【講演】

「経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンの開発」

国立感染症研究所感染病理部第二室室長　長谷川秀樹

堀井先生、どうもありがとうございます。ただいまご紹介にあずかりました国立感染症研究所感染病理部の長谷川です。本日は、我々が現在行っております経鼻粘膜投与型のインフルエンザワクチンの現状、いままで得られてきました結果を中心に話をさせていただきます。

（パワーポイント開始）

まず、本研究の目的ですが、感染予防を目的としたインフルエンザワクチンの開発があげられます。現在使われております皮下接種型のインフルエンザワクチンは、発症予防及び重篤化予防を目的としていて、感染そのものを予防することを目的としたワクチンではありません。今回開発しております粘膜ワクチンは、この感染防御を目指しております。また、その粘膜免疫の誘導により、その利点であります交叉防御能を有して、ワクチン株と流行株の間に変異があっても有効であることを目指した交叉防御能のあるワクチンであります。また、それは今後来るかもしれない新型インフルエンザに対応したワクチンの開発でもあります。

インフルエンザウイルスは、皆さんご存じのようにタイプが A、B、C とあり、内部にはネガティブなストランドのウイルスの RNA、シングルストランドの RNA を持っております。表面の抗原、ヘマグルチニン HA1 から 16、ノイラミダーゼ NA が１から９までこの組合せにより、表面の抗原型が決まります。それによって、ワクチンの型が異なり、これがぴったり合わないと効かないというのが現在のワクチンです。

より効果的なワクチン開発を考える場合に、自然感染で起こる免疫応答を考え、それを再現してやるような形のワクチン開発が必要になってきます。自然感染時に起こる免疫応答としては、粘膜でのインターフェロンの誘導、また粘膜への分泌型 IgA の誘導、血中の中和抗体の誘導、また T 細胞、CTL の誘導があります。

特に、今回目指しております粘膜投与型のワクチンは、この粘膜への分泌型の IgA の抗体の誘導を目指しております。分泌型の IgA は、その polyIG receptor を介し、粘膜の表面に分泌されます。この二量体の構造で分泌され、分泌された後にウイルスと結合します。ですから、IgG と比べて、その感染前の段階で作用するという特徴があります。

こちらに、分泌型の IgA が交叉防御に与える影響を示しましたが、これは、以前に我々の研究室で旭先生と田村先生が行った仕事です。先ほど示しました polyIG receptor のノックアウトマウスと、ワイルドタイプのマウスで、粘膜中への IgA の分泌量の減少を確認し、さらにそれがワクチンの交叉防御能を落としていることを示しております。

経鼻粘膜ワクチンは、不活化ワクチンの単独では免疫応答を誘導しません。そこで、ワ

クチンには粘膜応答を増強させる物質が必要になってきます。そこで、粘膜で利用できるアジュバントが必要になってきます。我々は、審良先生のお話にありました、自然免疫を活用したアジュバントを考えております。いままで、粘膜ワクチンのアジュバントといたしましては、コレラトキシン、CTB ですとか、あとは大腸菌易熱性毒素が実験的に使われてまいりました。

この CT/LT は非常に強い強いアジュバントでして、ワクチン特異的な全身の IgG 応答、また粘膜上の IgA も誘導してまいります。ところが、大腸菌易熱性毒素を用いた、実際にヒトでの治験において、スイスで治験が行われ、その一部に顔面神経麻痺が生じました。そのために、これら毒素系のアジュバントというものを使うメーカーがなくなってしまいました。

もう１つの経鼻ワクチンとして、米国で認可されております低温馴化型の生ワクチンがあります。ところが、アメリカで認可されておりますのは、健常な５歳から 49 歳までの人に限るということで、インフルエンザによって最も死亡率の高い小児と老人の部分がカバーされていないことになります。

そこで、我々はより安全で、生ワクチンと同等の効果を有するワクチンのために、アジュバントの開発を行っております。経鼻ワクチンの利点としては、分泌型の IgA 抗体を投与した鼻粘膜だけではなくて、全身の粘膜へ誘導することができる、交叉防御能がある、また簡便で痛くない。等があげられます。

