

201318079A

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

新興再興感染症に対する経鼻ワクチンの 開発・実用化に関する研究

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

新興再興感染症に対する経鼻ワクチンの 開発・実用化に関する研究

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
新興再興感染症に対する経鼻ワクチンの開発・実用化に関する研究

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
一戸 毅志	東京大学医科学研究所 感染症国際 研究センター	准 教 授
瀬谷 司	北海道大学大学院 医学研究科	教 授
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	主任研究官

目 次

I. 総括研究報告書

- 新興再興感染症に対する経鼻ワクチンの開発・実用化に関する研究・・・・・・・・・・ 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. 季節性3価不活化全粒子ワクチンの経鼻接種により誘導される抗体応答・・・・・・・・ 13
研究代表者：長谷川 秀樹（国立感染症研究所感染病理部）
2. 不活化全粒子ワクチンの開発・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 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. Inflammasomeの活性化によるインフルエンザウイルス特異的免疫応答の
制御機構の解析・・ 23
研究分担者：一戸 猛志（東京大学医科学研究所 感染症国際研究センター）
4. インフルエンザワクチンアジュバントの開発・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 29
研究分担者：瀬谷 司（北海道大学大学院 医学研究科）
5. 高病原性鳥インフルエンザウイルスに対する経鼻ワクチンによる抗体応答・・・・・・ 33
研究分担者：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）

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 39

I. 総括研究報告書

総括研究報告書

新興再興感染症に対する経鼻ワクチンの開発・実用化に関する研究

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： インフルエンザウイルスの感染を阻止できる分泌型 IgA 抗体を気道粘膜上に誘導する経鼻インフルエンザワクチンは、現在注射により皮下に接種されているワクチンと比べて感染防御効果が高いと考えられている。経鼻不活化全粒子インフルエンザワクチンの実用化に向け、健康人ボランティアを募りワクチン接種による抗体応答を詳細に検討し、その有効性を明らかにすることを目的とする。現行の 3 価季節性インフルエンザ HA ワクチン皮下接種あるいは 3 価不活化全粒子インフルエンザワクチン経鼻接種により誘導される抗体応答を評価した。また健康成人ボランティアを募った臨床試験において、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応答の評価を行った。インフルエンザウイルスの細胞培養系における生産性の向上を目的として、使用する細胞の選抜、培地及び培養条件の検討を行い、生産能力の向上を試みた。経鼻投与で分泌型 IgA の高産生を促進する免疫アジュバントを開発しインフルエンザワクチン HA 蛋白に最適な条件をマウス系で検討することを目指して系を作製した。更にインフルエンザウイルス感染細胞において、NLRP3 はミトコンドリア外膜上の mitofusin 2 (Mfn2) と相互作用し、inflammasome を活性化していることを明らかにした。肺での inflammasome の活性化は、インフルエンザウイルス特異的獲得免疫応答の誘導に必要であることから、これらの知見は、経鼻インフルエンザワクチンの効果的なアジュバントの開発に役立つ可能性がある。

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
一戸猛志 東京大学医科学研究所 感染症国際
研究センター 准教授
瀬谷 司 北海道大学大学院医学研究科 教授
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 主任研究官

A. 研究目的

現行の注射により接種されるインフルエンザワクチンは、血中の IgG 抗体を強く誘導し、感染に伴う重症化を防ぐ効果が高いことが知られている。しかしながら、感染を防ぐことが出来ないため、感染により発症する場合があります。インフルエンザワクチンは効かないとの誤解を招いている。これに対して、実用化に向けて研究を行っている不活化全粒子ワクチンを抗

原とする経鼻インフルエンザワクチンは、血中 IgG 抗体に加え、インフルエンザウイルスが感染する場である上気道粘膜上への分泌型 IgA 抗体の誘導により、感染自体を防ぐことが可能であると期待されている。またマウスを用いた実験からは、この分泌型 IgA 抗体には、変異したウイルスに対する交叉防御能があることが明らかとなっており、ヒトの分泌型 IgA 抗体にも同様の交叉防御能があることが期待される。

経鼻インフルエンザワクチンの実用化を目指す上で、ヒトにおいてその有効性を明らかにする必要がある。健康人ボランティアを募った臨床研究を実施し、その有効性を明らかにすることが本研究課題の大きな目標である。東南アジアやエジプトを中心に散発的な感染事例が報告される高病原性鳥インフルエンザウイルス A(H5N1)や、2013 年に中国において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)は、もともと免疫原性が低いことが指摘されているため、ワクチン接種により十分な抗体応答を誘導するためには、粘膜アジュバントを併用する経鼻インフルエンザワクチンの開発も視野に入れる必要がある。以上のことから本研究班では、長谷川、奥野および相内が経鼻インフルエンザワクチンの非臨床試験及び臨床研究を、瀬谷および一戸が経鼻インフルエンザワクチンの為のアジュバント開発を担当することとした。

本研究では、注射により皮下に接種される現行インフルエンザワクチンあるいは経鼻インフルエンザワクチンの接種により誘導される血清 HI 抗体応答の比較を行った。また、近年、ワクチンと流行する株の抗原性の乖離が疑われているため、ワクチン製造株と野外株に対する抗体応答を比較した。

