

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業：政策創薬総合研究事業
「新型インフルエンザ用ワクチンの有効性・安全性確保に関する研究」
分担研究報告書

新型インフルエンザウイルスに対するワクチンのマウスにおける有効性の検討

分担研究者 森 愛 (神戸市環境保健研究所)

研究要旨 最近の流行の主流である clade2 のウイルスから作製したワクチン株の効果を、マウスを用いて検討した。その結果、これらのワクチン株で作製した Alum 添加ホルマリン不活化全粒子ワクチンが、マウスにおいてホモのウイルスに対する中和抗体を効果的に誘導することが分かった。clade2 ウイルスでの攻撃にも、高い防御効果を示した。一方、clade1 ウイルスによるパンデミックの可能性が消えたわけではないことから、その対策も引き続き必要であることが示された。

A. 研究目的

東アジアから始まった H5N1 高病原性鳥インフルエンザの流行は、中近東、アフリカ、ヨーロッパへも拡大し、終息の見込みがない。現時点では、ヒトの感染は鳥との濃密な接触によるものがほとんどである。しかし、これらのウイルスが変異を起こし、ヒトでパンデミックを起こすことが懸念されており、その対策が急がれている。中でも、新型インフルエンザに対する有効なワクチンの開発と選定は重要である。

平成 18 年度の医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業「新型インフルエンザ用ワクチンの有効性・安全性確保に関する研究」は、clade1 のワクチン株 NIBRG-14 の clade2 ウイルスに対する効果を検討し、clade2 のウイルス感染に対してマウスで防御効果が認められたことを報告した。2006 年以降、ヒトから分離されている流行株は全て clade2 に属しているため、新型ウイルス出現に備え、clade2 ワクチンの効果も検討しておく必要がある。そこで、本研究では 2 種類の clade2 ワクチンの有効性を、マウスを用いて調べた。

A. 研究方法

ワクチン

強毒ウイルスをリバーシジェネティクス法で弱毒化した以下のワクチン株を使用した。

・ rgIN5

A/Indonesia/5/2005 (clade2.1.3) 由来

・ NIBRG-23

A/turkey/Turkey/1/2005 (clade2.2) 由来

これらのウイルスを精製・不活化し、(財) 阪大微生物病研究会から分与されたアルミニウムアジュバント (Alum) と混合して、Alum 添加ホルマリン不活化全粒子ワクチンを作製した。

マウス

BALB/c、メス、8 週齢

投与量・経路

0.1ml (抗原量: 30ug HA/ml、アジュバント: 0.3mg/ml) を皮下接種

免疫・感染実験

3 週間隔で 2 回、それぞれのワクチンを 10 匹の BALB/c マウスに接種した。陰性コ

ントロール群には Alum のみを接種した。その後以下の方法でワクチンの効果を検討した。

- 1) 2 回目の免疫後 12 日目に部分採血により血清を採取し、赤血球凝集阻止 (HI) 試験、中和試験を行った。
- 2) 2 回目の免疫後 2 週目に、各ワクチン群を 5 匹ずつに分け、強毒ウイルス A/Vietnam/JP1203/2004 (VNJP1203/04、clade1) または A/Indonesia/6/2005 (IN6/05、clade2.1.3) を、麻酔下で 20MLD₅₀/10ul 鼻から接種して攻撃した。感染後 2 週間経過観察を行い、体重推移ならびに生残率を調べた。

B. 研究結果と考察

- 1) 免疫後の血中抗体価を、HI 試験、中和試験で測定した (表 1、2)。rgIN5 接種群では、全てのマウスでホモ抗原に対する中和抗体が検出されたが、HI 抗体は 6 匹のみだった。NIBRG-23 接種群では、全てのマウスでホモ抗原に対する中和、HI 両方の抗体が陽性だった。clade2 の別の株を抗原に用いて HI 試験を行ったところ、系統樹上で同じ clade2.2 に属する NIBRG-23 と rgQinghai12 に対する反応は、両ワクチン群とも全く異なっていた。

抗原性の異なる clade1 ウイルスに対して、両群とも HI 抗体は検出されなかった。一方、中和抗体は NIBRG-23 接種群の 3 匹で検出された。HI 試験では、NIBRG-14 ウイルスの HI 抗原としての性質に問題がある可能性を、昨年度の報告でも述べた。しかし、rgIN5 接種群では中和抗体も検出されなかったことと、後の感染実験の結果を考慮すると、これらのマウスでは、実際に clade1 ウイルスに作用する抗体が少ない可能性がある。

全体的に見て、HI 試験においては概ね中和試験よりも感度が低く、上記の通り、抗原の性質による差もあることから、特にへ

テロの抗原に対する評価が困難である。このことから、H5N1 ワクチンの評価には中和試験が必要だと思われる。

- 2) 感染後、約 2 週間体重を測定し、変化を調べた (図 1)。陰性コントロール (Alum 接種) のマウスは、死亡するか、あるいは最終的に回復した個体でも 30%以上の体重減少が認められた。

rgIN5 接種群では、ホモのウイルスである IN6/05 の攻撃に対して体重はほとんど減少せず、全て生残した (A)。NIBRG-23 接種群では、IN6/05 攻撃により 5 匹中 3 匹で約 20%体重減少したが、最終的に回復し、全て生残した (B)。体重減少した 3 匹は IN6/05 に対する HI 抗体および中和抗体が検出限界未満の個体であり、一方、ほとんど減少しなかった 2 匹は、HI 抗体価が 160 と 320、中和抗体価が 1280 と 2560 と高かった。IN6/05 攻撃に対しては、NIBRG-14 ワクチンも NIBRG-23 と同程度の効果があったが (昨年度報告)、その際は抗体価と体重減少に今回のような関連は確認できなかった。

一方、clade1 ウイルスである VNJP1203/04 の攻撃に対し、rgIN5 接種群のうち 2 匹で大幅な体重減少が見られ、観察期間中に死亡した (D)。rgIN5 接種群の残り 3 匹と、全ての NIBRG-23 接種群では一時的に体重が減少したが、最終的に回復して生残した (D、E)。Alum 接種群の生残率 (C、F) からも分かるように、VNJP1203/04 は clade2 ウイルスに比べてマウスにおける病原性が高く、より少量のウイルスで死に至る。検出限界未満の抗体であっても、わずかな量や質の差が clade1 ウイルス攻撃に耐過するか否かに関係しているのかもしれない。

C. 結論

ワクチン株 rgIN5 (clade2.1.3) および

NIBRG-23 (clade2.2) で作製した Alum 添加ホルマリン不活化全粒子ワクチンの効果を、マウスを用いて検討した。その結果、両者ともホモのウイルスに対して高い値の中和抗体を誘導できることが分かった。ウイルス攻撃試験では、IN6/05 (clade2.1.3) に対しては、効果が高かったが、VNJP1203/04 (clade1) の攻撃では一部死亡するマウスもあった。現在、流行の主流は clade2 ウイルスである。しかし、clade1 のヒトへの感染事例が再発し、それによるパンデミックが起こった場合、clade2 ワクチンだけでは十分な効果が得られない可能性も考慮する必要があるかもしれない。

今回は、NIBRG-23 と抗原性が同じ強毒ウイルスでの攻撃実験を実施できなかったため、今後これについても検討する必要がある。

D. 健康危険情報

なし

E. 研究発表

1. 論文発表

・Masaki Imai, Ai Ninomiya, Harumi Minekawa, Tsugunori Notomi, Toru Ishizaki, Phan Van Tu, Nguyen Thi Kim Tien, Masato Tashiro, and Takato Odagiri Rapid diagnosis of H5N1 avian influenza virus infection by newly developed influenza H5 hemagglutinin gene-specific Loop-Mediated Isothermal Amplification method *J.Virol. Method* 141, 173-180, 2007

