

分担研究報告書

新型インフルエンザワクチンの性状及び免疫原性の正確、かつ迅速な  
評価方法に関する研究

—新型インフルエンザワクチンの免疫原性評価法に関する研究—

分担研究者： 笠井 道之（国立感染症研究所 血液・安全性研究部 主任研究官）

研究要旨：新型インフルエンザワクチンは不活化全粒子型インフルエンザウイルスにアルミニウムアジュバントを加え、従来のHAインフルエンザワクチン以上に免疫原性を高めた製剤である。しかし、新型インフルエンザワクチンの免疫原性はインフルエンザHAワクチンの場合と同様にたん白質定量法によるインフルエンザウイルスたん白質抗原の量および一次放射免疫拡散法によるHA抗原量の評価のみであり、不活化型全粒子インフルエンザウイルスのたん白質、脂質及び核酸に由来する免疫誘導能力の評価は未だ不十分である。そこで、不活化型全粒子インフルエンザウイルスに由来する免疫誘導能力を評価することを目的として、転写因子（NF- $\kappa$ B）の下流にレポーター遺伝子（SEAP: secreted embryonic alkaline phosphatase）を組み込んだヒト由来モノサイト細胞株（THP細胞）を用いて不活化型全粒子インフルエンザウイルスの免疫誘導能力の評価をおこなった。

転写因子（NF- $\kappa$ B）の下流にレポーター遺伝子を組み込んだTHP細胞をマクロファージ細胞に分化させることにより、不活化型全粒子インフルエンザウイルスに誘導されるNF- $\kappa$ B活性を感度よく測定することが出来た。この測定により全粒子インフルエンザウイルスの免疫誘導能力を評価することにより、その不活性化プロセスをより精緻に管理することが可能となった。

A. 研究目的：新型インフルエンザワクチンは不活化型全粒子インフルエンザウイルスにアルミニウムアジュバントを加えることにより、抗原提示細胞における抗原提示能力やタイプI型インターフェロン産生能力などの免疫誘導能力を高めた製剤である。従って、これまで以上に精緻な免疫原性（免疫抗原の質と量および免疫誘導能力）に関する評価およびその管理が求められる。しかしながら、新型インフルエンザワクチンの免疫原性はインフルエンザHAワクチンの場合と同様にたん白質定量法によるインフルエンザウイルスたん白質抗原の量と一次放射免疫拡散法によるHA抗原量の評価のみであり、不活化型全粒子インフルエンザウイルスのた

ん白質、脂質及び核酸に由来する免疫誘導能力の評価は未だ不十分である。そこで、不活化型全粒子インフルエンザウイルス由来の免疫誘導能力を評価することを目的として、転写因子（NF- $\kappa$ B）の下流にレポーター遺伝子（SEAP: secreted embryonic alkaline phosphatase）を組み込んだヒト由来モノサイト（THP細胞）細胞株を用いて不活化型全粒子インフルエンザウイルスの免疫誘導能力の評価をおこなった。

B. 研究方法：転写因子NF- $\kappa$ Bの下流にレポーター遺伝子を組み込んだヒト由来モノサイト（THP-Blue-CD14）はinvivogenより購入し、manufacture's protocolに従い培養した。この細胞はTLR 2, 4, 6, 7, 8, 9とCD14

を強く発現する。培養液中にPMAを加えることによりマクロファージ様細胞へと分化し、TLRに対する感受性が高まる。さらに、転写因子NF- $\kappa$ B下流にレポーター遺伝子、SEAPをコードするレポーター遺伝子を組み込んだ。NF- $\kappa$ B転写因子の活性化に伴い培養上清中に分泌されるSEAP活性を測定することにより、TLRからのシグナル伝達によるNF- $\kappa$ B転写因子の活性化の度合いを調べることが可能である。

1 mg/mLのH1N1インフルエンザウイルス、H3N2インフルエンザウイルスおよびB型インフルエンザウイルスを4℃で0.5%ホルムアルデヒドを様々な処理時間で反応させることにより、不活化処理時間の異なる不活化型全粒子インフルエンザウイルスを作製し、実験に用いた。