ヒトにおいても交叉防御能が高いと期待される分泌型 IgA 抗体を誘導する経鼻インフルエンザワクチンは、流行する株の予測が困難な新型インフルエンザに対するワクチンとして非常に有効であると期待されている。現在、散発的にヒトへの感染事例が報告されている高病原性鳥インフルエンザウイルス A(H5N1)が、ヒトに馴化しヒトの間で流行する危険性が危惧されている。免疫学的に無垢な状態にある A(H5N1)ウイルスに対して、不活化全粒子ワクチンの経鼻接種が有効なワクチン接種法になりうるかは検証されていない。

そこで本研究では、健康成人ボランティアを募った臨床試験において、A(H5N1)不活化全粒子ワクチンの経鼻接種により誘導される抗体応答を評価し免疫無垢な抗原 (H5N1、H7N9 等) に対しても有効性が高いインフルエンザワクチンの開発を目的とした。またトリインフルエンザ H5N1, H7N9 に対する抗体価を上げる自然免疫の戦略が必要になる。鶏卵でなく細胞培養系で作製した不活化全粒子インフルエンザワクチンと相性のよい免疫アジュバントを確立する。Inflammasome によるインフルエンザウイルス認識機構と獲得免疫応答の制御機構を理解することにより、inflammasome 経路を活性化するような新しい粘膜ワクチンアジュバントを開発に役立て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 132 名 (18 歳以上、男性 44 名、女性 88 名) を 3 群にわけ、経鼻インフルエンザワクチン臨床研究を実施した。第 1 群 (38 名) は、現行の 3 価季節性インフルエンザ HA ワクチンの皮下接種群とした。第 2 群 (47 名) と第 3 群 (47 名) は、3 価不活化

全粒子インフルエンザワクチンの経鼻接種群とした。ただし、第2群に関しては、鼻腔内に噴霧したワクチンの咽頭への流出を抑える目的で、粘稠剤カルボキシビニルポリマー(CVP)を添加した。3価季節性インフルエンザHAワクチンならびに3価不活化全粒子インフルエンザワクチンは、A(H1N1)株としてA/California/7/09由来のワクチン製造株X-179A、A(H3N2)株としてA/Victoria/361/11由来のIVR-165、B型株としてB/Wisconsin/1/10由来のBX-41Aから作製された。いずれのワクチンもそれぞれの株に関して、主要抗原であるヘマグルチニン(HA)を接種あたり15 µg含有している(阪大微生物病研究会より提供)。第1群は、現行ワクチン接種に倣い1回接種とした。経鼻インフルエンザワクチン接種(第2群、第3群)は、片鼻250 µlずつ(計500 µl)の接種を3週間間隔で2回実施した。

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試験を行った(研究代表者が実施)。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(Day0とDay21に接種)。本試験では、鼻腔内に噴霧したワクチンの粘膜上への滞留効果を増しワクチン接種の確実性を向上させる目的で、粘稠剤カルボキシビニルポリマー(CVP)添加の有無により2群(CVP添加接種群は31名、CVP非添加群は32名)を設けた。なお本臨床研究は、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

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(Day0、Day21ならびにDay42)。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; Aina et al., *J Med Virol* 84(2):336-44, 2012)。したがって、総タンパク質量を1 mg/mlに調製した鼻腔洗浄液を用い以下の測定を行った。

3) 中和抗体価とHI抗体価の測定

中和抗体価の測定は、マイクロ中和試験により行った。RDE処理を行った血清(1/10希釈液)あるいは鼻腔洗浄液(1/20希釈相当液)の2倍段階希釈系列を準備し、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を中和抗体価とした。

4) ワクチン製造細胞の選抜

ワクチン生産用として所有しているMDCK細胞のマスターセルバンクから限界希釈法によるクローニング株を取得した。これらの細胞クローンから、最近のインフルエンザワクチン株に関する感受性をもとに1次・2次選抜を行った。さらに、増殖性をもとに3次選抜を行った。また、選抜された細胞によりワクチン用ウイルスの培養を行い、試作ワクチンを作製した。こ

れを当会で日本脳炎ワクチン用ウイルスの培養用に用いている Vero 細胞で培養したウイルスによる試作ワクチンと比較し、ワクチンの免疫原性やウイルス増殖性の観点から比較し、有用な細胞を検討した。

5) 培地及び培養条件の検討

細胞培養ウイルスによるワクチン生産用として用いている培地のほか、複数の培地を用い、細胞の増殖性の観点から有用な培地を検討した。

6) 経鼻投与用試作ワクチン製剤の作製

2013-2014 シーズンに対応した厚生労働省指定ワクチン製造ウイルス株 A/California/7/2009 (H1N1) pdm09、A/Texas(テキサス) /50/2012 (H3N2)、B/Massachusetts/02/2012 (山形系統) の 3 株と、B/Brisbane/60/2008 (ビクトリア系統) の 4 ウイルス株を培養し、単味不活化全粒子インフルエンザワクチン原液を作製した。なお、現在は細胞培養法によるウイルス培養条件が確立されていないことから、今回のウイルス培養には発育鶏卵を用いた。

また、これらに粘稠剤として CVP (カルボキシビニルポリマー) 基剤を加え、人体への投与を想定した剤型とした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作製した。

