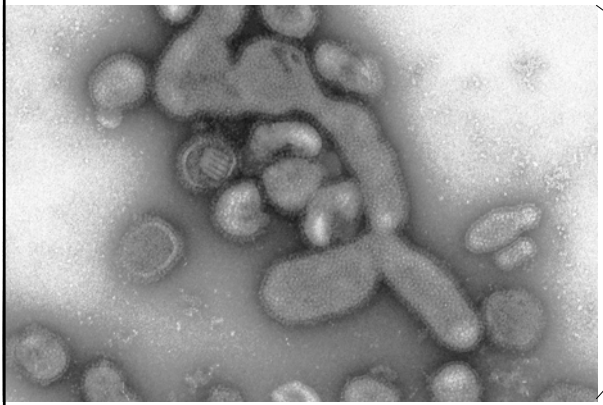
危機管理研修　平成20年9月18日

# 経鼻粘膜投与型
# インフルエンザワクチンの開発

「鼻に一吹き次世代ワクチン」

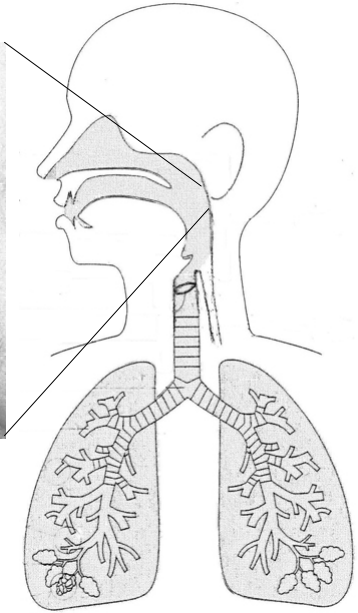
国立感染症研究所感染病理部
長谷川　秀樹

# インフルエンザウイルスの感染



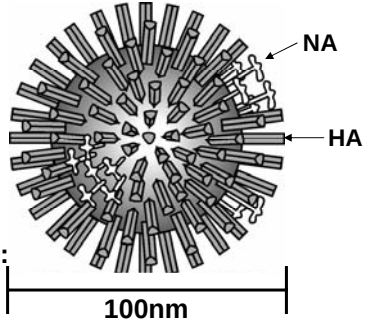
インフルエンザウイル電子顕微鏡写真

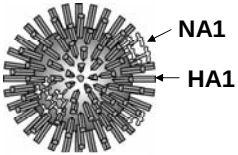
直径約80nm（1nmは1mmの百万分の一）



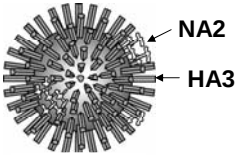
# Influenza virus

- Influenza type : A, B, C
- Eight negative-strand viral RNA segments (PA,PB1,PB2,HA,NP,NA,M,NS)
- Surface antigen of type A virus:
  Hemagglutinin (HA) 1-16
  Neuraminidase (NA) 1-9

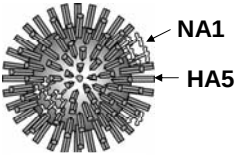



H1N1




H3N2




H5N1

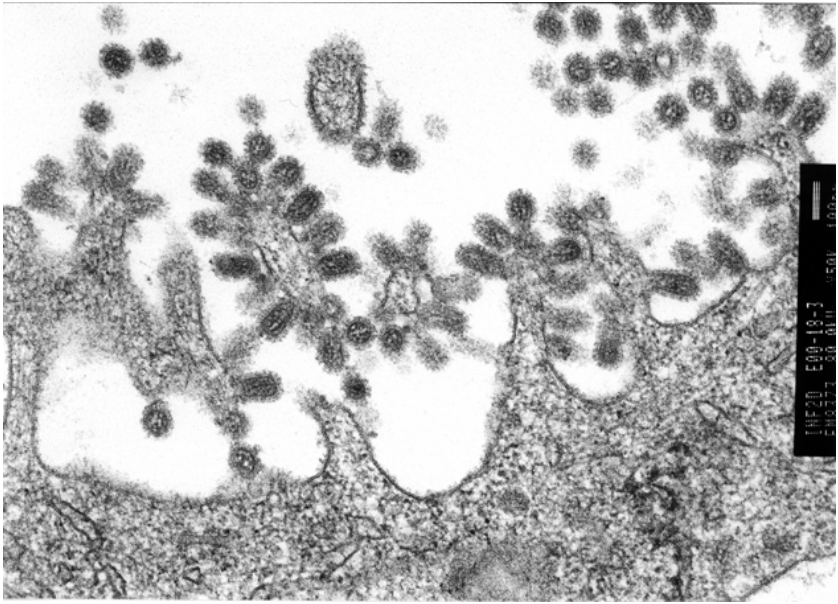
# インフルエンザ

1. インフルエンザウイルスによって引き起こされ、鼻咽頭、のど、気管支などを標的臓器とし、3日位の潜伏期の後に発症し、通常、約1週間で軽快する急性呼吸器感染症。
   日本では毎年11月～4月が流行期 。

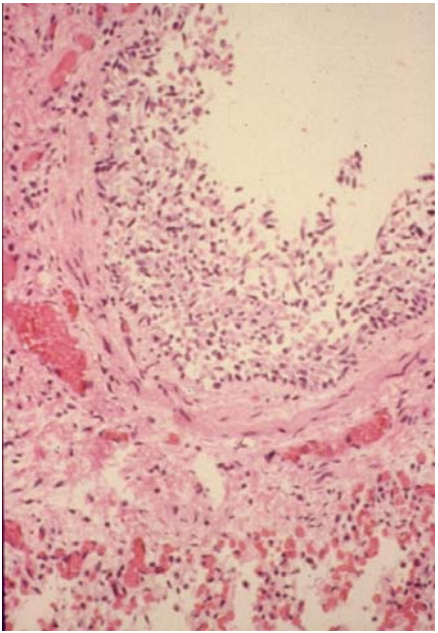
2. 症状 ： 突然の38～39℃を超える発熱、頭痛、関節痛、筋肉痛等に加え、鼻汁、咽頭痛、咳などの上気道炎症状がみられ、全身倦怠感等の全身症状が強いのが特徴。乳幼児、高齢者、基礎疾患をもつ人では、気管支炎、肺炎などを併発したり基礎疾患の悪化を招き、最悪の場合は死に至る。

