

Iwatsuki-Horimoto K, Shimojima M, Iwata A, Kawaoka Y. Growth determinants for H5N1 influenza vaccine seed viruses in MDCK cells. **J Virol.** 82:10502-9, 2008.

学会発表

Shin Murakami, Taisuke Horimoto¹, 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.

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

なし

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

研究分担者 影山努、今井正樹 国立感染症研究所ウイルス第3部第1室

協力研究者 白倉雅之 国立感染症研究所ウイルス第3部第1室

岸田典子 国立感染症研究所ウイルス第3部第1室

氏家 誠 国立感染症研究所ウイルス第3部第1室

研究要旨 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て、感染性リアソータントウイルス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いため、B型やA/H7亜型など用いるウイルス株によっては感染性リアソータントウイルスの回収が困難であった。そこで来るべき新型インフルエンザ用ワクチン候補株を高効率に作製することを目的に、Vero細胞よりも高効率でプラスミドDNAを取り込むアカゲザル腎臓由来のLLC-MK2細胞を用いて、RG法により感染性リアソータントウイルスの作製ができるかどうかの検討を行った結果、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/H9亜型やA/H3亜型だけでなく、Vero細胞では産生出来なかったH7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。

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。

そこで来るべき新型インフルエンザ用ワクチン候補株を高効率に作製することを目的に、Vero細胞よりも高効率でプラスミドDNAを取り込むアカゲザル腎臓由来の

LLC-MK2細胞が、RG法により感染性リアソータントウイルスを高効率に産生できないか、様々な亜型のインフルエンザウイルスを用いて調べた。

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: A/Panama/2007/99 (H3N2)株(A/H3亜型株)、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各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時間後にトリプシン(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)組換えB型インフルエンザウイルスの作製:A型インフルエンザウイルスの作製と同様にしてB/Yamagata/1/73(B/Yamagata)株からクローニングした遺伝子を基に組換えウイルスを作製した。

(4)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細胞を用いたブラック法、またはMDCK細胞を用いた50%培養細胞感染量(TCID₅₀)で測定した。

(5) 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、トリプシン(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。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。

(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感染価は、A/H3リアソータントウイルスの感染価はLLC-MK2細胞で 10^4 PFU/mlであり、その感染性ウイルス粒子の産生効率はVero細胞よりも数百倍高いことが分かった。一方、A/H5亜型株ウイルスについては、両細胞間で産生効率に有意差は認められず、何れの細

胞でも 10^6 PFU/mlと非常に高いウイルス産生が得られることが分かった。また、H6亜型株、H7亜型株あるいはH9亜型株のリアソータントウイルスの感染価(TCID₅₀)は、

LLC-MK2細胞では、すべての亜型で2.5-4.3 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。一方、Vero細胞ではA/H6およびA/H9亜型株で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亜型株では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。なお、Vero細胞での感染性リアソータントウイルスの産生効率はLLC-MK2細胞と比べて、A/H9亜型株では1/10低く、H6亜型株ではほぼ同等であった。

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亜型株で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亜型株では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亜型株ではHA価が1024以上のウイルスが回収できた。また、A/H7亜型株でもHA価はそれよりはるかに低いものの、感染価のある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 10^4 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 10^4 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。

B型インフルエンザウイルスの作製ではLLC-MK2細胞で 10^2 PFU/mlの感染性ウイルス粒子が産生されたが、その効率はA型ウイルスと比べ非常に低かった一方、Vero細胞では、感染性ウイルス粒子は全く検出されなかった。

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亜型株や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、A/H3亜型株、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。なお、ウイルスの増殖性は、A/H5亜型株でどちらの細胞でもほとんど変わらないものの、A/H7亜型株では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。

また、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結果、ウイルスを感染できる限界まで希釈した場合は、それぞれの細胞で変異株が確認されたが、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。従って、十分な感染価を持ったまま継代すれば、変異の入ら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。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ふ。今後は性的にも安定した細胞培養でのワクチン製造の開発が期待される。

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 亜型株をはじめ、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、全て安全性の高い 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。

健康危険情報

なし

E. 研究発表

1. 論文発表

(1) Imai, M., Ninomiya, A., Minekawa, H., Notomi, T., Ishizaki, T., Tu, P. V., Tien N. T. K., Tashiro, M., and Odagiri, T. Rapid diagnosis of H5N1 avian influenza virus infection by newly developed influenza H5 hemagglutinin gene-specific Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) method. *J Virol Methods* (in press).

(2) Imai, M., Ninomiya, A., Minekawa, H., Notomi, T., Ishizaki, T., Tashiro, M., and Odagiri,

T. (2006). Development of H5-RT-LAMP (loop-mediated isothermal amplification) system for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection. *Vaccine* 10;24(44-46):6679-82.