得られたワクチン製剤について、有効性を裏付けるため、マウスを用いた経鼻投与による免疫応答確認試験を実施した。試験に用いた被験ワクチンは上記4原液を含む4価ワクチンとし、粘稠剤として CVP (カルボキシビニルポリマー) 基剤を含む経鼻投与型製剤とした。投与は麻酔下で行い、3 週間間隔で 2 回実施した。2 回目の投与から 2 週間後に採血と鼻腔洗浄液の採取を行った。

7) 不活化処理条件の検討

迷入ウイルスによる汚染の恐れを低減させるため、従来以上にウイルスの死滅が期待できる不活化処理条件の探索を実施している。

8) RNA アジュバントの検討

これまでの Alum, CpG などは基本的に DNA 型のアジュバントであった。本企画では抗体価、CD8 T 細胞の高誘導に最適のアジュバントの開発を目指す。初年度は RNA については in vitro 合成による試作品の抗体産生能をテストした。Pam2 は化学合成品を委託発注で作製した。他のコントロール DNA アジュバントは購入した。テストは OVA 抗原を用い、マウス (C57BL/6) で IgA, IgG 各サブセット、IgM, IgE を見た。TICAM-1, MyD88, IPS-1 の各 KO マウスを用い、抗体産生が樹状細胞の如何なる経路に依存するかを検討した。

9) Inflammasome の検討

ρ0 J774A.1 マクロファージの樹立

J774A.1 細胞を 10% FBS, pyruvate (100 μg/ml)、ethidium bromide (100 ng/ml)、uridine (50 μg/ml) を含む DMEM で 2 週間培養した。ミトコンドリア DNA の脱落は、マウス 18S リボソーム、マウスシトクロム c オキシダーゼ I 特異的なプライマーを用いた定量的 PCR により確認した。

shRNA ノックダウン

標的配列は、Invitrogen BLOCK-iT RNAi Designer で設計した。Mfn2 のノックダウンは、Mfn2 特異的な抗体を用いた W.B.により確認した。

ELISA

マウス IL-1β、IL-6 の測定に必要な、抗体は eBioscience より購入した。

Flow Cytometric Analysis

ミトコンドリア活性酸素種 (ROS) は、MitoSOX (Molecular Probes/Invitrogen) による染色により検出した。

NLRP3 inflammasome の再構築系

発現プラスミド pCA7-NLRP3, pCA7-ASC, pCA7-procaspase-1, pCA7-pro-IL-1beta を HEK293T 細胞へトランスフェクトした。トランスフェクト 24 時間後に培養上清を回収し、培養上清をサイトカイン測定用のサンプルに使用した。

C. 研究結果

健康成人ボランティア 132 名を 3 群に分け、現行インフルエンザ HA ワクチン接種あるいは経鼻不活化全粒子インフルエンザワクチン接種を実施し、誘導される抗体応答を比較した。今回は、A(H3N2)株に対する血清 HI 抗体価の測定のみを実施した。野外株 A/Victoria/361/11 に対しては、第 1 群 (現行 3 価インフルエンザ HA ワクチン皮下接種 1 回)、第 2 群 (CVP 添加 3 価不活化全粒子インフルエンザワクチン経鼻接種 2 回) ならびに第 3 群 (3 価不活化全粒子インフルエンザワクチン経鼻接種 2 回) において、抗体陽転率ならびに抗体保有率は EMA の有効性基準を満たすことが出来なかった。また、第 1 群、第 2 群ならびに第 3 群の抗体変化率も EMA の基準を満たすことが出来なかったが、それぞれ 1.86 倍、1.89 倍ならびに 1.53 倍となった。CVP 添加経鼻不活化全粒子ワクチン 2 回接種は、現行 HA ワクチン 1 回接種と同程度の抗体応答を示した。さらに、ワクチン製造株である A/Victoria/361/11 (IVR-165) に対する抗体変化率は、野外株とほぼ同程度の上昇倍率を示したにも関わらず、抗体保有率はいずれの群も EMA の判断基準 (40 倍以上の血清 HI 抗体価を示す被験者の割合が 70%より高

いこと) を満たすことが明らかになった。なお抗体陽転率は、ワクチン製造株に対しても満たすことは出来なかった。

健康成人ボランティア 63 名を CVP 添加群 (31 名) と非添加群 (32 名) の二群に分け、A(H5N1)不活化全粒子ワクチン経鼻接種による抗体応答を測定・比較した。

初回ワクチン接種直前 (Day0)、2 回目接種前 (Day21) そしてワクチン接種後 (Day42) に提供いただいた血清および鼻腔洗浄液に関して、A/Indonesia/5/05 (H5N1)野外株に対する中和抗体価の測定を行った。中和抗体価を表 1 にまとめた。ワクチン接種による中和抗体価幾何平均値の上昇倍率は、血清に関しては、CVP 添加接種群で 2.3 倍、CVP 非添加接種群で 1.7 倍となり、鼻腔洗浄液に関しては CVP 添加接種群で 1.7 倍、CVP 非添加接種群で 1.4 倍となった。ワクチン接種後の中和抗体価がワクチン接種前と比較し 4 倍以上上昇した被験者の数は、血清中和抗体価に関して CVP 添加接種群 31 名中 5 名、CVP 非添加接種群 32 名中 3 名となった。また鼻腔洗浄液中中和抗体価に関して、同じく 4 倍以上の上昇が見られた被験者の数は、いずれの群においても 1 名となった。多くの被験者において中和抗体応答の上昇は認められなかった。

