

Table 2. Antigenic properties of clade 2.3.4 H5N1 viruses

REFERENCE ANTIGENS	CLADE	2.1		2.2	2.3.4		2.3.4	2.3.4	
		VN/1203	Indo/5		cm/HK	jwe/HK			ck/HK
A/VIETNAM/1203/2004	1	320	40	<40	160	80	<40	<40	
A/INDONESIA/5/2005	2.1	40	1280	160	160	<40	<40	<40	
A/COMMON MAGPIE/HK/645/06	2.3.4	80	40	<40	320	80	<40	<40	
A/JAPANESE/WHITE EYE/HK/1038/2006	2.3.4	80	320	80	2560	5120	<40	<40	
TEST ANTIGENS									
A/FALCON/HK/2142/2008	2.3.4	160	40	<40	80	<40	80	80	
A/CHICKEN/HK/API56/2008	2.3.4	<40	40	<40	<40	<40	<40	80	
A/CHICKEN/HK/8825.2/2008	2.3.4	<40	<40	<40	<40	<40	<40	10	

Table 3. Status of H5N1 vaccine virus development as of February 2009

Reassortants with completed regulatory approval

Virus	Clade	Institution*	Availability
A/Cambodia/R0405050/2007	1	NIBSC	Yes
A/Viet Nam/1194/2004	1	NIBSC	Yes
A/Viet Nam/1203/2004	1	CDC and SJ/HKU/NIAID	Yes
A/duck/Hunan/795/2002	2.1	SJ/HKU/NIAID	Yes
A/Indonesia/5/2005	2.1	CDC	Requires Indonesian Government permission
A/bar-headed goose/Qinghai/1A/2005	2.2	SJ/HKU/NIAID	Yes
A/turkey/Turkey/1/2005	2.2	NIBSC	Yes
A/whooper swan/Mongolia/244/2005	2.2	SJ/NIAID	Yes
A/Anhui/1/2005	2.3.4	CDC	Yes
A/duck/Laos/3295/2006	2.3.4	FDA	Yes
A/Japanese white-eye/Hong Kong/1038/2006	2.3.4	SJ/HKU/NIAID	Yes
A/goose/Guiyang/337/2006	4	SJ/HKU/NIAID	Yes

Reassortants prepared and awaiting regulatory approval

Virus	Clade	Institution*	Availability
A/chicken/India/NIV33487/2006	2.2	CDC/NIV	Pending
A/Egypt/2321/2007-like	2.2	CDC	Pending
A/Egypt/3300-NAMRU3/2008	2.2	CDC	Pending
A/common magpie/Hong Kong/5052/2007	2.3.2	SJ/HKU/NIAID	Pending
A/chicken/Viet Nam/NCVD-016/2008-like	7	CDC	Pending

Viruses proposed by WHO for candidate vaccine preparation

Virus	Clade	Institution*
A/chicken/Hong Kong/AP156/2008-like	2.3.4	SJ/HKU/NIAID
A/chicken/Vietnam/NCDV-03/2008	7	CDC

* CDC- Centers for Disease Control and Prevention, USA
 FDA- Food and Drug Administration, USA
 NIAID- National Institute of Allergy and Infectious Disease, NIH, USA
 NIBSC- National Institute for Biological Standards and Control, UK
 NIV- National Institute of Virology, India
 SJ- St Jude Children's Research Hospital, USA
 HKU-University of Hong Kong, Hong Kong SAR China