(3) Imai, M., Mizuno, T., and Kawasaki, K. (2006). Membrane fusion by single influenza hemagglutinin trimers. Kinetic evidence from image analysis of hemagglutinin-reconstituted vesicles. *J Biol Chem* 281(18), 12729-35.

・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.

・Ichinohe T, Nagata N, Strong P, Tamura S, 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 on highly pathogenic H5N1 influenza virus. *J Med Virol.* 79(6):811-9, 2007.
・ Masaki Imai, Kazunori Kawasaki, and Takato Odagiri Cytoplasmic domain of influenza B virus BM2 protein plays critical roles in production of infectious virus. *J. Virol.* 82, 728-739, 2008

2. 学会発表

今井正樹、二宮愛、川崎一則、小田切孝人：B型インフルエンザウイルスの感染性粒子形成過程におけるBM2蛋白質の役割、第45回日本ウイルス学会総会、名古屋、2006年11月

・ Masaki Imai, Kazunori Kawasaki, and Takato Odagiri The cytoplasmic domain of influenza B virus BM2 protein plays critical roles for the production of influenza virus. *Options for the Control of Influenza VI*, Tronto, June, 2007.

・ 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、田代眞人 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)

・ 今井正樹、影山努、氏家誠、納富継宣、峰川晴美、田代眞人、小田切孝人 LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)法によるH5N1型高病原性鳥インフルエンザウイルス遺伝子検出系の開発II 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、田代眞人、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

平成 18-20 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」
分担研究報告書

研究分担者 原田勇一 国立感染症研究所ウイルス第3部第1室
森(二宮)愛 神戸市環境保健研究所

研究要旨:強毒型 H5N1 インフルエンザパンデミック対策として作製されたワクチン候補株である NIBRG-14、rgIN5、NIBRG-23 ならびに A/Anhui/01/05-PR8-IBCDC-RG5 株について、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特異的抗体の交叉反応性をマウスモデルを用いて評価した。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ることが明らかとなった。さらに、これらのワクチン株は clade の異なる強毒型ウイルスに対し、マウスに効果的な交叉感染防御をもたらせることが明らかとなった。それ故、これらワクチン株は、たとえ流行するウイルスの clade がワクチン株のそれと異なっても、高い交叉感染防御効果が期待できる、有用性の高いワクチンとなる可能性が示唆された。

A. 研究目的

1997 年、香港において H5N1 型高病原性トリインフルエンザのヒトへの感染が初めて報告されて以来、ヒトにおける流行は東アジアから中近東、アフリカ、ヨーロッパへと拡大し、流行は現在に至っても続いている。H5N1 型高病原性トリインフルエンザはこれまでのところヒト-ヒト間の感染はほとんど見られず、トリとの濃密な接触による直接感染に限られている。我が国においても、幸いヒトへの感染例は未だ報告されていないが、野鳥や家禽から強毒型 H5N1 ウイルスの検出報告が断続的に続いており、これらトリ由来ウイルスがヒトの間でパンデミックを引き起こすような変異を獲得することが懸念され、その対策が急がれている。

我が国ではワクチン候補となる株を選定し、プレパンデミックワクチンとして製造・備蓄しているが、ヒトの間で流行する高病原性 H5N1 ウイルスは年と共にその遺伝子型 (clade) が変化してきている。このため、流行するウイルスの主流が変化するごとに新たなプレパンデミックワクチンを選定・製造するとともに、既存のワクチンが異なる clade に属するウイルスに対しても有効性を発揮で

きるか、評価する必要がある。そこで本研究では、2004 年以降に作製されたワクチン候補株について、本研究期間中に流行の主流となった clade の強毒性ウイルスに対する交叉感染防御効果を、マウスモデルを用いて評価した。

B. 研究方法

ワクチン

強毒ウイルスである A/Viet Nam/1194/2004 (clade1)、A/Indonesia/5/2005 (clade2.1)、A/Turkey/Turkey/1/2005 (clade2.2)及び A/Anhui/01/2005(clade2.3.4)をそれぞれリバースジェネティクス法を用いて弱毒化した、NIBRG-14、rgIN5、NIBRG-23 及び A/Anhui/01/05-PR8-IBCDC-RG5 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

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

各群のマウスをさらにそれぞれ 2 群に分け、1 群については 2 回目のワクチン接種後、適時に採血を行った。また、分離した血清を用いて HI 試験、ウイルス中和試験を行った。

残りの 1 群には、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) または A/Turkey/12/2006 (clade2.2) (以下 Turkey)) の致死性感染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 μ L 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

1. NIBRG-14

clade1 ウイルス由来のワクチン株 NIBRG-14 を用いて作製した Alum 添加ホルマリン不活化全粒子ワクチンについて、解析当時流行の主流であった clade2 ウイルス

