

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第5分野

健康保持増進・予防医薬品の開発に関する研究

## 粘膜インフルエンザワクチンの実用化に関する研究

所 属 国立感染症研究所感染病理部  
研究者 佐多 徹太郎

### 分担研究者

国立感染症研究所 田村慎一  
国立感染症研究所 板村繁之  
社団法人北里研究所生物製剤研究所 相澤主税  
財団法人阪大微生物病研究会観音寺研究所 東 雍

研究小課題 1. A/Beijing/262/95 (H1N1) ウイルスのヘマグルチニンやノイラミニダーゼを経鼻免疫されたH-2コンジェニックマウスの抗体応答と防御能 (研究者 佐多徹太郎、田村慎一、板村繁之)

### 要旨

A型のH1N1亜型のインフルエンザウイルスA/Beijing/262/95のHA分子に対する免疫応答は、H-2遺伝子によって拘束されており、H-2<sup>b</sup>マウスは低応答性で防御に必要な免疫応答を誘導できないが、同じマウスがNA分子に対しては防御に必要な免疫応答を誘導できる。このことは、現行のHAワクチンにNAを添加することによって、その予防効果を改善出来ることを示唆している。

### 1. 研究目的

本研究は、A/Beijing/262/95 (A/Beijing) (H1N1) ウイルスよりHAとNA分子を精製し、これらをH-2コンジェニックマウスにアジュバントと共に経鼻免疫して、HAあるいはNA分子に対する抗体応答のH-2拘束性を検討した。これによって、現行のHAワクチンにNAを添加した経鼻投与型の新ワクチンが、現行のワクチン効果を改善できる可能性を検討した。

### 2. 研究方法

マウス; B10 のH-2コンジェニックマウス、B10 (H-2<sup>b</sup>)、B10. A (H-2<sup>k</sup>) 及び B10. D2 (H-2<sup>d</sup>) の6週齢、雌マウスをSLCより購入し実験に用いた。A/Beijingウイルス; これらのウイルスは最近ワクチン株として用いられたものであり、発育鶏卵で増やした後、ショ糖の密度勾配遠心法で精製分離された。A/BeijingウイルスのHAとNA分子; HAとNA分子は、ウイルス濃縮液をTriton X-100を用いて溶解し遠心後の上清を、HA 及びNAそれぞれに対するモノクローナル抗体を結合したアフィニティー・カラムに順に入れることによって調整した。免疫; それぞれのH-2コンジェニックマウスの鼻腔内に、0.1、0.3、及び1.0 µgのHA あるいはNA分子をアジュバント(1µg; 0.2%のコレラトキシンを含むそのBサブユニット)と共に初回投与し、4週間後に同じアジュバント併用HA あるいはNA分子(0.3 µg)を追加免疫する二回投与方式を用いた。抗体応答; 追加免疫後2週間目に致死量のウイルスを感染し、その3日後の鼻の洗浄液及び血清の抗体価をELISA法により測定した。ウイルス価; 追加免疫後2週間目に致死量のウイルスを感染し、その3日後の鼻の洗浄液のウイルス価を、MDCK細胞を用いたブラック法により測定した。

### 3. 研究結果

A/BeijingウイルスのHA分子を経鼻免疫したそれぞれのH-2コンジェニックマウスにおける抗HA抗体応答と感染防御効果: A/BeijingのHA分子を経鼻免疫された B10. A (H-2<sup>k</sup>) 及び B10. D2 (H-2<sup>d</sup>) マウスは、一次免疫に用いられたHAの投与量が最も低い0.1µgでも高いレベルの血清の抗HA IgG抗体応答を示し、一方、B10 (H-2<sup>b</sup>) マウスは、一次免疫に用いられたHAの投与量が0.3µgでも全く血清の抗HA IgG抗体応答を示さなかった。また、B10. A (H-2<sup>k</sup>) 及び B10. D2 (H-2<sup>d</sup>) マウスは、一次免疫に用いられたHAの投与量が0.3µgで鼻の洗浄液の抗HA IgA抗体応答を誘導するのに、一方、B10 (H-2<sup>b</sup>) マウスは、一次免疫に用いられたHAの投与量が1.0µgでも全く鼻の洗浄液の抗HA IgA抗体応答を誘導しなかった。従って、B10. A (H-2<sup>k</sup>) 及び B10. D2 (H-2<sup>d</sup>) マウスは、A/BeijingウイルスのHA分子にたいして高応答性であり、B10 (H-2<sup>b</sup>) マウスは低応答性であった。また、A/BeijingのHA分子を経鼻免疫された B10. A (H-2<sup>k</sup>) 及び B10.