使用する細胞の選抜、培地及び培養条件の検討

1) 細胞の選抜

MDCK 細胞のマスターセルバンクからクローニング株を取得した。この細胞クローンから、最近のインフルエンザワクチン製造株に関する感受性をもとに 1 次・2 次選抜を行った。さらに、増殖性をもとに 3 次選抜を行い、ワクチン生産用細胞候補株を取得した。これらの細胞株から、ワクチン生産に準じた培養条件での増殖性、および安全性をもとに候補細胞株の絞り

込みを行っている。

2) 培地及び培養条件の検討

細胞培養用培地について、これまで使用していたワクチン生産用細胞及び新規ワクチン生産用細胞株を用い、最も増殖性の良い培地の選抜を行い、その成績をもとに更なる培地組成の改良検討を行っている。

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について、品質管理試験を行なった。たん白質含量試験、HA含量試験、チメロサル含量試験、ホルムアルデヒド含量試験、エンドトキシン試験、pH試験、不活化試験、無菌試験、マイコプラズマ否定試験のうち、事前に規格値を設定していた試験については規格値の範囲内の成績が得られた。また、参考値としていたものについても、非臨床試験を含む経鼻投与型ワクチン製剤の開発検討用材料として使用に支障は無いものと判断した。

有効性を裏付ける免疫応答試験については、現在分析中である。

アジュバントの検討

粘膜免疫の効果的誘導を図る目的で種々のアジュバントを用意し、マウス (C57BL/6) 鼻粘膜に抗原とともに投与している。アジュバントとしては Alum, polyI:C, Pam2 リポペプチド、CpG をコントロールとし、Nanogel に包んだものと包まないものを抗原あり、無しの場合と比較投与している。抗原としては全粒子不活化ワクチンの前にインフルエンザ HA 抗原を採用する。現在、各種アジュバントをエンドトキシンフリーで揃えた。マウスに経鼻投与してベースのコントロールを採っている所である。今年の秋を目処にデータを完成させる予定である。

Inflammasome の検討

ウイルス感染による IL-1 β の産生においても、ミトコンドリア産生活性酸素種 (ROS) が必要であるかどうかを確かめるため、ミトコンドリアの ROS を特異的に阻害する Mito-TEMPO 存在下での、ウイルス感染による IL-1 β の産生を調べた。ATP や MSU の刺激に対する IL-1 β の産生は、これまでの報告通り、ミトコンドリア ROS の阻害剤で完全に抑制された。これとは対照的に、麻疹ウイルス、EMCV、インフルエンザウイルス感染による IL-1 β の産生は、Mito-TEMPO 存在下では抑制されなかった。このことから、RNA ウイルスによる NLRP3 inflammasome の活性化は、ミトコンドリア ROS 以外のメカニズムが存在していることが示唆された。

ウイルス感染による NLRP3 inflammasome 活性化における Mfn2 の役割を明らかにするために、Mfn2 ノックダウン J774A.1 細胞にインフルエンザウイルスまたは EMCV を感染させると、Mfn2 ノックダウン細胞では、コントロール細胞と比較して、ウイルス感染 24 時間後の培養上清中の IL-1 β が有意に低下していることが明らかとなった。このことから、ウイルス感染による NLRP3 inflammasome の活性化には、ミトコンドリア膜電位依存的な NLRP3-Mfn2 の結合が必要であることが示唆された。

D. 考 察

本研究では、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のもと臨床研究を実施し、現行の 3 価季節性インフルエンザ HA ワクチン皮下接種あるいは 3 価不活化全粒子インフルエンザワクチン経鼻接種により誘導される血清 HI 抗体価の評価・比較を行った。今年度は、発育鶏卵を用いて分離・継代

された野外株 A/Victoria/361/11 (H3N2)と発育鶏卵でのワクチン製造の元となる製造株 A/Victoria/361/11(IVR-165) (H3N2)に対して HI 試験を実施した。

野外株に対する血清 HI 抗体価は EMA の有効性判断基準を全く満たせなかったのに対し、ワクチン製造株に対する血清 HI 抗体価は抗体保有率を満たすことが明らかとなった。

近年、A(H3N2)ウイルス株に関しては、発育鶏卵で継代すると卵に馴化したウイルスに変化し、流行するウイルスと抗原性が著しく異なってしまうという報告がある。したがって、実際に流行しているウイルスに限りなく抗原性が近いとされる細胞により分離・継代されたウイルス株を用いた場合には、さらに血清 HI 抗体価が低い値を示してしまう可能性がある。細胞培養系により分離・継代され、且つ細胞培養系で製造されたワクチンを用いることで、このような抗原性の乖離の問題を克服できる可能性がある。

また、経鼻ワクチン接種に関しては、噴霧したワクチンの鼻腔粘膜上への滞留効率を向上させる粘稠剤 CVP 添加による効果を検討した。有意差は付かないものの CVP 添加経鼻ワクチン接種により、血清 HI 抗体価が上昇する傾向が認められた。CVP の添加は経鼻ワクチンの確実性を増す効果が有ると考えられる。

健康成人に対して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の経鼻接種を行い、血清および鼻腔洗浄液における中和抗体応答を評価した。

季節性インフルエンザウイルス A(H3N2)の不活化全粒子ワクチン経鼻接種に関する臨床試験においては、粘膜アジュバントの添加を行わなかったにもかかわらず、血清 HI 抗体価は EMA が定める有効性判断基準の 3 項目を全て満たした(Ainai et al., Hum Vaccin Immunother.