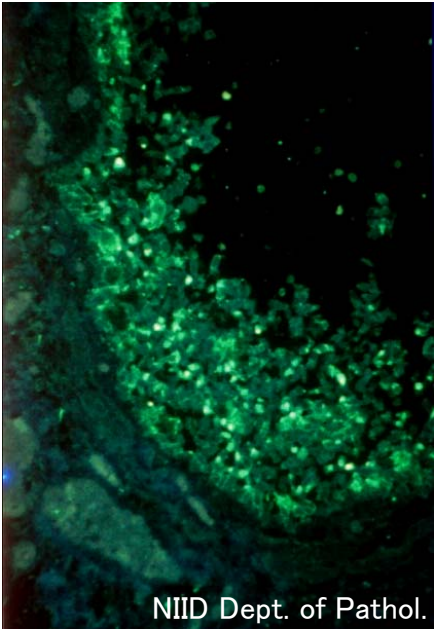
3. 診断 ： 迅速診断キットによって感染早期のウイルス抗原を検出可能。確定診断は、咽頭ぬぐい液、うがい液、鼻腔吸引液などからのウイルス分離や、血液検査での抗体価の有意な上昇（抗体陽転あるいは4倍以上の上昇）によってなされる。

# 鼻粘膜で増殖し出芽するインフルエンザウイルス



# インフルエンザウイルス感染の病理組織





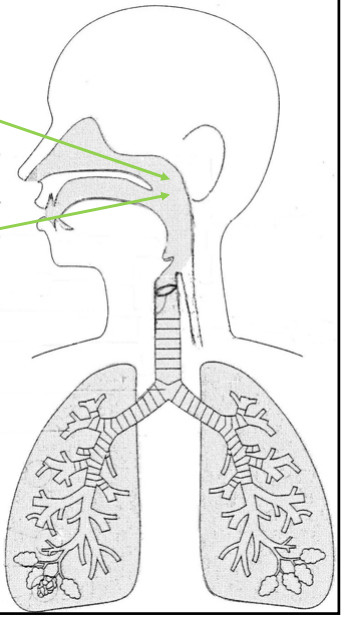
# インフルエンザウイルスの感染による免疫応答

1.粘膜表面での
インターフェロンの分泌

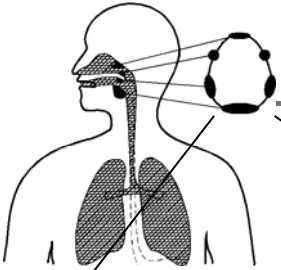
2.粘膜上への
分泌型IgA抗体の産生

3.血中のIgG抗体の産生

4. 細胞障害性T細胞の誘導



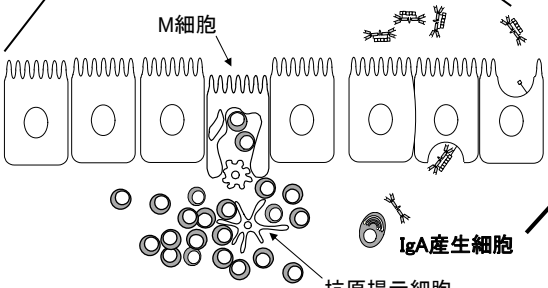
# インフルエンザウイルス感染時の粘膜免疫応答

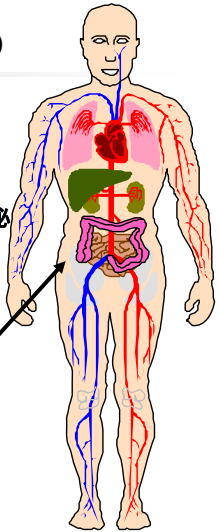


## 汎粘膜免疫機構

**(Common mucosal Immune system)**

- **特異的IgA抗体産生細胞が全身の粘膜に再分布する。**
- **呼吸器だけでなく消化器、泌尿生殖器の粘膜で特異的IgA抗体が分泌**



## 現行の注射型インフルエンザワクチンの問題点

・インフルエンザウイルス感染後の発症、重症化を
**予防できるが感染防御するものではない。**

・ワクチン株と流行株が一致した時には有効であるが、
**株が一致しない場合に効果が低い。**

・ワクチン株決定から製造までに**最低半年かかる。**

・新型インフルエンザのパンデミックにおいては
**流行株を予測する事は不可能である。**

# 次世代経鼻粘膜投与型ワクチンの目標

・感染阻止！

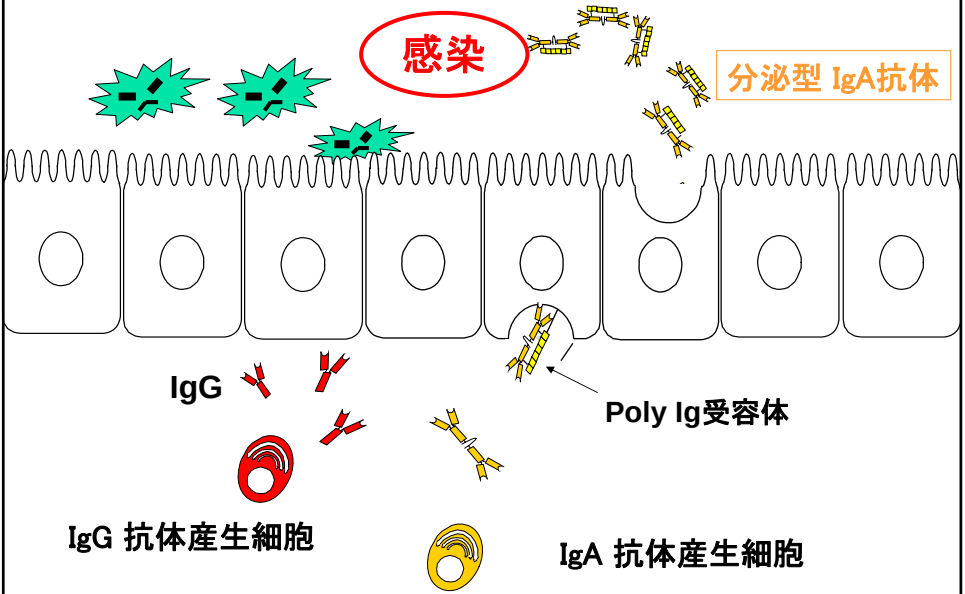
・流行株がワクチン株とある程度一致しな場合にも交叉防御能(cross-protection）がある

