名、女性 14 名) に対して、全粒子不活化ワクチン X-187 (A/Victoria/210/09(H3N2)由来; 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)。X-187 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) を用い濃縮することで、総タンパク質量を 1 mg/ml に調製した鼻腔洗浄液を用いて抗体応答の評価を行った。

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。

4) 副反応の評価

本研究では、ワクチン接種後に生じた局所のおよび全身性副反応の調査を行った。初回ワクチン接種から 24 時間以内と 3 日後、2 回目のワクチン接種から 24 時間以内と 3 日後に関し

て、生じた副反応に関して健康診断表への記録をお願いした。局所的な症状としては、鼻の痛み、鼻水、鼻づまり、くしゃみ、咳および喉の痛み、全身性の症状としては、倦怠感、頭痛、腹痛・下痢、筋肉痛、発熱に関して、症状無し、弱い症状、強い症状の三段階で評価した。

5) 抗体産生形質細胞の定量

ワクチン X-187 特異的な抗体を産生する形質細胞の測定は、ELISPOT 法により測定した。抗体産生形質細胞の解析には、Day10 と Day31 の末梢血（4 名）を用いた。

6) 記憶 B 細胞の定量

記憶 B 細胞の解析には、Day0、Day21 そして Day42 の末梢血（10 名）を用いた。被験者から回収した末梢血リンパ球を試験管内で刺激し、この刺激に応じて抗体を産生する細胞を記憶 B 細胞とした。ELISPOT 法による抗体産生細胞の測定系において、この試験管内刺激を行った細胞を用いることで抗体を産生する細胞を記憶 B 細胞としてカウントし、評価を行った。

7) 経鼻接種による免疫応答評価用インフルエンザワクチン原液の作製

2012/2013 冬シーズンの季節性インフルエンザワクチン株ウイルスである

- ・ A/California/7/2009 (H1N1) pdm09
- ・ A/Victoria/361/2011 (H3N2)
- ・ B/Wisconsin/01/2010 (山形系統)

の 3 株を用い、ホルマリンにより不活化した単味全粒子ワクチン原液を作製した。これを用いて、免疫応答評価用の 2 種類の 3 混ワクチン原液を調製した。

8) 経鼻投与用試作ワクチン製剤の作製

上記の試験にて作製した単味不活化全粒子インフルエンザワクチン原液に粘稠剤を加え、人体への投与を想定した剤型で非臨床試験用の経鼻投与用季節性インフルエンザワクチン製剤を調製した。

9) 経鼻投与用試作ワクチン製剤の GLP 試験

上記非臨床試験用ワクチン製剤を被験薬とし、毒性（単回投与、間歇投与）試験、生殖発生試験（受胎能および着床までの初期胚発生、出生前および出生後の発生並びに母体の機能、胚・胎児発生に関する試験）、及び安全性薬理試験（中枢神経系に及ぼす影響、心血管系および呼吸系に及ぼす影響）を開始した。本試験は、GLP 適合施設に実施を委託した。

10) 抗ウイルス応答に関与する細胞内シグナルにおける Type 8 PLA2 の関与を調べるために、ヒト胎児腎細胞株 HEK293 細胞に Type8 PLA2 に対する siRNA、または Type8 PLA2 強制発現ベクターをトランスフェクションし、RIG-I 恒常活性化体 (aa 1-229) による I 型インターフェロン応答を ISRE-Luc のレポーターアッセイにより調べた。また RIG-I 恒常活性化体による転写因子 IRF3 の活性化（二量体化）を Native-PAGE 後に抗 IRF3 抗体でウェスタンブロットティングすることにより検出した。

C. 研究結果

副反応及び有効性の検討

健常人ボランティア 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 µg HA/500 µl 接種）を実施し、各時点における血清および鼻腔洗浄液中の 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 46 名の被験者に関して、ワクチン接種後の血清中 HI 抗体価を