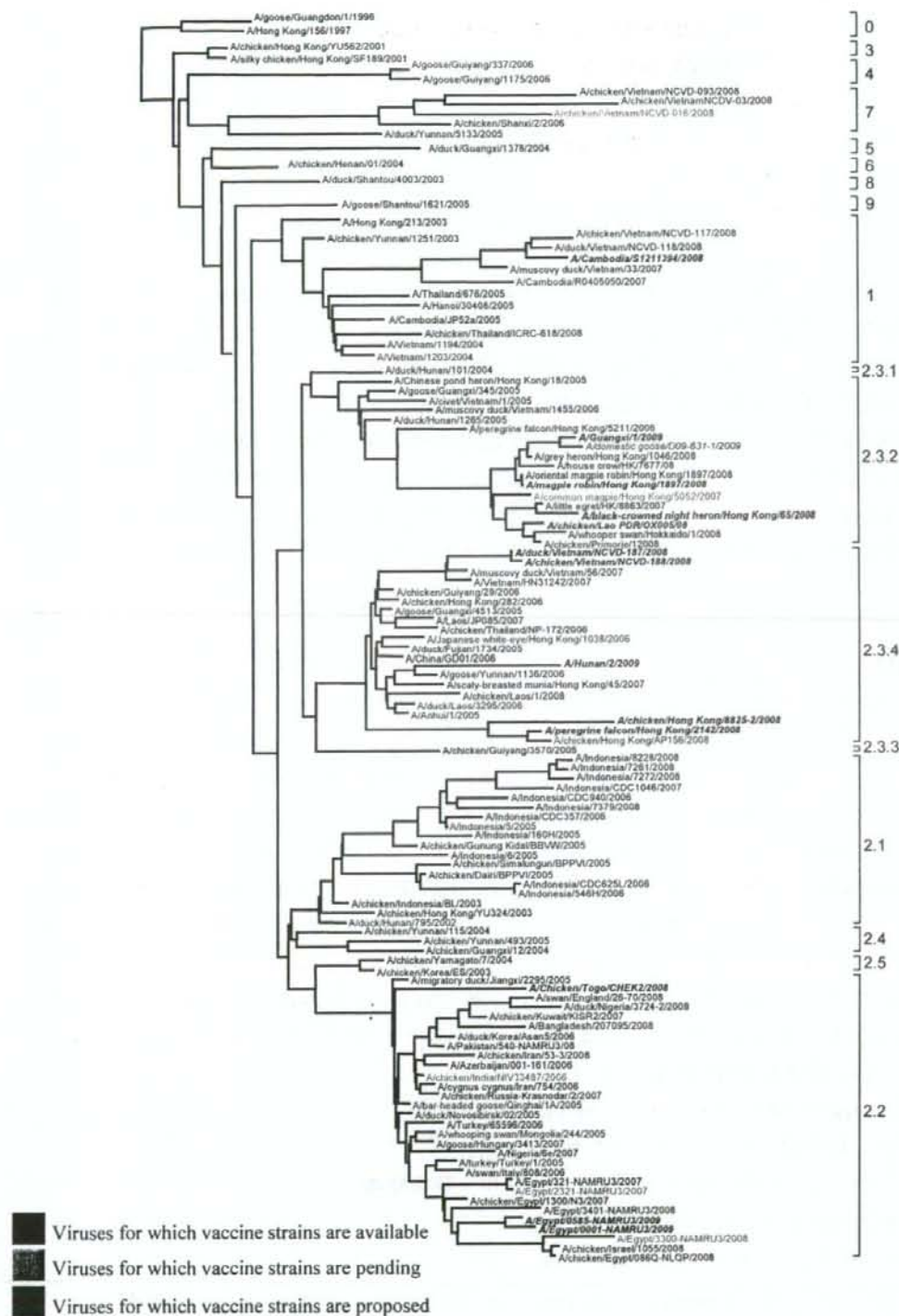


Figure 1. Phylogenetic relationships of H5N1 viruses showing availability of vaccine strains. We gratefully acknowledge the contributions of the originating laboratories and countries that have provided samples and/or submitted sequence data to DDBJ, EMBL-Bank, GenBank, GISAID and other public databases. Recent viruses (where date of isolation known) are shown in italics.

研究分担者 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ウイルスがパンデミックを起こした場合、不活化ワクチンの製造基材である発育鶏卵の不足が予測される。そのため培養細胞を用いた H5 ワクチンの作製を考慮しておく必要がある。ウイルス増殖性に優れる MDCK 細胞は新たな製造基材としての実用化が目指されている。またこれまでの臨床試験で H5 ワクチンはヒトに対し免疫原性が低いことが明らかにされており、防御免疫賦活に必要なウイルス抗原量を獲得するには、季節性ワクチンよりも多量の抗原が必要となる。したがって効率よく大量のワクチンを作製するためには、MDCK 細胞で良く増殖するシードウイルスを選択する必要がある。そこでシードウイルスの HA/NA バランスを変えて、MDCK 細胞で良く増殖する NA を検索した。その結果、ストーク領域が長い NA を持たせることで、ウイルス増殖性が有意に向上した。

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、鶏の殺処分や卵の移動制限等により、不活化ワクチンの製造基材である発育鶏卵が不足する可能性が高い。そこで発育鶏卵に替わる製造基材として培養細胞を用いたワクチン製造が重要となる。MDCK 細胞はインフルエンザウイルス増殖性に優れるために有力な製造基材候補である。また臨床試験の成績から、H5 ワクチンはヒトに対し免疫原性が低いことが明らかにされており、防御免疫賦活に必要なウイルス抗原量を獲得するには、季節性ワクチンよりも多量の抗原が必要となる。したがって効率よく大量のワクチンを作製するためには、MDCK 細胞で良く増殖するシードウイルスを選択する必要がある。ウイルスの増殖性には HA/NA バランスが重要であることがわかっている。そこで NA を変えて、MDCK 細胞での増殖に適した HA と NA の組み合わせを決定することを目的として、本研究を行った。

B. 研究方法

まず HA、NA を A/Vietnam/1194/04 (VN1194, H5N1) 由来、あるいは A/Vietnam/1203/04

(VN1203, H5N1)由来としたワクチンシードウイルスの PR8/H5N1 6:2 reassortant(PR8/VN1194/あるいは PR8/VN1203)を作製した。つぎに MDCK 細胞での増殖適した HA/NA バランスを決定するために、他のウイルス (PR8, A/WSN/33, A/Kanagawa/173/03, A/Hong Kong/213/03)由来の N1NA や VN1203 由来 NA のストーク領域を長くした NA (VN1203Fill) と置き換えて 6:1:1 reassortant を作製し、PR8/VN1194 あるいは PR8/VN1203 よりも有意に良く増殖するウイルスをブランクのサイズやウイルス力価を指標として検討した。

C. 研究結果

ブランクサイズによる検討では、ストーク領域が長い A/Hong Kong/213/03 由来の NA および VN1203FillNA をもった 6:1:1 reassortant のブランクサイズが PR8/VN1194 あるいは PR8/VN1203 よりも有意に大きかった。またウイルス力価も有意に高かった。

D. 考察

H5N1 ワクチンシードウイルスの MDCK 細胞での増殖性は、HA/NA 機能バランスを変えることで向上可能であることがわかった。

E. 結論

これらの知見は、MDCK 細胞でのワクチン製造効率の向上に貢献すると期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

Murakami S, Horimoto T, Mai le Q, Nidom CA, Chen H, Muramoto Y, Yamada S, Iwasa A, Iwatsuki-Horimoto K, Shimojima M, Iwata A, Kawaoka Y. Growth determinants for H5N1 influenza vaccine seed viruses in MDCK cells. J Virol. 2008 Nov;82(21):10502-9.