・予測不能な新型インフルエンザに対応できる

→ プレパンデミックワクチンとして最適なワクチンである。

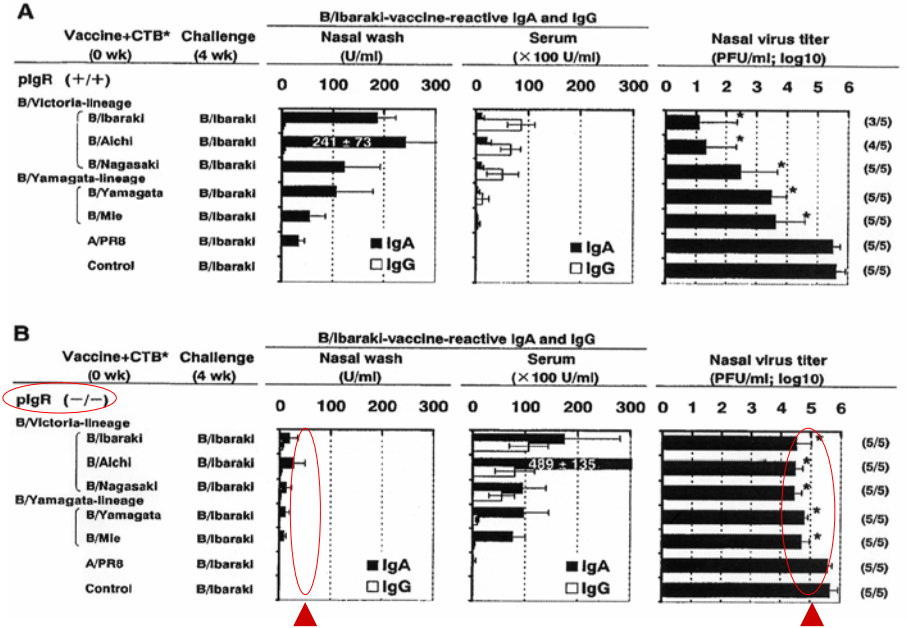
→（ただしヒトで安全に使えるアジュバントが必要である。）

# 粘膜表面におけるインフルエンザウイルス感染防御



# 分泌型IgAが交叉防御に与える影響

Asahi Y et.al.
J. Med. Virol., 74: 328-355, 2004.




鼻腔内への分泌型IgA抗体が見られない。

交叉防御が見られない。

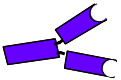
# 経鼻インフルエンザワクチンは変異株に対しても防御効果がある。

皮下接種ワクチン

Saishin-igaku : vol.57

流行ウイルス株

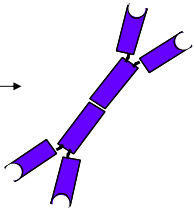
ワクチン株



血清中 IgG

経鼻ワクチン

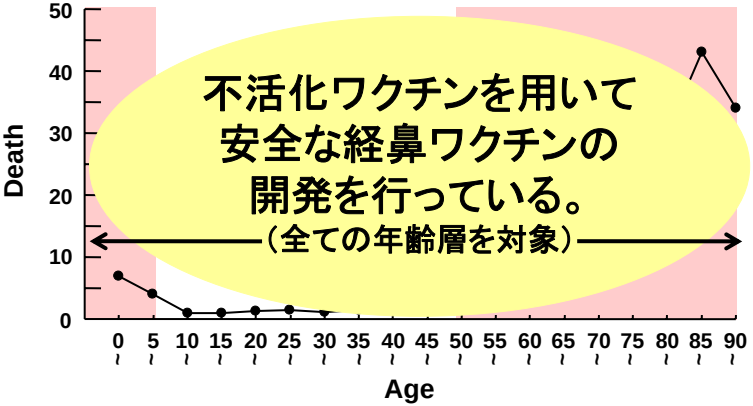
ワクチン株



粘膜上 IgA

# 低温馴化生ウイルスワクチン（FluMist）

**2003年、米国で認可（5～49歳の健康なヒトに限る）**




**不活化ワクチンを用いて**
**安全な経鼻ワクチンの**
**開発を行っている。**
**（全ての年齢層を対象）**

# 経鼻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における経鼻インフルエンザワクチン開発

1987年　感染研病理部細胞病理室長、田村慎一　;部長、倉田毅による
「コレラアジュバント(CTB*)併用経鼻インフルエンザワクチン」開発研究開始

1989年　特許「ワクチン製剤」感染研と(社)北里研究所の共同出願。

1989年　最初の論文発表 (Protection against influenza virus infection by vaccine Inoculated intranasally with CTB. (**Vaccine** 6:409-413,1988))

*＊2002～2004年*
*スイスで、大腸菌易熱性毒素をアジュバントとした経鼻ワクチンを接種した一部のヒトに顔面麻痺(Bell's Palsy)が発症したため使用中止される。*

**新しい安全なアジュバントの開発開始**

2002年　感染研感染病理部、第二室長、長谷川秀樹　;部長、佐多徹太郎:
「Poly I:C併用経鼻インフルエンザワクチン]開発研究開始

2004年　特許「粘膜免疫誘導アジュバントを含む新規ワクチン」感染研と(財)阪大微研の共同出願

2005年　最初の論文発表 (Synthetic double-stranded RNA [poly (I:C)]combined with mucosal vaccine protects against influenza virus infection .( **J Virol** 79, 2910-2919, 2005))

