

201318015B

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～平成25年度 総合研究報告書

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23年度～平成25年度 総合研究報告書

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23 - 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 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. 総合研究報告書

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. 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . .	3 3
------------------------------	-----

III. 研究成果の刊行物・別刷 . . . . .	4 3
----------------------------	-----

# I. 総合研究報告書

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

## 総合研究報告書

# 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** 経鼻投与型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、健康人ボランティアに対して不活化全粒子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、粘膜面に存在する分泌型 IgA 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詳細に検討した結果、鼻腔洗浄液中の IgA 抗体は単量体、二量体 (dIgA)、多量体 (pIgA) 抗体を含み、pIgA 抗体は dIgA 抗体と同程度かそれ以上の中和能を有していることが明らかになった。更に経鼻インフルエンザワクチン臨床試験において、ワクチン接種に伴い誘導される抗体産生細胞の評価を行った。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 (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) を実施した。また、同じ被験ワクチンで、マウスを用いて有効性を確認した。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研究を行なった。その結果、脂質代謝酵素の 1 つである Type 8 PLA<sub>2</sub> が RIG-I like receptor 経路と JAK-STAT 経路を負に制御する因子であることを見出した。さらに Type 8 PLA<sub>2</sub> の酵素活性を強力に阻害する化合物を見出した。Type 8 PLA<sub>2</sub> の阻害剤が自然免疫賦活化することにより粘膜ワクチンの有効性を高める可能性が示された。

## 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

経鼻投与型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)。

本研究課題では、経鼻投与型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。経鼻投与型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 (EMEA) 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、不活化全粒子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もとに評価するとともに被験者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を目的とした。一方、経鼻投与型インフルエンザワクチン有効性発現機序の主要な役割を担うと考えられている鼻腔内に誘導される分泌型 IgA 抗体は主に二量体 IgA (dIgA) 抗体から構成されるが、より大きな多量体 IgA (pIgA) 抗体から成る分泌型 IgA 抗体も存在することが知られている。しかしながら、分泌型 pIgA 抗体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。そこで本研究では、不活化全粒子インフルエンザワクチンの経鼻接種後に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 抗体のウイルス感染防御における役割についても検討を行った。

A 型インフルエンザウイルスには、16 種類のヘマグルチニン (HA) と 9 種類のノイラミニダーゼ (NA) の組合せにより 144 種類の亜型が存在する。ヒトの間で毎年流行を繰り返す季節性 A 型インフルエンザウイルスとして、A(H1N1) と A(H3N2) が知られている。また、高病原性鳥インフルエンザウイルス A(H5N1) や 2013 年に中国でヒトへの感染が報告された鳥インフルエンザウイルス A(H7N9) がヒトに馴化しヒトで流行するウイルスに変化する可能性も危惧されている。感染を防ぐことが可能な経鼻インフルエンザワクチンは、季節性インフルエンザウイルスや新型インフルエンザウイ

ルスの流行に対して、非常に効果の高い新しいワクチンとして、その実用化が待たれている。

しかしながら、A(H5N1)や A(H7N9)ウイルスの免疫原性は低いことが明らかとなっており、ワクチンの経鼻接種だけでは、感染を阻止するために十分な抗体応答を誘導できない可能性がある。このような免疫原性の低いウイルスに対しては、免疫応答を誘導する目的で粘膜アジュバントの添加が必要になると考えられる。既に合成二本鎖 RNA に高い粘膜アジュバント活性が認められているが、経鼻ワクチンに添加するアジュバントとして何が最適であるかは未だに答えが出ておらず、様々な物質のアジュバント活性を検討し、そのワクチン効果と副反応の程度を検討していく必要がある。そのため、新しく合成された新規粘膜アジュバント候補の評価を行った。