欧州医薬品庁（EMA）が定めるインフルエンザワクチンに関する有効性判断基準をもとに評価したところ、【抗体変化率】、【抗体陽転率】、および【抗体保有率】の三項目を全てみることが明らかになっている。新たに確立した鼻腔洗浄液の調製法により、鼻腔洗浄液を用いた HI 抗体価の測定に成功し、血清中和抗体価と関連することが明らかになった。

本研究においては、被験者にワクチン接種後に生じた副反応の記録を行った。初回ワクチン接種から 24 時間以内と 3 日後、2 回目のワクチン接種から 24 時間以内と 3 日後において申告された副反応をまとめた。鼻の痛み、鼻水、鼻づまり、くしゃみ、咳および喉の痛みのいずれかの局所的な副反応を呈した被験者は、各報告時点で 36%、20%、24% および 8% となった。ワクチン接種の 24 時間以内で頻度は高く 3 日後には治まる傾向にあり、初回と比べて 2 回目のワクチンでは副反応を訴える被験者の数は減少する傾向にあった。これに対して、倦怠感、頭痛、腹痛・下痢、筋肉痛あるいは発熱といった全身性の副反応を呈した被験者は、各報告時点で 8%、2%、6% および 0% となった。全身性副反応は、局所的副反応と比較して頻度が低いことが明らかとなった。局所のおよび全身性副反応における症状は、いずれの項目に関しても軽微なものであり、持続的あるいは通院を要するような重度の症状は認められなかった。

さらに、本試験で得られた中和抗体応答に年齢や性別が及ぼす影響を検討したところ、年齢が増すに従い中和抗体価が減少し、60 歳代の被験者では顕著に低下することが明らかとなった。また、これらの抗体応答は男性と比べて女性で高い傾向にあることが示された。

形質細胞及び記憶 B 細胞の検討

健康人ボランティア対し、季節性インフルエン

ザウイルス全粒子不活化ワクチン X-187（A/Victoria/210/09 由来）を 45 µg HA/dose の接種量で、3 週間間隔 2 回の経鼻接種を行った。ワクチン接種に伴う抗体産生形質細胞の解析を行った。ワクチン X-187 特異的抗体を産生する形質細胞は、IgG 抗体産生細胞は Day10 と Day31 において大きな差が見られなかったのに対し、IgA 抗体産生細胞は Day31 において若干上昇する傾向にあった。次に、記憶 B 細胞の検討を行った。ワクチン接種前においては、ワクチン X-187 特異的な IgG 抗体を産生可能な記憶 B 細胞は少ないながらも 60% の被験者で測定可能であったのに対し、ワクチン特異的 IgA 抗体を産生可能な記憶 B 細胞は 1 名を除き検出できなかった。しかしながら、これらの IgG あるいは IgA 抗体を産生可能な記憶 B 細胞は、ワクチン接種に伴いその数が増加することが明らかとなった。

上述のワクチン特異的抗体産生可能な記憶 B 細胞比率と中和抗体価（あるいは HI 抗体）との関係性を調べたところ、末梢血中の記憶 B 細胞数と血清あるいは鼻腔洗浄液中の中和抗体価（あるいは HI 抗体価）の間には相関関係があることが示された。また、末梢血中に存在する IgA 抗体産生記憶 B 細胞数は、鼻腔洗浄液中の IgA 抗体応答と相関し、血清中の IgG 抗体応答とは相関しないことが明らかとなった。

ワクチン原液の作製

経鼻接種による免疫応答評価用インフルエンザワクチン原液の作製

調製した 2 種のワクチン原液について、HA 含量試験を行なった。2 種類のワクチン原液の HA 含量は、どちらも設定値 ±15% の範囲内であり、無菌試験も適合した。

品質管理試験

経鼻投与用試作ワクチン製剤の作製

作製した経鼻投与式季節性インフルエンザワクチンの品質管理試験を行なった。HA 含量試験、チメロサル含量試験、浸透圧試験、性状確認試験、エンドトキシン試験、pH 試験、粘度測定試験については事前に設定していた規格値の範囲内の成績が得られた。また、常温における光安定性については 48 時間安定であり、無菌試験にも合格したため、非臨床試験に使用できるものと判断した。