(Indonesia, Turkey) に対するワクチン効果を検討した。

ワクチン接種マウスの血中抗体価を測定したところ、ウイルス中和抗体については両株

に対して同程度誘導されることが明らかとなった。しかしながら、HI 試験法では、Indonesia 株に対する抗体は全く検出することが出来なかった。また、Turkey 株に対して抗体価が検出できるマウスの割合はウイルス中和試験のほうが HI 試験と比較して高かった (中和 50% vs HI 40%)。

ワクチン接種マウスに致死性ウイルスを用いた攻撃試験を行ったところ、Indonesia 株を感染させたマウスは全例生残した。このうち、40%にあたるマウスでウイルス感染後に体重変動が観察されたが、体重減少の割合は 20% 未満であった。一方、ワクチン接種マウスは Turkey 株の攻撃試験においても全てのマウスが生残し、ウイルス感染後の体重減少は全く観察されなかった。

2. rgIN5

clade2.1 ウイルス由来のワクチン株 rgIN5 を用いて作製した Alum 添加ホルマリン不活化全粒子ワクチンについて、解析当時流行の主流であった clade2 ウイルス (Indonesia, Turkey)、過去の流行株である clade1 ウイルス (Viet Nam) に対するワクチン効果をそれぞれ検討した。

ワクチン接種マウス血中の抗体価を測定したところ、Viet Nam 株に対しては、HI 試験、ウイルス中和試験ともに抗体を検出することが出来なかった。一方、Turkey 株に対しては、homo 株より若干低い程度のウイルス中和抗体が誘導されていた。しかしながら、HI 抗体価は低く、実験に供した 20% のマウスでしか抗体が検出できなかった。

ワクチン接種マウスに clade1 強毒ウイルスである Viet Nam 株を用いた攻撃試験を行ったところ、40% のマウスが死亡し、その交叉防御効果は部分的であった。また、生残したマウスについても全例ウイルス感染後に 15-25% の体重減少が観察された。そこで homo ウイルスの強毒型である Indonesia 株を感染させたところ、Indonesia 株に対しては全てのマウスが生残し、ウイルス感染後の体重変動も

起こらない、効果的な感染防御がもたらされることが明らかとなった。

3. NIBRG-23

clade2.2 ウイルス由来のワクチン株 NIBRG-23 を用いて作製した Alum 添加ホルマリン不活化全粒子ワクチンについて、解析当時流行の主流であった clade2.1 ウイルス

(Indonesia)、過去の流行株である clade1 ウイルス (Viet Nam) に対するワクチン効果をそれぞれ検討した。

ワクチン接種マウス血中のウイルス特異的抗体価を測定したところ、Viet Nam、Indonesia 両株に対して反応性を有するウイルス中和抗体が検出された。また、抗体の交叉反応性に関しては、Indonesia 株に対する反応性のほうが Viet Nam 株に対するそれよりも高い傾向が観察された。一方、HI 試験においては、Indonesia 株に対して低いながらも抗体応答が観察されたのに対し、Viet Nam 株に対しては全く観察されなかった。

ワクチン接種マウスに強毒型の Indonesia 株または Viet Nam 株を用いて攻撃試験を行ったところ、それぞれ 60%、80% のマウスでウイルス感染後に 15-25% の体重減少が観察されたが、全てのマウスが生残した。また、体重減少やその後の回復の時期に攻撃試験に用いたウイルスによる差異は観察されなかった。

4. A/Anhui/01/05-PR8-IBDC-RG5

研究開始当時流行の主流であった clade2.3.4 ウイルス由来のワクチン株

A/Anhui/01/05-PR8-IBDC-RG5 から作製した Alum 添加ホルマリン不活化全粒子ワクチンを用い、clade1 ウイルス (Viet Nam)、clade2.1 ウイルス (Indonesia) 及び clade2.2 ウイルス (Turkey) に対するワクチン効果について、それぞれ解析を行った。

ワクチン接種マウス血中に誘導されるウイルス特異的抗体について、ウイルス中和試験を用いて解析を行った結果、解析を行ったすべての clade のウイルスに反応性を有する中

和抗体が検出された。交叉反応性の高さは Indonesia > Turkey > Viet Nam の順であった。しかしながら、Indonesia 株に対しては解析に用いた全てのマウスで抗体価を検出することが出来たものの、Viet Nam 株、Turkey 株に対しては約 30% のマウスで抗体が検出できなかった。

ワクチン接種マウスに強毒型ウイルスによる攻撃試験を行ったところ、用いた強毒型ウイルスの clade に関係なく、全てのウイルスの致死性感染に対して、全マウスが生残する、効果的な感染防御効果が観察された。また、Turkey 株を感染させたマウスにおいてのみ感染後、体重の減少が観察されたが、その程度は約 10% と、軽微なものであった。