2006年～　安全性の高いアジュバントであるAmpligen (Poly I:$C_{12}$U、米国 Hem社製)を併用した経鼻新型インフルエンザ(H5N1)ワクチンが, ワクチン株と異なる株の流行も予防する可能性が動物実験で示され、プレパンデミックワクチン開発計画開始

2007年～　厚生労働科学研究費医療技術実用化総合研究事業 開始

**1988年～2008年:経鼻インフルエンザワクチンについて英文論文62報発表**

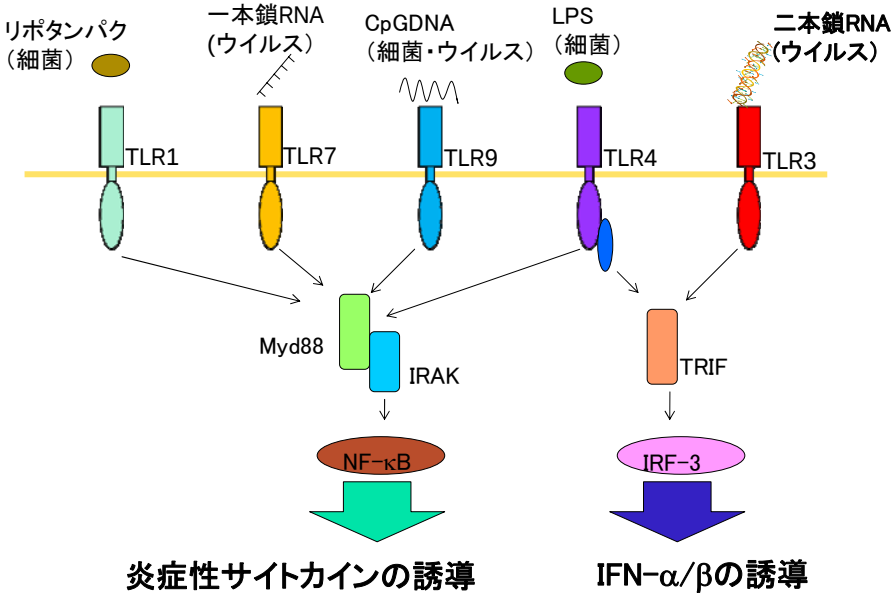
# 経鼻ワクチン（intranasal vaccine）

不活化ワクチン単独では
免疫応答を誘導できない

アジュバント

経鼻ワクチンには、
*免疫応答を増強させる物質*が必要！

# 病原体認識機構　TLR (Toll-like receptor)



# 粘膜ワクチンアジュバントの歴史

**コレラトキシン (CT)**
**大腸菌易熱性毒素 (LT)**

CT/LT併用経鼻ワクチンにより、ワクチン特異的な全身のIgG応答だけではなく、鼻粘膜上のIgA抗体も誘導する

↓

2000年、スイスでLTアジュバント併用の経鼻ワクチン治験

↓

ワクチンを受けたヒトの一部に顔面神経麻痺が生じたため、
毒素系アジュバントはヒトには用いられなくなった。

# 新規粘膜ワクチンアジュバントの開発

1) Compliment C3d fused HA vaccine

[ Watanabe I Hasegawa H *et al.* **Vaccine** 2003 Nov;7(31):4532-8. ]

2) Chitin microparticles (CMP)

[ Hasegawa H *et al.* **J.Med.Virol.** 2005 Jan;75(1):130-136. ]

3) Surfclam microparticles (SMP)

[ Ichinohe T, Hasegawa H. *et al.* **J.Med.Virol.** 2006 May;23(7):954-963. ]

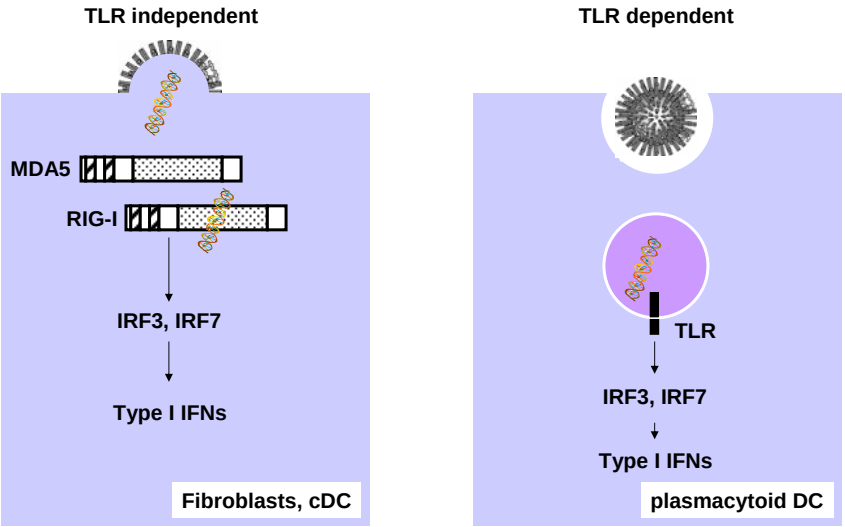
4) Synthetic double stranded RNA [poly(I:C)], Toll like receptor-3 ligand

[ Ichinohe T, Hasegawa H*et al.* **J Virol.** 2005 Mar;79(5):2910-9.
Asahi-Ozaki Yet.al. **Microbes and Infection** 2006 Oct;8(12-13):2706-14.
Ichinohe T et.al. **Microbes and Infection** 2007 Sep;9(11):1333-40.
Ichinohe T et.al. **J Infect Dis.** 2007 Nov 1;196(9):1313-20.]