抗体誘導を目的とするワクチンには、長期にわたり存在し特異的抗体を持続的に産生する形質細胞と、ウイルスの侵入の際に直ちに抗体を産生可能な記憶 B 細胞の誘導が求められる。しかしながら、ヒトにおいて経鼻インフルエンザワクチンにより誘導される抗体産生細胞や記憶 B 細胞の評価は行われておらず、未だに不明な点が多い。経鼻インフルエンザワクチンの実用化を考えた時、最終的に得られる抗体応答の評価に加えて抗体産生細胞を評価することは、本ワクチン接種法の有効性を科学的に証明する上で重要である。そこで健康成人ボランティアを募った臨床試験において、経鼻インフルエンザワクチン接種における抗体産生細胞の評価を行った。

粘膜ワクチンの有効性に重要な自然免疫応答の制御機構は未解明な点が多い。我々はこれまでに Type 8 PLA<sub>2</sub> という脂質代謝酵素を精製・クローニングし、機能解析を行ってきた。最近、Type 8 PLA<sub>2</sub> の欠損細胞ではウイルス感

染時の I 型インターフェロン (IFN) 産生が増大することを見出し、本酵素が I 型 IFN 応答の抑制因子であることが分かった。本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した。

## B. 研究方法

### 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、不活化全粒子インフルエンザワクチン 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  $\mu$ l ずつ (計 500  $\mu$ 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  $\mu$ g のヘマグルチニン (HA) を含む (各亜型 HA 15  $\mu$ 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  $\mu$ g HA/500  $\mu$ 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。また、鼻腔内の分泌型 pIgA の性状解析のために、健康人ボランティア 5 名に同意を得て、不活化全粒子インフルエンザワクチン 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  $\mu$ l ずつ (45  $\mu$ g HA/500  $\mu$ 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、いずれの介入試験に関しても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。また、鼻腔内の分泌型 pIgA の性状解析のために、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。

#### 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 TCID<sub>50</sub> (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。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。

#### 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 歳の健常被験者において、

- 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。

### 副反応の評価

本研究では、ワクチン接種後に生じた局所的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。

### 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 $\mu$ 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を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。

### 新規粘膜アジュバント候補の評価

6~8 週齢、雌の BALB/c マウスを一群 5 匹で利用した。動物への処置は国立感染症研究所の定める動物実験実施規定に則り、苦痛を与えないように考慮した。

ワクチンとして、エーテル不活化処理を行った実験室株 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。CompB は東興薬品工業株式会社より供与頂いた。

BALB/c マウス 1 匹あたり、A/PR8 HA ワクチン 0.6  $\mu$ g (HA 含量 約 0.2  $\mu$ g) に対して Poly(I:C)を 10、1、0.1  $\mu$ g、あるいは CompB を 6  $\mu$ l を加え、PBS 添加により 12  $\mu$ l としたワクチン溶液を片鼻 6  $\mu$ l ずつ滴下しワクチンの経鼻接種を行った。またこの時、CompB 6  $\mu$ l に対して、Poly(I:C)を 1 あるいは 0.1  $\mu$ g を混合した併用群を設けた。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 1,000 plaque forming unit (pfu)のウイルスを滴下し上気道感染を行った(片鼻 2  $\mu$ l ずつ、計 1,000 pfu/4  $\mu$ l)。感染 3 日後に、安楽殺のうえ血清と鼻腔洗浄液の回収を行った。鼻腔洗浄液は、1% BSA を含む PBS(-) 1 ml で上気道を繰り返し 3 回洗浄することで回収した。

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おける抗体産生細胞の評価

#### (1) A(H3)経鼻インフルエンザワクチン接種

ワクチン接種と末梢血リンパ球の回収:本研究班の代表研究者が行う経鼻インフルエンザワクチン臨床試験において、被験者である健常人ボランティア 50 名のうち、10 名 (男性 8 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。本臨床試験では、接種 (片鼻 250