経鼻投与用試作ワクチン製剤の GLP 試験

GLP 適合施設下で各試験における投与が終了し、分析及び成績の取り纏めを行っている。被験物質の 1 回あたりの投与量は、成人の体重 (50 kg) あたりの予定臨床投与量の数十倍に相当するが、現在までのところ、被験薬に起因する有害な影響は報告されていない。

有効性を高める基盤研究

HEK293 細胞において、Type8 PLA2 を siRNA により発現抑制したところ、RIG-I 恒常活性化体の発現により誘導される I 型インターフェロン応答が有意に増強された。一方、Type8 PLA2 を強制発現させると、RIG-I 恒常活性化体による I 型インターフェロン応答は顕著に抑制された。同様の結果は、RIG-I like 経路を構成する分子である IPS-1/MAVS、IKK ϵ 、IRF3 の過剰発現による I 型インターフェロン応答においても得られた。また Type8 PLA2 の強制発現は、RIG-I 恒常活性化体による IRF3 の二量体化を抑制することもわかった。Type8 PLA2 は N 末端がミリスチル化されており、細胞質と膜の両方に存在する。Type8 PLA2 による I 型インターフェロン応答シグナルの抑制における酵素活性やミリスチル化の必要

性を調べたところ、IRF3 の過剰発現による I 型インターフェロン応答は酵素活性を欠失した Type8 PLA2 (S234C) やミリスチル化されない Type8 PLA2 (G2A) では抑制できなかった。

D. 考 察

経鼻インフルエンザワクチンの実用化を目指した臨床研究の実施により、ヒトにおいても鼻腔洗浄液中に中和活性を有する抗体応答が認められ、且つ血清中 HI 抗体応答は EMA が定めるインフルエンザワクチンの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。経鼻インフルエンザワクチン特異的な副反応を評価することは重要な課題と考えられる。

本試験において認められた局所的あるいは全身性副反応はいずれも軽微なものであり、通院を要するような重篤なものではなかったことから、経鼻インフルエンザワクチンは実用性の高いワクチンであると考えられる。

また、今回のワクチン接種によって誘導された抗体応答を年齢別あるいは性別により評価したところ、60 歳代の被験者では顕著にその抗体応答が低下し、男性よりも女性で高い応答を示すことが明らかになった。女性はワクチン接種において I 型インターフェロンの産生量が高く免疫誘導能が高いという報告があり、我々の結果は、この報告を反映する形となった。より効果の高いワクチン開発を目指すためには、年齢や性差によらず十分な抗体応答を誘導できる手段を考える必要があると考えられる。

末梢血中に誘導されるワクチン特異的な IgG 抗体産生形質細胞はワクチン接種に伴い目立った増加は認められなかったが、その存在比率は既に報告がある現行のワクチンによって誘導されるものと比較して大きな差は認め

られなかった。これに対し IgA 抗体産生形質細胞は、ワクチン接種に伴い増加することが示唆された。また末梢血中に誘導される IgG あるいは IgA を産生しうる記憶 B 細胞はワクチン接種によって増加することが明らかとなった。さらには、末梢血中に誘導される IgA 抗体産生記憶 B 細胞数は、鼻腔洗浄液中の IgA 抗体応答と相関することが明らかとなり、これを反映し中和抗体価（あるいは HI 抗体価）が増強された。経鼻インフルエンザワクチン接種により IgA 抗体を産生する形質細胞と記憶 B 細胞が誘導されることで、上気道での IgA 抗体の分泌が促進され、鼻腔粘膜上でのウイルスの中和が達成される関係性を裏付ける重要な知見であると考えられる。

本研究において、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は、ヒトにおいても有意にウイルス特異的抗体産生細胞を誘導可能であり、ウイルスに対する中和抗体および HI 抗体はこれら抗体産生細胞の誘導と相関していることが明らかとなった。

試験ワクチンに関して季節性インフルエンザに対するワクチン原液を作製し、抗体価調査用として提供するとともに、非臨床試験用として人体への投与を想定した剤型の試作ワクチン製剤を作製した。ワクチン原液、試作ワクチン製剤とも規格値に合格したため、それぞれの目的に使用可能であると判断し、これらを用いた試験を進めている。