5) Alpha-galactosylceramide (a-GalCer), NKT cell ligand

(**Mucosal Immunology** *in press*)

# Recognition of dsRNA




Kato *et al.* (2005) Immunity

# 実験スケジュール

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| A/PR8 (H1N1) HA vaccine 1 μg (split-product virus vaccine) | + | Poly ( I:C ) 10 ~ 0.1 μg or CTB* 1 μg | / | 10 μl PBS ( - ) |

CTB* : CTB containing a trace amount (0.1%) of holotoxin (CT)

Balb/c mice ♀
6-8 weeks old

1st → 0

2nd → 4

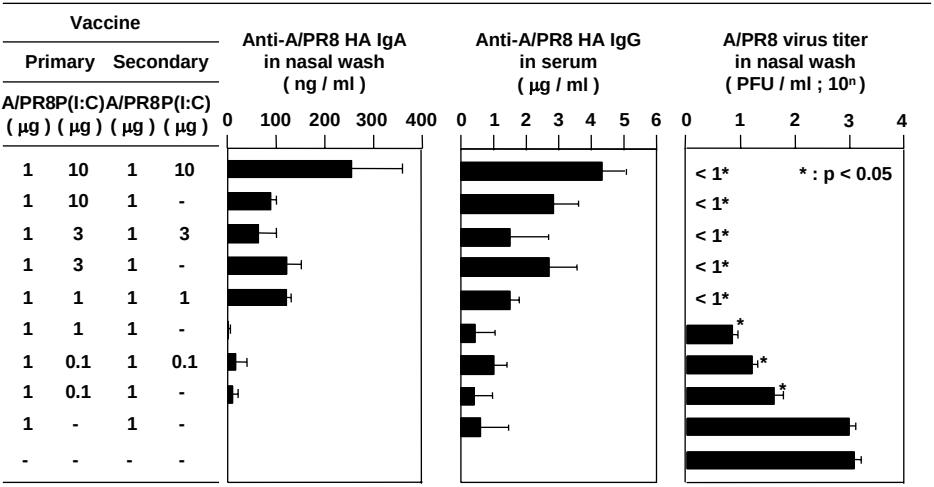
A/PR8/34 (H1N1) virus challenge (1000 pfu) → 6

→ ( weeks )

Nasal wash
Serum
Lung wash

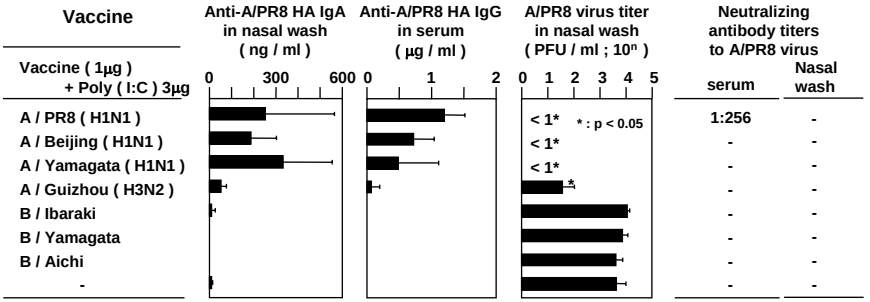
5 μl / Nasal cavity

# Poly(I:C)併用経鼻インフルエンザワクチン接種により、インフルエンザウイルスの感染を防御できる

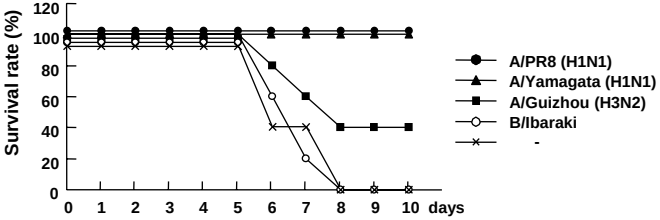


# Poly(I:C)併用経鼻ワクチンは、変異ウイルスに対しても効果的である
# （交叉防御効果）

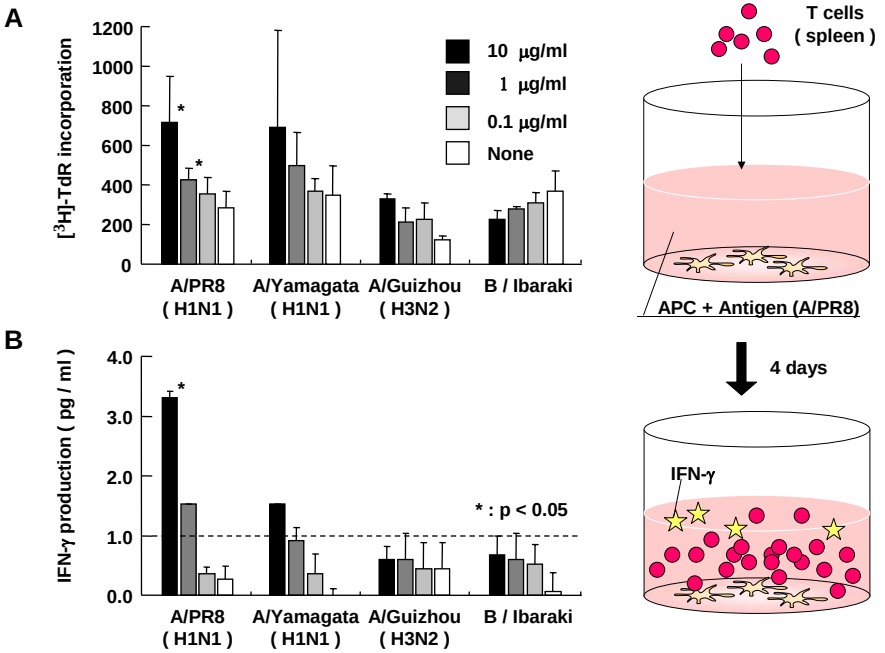
## A. Nasal-restricted influenza model (challenged with A/PR8 virus)