μl、計 500 μl) あたり 45 μg のヘマグルチニン (HA) を含有する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) が 3 週間間隔で 2 回、経鼻接種されている。初回ワクチン接種前 (Day0)、初回ワクチン接種 10 日後 (Day10)、2 回目ワクチン接種前 (Day21)、2 回目ワクチン接種 10 日後 (Day31) および 2 回目ワクチン接種 3 週間後 (Day42) 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。なお、本臨床試験は、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。

**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 に提供頂いた末梢血 (4 名) を用いた。抗ヒト Ig 抗体あるいは接種に用いたワクチン X-187 をコーティングしたマルチスクリーンプレート (Millipore, MSIP S4510) に、調製した末梢血リンパ球をウェルあたり  $2 \times 10^5$  細胞を播き込み、約 6 時間インキュベートした。その後、細胞を洗い流したプレートに関してビオチン化抗ヒト IgA 抗体あるいは抗ヒト IgG 抗体の反応、続いてアルカリフォスファターゼ標識アビジンの反応を行い、BCIP/NBT 基質を用いて各アイソタイプの抗体産生細胞の検出を行った。スポットの数を数えることで、播き込み細胞数あたりの抗体産生細胞の割合を算出した。

**記憶 B 細胞の定量:** 記憶 B 細胞の解析には、Day0、Day21 そして Day42 に提供頂いた末梢血 (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。被験者から採取した末梢血リンパ球を 24 ウェルプレートに  $5 \times 10^5$  細胞で播き込み、CpG-ODN 2006 (終濃度 3 μg/ml)、ヒト rBAFF (終濃度 20 ng/ml) と人 rIL-15 (終濃度 5 ng/ml) を添加し、5 日間培養することで試験管内刺激を行った。上述の 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。

## (2) A(H5)経鼻インフルエンザワクチン接種

**ワクチン接種と末梢血リンパ球の回収:** 本研究班の代表研究者が行う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試験において、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。本臨床試験では、接種 (片鼻 250 μl、計 500 μl) あたり 45 μg のヘマグルチニン (HA) を含有する不活化全粒子ワクチン IBCDC- RG2 (A/Indonesia/5/05 (H5N1)由来; 阪大微生物病研究会) を 3 週間間隔で 2 回経鼻接種した。なお、本臨床試験では粘稠剤カルボキシビニルポリマー (CVP) 添加の有無で 2 群を設けているが、本研究では CVP 添加の有無での比較は行っていない。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。本臨床試験は、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承諾を得ている。

**抗体産生形質細胞の単離と cDNA の調製**：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。細胞表面マーカー CD2<sup>-</sup>、CD3<sup>-</sup>、CD4<sup>-</sup>、CD10<sup>-</sup>、CD20<sup>-</sup>、IgD<sup>-</sup>、CD19<sup>low</sup>、CD27<sup>high</sup> かつ CD38<sup>high</sup> の細胞集団を抗体産生形質細胞とした。末梢血リンパ球に占める抗体産生形質細胞の割合を測定すると同時に、単一細胞として分離・回収を行った。単一抗体産生形質細胞は、各ウェルに 45 ng のキャリア RNA を含む滅菌水 9  $\mu$ l を分注した 96 穴プレートに回収し、その後の遺伝子解析のサンプルとした。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。上述の各ウェルに Superscript III RT、Random Hexamer、RNaseOUT (以上 Invitrogen) ならびに dNTP mix (Qiagen)を含む 6  $\mu$ l の混合液を添加し、50°C 50 分、85°C 5 分の反応を行うことで cDNA を調製した。

**抗体アイソタイプの決定**：調製した 2  $\mu$ l の 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。IgG、IgA および IgM の各定常領域に対して TaqMan プロブとプライマーを準備した。IgG、IgA および IgM に対する TaqMan プロブは、それぞれ FAM、HEX および Cy5 による標識とした。QuantiTect Multiplex PCR NoROX Master Mix (Qiagen) を使用し、LightCycler480 (Roche)を用いて解析を行った。

