

# インフルエンザスプリットワクチンの限界と 新規ワクチンの開発

Limitations of influenza split vaccine and new concepts for vaccine development

なか やま てつ お  
中山 哲 夫  
Tetsuo NAKAYAMA

## はじめに

インフルエンザは毎年流行を繰り返し、流行年度には高齢者を中心に超過死亡が増加することから一部個人負担で老人へのインフルエンザワクチンが勧奨接種のワクチンとして推奨されてきた。老人の肺炎だけでなく、乳幼児のインフルエンザ脳症の合併症などからインフルエンザの重要性の認識が高まってきた<sup>1)</sup>。

インフルエンザウイルスは 1930 年代にヒトのインフルエンザウイルスがフェレットで分離された。同じころ発育鶏卵を用いて黄熱ウイルスが分離され、インフルエンザウイルスも発育鶏卵で増殖することがわかった。こうして増殖させたインフルエンザウイルスを皮下接種すると 2 週間には中和抗体が検出され 6 カ月は維持されており、インフルエンザ疾患の入院に対して有効率が 70-80% と報告されていた。しかしながら、1947 年には同じ製法で作製したワクチンは効果がなく、これまでと同じ H1N1 亜型であってもイタリア風邪の流行に際して Antigen drift には効果が減弱することが解った<sup>2)</sup>。

当時の全粒子不活化ワクチンは副反応として発熱率が高く、その原因としては原材料の卵の汚染、ウイルス膜は宿主由来の脂質膜成分を含んでおり、これらを除去する方法が考案された。現在のスプリットワクチンの原型となるゾーナル超遠心精製後に界面活性剤で分解し、エーテルで発熱の原因となる脂質膜成分を除去した安全性の高いスプリットワクチンが製造されている。その後、不活化インフルエンザワクチンの製造法には大きな変化はなく、現在に至っている。抗原変異に対処するためにも高い抗体

価を誘導する必要があると考えられ、1960 年代からアジュバントワクチンの開発が始まった<sup>2)</sup>。アジュバントは抗原と同時に投与することで液性免疫、細胞性免疫能を高める物質を呼ぶ。わが国でもインフルエンザワクチンの研究・開発のために 1961 年にインフルエンザワクチン研究会が組織されており、研究集会の記録の冒頭で「もう少しワクチンの免疫効果のいいものを作ろうじゃないかということで、まずアジュバントワクチンを検討しよう。」と述べられている<sup>3)</sup>。ミネラルオイル、ゴマ油、アルミとアジュバント活性について研究されたが、ヒトで安全性と有効性のバランスのとれたアジュバント添加インフルエンザワクチンは開発できなかった。

インフルエンザワクチンの効果は抗原変異に対応できない事が開発の歴史の中から垣間みられる。20 世紀になってヒトに流行してきた A 型インフルエンザウイルスは H1N1 (ソ連かぜ)、H2N2 (アジアかぜ)、H3N2 (香港かぜ) で、20 世紀初頭のスペイン風邪は H1N1 でトリ由来のウイルスと考えられている。こうした抗原の不連続変異(シフト)により出現したウイルスは、今までにヒトに流行したことがないので世界中に蔓延しパンデミックを起こす。また、インフルエンザウイルスは RNA ウイルスでヒトからヒトに感染するうちに変異を重ねて抗原性に変化し、抗原の連続変異 (drift) を起こす。インフルエンザワクチンは WHO が前年度の流行株を参考にワクチン製造推奨株を 2 月頃に決定し、感染症疫学センターでの血清疫学調査等を参考とし、WHO 推奨株と同じ抗原性で増殖性の高い株を日本でのワクチン製造株とする<sup>4)</sup>。

## I. 現行の不活化スプリット インフルエンザワクチンの限界

現行の季節性インフルエンザワクチンの有効性に関しては開発当初から議論されている。1967-2011年の間に発表されたワクチンスタディの5707の論文のなかで randomized control study で18-65歳を対象に遺伝子検出を指標としたワクチンの有効率は59%、6-24カ月を対象とした論文では全く異なる

### 1) ワクチンの剤型の問題

- \* 自然免疫系に刺激が入らない。  
免疫原性が低くnaïveな乳幼児には免疫応答が低い。
- \* インフルエンザの既往歴 (CD4メモリー) に依存する。
- \* IgA抗体、細胞性免疫の誘導ができない。
- \* 抗原変異に対応できない。
- \* IgE感作を増強する。

