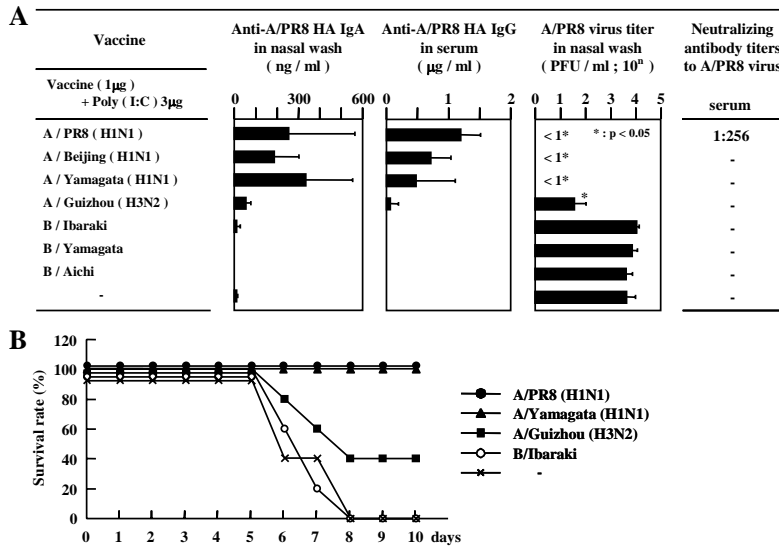


## 経鼻投与型インフルエンザワクチンの開発

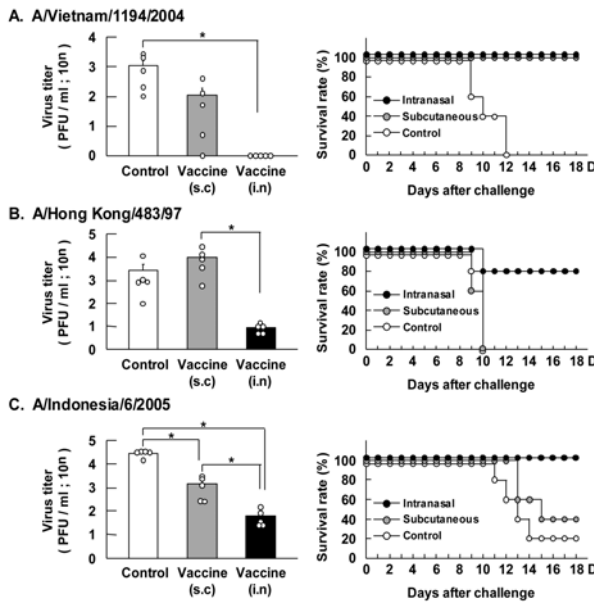
国立感染症研究所感染病理部 長谷川 秀樹、他

インフルエンザウイルスの感染防御と交叉防御反応による変異ウイルスへの防御能を持つインフルエンザワクチンの開発を目的とし、粘膜投与型のワクチンの開発を行っている。インフルエンザウイルス感染により誘導される免疫には血中に誘導される中和抗体 (IgG 抗体)、粘膜上に分泌される IgA 抗体、細胞障害性 T 細胞等があげられるが、それらのうち特に粘膜上に分泌される IgA 抗体は局所での感染防御に働き、またその交叉反応性により病原体の変異に強い防御機構である。粘膜免疫はインフルエンザウイルスのような頻りに抗原性が変異し経粘膜感染する病原体に対して特に有効である。現在、我が国で接種されているインフルエンザワクチンは感染後の発症予防、重症化予防を目的としており感染防御を目的としていない。我々は感染防御を目的としたインフルエンザワクチンを目指し、インフルエンザウイルスの自然感染により誘導される粘膜免疫を安全な不活化ワクチンを用いて誘導する方法を研究している。不活化ワクチンの経鼻接種により有効な粘膜免疫を誘導するには粘膜アジュバントが必要である。我々はアジュバントとして自然免疫を活性化する Toll-like receptor 3 の agonist である二重鎖 RNA(dsRNA)に注目しヒトでの安全性が確認されている合成二重鎖 RNA、Ampligen (polyI:polyC<sub>12</sub>U)を用いた。モデル動物として BALB/c マウスを用い、dsRNA アジュバント併用経鼻ワクチンの効果を調べた。Ampligen と共に不活化インフルエンザワクチンを経鼻接種する事により特異的な血中 IgG 抗体、粘膜の分泌型 IgA 抗体、特異的 T 細胞応答が誘導され、変異株に対しても有効であった。またこの方法は免疫原性の低い高病原性鳥インフルエンザ (H5N1) のワクチンにおいても感染を防御し、clade の異なる変異ウイルスに対しても有効であった。また免疫機構がよりヒトに近いカニクイザルを用いた実験により非ヒト霊長類においても経鼻インフルエンザワクチンの有効性がマウス同様示すことができた。dsRNA アジュバント併用経鼻インフルエンザワクチンは安全な不活化ワクチンを用い、ウイルス感染を模倣する事により粘膜免疫を誘導し、局所での感染を防御し予測不可能な新型インフルエンザの出現にも対応しうる新しいワクチン技術である。この技術はインフルエンザワクチンにとどまらず、粘膜を介して感染する多くの感染症に応用が可能である。



