

2013/80/5A

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25年度 総括・分担研究報告書

平成26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25年度 総括・分担研究報告書

平成26年 3 月

研究代表者 長谷川 秀樹

(国立感染症研究所)

平成25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. 経鼻不活化全粒子インフルエンザワクチンにより鼻腔内に誘導される
分泌型 IgA 抗体の性状解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 9
研究代表者：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・・・・・・・・ 19
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レパートリーの解析・・・・・・・・ 23
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・・・・・・・・ 33
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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 37

I. 総括研究報告書

平成 25 年度 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

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。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、経鼻不活化全粒子インフルエンザワクチン接種後誘導される鼻腔中の抗体をゲル濾過クロマトグラフィーで分画し、その性状と中和能について検討し、pIgA のウイルス感染防御における役割を明らかにした。同時に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（ラットを用いた毒性・生殖発生試験、及びサルを用いた安全性薬理試験）を開始した。また高病原性鳥インフルエンザウイルス A(H5N1)の不活化全粒子ワクチンを用いた経鼻ワクチン接種により誘導される抗体の解析を行った。また、ワクチンによる免疫を増強する研究として哺乳動物培養細胞を用いて抗ウイルス応答に関与する細胞内シグナル伝達に対する Type 8 PLA2 の関与を調べ Type 8 PLA2 は IFN β による JAK-STAT 経路の活性化を負に制御する因子であることを明らかにし更に Type8 PLA2 の活性を強力に阻害する化合物を見出した。

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

2009 年のインフルエンザパンデミックは、免疫のない集団においてインフルエンザウイルスが瞬く間に蔓延するという事実を世界中の人々に再認識させた。このような大流行を抑制するには効果的なワクチンが必要不可欠である。しかしながら、毎年のように抗原性の変化するインフルエンザウイルスにおいては、ワクチン株と実際に流行するウイルス株の抗原

性が大きく異なる場合があり、その場合はワクチン効果が著しく低いことが知られている。そのため、現行のワクチンより有効性の高いインフルエンザワクチンの開発が求められている。

有効性の高いワクチンを開発するためには、自然感染により誘導される免疫応答を理解する必要がある。インフルエンザウイルスの自然感染においては、血液中 IgG 抗体に加えて気道粘膜上に分泌型 IgA 抗体が誘導されることが知られている。特に感染の場である気道粘膜上に多量に存在する分泌型 IgA 抗体が、その後の感染阻止に重要であると考えられている。経鼻不活化全粒子インフルエンザワクチン接種後誘導されるヒト鼻腔中の抗体をゲル濾過クロマトグラフィーで分画し、その性状と中和能について検討し、pIgA のウイルス感染防御における役割を明らかにすることを目的とした。また高病原性鳥インフルエンザウイルス A(H5N1)の不活化全粒子ワクチンを用いた経鼻インフルエンザワクチン臨床研究において、末梢血中に誘導される抗体のレパートリーを明らかにする事を目的とした。

更に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

ワクチン接種

健康人ボランティア 5 名に同意を得て、不活化全粒子ワクチン X-187 (A/Victoria/210/09 (H3N2)由来)を片鼻 250 μ l ずつ (45 μ g HA/500 μ l)、3 週間間隔で計 5 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。

採材とサンプル調製

ワクチン最終接種から 1 週間後から鼻腔洗浄液 200 ml を 5 日間連続で採取し、計 1L の鼻腔洗浄液を採取し分子サイズに基づき分画した。採取した各分画の IgG, IgA, IgM の含有量を ELISA 法により定量するとともに、中和抗体価の測定を行った。

中和抗体価の測定

中和抗体価の測定は、マイクロ中和試験により行った。

鼻腔洗浄液中 IgA の精製

鼻腔洗浄液中の IgA 精製はヒト IgA 特異的な CaptureSelect® 抗体精製マトリックスを用いて、プロトコルに従いアフィニティー精製を行った。精製した IgA サンプルを分子サイズに基づき分画し 10%ゲルで SDS-PAGE を行った。さらに、同様のものをサンプルとし BN-PAGE STARTER KIT (Invitrogen) を用いて、Blue Native-PAGE を行った。

ワクチン接種と末梢血リンパ球の回収

高病原性鳥インフルエンザウイルス A(H5N1)の不活化全粒子ワクチンを用いた経鼻インフルエンザワクチン臨床研究において、被験者である健康人ボランティアのうち、19 名（男性 17 名、女性 2 名）にワクチン接種後の末梢血の提供をお願いした。初回ワクチン接種前 (Day0)、初回ワクチン接種 7 日後 (Day7) ならびに 2 回目ワクチン接種 7 日後 (Day28) に、末梢血を提供して頂き、血球分離溶液 Lymphoprep™を用いて末梢血リンパ球を回収した。本臨床研究は、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ている。なお、19 名の被験者には、末梢血中抗体産生形質細胞の抗体遺伝子解析に関する

る承諾を得ている。

抗体産生形質細胞の単離

経鼻ワクチン接種により末梢血中に誘導される抗体産生形質細胞の割合の解析、ならびに抗体産生形質細胞の単離は、FACS Aria (BD Bioscience)を用いて行った。

単一抗体産生形質細胞からの cDNA 調製

単一細胞として分離・回収した抗体産生形質細胞からの cDNA 調製は、T. Tiller et al. (J Immunol Methods. 2008) の報告に則り実施した。