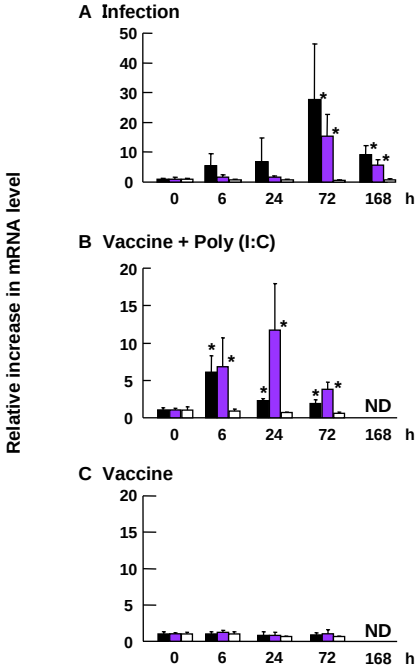



## B. Lethal lung influenza model (challenged with A/PR8 virus)

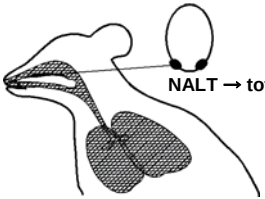


# Poly(I:C)併用経鼻ワクチン後のワクチン特異的なT細胞応答






**Nasopharyngeal associate lymphoid tissue**



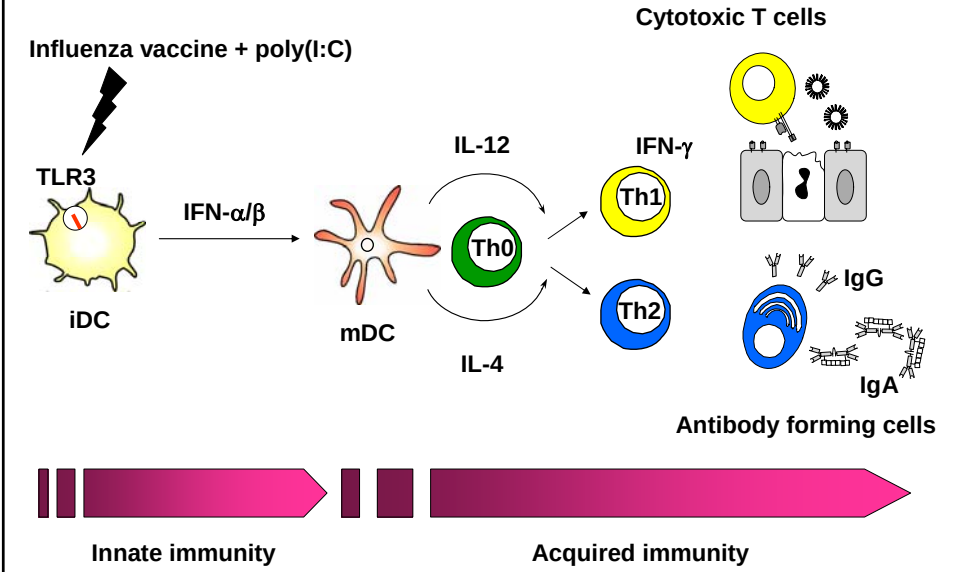

**Sensors of dsRNA**

- TLR3 (endosome)
- RIG-I (cytosol)
- MDA-5 (cytosol)

**Vaccine with poly(I:C) mimics the state of viral infection**

**↓**

**Protective immune response!**


Influenza vaccine + poly(I:C)
TLR3
iDC
IFN-α/β
mDC
IL-12
Th0
IL-4
IFN-γ
Th1
Th2
Cytotoxic T cells
IgG
IgA
Antibody forming cells
Innate immunity
Acquired immunity

## 経鼻ワクチンの利点

・簡便で痛くない！

・全身の粘膜へ分泌型IgA抗体の誘導

　　感染自体を防ぐ

　　交叉防御効果→変異株に対して有効

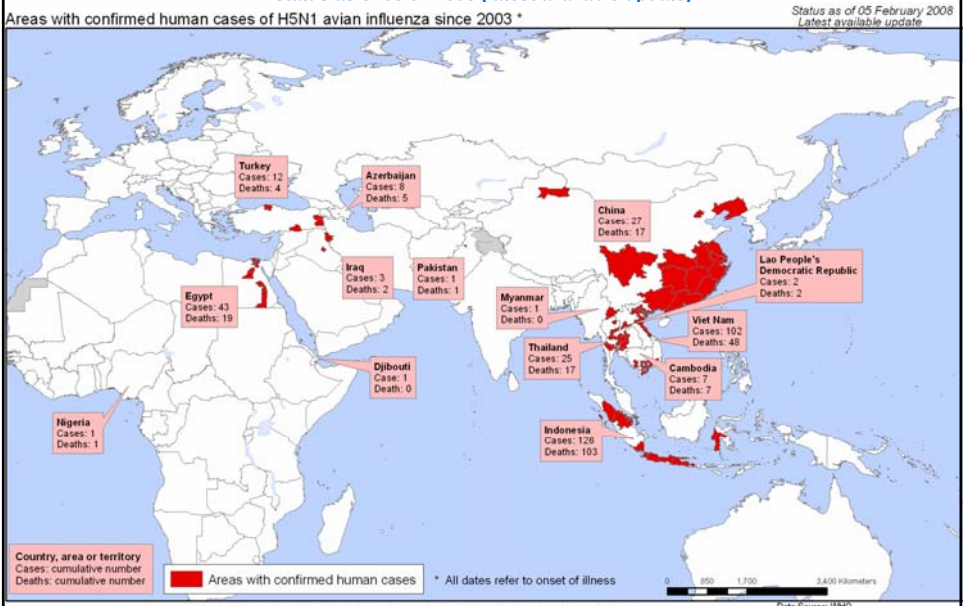
・通常のインフルエンザだけでなく

　新型インフルエンザに対応

・針が必要なく安全、医療廃棄物の減量

# 高病原性鳥インフルエンザウイルスワクチンへの応用

## Affected areas with confirmed cases of H5N1 avian influenza since 2003, status as of 05.02.2008 (latest available update)




World Health Organization

The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement.