D. 考察

以上の結果から、NIBRG-14、NIBRG-23 及び A/Anhui/01/05-PR8-IBDC-RG5 各株を用いて作製した Alum 添加ホルマリン不活化全粒子ワクチンが発揮する交叉防御効果は充分に高く、これらのワクチン株が幅広い clade の強毒株に対して有効に使用できる可能性が示唆された。一方、rgIN5 株については、交叉防御効果は攻撃ウイルス株の種類によって不完全な場合があるものの、同一 clade の強毒株に対しては非常に有効であり、この結果は、ワクチン接種マウス血中で観察されたウイルス中和抗体量によっても支持された。

我が国における備蓄ワクチンには clade2.2 に属するウイルス株由来のものが含まれていないが、本研究の結果は、たとえ clade2.2 に属する強毒型ウイルスが流行したとしても、備蓄ワクチンが充分有効に機能する可能性を強く示唆する。

抗体価測定法として HI 試験法は、ウイルス中和試験法と比較して、用いるウイルスの性質や検出感度の問題から抗体価が検出できない場合が多く観察された。従って、少なくともブレパンデミックワクチンの評価に関して本法を用いるのは適切でないと考えられ、実際、平成 20 年度の抗体価評価対象からは HI

試験法を割愛した。他方、ワクチン接種によりマウス血中に誘導されるウイルス中和抗体価と攻撃試験時にマウスにもたらされる防御効果とは概ねよく相関していた。しかしながら、いずれのワクチン株を使用した場合にも、強毒型ウイルスによる攻撃試験時には全てのマウスが生残したにもかかわらず、一部のマウスでウイルス中和抗体価が検出できなかった。特に A/Anhui/01/05-PR8-IBCDRC-RG5 由来ワクチンを用いた解析では、Turkey 株に対する抗体価は Viet Nam 株に対するそれより全体的に高かったにもかかわらず、攻撃試験時にマウスの体重減少が起こるのは Turkey 株を用いたときのみであった。それ故、ウイルス中和抗体価に関しても、必ずしもワクチン接種マウスにもたらされる感染防御効果の指標とはなり得ない可能性が示唆された。ウイルス中和試験に替わる抗体測定法の一つとして、リコンビナントウイルスタンパクを用いた ELISA 法が挙げられる。今後、本法を用いて測定された抗体価と、マウスにもたらされる感染防御効果の関係を評価する等、より感染防御と密接な関係にある因子を探索する必要がある。

E. 結論

本研究に用いたワクチン候補株は、いずれも幅広い clade の強毒ウイルス感染に対してマウスに効果的な交叉感染防御をもたらすことが明らかとなり、プレパンデミックワクチンとして有用な候補たりうることが示唆された。ワクチン効果の指標となるウイルス特異的抗体の評価法として、HI 試験法は検出感度等の問題から採用が困難であるが、ウイルス中和試験を用いても未だ不十分である。今後、これらの方法に替わる評価法の確立が必要である。

D. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Ninomiya A, Imai M, Tashiro M, Odagiri T. 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, 3554-3560, 2007

Imai M, Ninomiya A, Minekawa H, Notomi T, Ishizaki T, Tu P.V, Tien N.T.K, Tashiro M and Odagiri T.

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

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 F, 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. 196 (9), 1313-1320, 2007

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. 9 (11), 1333-1340, 2007

2. 学会発表

二宮愛、今井正樹、多田善一、田代真人、小田切孝人

弱毒化 H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスを用いたアルムアジュバント添加ワクチンのマウスにおける有効性の検討
第 54 回日本ウイルス学会総会、名古屋、2006 年

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総会、札幌、2007 年

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 高病原性トリ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総会、札幌、2007 年

G. 知的所有権の取得状況

なし

平成 18-19 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

LLC-MK2-Derivative 細胞の現行インフルエンザワクチン株に対する感受性の検討

研究分担者 城野洋一郎

研究要旨 新型インフルエンザの凡流行に対応してワクチンを製造する際に、ワクチン用ウイルスシードはリバースジェネティクス（RG）法により作出するのが最も効率的である。RG によってウイルスを作出するにあたって、基質となる細胞は Vero 細胞より LLC-MK2-Derivative 細胞の方が優れていることが国立感染症研究所のこれまでの研究で明かとなった。更に我々が構築した LLC-MK2-Derivative 細胞バンクの各種安全性試験を実施した結果、迷入因子が無く、造腫瘍性も陰性であることが昨年度の研究で明かとなった。