2. 学会発表

Shin Murakami, Taisuke Horimoto, Yukiko Muramoto, Shinya Yamada, Ayaka Iwasa, Kiyoko Iwatsuki-Horimoto, Masayuki Shimojima, Akira Iwata, and Yoshihiro Kawaoka. Growth determinants for H5N1 influenza vaccine seed viruses in MDCK cells. IUMS2008. Istanbul, Turkey, Aug. 2008.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

平成 20 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」

分担研究年度終了報告書

新型インフルエンザワクチン製造用 LLC-MK2 細胞の有用性に関する研究 3

研究分担者 影山 努 国立感染症研究所ウイルス第 3 部

協力研究者 白倉雅之 国立感染症研究所ウイルス第 3 部

岸田典子 国立感染症研究所ウイルス第 3 部

研究要旨 これまでの本研究では、LLC-MK2 細胞を用いたリバースジェネティクス (RG) 法により、A/H5 亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスから弱毒化ワクチン株を作製できるだけでなく、A/H3 亜型ヒトインフルエンザウイルス、A/H6 亜型トリインフルエンザウイルス、A/H7 亜型トリインフルエンザウイルス、A/H9 亜型トリインフルエンザウイルスや B 型インフルエンザウイルスからもリアソータントウイルスを作製できる事を明らかにしてきた。本年度は、LLC-MK2 細胞を用いた細胞培養により、ウイルスの大量培養ができるのかどうか、また、安定性はどうか等ワクチン作製への応用が可能かどうかを探るために、各リアソータントウイルスの LLC-MK2 細胞における増殖能および HA 遺伝子の安定性を調べた。

A. 研究目的

遺伝子操作技術のリバースジェネティクス (RG) 法を用いた遺伝子再集合体 (リアソータントウイルス) の作製には、ウイルス遺伝子をコードするプラスミド DNA を培養細胞にトランスフェクションし、感染性ウイルス粒子を回収しなければならない。WHO は RG 用の細胞にアフリカミドリザル腎臓由来の Vero 細胞を推奨しているが、この細胞はトランスフェクション効率が低く、ウイルス株によっては、リアソータントウイルスの回収が困難な場合がある。

本研究ではこれまでに、ATCC から購入したアカゲザル腎臓由来の LLC-MK2 細胞が Vero 細胞よりも高効率でプラスミド DNA を

取り込むことを明らかにし、A/H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスである A/Vietnam/JPI203/04 (H5N1) の弱毒型株、A/H3 亜型ヒトインフルエンザウイルスである A/Panama/2007/99 (H3N2) 株、A/H6 亜型トリインフルエンザウイルスである A/duck/Hong Kong/716/79 (H6N1) 株および A/H9 亜型トリインフルエンザウイルスである A/swine/Hong Kong/9/98 (H9N2) 株の感染性リアソータントウイルスは、Vero 細胞よりも LLC-MK2 細胞を用いた RG 法の方が高効率に回収できる事を報告している。一方、A/H7 亜型トリインフルエンザウイルスである A/mallard/Netherlands/12/00 (H7N3) 株および B 型インフルエンザウイルス

B/Yamagata/1/73 株の感染性リアソータントウイルスは、LLC-MK2 細胞を用いた RG 法で感染性ウイルスを回収することはできたが、Vero 細胞から回収することはできなかった。

本年度は、これらリアソータントウイルスの孵化鶏卵および各細胞での増殖性を検討し、A/H5 亜型では、細胞継代による HA 遺伝子の安定性を調べた。

B. 研究方法

(1) インフルエンザウイルス遺伝子のクローニング：HA を弱毒型に改変した A/Vietnam/JP1203/04 (H5N1) 株 (A/H5 亜型株)、A/duck/Hong Kong/716/79 (H6N1) 株 (A/H6 亜型株)、A/mallard/Netherlands/12/00 (H7N3) 株 (A/H7 亜型株) あるいは A/swine/Hong Kong/9/98 (H9N2) 株 (A/H9 亜型株) の 2 種類 (HA, NA) の遺伝子を vRNA 合成プラスミドに組み込んだ。

(2) 組換え A 型インフルエンザウイルスの作製：A/H5、A/H6、A/H7 あるいは A/H9 亜型株の 2 種類 (HA, NA) の遺伝子と高増殖性標準株 (A/PR/8/34) 株の 6 種類 (PB1、PB2、PA、NP、M、NS) の遺伝子の vRNA 合成プラスミドと 4 種類 (PB1、PB2、PA、NP) のタンパク質発現プラスミドを LLC-MK2 細胞または Vero 細胞に FuGENE HD Transfection Reagent (Roche) を用いてトランスフェクションした。18 時間後にトリブシン (5 μ g/ml) を添加した Opti-Pro SFM 培地に交換し、その後 30 時間培養して培養上清を回収した。

(3) ウイルス感染価の測定：培養上清中のウイルス感染価は MDCK 細胞を用いた 50% 培養細胞感染量 (TCID₅₀) で測定した。また、10 日孵化鶏卵に各培養上清を 100 μ l 接種し、3 日間培養してウイルス液を回収し 0.5% TRBC にて HA 価を求めた。

(4) LLC-MK2 細胞を用いて作製した A/H5 亜型株および A/H7 亜型株の培養上清を、MDCK

細胞、LLC-MK2 細胞および Vero 細胞に接種し、トリブシン (5 μ g/ml) を添加した MEM 培地 (10% FCS を含む) にて、16 時間、24 時間、48 時間、72 時間培養し、各培養上清のウイルス感染価を測定した。

(5) ウイルス感染価の測定：培養上清中のウイルス感染価は MDCK 細胞を用いた 50% 培養細胞感染量 (TCID₅₀) で測定した。

(6) LLC-MK2 細胞を用いて作製した A/H5 亜型株の培養上清を MDCK 細胞および LLC-MK2 細胞で継代し、2 代、4 代、6 代目の培養上清を回収して HA のシーケンス解析を行った。

C. 研究結果

LLC-MK2 細胞または Vero 細胞にトランスフェクションして得られた培養上清中の、A/H6、A/H7、A/H9 亜型株のリアソータントウイルスの感染価 (TCID₅₀) および孵化鶏卵で培養後の HA 価を測定した (表 1)。その結果、LLC-MK2 細胞を用いて作製したリアソータントウイルスでは、すべての亜型で 2.5 ~ 4.5 log₁₀ TCID₅₀ /ml の感染価のあるウイルスが産生された。また、孵化鶏卵で培養するといずれの亜型からも HA 価が 256 以上のウイルスが回収できた。Vero 細胞では A/H6 および A/H9 亜型で 2.2 および 3.5 log₁₀ TCID₅₀ /ml の感染価のあるリアソータントウイルスが産生されていたが、A/H7 亜型では TCID₅₀ で感染価のあるリアソータントウイルスは産生されなかった。これらを孵化鶏卵で培養すると、A/H6 および A/H9 亜型では HA 価が 1024 以上のウイルスが回収できた。また、A/H7 亜型でも HA 価はそれよりも低いものの、ウイルスが回収できる事が明らかになった。