D2 (H-2<sup>d</sup>) マウスは、一次免疫に用いられたHAの投与量が最も低い0.1 $\mu$ gでも高いレベルの血清の抗HA IgG抗体応答を示したと相関して、上気道感染に対する統計的に有意の感染防御を示した。一方、B10 (H-2<sup>b</sup>) マウスは、一次免疫に用いられたHAの投与量が1.0 $\mu$ gで初めて血清の抗HA IgG抗体応答を誘導することと相関して、上気道感染に対する統計的に有意の感染防御を、一次免疫に用いられたHAの投与量が1.0 $\mu$ gで示した。この時、鼻の洗浄液の抗HA IgA抗体応答の誘導は感染防御の開始に連動していないように見えた。

A/BeijingウイルスのNA分子を経鼻免疫したそれぞれのH-2コンジェニックマウスにおける抗NA抗体応答と感染防御効果：A/BeijingのNA分子を経鼻免疫された B10.A (H-2<sup>a</sup>) 及び B10.D2 (H-2<sup>d</sup>) マウスは、一次免疫に用いられたNAの投与量が最も低い0.1 $\mu$ gでも比較的高いレベルの血清の抗HA IgG抗体応答を示し、その応答は投与量の増加に伴って増加した。一方、B10 (H-2<sup>b</sup>) マウスは、一次免疫に用いられたHAの投与量が0.1 $\mu$ gで比較的高いレベルの血清の抗HA IgG抗体応答を示したが、その応答は投与量が増加しても全く変らなかった。また、このことは、鼻の洗浄液の抗HA IgA抗体応答についても同じように認められた。従って、B10.A (H-2<sup>a</sup>) 及び B10.D2 (H-2<sup>d</sup>) マウスは、A/BeijingウイルスのNA分子にたいして高応答性であり、B10 (H-2<sup>b</sup>) マウスは低応答性であった。また、A/BeijingのNA分子を経鼻免疫された B10.A (H-2<sup>a</sup>)、B10.D2 (H-2<sup>d</sup>) 及びB10 (H-2<sup>b</sup>) マウスは、一次免疫に用いられたNAの投与量が最も低い0.1 $\mu$ gでも比較的高いレベルの鼻の洗浄液の抗HA IgA抗体応答及び血清の抗HA IgG抗体応答を誘導することと相関して、上気道感染に対する統計的に有意の感染防御を示した。

#### 4. 考察

以上の結果により、A/BeijingウイルスのHA分子に対してB10.A (H-2<sup>a</sup>) 及び B10.D2 (H-2<sup>d</sup>) マウスは高応答性であり、B10 (H-2<sup>b</sup>) マウスは低応答性であった。また、この時の血清の抗HA IgG抗体応答と相関して感染防御が認められたが、B10 (H-2<sup>b</sup>) マウスで感染防御が成立するには、一次免疫に用いられるHAの投与量が10.A (H-2<sup>a</sup>) 及び B10.D2 (H-2<sup>d</sup>) マウスの場合の十倍量を必要とした。一方、A/BeijingのNA分子に対しても、B10.A (H-2<sup>a</sup>) 及び B10.D2 (H-2<sup>d</sup>) マウスは高応答性であり、B10 (H-2<sup>b</sup>) マウスは低応答性であった。しかしながら、一次免疫に用いられたNAの投与量が最も低い0.1 $\mu$ gでも比較的高いレベルの鼻の洗浄液及び血清の抗NA抗体応答を誘導することと相関して、0.1 $\mu$ gのNA分子を経鼻免疫された B10.A (H-2<sup>a</sup>)、B10.D2 (H-2<sup>d</sup>) 及びB10 (H-2<sup>b</sup>) マウスにおいて、上気道感染に対する統計的に有意の感染防御が認められた。これらの結果は、A/BeijingウイルスのHA分子及びNA分子に対する応答性がH-2遺伝子によって拘束されていることを示唆している。