・Ai Ninomiya, Masaki Imai, Masato Tashiro and Takato Odagiri Inactivated influenza H5N1 whole-virus vaccine with aluminum adjuvant induces homologous and heterologous protective immunities against lethal challenge with highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses in a mouse model. *Vaccine* 25, 3557-3560, 2007

・Ichinohe T, Tamura S, Kawaguchi A, Ninomiya A, Imai M, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Takahashi H, Sawa H, Mitchell WM, Strayer DR, Carter WA, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H. Cross-Protection against H5N1 Influenza Virus Infection Is Afforded by Intranasal Inoculation with Seasonal Trivalent Inactivated Influenza Vaccine. *J Infect Dis.* 2007 Nov 1;196(9):1313-20

・Ichinohe T, Kawaguchi A, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Ninomiya A, Imai M, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Chiba J, Sata T, Kurata T, Hasegawa H. Intranasal immunization with H5N1 vaccine plus Poly I:Poly C(12)U, a Toll-like receptor agonist, protects mice against homologous and heterologous virus challenge. *Microbes Infect.* 2007 Sep;9(11):1333-40.

2. 学会発表

・小田切孝人、小淵正次、影山努、板村繁之、今井正樹、二宮愛、氏家誠、田代真人 2006/07 シーズンのインフルエンザ流行株と平成 19 年度のワクチン株 第 55 回日本ウイルス学会、札幌、10 月 (2007)

・影山努、今井正樹、二宮愛、氏家誠、田代真人、小田切孝人 Real-time RT-PCR 法による H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルス核酸検出系の構築 第 55 回日本ウイルス学会、札幌、10 月 (2007)

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 ワクチン接種マウスの血中HI抗体価

HI抗原 (clade) ^c	接種ワクチン		
	rgIN5	NIBRG-23	Alum
NIBRG-14 (1)	- ^a	-	-
rgIN5 (2.1.3)	4.62±2.15 (6/10) ^b	3.62±2.19 (3/10)	-
NIBRG-23 (2.2)	2.82±1.50 (1/10)	6.62±1.50(10/10)	-
rgQinghai12 (2.2)	3.72±1.62 (5/10)	3.12±1.66 (2/10)	-
rgAnhui1 (2.3.4)	2.92±1.28 (2/10)	4.72±1.69 (8/10)	-

a) “-”は全てのマウスでHI抗体が検出されなかったことを示す(検出限界1:10)

b) GMT(log2)±標準偏差(抗体陽性マウス数/グループ全マウス数)

c) NIBRG-14: A/Vietnam/1194/2004由来ワクチン株

rgQinghai12: A/bar headed goose/Qinghai/12/2005由来ワクチン株

rgAnhui1: A/Anhui/1/2005由来ワクチン株

表2 ワクチン接種マウスの血中中和抗体価

NT抗原 (clade) ^c	接種ワクチン		
	rgIN5	NIBRG-23	Alum
VNJP1203/04 (1)	- ^a	4.62±2.10 (3/10)	-
IN6/05 (2.1.3)	9.12±1.66 (10/10) ^b	6.62±2.97 (6/10)	-
TK12/06 (2.2)	6.22±2.51 (7/10)	10.62±1.00(10/10)	-

a) “-”は全てのマウスでHI抗体が検出されなかったことを示す(検出限界1:20)

b) GMT(log2)±標準偏差(抗体陽性マウス数/グループ全マウス数)

c) TK12/06: 強毒株 A/Turkey/12/2006

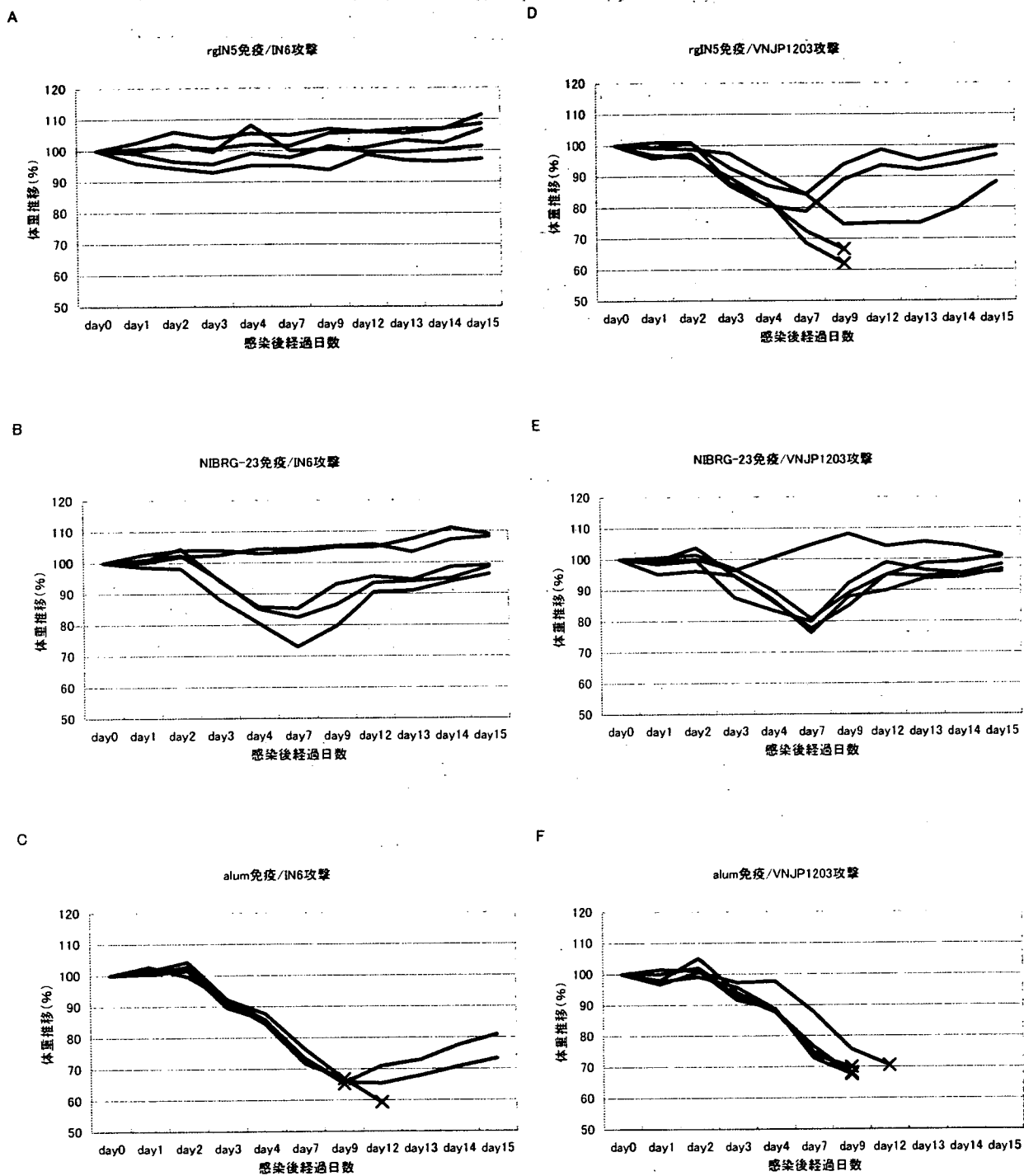


図1 ウイルス感染後のマウス体重推移
 体重の変化を一匹毎に示した。×はマウスが死亡したことを示す。

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業：政策創薬総合研究事業
「新型インフルエンザ用ワクチンの有効性・安全性確保に関する研究」
分担研究報告書