全粒子不活化、生ワクチン  
アジュバント

### 2) 投与ルートの問題

局所IgA抗体の誘導ができない。

経鼻接種

### 3) 孵化鶏卵による製造

孵化鶏卵で増えるようになるまでにHA抗原が変異する。

細胞培養型

### 4) 昨年度の流行型から製造株を決定する。

4価スプリットワクチン

図1 現行のインフルエンザワクチンの限界

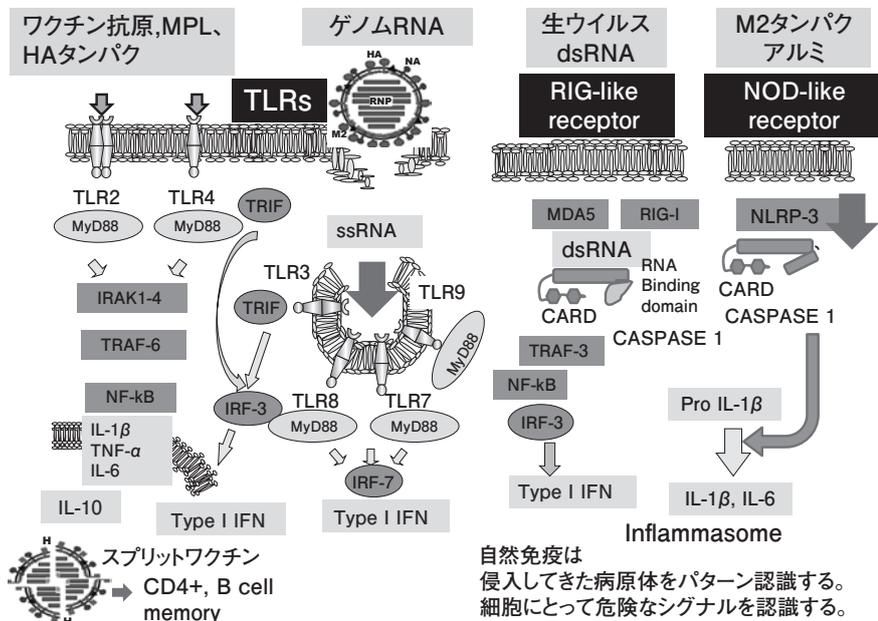


図2 インフルエンザワクチンの剤型による自然免疫系へのシグナル

自然感染・生ワクチンでは粒子内の一本鎖RNAウイルス遺伝子 (ssRNA) は細胞内に取り込まれ endosome の TLR3, 7 にシグナルを入れ type I Interferon (IFN) を誘導する。生ワクチンウイルスは増殖する過程に産生される二本鎖RNA (dsRNA) が RIG-I にシグナルが入り caspase recruitment domain (CARD) に caspase を動員し炎症性サイトカンを誘導する。インフルエンザ M2 タンパクやアルミアジュバントは NOD-like receptor に刺激を入れ同様に炎症性サイトカンを産生する。全粒子不活化ワクチンでは粒子内のゲノムRNAがTLRに刺激を入れる。不活化スプリットワクチンはこうした自然免疫系にシグナルが入らない。

結果で流行年度により有効性に差が認められる事や、8-17歳では17論文中6件が有効であると結論している。H1 Pdm 2009 ワクチンでは抗原性が一致したことから有効性が認められている<sup>9)</sup>。スプリットワクチンはインフルエンザウイルス感染の既往があるワクチン被接種者において抗体を誘導し、その免疫応答は年齢因子(過去のインフルエンザの既往)に強く影響される。現行のスプリットワクチンの限界について図1に示した。こうした課題を克服するために新規のワクチンの開発研究が行われている。

## II. インフルエンザワクチンの 剤型による免疫応答

わが国で認可されているインフルエンザワクチンはスプリットワクチンのみであるが、外国では噴霧弱毒生ワクチン、アジュバント添加サブユニットワクチンも存在する。感染症で獲得免疫を誘導するには自然免疫系にシグナルを入れてサイトカインを誘導することが必須で、ワクチン免疫も同様であり模式的に図2に示した。インフルエンザ生ワクチンでは自然感染と同様に感染しウイルスの一本鎖RNA、