有効性を高める基盤研究においては哺乳動物培養細胞を用いた解析から、Type 8 PLA2 は RIG-I like receptor 経路を負に制御する因子であることが明らかとなった。Type2 PLA2 の過剰発現は RIG-I 恒常活性化体による IRF3 の二量体化を抑制したことから、RIG-I の下流かつ IRF3 の上流において Type8 PLA2 が作用していることが示唆された。RIG-I like receptor 経路

はミトコンドリア外膜に存在する IPS-1/MAVS を介するシグナル経路である。Type8 PLA2 の作用には膜との相互作用に重要なミリスチル化が必要であったことから、ミトコンドリア膜上で RIG-I like receptor 経路を制御していることが考えられる。また Type8 PLA2 の作用において酵素活性の必要性も見出すことができた。本酵素の作用機構を詳細に解析するとともに、阻害剤の開発・応用も進めていきたい。

E. 結 論

全粒子不活化インフルエンザワクチンの経鼻接種は、EMA が定める有効性判断基準を十分満たすワクチン接種法である。接種経路の変更を伴うために、生じる副反応を詳細にわたり評価する必要がある。本試験では重篤な副反応事例がなかったことから、経鼻インフルエンザワクチンはヒトにおいて十分に実用可能なワクチンであると考えられる。ワクチンにより誘導される HI 抗体価あるいは中和抗体価の評価に加えて、体内で起きている免疫応答を正しく評価することはワクチンの有効性を示す上で重要である。鼻腔粘膜上の IgA 抗体および中和抗体と相関する末梢血中のワクチン特異的 IgA 抗体産生細胞の比率も合わせて評価することで、ヒトにおける経鼻インフルエンザワクチンの有効性を明らかにできると期待する。本研究において作製した、全粒子インフルエンザワクチン原液、及び経鼻投与用季節性インフルエンザワクチン製剤は事前に設定した規格値に適合した成績であり、抗体価調査、非臨床試験に使用できるものであった。今後は、

- (1) 抗体価調査において有用な成績を得る
- (2) 非臨床試験において安全であることを確認する
- (3) 非臨床試験に用いた試作ワクチン製剤を用いた動物実験により、用法・用量・有効性の

根拠となる成績を集積する等の検討を行う予定である。

哺乳動物培養細胞を用いた解析から、Type 8 PLA2はRIG-I like receptor経路を負に制御する因子であることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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]
- 2) 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, Aina 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]
- 3) van Riet E, Aina 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.
- 4) 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.
- 5) Aina A, Tamura S, Suzuki T, Ito R, Asanuma H, Tanimoto T, Gomi Y, Manabe S, Ishikawa T, Okuno Y, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Kurata T, Hasegawa H. Characterization of neutralizing antibodies in adults after intranasal vaccination with an inactivated influenza vaccine. *J Med Virol*. 2012 Feb;84(2):336-44.
- 6) Fouchier RA, García-Sastre A, Kawaoka Y, Barclay WS, Bouvier NM, Brown IH, Capua I, Chen H, Compans RW, Couch RB, Cox NJ, Doherty PC, Donis RO, Feldmann H, Guan Y, Katz JM, Kiselev OI, Klenk HD, Kobinger G, Liu J, Liu X, Lowen A, Mettenleiter TC, Osterhaus AD, Palese P, Peiris JS, Perez DR, Richt JA, Schultz-Cherry S, Steel J, Subbarao K, Swayne DE, Takimoto T, Tashiro M, Taubenberger JK, Thomas PG, Tripp RA, Tumpey TM, Webby RJ, Webster RG. Transmission studies resume for avian flu. *Science*. 2013 Feb 1;339(6119):520-1.
- 7) Takayama I, Nakauchi M, Fujisaki S, Odagiri T, Tashiro M, Kageyama T. Rapid detection of the S247N neuraminidase mutation in influenza A(H1N1)pdm09 virus by one-step duplex RT-PCR assay. *J Virol Methods*. 2012 Dec 20;188(1-2):73-75.
- 8) Fujisaki S, Takashita E, Yokoyama M, Taniwaki T, Xu H, Kishida N, Sato H, Tashiro M, Imai M, Odagiri T. A single E105K mutation far from the active site of influenza B virus neuraminidase contributes to reduced susceptibility to multiple neuraminidase-inhibitor drugs. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Nov 3. doi:pii:

- S0006-291X(12)02087-6. 10.1016/j.bbrc.2012.10.095. [Epub ahead of print]
- 9) Uchida Y, Suzuki Y, Shirakura M, Kawaguchi A, Nobusawa E, Tanikawa T, Hikono H, Takemae N, Mase M, Kanehira K, Hayashi T, Tagawa Y, Tashiro M, Saito T. Genetics and infectivity of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses isolated from chickens and wild birds in Japan during 2010-11. *Virus Res.* 2012 Sep 19. doi:pil: S0168-1702(12)00322-X. 10.1016/j.virusres.2012.09.004. [Epub ahead of print]
 - 10) Klimov AI, Garten R, Russell C, Barr IG, Besselaar TG, Daniels R, Engelhardt OG, Grohmann G, Itamura S, Kelso A, McCauley J, Odagiri T, Smith D, Tashiro M, Xu X, Webby R, Wang D, Ye Z, Yuelong S, Zhang W, Cox N; Writing Committee of the World Health Organization Consultation on Southern Hemisphere Influenza Vaccine Composition for 2012. WHO recommendations for the viruses to be used in the 2012 Southern Hemisphere Influenza Vaccine: epidemiology, antigenic and genetic characteristics of influenza A(H1N1)pdm09, A(H3N2) and B influenza viruses collected from February to September 2011. *Vaccine.* 2012 Oct 5;30(45):6461-71. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.07.089.
 - 11) Obuchi M, Toda S, Tsukagoshi H, Oogane T, Abiko C, Funatogawa K, Mizuta K, Shirabe K, Kozawa K, Noda M, Kimura H, Tashiro M. Molecular analysis of genome of the pandemic influenza A(H1N1) 2009 virus associated with fatal infections in Gunma, Tochigi, Yamagata, and Yamaguchi prefectures in Japan during the first pandemic wave. *Jpn J Infect Dis.* 2012 Jul;65(4):363-7.
 - 12) Western Pacific Region Global Influenza Surveillance and Response System. Epidemiological and virological characteristics of influenza in the Western Pacific Region of the World Health Organization, 2006-2010. *PLoS One.* 2012; 7(5):e37568.
 - 13) Kishida N, Fujisaki S, Yokoyama M, Sato H, Saito R, Ikematsu H, Xu H, Takashita E, Tashiro M, Takao S, Yano T, Suga T, Kawakami C, Yamamoto M, Kajiyama K, Saito H, Shimada S, Watanabe S, Aoki S, Taira K, Kon M, Lin JH, Odagiri T. Evaluation of influenza virus A/H3N2 and B vaccines on the basis of cross-reactivity of postvaccination human serum antibodies against influenza viruses A/H3N2 and B isolated in MDCK cells and embryonated hen eggs. *Clin Vaccine Immunol.* 2012 Jun;19(6):897-908.
 - 14) Sriwilajaroen N, Fukumoto S, Kumagai K, Hiramatsu H, Odagiri T, Tashiro M, Suzuki Y. Antiviral effects of Psidium guajava Linn. (guava) tea on the growth of clinical isolated H1N1 viruses: its role in viral hemagglutination and neuraminidase inhibition. *Antiviral Res.* 2012 May;94(2):139-46. doi: /10.1016/j.antiviral.2012.02.013.
 - 15) Yoshida A, Kiyota N, Kobayashi M, Nishimura K, Tsutsui R, Tsukagoshi H, Hirano E, Yamamoto N, Ryo A, Saitoh M, Harada S, Inoue O, Kozawa K, Tanaka R, Noda M, Okabe N, Tashiro M, Mizuta K, Kimura H. Molecular epidemiology of the attachment glycoprotein (G) gene in respiratory syncytial virus in children with acute respiratory

infection in Japan in 2009/2010. J Med Microbiol. 2012 Jun;61(Pt 6):820-9.