抗体アイソタイプの決定

調製した cDNA を用いて各ウェルに単離された抗体 H 鎖のアイソタイプを Real-time PCR により決定した。

抗体可変領域遺伝子の増幅とシーケンス

T. Tiller et al. (J Immunol Methods. 2008) の報告に則り実施した。

抗体遺伝子の解析

得られた抗体 H 鎖ならびに L 鎖の可変領域遺伝子に関して、ウェブサイト IgBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>)、IMGT (<http://www.imgt.org/>) ならびに IgAT (Rogosch et al, Front Immunol 2012) により、使用される遺伝子座、CDR3 領域等の解析を行った。

経鼻投与用ワクチン製剤の GLP 試験

作製した季節性不活化全粒子インフルエンザワクチン原液に粘稠剤としてカルボキシビニルポリマー (CVP) 基剤を加え、非臨床試験用の経鼻投与型季節性インフルエンザワクチン

製剤を調製した。安全性を確認するため、各株の HA 蛋白含量は、臨床投与予定量の 3 倍の濃度である 90 μ g HA/株/mL とした。ワクチン製剤に含まれるワクチン株ウイルス抗原は下記の 3 株である。

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

上記ワクチン製剤を被験薬とし、ラットを用いた毒性試験 (単回投与、反復投与)、生殖発生毒性試験 (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)、及びサルを用いた安全性薬理試験 (中枢神経系に及ぼす影響、覚醒サルの心血管系および呼吸系に及ぼす影響) を実施した。本試験は、三菱化学メディエンス㈱に実施を依頼して行った。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 (15 μ g HA/株) と比較すると、ラット、カニクイザルとも 10 倍以上に相当するものとした。

(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。

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、インターフェロン β (IFN β) による JAK-STAT 経路の活性化を ISRE-Luc のレポーターアッセイと OAS1 (2'-5'-oligoadenylate synthetase 1) の定量 PCR により調べた。また IFN β による転写因

子 STAT1、STAT2 の活性化（リン酸化）をウェスタンブロッティングにより検出した。

Type8 PLA2 の活性を阻害する化合物を探索するために Type8 PLA2 組み換えタンパク質と放射標識基質を用いた in vitro の酵素アッセイをおこない化合物の Type8 PLA2 の活性に対する影響を調べた。

C. 研究結果

鼻腔内抗体のゲル濾過クロマトグラフィーによる分画

不活化全粒子ワクチンを経鼻接種後に回収した鼻腔洗浄液に含まれる抗体は 70%程度が IgA であり、30%程度の IgG と数%の IgM を含んでいた。鼻腔洗浄液を濃縮後、ゲル濾過クロマトグラフィーで分画すると IgM と IgG は明瞭に分離され、IgA は IgG と IgM の間に溶出された。この時、IgA は IgM と IgG に比べ広いフラクションで検出されたことから、IgA は、単量体で存在する IgG や五量体で存在する IgM と異なり多様な高次構造を持っていると考えられた。

次に鼻洗浄液ゲル濾過クロマトグラフィーの各分画のウイルス中和能を検討したところ、いずれの被験者においても IgG と IgA を含む分画に一致してウイルス中和能が認められた。ウイルス中和能はワクチン株である Victoria 株で最も高く、Victoria 株と同じ亜型である NY 株、Sydney 株でも中和能が認められたが、異なる亜型である Brisbane 株においては、いずれの分画においても、ほとんど中和能は認められなかった。以上の結果から、鼻洗浄液ゲル濾過クロマトグラフィー分画サンプルの中和能にはウイルス株特異性が存在し、これらのサンプルに含まれる各種抗体による中和であると考えられた。

アフィニティーカラムによる鼻腔内 IgA の精製

ヒト IgA 特異的な CaptureSelect® 抗体精製マトリックスを用いた精製を行ったところ、鼻腔洗浄液から純度の高い IgA サンプルを得ることに成功した。次にゲル濾過クロマトグラフィーの各分画に含まれる IgA の構成因子の解析するために、SDS-PAGE を行ったところ、鼻腔洗浄液には、SC および J 鎖を含まず H 鎖と L 鎖のみからなる単量体 IgA と SC、J 鎖、H 鎖および L 鎖からなる多量体 IgA が存在することが明らかになった。さらに各分画を Blue Native-PAGE にて解析を行うと、単量体と二量体、さらにそれ以上の多量体のバンドが検出され、dIgA だけでなく、さらに大きな多量体を形成する pIgA が鼻腔内に存在することが明らかになった。

鼻腔内抗体の高次構造によるウイルス中和能比較

精製 IgA を用いた解析により明らかになった抗体の高次構造を基にゲル濾過クロマトグラフィーの各分画に含まれる抗体を高次構造毎に分類し、各高次構造の抗体量を算出し、各高次構造の抗体のウイルス中和に必要な最小濃度を求めた。その結果、多量体抗体は単量体抗体や二量体抗体に比べ有意に少ない濃度でウイルス中和能を有していた。中和のほとんどは IgA によるものと考えられた。

経鼻ワクチンで誘導される抗体の遺伝子解析

健康人ボランティア 63 名に対し、高病原性鳥インフルエンザウイルス A(H5N1)の不活化全粒子ワクチン IBCDC-RG2 (A/Indonesia/5/05 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。末梢血中に誘導さ