本年度は、この LLC-MK2-Derivative 細胞の各種インフルエンザウイルスに対する感受性を確認する目的とし、近年現行の卵ワクチンに用いられた H1N1、H3N2、B の複数のウイルス株に対する感受性を試験した。その結果、LLC-MK2-Derivative 細胞は、試験した全てのワクチン用ウイルス株に感受性であった。LLC-MK2-Derivative 細胞でのウイルスの増殖性は MDCK-CCL34 細胞には劣るものの、Vero-CCL81 細胞より高いものであった。

A. 研究目的

新型インフルエンザの凡流行が予測された際にワクチンを製造するにあたり、リバースジェネティクス法(RG)によりワクチン製造用ウイルス株を作製することが効率的である。国立感染症研究所のこれまでの研究により複数の候補細胞の中から LLC-MK2-Derivative 細胞が、一般的に使用される Vero 細胞より効率的に RG による組み換えインフルエンザウイルスが得られることが明かとなった。この RG によりウイルスを作製するには安全性・特性が十分に解析された細胞を用いることが必須であるため、我々は、この LLC-MK2-Derivative 細胞のマスターセルバンク、ワーキングセルバンクを構築し、それらについて安全性・特性試験を実施した。

その結果、実施した無菌試験、マイコプラズマ否定試験、多種のウイルス検出試験の全てにおいて迷入する因子は検出され

なかった。特性試験として核分析、アイソエンザイム分析を実施した。その結果、バンキングされた細胞はオリジナルのアカゲサルを保持しており染色体、アイソエンザイムに異常は認められなかった。更に、「FDA Point to Consider 1993」に定める手法で造腫瘍性試験を実施した結果、このバンキングした細胞は造腫瘍性が陰性であることを明かにした。この結果は、より安全性の高いワクチンを製造するために重要である。

今年度は、この LLC-MK2-Derivative 細胞のウイルス感受性について検証する目的で、2005/06 年シーズン以降に推奨あるいは実際に使用された、現行卵ワクチン用ウイルス株 7 種を LLC-MK2-Derivative 細胞へ接種し、その増殖性を、試験した。試験の際には、最もインフルエンザウイルスに対し感受性が高い MDCK-CCL34 や、RG に用いられ、日本脳炎ワクチン等で実際にワ

クチンの基質となっている Vero-CCL81 細胞を対照に用い比較検証した。

B. 研究方法

材料

LLC-MK2-Derivative 細胞

H17年に調製した LLC-MK2-Derivative のワーキングセルバンクより起こし継代・拡張した細胞を使用した。

対照の細胞

対照として、MDCK-CCL34 及び

Vero-CCL81 の 2 種の細胞を用いた。これらの細胞は、化血研が過去に ATCC より入手し、調製した細胞バンクより起こし、継代・拡張して試験に用いた。

ウイルス

近年ワクチン株として推奨あるいは実際に使用された以下の 7 種のウイルス株について、本研究のため感染研より分与を受け検討に用いた。

H1N1 亜型 2000 年から 2007 年シーズンまで用いられた A/New Caledonia/20/99 IVR116 株

H3N2 亜型 2005/06 年シーズンの WHO 推奨株となった、A/California/7/2004 株、同シーズンのワクチン株となった、A/New York/55/2004 株、2006/07 年シーズンの WHO 推奨株となった A/Wisconsin/67/2005 X-161 株、同シーズンのワクチン株となった A/Hiroshima/52/2005 IVR-142 株。

B 株 2005/06 年シーズンのワクチン株となった Yamagata-lineage の

B/Shanghai/361/2002 株、2006/07 年シーズンのワクチン株となった Victoria-lineage の B/Malaysia/2506/2004 株。

培地

LLC-MK2-Derivative 細胞は MEM 培地、MDCK-CCL34 細胞と Vero-CCL81 細胞は D-MEM 培地で培養した。それぞれの培地と添加物は以下の通りである。

MEM GIBCO 11095-080、DMEM GIBCO 11965-092、MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100×) GIBCO 11140-050、MEM Sodium Pyruvate Solution

(100×) GIBCO 11360-070、FOETAL BOVINE SERUM (New Zealand)

GIBCO 10091-148、ゲンタマイシン

SIGMA G-1397

方法

1. ワクチン株ウイルス液の感染価計測

まず、分与された 7 種のウイルス液の感染価を計測した。計測は 96well プレートに播いた MDCK-CCL34 細胞へ、10 倍段階希釈した各ウイルス液を接種し、34°C で培養を行い、接種後 5 日目に CPE の有無を well ごとに観察した。感染価は Kaber 法を用いて算出した。

2. ウイルス接種試験

LLC-MK2-Derivative 細胞、MDCK-CCL34 細胞、Vero-CCL81 細胞を 2×10^5 cells/mL となるよう調製し、6well プレートに 3mL ずつ播きコンフルエントになるまで 37°C の CO₂ インキュベータで培養した。ウイルスを接種しない well の細胞をトリプシンで消化し、細胞数を計測した。