**抗体可変領域遺伝子の解析**：T. Tiller et al. (J Immunol Methods. 2008) の報告に則り実施した。調製した 1  $\mu$ l の cDNA に対して 11.5  $\mu$ l の HotStarTaq polymerase (Qiagen)、dNTP mix およ

び各抗体可変領域遺伝子を増幅するプライマーセットの混合液を添加し、1 回目の PCR 反応を行った。更にこの PCR 産物 1  $\mu$ l に対して各遺伝子に対して更に内側に設計したプライマーセットを用いて 2 回目の PCR 反応を行った。いずれの PCR 反応においても、95°C 15 分、(94°C 30 秒、58°C 20 秒、72°C 60 秒)  $\times$  43 サイクル、72°C 2 分の条件で増幅を行った。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。

**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  $\mu$ g HA/mL となるように PBS で希釈し、経鼻製剤用粘稠剤である CVP (カルボキシビニルポリマー) 基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  $\mu$ 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 2.7~3.7 kg)

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  $\mu$ L $\times$ 3 回(合計:片鼻あたり 150  $\mu$ L、両鼻で 300  $\mu$ 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 1 mL 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 10 mg/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。

免疫応答及び安全性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。

また、これを用いて、免疫応答評価用として各株 60  $\mu$ g HA/mL、及び各株 180  $\mu$ g HA/mL の 2 種類の 3 混ワクチン原液を調製した。

#### 経鼻投与用ワクチン製剤の GLP 試験

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として 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  $\mu$ g HA/株/mL とした。

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、4 週間間歇投与)、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。1 回あたりの投与量は、ラットの場合片側の鼻腔に 50  $\mu$ L、サルの場合片側の鼻腔に 200  $\mu$ L とした。

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  $\mu$ g HA/株) と比較すると、ラット (体重約 200 g) で約 75 倍、カニクイザル (体重約 2 kg) で約 30 倍に相当する。

## 経鼻投与用ワクチン製剤の有効性・持続性検討

経鼻投与型インフルエンザワクチンの持続性と有効性を確認するため、上記の単味ワクチン原液を用い、CVP 基剤を加えて 3 混ワクチンを作製し、マウスに経鼻投与して免疫応答を確認した。投与群として、0.9  $\mu\text{g}$ 、0.18  $\mu\text{g}$ 、0.032  $\mu\text{g}$  HA/株/dose の 3 群を設けた。また、対照として 0.18  $\mu\text{g}$  HA/株/dose の皮下投与群と無投与群を設けた。投与は 3 週間間隔で 2 回実施し、2 回目の投与から 2 週間ごとに 24 週間まで、投与群の一部のマウスから全採血及び鼻腔洗浄液の採取を実施した。

採血した血清からは中和抗体価を、鼻腔洗浄液からは特異的 IgA-ELISA 抗体価を測定した。中和抗体価は血清の希釈倍数を 10 倍としたところから測定し、陰性の検体については抗体価 5 として集計した。鼻腔洗浄液の特異的 IgA-ELISA 抗体価については、希釈倍率を 2 倍としたところから測定し、有意な発色が得られた最大の希釈倍数を抗体価として表記した。陰性の検体については抗体価 1 として集計した。

(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。

## RIG-I like receptor (RLR) 経路における Type 8 PLA<sub>2</sub> の関与

RIG-I like receptor (RLR) 経路における Type 8 PLA<sub>2</sub> の関与を調べるために、ヒト胎児腎細胞株 HEK293 細胞に Type8 PLA<sub>2</sub> に対する siRNA、または Type8 PLA<sub>2</sub> 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 IFN 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ティングすることにより検出した。

IFN $\beta$  により活性化する JAK-STAT 経路における Type 8 PLA<sub>2</sub> の関与を調べるために、HEK293 細胞に Type8 PLA<sub>2</sub> に対する siRNA、または Type8 PLA<sub>2</sub> 強制発現ベクターをトランスフェクションし、IFN $\beta$  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 $\beta$  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。