れる抗体産生形質細胞の割合を測定した。また、Day28の被験者の末梢血からは、単一抗体産生形質細胞を回収し抗体遺伝子レポーターに関する解析を行った。692 クローンの抗体に関し、抗体重鎖ならびに軽鎖遺伝子シーケンスの解析を行った。

抗体アイソタイプは、176 クローンが IgG 抗体、391 クローンが IgA 抗体、そして 125 クローンは IgM 抗体となり、IgG 抗体産生形質細胞と比較して IgA 抗体産生形質細胞が優位であることが明らかとなった。CDR3 領域の長さの比較を行ったところ、IgG 抗体と比べて IgA 抗体で長さに幅があることが明らかになった (IgG; 9~23 アミノ酸、IgA; 6~25 アミノ酸)。さらに対立遺伝子 VH1-69 を使用する抗体クローンの探索を行ったところ、IgG 抗体で 3 クローン、IgA 抗体で 5 クローン存在することが明らかになった。

経鼻投与用ワクチン製剤の GLP 試験

実施したすべての試験において、被験薬投与群と対照群 (生理食塩液投与群) との間に有意な差は無く、被験薬に起因する有害な影響は認められなかった。

経鼻投与用ワクチン製剤の有効性・持続性検討

1) 血清の中和抗体価

血清の中和抗体価は 2 回目の接種から 24 週目まで持続していることが確認された。また、中用量において、経鼻投与群の抗体価は皮下投与群と同程度であった。

2) 鼻腔洗浄液の特異的 IgA-ELISA 抗体価

鼻腔洗浄液の特異的 IgA-ELISA 抗体価は徐々に低下する傾向は見られたが、中用量及び高用量のワクチンを経鼻投与した群においては、2 回目の投与から 24 週後でも 32 倍 (経験

的に感染防御効果が認められる抗体価) 以上の抗体価が認められた。皮下投与群及び無投与群では特異的 IgA-ELISA 抗体の反応は認められなかった。

3) Type8 PLA2 の働き

HEK293 細胞において、Type8 PLA2 を siRNA により発現抑制したところ、IFN β により誘導される OAS1 の mRNA 発現が顕著に増強された。この OAS1 の発現増強は、Type8 PLA2 の発現プラスミドを導入することによりレスキューされた。同様の結果は ISRE-Luc を用いたレポーターアッセイによっても得られ、また Type8 PLA2 の過剰発現は IFN β による ISRE-Luc の応答を抑制した。さらに IFN β による JAK-STAT 経路の活性化に対する Type8 PLA2 の影響を詳細に解析したところ、Type8 PLA2 の発現抑制により、IFN β 刺激時の STAT1、STAT2 のリン酸化、および STAT1 と STAT2 の結合が亢進した。一方、STAT1/STAT2 の上流である JAK1、TYK2 のリン酸化には影響はみられなかった。

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 JAK-STAT 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、IFN β による ISRE-Luc の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。

Type8 PLA2 の in vitro の酵素アッセイを用い、Type8 PLA2 の活性を阻害する化合物を探索したところ、ホスホリパーゼ A2 阻害剤の一つである methyl arachidonyl fluorophosphonate (MAFP) が Type8 PLA2 を IC₅₀=30 nM で阻害することを見出した。

D. 考 察

経鼻不活化全粒子ワクチンを接種された健康成人から採取された鼻腔洗浄液から精製した IgA の解析により、鼻腔内の IgA は単量体、二量体、多量体から成ることが明らかになった。このうち、二量体と多量体の IgA のみが SC の結合した分泌型 IgA であった。いずれの抗体を含む分画においてもワクチン株と同様の抗原性を有するウイルスを中和することが出来たが、pIgA は dIgA と同程度かそれ以上の中和能を有しており、ヒトの鼻粘膜において pIgA は dIgA と同様にウイルス感染防御に寄与していることが示唆された。これまで、dIgA よりも大きな pIgA については、動物において存在が確認され、モノクローナル抗体の研究により多量体化によって結合活性が上昇することが示されてはいるが、ポリクローナルで存在する生体内での感染防御との関係性についてはほとんど解析がなされておらず、その実態は不明であった。本研究では、pIgA がヒトの気道粘膜上で感染防御に関して一定の機能を有していることを示しており、経鼻投与型ワクチンによって誘導される粘膜免疫の新たな機能を見出すことに成功した。抗体に関わる技術の発展は目覚ましく、様々な抗体医薬が開発されているが、生体内に存在する抗体の新たな機能を見出すことは、抗体医薬開発の基盤となっている今後の抗体科学の深化に寄与することが予想される。我々の開発する経鼻不活化全粒子インフルエンザワクチンは、実用化に最も近い不活化抗原を用いた粘膜免疫誘導型ワクチンであり、この研究領域を牽引している研究である。タンパク質科学やナノテクノロジーの発展により様々なタイプの次世代ワクチン開発が世界中で進んでいるが、本研究により pIgA 誘導を指標とした全く新しいコンセプトのワクチン開発も可能となると考えられ、より効果の高