LLC-MK2 細胞を用いて作製した A/H5 亜型株および A/H7 亜型株リアソータントウイルスを最終濃度が 1000 倍になるように希釈して、MDCK 細胞、LLC-MK2 細胞および Vero 細胞に接種し経時的に感染価を測定した

(図 1)。その結果、A/H5 亜型株リアソータントウイルスでは、24 時間の培養では、MDCK 細胞に比べると LLC-MK2 細胞および Vero 細胞での増殖は悪かったが、48 時間の培養では、いずれの細胞でも非常に良く増殖していた。一方、A/H7 亜型株リアソータントウイルスでは、MDCK 細胞でよく増殖していたが、Vero 細胞、LLC-MK2 細胞では 48 時間の培養でもほとんど増殖しなかった。さらに 72 時間の培養でも Vero 細胞ではほとんど増殖せず、LLC-MK2 細胞でも MDCK 細胞の約 1/100 しか感染性のあるウイルスが増殖しなかった。

また、LLC-MK2 細胞を用いて作製した A/H5 亜型株の培養上清を MDCK 細胞では最終濃度が 10^6 倍あるいは 10^8 倍希釈、LLC-MK2 細胞では 10^1 倍あるいは 10^5 倍希釈して継代し、2 代、4 代、6 代目の培養上清を回収して HA のシークエンス解析を行った。その結果、MDCK 細胞で 10^6 倍希釈して継代、LLC-MK2 細胞では 10^1 倍希釈して継代した場合、6 代目では HA 遺伝子の変異は見られなかった。一方、MDCK 細胞で 10^8 倍希釈して継代した場合、4 代目以降でアミノ酸置換を伴う変異が 1 カ所、LLC-MK2 細胞では 10^5 倍希釈して継代した場合、6 代目でアミノ酸置換を伴わない遺伝子変異が 1 カ所確認された (表 2)。

D. 考察

現行の不活化ヒトインフルエンザワクチンは、孵化鶏卵で分離・継代されたウイルス株をもとに高増殖性のワクチン株を作製してから製造している。しかし、孵化鶏卵でのウイルスの分離効率は悪く、また、分離できたとしても高増殖性のワクチン株を作製するまでに長い時間がかかっているのが現状である。一方、ウイルス遺伝子を出発材料とする RG 法は、ウイルス遺伝子をコードするプラスミド DNA を培養細胞にトランスフェクションするだけで、高増殖性の

リアソータントウイルスを作製できるので、培養細胞から分離した流行株の遺伝子を用いて、流行株と抗原性が一致したワクチン株の供給や、H5N1 亜型ウイルスなど強毒性から弱毒性に変えたワクチン株の供給が、短期間で行う事ができるので、特に新型インフルエンザ発生時などの緊急時にワクチン株を供給する場合など、非常に有用である。

しかし、RG 法によるワクチン株の作製においては、WHO の推奨する Vero 細胞を使用した場合、A/H7 亜型や B 型では効率よく増殖する感染性リアソータントウイルスの作製ができない。この事は、亜型あるいはウイルス株によっては、リアソータントウイルスの作製ができず、ワクチン候補株を供給する事ができない可能性があるという事を意味する。

一方、LLC-MK2 細胞を使用した場合は、今後新型インフルエンザとして出現する可能性がある A/H5、A/H6、A/H7 および A/H9 亜型株をはじめ、H1 亜型、H3 亜型、B 型でも感染性リアソータントウイルスを効率よく産生する事ができ、RG 法によるワクチン候補株の作製に、LLC-MK2 細胞は有用である事が明らかとなった。

インフルエンザウイルスを孵化鶏卵で継代すると、ウイルスが卵に適応して遺伝子変異が起き、それにより抗原性が大きく変わる場合があることが知られている。作製したワクチン株の抗原性が大きく変わってしまえば、期待したワクチンの効果が得られなくなってしまうので、細胞培養ワクチンの開発にはそうした点に留意しなければならない。本研究では、MDCK 細胞や LLC-MK2 細胞を用いて継代したウイルスの安定性を調べた。その結果、ウイルスを感染できる限界まで希釈した場合は、MDCK 細胞の場合 4 代目で 1 カ所の遺伝子変異 (同義置換) が、LLC-MK2 細胞の場合 6 代目で 1 カ所の遺伝子の変異 (非同義置換) が起きたが、それよ

りも 100 倍濃いウイルス濃度で継代した場合は、HA 遺伝子変異は起きなかった。よって、十分な感染価を持ったまま継代すれば、変異の入る可能性は少なく、変異のないウイルスを大量に培養できる可能性がある事が示唆された。

一方、ウイルスの増殖性は、H5 亜型でどちらの細胞でもほとんど変わらないものの、H7 亜型では LLC-MK2 細胞の増殖性は MDCK 細胞にくらべて大きく劣っていた。LLC-MK2 細胞を培養細胞ワクチン株へ応用するには、もっと高い増殖性を保つようにしなければならず、培養条件の改良などさらなる検討が必要である。

D. 結論

LLC-MK2 細胞は安全性が非常に高い事が当研究班によって証明されている。また、LLC-MK2 細胞は新型インフルエンザになる可能性があるとして危惧されている H5、H6、H7、H9 亜型をはじめ、WHO の推奨する Vero 細胞では産生できない、リアソータントウイルス株の作製が可能であり、RG 法によるリア