経鼻インフルエンザワクチンによる交叉防御：様々なウイルス株由来のワクチンの経鼻接種後 A/PR8 (H1N1) 株によるチャレンジ感染を行いその交叉防御能を調べた。同じ亜型内の H1N1 ワクチンは全て完全防御が見られた。H3N1 株のワクチンでも部分防御がみられた。

Figure 3



高病原性鳥インフルエンザ H5N1 ワクチンの経鼻接種による交叉防御：A/Vietnam/1194/2004 株由来のワクチン経鼻接種後 clade の異なる H5N1 ウイルスである HongKong 株、Indonesia 株によるチャレンジ感染を行いワクチンの皮下接種群と比較した。同一株である株の異なるウイルスに対して皮下接種群では感染防御効果が見られないのに対し、経鼻接種群では感染防御効果ならびに生存率の大幅な改善がみられた。

## 発癌性ヒトパピローマウイルス群の感染予防ワクチン

国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター 神田 忠仁、他

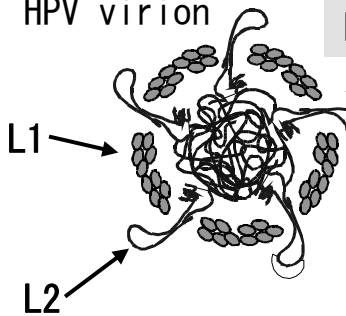
ヒトパピローマウイルス (HPV) には、100 以上の遺伝子型が存在する。15 の高リスク型 (16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68、73 型) が子宮頸癌を中心に世界の女性の悪性腫瘍の 11% (45 万人) の原因となっている。我が国では年間 15000 人の発症と 2500 人の死亡がある。HPV16 型は 50-60% の子宮頸癌で検出される。次いで、欧米では 18 型が多く、日本では 52、58 型が多い。培養細胞で増殖せず、キャプシドにプラスミドを組み込ませたベクターを使って、抗体の中和活性が測定されている。

キャプシドは、360 分子の L1 蛋白質による正 20 面体の骨格と 12 分子の L2 蛋白質で形成される。L2 蛋白質の一部はキャプシド表面に出ている (L2-表面領域)。代用系で L1 蛋白質のみを発現させるとウイルス様粒子 (Virus-like particle; VLP) ができる。メルク社では 16、18 型 VLP と尖圭コンジローマ (良性) の原因となる 6、11 型 VLP を混合したワクチンを、グラクソスミスクライン社では 16、18 型 VLP を混合したワクチンを開発した。これらのワクチンは大規模臨床試験で感染予防効果を示している。しかし、VLP は型特異的な中和抗体を誘導するので、16、18 型にしか効果が無い。全ての高リスク型 HPV を予防するには、15 種の VLP のカクテルが必要となり、実用的なワクチン抗原とするのは難しい。