いインフルエンザワクチンだけでなく、様々な感染症ワクチン開発の礎になることが期待される。

また健康成人に対して、これまで暴露された経験のない高病原性鳥インフルエンザウイルス A(H5N1)の不活化全粒子ワクチンを用いた経鼻ワクチン接種を実施した。季節性インフルエンザウイルスとは異なり、A(H5N1)ウイルスに対しては免疫学的に無垢な状態にあるために、主要抗原である HA に対する純粋な抗体応答を評価することが可能であると考えた。これまでの報告では、注射によりワクチン接種を行った場合には、末梢血中は IgG 抗体を産生する形質細胞が主に誘導されることが明らかになっている。今回の経鼻インフルエンザワクチン接種では、末梢血中の抗体産生形質細胞は、ワクチン接種とともに増加することが明らかとなり、かつ IgA 抗体産生細胞は IgG 抗体産生細胞の約 2 倍程度誘導されることが明らかになった。マウスを用いた実験から、経鼻ワクチン接種は上気道粘膜上に加え血中の IgA 抗体応答を強く誘導することが示されているが、ヒトにおける経鼻ワクチン接種も IgA 抗体産生細胞を強く誘導すると考えられる。今回の研究では、HA 特異的抗体産生細胞ではなく抗体を産生する総形質細胞数の測定を行った。ワクチン接種を行ったとき誘導される抗体産生形質細胞の約 80%が抗原特異的な抗体を産生しているという報告があることから、今回誘導された抗体産生細胞の多くは A(H5N1)特異的な抗体を産生するものと考えられる。

さらに、今回の経鼻ワクチン接種で誘導された抗体レパトリーの解析を行った。抗体の H 鎖は VDJ 遺伝子再編成により可変領域の多様性を獲得することが知られている。VDJ 各遺伝子の使用頻度を調べたところ、IgG および IgA 抗体ともに V 遺伝子は VH3、D 遺伝子は

D3 そして J 遺伝子は JH4 の使用頻度が高かった。これは、それぞれの遺伝子を形成する対立遺伝子の総数を反映したものとなったが、VDJ 遺伝子の接合部となる CDR3 領域の長さは IgA 抗体の方で多様性があることが明らかになった。経鼻インフルエンザワクチン接種では、IgA 抗体の方が IgG 抗体と比べて多様性に富む可能性が示唆された。また、亜型を超えて広範な中和活性を示す bNAbs の多くが使用する対立遺伝子 VH1-69 を使用する抗体の存在を調べたところ、その抗体の存在が明らかとなった。今後これらの抗体の反応性を詳細に調べる必要があるが、経鼻インフルエンザワクチン接種により bNAbs 抗体が誘導可能である可能性は十分にある。

経鼻インフルエンザワクチン接種により誘導される広範な中和活性を有する bNAbs 抗体の存在を証明することは、本ワクチンの有効性を科学的に裏付けることにつながると考えられ、引き続き研究を進める必要があると思われる。

季節性インフルエンザに対するワクチン原液を作製し、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、GLP 試験を実施したところ、被験ワクチンに起因する有害事象は認められなかった。また、マウスを用いた有効性・持続性検討において、液性免疫（血清の中和抗体応答）においては、経鼻投与型ワクチンは同用量の皮下投与型ワクチンと同程度の有効性を有していた。さらに、粘膜免疫（鼻腔洗浄液における特異的 IgA-ELISA 抗体価）においては、経鼻投与群においてのみ免疫応答の誘導が認められた。さらに、季節性インフルエンザウイルスの流行期間をカバーできるだけの有効性が持続することも確認された。

以上のことから、本研究において作成した試

作ワクチンの有効性・安全性は実用的な水準に達しているものと考えられた。

哺乳動物培養細胞を用いた解析から、Type 8 PLA2 は IFN β による JAK-STAT シグナルを負に制御する因子であることが明らかとなった。Type 2 PLA2 の発現抑制は STAT1、STAT2 のリン酸化、および STAT1 と STAT2 の結合が亢進したことから、STAT1/STAT2 の上流において Type 8 PLA2 が作用していることが示唆された。IFN β による JAK-STAT シグナルは形質膜上の I 型インターフェロン受容体に IFN β が結合することにより惹起される。Type 8 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、形質膜の受容体直下で JAK-STAT シグナルを制御していることが考えられる。また Type 8 PLA2 の作用において酵素活性の必要性も示すことができ、Type 8 PLA2 の酵素活性を阻害できる化合物も見出した。本酵素の作用機構を詳細に解析するとともに、特異的かつ強力な阻害剤の開発・応用も進めていきたい。

E. 結 論

経鼻不活化全粒子インフルエンザワクチンは、感染の場である気道粘膜上に分泌型 IgA を誘導する。この分泌型 IgA は主に二量体 IgA(dIgA)から構成されるが、より大きな多量体 IgA(pIgA)から成る分泌型 IgA も存在することが知られている。経鼻不活化全粒子ワクチンを接種された被験者の鼻腔洗浄液から精製した IgA の解析により、鼻腔内の IgA は単量体、二量体、多量体からなり、pIgA は dIgA と同程度かそれ以上の中和能を有しており、pIgA は dIgA と同様にウイルス感染防御に寄与していることが示唆された。