アジュバントによる自然免疫を活用した高病原性鳥インフルエンザの予防法の開発

分担研究者：長谷川秀樹（国立感染症研究所、感染病理部）

協力研究者：一戸猛志、佐多徹太郎（同所、感染病理部）

研究要旨

高病原性トリインフルエンザ H5N1 の家禽での蔓延と、ヒトへの感染が報告され、新型インフルエンザの出現が危惧されている。さらにこのウイルスはインターフェロンの抗ウイルス作用に耐性である事が調べられてきた。しかし、インターフェロン以外の自然免疫による防御機構についてはほとんど調べられていない。本研究において経鼻ワクチンのアジュバントとして有効な Chitin microparticles (CMP) の高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) に対する予防効果をマウスモデルで調べた。CMP 処置した群においては非処置群と比較し有意に生存率が改善された。これらの現象は CMP による粘膜局所での Natural Killer 細胞の活性化や過剰なサイトカインの産生を抑える事により H5N1 ウイルスによる発病を抑える事が示唆された。

A. 研究目的

高病原性トリインフルエンザ H5N1 の蔓延を発端とする新型インフルエンザの出現とヒトからヒトへの感染が脅威となっている。このウイルスはインターフェロンによる抗ウイルス作用に対して耐性を示しておりそれに代わる療法が求められている。そこで本研究においてはインターフェロン以外の自然免疫の誘導による高病原性鳥インフルエンザ (H5N1) の感染防御法の開発を目的とする。

B. 研究方法

材料と方法：

マウス

8 週齢の雌 BALB/c マウス (Japan SLC) を用いた。全ての動物実験は国立感染症研究所動物実験委員会の承認の元行われた。

ウイルス

マウス馴化ウイルスである A/Puerto Rico/8/34 (A/PR8, H1N1) 及び野生株の高病原性鳥インフルエンザウイルス A/Vietnam/1194/04 (VN1194, H5N1) を用いた。

Chitin Microparticles (CMP)

Chitin microparticles (CMP) は P. Strong 博士 (CMP Therapeutics Ltd, Oxford, UK) より提供された。粒子サイズは Christison Particle Technologies 社 (Gateshead, UK) で Model 780 Accusizer を用いて測定し平均粒子サイズは 10 ミクロンであった。CMP は無菌性を確認して用いた。

マウスの CMP 処置

自然免疫誘導物質として CMP (100 μ g) または PBS を感染の 2 もしくは 3 日間経鼻

接種し A/PR8 インフルエンザウイルス (H1N1) 及び高病原性鳥インフルエンザウイルス A/VN/1194(H5N1) の感染を行った。感染 3 日目の鼻腔洗浄液を回収しウイルス価の測定に用いた。

ウイルス価の測定

マウスの各組織でのウイルスの増殖を調べるため、感染後経時的 (3, 5, 8, 10 日) に解剖し前頭葉、三叉神経節、脳幹、頸部リンパ節、脾臓、肝臓、大腸、筋肉、血清、鼻腔洗浄液の組織を回収し、MDCK 細胞を用いたプラークアッセイを行った。

フローサイトメーター

100 μ g の CMP を 3 日間経鼻投与後、頸部リンパ節での Natural Killer 細胞の数をフローサイトメータを用いて測定した。用いた抗体はブロッキングに anti-mouse CD16/32 antibody (eBioscience, San Diego, CA)、続いて FITC-labeled anti-mouse pan-natural killer cell antibody (Dx5, eBioscience), phycoerythrin (PE), そして anti-mouse tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) antibody (N2B2, eBioscience)。サンプルは FACSCalibur, BD Biosciences, San Jose, CA を用いて CELLQuest で解析した。

結果

1、Chitin microparticle (CMP) のインフルエンザウイルス感染予防作用

自然免疫誘導物質のインフルエンザ予防効果を調べるために Chitin microparticles (CMP)、poly(I:C)、LPS を経鼻投与しその後 A/PuertoRico/8/34/ (H1N1) または高病原性鳥インフルエンザウイルス A/Vietnam/1194/2004, (H5N1) を感染させ自然免疫によるその感染予防効果を調べた。

CMP を 3 日間経鼻投与したマウスに A/PR8 (H1N1) インフルエンザウイルスを感染させると鼻腔洗浄液中のウイルス価が部分的ではあるが有意に減少した (図 1)。同様に CMP を 3 日間経鼻投与したマウスに高病原性鳥インフルエンザウイルス A/VN (H5N1) を感染させると鼻腔洗浄液中のウイルス価が著しく減少した (図 1B)。一方で Toll like receptor のリガンドである poly(I:C)、LPS を経鼻投与した群では部分的なウイルス価の減少が認められたただけであった。

Chitin microparticles (CMP) の前投与による致死感染の防御

次に CMP を経鼻投与した後に H1N1 及び H5N1 インフルエンザウイルスの致死感染を行いその防御効果を調べた。CMP を 100 μ g、3 日間経鼻投与しその後 100 PFU (4 LD50) の H1N1 ウイルス 20 μ l を用いて攻撃感染した。CMP 非投与のコントロール群の全てのマウスは感染 9 日目に著しい体重減少と共に死亡した。一方 CMP 投与群においては体重減少は認められたが 15 日目で 60% のマウスの体重が回復しその後少なくとも 40 日目まで生残している (図 2)。また、致死的高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) 感染前に 2 日間 CMP を 100 μ g 経鼻投与した場合コントロール群の比較し著しい症状の改善と 80% の生存を示した。コントロール群の死亡率は 40% であった。

以上の結果から CMP の経鼻投与は H1N1、H5N1 インフルエンザウイルスの致死感染に対して防御効果がある事が示された。

CMP 経鼻投与による頸部リンパ節の Natural Killer 細胞の遊走と tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) の発現

CMP は局所のリンパ節にナチュラルキラ

一細胞(NK細胞)を遊走させることが知られているので本研究におけるCMPによるインフルエンザウイルス防御機構にNK細胞が関係している可能性がある。そこでCMP経鼻投与後の頸部リンパ節でのNK細胞と Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)の発現をFACSを用いて調べた。PBS投与群に比較しCMP投与群において頸部リンパ節でNK細胞が約6倍増加した。また tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)がインフルエンザウイルス感染時のNK細胞で重要な働きをしている [Ishikawa et al., 2005], ことからその発現を調べるとCMP投与群では頸部リンパ節でのTRAIL発現NK足棒がPBS投与群と比較し26倍に増加していた(図3)。これらの結果から局所リンパ節へのTRAIL発現NK細胞の遊走がCMP経鼻投与による感染防御に関連している可能性がある。

D. 考察

本研究において chitin microparticles (CMP) の経鼻投与によって H5N1 インフルエンザウイルスに対して呼吸器での予防効果がある事が示された。我々は以前CMPがインフルエンザワクチンの粘膜アジュバントとして効果がある事を示してきた。今回の結果はCMPが粘膜でインフルエンザウイルスに対する自然免疫を誘導し高病原性鳥インフルエンザウイルスに有効である事を示した。

ウイルス感染におけるNK細胞の重要性はNK細胞を欠損したヒトでウイルス易感染性を示す事から明らかであり、またNK細胞を除去したマウスでインフルエンザウイルスによる死亡率の増加が報告されている。よってCMPの事前投与によりNK細胞が活性化されその後のインフルエンザウイルスの攻撃感染に対してウイルス価を減少させ、症状を緩和し致死的な感染に対して生存率を改