一部二本鎖 RNA は endosome の自然免疫受容体の Toll-like receptor (TLR) 3 に認識され、感染後の複製過程で生じる 2 本鎖 RNA は retinoic acid inducible gene (RIG)-I を刺激する<sup>6)</sup>。またインフルエンザウイルスの M2 タンパクは inflammasome を刺激し IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  の炎症性サイトカインを誘導する<sup>7)</sup>。ウイルス感染、生ワクチンはこうして自然免疫系に多くのシグナルを入れる。全粒子不活化ワクチンは細胞内に取り込まれるが増殖することはなく、ウイルス粒子内のゲノム RNA は TLR 3/7 を刺激するが RIG-I には刺激が入らない。一方、スプリットワクチンは粒子がバラバラになり、理論的には自然免疫系にシグナルは入らないので、naïve な個体に獲得免疫を誘導できないが、製剤中に残存する遺伝子成分、タンパク成分が刺激となり弱いながらも抗体産生を誘導する。従って、スプリットワクチン成分である HA タンパクが CD4 memory、抗体産生の B cell memory を刺激するのみで、今までにインフルエンザの感染の既往がない乳幼児には効果が低い<sup>8)</sup>。CD4 ヘルパー T 細胞を介する抗体刺激以外にも抗原の B cell epitope は B 細胞抗原受容体 (BCR) を介して取り込まれ抗体産生を誘導する。

生ワクチン、全粒子不活化、スプリットワクチンの剤型による免疫応答の差は自然免疫系へのシグナルの差に起因する。

### Ⅲ. アナフィラキシー

インフルエンザワクチン接種後のアナフィラキシー反応は毎年数例報告されており、発育鶏卵で製

造されることからその原因は卵アレルギーと考えられてきた。2011/12 シーズンの 2-フェノキシエタノールを保存剤として使用したインフルエンザワクチン接種後にアナフィラキシーが起こり、その原因はインフルエンザワクチン成分に対する IgE 抗体の存在が報告されている<sup>9)</sup>。IgE 抗体の存在だけではアナフィラキシー反応は起こさず、ワクチン抗原分子はマスト細胞の表面で IgE 抗体と数カ所以上結合する抗原分子、粒子の大きさが必要となる。また、昆虫細胞を用いて遺伝子組換え技術を応用した HA タンパクを用いたワクチンは鶏卵由来でないことから卵アレルギーを持つ患者さんに推奨されたが、このワクチン接種後にもアナフィラキシーが報告されている<sup>10)</sup>。こうした報告からインフルエンザワクチン接種後のアナフィラキシー反応は卵アレルギーではなく、インフルエンザワクチン成分に対するアレルギー反応と考えられる。インフルエンザの自然感染では IgE 抗体の感作は認めず、感作の原因は Th2 応答に偏った免疫応答のみを誘導する現行のスプリットワクチンの剤型に問題があることが明らかとなり、Th1 応答も誘導できる有効なワクチンの剤型を検討する必要がある。これらの課題を克服するためには、精製全粒子不活化、もしくはスプリット+アジュバントにするかワクチンの基本的な剤型を考える turning point にある。アジュバントに関しては Th1/Th2 のバランスのとれた応答が必要であり、理想的なアジュバントはインフルエンザウイルスそのものである。ワクチンの免疫原性、安全性の課題を解決するための種々の検討が行われておりまとめて表 1 に示した。

表 1 インフルエンザワクチンの剤型、製造、投与経路

インフルエンザワクチンの剤型
1) 不活化スプリット、不活化サブユニット、virus like particles (VLP)
2) 弱毒生ワクチン
3) Virus-vectored vaccine
ウイルス抗原の製造
1) 鶏卵培養ワクチン
スプリット、サブユニット、4価ワクチン、弱毒生ワクチン
2) 動物培養 (MDCK, PER.C6, Vero, HEK293)
スプリット、全粒子不活化、弱毒生ワクチン
3) 昆虫細胞-バキュロウイルス
HA サブユニット、virus like particles (VLP: HA, NA, M1)
4) Virus-vectored vaccine
HA タンパクを発現する adenovirus, poxvirus, measles virus human parainfluenza virus
5) NS1 欠損 non-replicative virus
ワクチンの投与経路
1) 筋注、皮下注
2) 皮内
3) 経鼻