Data Source: WHO
Map Production: Public Health Mapping and GI
World Health Organization
© WHO 2008. All rights reserved

# 背景

・高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5N1）ワクチンは、ヒトでの皮下接種において免疫応答が低いことが知られている

・ウイルスのどの株がパンデミックを起こすのか予測することは難しく、流行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る

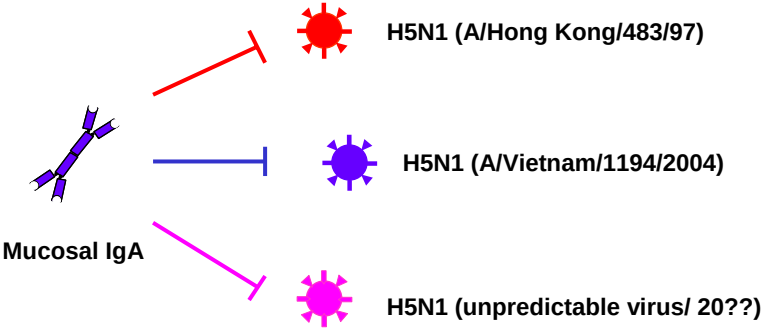
・皮下接種ワクチンは、ワクチン株と流行ウイルス株が 一致しないとワクチンの効果が期待できない

・感染部位が呼吸器だけでなく消化管への感染が報告されている。

# 交叉防御能を有する 分泌型-IgA抗体

・インフルエンザウイルスH5N1変異ウイルスに対する防御が必要である。

・そのためには交叉防御能を有する分泌型IgA抗体を粘膜上に誘導する必要がある。

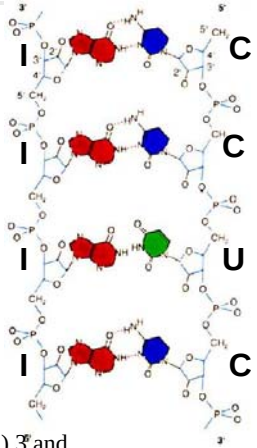


# PolyI:PolyC$_{12}$U (Ampligen®)

・合成二本鎖RNA
TLR3 ligand

・慢性疲労症候群
第3相臨床治験終了(USA)
> 75,000 dose (400 mg IV)

・12塩基に1塩基ミスマッチ

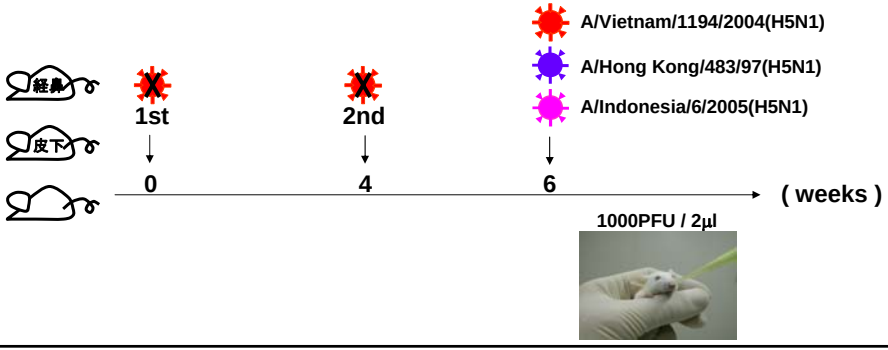



Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Feb 19;105(7):2574-9.
The adjuvant role of poly IC requires Toll-like receptor (TLR) 3 and melanoma differentiation-associated gene-5 (MDA5) receptors, but its analog poly IC12U requires only TLR3.

# 実験スケジュール

全粒子不活化ワクチン　1μg：　NIBRG14 (A/Vietnam/1194/2004)

アジュバント　　10μg：　PolyI:PolyC$_{12}$U (Ampligen®)

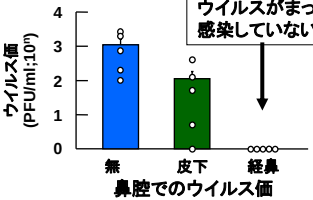


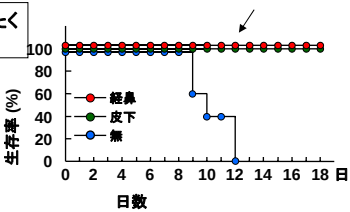
# ベトナム株由来H5N1ワクチンの感染防御効果

皮下・経鼻共に100%生存

A. ベトナム株/2004

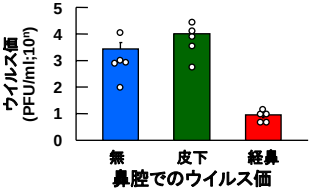
ワクチン株と
同じウイルス株

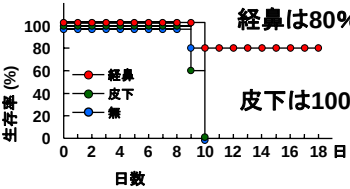



B. 香港株/1997

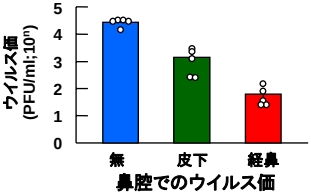
ワクチン株と
異なるウイルス株

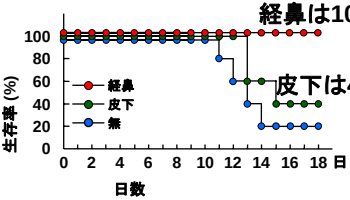



C. インドネシア株/2005

ワクチン株と
異なるウイルス株

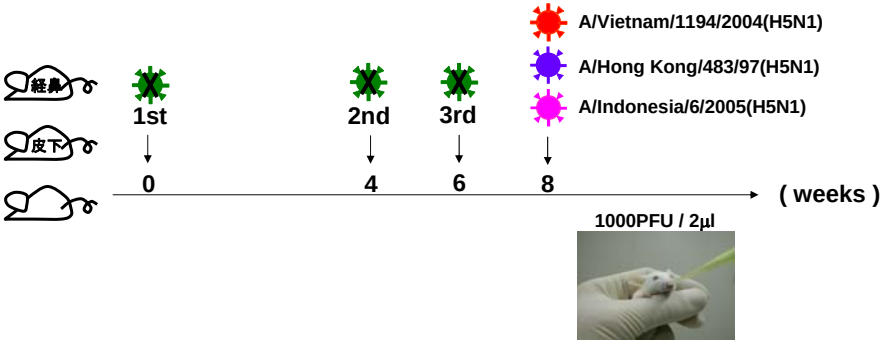


# 実験スケジュール

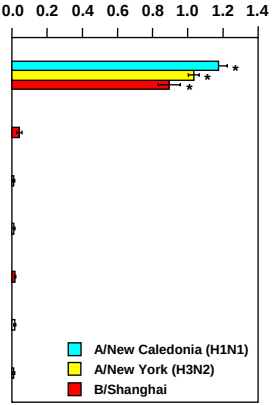
05/06シーズンインフルエンザHAワクチン　1μg：　A/New Caledonia (H1N1)
A/NewYork (H3N2)
B/Shanghai