善させたものと考えられる。

E. 結論

Chitin microparticles (CMP) の事前経鼻投与により H1N1 及び H5N1 インフルエンザウイルスの致死的感染を防御し生存率を改善させる事が示された。またその作用機序には局所のリンパ装置へのNK細胞の遊走と TRAIL 発現といった活性化が関与している事が示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

1. Hasegawa H*, Ichinohe T, Tamura S, Kurata T Development of a mucosal vaccine for influenza viruses: preparation for a potential influenza pandemic. Expert Review of Vaccines, April 2007, Vol. 6, No. 2, Pages 193-201.
2. Ichinohe T, Nagata N, Strong P, Tamura SI, Takahashi H, Ninomiya A, Imai M, Odagiri T, Tashiro M, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H*. Prophylactic effects of chitin microparticles (CMP) on highly pathogenic H5N1 influenza virus. J Med Virol. 2007 Jun;79(6):811-819
3. Ichinohe T, Kawaguchi A, Tamura S, Ninomiya A, Imai M, Tamura S, Odagiri T, Tashiro M, Chiba J, Sata T, Kurata T and Hasegawa H*. Intranasal immunization with H5N1 vaccine plus Poly I:Poly C12U, a Toll-like receptor agonist, protects mice against homologous and heterologous virus challenge. Microbes and Infection 2007 Sep;9(11):1333-40.

学会発表

1. Kawaguchi A, Orba Y, Sawa H, Sata T, Hall WW, Hasegawa H, Adult T cell leukemia/lymphoma(ATLL): Exploitation

of transgenic mouse model to understand disease pathogenesis and for the development of rational therapeutics. 13th International Conference on Human Retrovirology 21th-25th May 2008 Hakone

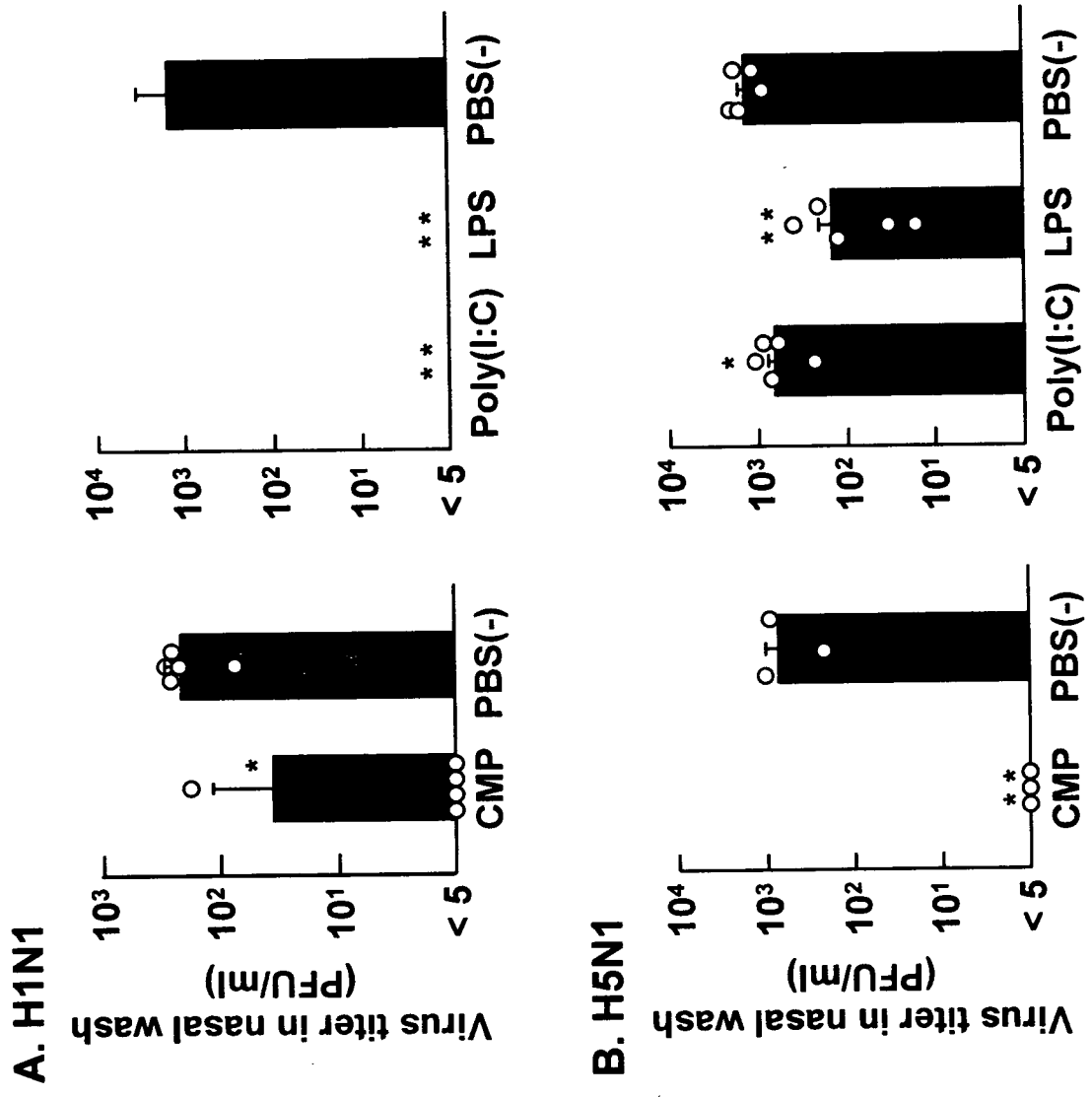
2. 長谷川秀樹、一戸猛志、田村慎一、板村繁之、小田切孝人、田代真人、佐多徹太郎、倉田毅 2005/2006 シーズナルインフルエンザワクチンの経鼻接種による高病原性鳥インフルエンザウイルス

(H5N1)感染の交叉防御効果の検討 第11回日本ワクチン学会学術集会(2007年11月横浜)

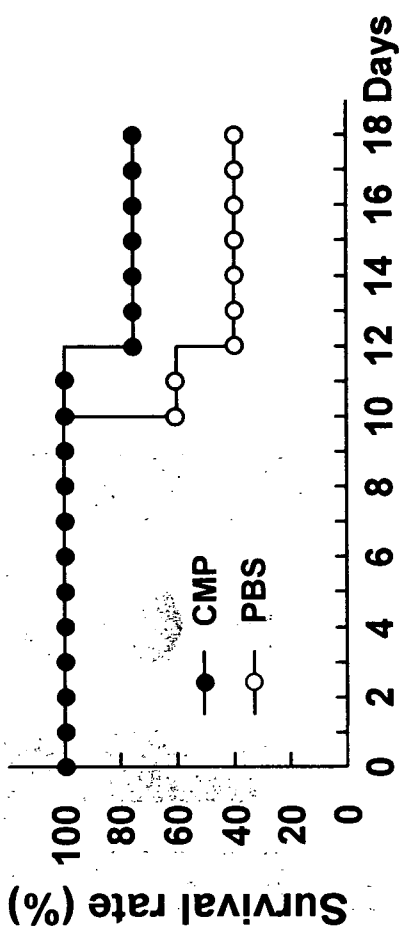
H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得(出願)
なし
2. 実用新案登録
なし