#### IV. 投与ルートの問題

ワクチン接種により血中に IgG 抗体が誘導され、気道粘膜にしみ出してくる抗体により感染を抑えると考えられる。現行ワクチンでは上気道には IgA 抗体が誘導できないために感染防御能には限界がある。今までのワクチン開発はウイルス血症を起こすウイルス感染症をターゲットに開発され、血中に抗体を誘導する事を目的としてきた。筋注、皮下接種以外の投与ルートをもとめて図 3 に示した。インフルエンザは気道粘膜感染であり弱毒生ワクチン、現行のスプリット抗原、全粒子不活化抗原を用いた自然感染に近い経鼻投与のワクチンが開発されており、抗原性が近い亜型のウイルスに関しても交叉免疫原性があることから、その有効性が期待されている。経鼻噴霧型弱毒生ワクチンアメリカでは 10 年以上の使用実績があり、わが国でも臨床試験が 2015 年度内には終了し 2017/18 年の認可を目途に申請される。経鼻接種による免疫応答を模式的に図 4 に示した。鼻粘膜中に停留し自然免疫を刺激する粘膜アジュバントと共に投与する必要がある<sup>11)</sup>。粘膜投

与された抗原は M 細胞に uptake され、粘膜下に運ばれ、樹状細胞に取り上げられ、所属リンパ節に運ばれる。腸管、鼻咽頭粘膜組織の共通する mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) で B 細胞はプラズマ細胞に分化し、経鼻接種により血清中に IgG 抗体を誘導するとともに IgA 抗体が血中にも産生される。血清中の IgA は粘膜上皮の基底膜側から上皮細胞に取り込まれ secretory component を付加して多量体として内腔面に分泌される。IgA は抗原との結合がゆるく抗原変異にも対応できる。

他の投与ルートとして皮内接種のワクチンが外国では認可されている。皮内は Langerhans 細胞をはじめ樹状細胞が多く存在することで、接種された抗原は効率よく uptake され所属リンパ節に運ばれ CD4, CD8 細胞に抗原を提示することで細胞性免疫、液性免疫の双方を活性化できると報告されている<sup>12, 13)</sup>。皮内接種の課題はそのデバイスの開発である。ヨーロッパで認可されているシリンジタイプのデバイスの皮内接種ワクチンの臨床試験が終わり製造申請された。他にマイクロニードルのデバイスもあるが、安定した抗原のデリバリーに関して課題が残っている。

##### 投与ルート

1. 経鼻投与
  - a) 卵由来 弱毒生ワクチン FluMist (MedImmune)  
アストラゼネカ 2015申請予定 2017/18上市目標
  - b) 全粒子不活化  
小規模臨床試験では 感染防御能は3W間隔2回接種で76%  
大阪大学微生物病研究会 2018/20に申請目標
  - c) スプリットワクチン+粘膜アジュバント
2. 経皮接種
  - a) シリンジ型
  - b) マイクロニードル