インフルエンザウイルス感染時の自然免疫応答、および抗体応答に対する Type 8 PLA<sub>2</sub> の関与を調べるために、当研究室において樹立した Type 8 PLA<sub>2</sub> 欠損マウス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 IFN 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。

Type8 PLA<sub>2</sub> の活性を阻害する化合物を探索するために Type8 PLA<sub>2</sub> 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 PLA<sub>2</sub> の活性に対する影響を調べた。

## C. 研究結果

経鼻不活化全粒子インフルエンザワクチン接種により誘導される抗体応答の評価  
健康人ボランティア 50 名に対して、A/Victoria

/210/09 の不活化全粒子インフルエンザワクチンを 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。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。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。以上のことから、EMA 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】の三項目を全てみ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。これは、EMA 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。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。

経鼻不活化全粒子インフルエンザワクチン接種による副反応の評価

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。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。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。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。局所的小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。

#### 鼻腔内の分泌型 pIgA の性状解析

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。

次に、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。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。

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。

#### 新規粘膜アジュバント候補の評価

新規アジュバント候補として合成された CompB の経鼻投与型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。ワクチンの経鼻噴霧において鼻腔粘膜上へのワクチン抗原定着効率を上げる Carboxy Vinyl Polymer (CVP)の添加は、経鼻投与型インフルエンザワクチン効果を増強することが示されている。CompB は、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 µg 相当の抗体応答であることが明らかになった。また、CompB 6 µl に Poly(I:C)を 1 あるいは 0.1 µg 混合し粘膜アジュバントとして利用した場合には、抗体応答が強く誘導される個体と抑制される個体がいた。バラツキが大きいものの、平均すると各抗体応答は CompB と Poly(I:C)を併用することで増強され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における抗体産生細胞の評価

A(H3)経鼻インフルエンザワクチンの臨床試験（本研究班の代表研究者が実施）では、健康人ボランティア 50 名に対し、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。対象となる10名の被験者のうち4名に関して、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、対象となる10名の被験者に関して、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。

次の A(H5)経鼻インフルエンザワクチンの臨床試験(本研究班の代表研究者が実施)では、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。このうち対象となる19名の被験者には、接種前 (Day0)、初回および2回目接種の7日後 (Day7 および Day28) に血液の提供をお願いし、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。末梢血リンパ球中に占める抗体産生形質細胞の割合は、ワクチン接種に伴い増加することが明らかになった。

また、Day28 の9名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パートリ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 クローンが 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。H 鎖可変領域は DVJ 遺伝子再編成で形成され、遺伝子の接合部位である相補性決定領域 (CDR3) は、長さおよびアミノ酸配列が多様であり、抗原の認識に重要と考えられている。この 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)。また、亜型を超えた広範な中和活性を示す bNAbs の多くが V 遺伝子として対立遺伝子 VH1-69 を利用していることが明らかになっている。今回の臨床研究において、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。

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

**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。

**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。

**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。

#### 免疫応答及び安全性評価用インフルエンザワクチン原液の作製

調製した単味及び 3 混ワクチン原液について、HA 含量試験を行なった。3 混ワクチン原液 2 種類の 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。各株 60 µg HA/mL のワクチン 200mL、各株 180 µg HA/mL のワクチン 100mL を国立感染症研究所へ発送した。

#### 経鼻投与用ワクチン製剤の GLP 試験

**品質管理試験：** 作製した経鼻投与型季節性インフルエンザワクチン製剤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。

**GLP 試験：** 実施したすべての試験において、被験薬に起因する有害な影響は認められなかった。

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 µg HA/

株) と比較すると、ラット (体重約 200 g) で約 75 倍、カンクイザル (体重約 2 kg) で約 30 倍に相当する。

#### 経鼻投与用ワクチン製剤の有効性・持続性検討

**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、0.18 µg HA/株を投与した群において、経鼻投与群の抗体価は皮下投与群と同程度であった。

**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、0.18 µg HA/株以上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 16 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。