图1

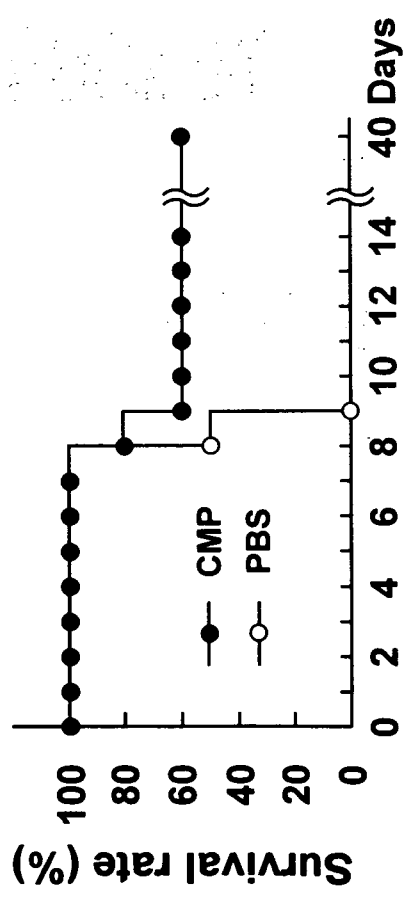


C



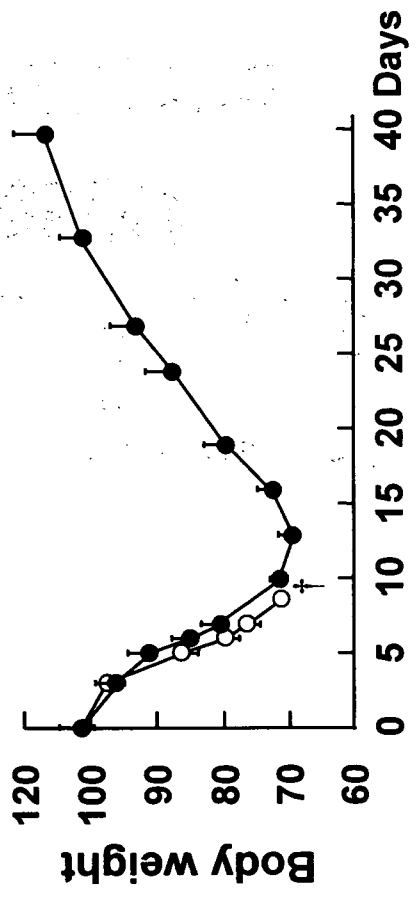
Days after VN1194 challenge

A



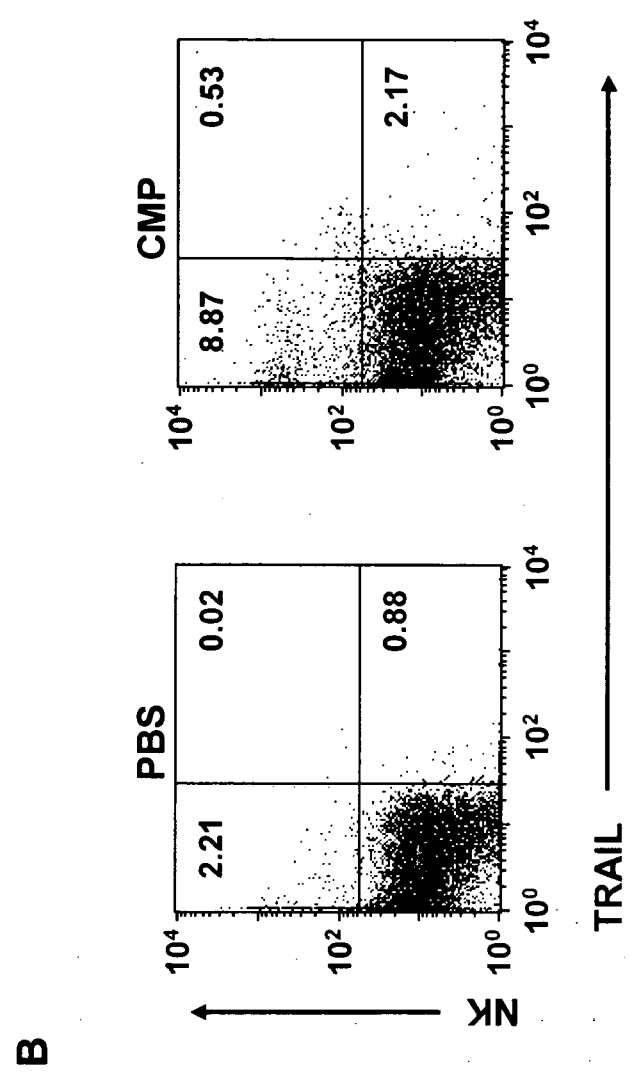
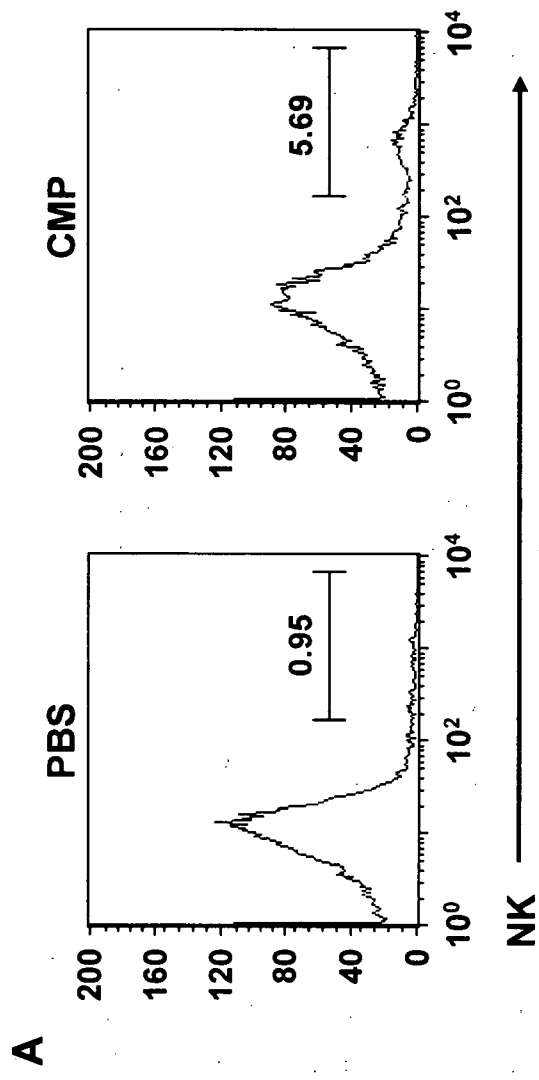
Days after A/PR8 challenge

B



Days after A/PR8 challenge

3



平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業：政策創薬総合研究事業
「新型インフルエンザ用ワクチンの有効性・安全性確保に関する研究」
分担研究報告書

ワクチン有効性評価技術の開発

分担研究者 高橋 宜聖 (国立感染症研究所免疫部)
研究協力者 阿戸 学 (国立感染症研究所免疫部)
小林 和夫 (国立感染症研究所免疫部)
小田切 孝人 (国立感染症研究所ウイルス第3部)
田代 真人 (国立感染症研究所ウイルス第3部)

研究要旨

NIBRG-14 プレパンデミックワクチンが誘導する感染防御抗体は、赤血球凝集阻害 (HI) 活性や中和活性が低く、感染防御能と相関した新たな抗体測定法の開発が必要とされている。本年度の研究では、clade の異なるプレパンデミックワクチン (RG-Indonesia/5) について解析を進めた結果、NIBRG-14 と比べ HI 活性の上昇が認められたものの、従来のワクチンに比べて依然 HI 活性の低いことが明らかとなった。しかし、補体因子 C1q の添加によって、抗血清の中和活性が部分的に増強したことから、プレパンデミックワクチンが誘導する感染防御抗体価の正確な測定には、C1q の添加が有効となる可能性が示唆された。さらに、抗ノイラミニダーゼ (NA) 抗体が感染防御に寄与する可能性を考慮し、抗 NA 抗体を高感度で定量する ELISA 法を確立した。