A/Beijing (H1N1) ウイルスのHA分子に対して、B10 (H-2<sup>b</sup>) マウスは、B10.A (H-2<sup>a</sup>) 及び B10.D2 (H-2<sup>d</sup>) マウスよりも10倍量の投与量がないと感染防御に必要な血清の抗HA IgG抗体応答誘導できないという結果、及び、A/BeijingのNA分子に対してB10.A (H-2<sup>a</sup>) 及びB10.D2 (H-2<sup>d</sup>) ばかりでなくB10 (H-2<sup>b</sup>) マウスも、低投与量で、防御に必要なレベルの血清の抗NA-IgG抗体応答を誘導できるという結果は、既に、A/PR/8/34 (PR8) (H1N1) ウイルスのHA-DNA及びNA-DNAを遺伝子銃を用いて免疫して得られた結果と相関しているように見える。即ち、PR8のHA-DNAを2回免疫したBALB/c (H-2<sup>d</sup>) とC3H (H-2<sup>k</sup>) マウスはPR8の感染に対して防御でき、C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) は防御できなかった。一方、PR8のNA-DNAを2回免疫したBALB/c (H-2<sup>d</sup>)、C3H (H-2<sup>k</sup>)、C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) のどのマウスもPR8の感染に対して防御を示した。これらの結果は、A型のH1N1亜型のインフルエンザウイルスに対する応答性は、亜型内変異ウイルス株の出現に関係なく同じようにH-2遺伝子によって拘束されていることを示唆している。

以上の結果は、A型のH1N1亜型のウイルスのHA分子に対して免疫応答の低いマウスでもNA分子に対しては防御に必要な免疫応答を誘導できることを示唆している。このことは、現行のHAワクチンにNAを添加した経鼻投与型の新ワクチンを開発することによって、現行のワクチンの予防効果を改善出来ることを示唆している。今後更に、A型のH3N2亜型のインフルエンザウイルスやB型のインフルエンザウイルスに対する応答性もH1N1亜型と同じようにH-2遺伝子によって拘束されているかどうか明かにされねばならない。

#### 5. まとめ

A/Beijing (H1N1) ウイルスのHA分子の経鼻免疫によって、B10.A (H-2<sup>a</sup>) 及び B10.D2 (H-2<sup>d</sup>) マウスは低HA投与量でも高いレベルの血清の抗HA IgG抗体応答を誘導し感染防御したが、B10 (H-2<sup>b</sup>) マウスは高HA投与量で初めて抗HA IgG抗体応答を誘導し感染防御した。一方、NA分子の経鼻免疫によって、B10.A (H-

-2<sup>a</sup>)、B10.D2(H-2<sup>d</sup>)及びB10(H-2<sup>b</sup>)マウスのどれもが、低NA投与量でも感染防御に必要なレベルの血清及び鼻洗浄液の抗NA抗体応答を誘導した。これらの結果は、A型のH1N1亜型のウイルスのHA分子に対して免疫応答の低いマウスでもNA分子に対しては防御に必要な免疫応答を誘導できることを示唆している。この事実は、A型のH1N1亜型のウイルスのNAを添加した経鼻投与型の新ワクチンが、現行のワクチンの予防効果を改善出来ることを示唆している。

## 6. 研究発表

Yoshikawa, T., Suzuki, Y., Aizawa, C., Sata, T., Kurata, T., and Tamura, S.-I. Antibody responses and protection against influenza virus infection in H-2 congenic strain of mice immunized intranasally with adjuvant-combined A/Beijing/262/95 (H1N1) virus hemagglutinin or neuraminidase. Vaccine (submitted), 2002.

## 7. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許取得：なし。
- 2) 実用新案登録：なし。
- 3) その他：なし。

研究小課題 2. 変異コレラ毒素併用経鼻インフルエンザワクチンによって誘導される防御免疫応答 (相沢主税)

### 要旨

安全かつ有効なコレラトキシンの変異毒素であるCT112K (AサブユニットのN末から112番目のグルタミン酸をリジンに置換したもの) (0.1 $\mu$ g)を併用した経鼻インフルエンザワクチン(0.1 $\mu$ g)が、4週間後にPR8HAワクチンのみを追加免疫したBALB/cマウスにおいて、インフルエンザの防御にどのように有効な免疫応答を誘導するのかを検討した。その結果、誘導される獲得免疫応答のうち、抗体応答、特に、上気道のIgA抗体応答が、また、下気道ではIgG抗体応答がウイルス感染阻止に最も重要な役割を果たしていること、さらに、上気道のIgA抗体は変異ウイルスに対する交叉反応性が高く、ワクチン株と流行ウイルス株が異なる場合にも感染防御に有効であることが示された。