- 16) Lee HC, Inoue T, Sasaki J, Kubo T, Matsuda S, Nakasaki Y, Hattori M, Tanaka F, Udagawa O, Kono N, Itoh T, Ogiso H, Taguchi R, Arita M, Sasaki T, Arai H. LPIAT1 regulates arachidonic acid content in phosphatidylinositol and is required for cortical lamination in mice. Mol Biol Cell. (2012) 23:4689-700.
- 17) Lee HC, Kubo T, Kono N, Kage-Nakadai E, Gengyo-Ando K, Mitani S, Inoue T, Arai H. Depletion of mboa-7, an enzyme that incorporates polyunsaturated fatty acids into phosphatidylinositol (PI), impairs PI 3-phosphate signaling in Caenorhabditis elegans. Genes Cells. (2012) 17:748-57.
- 18) Lee S, Uchida Y, Emoto K, Umeda M, Kuge O, Taguchi T, Arai H. Impaired retrograde membrane traffic through endosomes in a mutant CHO cell defective in phosphatidylserine synthesis. Genes. Cells. (2012) 17:728-36.
- 19) Yachi R, Uchida Y, Balakrishna BH, Anderluh G, Kobayashi T, Taguchi T, Arai H. Subcellular localization of sphingomyelin revealed by two toxin-based probes in mammalian cells. Genes Cells (2012) 17:720-7.

2. 学会発表

各研究分担者の報告書参照

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

長谷川秀樹、谷本武史

混合免疫賦活剤を含む新規ワクチン

出願番号 特願 2008-094360

出願日 平成 20 年 3 月 31 日

登録日 平成 25 年 2 月 8 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等粘膜ワクチンの有効性に関する研究

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

研究協力者：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、インフルエンザウイルスの感染阻止に働く気道粘膜上の分泌型 IgA 抗体を誘導することから、血清中の IgG 応対のみを誘導する現行の注射によるワクチンと比べて有効性が高いことが期待されている。現在、実用化に向けた健康人ボランティアを募った臨床研究を行っている。本研究では、全粒子不活化ワクチン経鼻接種を施された健康人ボランティアにおいて、ワクチン接種に伴う副反応の評価、また年齢あるいは性別が抗体応答に与える影響を明らかにすることを目的とした。その結果、経鼻インフルエンザワクチンにより、鼻水、鼻づまりなど軽微な副反応を生じるものの重篤な副反応は認められなかった。さらに、誘導される抗体応答は年齢とともに減弱し、女性において高い傾向にあった。

A. 研究目的

経鼻投与型インフルエンザワクチンは現行の注射によるワクチンとは異なり、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可能である。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マウスを主体とした動物実験により明らかにされている。

ヒトにおける経鼻インフルエンザワクチンの実用化を考えた時、実験動物を用いた実験により得られた現象と同じことが、ヒトにおいて再現できるかが課題となる。また、経鼻インフルエンザワクチンは、現在、筋中ないし皮下に注射により接種される現行インフルエンザワクチンとは異なり、鼻腔領域内にワクチンを接

種するために鼻腔領域を中心とした局所的な副反応を誘導する可能性がある。以上から、抗体応答に加えて接種に伴う副反応を十分に調査することが、経鼻ワクチン実用化に向けた重要な課題として考えられる。これらの課題に取り組むため、ヒトの気道粘膜上に分泌される IgA 抗体応答を実際の生理的条件下にあ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)。

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 名の健康人ボランティアに対して実施した副反応調査をもとに、生じる局所的あるいは全身性副反応を総括することと、年齢や性別が経鼻インフルエンザワクチンにより誘導される抗体応答に与える影響を評価することを目的とした。