こちらの低温馴化株の生ワクチンのほうには、アジュバントなしで抗体誘導は得られるものの、ハイリスクの適用が認められていない。これに適用を広げて同様の効果を目指す不活化ワクチンのためには、アジュバントが不可欠だということになります。

近年、我々の研究室では、いくつかのアジュバントを試して、インフルエンザのワクチンに応用してまいりました。大きく分けると、１つは微粒子系のもの、これはマイクロパーティクルですけれども、キチンを使ったもの、あとホッキ貝から得られた微粒子を使ったもの、これらはどちらかというと、ワクチンのキャリアとして働くものです。もう１つは、免疫系を直接刺激するもの、１つは補体であります C3d と結合した HA を作ってこれを用いました。あと、免疫系を刺激するものとしては、Toll-like receptor の 3 のリガンドであります PolyIC、あとは NKT 細胞のリガンドであります α-galactosylceramide（α-GalCer)を用いた研究を行っています。本日は、それらのうちの合成二本鎖 RNA を用いた仕事について紹介させていただきます。

二本鎖 RNA は、本来生体の中では存在しません。ウイルスが増殖するときに、二本鎖の RNA が作られるために、二本鎖 RNA は基本的に外から病原体が入ったシグナルになります。その認識には、１つはエンドゾームの中の Toll-like receptor３によって認識される機構と、細胞質の RNA ヘリカーゼなどによって認識される機構があります。

今回は、まず Poly（I：C）と HA ワクチンを用いて、マウスを用いて実験を行いました。量としては、PolyIC を 0.1 から 10μg、コントロールとしてコレラトキシン B サブユニッ

トを１μｇを用いました。４週間間隔で２回ワクチン接種の後、２週間後に同じ型のウイルスで攻撃感染し、サンプルを集めて免疫学的に解析いたしました。

こちらが PolyIC のアジュバント濃を示したものです、このように１μｇのワクチンと、10μｇの Poly(I:C)から減らしていき、１μｇの Poly(I:C)の２回投与でウイルスを完全に防御いたしました。また、粘膜中には分泌型の IgA が誘導されました。２回目の免疫には抗原のみを用いましても、１回目に３μｇの Poly(I:C)を使うと完全な防御が可能でした。

こちらに、その交叉防御能を示しましたが、ワクチン株を同じ H1N1 であります北京株、山形株、また H3N2 のワクチン株、あとはインフルエンザ B の抗原をワクチンとして用いました､これらを H1N1 の PR8 ウイルスでチャレンジ感染いたしました｡そうすると､同じ H1N1、同じ亜型内においては完全にプロテクションされております。しかし、血中の中和抗体は PR8 のみに対して中和抗体がありますので、ここの分泌型、IgA がこの交叉防御に効いていると考えられます。

実際に生存率を見ると、H1N1 は同じ亜型内ではすべてが生存、それで H3N2 も部分的に生存しております。B は全く効かないで 100％の致死率になっています。

このワクチンにおいて、粘膜分泌型の IgA と中和 IgG のみではなくて、T 細胞の応答を調べました。こちらは、脾臓の細胞を取ってきて、抗原で刺激後、細胞内への取込み、もしくはインターフェロンγの産生で調べたところ､CTL も誘導されていることが示されました。

実際の感染のときには、鼻の NALT において、二本鎖 RNA のレセプターであります、Toll-like receptor３、及び Toll-like receptor７の誘導が認められます。今回用いました、ワクチンと Poly(I:C)を用いますと、それを模倣する形でこのように Toll-like receptor３と７の誘導が認められました。

ここまでをまとめますと､インフルエンザワクチンと Poly(I:C)を経鼻投与することにより、未成熟な樹状細胞が、成熟し、それによってこの獲得免疫への橋渡しになっているということ。それで結果的には分泌型の IgA、血中の IgG、CTL の誘導へとつながっております。

次に、ここまで行ってき事を踏まえ、高病原性鳥インフルエンザワクチンへの応用を試みました。現在、アジアから広がり高病原性鳥インフルエンザは、中東やアフリカまで、達しております。これはヒトでの発症例を示しておりますが、社会的にも非常に不安を起こし問題になっております。これらに対するワクチン開発は非常に急務であります。