A. 研究目的

NIBRG-14 プレパンデミックワクチンをモデル動物へ接種すると、HI 活性や中和活性の低い感染防御抗体が誘導される。本研究では、もう一つの国家備蓄プレパンデミックワクチン (RG-Indonesia/5) でも同様な現象が認められるか否か確認するとともに、その原因メカニズムを解明し、プレパンデミックワクチンが誘導する感染防御抗体のより正確かつ高感度な測定法を開発する。

B. 研究方法

(1) 不活化全粒子ワクチンの調製とマウスへの接種

リバースジェネティクスによりヘマグルチニン (HA) とノイラミニダーゼ (NA) 以外を A/Puerto Rico/8/34(H1N1; PR8)由来に置き換えた 2 つの H5N1 型ワクチン株 (NIBRG-14、RG-Indonesia/5) を使用した。各ウイルスを発育鶏卵で増幅した後、ショ糖密度勾配遠心法で精製し、0.05%ホルマリンで不活化した。5 μ g HA に相当する不活化全粒子/アラムを BALB/c マウスに 2 回皮下接種した。

(2) バキュロウイルス発現系を用いた組換え

HA/NA タンパクの作製

HA と NA に特異的な抗体を高感度で検出するため、NIBRG-14 と RG-Indonesia/5 の組換え HA (rHA) と組換え NA (rNA) タンパクを作製した。方法として、pBacPAK8 ベクターに His タグを付加した HA、NA cDNA を組み込み、Sf21 昆虫細胞にトランスフェクションして組換えバキュロウイルスを作製した。これを Sf21 細胞に感染させた後、コバルトカラムを用いて組換えタンパクを精製した。精製した組換えタンパク 5 μ g を SDS-PAGE にて分離後、プロモフェノールブルー染色を行い、タンパクの精製度を確認した。

(3) ELISA による HA/NA 特異的な血中抗体価の測定

バキュロウイルス発現系にて作製した組換え HA または NA タンパクを ELISA プレートにコーティングした。1% BSA でブロッキング後、段階希釈したマウス抗血清を加え、HRP 標識した抗マウス IgG1 抗体にて検出した。HRP の基質である OPD を加え、最終的に 450 nm での吸光値を測定した。

(4) HI 抗体価の測定

4 HAU の不活化全粒子ワクチンと段階希釈した抗血清を前培養した後、0.5%鶏赤血球に添加し、赤血球凝集の阻害活性を示す血清希釈率の最大値をグラフに表示した。

(5) フローサイトメトリによるウイルス結合阻害活性の測定

ウイルス粒子の細胞への結合量をフローサートメトリにて定量した。不活化全粒子を Alexa Fluor647 蛍光色素で標識し、4HA に相当する蛍光標識不活化全粒子と 100 倍希釈した非働化抗血清を前培養した後、細胞に添加した。4°C にて 30 分染色後、FACS Vantage にて細胞一個あた

りに結合した Alexa Fluor647 の蛍光色素量を測定した。また、不活化全粒子と抗血清を前培養する際に、精製 C1q タンパクを添加し (最終濃度 10 μ g/ml)、C1q がウイルス結合阻害に与える影響を評価した。

(倫理面への配慮)

全ての実験は国立感染症研究所戸山庁舎高度安全実験施設において、国立感染症研究所病原体等安全管理規程および動物実験委員会規程に従い実施した。

C. 研究結果

(1) rHA、rNA タンパクの作製

NIBRG-14 rHA と同様な手法を用い、RG-Indonesia/5 rHA と NIBRG-14 rNA を作製した。作製したタンパクを SDS-PAGE により解析したところ、予想されるサイズにバンドが現れることを確認した (図 1)。

(2) RG-Indonesia/5 ワクチンが惹起する抗 HA 抗体価と HI 活性の測定

NIBRG-14 ワクチンが惹起する抗 HA 抗体は、HI 活性が従来 of ワクチンに比べて 27 倍以下であることが知られている。この現象が、もう一つのプレパンデミックワクチンである RG-Indonesia/5 にも共通か否か確認するため、RG-Indonesia/5 ワクチンを 2 回皮下接種したマウス抗血清を作製し、抗血清に含まれる抗 HA 抗体価を ELISA により定量した (図 2 左)。すると、同様な手法で作製した NIBRG-14 ワクチンの抗血清に比べ、抗 HA 抗体濃度が 3.6 倍高いことから、NIBRG-14 ワクチンよりも免疫原性に優れている可能性が示唆された。さらに、HI 抗体価を調べたところ、NIBRG-14 ワクチンの抗血清と比べ 5.7 倍の増加が認められたが、

従来のワクチンの HI 抗体価 (960±350) の 4.8 分の 1 であることが明らかとなった (図 2 右)。

(3) 補体の添加によるウイルス結合阻害活性の増強

HI に対するモノクローナル抗体を用いた解析から、ウイルス粒子と HA 特異抗体を前培養する際に Clq を添加すると、抗体の中和活性が増加する例が報告されている。そこで Clq の添加によって、抗 NIBRG-14 抗体のウイルス結合阻害活性が増強されるか否か検証した。方法として、蛍光標識ウイルス粒子と抗血清を培養する際に、Clq を添加して細胞 1 個あたりのウイルス結合量の変化を観察した (図 3)。すると、NIBRG-14 抗血清と蛍光標識 NIBRG-14 粒子を前培養する際に Clq を添加すると、NIBRG-14 粒子の細胞への吸着がより強く抑制されることが判明した。技術的な問題から、本実験では、添加する Clq 濃度が生体内の 10 分の 1 (10 μg/ml) に制限されたため、もしこの濃度を生体内の濃度に近づければ、さらに強い抑制効果が期待できるかもしれない。

(4) rNA を用いた ELISA 法による NA 特異抗体の検出

NIBRG-14 ワクチンをマウスに接種すると、抗 HA 抗体に加え、抗 NA 抗体が産生されることを見いだしている。インフルエンザウイルスに対する防御反応において、抗 HA 抗体は感染そのものを阻害し最も効率的にウイルスを排除する一方で、抗 NA 抗体はウイルスの拡散を防ぎ、症状の軽減に寄与すると推察されている。近年、DNA ワクチン等の手法により、NA に対する抗体が産生されたマウスでは、強毒 H5N1 ウイルス感染に対する生存率が増加する例が報告されている。そこで、抗 HA 抗体価に加え、抗 NA 抗体価を定量することによって、プレパンデミ

ックワクチンの有効性をより正確に評価するため、抗 NA 抗体価を高感度で検出する ELISA 法の開発を試みた。図 1 で精製した NIBRG-14 rNA を検出抗原として ELISA を行ったところ、NIBRG-14 ワクチンの抗血清を 10,000 倍以上希釈してもシグナルが検出可能であることが明らかとなった (図 4)。この結果から、rNA を用いた ELISA 法は特異抗体を非常に高感度で検出可能であることが明らかとなった。

D. 考察

インフルエンザワクチンが惹起する感染防御抗体の主な作用機構として、ウイルス表面の HA 分子に結合して細胞レセプターへの結合を阻害することが挙げられる。しかし、これとは異なる機構の存在も数多く報告されており、実際の作用機構はウイルスと宿主細胞の種類や感染条件により大きく左右される。昨年度の結果から、NIBRG-14 プレパンデミックワクチンが誘導する抗 HA 抗体は、ウイルス粒子の細胞レセプターへの結合を阻害する機能が著しく低く、これが HI 試験や中和試験で検出困難となる主要因であると判断した。さらに本年度の結果から、RG-Indonesia/5 プレパンデミックワクチンでも、同様な現象が起きている可能性が高い。