B. 研究方法

1) ワクチン接種

健常人ボランティア 50 名（22～68 歳、男性 36 名、女性 14 名）に対して、全粒子不活化ワクチン X-187（A/Victoria/210/09(H3N2)由来；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）。X-187 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）を用い濃縮することで、総タンパク質量を 1 mg/ml に調製した鼻腔洗浄液を用いて抗体応答の評価を行った。総タンパク質量を 1 mg/ml に調製した鼻腔洗浄液は、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）。

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) 副反応の評価

本研究では、ワクチン接種後に生じた局所のおよび全身性副反応の調査を行った。初回ワクチン接種から 24 時間以内と 3 日後、2 回目のワクチン接種から 24 時間以内と 3 日後に関して、生じた副反応に関して健康診断表への記録をお願いした。局所的な症状としては、鼻の痛み、鼻水、鼻づまり、くしゃみ、咳および喉の痛み、全身性の症状としては、倦怠感、頭痛、腹痛・下痢、筋肉痛、発熱に関して、症状無し、弱い症状、強い症状の三段階で評価して頂いた。

C. 研究結果

健常人ボランティア 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、各時点における血清および鼻腔洗浄液中の 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 46 名の被験者に関して、ワクチン接種後の血清中 HI 抗体価を

欧州医薬品庁（EMA）が定めるインフルエンザワクチンに関する有効性判断基準をもとに評価したところ、【抗体変化率】、【抗体陽転率】、および【抗体保有率】の三項目を全てみたすことが明らかになっている（昨年度報告済み）。我々が確立した鼻腔洗浄液の調製法により、鼻腔洗浄液においても HI 抗体価の測定に成功し、血清中和抗体価と同様の挙動を示すこと、血清および鼻腔洗浄液中の中和抗体価は HI 抗体価の約 2 倍の応答を示し相関することが明らかになっている。

本研究においては、被験者にワクチン接種後に生じた副反応の記録をお願いした。初回ワクチン接種から 24 時間以内と 3 日後、2 回目のワクチン接種から 24 時間以内と 3 日後において申告された副反応をまとめた（表 1）。鼻の痛み、鼻水、鼻づまり、くしゃみ、咳および喉の痛みのいずれかの局所的な副反応を呈した被験者は、各報告時点で 36%、20%、24% および 8% となった。ワクチン接種の 24 時間以内で頻度は高く 3 日後には治まる傾向にあり、初回と比べて 2 回目のワクチンでは副反応を訴

える被験者の数は減少する傾向にあった（表 1）。また、本試験を通していずれかの時点でこれら局所的副反応を呈した被験者の割合は、49% となった。これに対して、倦怠感、頭痛、腹痛・下痢、筋肉痛あるいは発熱といった全身性の副反応を呈した被験者は、各報告時点で 8%、2%、6% および 0% となった。全身性副反応は、局所的副反応と比較して頻度が低いことが明らかとなり、継時的傾向は局所的副反応と同様であった（表 1）。また本試験を通して全身性副反応を呈した被験者の割合は、13% であった。局所および全身性副反応における症状は、いずれの項目に関しても軽微なものであり、持続的あるいは通院を要するような重度の症状は認められなかった。

さらに、本試験で得られた中和抗体応答に年齢や性別が及ぼす影響を検討したところ、年齢が増すに従い中和抗体価が減少し、60 歳代の被験者では顕著に低下することが明らかとなった。また、これらの抗体応答は男性と比べて女性で高い傾向にあることが示された。

表 1. 副反応の推移

		副反応を報告した被験者数(%)			
		初回ワクチン接種		2回目ワクチン接種	
		24時間以内	3日後	24時間以内	3日後
局所的副反応	鼻の痛み	5 (10)	1 (2)	4 (8)	0 (0)
	くしゃみ	3 (6)	3 (6)	5 (10)	1 (2)
	鼻水	9 (18)	5 (10)	10 (20)	2 (4)
	鼻づまり	5 (10)	7 (14)	6 (12)	2 (4)
	咳	4 (8)	2 (4)	2 (4)	1 (2)
	喉の痛み	5 (10)	1 (2)	1 (2)	0 (0)
	いずれかの症状	18 (36)	10 (20)	12 (24)	4 (8)
全身性副反応	倦怠感	2 (4)	0 (0)	1 (2)	0 (0)
	頭痛	4 (8)	1 (2)	3 (6)	0 (0)
	腹痛・下痢	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	筋肉痛	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	発熱	0 (0)	0 (0)	1 (2)	0 (0)
	いずれかの症状	4 (8)	1 (2)	3 (6)	0 (0)