ところが、H5N1 から得られたワクチンというのは、ヒトの皮下接種において免疫性が非常に低いことが知られています。もう１つは、どの株がパンデミックを起こすのか予測することが難しく、流行する前にパンデミックワクチンを準備しておくことは困難であります。皮下接種の場合には、流行株とワクチン株が一致しないと効果は期待できない。また、感染部位が呼吸器だけではなくて、消化管などでのウイルスの分離が報告されている点が挙げられます。

今回用いましたアジュバントは、先ほどと同じ合成二本鎖 RNA なのですが、

PolyI:PolyC12U といいまして、Poly(I:C)の C の部分が 12 個に１個 U に置換されている構造を持ったもので、これは同様に Toll-like receptor３のリガンドとして働きます。

なぜこれを用いたかといいますと、既にヒトでの投与での安全性が確認されていて、米国で慢性疲労症候群の治療薬として、内因性のインターフェロンを誘導する薬剤として、第Ⅲ相の臨床試験を終了しております。こちらの治験においては静脈内に 400mg という大量の PolyI:PolyC12U を静注し、延べ７万 5,000 ドース以上用いられていて安全が確認されています。

今回は、ヒトでの応用を前提として、この PolyI:PolyC12U、Ampligen が商品名ですが、これを用いました。

免疫スケジュールとしては、全粒子不活化ワクチンのベトナム株から得られた NIBRG14 を用いて、アジュバントとしては Ampligen を用いました。マウスで経鼻、もしくは皮下接種で２回接種後、チャレンジを３種類の clade の異なる、ワクチン株と同じ抗原性を持つベトナム株、あとは 1997 年に香港で流行を起こした香港株の H5N1、あと clade２に属するインドネシアで分離された H5N1、これらはすべてヒトから分離された株ですが、これで攻撃感染実験を行いました。

NIBRG14 に対する抗体誘導ですが、ルートを鼻から入れた場合と皮下接種した場合で比較しますと、このように皮下接種では鼻粘膜上の IgA は全く誘導されません。ところが、経鼻で投与すると、このように IgA を誘導し、血中の中和抗体価を調べますと、中和抗体価はベトナム株に対してのみ、これらの群で認められました。ほかの香港株、インドネシア株に対する中和抗体価は全く認められませんでした。

次に、チャレンジした後の生存と、感染３日後の鼻腔内でのウイルス価を測りました。まず、ワクチン株と同じ抗原性を持つベトナム株でチャレンジした場合、皮下接種群と経鼻接種群共に生存率は 100％でした、コントロール群は 100％死亡しております。ところが、鼻でのウイルス価を見ますと、皮下接種群では有意にウイルス価は下がっておりますけれども、経鼻接種群においては、全く生きたウイルスの分離ができませんでした。要するに、感染自身を防御して、その結果 100％の生存率を得たということになります。

次に、1997 年の香港株でチャレンジした例です。ここでは、皮下接種群においては、ウイルスの減少は全く認められませんで、生存率も皮下接種では全く認められず 100％の死亡になりました。ところが、経鼻接種しておきますと、80％の生存が得られました。感染は、すべて 1000PFU という同じウイルス価での感染を行いましたので、死亡率に多少差はありますけれども、インドネシアの株でチャレンジしたところ、経鼻接種群では有意に、また皮下接種群でもウイルス価は下げておりますが、生存率では、経鼻接種群が 100％、コントロール群が 20％の生存に対して、皮下接種群が 40％という結果になりました。このように見ますと、ワクチン株と同じ株でのチャレンジに対しては、感染自体を防御している。また、異なる clade のものでありましても、同じ H5N1 に属するものに関しては、ほぼ 100％に近い生存率で、交叉防御が認められたことになります。

次にこのアジュバントが、シーズナルなスプリットワクチンに、同じような抗体誘導ができるのかどうかを調べました。これは2005年、2006年のシーズンのワクチンで、市販されているものを用いました、そのワクチンの総蛋白量１μg、Ampligen10μg、それで経鼻接種群と皮下接種群で、抗体価は鼻腔中のIgA、血中のIgGを、それぞれ３価ワクチンですので、ニューカレドニア、ニューヨーク、B上海それぞれについての抗体を調べました。