9(9):1962-70, 2013)。中和抗体価は HI 抗体価より通常高い値を示すことを考慮した場合、今回の臨床試験においては十分な抗体応答を誘導できなかったこととなる。

暴露経験のない A(H5N1)ウイルスに対しては免疫学的に無垢な状態に有る上に、A(H5N1)ウイルスの免疫原性の低さが影響し、十分な抗体応答を誘導できなかった可能性がある。免疫学的に無垢な状態にあるインフルエンザウイルスを対象とした経鼻インフルエンザワクチン接種により、十分な抗体応答を誘導するためには、追加ワクチン接種の検討あるいは粘膜アジュバントの添加を考える必要がある。現在、ヒトに対して認可されている粘膜アジュバントは存在しないため、ワクチンスケジュールを見直すことで十分な抗体応答が誘導できるのではないかと考える。

また、今回の試験では、噴霧したワクチンの鼻腔領域内へ滞留効果を向上させる目的で粘稠剤 CVP の添加・非添加の比較を行った。CVP 添加群で血清および鼻腔洗浄液の中和抗体価が高くなる傾向が認められた。鼻腔領域内へのワクチンの滞留効果を向上させることで、ワクチン効果が高まることが考えられる。今後十分に評価を行い、CVP 添加がもたらす効果を明らかにする必要がある。

ワクチン生産に用いる細胞及び培地については、従来用いていたものよりも高い生産性が得られる候補の絞り込みを行っており、大幅な改善が見込まれている。また、4 価ワクチン化・経鼻製剤化についても支障となる事象はなく、免疫応答についても 3 価ワクチンと同様の応答が認められている。

以上のことから、細胞培養によるインフルエンザワクチンの生産、及び経鼻投与型製剤化、及び3価から4価とすることに大きな問題点はないものと考えられる。

全粒子インフルエンザワクチンの実用化試験にアジュバントを提供する目的の研究である。

鼻粘膜へのアジュバント投与が自然免疫を活性化する経路は複数あるが、polyI:C, **Ampligen** を用いて抗体産生の効率化が達成されることが長谷川らによって報告されている。RNA を用いて TLR3 を活性化する方法は当研究室で確立しているが、マウス経鼻投与系で各種アジュバントの抗体産生の比較検討を行って RNA の種類と抗原との相性をまず確認する。**Ampligen** より優位な結果が得られれば、マウス以外の動物実験への試料を確定する。化学合成で GLP 標品を作製するため、現在大量合成の方策をたてている。

ミトコンドリアの膜電位や Mfn2 は、ウイルス感染による NLRP3 inflammasome の活性化に必要であることが示唆された。インフルエンザウイルス感染による肺での inflammasome の活性化は、ウイルス特異的な獲得免疫応答の惹起に必要であるが、今回の研究成果は、ウイルス感染後の過剰な炎症反応を抑える治療薬の開発や、炎症を促進させることによりインフルエンザウイルスワクチンの効果を高めるようなアジュバントの開発につながる可能性がある。

E. 結論

本研究では現行の 3 価季節性インフルエンザ HA ワクチン皮下接種と 3 価不活化全粒子インフルエンザワクチン経鼻接種により誘導される A(H3N2)株に対する血清 HI 抗体価を評価した。野外株とワクチン製造株の間に抗原性の乖離の可能性が考えられたが、粘稠剤 CVP を添加した不活化全粒子インフルエンザワクチン経鼻接種は、現行のワクチンと同等の血清 HI 抗体を誘導することが示された。

健康成人ボランティアに対して、高病原性鳥インフルエンザウイルス A(H5N1)に対する経鼻ワクチン接種を行い誘導される抗体応答を評価した。免疫学的に無垢な状態にある A(H5N1)ウイルスの不活化全粒子ワクチンのみの 2 回の経鼻接種では、十分な抗体応答を誘導することが出来なかった。しかしながら、ワクチン接種の確実性を高めると期待される CVP の添加により、抗体応答が促進する可能性が示唆された。

新規のワクチン生産用細胞及び培地の選抜、及び発育鶏卵培養による全粒子インフルエンザワクチン製剤の試作を行った。

各種アジュバントの IgA 産生誘導活性を確定し、RNA アジュバントの優位性を確認するため、マウス経鼻投与系で KO マウスを含めた試験系を作製した。アジュバントは大量化学合成の方策を検討中である。