健康成人において、経鼻インフルエンザワク

チンの接種は、IgA 抗体産生細胞を優位に誘導することが明らかとなった。さらにこれら IgA 抗体は IgG 抗体と比較して多様性に富む可能性が示唆され、広範な中和活性を示す抗体が存在する可能性がある。インフルエンザウイルスの感染の場となる上気道粘膜上に、このような特徴を有する IgA 抗体を分泌型抗体として誘導可能な経鼻インフルエンザワクチンは、新しいワクチンとして非常に有効性の高いワクチンであると考ええる。

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

- (1) 十分な安全性を有していた。
- (2) 用法・用量・有効性・持続性の根拠となる成績が集積され、実用的な免疫応答を誘導できることが確認された。

以上のことから、本ワクチン製剤は、臨床応用での有用性が望める次世代ワクチン候補として期待できるものであると考えられる。

今回の哺乳動物培養細胞を用いた解析から、Type 8 PLA2 は IFN β による JAK-STAT シグナルを負に制御する因子であることが明らかとなった。また *in vitro* の解析から MAFP が Type8 PLA2 の酵素活性を阻害することがわかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

各分担項目参照（省略）

2. 学会発表

各分担項目参照（省略）

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得（出願）

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

経鼻不活化全粒子インフルエンザワクチンにより鼻腔内に誘導される 分泌型 IgA 抗体の性状解析

研究代表者 長谷川 秀樹（国立感染症研究所 感染病理部）

研究協力者 鈴木 忠樹（国立感染症研究所 感染病理部）

川口 晶（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）

田村 慎一（国立感染症研究所 感染病理部）

研究要旨 経鼻不活化インフルエンザワクチンは、感染の場である気道粘膜上に分泌型 IgA を誘導する。粘膜面に存在する分泌型 IgA は、J 鎖を介して多量体化した IgA に secretory component (SC) が結合したものである。この分泌型 IgA は主に二量体 IgA (dIgA) から構成されるが、より大きな多量体 IgA (pIgA) から成る分泌型 IgA も存在することが知られている。しかしながら、分泌型 pIgA のウイルス感染防御における意義については、ほとんど研究がなされていない。本研究では、ヒトに経鼻不活化全粒子インフルエンザワクチン接種後誘導される鼻腔中の抗体をゲル濾過クロマトグラフィーで分画し、その性状と中和能について検討し、pIgA のウイルス感染防御における役割を明らかにすることを目的とした。成人ボランティア 5 名に季節性インフルエンザウイルス (A/Victoria/210/2009、H3N2) の不活化全粒子インフルエンザワクチンを経鼻接種した。最終接種から 1 週間後に回収した鼻腔洗浄液を濃縮後、ゲル濾過クロマトグラフィーで分画し、各分画に含まれる抗体量、ワクチン株を含む数種類のウイルス株に対する中和抗体価を測定し評価した。また、5 人の鼻腔洗浄液プールから IgA のみを精製後、ゲル濾過クロマトグラフィーで分画し各分画に含まれる抗体の性状を生化学的に検討した。精製 IgA の解析により、鼻腔洗浄液中の IgA は単量体、二量体、多量体から成ることが明らかになった。このうち、二量体と多量体の IgA のみが SC の結合した分泌型 IgA であった。いずれの抗体を含む分画においてもウイルスを中和することが出来た。また、pIgA は dIgA と同程度かそれ以上の中和能を有しており、pIgA は dIgA と同様にウイルス感染防御に寄与していることが示唆された。

A. 研究目的

2009 年のインフルエンザパンデミックは、免疫のない集団においてインフルエンザウイルスが瞬く間に蔓延するという事実を世界中

の人々に再認識させた。このような大流行を抑制するには効果的なワクチンが必要不可欠である。しかしながら、毎年のように抗原性の変化するインフルエンザウイルスにおいては、ワ

クチン株と実際に流行するウイルス株の抗原性が大きく異なる場合があり、その場合はワクチン効果が著しく低いことが知られている。そのため、現行のワクチンより有効性の高いインフルエンザワクチンの開発が求められている。

有効性の高いワクチンを開発するためには、自然感染により誘導される免疫応答を理解する必要がある。インフルエンザウイルスの自然感染においては、血液中 IgG 抗体に加えて気道粘膜上に分泌型 IgA 抗体が誘導されることが知られている。特に感染の場である気道粘膜上に多量に存在する分泌型 IgA 抗体が、その後の感染阻止に重要であると考えられている。現行のインフルエンザワクチンは不活化スプリットワクチン（HA ワクチン）の皮下接種が用いられているが、このワクチンではウイルスに対する IgG 抗体のみが誘導され、感染の場となる気道粘膜上に分泌型 IgA 抗体の誘導は認められない。現行のワクチンにおいても一定の有効性は認められるが、気道粘膜上にウイルス特異的分泌型 IgA 抗体を誘導することができれば、さらに有効性の高いワクチンとなることが考えられる。そこで、自然感染を模倣する経鼻投与型インフルエンザワクチンの開発研究が進められている。経鼻投与型インフルエンザワクチンは、IgG 抗体のみならず上気道粘膜の分泌型 IgA 抗体を誘導することができ、ウイルス感染を効率良く抑制できる。さらに抗原性が変化したウイルスに対しても感染阻止効果が高いことが、様々な動物実験から明らかになっている（Vaccine. 28: 6393-7. 2010）。