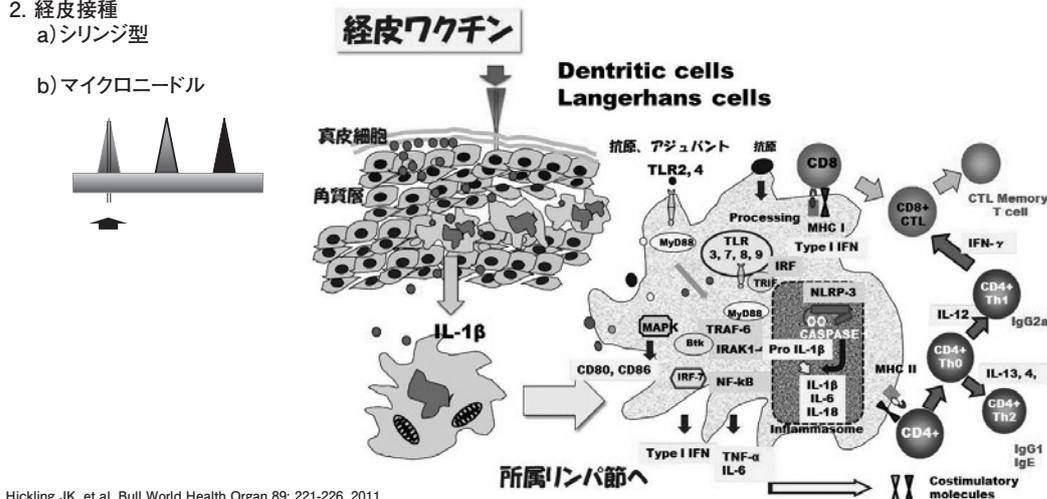


図 3 経鼻ワクチン、経皮接種のワクチンの開発状況

経皮接種のシリンジ型は周辺の皮膚を圧迫して針刺しで抗原を刺入する。Langerhans 細胞が抗原を取り込み所属リンパ節に運び獲得免疫を誘導する。

## V. これからのインフルエンザワクチン

インフルエンザワクチンの効果が低いことの原因としては、現行スプリットワクチン株と流行株との抗原性の変異が挙げられる。季節性ワクチン株の選定だけではなくワクチン製造のために鶏卵で増殖する株を選択し、その馴化過程に変異が導入され流行野生株型ではあるが鶏卵馴化の過程で抗原変異を来

たし有効性が減弱する<sup>14)</sup>。現行の鶏卵ワクチンの状況をまとめて図5に示した。全世界のインフルエンザワクチンの製造量は6億ドース弱であり、フル稼働で15億ドースとなる。70億の全人口に対してパンデミックに対処するには、受精卵の供給等の問題から効率の高い製造法の開発が必要とされる。その解決策として組織培養型ワクチンへの転換が期待されるが、組織培養ワクチンの開発は主としてパンデミックワクチンの抗原製造のための迅速性、生産

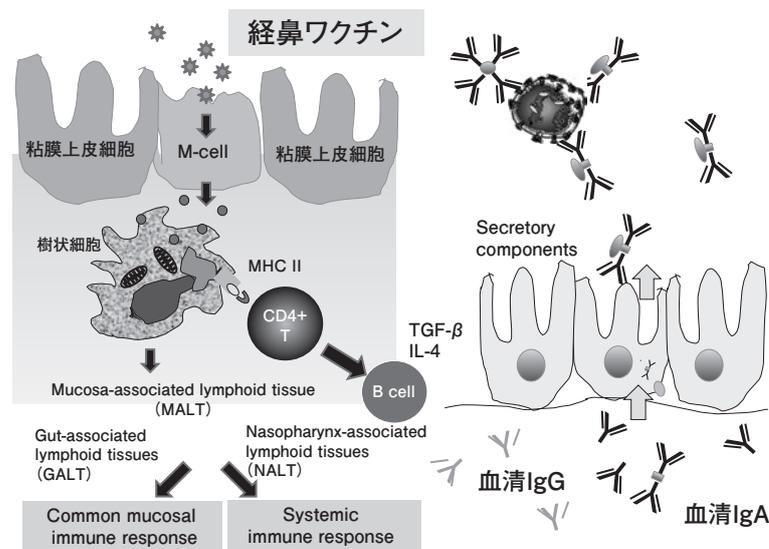
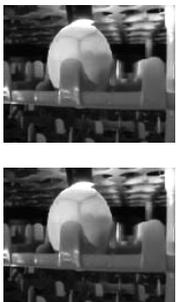


図4 経鼻接種のワクチンによる免疫反応

投与された抗原は粘膜下の樹状細胞に取り上げられ、所属リンパ節に運ばれ、腸管や鼻咽頭粘膜に共通する Mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) で CD4+T 細胞を活性化し、B リンパ球を抗体分泌細胞に分化させ IgG, IgA 抗体を産生する。血清中の IgA 抗体は基底膜層から粘膜細胞に uptake され secretory component が付加されて管腔に分泌される。



鶏卵由来のワクチンのメリット

- 安価
- 製造施設 Regulationが既に出来上がっている。
- ウイルスの収量が高い。

鶏卵由来のワクチンのデメリット

- 鶏由来のウイルスの迷入
- 安定した受精卵の供給
- 高増殖株の樹立
- 流行株・PR8 reassortant
- 鶏卵馴化過程の変異

世界のインフルエンザワクチンの製造量  
6億ドース (Max 15億ドース)