ウイルス感染による NLRP3 inflammasome の活性化には、ミトコンドリアの膜電位（連結したミトコンドリア）と、ミトコンドリア外膜上での NLRP3 と Mfn2 の相互作用が必要であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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 9(9):1962-70.
- 2) 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;63(2):194-200.
- 3) Yamazaki T, Ichinohe T. Inflammasomes in antiviral immunity: clues for influenza vaccine development. *Clin Exp Vaccine Res*. 2014;3(1):5-11.
 - 4) Ichinohe T, Yamazaki T, Koshihara T, Yanagi Y. Mitochondrial protein mitofusin 2 is required for NLRP3 inflammasome activation after RNA virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(44): 17963-8.
 - 5) 一戸猛志. インフルエンザウイルス認識機構と経鼻インフルエンザワクチン. *臨床とウイルス*. 2013; 41(4): 212-21.
 - 6) Okamoto M, Oshiumi H, Azuma M, Kato N, Matsumoto M, Seya T. IPS-1 Is Essential for Type III IFN Production by Hepatocytes and Dendritic Cells in Response to Hepatitis C Virus Infection. *J Immunol*. 2014 Feb 14. [Epub ahead of print]
 - 7) Tatematsu M, Seya T, Matsumoto M. Beyond dsRNA: Toll-like receptor 3 signalling in RNA-induced immune responses. *Biochem J*. 2014 Mar 1;458(2):195-201.
 - 8) Suzuki T, Oshiumi H, Miyashita M, Aly HH, Matsumoto M, Seya T. Cell type-specific subcellular localization of phospho-TBK1 in response to cytoplasmic viral DNA. *PLoS One*. 2013 Dec 9;8(12):e83639.
 - 9) Enokizono Y, Kumeta H, Funami K, Horiuchi M, Sarmiento J, Yamashita K, Standley DM, Matsumoto M, Seya T, Inagaki F. Structures and interface mapping of the TIR domain-containing adaptor molecules involved in interferon signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110(49):19908-13.
 - 10) Takaki H, Honda K, Atarashi K, Kobayashi F, Ebihara T, Oshiumi H, Matsumoto M, Shingai M, Seya T. MAVS-dependent IRF3/7 bypass of interferon β -induction restricts the response to measles infection in CD150Tg mouse bone marrow-derived dendritic cells. *Mol Immunol*. 2014;57(2):100-10.
 - 11) Takaki H, Takeda M, Tahara M, Shingai M, Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T. The MyD88 pathway in plasmacytoid and CD4+ dendritic cells primarily triggers type I IFN production against measles virus in a mouse infection model. *J Immunol*. 2013;191(9):4740-7.
 - 12) Oshiumi H, Miyashita M, Matsumoto M, Seya T. A distinct role of Riplet-mediated K63-Linked polyubiquitination of the RIG-I repressor domain in human antiviral innate immune responses. *PLoS Pathog*. 2013;9(8):e1003533.
 - 13) Tanaka Y, Suenaga T, Matsumoto M, Seya T, Arase H. Herpesvirus 6 glycoproteins B (gB), gH, gL, and gQ are necessary and sufficient for cell-to-cell fusion. *J Virol*. 2013 Oct;87(19):10900-3.
 - 14) Nishitsuji H, Funami K, Shimizu Y, Ujino S, Sugiyama K, Seya T, Takaku H, Shimotohno K. Hepatitis C virus infection induces inflammatory cytokines and chemokines mediated by the cross talk between hepatocytes and stellate cells. *J Virol*. 2013 Jul;87(14):8169-78.
 - 15) Tatematsu M, Nishikawa F, Seya T, Matsumoto M. Toll-like receptor 3 recognizes incomplete stem structures in single-stranded viral RNA. *Nat Commun*. 2013;4:1833.
 - 16) Seya T, Azuma M, Matsumoto M. Targeting TLR3 with no RIG-I/MDA5 activation is effective in immunotherapy for cancer. *Expert*

Opin Ther Targets. 2013;17(5):533-44.

- 17) Oshiumi H, Funami K, Aly HH, Matsumoto M, Seya T. Multi-step regulation of interferon induction by hepatitis C virus. *Arch Immunol Ther Exp* (Warsz). 2013;61(2):127-38.
- 18) Toscano F, Estornes Y, Virard F, Garcia-Cattaneo A, Pierrot A, Vanbervliet B, Bonnin M, Ciancanelli MJ, Zhang SY, Funami K, Seya T, Matsumoto M, Pin JJ, Casanova JL, Renno T, Lebecque S. Cleaved/associated TLR3 represents the primary form of the signaling receptor. *J Immunol*. 2013;190(2):764-73.

2. 学会発表

国際学会

- 1) Ainai A, van Riet E, Tamura S, Suzuki T, Kawaguchi A, Ito R, Ikeda K, Senchi K, Asanuma H, Odagiri T, Tashiro M, Kurata T, Hasegawa H. Antibody responses in serum and nasal mucus induced by the intranasal vaccination with a whole-virion inactivated vaccine of A(H5N1) virus in healthy human adults. 7th Vaccine & ISV, Oct 2013, Barcelona, Spain
- 2) Suzuki T, Kawaguchi A, Ainai A, Tamura S, Ito R, Tashiro M, Hasegawa H. Impact of the quaternary structure of human secretory-IgA on viral neutralization activity in upper respiratory tract. 7th Vaccine & ISV, Oct 2013, Barcelona, Spain
- 3) Hasegawa H, Ainai A, Suzuki T, van Riet E, Tamura S, Ikeda K, Odagiri T, Tashiro M, Kurata T. Antibody responses in serum and nasal mucus induced by the intranasal vaccination with a whole-virion inactivated vaccine of A(H5N1) virus in healthy naïve human adults. Keystone Symposia 2014, Jan

2014, CO, USA

- 4) Suzuki T, Kawaguchi A, Ainai A, Tamura S, Ito R, Tashiro M, Hasegawa H. Impact of the quaternary structure of human Secretory-IgA on neutralization potency to Influenza A virus in upper respiratory tract. Keystone Symposia 2014, Jan 2014, CO, USA