局所的副反応（6 項目）あるいは全身性副反応（5 項目）に関して、初回あるいは 2 回目のワクチン接種から 24 時間以内および 3 日後の各時点において、報告をお願いした。対象は全被験者 50 名

D. 考 察

経鼻インフルエンザワクチンの実用化を目指した健常人ボランティアを募った臨床研究の実施により、ヒトにおいても鼻腔洗浄液中に中和活性を有する抗体応答が認められ、且つ血清中 HI 抗体応答は EMA が定めるインフルエンザワクチンの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。しかしながら、経鼻インフルエンザワクチンは鼻腔領域内にワクチンを噴霧するために、現行ワクチンでは認められなかった上気道における局所的な反応を伴う可能性がある。実用化を考える上で、経鼻インフルエンザワクチン特異的な副反応を評価することは重要な課題と考えられる。

本研究において、初回ならびに2回目のワクチン接種から24時間以内と3日後の計4回の時点において申告された副反応をまとめたところ、局所的副反応を訴える被験者の数が多かった(表1)。いずれかの申告時点で副反応を感じた被験者の割合は、局所的副反応は約半数で、全身性副反応は10人中1人の割合で認められた。今回の試験では、ワクチン接種直前に抗体価測定のために100mlの生理食塩水で鼻腔領域内の洗浄をお願いしているため、局所的副反応である鼻の痛み、鼻水そして鼻づまりが、この洗浄操作による副反応かワクチン接種によるものかを判断することは難しい。今回認められた副反応がワクチン接種に起因するの可否かは、プラセボ接種群との比較により明らかになるものと考えられる。また、本試験において認められた局所的あるいは全身性副反応はいずれも軽微なものであり、通院を要するような重篤なものではなかったことから、経鼻インフルエンザワクチンは実用性の高いワクチンであると考えられる。

本試験では明らかではないが、炎症性サイトカイン自体にアジュバント活性が認められる

事実から、副反応を呈した被験者においては高い抗体応答が誘導される可能性は否定できない。また、抗体応答の程度と副反応の関連性は、現時点においては明らかにされていないため、経鼻インフルエンザワクチンの実用化を考える上で、今後十分に検討を行う必要があると思われる。

また、今回のワクチン接種によって誘導された抗体応答を年齢別あるいは性別により評価したところ、60歳代の被験者では顕著にその抗体応答が低下し、男性よりも女性で高い応答を示すことが明らかになった。女性はワクチン接種において1型インターフェロンの産生量が高く免疫誘導能が高いという報告があり、我々の結果は、この報告を反映する形となった。より効果の高いワクチン開発を目指すためには、年齢や性差によらず十分な抗体応答を誘導できる手段を考える必要があると考えられる。

E. 結 論

全粒子不活化インフルエンザワクチンの経鼻接種は、EMAが定める有効性判断基準を十分満たすワクチン接種法である。接種経路の変更を伴うために、生じる副反応を詳細にわたり評価する必要がある。今回の試験で生じた副反応が、鼻腔洗浄操作あるいはワクチン自体に起因するものかは不明である。プラセボ接種群との比較、あるいは客観的な手段を用いて副反応を評価する必要があると考える。また、本試験では重篤な副反応事例がなかったことから、経鼻インフルエンザワクチンはヒトにおいて十分に実用可能なワクチンであると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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]
- 2) 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]
 - 3) 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.
 - 4) 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.
 - 5) 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：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
 - 2) 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
 - 3) 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
 - 4) 池田千将、伊藤 良、相内 章、鈴木忠樹、田村慎一、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
 - 5) 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
 - 6) 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
 - 7) 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