### 1. 研究目的

これまでの我々の実験から、経鼻インフルエンザワクチンのアジュバントとして、山本らによって報告されたコレラトキシンの変異毒素であるCT112K (AサブユニットのN末から112番目のグルタミン酸をリジンに置換したもの)が安全かつ有効であることが示されている。本研究では、ヒトへの投与を前提として、このCT112K併用インフルエンザワクチンが、マウスにおいて、インフルエンザの防御に有効などのような免疫応答を誘導するかを検討した。

### 2. 研究方法

免疫；BALB/cマウスに、インフルエンザワクチン (H1N1亜型、A/PR/8/34ウイルス由来、最小有効濃度0.1 $\mu$ g) をアジュバント (0.1 $\mu$ g) と共に初回投与し、4週間後に同じA/PR/8/34 (PR8) 由来のHAワクチン (0.1 $\mu$ g) のみを追加する免疫する二回投与方式を用いた。 ウイルス価；追加ワクチン投与後2週間目に致死量のウイルスを感染し、その1-3日の鼻及び肺の洗浄液のウイルス価を、MDC K細胞を用いたブラック法により測定した。 鼻関連粘膜リンパ組織 (NALT) 及び脾臓の抗体産生細胞 (AFC) 数；NALT及び脾臓のリンパ球を取り出し、AFC数をELISPOT法により測定した。 抗体応答；鼻の洗浄液及び血清の抗体ウイルス価をELISA法により測定した。 DTH；惹起抗原を注射後24時間の足跡の腫脹により判定した。 CTL活性；免疫マウスの脾臓のリンパ球を感染細胞存在下で培養し、5日後のリンパ球による<sup>51</sup>Cr標識感染細胞からの<sup>51</sup>Cr放出により測定した。

### 3. 研究結果

免疫条件と感染防御効果；ヒトでの安全性の観点から、最適ワクチン投与条件として、BALB/cマウスに、インフルエンザワクチン (H1N1亜型、A/PR/8/34ウイルス由来、最小有効濃度0.1 $\mu$ g) をア

ジュバント(0.1 $\mu$ g)と共に初回投与し、4週間後に同じA/PR/8/34 (PR8) 由来のHAワクチン(0.1 $\mu$ g)のみを追加免疫した。また、この追加ワクチン投与後2週間目に致死量のウイルスを感染し、その1-3日の鼻及び肺のウイルス価を測定し予防効果を判定した。その結果、この投与方式において、初回投与のみの対照群では鼻で完全なまた肺では部分的な防御がみとめられ、2回投与の実験群では、鼻でも肺でも完全な防御が認められた。しかも、鼻及び肺のウイルス価は、ウイルス感染1日目から検出限界以下になり、防御機構が感染直後にはじまり、感染1日目後には完了していることが示された。次に、このような2回免疫方式でどのような抗体、およびT細胞免疫応答が誘導されるかを検討した。

**抗体応答：**鼻咽頭粘膜関連リンパ組織(NALT)には1回投与7日目に低レベルのIgA、IgG、IgM抗体産生細胞(AFC)が検出され、2回投与5日目には、高いレベルのIgA、IgGと中等度のIgM AFCが検出された。また、脾臓では1回投与7日目に低レベルのIgA、IgG、IgM AFCが検出され、2回投与5日目には高いレベルのIgG、IgMと中等度のIgA AFCが検出された。また、AFCの出現と相関して、1回投与4週目では、低レベルの鼻洗浄液中の抗PR8 HA IgA、血清中の抗PR8 HA IgG抗体応答が誘導された。2回投与2週目では、高いレベルのIgAとIgGが誘導された。即ち、初回免疫により誘導される低レベルの抗体応答は部分的な感染防御能に、また、追加免疫により誘導された高い抗体応答は完全な感染防御と相関していることが示された。

**DTH応答：**1回免疫後7日目にピークの遅延型過敏(DTH) 応答が検出され、2回免疫後3日目にDTH応答が加速誘導されたが、その後チャレンジウイルスを感染した2週目までに応答は低下した。即ち、初回免疫及び追加免疫により誘導されるDTH応答と感染防御能の間に相関性が認められなかった。

**CTL応答：**2回投与後2週目の脾細胞にはCTL誘導能力がなかったが、その脾細胞を培養して5日目の細胞にはウイルス感染群の約半分のメモリーCTL活性が検出された。即ち、チャレンジウイルスを感染した追加免疫後2週目にCTL活性が検出されず、CTLメモリー活性のみ検出されることから、CTL応答と感染防御能の間に相関性が認められなかった。