Cell-culture based vaccine

- MDCK (Novartis)
- sf9/baculovirus (Protein Sciences)
- Vero (Baxter)

季節性の供給量は10%以下

図5 鶏卵由来インフルエンザワクチンのメリットとデメリット

現在のインフルエンザスプリットワクチンは受精卵2個で製造される。

性の面から検討されている。犬腎臓細胞 (MDCK)、ヒト胎児網膜細胞 (PER.C6)、サル腎臓細胞 (Vero)、ヒト胎児腎臓細胞 (HEK293) が用いられている。抗原変異に対応する観点から季節性インフルエンザワクチンへの応用が期待されるものも、現在では世界の季節性ワクチンの製造量のうち細胞培養型ワクチンの占める割合は全体の 10% 以下である。鶏卵由来ワクチンはウイルスの収量が多く、既に製造工程基準は確立されており、製造施設も特別な設備は必要とされないことから安価に製造が可能である<sup>15)</sup>。

また、遺伝子組換え技術はインフルエンザワクチン製造にも応用され、HA タンパク遺伝子を発現するバキュロウイルスを昆虫細胞に感染させ培養上清から HA タンパクを精製したワクチンは既にアメリカで認可され有効性が報告されている<sup>16)</sup>。また同じ系を用いて HA, NA, M1 タンパクを発現するように設計し、virus like particle (VLP) を用いた新規ワクチンの研究も始まっている。

以上のように、既に認可されたワクチン以外にも新たな概念に基づくワクチン開発が進められている。生ワクチンの新たな開発の方法として、ウイルスベクターを用いてインフルエンザ HA タンパクを発現する組換えウイルスの手法も試みられている。Reverse genetics の手法を用いて NS1 を欠損した非増殖性の欠損ウイルスも検討されている<sup>17)</sup>。

## VI. 日本の状況

ワクチン株の選定は毎年 WHO 推奨株が 2 月までに決まり、わが国では製造株が 3 月末に決定される。前シーズンの流行株、増殖性、抗原性、血清抗体の保有状況を参考に次のシーズンのワクチン株が 3 株選定される。B 型にはビクトリア、山形タイプと異なる抗原性のウイルスが存在しワクチン株の選定に毎年苦慮しているが、欧米では B 型 2 株を加えた 4 価ワクチンが既に使用されている。日本のワクチン製造の基準は生物製剤基準により 240 $\mu$ g と規定されており、4 価のワクチンにすると総タンパク量が増えることから 400 $\mu$ g 以下と規定され、アナフィラキシー、IgE 感作の増強の可能性があるかどうかの検討が行われ、IgE 感作の程度は従来の 3 価のワクチンと同じ程度であると報告されている。

1997 年に始まった H5N1 高病原性トリインフル

エンザから 2004 年にベトナムで H5N1 による感染死亡例が報告され、パンデミックワクチンとして H5N1 ワクチンの製造開発が始まり全粒子不活化ウイルス+アルミアジュバント製剤で製造された。H5N1 ウイルスでは HI 抗体反応は低く、中和抗体応答が EMA の基準をクリアし成人で認可されたが、同じワクチンを小児で使用すると良好な免疫応答を示したが高い発熱率を示した<sup>18)</sup>。この時の鶏卵製造株 H5N1 A/Vietnam/2004 だけの問題なのか、その後の細胞培養型の H5N1/Indonesia, A/Anhui で臨床試験を継続しており小児への接種試験も実施しており、H5N1 A/Vietnam の発熱率よりは低いようで、開発当初の全粒子不活化ワクチンとは異なり精製の技術も高まり発熱率も低くなっているものと考えられる。

## おわりに

従来、免疫原性、感染防御能に課題を持っているものの安全であるとされてきたワクチンであるが、アナフィラキシーの IgE 感作が問題となってきた。現実問題としてその頻度は高いものではないが毎年毎年の感作の蓄積がアナフィラキシーの下地を作ることになる。Th2 応答に偏った現行スプリットのワクチンの剤型に根本的な問題があり現在のスプリットワクチン以外に経鼻弱毒生ワクチン、経皮ワクチンの申請が提出され 2017/18 シーズンには使用できる可能性が出てきた。個々のワクチンの性状、メリット、デメリットを考えワクチンを選択できるようになる。