ソータントウイルスの作製に非常に有用である。なお、ウイルスの増殖効率は MDCK 細胞よりも低く、このままでは細胞培養ワクチンへの応用はできないが、培地や培養条件等をもっと検討して、増殖効率の改善を計ることができれば、トランスフェクションから培養まで、全て LLC-MK2 細胞を使用する事ができ、培養細胞ワクチンへの応用の可能性が広がる。今後も継続的な検討が必要である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

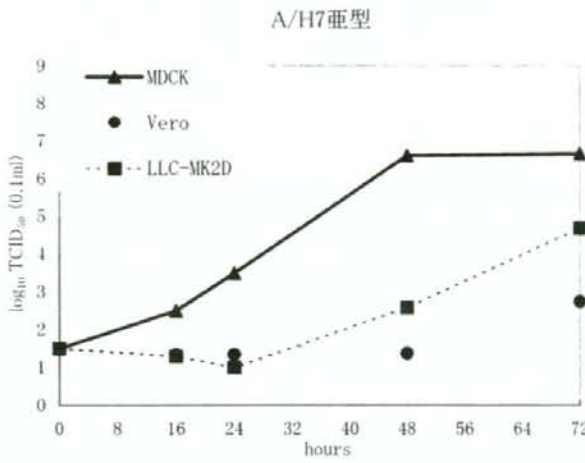
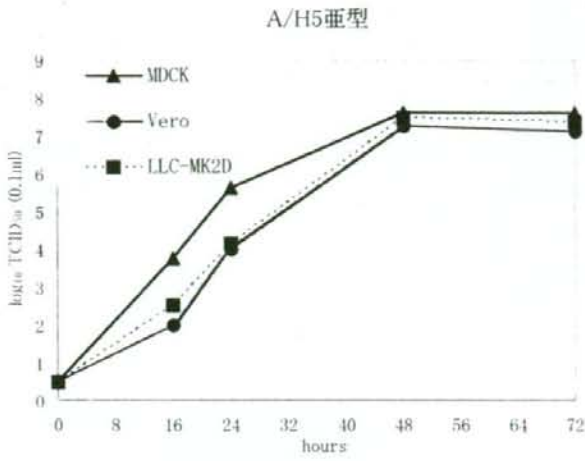


図1 A/H5 亜型および A/H7 亜型ウイルスの各細胞における増殖曲線

表1. リアソータントインフルエンザウイルスの感染価およびHA 価

亜型	細胞	No.	感染価* およびHA 価			亜型	細胞	No.	感染価* およびHA 価			亜型	細胞	No.	感染価* およびHA 価		
			TCID ₅₀	#1	#2				#3	TCID ₅₀	#1				#2	#3	TCID ₅₀
A/H6	LLC-MK2D	#1	TCID ₅₀	2.7		LLC-MK2D	#1	TCID ₅₀	3.7		A/H9	LLC-MK2D	#1	TCID ₅₀	3.7		
			#1	1024	#1			256	#1	2048							
			HA	1024	HA			256	HA	2048							
		#2	1024	#2	256		#2	2048									
		HA	1024	HA	256		HA	2048									
		#3	1024	#3	256		#3	2048									
	TCID ₅₀	2.5		TCID ₅₀	4.3		TCID ₅₀	4.5									
	#1	1024	#1	256	#1	2048											
	HA	1024	HA	256	HA	2048											
	#2	1024	#2	256	#2	2048											
	HA	1024	HA	256	HA	2048											
	#3	1024	#3	256	#3	2048											
TCID ₅₀	2.3		TCID ₅₀	3.5		TCID ₅₀	4.5										
#4	2.7		TCID ₅₀	4.3		#4	4.5										
TCID ₅₀	2.3		TCID ₅₀	-		TCID ₅₀	3.3										
#1	1024	#1	64	#1	2048												
HA	1024	HA	64	HA	2048												
#2	1024	#2	64	#2	2048												
HA	1024	HA	64	HA	2048												
#3	4096	#3	32	#3	2048												
TCID ₅₀	2.3		TCID ₅₀	-		TCID ₅₀	3.5										
#2	1024	#1	128	#1	2048												
HA	1024	HA	64	HA	2048												
#3	1024	#3	NT	#3	2048												
TCID ₅₀	2		TCID ₅₀	-		TCID ₅₀	3.5										
#4	2.5		TCID ₅₀	-		#4	3.5										
TCID ₅₀	2.5		TCID ₅₀	-		TCID ₅₀	3.5										

*単位: log₁₀ TCID₅₀ / ml - は 0.5 以下を示す。

表 2 A/Viet Nam/JP1203/2004(弱毒型)の細胞継代による HA 遺伝子の変異

接種細胞	接種ウイルス濃度	継代数	遺伝子番号*	アミノ酸番号*
			192-194	62
野生株:A/Viet Nam/JP1203/2004			GGA	Glu
MDCK	10 ⁸	4	GAA	Gly
MDCK	10 ⁸	6	GAA	Gly
接種細胞	接種ウイルス濃度	継代数	遺伝子番号*	アミノ酸番号*
			1245-1247	413
野生株:A/Viet Nam/JP1203/2004			GGA	Gly
LLC-MK2D	10 ⁵	6	GGT	Gly

*遺伝子番号およびアミノ酸番号(開始コドン ATG から)は A/Viet Nam/1203/2004(EF541403)に対応

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

研究分担者 原田 勇一 国立感染症研究所ウイルス第 3 部研究員

研究要旨：強毒型 H5N1 インフルエンザパンデミック対策の一環で、ワクチン候補株に選定された A/Anhui/01/05-PR8-IBDC-RG5 株について、マウスモデルを用いてワクチン接種による交叉防御効果と、血中に誘導されるウイルス中和抗体の交叉反応性を評価した。その結果、ワクチン接種マウスには、幅広い交叉反応性を有するウイルス中和抗体が誘導され、その後の強毒型ウイルス攻撃試験に対しても効果的な交叉感染防御がもたらされることが明らかとなり、本株のワクチン候補としての高い有用性が示唆された。