L2-表面領域は HPV の感染に不可欠な機能を担っている。我々は、HPV16 型 L2-表面領域のアミノ酸 18-38、49-75、96-115 領域に交差性エピトープを見出した。全ての高リスク型の L2-表面領域のアミノ酸配列が極めて良く似ていることから、交差性 L2-エピトープを認識する抗体は全ての高リスク型の感染を防ぐ可能性がある。そこで交差性エピトープを L1 蛋白質に挿入して、3 種のキメラ VLP (Ch18/33、Ch56/75、Ch96/115) を作製した。VLP は 360 分子の L1 蛋白質から形成されるので、粒子あたり 360 個の交差性エピトープを持つ。キメラ VLP をウサギに接種して得た抗血清の HPV16、18、31、52、58 型に対する中和活性を調べると、抗 Ch18/33 抗体は 16、18、31 型を、抗 Ch56/75 抗体は全ての型を、抗 Ch96/115 抗体は 16、18、31、58 型を中和した。全ての抗血清は、キメラ VLP の骨格となった 16 型に強く反応し、16 型 VLP の中和エピトープがキメラ VLP で保存されていることが示された。動物パピローマウイルスの実験では、VLP ワクチンと L2 蛋白質ワクチンの効果は同程度であることから、キメラ VLP は 16 型特異的な抗 L1 抗体と、交差性 L2 エピトープに対する抗 L2 抗体を誘導し、全ての高リスク型 HPV の感染予防をするワクチン抗原となりうる。

## 発癌性HPV群の感染予防ワクチン

HPV virion



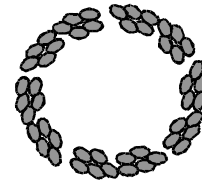
L2-表面領域

アミノ酸配列は、全ての発癌性HPVに極めて良く保存されている。

型共通中和エピトープがある。

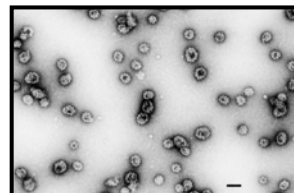
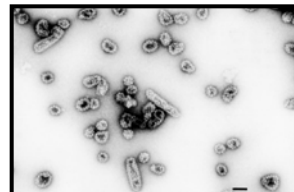
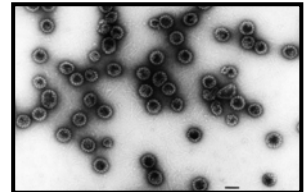
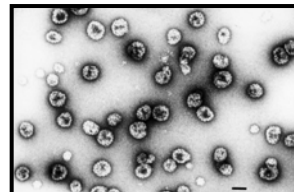
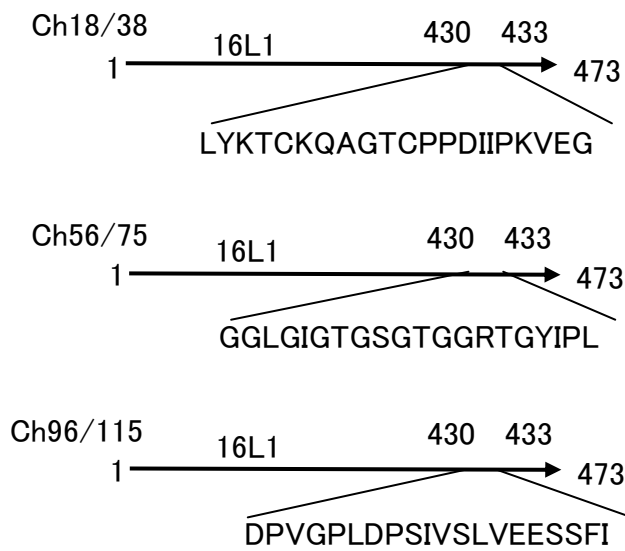
VLP: 現行ワクチン

型特異的中和エピトープがある。



型共通エピトープを持つキメラVLP

16 L1 WT-VLP



抗キメラVLP抗体による中和

抗血清	抗L2抗体による交差性中和			抗L1と抗L2抗体による中和	
	HPV18	HPV31	HPV52	HPV58	HPV16
抗Ch18/38	400	3,200	<50	<50	204,800
抗Ch56/75	100	3,200	3,200	800	204,800
抗Ch96/115	100	800	<50	50	204,800