そうしますと、このように皮下接種群、あとはAmpligenなしの、ワクチンのみの群においては IgA 誘導が認められませんが、このアジュバントを加えることにより、このようにIgAが出てきて、IgGは皮下接種群と同等のIgG応答が認められました。

これらのワクチンで免疫したもので、H5N1 で同様の感染実験を行いました。そうしたところ、ベトナムの株に対しては、有意にウイルス価を減少させ、致死率もコントロールで100％のところが、最終的には 50％の生存。香港株に対しては、コントロールが 60％の死亡のところ、100％の生存。インドネシア株に対しては、コントロール群20％のところ100％の生存。このようにシーズナルワクチンであっても、経鼻接種することにより、ある程度の交叉防御によって生存率の改善が認められました。

マウスでは、そのようにアジュバント効果があるという報告がいくつかありますが、実際に、それがヒトに近い霊長類において利用できるかどうかということが１つのハードルになると思います。本アジュバントを用いて、カニクイザルで実験を行いました。用いたワクチンは、全粒子のNIBRG14、これはベトナム株で作られたワクチンですが、抗原量としては総蛋白は90μg、PolyI:PolylC12UのAmpligenを500μg、感染はベトナムのウイルスを用いました。

実験スケジュールは、サルは貴重ですし、どれぐらいの免疫応答が得られるかわからなかったので、３回投与してみて、経時的に抗体応答を追っていきました。これらの実験は、感染研の村山にありますP4施設ですけれどもP3として運用されているBSL3+で、グローグボックスの中で行いました。

まず、症状といたしましては、上が免疫群、下が非免疫群の摂食活動を表しています。ここの矢印のところが、チャレンジ感染を行ったところです。非免疫群においては、各群３頭で行い、すべてのサルが食事を摂らなくなり、しばらくうつうつな状態が続きました。症状としては、鼻水、咳、下痢を起こしたりという個体がありました。それは、２週間のうちに改善されていきました。一方、経鼻で免疫した群においては、摂食行動に全く変化はなく、臨床症状も全く認められませんでした。

これが、血中の特異的な IgG ですけれども、ここでわかりますように、２回接種することにより、血中のIgGがかなり高く誘導されていて、この値はnaive 群に感染した２週間後のIgGの値よりも高いものでありました。チャレンジはここで行いました。

こちらが、唾液中に分泌されている特異的な IgA ですが、こちらも２回のワクチン接種後に非常に高いワクチン特異的なIgAが誘導されております。

攻撃感染後のウイルス分離ですが、鼻腔スワブ及び咽頭スワブで、３頭中３頭すべての

サルから生きたウイルスが分離されました。ところが、ワクチン群においては１つもウイルスは分離されておりません。

こちらが、２週間後に解剖したサルの肺を表しています。こちらが、免疫した群、こちらが非免疫群です。非免疫群のほうは、このようにスポット状に変色しているところが認められますけれども、ここの部分を病理で見ますと、非常に激しい炎症が起こっています。肺全体がこういう状態ではありませんが、ローカライズされた部分ですけれども、このように炎症が認められています。それに相当する部分は免疫群においては、このように感染の瘢痕のような状態は認められますけれども、炎症は全く認められませんでした。

まとめますと、合成二本鎖 RNA 併用の経鼻インフルエンザワクチンによって、ワクチン株とは異なるウイルスに対しても交叉防御が、これはマウスの実験ですが可能であった。もう１つは、交叉防御というのは、中和抗体がないにもかかわらず防御されていましたので、粘膜上の IgA 抗体によるものであることが推察された。

免疫機構がヒトに近いカニクイザルにおいても、PolyI:PolyC12U をアジュバントとして用いたワクチンが、H5 ウイルスに対して有効であることが示されました。今後は、これらの製剤化、安全性を検討して臨床試験に進めたいと思っております。

新興感染症というのは、漫画で取り上げられるぐらいに国民の関心を得ていまして、これは村山庁舎そのものなのですけれども、いままでの実験はすべてこの村山で行った、６号棟、もしくは BSL4 の施設で行ったものであります。

ここにラボのメンバー、特に二本鎖の RNA に関しては、大学院生の一戸君に中心にやってもらいました。

（パワーポイント終了）

以上です。