## 文 献

- 1) CDC. Prevention and control of influenza : recommendations of Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), MMWR 2008 ; 57 : 1-60.
- 2) Kilbourne ED. A race with evolution : a history of influenza vaccines. In History of vaccine development. Edited by Plotkin SA. Springer, New York Dordrecht Heidelberg London, pp137-144, 2011.
- 3) 福見秀雄. 開会の弁. インフルエンザワクチン研究会 Vol. 1. 1961年(第1回)~1970年(第9回) 細菌製剤協会 pp1-2.
- 4) CDC. Influenza activity – United States, 2012-13 season and composition of the 2013-14 influenza vaccine. MMWR 2013 ; 62 : 473-479.

- 5) Osterholm MT, Kelley NS, Sommer A, et al. Efficacy and effectiveness of influenza vaccines : a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2012 ; **12** : 36-44.
- 6) Aoshi T, Koyama S, Kobiyama K, et al. Innate and adaptive immune responses to viral infection and vaccination. *Curr Opin Virol* 2011 ; **1** : 226-232.
- 7) Ichinohe T, Pang IK, Iwasaki A. Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. *Nat Immunol* 2010 ; **11** : 404-410.
- 8) Kumagai T, Nagai K, Okui T, et al. Poor immune responses to influenza vaccination in infants. *Vaccine* 2004 ; **22** : 3404-3410.
- 9) Safety information from Pharmaceuticals and Medical Devices Agency(PMDA), No.294 ; Sep. 2012, [http://www1.mhlw.go.jp/kinkyu/iyaku\\_j/iyaku\\_j/anzenseijy\\_ouhou/294-2.pdf](http://www1.mhlw.go.jp/kinkyu/iyaku_j/iyaku_j/anzenseijy_ouhou/294-2.pdf)
- 10) Woo EJ. Allergic reactions after egg-free recombinant influenza vaccine : reports to the US Vaccine Adverse Event Reporting System. *Clin Infect Dis* 2015 ; **60** : 777-7780.
- 11) Hasegawa H, van Reit E, Kida H. Mucosal immunization and adjuvants. *Curr Top Microbiol Immunol* 2015 ; **386** : 371-380.
- 12) Gorse GJ, Falsey AR, Johnson CM, et al. Safety and immunogenicity of revaccination with reduced dose intradermal and standard dose intramuscular influenza vaccines in adults 18-64 years of age. *Vaccine* 2013 ; **31** : 6034-6040.
- 13) Durando P, Iudici R, Alicino C, et al. Adjuvants and alternative routes of administration towards the development of the ideal influenza vaccine. *Human Vaccines* 2015 ; **7** : DOL ; 10.4161/hv.7.0.14560.
- 14) Kishida N, Fujisaki S, Yokoyama M, et al. Evaluation of influenza virus A/H3N2 and B vaccines on the basis of cross-reactivity of postvaccination human serum antibodies against influenza viruses A/H3N2 and B isolated in MDCK cells and embryonated hen eggs. *Clin Vaccine immunol* 2012 ; **19** : 897-908.
- 15) Milián E, Kamen AA. Current and emerging cell culture manufacturing technologies for influenza vaccines. *Biomed Res Int* 2015 ; **20** : Article ID 504831, [doi.org/10.1155/2015.doi.org/10.1155/2015/504831](http://doi.org/10.1155/2015.doi.org/10.1155/2015/504831).
- 16) Baxter R, Patriarca PA, Ensor K, et al. Evaluation of the safety, reactogenicity and immunogenicity of FluBlok trivalent recombinant baculovirus-expressed hemagglutinin influenza vaccine administered intramuscularly to healthy adults 50-64 years of age. *Vaccine* 2011 ; **29** : 2272-2278.
- 17) Wong SS, Webby RJ. Traditional and new influenza vaccines. *Clin Microbiol Rev* 2013 ; **26** : 476-492.
- 18) Nakayama T, Kumagai T, Ishii KJ, et al. Alum-adjuvanted H5N1 whole virion inactivated vaccine(WIV) enhanced inflammatory cytokine productions. *Vaccine* 2012 ; **30** : 3885-3890.