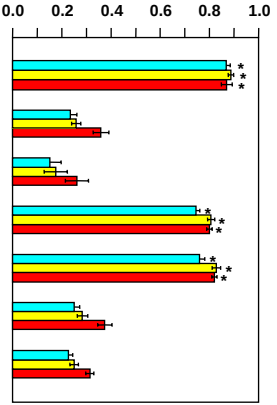
アジュバント　　10μg：　dsRNA



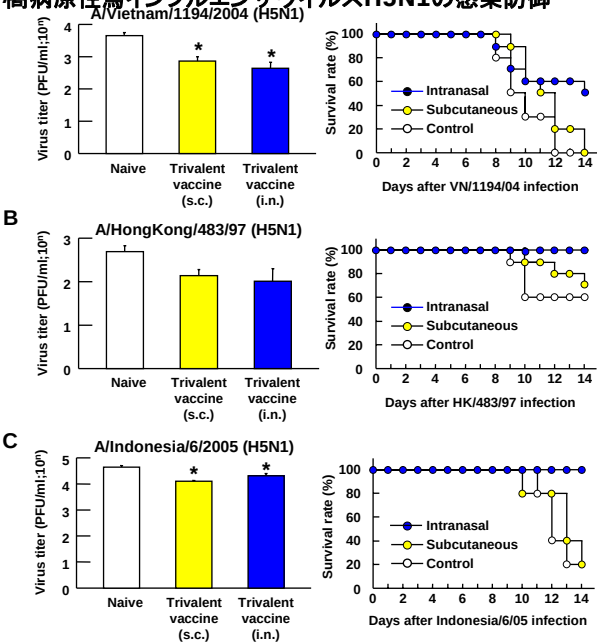
# 2005/2006 年シーズナルインフルエンザワクチンによる抗体応答

| Vaccine | | |
|---|---|---|
| Trivalent vaccine ( μg ) | dsRNA ( μg ) | Route |
| 1 | 10 | i.n. |
| 1 | - | i.n. |
| - | 10 | i.n. |
| 1 | 10 | s.c. |
| 1 | - | s.c. |
| - | 10 | s.c. |
| - | - | - |



# 2005/2006 年シーズナルインフルエンザワクチンによる
# 高病原性鳥インフルエンザウイルスH5N1の感染防御



# まとめ

- 経鼻インフルエンザワクチンにより、注射型ワクチンでは誘導されない分泌型のIgA抗体が誘導される。
- 分泌型IgA抗体は感染前にウイルスと反応し感染自体を防ぐ。
- 分泌型IgA抗体には交叉防御能(cross protection)があり変異株に対しても有効である。
- 経鼻インフルエンザワクチンにより誘導される粘膜免疫は汎粘膜免疫機構（common mucosal immune system)により全身の粘膜を防御する。
- 高病原性鳥インフルエンザH5N1に対する経鼻インフルエンザワクチンはCladeの異なる株に対しても有効であり、流行株の予測が不可能なプレパンデミックワクチンとして最適なワクチンである。

感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律及び検疫法の一部を改正する法律案に対する修正案要綱

一　新型インフルエンザ等感染症の無症状病原体保有者に対する感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律の適用

新型インフルエンザ等感染症の無症状病原体保有者については、新型インフルエンザ等感染症の患者とみなして、感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律の規定を適用すること。（感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律第八条第三項関係）

二　研究の促進等

1　国は、新型インフルエンザ等感染症に係るワクチン等の医薬品の研究開発を促進するために必要な措置を講ずるとともに、これらの医薬品の早期の薬事法の規定による製造販売の承認に資するよう必要な措置を講ずるものとすること。（附則第三条第一項関係）

2　国は、新型インフルエンザ等感染症の発生及びまん延に備え、抗インフルエンザ薬及びプレパンデミックワクチンの必要な量の備蓄に努めるものとすること。（附則第三条第二項関係）

感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律及び検疫法の一部を改正する法律案に対する附帯決議（案）

政府は、発生が時間の問題とされている新型インフルエンザの脅威から、国民の生命及び健康を守るため、次の事項について対策を講ずるべきである。

三、新型インフルエンザの感染予防対策の重要性にかんがみ、経鼻粘膜投与技術及び細胞培養による大量生産技術の開発等を推進すること。また、新型インフルエンザが出現した場合に、速やかにワクチンを大量に生産できるよう、必要な有精卵を確保するため、これらを生産する養鶏業者に対し、鳥インフルエンザ等の感染予防対策を支援するなど、財政措置を含め必要な対策を講ずること。さらに、新型インフルエンザ感染症の流行時において、全国民を対象に迅速かつ適切にワクチン接種ができるよう、薬剤師及び保健師等を活用した投与の在り方についても検討すること。

# 社会的に注目され実用化が待たれている！

読売新聞朝刊　平成20年1月13日

感染自体防ぐ
粘膜ワクチン

鼻に噴霧 呼吸器の免疫強化

インフルエンザ

注射より効く鼻ワクチン

粘膜に噴霧 感染防止

読売新聞夕刊
平成19年6月30日

新型インフルエンザ

鼻に一吹き 新ワクチン

厚労省研究班 動物で立証

即応型 粘膜に免疫

2年後治験 副反応課題

朝日新聞

2008年 平成20年
3月12日
水曜日

人・空気・未来
高砂熱学工業

# Acknowledgement

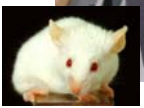
**国立感染症研究所**

**感染病理部**

一戸猛史
相内章
川口晶
神戸光彦
永田典代
岩田奈緒子
原嶋綾
田村慎一
佐多徹太郎
倉田毅

**ウイルス第3部**

田代眞人
小田切孝人
板村繁之
二宮愛
今井正樹

**動物管理室**

網康至
須崎百合子