**交差感染防御：**抗体応答と感染防御とが相関していることが示されたので、両者の相関性をさらに詳細に明らかにするために、感染株と異なるワクチン株をもちいて、この2回免疫方式で免疫した時の交差抗体の出現と交差防御の関連を検討した。その結果、上気道(鼻)では感染株に交叉するIgA抗体が誘導され、これと相関して感染株と同じA型内で強い交叉防御が認められた。一方、下気道(肺)では交叉IgAがほとんど検出されず、交叉防御がほとんど認められなかった。

#### 4. 考察

以上の結果により、CT112K併用ワクチンの2回免疫方式によって、インフルエンザウイルス抗原に対する抗体応答、DTH応答、CTL応答などの獲得免疫応答が誘導されることが示された。これらの応答の中で、抗体応答が、初回免疫よりも2回免疫によって強化される防御機構として、しかも、感染直後から作用し感染1日目後には完了する防御機構として最も重要な役割を果たしていることが考えられた。さらに、上気道でのウイルス感染防御においてIgA抗体応答が、また、下気道においてIgG抗体応答が重要な役割を果たしていることが示された。さらに、ウイルスの侵入門戸である気道粘膜において分泌型IgA抗体の変異ウイルスに対する交叉反応性が高く、ワクチン株と流行ウイルス株が異なる場合にもこのCT112K併用経鼻接種ワクチンの有効性が確認された。

#### 5. まとめ

最小有効濃度(0.1 $\mu$ g)のインフルエンザワクチンとCT112K を共に初回投与し、4週間後にPR8HAワクチン(0.1 $\mu$ g)のみを追加するこの経鼻ワクチンのBALB/cマウスにおける最適投与条件において、誘導される獲得免疫応答のうち、抗体応答、特に、上気道のIgA抗体応答が、また、下気道ではIgG抗体応答がウイルス感染阻止に最も重要な役割を果たしていることが示された。さらに、粘膜のIgA抗体は変異ウイルスに対する交叉反応性が高く、ワクチン株と流行ウイルス株が異なる場合にもこのCT112K併用経鼻インフルエンザワクチンが有効であることが示唆された。

#### 6. 研究発表

Watanabe, I., Yukari, H., Kadowaki, S., Yoshikawa, T., Komase, K., Aizawa, C., Kiyono, H., Takeda, Y., McGhee, J. R., Chiba, J., Sata, T., Kurata, T., and Tamura, S.-I.

Characterization of protective immune responses induced by nasal Influenza vaccine containing mutant cholera toxin as a safe adjuvant (CT112K). Vaccine (submitted), 2002.

## 7. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許取得；なし。
- 2) 実用新案登録；なし。
- 3) その他；なし。

研究小課題 3. ノイラミニダーゼ(NA)の精製・定量の手段としての抗NA抗体の作製(研究者 東 雍)

## 要旨

インフルエンザウイルスA/New Caledonia/20/99(H1N1)及びA/Panama/2007/99(H3N2)の精製ウイルスをプロナーゼ処理してNAを精製し、これを抗原として抗NAモノクローナル抗体の作製を試みた。現在、いくつかのクローンを得て、その性質を検討している。

## 1. 研究目的

現行の皮下接種ワクチンよりも予防効果の高い粘膜投与型インフルエンザワクチンを創製しようとする時、予防効果を高める方策の一つとして、ヘマグルチニンと並んで防御上最も有効な成分であるNAのワクチンへの積極的な添加が考えられる。本研究では、NAの精製・定量の手段として、インフルエンザウイルスA/New Caledonia/20/99(H1N1)及びA/Panama/2007/99(H3N2)よりNAを分離・精製し、これを抗原として抗NAモノクローナル抗体の作製を試みた。

## 2. 研究方法

インフルエンザ NA のワクチン成分としての有効性に関する知見は現在のところ限られている。従って、このことを検討するために、NA の定量系を構築し、次に、精製 NA 蛋白を得るため、大量培養したインフルエンザウイルスを精製し、さらにウイルス粒子から NA を精製する。また、NA は全ウイルス蛋白の 5 % 以下の割合でしか存在しないため、十分な精製蛋白が得られない場合には、遺伝子組換えにより NA を発現、精製する。このようにして得られた NA をアジュバント併用インフルエンザワクチンに添加し、マウスに経鼻投与することにより、有効性と安全性を検討する。また、NA 非添加のワクチンとの比較検討を行うことにより、NA のワクチン成分としての有用性を検証する。