では、プレパンデミックワクチンが惹起する感染防御抗体は、生体内においてどのようにウイルス中和を行っているのだろうか？図 3 の結果から、生体内でおこるウイルス中和は、補体因子 Clq を必要とする可能性が示唆された。古典的補体経路において、Clq はヘテロ 3 量体が 6 つ会合した複合体 (460 kDa) を形成して抗原-抗体複合体に結合することが知られている。そのため、HA に結合する抗体がシアル酸結合部位を直接認識できなかつた場合でも、抗体に結

合した巨大な Clq 複合体により、物理的に HA とシアル酸との結合を阻害することが可能となる。この可能性については、今後 Clq 欠損マウス等を用いた解析により詳細に検証する必要がある。

また、別の可能性として抗 NA 抗体の感染防御への関与も考えられる。実際、NIBRG-14 ワクチンをマウスに接種すると、抗 NA 抗体が産生されることを見いだしているが、ワクチン接種により産生された抗 NA 抗体価が、抗 HA 抗体の存在下でも感染防御に関与するか否かについては、今後慎重に検証する可能性がある。

通常の不活化インフルエンザワクチンでは、中和試験で測定した中和抗体価と感染防御抗体価が相関するため、中和抗体価の増加を指標としてワクチン効果が判定されてきた。しかし、プレパンデミックワクチンにより惹起される感染防御抗体の評価には、従来の中和試験とは異なる新たな指標の導入が必要と考えられる。今後、Clq を利用することによって、HI 試験や中和試験の改良が可能かどうか検証する必要がある。さらに、抗 HA 抗体価と抗 NA 抗体価に着目した評価法が、プレパンデミックワクチン有効性の改善に繋がるかどうか検証する必要がある。

E. 結論

プレパンデミックワクチン (NIBRG-14、RG-Indonesia/5) が誘導する中和抗体の正確な測定には、Clq が必要となる可能性が示唆された。抗 NA 抗の高感度検出法を開発することに成功し、抗 HA 抗体価と抗 NA 抗体価の両方に着目したワクチン有効性の評価が可能となった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Takahashi, Y. Memory B cells in systemic and mucosal immune response; Implications for successful vaccination. *Biosci. Biotech. Biochem.* 71:2358-2366, 2007

2. 学会発表

[国内学会発表]

(第37回日本免疫学会、東京、2007年11月)

- (1) 高橋宜聖、阿戸学、小林和夫「H5N1インフルエンザワクチンが惹起する防御抗体はウイルス中和に補体因子を必要とする」
- (2) Umeda, Y., Akema, Y., Kuraoka, M., Takahashi, Y., Yamada, K., Tsuji, N.M., Kouro, T., Totsuka, M., Takatsu, K., Kaminogawa, S., Sato, R., Hachimura, S. 「Intestinal CD3-IL-2R+ cells respond to poly I:C stimuli and influenza virus infection.」
- (3) 加地友弘、高橋宜聖、竹森利忠「IgG1メモリーB細胞産生における転写因子制御機序の解析」
(第55回日本ウイルス学会、札幌、2007年10月)
- (4) 高橋宜聖、阿戸学、北原玄太、二宮愛、小田切孝人、田代真人、小林和夫「H5N1型プレパンデミックワクチンによる感染防御メカニズムの解析」