現在、経鼻投与型インフルエンザワクチンの一つとして、FluMist®が欧米で認可されている。これは、低温馴化弱毒生インフルエンザウイルスを上気道内に噴霧し、軽微な感染を起こすことで免疫を誘導するワクチンである。有効性は高いと言われているが、弱毒とはいえ生きたウ

イルスを使用するため安全性を考慮してインフルエンザにおける高リスク集団である幼児や高齢者が適応範囲から外されており、全ての年齢層を対象にした、より安全な経鼻投与型インフルエンザワクチンを開発が望まれている。

我々は、不活化抗原を用いた安全な経鼻投与型インフルエンザワクチンの開発研究を行ってきており、これまでに経鼻不活化全粒子インフルエンザワクチンの有効性と安全性、分子機構についてマウスやサルなどを用いた動物モデル実験により明らかにしてきた。しかしながら、ワクチンの有効性発現機序は完全に宿主免疫系に依存しており、ヒトに使用するワクチンの有効性はどのような動物モデルを用いても完全には正しく評価出来ないことから、ヒトでの有効性を示す研究の必要性が求められている。

現在、我々は不活化全粒子インフルエンザワクチンを健康成人ボランティアに接種し、その免疫応答を解析する臨床研究を行っており、昨年度までの研究により経鼻不活化全粒子インフルエンザワクチン接種者の鼻腔粘膜上にウイルスを中和できる分泌型 IgA 抗体が誘導されることが明らかになった（J Med Virol. 84(2):336-44. 2012, Hum Vaccin Immunother. 27:9(9). 2013）。この分泌型 IgA は、J 鎖を介して多量体化した IgA に secretory component（SC）が結合したもので、主に二量体 IgA（dIgA）から構成されるが、より大きな多量体 IgA（pIgA）から成る分泌型 IgA も存在することが知られている。しかしながら、分泌型 pIgA のウイルス感染防御における意義については、ほとんど研究がなされていない。

そこで本年度の研究では、経鼻不活化全粒子インフルエンザワクチン接種後誘導されるヒト鼻腔中の抗体をゲル濾過クロマトグラフィーで分画し、その性状と中和能について検討し、

pIgA のウイルス感染防御における役割を明らかに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 5 名に同意を得て、不活化全粒子ワクチン 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 (45 μ g HA/500 μ l)、3 週間間隔で計 5 回の経鼻接種を実施した。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

ワクチン最終接種から 1 週間後から鼻腔洗浄液 200 ml を 5 日間連続で採取し、計 1L の鼻腔洗浄液を採取した。鼻腔洗浄液は、市販の鼻うがい用器具を用い、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 1000 倍に濃縮し Superose 6 10/300 GL カラムを用いたゲル濾過クロマトグラフィーゲルに供し、分子サイズに基づき分画した。採取した各分画の IgG, IgA, IgM の含有量を ELISA 法により定量するとともに、中和抗体価の測定を行った。

3) 中和抗体価の測定

中和抗体価の測定は、マイクロ中和試験により行った。ゲル濾過クロマトグラフィーで分画した鼻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。攻撃ウイルスとしては、A/Victoria/210/2009 (H3N2; Victoria 株)、A/New york/55/2004 (H3N2; NY 株)、A/Sydney/05/1997 (H3N2; Sydney 株)、A/Brisbane/59/2007 (H1N1; Brisbane 株) を用いた。

4) 鼻腔洗浄液中 IgA の精製

鼻腔洗浄液中の IgA 精製はヒト IgA 特異的な CaptureSelect® 抗体精製マトリックスを用いて、プロトコルに従いアフィニティー精製にて行った。精製した IgA サンプルを遠心型濃縮チューブ (Vivaspin) により 500 μ l 程度まで濃縮し、Superose 6 10/300 GL カラムを用いたゲル濾過クロマトグラフィーゲルに供し分子サイズに基づき分画した。分画したサンプルを 2-メルカプトエタノールを加えたサンプルバッファーと混ぜ、95°C、5 分のインキュベーション行う事で変性させたものをサンプルとし、10%ゲルで SDS-PAGE を行った。さらに、同様のものをサンプルとし BN-PAGE STARTER KIT (Invitrogen) を用いて、Blue Native-PAGE を行った。

C. 研究結果

1) 鼻腔内抗体のゲル濾過クロマトグラフィーによる分画

不活化全粒子ワクチンを経鼻接種後に回収した鼻腔洗浄液に含まれる抗体は 70%程度が IgA であり、30%程度の IgG と数%の IgM を含んでいた。鼻腔洗浄液を濃縮後、ゲル濾過クロマトグラフィーで分画すると IgM と IgG は明瞭に分離され、IgA は IgG と IgM の間に溶出された。この時、IgA は IgM と IgG に比べ広いフラクシ

ヨンで検出されたことから、IgA は、単量体で存在する IgG や五量体で存在する IgM と異なり多様な高次構造を持っていると考えられた。

次に鼻洗浄液ゲル濾過クロマトグラフィーの各分画のウイルス中和能を検討したところ、いずれの被験者においても IgG と IgA を含む分画に一致してウイルス中和能が認められた。ウイルス中和能はワクチン株である Victoria 株で最も高く、Victoria 株と同じ亜型である NY 株、Sydney 株でも中和能が認められたが、異なる亜型である Brisbane 株においては、いずれの分画においても、ほとんど中和能は認められなかった。以上の結果から、鼻洗浄液ゲル濾過クロマトグラフィー分画サンプルの中和能にはウイルス株特異性が存在し、これらのサンプルに含まれる各種抗体による中和であると考えられた。