不活化型全粒子インフルエンザウイルスの粒子性については、光散乱装置を用いて確認すると同時にその粒径を測定した。

(倫理面への配慮) 特になし。

C. 研究結果：THP-Blue-CD14細胞をPMA処理した後、マクロファージ化へと分化させ(以下PMA-Macと略す)、様々な濃度のTLRリガンドと24時間共培養後、NF- $\kappa$ B活性を調べた。PMA-MacはPam3CSK4 (TLR1/2), HKLM (TLR2), LPS (TLR4), FSL-1 (TLR2/6), ssRNA40 (TLR8)の各TLRリガンドに反応し、それらリガンドの濃度に依存してNF- $\kappa$ B活性を示したが、poly I:C (TLR3), CL087 (TLR7), ODN2006 (TLR9)のTLRリガンドにはNF- $\kappa$ B活性を示さなかった。

以上のTLRリガンド感受性を有するPMA-Macに不活化程度の異なる H3N2インフルエンザウイルスまたはB型インフルエンザウイルスを様々なたん白質濃度で加えて共培養した後、NF- $\kappa$ B活性を調べ、次の結果を得た。

1. 培養液中のホルムアルデヒド濃度は0.0078%以下でないとPMA-MacはNF- $\kappa$ B活性を示さない(図1, 2)。

2. 培養液に加えたH3N2インフルエンザウイルスおよびB型インフルエンザウイルスのたん白質濃度の増加に依存してPMA-MacのNF- $\kappa$ B活性は上昇する(図1, 2)。

3. 培養液に加えたH3N2インフルエンザウイルスおよびB型インフルエンザウイルスは

共に不活化期間の長さに応じてPMA-MacのNF- $\kappa$ B活性の低下を示す。この活性低下の度合いは、B型よりもH3N2の場合の方が大きかった(図1, 2)。

4. H3N2インフルエンザウイルスについては様々な不活化期間の後に培養液に加え、PMA-MacのNF- $\kappa$ B活性を調べた。図3に示すように活性低下は、不活化時間に対して一次的ではなく、40日前後で急激に低下するような現象を示した(図3)。

#### D. 考察：

1. PMA-Macは培養液中のホルムアルデヒド濃度が0.0078%よりも高い濃度でも死滅することはなく生存しているが、0.0078%以下の濃度でないとNF- $\kappa$ B活性を示さない。このことから、不活化全粒子インフルエンザウイルスはPMA-Mac細胞膜上のTLRを刺激するのに加えて、不活化全粒子インフルエンザウイルス自体を取り込むなどの動的刺激がPMA-MacのNF- $\kappa$ B活性発現に必要と考えられた。

2. H3N2インフルエンザウイルスおよびB型インフルエンザウイルスは共にホルムアルデヒドの処理時間の長さに応じてPMA-MacのNF- $\kappa$ B活性の低下を示すが、H3N2インフルエンザウイルスの場合は40日を境に急激に減少することから、ホルムアルデヒド処理によるインフルエンザウイルスの化学修飾が一定の閾値を越えるとNF- $\kappa$ B活性の急激な低下を誘導すると考えられる。さらに、B型の場合はホルムアルデヒド処理時間に依存してNF- $\kappa$ B活性が低下する度合いがH3N2インフルエンザウイルスの場合と比べて小さいことから、ホルムアルデヒド感受性ともいえるべきこの閾値は、ウイルスの種類や製造ロット間で異なっている可能性を示している。

E. 結論：不活化型全粒子インフルエンザウイルスによるマクロファージ様細胞のNF- $\kappa$ B活性発現を指標にして、不活化型全粒子インフルエンザウイルスの免疫誘導能力の評価系を構築することができた。この評価系は、インフルエンザウイルスの不活性化プロセス

スをより精緻に管理することが可能である。来年度はこの方法を用いて実際のワクチンに関するデータを蓄積すると共に、不活化型全粒子インフルエンザウイルスの有する免疫誘導能力を次の3つの方法を組み合わせることにより分子レベルで解明し、より精緻な免疫原性の評価と管理方法の確立を目指したい。