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)
なし

図1 バキュロウイルス発現系による rHA、rNA タンパクの作製

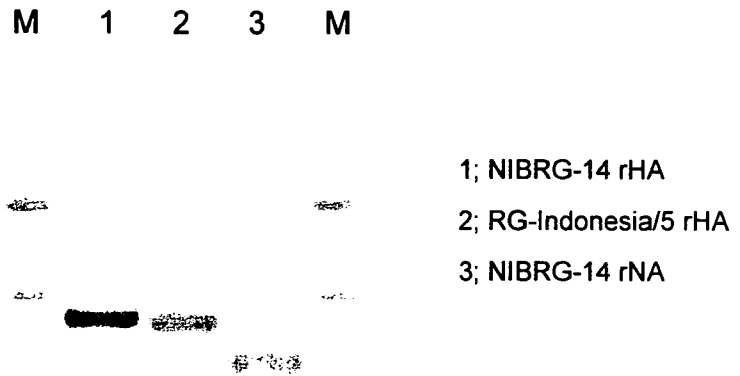


図2 NIBRG-14 ワクチンと RG-Indonesia/5 ワクチンが惹起する抗 HA 抗体価と HI 活性の比較

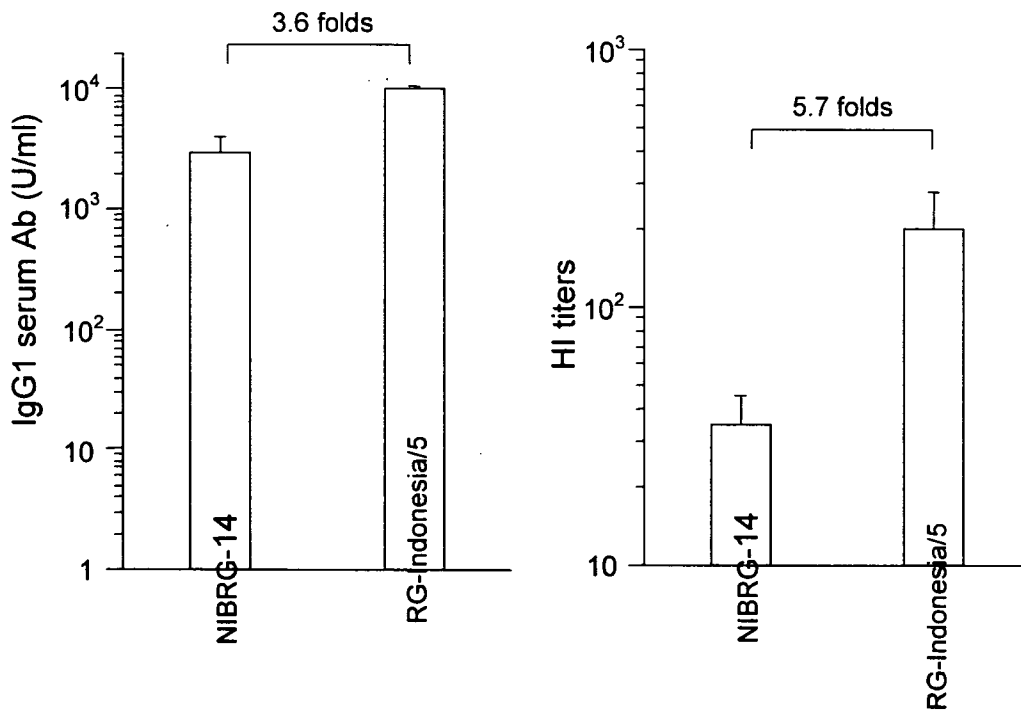


図3 C1q は抗 NIBRG-14 抗体のウイルス付着阻害活性を部分的に増強する

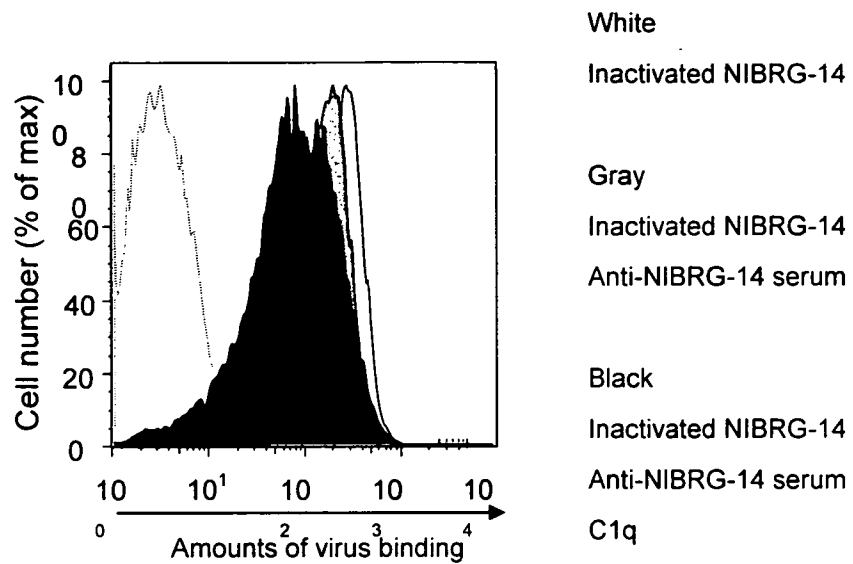
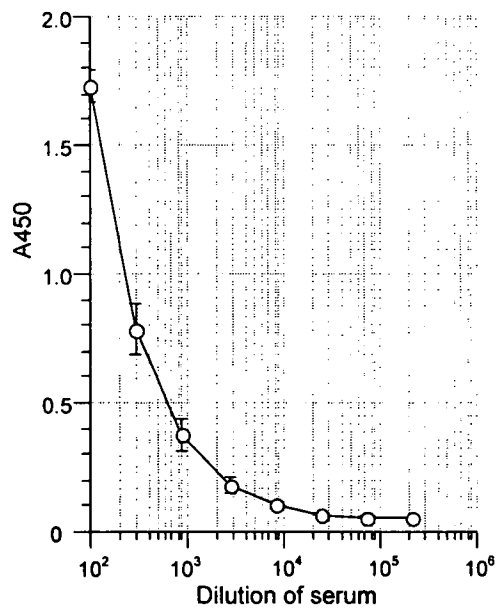


図4 rNA を用いた ELISA による抗 NA 抗体測定技術の開発



平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業：政策創薬総合研究事業
「新型インフルエンザ用ワクチンの有効性・安全性確保に関する研究」
分担研究報告書

新型インフルエンザ用ワクチンの有効性・安全性確保に関する研究

研究者 河岡義裕 東京大学 医科学研究所 教授

研究要旨： 新型インフルエンザの不活化ワクチンを作製するためのシードウイルスは、ヒトでのワクチン作製が許可されている Vero 細胞や MDCK 細胞などを用いて作らなければならない。しかし、イヌ腎臓由来の MDCK 細胞では、従来のヒト RNA ポリメラーゼ I (PolI) プロモーターを用いたリバーシジェネティクス系ではプロモーター活性の種特異性が障害となり効率よくシードウイルスが作製できない。そこで本研究では、イヌ PolI プロモーター領域をクローニングし、イヌ PolI プロモーターを用いたリバーシジェネティクス系を確立した。さらに、この系により、MDCK 細胞を用いた H5N1 ワクチンシードウイルスの効率的な作製に成功した。

A. 研究目的

新型ウイルスによる新たなパンデミックが発生した場合、ワクチンの迅速な製造が要求される。不活化ワクチンを作製するためのシードウイルスは、ヒトでのワクチン作製が認可されている細胞、例えば Vero 細胞あるいは MDCK 細胞を用いる必要がある。しかし Vero 細胞ではトランスフェクション効率が低いため、シードウイルス作製効率も低い。一方、MDCK 細胞では、従来のヒト RNA ポリメラーゼ I(PolI)プロモーターを用いたリバーシジェネティクス系ではプロモーター活性の種特異性が障害となり効率よくシードウイルスが作製できない。そこで、MDCK 細胞で効率よくワクチンシードウイルスを作製する系の確立を目的として、本研究を行った。

B. 研究方法

動物種間で保存されていると推定される PolI 転写開始点付近の塩基配列をもとに、イヌ PolI 転写開始点をイヌゲノムデータベース上から検索した。推定した転写開始点から上流領域を MDCK 細胞のゲノム DNA からクローニングし、マウス PolI ターミナー配列を持つプラスミドに組み込み(pPolIC)、

MDCK 細胞におけるそのプロモーター活性をルシフェラーゼアッセイで調べた。さらに A/Puerto Rico/8/34 (PR8, H1N1)由来の 8 遺伝子および A/Vietnam/1194/04 (VN1194, H5N1)由来の弱毒改変型 HA、NA 遺伝子を pPolIC プラスミドに組み込み、MDCK 細胞から野生型 PR8 および PR8/H5N1 6:2 reassortant が作成可能かを調べた。

C. 研究結果

イヌゲノム(GenBank No. NW_87894)上で推定される配列をもとに、MDCK 細胞 DNA から PolI プロモーター領域を PCR クローニングした。MDCK 細胞において、そのプロモーター活性を測定したところ、ヒト PolI プロモーターよりも有意に高い値を示した。そこでイヌ PolI プロモーターを用いたリバーシジェネティクス系を構築したところ、野生型 PR8 が効率よくレスキューされた。さらにワクチンシードウイルス(PR8/H5N1 6:2 reassortant)も効率よく作製された。

D. 考察

イヌ PolI プロモーターを用いたリバーシジェネティクス系が確立された。この系を用いることで、MDCK 細胞から H5N1 ワクチ

ンシードウイルスを効率よく作製することが出来る。

E. 結論

本研究で作製したイヌ PolI プロモーターを用いたインフルエンザリバースジェネティクス系は、今後のワクチン開発に役立つと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Horimoto T, Murakami S, Muramoto Y, Yamada S, Fujii K, Kiso M, Iwatsuki-Horimoto K, Kino Y, Kawaoka Y. Enhanced growth of seed viruses for H5N1 influenza vaccines. **Virology** 366:23-27, 2007.

Hatta M, Hatta Y, Kim JH, Watanabe S, Shinya K, Kawaoka Y. Growth of H5N1 influenza A viruses in the upper respiratory tracts of mice **PLoS Patho** 3:1374-1379, 2007.

Rigoni M, Shinya K, Toffan A, Milani A, Bettini F, Kawaoka Y, Cattoli G, Capua I. Pneumo- and eurotropism of avian origin Italian highly pathogenic avian influenza H7N1 isolates in experimentally infected mice. **Virology** 364, 28-35, 2007.

Shinya K, Watanabe S, Ito T, Kasai N, Kawaoka Y. Adaptation of an H7N7 equine influenza A virus in mice. **J Gen Virol** 88, 547-532, 2007.

Zhu Q, Yang H, Deng G, Yu K, Bu Z, Kawaoka Y, Chen H. A naturally occurring deletion in its NS gene contributes to attenuation of an H5N1 swine influenza virus in chickens. **J Virol** 82:220-228, 2008.

Jiao P, Tian G, Li Y, Liu C, Liu W, Deng G, Guan Y, Bu Z, Kawaoka Y, Chen H. A single amino acid substitution in the NS1 protein changes the pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in mice. **J Virol** (in press).

2. 学会発表

村上晋、堀本泰介、河岡義裕「イヌ RNA ポリメラーゼ I プロモーターを用いたインフルエンザリバースジェネティクス系の確立と H5N1 ワクチンシードウイルスの作製」第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2007 年 10 月

G. 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