計測した細胞数と、事前に測定した接種するウイルスの感染価より、それぞれの細胞について重複感染度 (Multiplicity of infection 以下 M.O.I と略) $10^{\wedge}3$ 、 $10^{\wedge}4$ 、 $10^{\wedge}5$ となるようウイルス液を希釈し細胞プレートへ接種した。接種後、1 μ g/mL のトリプシンを添加した血清を含まない D-MEM あるいは MEM 培地を 3mL/well で添加し、34°C の CO₂ インキュベータで培養した。培養は、CPE の出現により細胞が死滅した well が出現するまで実施した。

MDCK-CCL34 細胞は、接種後 3 日で細胞は CPE により死滅、剥離した。

LLC-MK2-Derivative は、接種後 5 日に、CPE により細胞が剥離・死滅した well が観察された。

培養後、培養液を回収し、320×g で 10 分遠沈し上清の HA 価と感染価を計測した。HA 価計測において、A/California/7/2004 株、A/New York/55/2004 株、A/Wisconsin/67/2005 X-161 株、A/Hiroshima/52/2005 IVR-142 株はモルモット血球で、A/New Caledonia/20/99 IVR116

株、B/Shanghai/361/2002 株、
B/Malaysia/2506/2004 株はニワトリ血球で
計測した。

3. Vero-CCL81 における追加試験

上記 2. の試験において、Vero-CCL81 では 2
週間の観察でも CPE の出現が確認されな
かった。そこで、トリブシン濃度を 2 およ
び 4 μ g/mL に、M.O.I. も 10 倍ほど変化させ
る等の接種試験を繰り返したが、7 種のウ
イルス株を接種した Vero-CCL81 は CPE が
観察されず、上清中の HA 価も観察されな
かった。

C. 研究結果

細胞へ接種したウイルスの感染価計測の
結果及び、LLC-MK2-Derivative 細胞と
MDCK-CCL34 細胞の感受性の検討結果を
表 1 にまとめて示す。

試験に用いたワクチン株を MDCK-CCL34
細胞へ M.O.I. = 10^{-3} ~ 10^{-5} で接種すると、
いずれの接種 M.O.I. でも接種後第 3 日で
CPE により細胞は死滅し、プレート面から
剥離した。培養上清中の HA 価をニワトリ
血球或いは、モルモット血球で計測した結
果、32 ~ 256 の HA 価であった。接種前の
ウイルス感染価とほぼ同等で株によつて
は接種前より高い感染価も観察された。同
じウイルスを LLC-MK2-Derivative 細胞へ
接種した場合、株によつては低い M.O.I. で
は CPE が観察されない場合もあった。より
高い M.O.I. 接種 well で CPE が観察された
培養第 7 日目で全ての well の培養上清を回
収し、それぞれ HA 価を計測した。その結
果、CPE が観察された well では HA 価が認
められた。観察された HA 価は 16 ~ 64 で
あった。

ウイルス感染価を計測した結果、CPE、上清
中の HA 価が認められた well ではウイルス
感染価も認められた。観察された感染価は、
 $10^{4.5}$ ~ $10^{7.5}$ TCID₅₀/mL であった。

MDCK-CCL34 細胞、LLC-MK2-Derivative
細胞と同じ条件でウイルスを接種した場
合、Vero-CCL81 細胞では全く CPE は観察
されず、培養上清中の HA 価も観察されな

かった。この結果を受け、Vero-CCL81 細
胞については、1) トリブシン濃度を 2、4 μ
g/mL に上げる、2) 文献に従い、培養期間中
2 日おきにトリブシンを追加する、3) 接種
M.O.I. を 1 まで引き上げる工夫を行い、試
験したが、いずれの試験においても細胞に
CPE は観察されず、上清中の HA 価も観察
されなかった。

D. 考察

昨年度までの研究で、LLC-MK2-Derivative
細胞の RG によるウイルスのレスキュー効
率は Vero-CCL81 細胞よりも高いことが明
かとなっている。さらに調製した
LLC-MK2-Derivative セルバンクの性状解
析の結果、各種の迷入因子が否定され更に、
バンキングした LLC-MK2-Derivative 細胞
は、造腫瘍性を示さないことが明かとなっ
ている。これらの性状は、RG によるワク
チン用シードウイルスを調製する基質と
して適していることを示す。