1. NF- $\kappa$ B活性を指標にした抗原提示細胞による不活化型全粒子インフルエンザウイルス取り込み・分解プロセスの解析。
2. 不活化型全粒子インフルエンザウイルスにおけるTLRリガンド様分子の生化学的分離・解析。
3. 不活化型全粒子インフルエンザウイルスから分離される核酸成分を用いたTLRリガンド様分子のクローニング。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表：第38回 日本免疫学会総会・学術集会 2008年12月

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

- 特になし。
1. 特許取得
  2. 実用新案登録
  3. その他

異なる不活化期間のH3N2ウイルスを様々な希釈率で培養液に加えて PMA-activated THP-1-blue-CD14 を24時間培養した後、NF- $\kappa$ B活性を測定した。

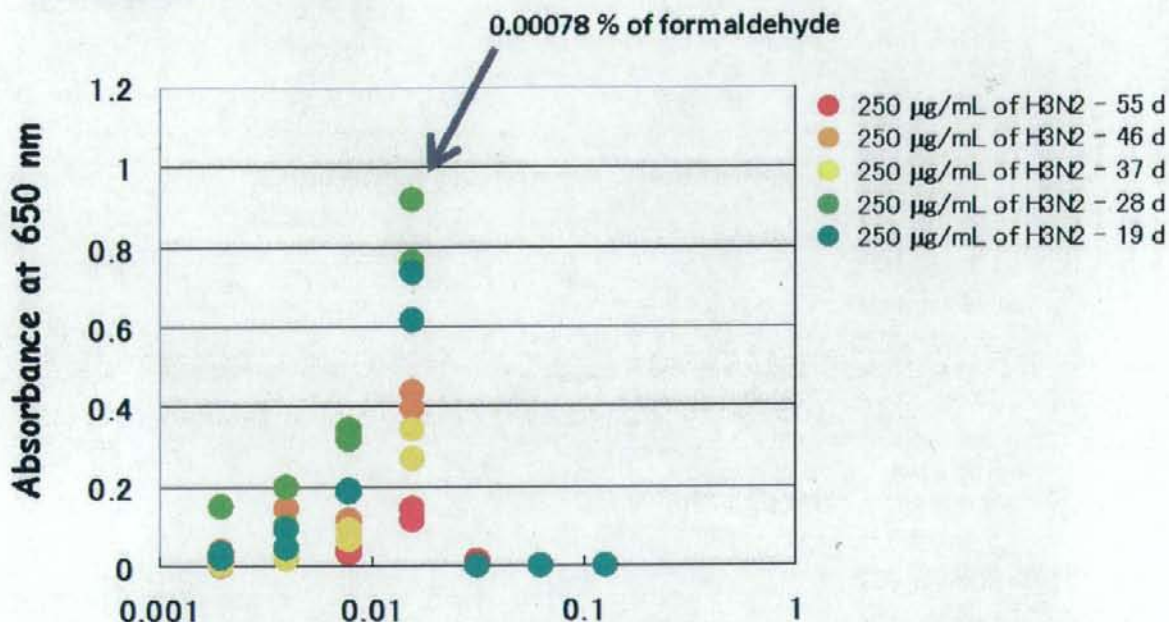


Figure 1

異なる不活化期間のB型ウイルスを様々な希釈率で培養液に加えて PMA-activated THP-1-blue-CD14 を24時間培養した後、NF- $\kappa$ B活性を測定した。