## 3. 研究結果

インフルエンザウイルスの培養：インフルエンザウイルス A/New Caledonia/20/99 (H1N1)、A/Panama/2007/99 (H3N2) の 2 株を発育鶏卵中で培養し、ウイルス画分の精製を行った。

NA の精製：精製ワクチン原液に pronase を添加し、37℃、2.5 時間反応させることにより NA を粒子より切断、遊離させた、その後、100,000g、1 時間遠心し、上清を 20ml まで濃縮後、PBS にて透析した。透析したサンプルをクロロホルム抽出し、ゲル濾過 (Sephacryl S-300HR, 26mm φ × 600mmL, PBS, 3ml/min で展開) により NA の精製を試みた。ゲル濾過した各分画の NA 活性の測定、SDS-PAGE 解析、蛋白定量をそれぞれ行った結果、N1、N2 型それぞれについて約 60kDa の NA が各 1～2 mg 精製できた。ただし、蛋白量当たりの NA 活性は N2 に比べ N1 の方がやや弱い傾向が認められた。

モノクローナル抗体の作製：まず、N2 型 NA のモノクローナル抗体を作製するため、4 週齢、BALB/C マウスに 80 μg の NA を 3 週間隔で 2 回、GERBU アジュバントと共に接種した。さらに 2 週間後 3 回目の接種を行い、血中抗 NA 抗体の上昇を ELISA 法で確認後、脾臓を採取し、ハイブリドーマ作製に供した。その結果、NA 特異的と思われる 8 クローンのハイブリドーマが確認できた。

モノクローナル抗体の性状解析：作製したモノクローナル抗体を使用し、精製ウイルス蛋白との反応性をウエスタンブロッティング法により解析した結果、NA と思われる約 60kDa の蛋白と反応することが確認された。また、これらの抗体とインタクトワクチン原液を 37℃、15 分反応させた後、反応基質を添加し NA 活性の測定を行ったところ、抗体反応を行わないものと比較して 20～40 % 程度の活性の低下が認められたため、作製された抗体はある程度、酵素活性を阻害することが示された。こ

これらのモノクローナル抗体の、イソタイプ及びサブクラスの決定を行ったところ、4クローンは IgM、2クローンは IgG1、残り2クローンは IgG3 であった。これらのうち代表的な2種類のハイブリドーマをマウスに接種し、腹水を採取した後、抗体カラムにて精製を行った。

DNA 免疫によるポリクローナル抗体の作製：NA に対するポリクローナル抗体を作製するため、NA 発現プラスミドを作製した。発現プラスミドは CMV-IE enhancer 及び chicken  $\beta$ -actin promoter の制御下に NA が発現するように構築した。

#### 4. 考察

NA 添加粘膜投与型ワクチンの有効性を検討するため、複数の抗 NA モノクローナル抗体を作製した。これらの抗体は精製ウイルス蛋白とのウエスタンブロッティングにおいて、NA と思われる約 60kDa の蛋白と反応し、また、NA 活性を阻害することより NA に対する抗体であることが確認された。

NA は N1 ~ N9 までの9種類が存在し、この内、人への感染性を有するウイルスは現在のところ、N1 または N2 を持つ。また、同じ N1 型、あるいは N2 型内においてもその抗原性にかなりのバリエーションが存在すると考えられるため、モノクローナル抗体はこれらをすべて認識できないか、認識可能でもそのアフィニティーが抗原ごとに異なる可能性がある。

この点を解決するため、さらにポリクローナル抗体を作製中である。このポリクローナル抗体は、DNA ワクチン免疫後、精製 NA 蛋白でブースターをかけることにより、NA に対してよりアフィニティーが高まることが予測される。これらの抗体を使用することにより、NA の定量系が確立できると思われる。

#### 5. まとめ

NA を添加した粘膜投与型インフルエンザワクチンの開発のために、NA の精製・定量系に使用する抗体の作製を試みた。1) 精製ウイルスから NA 蛋白の精製を行った。2) NA をマウスに接種し、ハイブリドーマを作製、モノクローナル抗体を精製した。3) モノクローナル抗体の性状を解析した。4) DNA ワクチンのためのベクターを構築した。

#### 6. 研究発表

なし

#### 7. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許取得 : なし
- 2) 実用新案登録 : なし
- 3) その他 : なし

---

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第5分野

健康保持増進・予防医薬品の開発に関する研究

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社