A. 研究目的

東アジアから始まった H5N1 高病原性トリインフルエンザの流行は、中近東、アフリカ、ヨーロッパへと拡大している。これまでのところヒトへの感染はトリとの濃密な接触によるものがほとんどであるが、ヒトにおいて流行するウイルスの clade は年を追うごとに変化してきており、これらのウイルスがヒトでパンデミックを起こすような変異を獲得することが懸念され、その対策は焦眉の急である。なかでも H5N1 型高病原性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。

2006、2007 年度の本研究事業において、clade1、clade2 に属するワクチン候補株より作製したホルマリン不活化全粒子ワクチンを用い、異なる clade のウイルス感染に対するワクチン効果についてマウスモデルを用いて検証し、その有用性を報告した。しかしながら、その後ヒトにおける流行の主流は clade2 ウイルスの派生ウイルスである、clade2.3.4 へと変化したため、この clade に属するウイルス由来のワクチンを作製し、その効果を検証する必要性が生じた。さらに最近、一部の地域では clade1 に属するウイルスの流行が報告されており、使用するワクチンの交叉感染防御能評価の重要性が示唆される。そこで本研究では、clade2.3.4 に属するウイルスより作製したワクチン候補株の不活化全粒子ワクチンを用い、マウスにおける交叉防御効果について解析を行った。

B. 研究方法

ワクチン

強毒ウイルスである A/Anhui/01/2005 株 (clade2.3.4) をリバースジェネティクス法を用いて弱毒化した、A/Anhui/01/05-PR8-IBDC-RG5 株を使用した。このウイルスを精製・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

8 週齢、雌の BALB/c マウスを用いた。

投与量・経路

ウイルス抗原 30 μ g HA / mL、0.3 mg / mL Alum を含むワクチン液を 0.1 mL / マウスにて皮下接種した。

免疫・感染実験

1 群 10 匹の BALB/c マウスに 3 週間間隔で 2 回、ワクチン液を接種した。陰性コントロール群には Alum のみを接種した。

各群 10 匹のマウスのうち、半数については 2 回目のワクチン接種後、3 週間目に麻酔を施し、採血を行った。また、分離した血清を用いてウイルス中和抗体価を測定した。

残りの半数のマウスは、2 回目のワクチン接種 3 週間後に強毒ウイルス (A/Viet Nam JP1203/2004 (clade1) (以下 Viet Nam)、A/Indonesia/6/2005 (clade2.1) (以

下、Indonesia)、A/Turkey/12/2006 (clade2.2) (以下 Turkey)) による攻撃試験を行った。

攻撃試験は、麻酔下のマウスに 20 MLD₅₀/10 μL のウイルスを経鼻接種することによって行った。

ウイルスを感染させたマウスは、感染後 2 週間、個体の生死と体重変動を観察した。

(倫理面への配慮)

ウイルス感染、採材時にマウスへの苦痛を低減するよう、麻酔処置を行った。また、実験終了後についても、麻酔薬の過量投与によってマウスを安楽死させた。

C. 研究結果と考察

ワクチン接種マウス血中のウイルス中和抗体価を測定したところ、これらの血中抗体は clade の異なるウイルスに広く交叉反応することが明らかとなった (図 1)。交叉反応性に関しては、Indonesia に対する反応性が最も良く、次いで Turkey、Viet Nam の順であった。

次にワクチン接種マウスに対して強毒ウイルスによる攻撃試験を行った。その結果、攻撃試験に用いた強毒ウイルスの clade にかかわらず、ワクチン接種を施したマウスは全例生残した (図 2A)。また、Turkey 株の攻撃試験では、ウイルス感染後、ワクチン接種マウスは 10% 前後の体重減少を示したものの、Viet Nam、Indonesia 両株の感染に対しては、ほとんど全く体重減少が観察されなかった (図 2B)。

以上の結果から、clade2.3.4 に属する A/Anhui-PR8-IBCDC-RG5 株由来不活化全粒子ワクチンは、マウス血中に幅広い clade のウイルスに対する中和抗体を誘導することができ、その後の攻撃試験においても、用いた全ての clade のウイルスに対してマウスに効果的な感染防御をもたらせることが明らかとなった。それ故、本株はワクチン候補として非常に有用であることが示唆された。一方、ワクチン接種マウスには効果的な感染防御がもたらされるにもかかわらず、Viet Nam 株、Turkey 株に対してはウイルス中和抗体価が検出できない個体も観察された (観察

した 5 匹のうち 2 匹)。この原因は、本実験系が一般に細胞性免疫応答を誘導できない系であることから、ウイルス中和活性を持たないウイルス特異的抗体がワクチン接種マウスの感染防御に何らかの寄与をしているためである可能性がある。従って、今後は ELISA 法などウイルス中和活性の有無を問わず、全てのウイルス特異的抗体を検出することの出来る手法を用い、その抗体価とマウスにもたらされる感染防御効果の関係を評価して行く必要がある。

D. 健康危険情報
なし

E. 研究発表
1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

F. 知的財産の出願・登録情報
なし

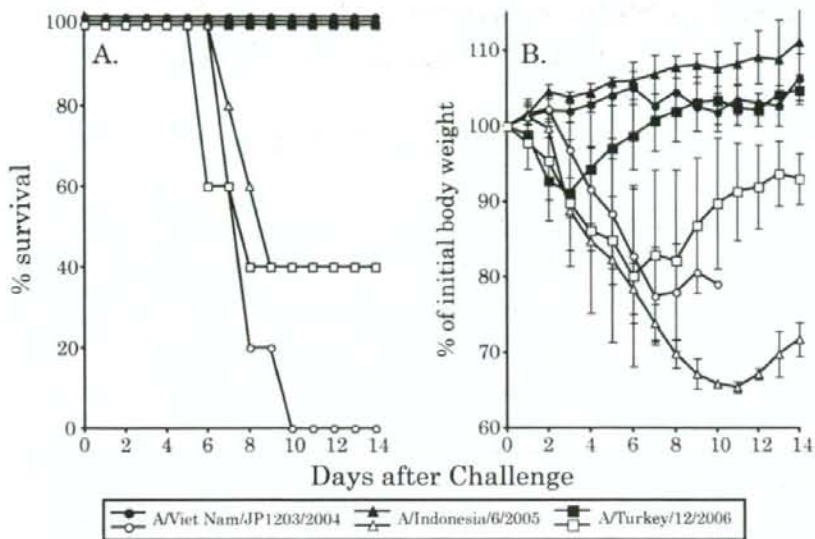


図2. 強毒型ウイルスによるワクチン接種マウスへの攻撃試験
 強毒型ウイルス感染後のワクチン接種マウスの生残率 (A) と体重変動 (B)。図中の黒塗シンボルは
 ワクチン接種マウスを、白抜きシンボルは陰性コントロールマウスをそれぞれ示す。