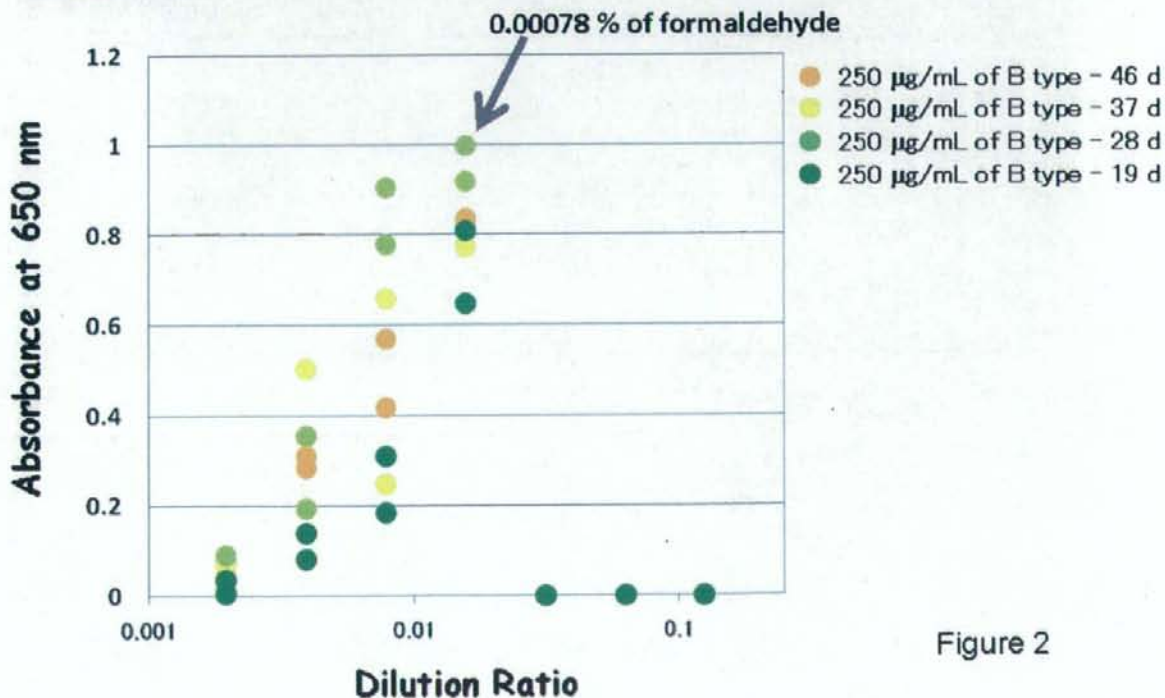


Figure 2

異なる不活化期間のH3N2ウイルスを培養液に加えてPMA-activated THP-1-blue-CD14 を24時間培養した後、NF-kB活性を測定した。

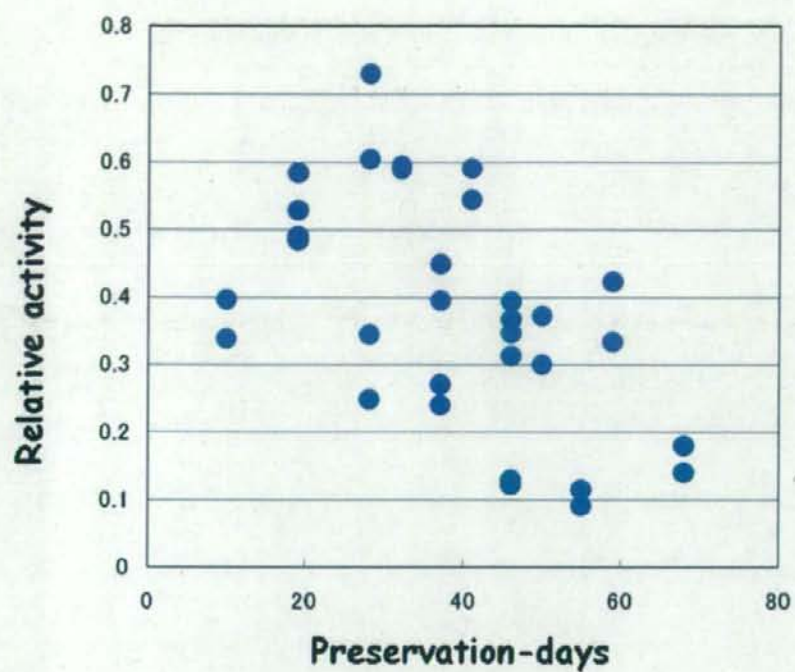


Figure 3