#### Type 8 PLA<sub>2</sub> による RLR 経路の制御

HEK293 細胞において、Type8 PLA<sub>2</sub> 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る ISRE-Luc の応答が有意に増強された。一方、Type8 PLA<sub>2</sub> を強制発現させると、RIG-I 恒常活性化体による ISRE-Luc の応答は顕著に抑制された。同様の結果は、RLR 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 ISRE-Luc の応答においても得られた。また Type8 PLA<sub>2</sub> 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 PLA<sub>2</sub> 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 PLA<sub>2</sub> による I 型 IFN 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ISRE-Lucの応答は酵素活性を欠失したType8 PLA<sub>2</sub> (S234C) やミリストイル化されないType8 PLA<sub>2</sub> (G2A) では抑制できなかつた。

#### **Type 8 PLA<sub>2</sub>による JAK-STAT 経路の制御**

HEK293 細胞において、Type8 PLA<sub>2</sub> を siRNA により発現抑制したところ、IFN $\beta$  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 PLA<sub>2</sub> 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 PLA<sub>2</sub> の過剰発現は IFN $\beta$  による ISRE-Luc の応答を抑制した。さらに IFN $\beta$  による JAK-STAT 経路の活性化に対する Type8 PLA<sub>2</sub> の影響を詳細に解析したところ、Type8 PLA<sub>2</sub> の発現抑制により、IFN $\beta$  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つた。

RLR 経路と同様に、Type8 PLA<sub>2</sub> による JAK-STAT シグナルの抑制における酵素活性やミリストイル化の必要性を調べたところ、IFN $\beta$  による ISRE-Luc の応答は酵素活性を欠失した Type8 PLA<sub>2</sub> (S234C) やミリストイル化されない Type8 PLA<sub>2</sub> (G2A) では抑制できなかつた。

#### **Type 8 PLA<sub>2</sub> 欠損マウスを用いたインフルエンザ感染時の抗ウイルス応答の解析**

Type 8 PLA<sub>2</sub> 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 PLA<sub>2</sub> 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 PLA<sub>2</sub> ノックアウトマウスでは IFN $\alpha$  (IFNA4)、IFN $\beta$  (IFNB)、ISG54 といった I 型 IFN 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 PLA<sub>2</sub> 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 PLA<sub>2</sub> 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。

#### **Type 8 PLA<sub>2</sub> 阻害化合物の探索**

Type8 PLA<sub>2</sub> の *in vitro* の酵素アッセイを用い、Type8 PLA<sub>2</sub> 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 PLA<sub>2</sub> を IC<sub>50</sub>=30 nM で阻害することを見出した。

## **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による血球凝集を抑制する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、不活化全粒子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。経鼻投与型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、EMA 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。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投与型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。これに対して不活化全粒子インフルエンザワクチンは、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、健康人ボランティアに対して不活化全粒子インフルエンザ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。また、経鼻不活化全粒子インフルエンザワクチン接種後に被験者より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。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 100 ml の生理食塩水で鼻腔領域内の洗浄を行っており、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、経鼻不活化全粒子インフルエンザワクチンは安全性の高いワクチンであると考えられる。以上の結果から、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不活化全粒子インフルエンザ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。

さらに、本研究では、経鼻不活化全粒子ワクチンは、鼻腔粘膜上にウイルス中和能の高い pIgA 抗体を誘導することができることを明らかにしており、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も成功した。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。現在、様々な粘膜ワクチン開発が世界中で進んでいるが、本研究により pIgA 抗体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。

新規粘膜アジュバント候補の評価についてすでに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、今回粘膜アジュバント活性を評価した新規アジュバント CompB は、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た。またこのアジュバント活性は、鼻腔粘膜上において炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  の産生を促すことでもたらされると考えられた (結果の提示なし)。Poly(I:C)のみの添加により、TNF- $\alpha$  の発現は見られなかつ