HPVベクター溶液には遊離L2が含まれるため、抗L2抗体による中和活性は低く示される。

動物パピローマウイルスの感染実験では、抗L1抗体と抗L2抗体は同じように感染を予防できる。

## Vero毒素のトキシイドワクチンの開発

国立感染症研究所細菌第二部 高橋 元秀、他

**研究目的：**腸管出血性大腸菌(EHEC) O157:H7の感染患者は出血性大腸炎を発症し、これに続発して、溶血性尿毒症症候群や神経症状を呈し、死に至る例がある。EHECの病原機構については未解決の部分が多いが、菌の産生する毒素はEHECの感染・発症に主要な役割を演じている。他の細菌毒素性疾患の予防にトキシイドワクチンをヒトに接種し、広く効果を挙げている。EHEC感染症の発病予防にも、トキシイドワクチンによる予防効果を実験動物を用いて確認した。

**現在までの成績：**(1) 発症に主要な役割を演じているSLT毒素の遺伝子を組み込んだプラスミドを保有するE.coli株をLB培地に接種し37Cで18時間培養後、集菌した浮遊菌液を超音波処理して粗毒素を得た。粗毒素は硫酸塩析、イオン交換カラムによるHPLCを用いて精製し、トキシイドの原料とした。

(2) 毒素を実験動物に静脈内投与後、臨床観察及び病理組織学的解析を行った。毒素を各種実験動物に静脈内投与して、臨床観察及び病理組織学的解析を行った結果、毒素感受性はモルモットが低く、サルが高かった。死亡した動物の病理組織像はいずれも腎尿細管壊死が著明に観察された。マウスでは腎臓の尿細管上皮の脱落、壊死が最も著明であり、その病変部に一致して毒素を証明した。動物種による特徴的な臨床症状は、ラット、サルでは下痢症状が観察されたが、他の動物では見られなかった。ハムスターでは肺水腫が著明に見られ、動物種別にヒトの病態と類似した像を観察した。また、生菌をマウスに経口投与した場合には、菌は一過性に定着増殖し、腸管内に毒素を産生し、盲腸内容物及び糞便より毒素を検出した。発症したマウスは、毒素の静脈内投与と同様な病理組織像が見られた。

(3) 毒素と抗毒素の測定に、*in vitro*法は検出感度の高いVero細胞培養法と、*in vivo*法は中和活性を直接測定できるマウスを用いた試験法を確立した。

(4) 精製毒素のトキシイド化の条件検討は、ホルマリン添加後、37Cで経時的な減毒化の過程をVero細胞毒性及びマウス致死活性を測定して行った。毒素のトキシイド化を検討した結果、現行のホルマリンによる無毒化条件でトキシイド化したSLT1及びSLT2は共に無毒化は不完全であった。さらに強い無毒化をして得たトキシイドは免疫原性に乏しい成績であった。一方、毒素をグルタルアルデヒドと共にリポゾームに結合したトキシイドは、無毒化は速やかに完了した。

(5) SLT2を結合したリポゾームトキシイドをマウスに3回注射後、毒素または菌攻撃により耐過した。また、SLT2-リポゾームトキシイドを接種後のサルは、ELISA法により顕著な抗VT2 IgG抗体産生が誘導され、Vero細胞とマウスを用いた中和試験でも高値の中和抗体を証明し、抗VT2 IgE抗体産生を選択的に抑制することを確認した。また、トキシイド免疫サルに致死量の毒素を経口的に投与した結果、毒素による発症を阻止して、臨床的および病理組織学的に毒素による各組織の障害は認めなかった。一方、非免疫動物は毒素により発症、死亡し、血管内皮や腎臓の障害が観察された。

**今後の課題：**(1) 現行破傷風トキシイドで有効性と安全性が確認されているホルマリンによるトキシイド化の検討。(2) トキシイドの安全性と有効性について品質管理法の確立。(3) ヒト接種を想定したGMP化での製法の確立