2) アフィニティーカラムによる鼻腔内 IgA の精製

これまでに行った基礎的検討では、pIgA の化学的耐性などの情報がなかったことから、温和な条件で精製が出来る CHT セラミックハイドロキシアパタイトを用いた精製を行っており、数種類のカラムを組み合わせることで精製 pIgA を得る必要があった。この方法は特異的結合を用いた精製ではなく微量の不純物の混在が問題になる。そこで、少量の pIgA を用いた基礎検討をしたところ、pIgA は pH3.0 程度の酸性条件でも安定して存在する事が明らかになったことから、ヒト IgA 特異的な CaptureSelect® 抗体精製マトリックスを用いた精製を行ったところ、鼻洗浄液から純度の高い IgA サンプルを得ることに成功した。次にサンプルをゲル濾過クロマトグラフィーに供することにより精製 IgA を分子の大きさにより分画した。分泌型 IgA は、2 本の同一 H 鎖 (Heavy chain) と 2

本の同一 L 鎖 (Light chain)、J (joining) 鎖 (約 16 kDa) と SC (secretory component) により構成されることが知られていることから、ゲル濾過クロマトグラフィーの各分画に含まれる IgA の構成因子の解析するために、SDS-PAGE を行ったところ、鼻洗浄液には、SC および J 鎖を含まず H 鎖と L 鎖のみからなる単量体 IgA と SC、J 鎖、H 鎖および L 鎖からなる多量体 IgA が存在することが明らかになった (図 1)。さらに各分画を Blue Native-PAGE にて解析を行うと、単量体と二量体、さらにそれ以上の多量体のバンドが検出され、dIgA だけでなく、さらに大きな多量体を形成する pIgA が鼻腔内に存在することが明らかになった (図 2)。

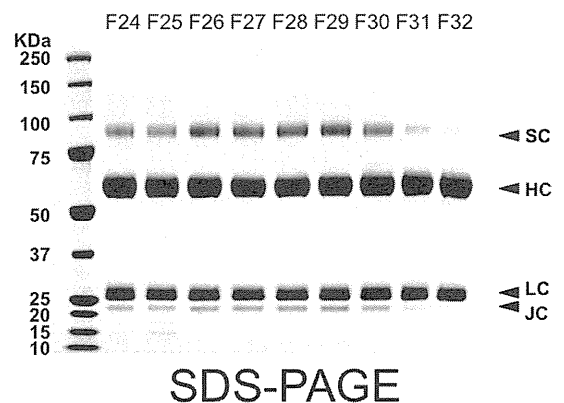


図 1 鼻腔内精製 IgA のゲル濾過クロマトグラフィー分画サンプルの SDS-PAGE

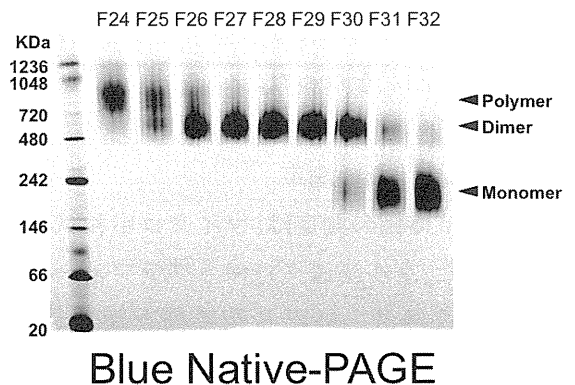


図 2 鼻腔内精製 IgA のゲル濾過クロマトグラフィー分画サンプルの Blue Native-PAGE

3) 鼻腔内抗体の高次構造によるウイルス中和能比較

精製 IgA を用いた解析により明らかになった抗体の高次構造を基にゲル濾過クロマトグラフィーの各分画に含まれる抗体を高次構造毎に分類し、各高次構造の抗体量を算出し、各高次構造の抗体のウイルス中和に必要な最小濃度を求めた。その結果、多量体抗体は単量体抗体や二量体抗体に比べ有意に少ない濃度でウイルス中和能を有していた。多量体抗体には IgA と IgM が含まれるが、80%以上が IgA 抗体からなり、その中和のほとんどは IgA によるものと考えられた。

D. 考 察

経鼻不活化全粒子ワクチンを接種された健康成人から採取された鼻腔洗浄液から精製した IgA の解析により、鼻腔内の IgA は単量体、二量体、多量体から成ることが明らかになった。このうち、二量体と多量体の IgA のみが SC の結合した分泌型 IgA であった。いずれの抗体を含む分画においてもワクチン株と同様の抗原性を有するウイルスを中和することが出来たが、pIgA は dIgA と同程度かそれ以上の中和能を有しており、ヒトの鼻粘膜において pIgA は dIgA と同様にウイルス感染防御に寄与していることが示唆された。これまで、dIgA よりも大きな pIgA については、動物において存在が確認され、モノクローナル抗体の研究により多量体化によって結合活性が上昇することが示されているが、ポリクローナルで存在する生体内での感染防御との関係性についてはほとんど解析がなされておらず、その実態は不明であった。本研究では、pIgA がヒトの気道粘膜上で感染防御に関して一定の機能を有していることを示しており、経鼻投与型ワクチンによって誘導される粘膜免疫の新たな機能を見出