今年度は、LLC-MK2-Derivative 細胞が
RG の基質のみならず、ウイルス培養を目
的とした基質に成り得るかどうかを検証
した。もし、ワクチン製造のためのウイル
ス培養基質として十分な性状をもってい
ることが判明すれば、RG で調製されたシ
ードウイルスをそのまま、同じ培養基質で
ワクチンを製造できる可能性が高まる。
LLC-MK2-Derivative 細胞でのウイルスの
増殖性を検証する目的で、近年ワクチン用
株となったインフルエンザウイルス株を
複数選定した。H1N1 株は、2000 年から 2007
年シーズンまで使用された A/New
Caledonia/20/99 IVR-116 株を用いた。H3N2
株は近年毎年のようにワクチン株が変更
されているため、2005/06 年シーズンと
2006/07 年シーズンの WHO が推奨した株
および実際に国内で採用されたワクチン
株 4 種を用いた。これらの 4 種の株の内
2005/06 年シーズンの 2 株は、リアソータ
ント株ではない。2006/07 年シーズンの 2
株はリアソータント株である。B 株につい
ては、近年 Yamagata 系統と Victoria 系統の

ウイルス株が1,2年ごとに推奨・採用されている。今回は、2005/06年シーズンの Yamagata 系統の B/Shanghai/361/2002 株と、2006/07年シーズンの Victoria 系統の B/Malaysia/2506/2004 株を用いた。

MDCK-CCL34 にこれらのウイルスを M.O.I= 10^{-3} ~ 10^{-5} で接種した場合、培養第3日目には強い CPE により細胞が死滅・剥離した。培養上清中の HA 価は 32~256 であった。同一株内において M.O.I によって2管以上 HA 価が異なることはなかった。上清中の感染価はどの株も接種前のウイルス感染価とほぼ同等の力価を示した。M.O.I によって上清中の感染価に差はほとんど見られなかった。総じて MDCK-CCL34 細胞は発育鶏卵で継代されてきたワクチン用ウイルスに対し、発育鶏卵と同等の感受性を持っていることが示された。

LLC-MK2-Derivative 細胞へこれらウイルスを接種した場合、M.O.I= 10^{-3} では全てのワクチン株が LLC-MK2-Derivative 細胞で CPE を起こし、ウイルスが増殖できた。しかし、M.O.I= 10^{-4} 、 10^{-5} では株によっては CPE がおこらず、ウイルスが増殖しなかった。CPE の出現は MDCK-CCL34 細胞にくらべ遅く、接種後第7日目に出現した。第7日目にすべての well の培養上清を回収し、HA 価を計測した結果、CPE が出現した well の培養上清では HA 価が確認された。計測された HA 価は 16~64 で、MDCK-CCL34 細胞の培養上清にくらべ相対的に低い値であった。ウイルス感染価を計測した結果、CPE, HA 価が認められた well ではウイルスの感染価も認められた。計測された感染価は $10^{5.5}$ ~ $10^{7.5}$ TCID₅₀/mL で MDCK-CCL34 細胞における感染価より相対的に低い値であった。

株別に比較した場合、全ての株において MDCK-CCL34 細胞の方が高い感染価であった。LLC-MK2 細胞は、アカゲサル腎由来細胞を195代継代して得られた細胞である。LLC-MK2 細胞に関するインフルエ

ンザウイルスの増殖性は幾つかの報告がある。しかし、LLC-MK2 細胞を Eagle-MEM 培地へ馴化させ更に8代継代して作製された LLC-MK2-Derivative 細胞について、インフルエンザウイルスの増殖性を検討した報告はない。今回の検討において、MDCK-CCL34 細胞と同一の培養条件でインフルエンザワクチン株の増殖性を比較した結果、試験したウイルスは MDCK-CCL34 細胞の方が増殖性は高い結果であった。しかし、LLC-MK2-Derivative 細胞は同様なサル腎由来細胞である Vero-CCL81 細胞よりも、試験したウイルスに対して高い感受性を示した。

LLC-MK2-Derivative 細胞におけるインフルエンザウイルスの培養について、より至適な条件を設定すれば、MDCK-CCL34 細胞と同程度の感受性を示し得る可能性はあると考える。

今回、対照として用いた Vero-CCL81 細胞について MDCK-CCL34 細胞と同じ培養条件では、インフルエンザウイルスの増殖は確認できなかった。そこで、Nicolai らの報告(J Virol. 1995;69(4):2700-3.)を参考に、トリプシンの追加、接種 M.O.I を上げて培養を検討したが、試験したウイルスの増殖は確認できなかった。

これらの結果を総合すると、LLC-MK2-Derivative 細胞の現行インフルエンザワクチン株に対する感受性は、細胞由来ワクチン製造用基質として実用化されている MDCK 細胞には若干劣るものの、Vero 細胞よりはるかに高い感受性を持つ、更に至適条件を求めれば MDCK-CCL34 と同等の感受性を持つ可能性もあると考察される。

E. 結論

本研究において、RG によるウイルスが Vero 細胞より高い効率でレスキューされ、更に造腫瘍性が無い LLC-MK2-Derivative 細胞は、MDCK-CCL34 細胞と同一の条件でインフルエンザワクチン用ウイルス株を接種すると、MDCK-CCL34 には若干劣