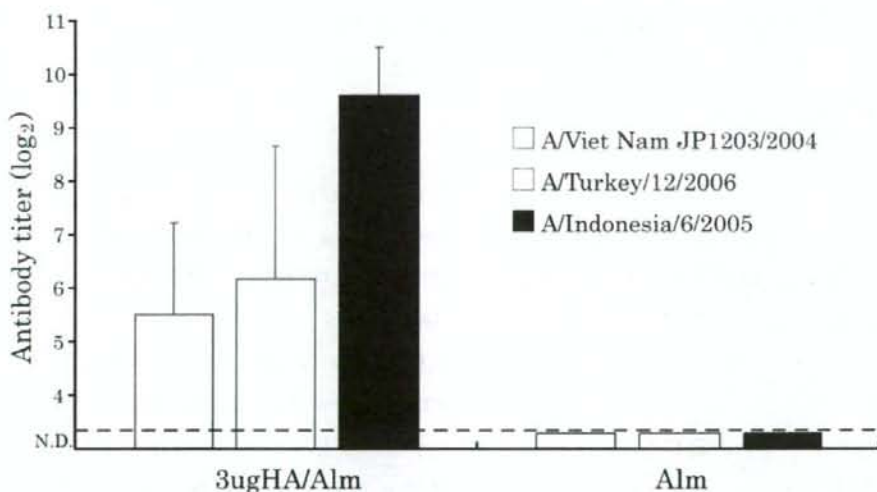


図1. ワクチン接種マウス血中のウイルス特異的抗体価
 ワクチン接種マウス血中のウイルス中和抗体価を測定した。図中の破線は検出限界を示し、N.D.
 は検出限界以下であることを、また、エラーバーは標準偏差を示す。

ワクチン有効性評価技術の開発

研究分担者	高橋 宜聖	(国立感染症研究所免疫部)
研究協力者	小野寺 大志	(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

これまで、2種類の H5N1 型プレパンデミックワクチン株（NIBRG-14、RG-Indonesia/5）について、リコンビナントヘマグルチニン（rHA）を作製し、抗 HA 抗体を高感度で検出する ELISA 法を確立した。本年度の研究では、RG-Anhui/1 株の rHA を用いた ELISA 法を確立し、各プレパンデミックワクチン株が誘導する抗 HA 抗体価とその HI 活性／中和活性を比較した。さらに、この ELISA 法をヒト血清サンプルに適用したところ、ヒト抗 H5 IgG1 抗体を高感度で検出可能なことが明らかとなった。

A. 研究目的

プレパンデミックワクチンが誘導する抗体の高感度な検出法を開発し、HI 活性や中和活性との相関性を明らかにする。

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3つの H5N1 型ワクチン株（NIBRG-14、RG-Indonesia/5、RG-Anhui/1）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 タンパクの作製

組換え HA（rHA）タンパクを作製するため、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。

(3) ELISA による HA 特異的な血中抗体価の測定

rHA タンパクを ELISA プレートにコーティングし 1% BSA でブロッキング後、段階希釈したマ

ウスあるいはヒト血清を加え、HRP 標識抗 IgG 抗体にて特異抗体を検出した。

(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) 中和試験による中和抗体価の測定

イヌ腎細胞株である MDCK に対し、100 TCID₅₀ の攻撃ウイルスを使用して中和試験を行った。攻撃ウイルスと段階希釈した抗血清を前培養した後、細胞に添加して 3-4 日間培養した。メチレンブルー染色にて細胞障害を受けたウェルの割合を判定し、ウイルス感染を中和する血清希釈率を決定した。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は国立感染症研究所動物実験施設にて行い、倫理面を含め当研究所動物実験委員会の審査を受け、承認を得てから開始した。ヒト血清を用いた実験は、当研究所のヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会の審査を受け、承認を得てから開始した。

C. 研究結果

(1) RG-Anhui/1 rHA の作製と抗 HA 抗体価の比較

他のワクチン株と同様に、RG-Anhui/1 の rHA タンパクを作製した。RG-Anhui/1 ワクチンを接種したマウス抗血清に含まれる抗 HA IgG 抗体価を他の H5N1 プレパンデミックワクチン株と比較したところ、どのワクチンも同程度の抗 HA IgG 抗体価を誘導することが明らかとなった (図 1)。

(2) HI 活性と中和活性の比較

HI 抗体価と中和抗体価は、血清に含まれる抗 HA 抗体濃度と、抗体あたりの HI 活性、中和活性により決定される。RG-Anhui/1 ワクチンが誘導する抗体の HI 活性と中和活性を他のワクチン株と比較するため、HI 抗体価と中和抗体価を測定し、抗 HA IgG 抗体価に対する比率を計算した (図 2)。すると、RG-Anhui/1 ワクチンが誘導する抗体の HI 活性は、NIBRG-14 ワクチンと比較し 5 倍増加しているものの、依然として H1N1 ワクチンより有意に低いことが判明した。中和活性も H1N1 ワクチンに比べ低いことが明らかとなった。このことから、RG-Anhui/1 ワクチンが誘導する抗体は、NIBRG-14 ワクチンと同様に HI 活性、中和活性ともに低いことが明らかとなった。これに対し、RG-Indonesia/5 ワクチンが誘導する抗体は、中和活性が他の H5N1 ワクチンに比べ有意に高く、H1N1 ワクチンの約 50%の値を示すことが判明した。