国内学会

- 1) 原田勇一、中村一哉、浜本いつき、浅沼秀樹、相内 章、田代真人、奥野良信、山本典夫：マウスにおける細胞培養型インフルエンザワクチンの有効性の解析。第 61 回日本ウイルス学会学術集会（神戸）2013 年 11 月
- 2) 一戸猛志、山崎達也、小柴琢己、柳 雄介：ウイルス感染による mitofusin 2 依存的な NLRP3 inflammasome の活性化。第 61 回日本ウイルス学会学術集会（神戸）2013 年 11 月
- 3) 山崎達也、上羽悟史、松島綱治、一戸猛志：並体結合マウスを用いたインフルエンザウイルス特異的粘膜免疫応答の解析。第 61 回日本ウイルス学会学術集会（神戸）2013 年 11 月
- 4) 山崎達也、上羽悟史、松島綱治、一戸猛志：並体結合マウスにおけるインフルエンザウイルス特異的粘膜免疫応答の解析。第 17 回日本ワクチン学会学術集会（三重）2013 年 11 月
- 5) 長谷川秀樹、相内 章、田村慎一、鈴木忠樹、浅沼秀樹、小田切孝人、田代真人、倉田 毅：高病原性鳥インフルエンザウイルス A(H5N1) 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の効果。第 17 回日本ワクチン学会学術集会（津）2013 年 12 月

- 6) 鈴木忠樹、川口 晶、相内 章、田村慎一、小田切孝人、田代真人、長谷川秀樹：経鼻インフルエンザワクチンにより鼻腔粘膜上に誘導される多量体 IgA 抗体のウイルス感染防御における役割. 第 17 回日本ワクチン学会学術集会 (津) 2013 年 12 月
- 7) 相内 章、田村慎一、鈴木忠樹、小田切孝人、田代真人、倉田 毅、長谷川秀樹：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年齢、性別あるいは副反応が与える影響. 第 17 回日本ワクチン学会学術集会 (津) 2013 年 12 月
- 8) 原田勇一、中村一哉、浜本いつき、榎本匡志、浅沼秀樹、相内 章、田代真人、山本典生：マウスモデルを用いた細胞培養型インフルエンザワクチンの有効性の解析. 第 17 回日本ワクチン学会学術集会 (津) 2013 年 12 月

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

季節性 3 価不活化全粒子ワクチンの経鼻接種により誘導される抗体応答

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 田村 慎一（国立感染症研究所 感染病理部）

鈴木 忠樹（国立感染症研究所 感染病理部）

池田 千将（国立感染症研究所 感染病理部）

研究要旨 インフルエンザウイルスの感染を阻止できる分泌型 IgA 抗体を気道粘膜上に誘導する経鼻インフルエンザワクチンは、現在注射により皮下に接種されているワクチンと比べて感染防御効果が高いと考えられている。経鼻不活化全粒子インフルエンザワクチンの実用化に向け、健常人ボランティアを募りワクチン接種による抗体応答を詳細に検討し、その有効性を明らかにすることを目的とする。現行の 3 価季節性インフルエンザ HA ワクチン皮下接種あるいは 3 価不活化全粒子インフルエンザワクチン経鼻接種により誘導される抗体応答を評価した。血清の A(H3N2) ウイルスに対する血球凝集阻害 (HI) 抗体価を測定したところ、経鼻ワクチン接種は現行ワクチン接種と同程度の血清 HI 抗体応答を誘導することが明らかになった。また、ワクチン製造株に対しては高い抗体応答を示すものの、野外株（卵分離・卵継代）に対する抗体応答は低いことが明らかになった。

A. 研究目的

現行の注射により接種されるインフルエンザワクチンは、血中の IgG 抗体を強く誘導し、感染に伴う重症化を防ぐ効果が高いことが知られている。しかしながら、感染を防ぐことが出来ないため、感染により発症する場合があります。インフルエンザワクチンは効かないとの誤解を招いている。これに対して、実用化に向けて研究を行っている不活化全粒子ワクチンを抗原とする経鼻インフルエンザワクチンは、血中 IgG 抗体に加え、インフルエンザウイルスが感染する場である上気道粘膜上への分泌型 IgA

抗体の誘導により、感染自体を防ぐことが可能であると期待されている。またマウスを用いた実験からは、この分泌型 IgA 抗体には、変異したウイルスに対する交叉防御能があることが明らかとなっており、ヒトの分泌型 IgA 抗体にも同様の交叉防御能があることが期待される。

経鼻インフルエンザワクチンの実用化を目指す上で、ヒトにおいてその有効性を明らかにする必要がある。健常人ボランティアを募った臨床研究を実施し、その有効性を明らかにすることが本研究課題の大きな目標である。またこの過程で、現行インフルエンザワクチンなら

びに現時点における経鼻インフルエンザワクチンが抱える問題点を把握することで、今後より良いワクチンの開発が可能になると考える。これまでのインフルエンザワクチンは発育鶏卵を用いて作製されてきたが、現在開発が進められている細胞培養系により作製されるインフルエンザワクチンを抗原とすることも、今後十分に想定される。また、東南アジアやエジプトを中心に散発的な感染事例が報告される高病原性鳥インフルエンザウイルス A(H5N1)や、2013年に中国において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)は、もともと免疫原性が低いことが指摘されているため、ワクチン接種により十分な抗体応答を誘導するためには、粘膜アジュバントを併用する経鼻インフルエンザワクチンの開発も視野に入れる必要がある。以上のことから本研究班では、長谷川、奥野および相内が経鼻インフルエンザワクチンの非臨床試験及び臨床研究を、瀬谷および一戸が経鼻インフルエンザワクチンの為のアジュバント開発を担当することとした。