るものの、Vero-CCL81 より高い感受性を示すことが明かとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

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)
	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

H5N1 型プレパンデミックワクチン株 (NIBRG-14、RG-Indonesia/5、RG-Anhui/1) は、産生誘導する感染防御抗体の赤血球凝集阻害 (HI) 活性や中和活性が低く、その原因メカニズムの解明と、より高感度な抗体検出法の開発が望まれている。本研究では、プレパンデミックワクチンが誘導する防御抗体はウイルス中和過程での補体依存性が高く、これが HI 試験や中和試験で検出しづらい要因の 1 つである可能性を見いだした。さらに、リコンビナントヘマグルチニン (HA)、ノイラミニダーゼ (NA) タンパクを用いた ELISA 法を開発し、従来の試験に比べ、より高感度に抗 HA・NA 抗体の定量を行うことに成功した。

A. 研究目的

H5N1 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、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高感度な検出法を開発する。

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 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) パキ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

組換え HA (rHA) と NA (rNA) 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。精製した組換えタンパク 5 μ g を SDS-PAGE にて分離後、ブROMOFENOL BLUE 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

rHA または rNA 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) 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

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 Clq タンパクを添加し (最終濃度 10 μ g/ml)、Clq 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) 補体因子 C1q の添加によるウイルス結合阻害活性の増強

NIBRG-14 抗血清と NIBRG-14 不活化ウイルスを前培養する際に C1q を添加すると、NIBRG-14 ウイルスの細胞への結合がより強く抑制されることが判明した (図 1)。

(2) rHA、rNA タンパクの作製

3 つのプレパンデミック ワクチン株 (NIBRG-14、RG-Indonesia/5、RG-Anhui/1) 由来 rHA と、2 つのプレパンデミック ワクチン株 (NIBRG-14、RG-Indonesia/5) 由来 rNA を作製することに成功した。図 2 には、精製 rHA と rNA の典型的な電気泳動の結果を示す。RG-Anhui/1 由来 rNA は現在作製中である。

(3) rHA、rNA タンパクを用いた ELISA 法の開発と抗 HA 抗体、抗 NA 抗体の検出感度の改善

ELISA 法を用いた場合、20,000 倍以上希釈した抗血清中の抗 HA 抗体価を検出することが可能となった (図 3)。これは、HI 試験と比較して 100 倍以上、中和試験と比較して 4 倍以上の検出感度の改善に相当する。同様に、ELISA 法を用いた場合、2,000 倍以上希釈した抗血清中の抗 NA 抗体価を検出することが可能となった。

(4) 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。3つのプレバンデミックワクチン株が誘導する抗体の 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4)。すると、NIBRG-14、RG-Anhui/1 ワクチンが誘導する抗体の HI 活性、中和活性は、2つの H1N1 ワクチンと比較し、有意に低いことが明らかとなった。一方これに対し、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。

(5) 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5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

通常の季節性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有効性が判定されてきた。しかし、プレバ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、HI 試験や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、CIq の添加により、HI 試験や中和試験による検出感度の改善が可能かどうか検証する必要がある。さらに、ELISA 法により抗 HA 抗体価と抗 NA 抗体価の高感

度な定量が可能となった今、これらのパラメーターを取り入れた感染防御抗体の評価が期待される。

抗 HA 抗体価の高感度な定量が可能となった結果、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、抗 H8 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義や感染防御に果たす役割について検討を加える必要がある。さらに、H5N1 で感作されたドナー血清に含まれる抗 H5 HA 抗体価と抗 NI NA 抗体価を ELISA 法で測定し、HI 試験や中和試験で得られるデータとの相関性を確認する必要がある。

E. 結論

プレバンデミックワクチンが誘導する中和抗体の正確な測定には、CIq が必要となる可能性が示唆された。ELISA によるヒト抗 HA 抗体の検出法を開発することに成功し、ワクチン有効性のより高感度な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., 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) Takahashi, Y. Memory B cells in systemic and mucosal immune response; Implications for successful vaccination. *Biosci. Biotech. Biochem.* 71:2358-2366, 2007
- (3) 高橋宜聖 免疫記憶を担うリンパ球とその機能を操る分子メカニズム 蛋白質 核酸 酵素 52: 31-36, 2007
- (4) 高橋宜聖 抗体産生経路の多様性とその生理的意義 化学と生物 45: 27-33, 2007

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」
(第37回日本免疫学会、東京、2007年11月)
- (3) 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」
- (4) 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.]

- (5) 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)
- (6) 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」
(第36回日本免疫学会総会、大阪、2006年12月)
- (7) 加地友弘、高橋宜聖、橋本修一、竹森利忠「Pathways for memory B cells」

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

なし