(3) ヒト血清中に含まれる抗 H5 HA 抗体の検出 ELISA 法により、ヒト血清中に含まれる抗 H5 HA 抗体濃度の測定を試みた。その結果、H5 HA に未感作な血清中にも、NIBRG-14 rHA や RG-Indonesia/5 rHA に結合するヒト IgG1 抗体が検出された。図 3 には、抗 NIBRG-14 IgG1 抗体価と、比較として抗 PR8 IgG1 抗体価を示す。

D. 考察

プレパンデミックワクチン株として国家備蓄されている 3 種類全ての rHA 作製を完了した。プレパンデミックワクチンが誘導する抗体の HI 活性と中和活性を比較したところ、プレパンデミックワクチン株のなかでもばらつきが認められ、RG-Indonesia/5 株は、他の 2 つのワクチン株と比較して、高い中和活性を得られることが判明した。

さらに、ELISA 法による抗 HA 抗体価の高感度な定量により、H5 未感作のヒト血清中にも H5 HA に結合する抗体の存在が明らかとなった。H1N1 や H3N2 ウイルス感染者において、H8 に結合する血中抗体価が増加する例が報告されており、異なるサブタイプ間に共通のエピトープを認識する抗体が存在すると予想される。今後、この抗体の生理学的意味・感染防御に果たす役割の有無を検討する必要がある。

E. 結論

プレパンデミックワクチン 3 株の rHA 作製を完了し、ELISA による高感度検出法を開発した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Takahashi, Y., Hasegawa, H., Hara, Y., Ato, M., Ninomiya, A., Takagi, H., Odagiri, T., Sata, T., Tashiro, M., Kobayashi, K. Protective immunity afforded by H5N1 (NIBRG-14)-inactivated vaccine requires both antibodies against hemagglutinin and neuraminidase in mice. *J. Infect. Dis.* in press, 2009

2. 学会発表

[国内学会発表]

(第12回日本ワクチン学会、熊本、2008年11月)

- (1) 高橋宜聖、阿戸学、二宮愛、長谷川秀樹、小田切孝人、佐多徹太郎、田代真人、小林和夫 「H5N1 (NIBRG-14) ワクチンの感染防御効果には、抗ヘマグルチニン抗体と抗ノイラミ

ニダーゼ抗体の両者が関与する」

(第38回日本免疫学会、京都、2008年12月)

- (2) 高橋宜聖、小野寺大志、加地友弘、北村弘、竹森利忠、小林和夫 「IgA⁺ memory B cells persist in the lung after an intranasal infection with influenza virus」

- H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)
なし

図1 プレパネデミックワクチンが誘導する抗 HA IgG 抗体価の比較

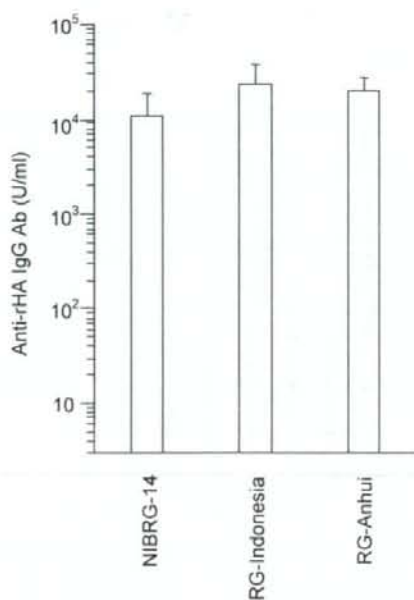


図2 HI 抗体価と中和抗体価が抗 HA IgG 抗体価に占める割合

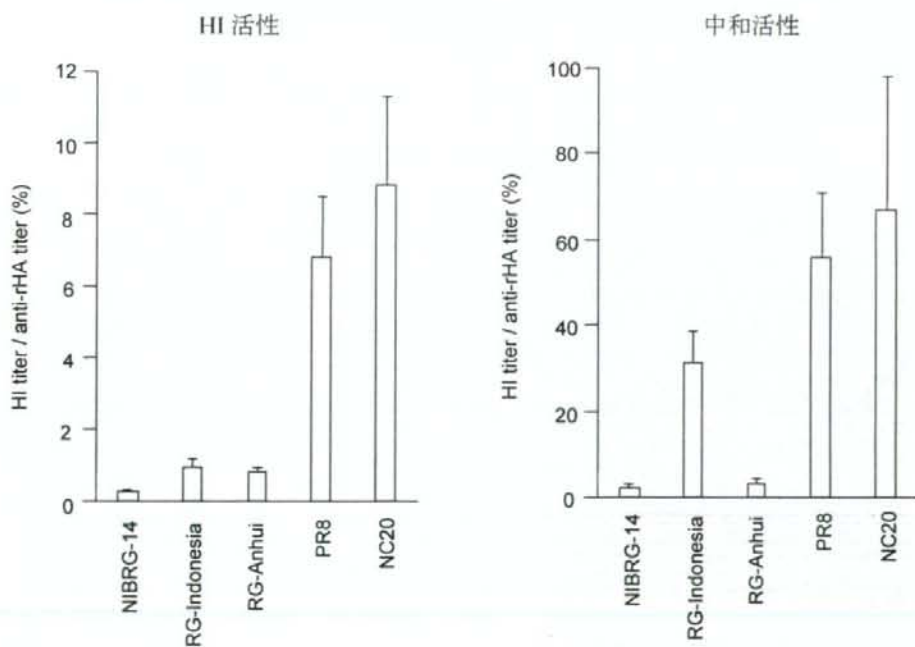


図3 ヒト血清中に含まれる抗HA IgG1抗体価の比較