すことに成功した。抗体に関わる技術の発展は目覚ましく、様々な抗体医薬が開発されているが、生体内に存在する抗体の新たな機能を見出すことは、抗体医薬開発の基盤となっている今後の抗体科学の深化に寄与することが予想される。我々の開発する経鼻不活化全粒子インフルエンザワクチンは、実用化に最も近い不活化抗原を用いた粘膜免疫誘導型ワクチンであり、この研究領域を牽引している研究である。タンパク質科学やナノテクノロジーの発展により様々なタイプの次世代ワクチン開発が世界中で進んでいるが、本研究により pIgA 誘導を指標とした全く新しいコンセプトのワクチン開発も可能となると考えられ、より効果の高いインフルエンザワクチンだけでなく、様々な感染症ワクチン開発の礎になることが期待される。

E. 結 論

経鼻不活化全粒子インフルエンザワクチンは、感染の場である気道粘膜上に分泌型 IgA を誘導する。この分泌型 IgA は主に二量体 IgA (dIgA) から構成されるが、より大きな多量体 IgA (pIgA) から成る分泌型 IgA も存在することが知られている。経鼻不活化全粒子ワクチンを接種された被験者の鼻腔洗浄液から精製した IgA の解析により、鼻腔内の IgA は単量体、二量体、多量体からなり、pIgA は dIgA と同程度かそれ以上の中和能を有しており、pIgA は dIgA と同様にウイルス感染防御に寄与していることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyazaki M, Nishihara H, Hasegawa H, Tashiro M, Wang L, Kimura T, Tanino M, Tsuda M, Tanaka S. NS1-binding protein abrogates the elevation of cell viability by the

- influenza A virus NS1 protein in association with CRKL. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Nov 29;441(4):953-7.
- 2) Ainai A, Tamura S, Suzuki T, van Riet E, Ito R, Odagiri T, Tashiro M, Kurata T, Hasegawa H. Intranasal vaccination with an inactivated whole influenza virus vaccine induces strong antibody responses in serum and nasal mucus of healthy adults. *Hum Vaccin Immunother*. 2013 Sep;9(9):1962-70.
 - 3) Watanabe T, Kiso M, Fukuyama S, Nakajima N, Imai M, Yamada S, Murakami S, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Sakoda Y, Takashita E, McBride R, Noda T, Hatta M, Imai H, Zhao D, Kishida N, Shirakura M, de Vries RP, Shichinohe S, Okamatsu M, Tamura T, Tomita Y, Fujimoto N, Goto K, Katsura H, Kawakami E, Ishikawa I, Watanabe S, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Sugita Y, Uraki R, Yamaji R, Einfeld AJ, Zhong G, Fan S, Ping J, Maher EA, Hanson A, Uchida Y, Saito T, Ozawa M, Neumann G, Kida H, Odagiri T, Paulson JC, Hasegawa H, Tashiro M, Kawaoka Y. Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. *Nature*. 2013 Sep 26;501(7468):551-5. doi: 10.1038/nature12392.
 - 4) Okada S, Hasegawa S, Hasegawa H, Ainai A, Atsuta R, Ikemoto K, Sasaki K, Toda S, Shirabe K, Takahara M, Harada S, Morishima T, Ichiyama T. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid in a mouse model of bronchial asthma and H1N1 2009 infection. *Cytokine*. 2013 Aug;63(2):194-200.
 - 5) Kuribayashi S, Sakoda Y, Kawasaki T, Tanaka T, Yamamoto N, Okamatsu M, Isoda N, Tsuda Y, Sunden Y, Umemura T, Nakajima N, Hasegawa H, Kida H. Excessive cytokine response to rapid proliferation of highly pathogenic avian influenza viruses leads to fatal systemic capillary leakage in chickens. *PLoS One*. 2013 Jul 9;8(7):e68375.
 - 6) Dan K, Akiyoshi H, Munakata K, Hasegawa H, Watanabe K. A Kampo (traditional Japanese herbal) medicine, Hochuekkito, pretreatment in mice prevented influenza virus replication accompanied with GM-CSF expression and increase in several defensin mRNA levels. *Pharmacology*. 2013;91(5-6):314-21.
 - 7) Niikura K, Matsunaga T, Suzuki T, Kobayashi S, Yamaguchi H, Orba Y, Kawaguchi A, Hasegawa H, Kajino K, Ninomiya T, Ijio K, Sawa H. Gold nanoparticles as a vaccine platform: influence of size and shape on immunological responses in vitro and in vivo. *ACS Nano*. 2013 May 28;7(5):3926-38.
 - 8) 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*. 2013 Mar;26(3):357-69.
 - 9) 長谷川秀樹, 田村慎一:インフルエンザに立ち向かうインフルエンザワクチンの現状と展望.*Mebio*(0910-0474)30 巻 12 号 Page68-73 2013.12
 - 10) 長谷川秀樹:今、注目のワクチン 次世代ワクチンとしての経鼻インフルエンザワクチン.*ファルマシア*(0014-8601)49 巻 3 号 Page196-200 2013.03