既に、季節性インフルエンザウイルス A(H3N2)単独の不活化全粒子ワクチン（接種あたり 45 µg HA；現行ワクチンの3倍量）を用いた経鼻インフルエンザワクチン接種により、欧州医薬品庁（EMA）が定める有効性判断基準を満たす血清 HI 抗体応答の誘導に加えて、鼻腔洗浄液中にも中和活性を有する抗体が誘導されることを明らかにしてきた。本研究では、注射により皮下に接種される現行インフルエンザワクチンあるいは経鼻インフルエンザワクチンの接種により誘導される血清 HI 抗体応答の比較を行った。また、近年、ワクチンと流行する株の抗原性の乖離が疑われているため、ワクチン製造株と野外株に対する抗体応答を比較した。

B. 研究方法

1) ワクチン接種

健康人ボランティア 132 名（18 歳以上、男性 44 名、女性 88 名）を 3 群にわけ、経鼻インフルエンザワクチン臨床研究を実施した。第 1 群（38 名）は、現行の 3 価季節性インフルエンザ HA ワクチンの皮下接種群とした。第 2 群（47 名）と第 3 群（47 名）は、3 価不活化全粒子インフルエンザワクチンの経鼻接種群とした。ただし、第 2 群に関しては、鼻腔内に噴霧したワクチンの咽頭への流出を抑える目的で、粘稠剤カルボキシビニルポリマー（CVP）を添加した。3 価季節性インフルエンザ HA ワクチンならびに 3 価不活化全粒子インフルエンザワクチンは、A(H1N1)株として A/California/7/09 由来のワクチン製造株 X-179A、A(H3N2)株として A/Victoria/361/11 由来の IVR-165、B 型株として B/Wisconsin/1/10 由来の BX-41A から作製された。いずれのワクチンもそれぞれの株に関して、主要抗原であるヘマグルチニン（HA）を接種あたり 15 µg 含有している（阪大微生物病研究会より提供）。第 1 群は、現行ワクチン接種に倣い 1 回接種とした。経鼻インフルエンザワクチン接種（第 2 群、第 3 群）は、片鼻 250 µl ずつ（計 500 µl）の接種を 3 週間間隔で 2 回実施した。なお本臨床研究は、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た上で実施した。

2) 採材

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-80℃にて保

存した。

3) HI 抗体価の測定と使用したウイルス株

HI 抗体価は、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を HI 抗体価とした。血清は 1/10 倍希釈からの 2 倍希釈系列を用い、HI 抗体価<10 は 5 とした。なお、使用したウイルスは下記の通りである。

- A/Victoria/361/11; A(H3N2)
- A/Victoria/361/11 (IVR-165); A(H3N2)

4) 抗体応答の評価

EMA の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は、18～60 歳の健常被験者において、【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、【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、および【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 抗体価を上記判断基準に当てはめ評価を行った。

C. 研究結果

本臨床研究では、健常人ボランティア 132 名を 3 群に分け、現行インフルエンザ HA ワクチン接種あるいは経鼻不活化全粒子インフル

エンザワクチン接種を実施し、誘導される抗体応答を比較した。今回は、A(H3N2) 株に対する血清 HI 抗体価の測定のみを実施した。野外株 A/Victoria/361/11 に対しては、第 1 群 (現行 3 価インフルエンザ HA ワクチン皮下接種 1 回)、第 2 群 (CVP 添加 3 価不活化全粒子インフルエンザワクチン経鼻接種 2 回) ならびに第 3 群 (3 価不活化全粒子インフルエンザワクチン経鼻接種 2 回) において、抗体陽転率ならびに抗体保有率は EMA の有効性基準を満たすことが出来なかった。また、第 1 群、第 2 群ならびに第 3 群の抗体変化率も EMA の基準を満たすことが出来なかったが、それぞれ 1.86 倍、1.89 倍ならびに 1.53 倍となった (表 1)。CVP 添加経鼻不活化全粒子ワクチン 2 回接種は、現行 HA ワクチン 1 回接種と同程度の抗体応答を示した。さらに、ワクチン製造株である A/Victoria/361/11 (IVR-165) に対する抗体変化率は、野外株とほぼ同程度の上昇倍率を示したにも関わらず、抗体保有率はいずれの群も EMA の判断基準 (40 倍以上の血清 HI 抗体価を示す被験者の割合が 70%より高いこと) を満たすことが明らかになった (表 1)。なお抗体陽転率は、ワクチン製造株に対しても満たすことは出来なかった。

D. 考察

本研究では、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のもと臨床研究を実施し、現行の 3 価季節性インフルエンザ HA ワクチン皮下接種あるいは 3 価不活化全粒子インフルエンザワクチン経鼻接種により誘導される血清 HI 抗体価の評価・比較を行った。今年度は、発育鶏卵を用いて分離・継代された野外株 A/Victoria/361/11 (H3N2) と発育鶏卵でのワクチン製造の元となる製造株