

率の低かった A、D 2 社のワクチン由来核酸の場合にはすべてアガロースゲルから抽出した PCR産物のクローニング後に配列を決定した。Table 2 に結果の一部を記した。HA遺伝子に関しては、A社とB社で5クローンずつ解析したが、A社のワクチン由来のクローンでは、B社の場合と比較して塩基配列が本来のウイルスの配列と異なっている場合が多く、またそのほとんどがU (またはA) から G、またはCへという変化であった (赤字で示した)。他社のワクチンから分離された核酸やM遺伝子の場合でも同様の、変化の一方向性が観察された。ウイルス液をホルムアルデヒド処理せずにPCR後に解析した場合には、HA遺伝子とM遺伝子で3クローンずつ解析したが、わずか1カ所に変異が検出されたのみで、その変化もGからAと、ワクチン由来のPCR産物に多く観察された変異とは異なっていた。また、ワクチン株からのPCR産物をTAクローニングした場合、全長を含むクローンが得られることは少なく、内部に欠失が起こっていることが多かったが、いくつかの欠失 (再結合) 部位の塩基配列をFig. 3に示した。赤字で示したように欠失と再結合の部分は、ほとんどすべてU/A の配列で起こっており、特定の塩基の (おそらくホルムアルデヒドによる) 変化が多く生じている可能性が示唆された。

6. 不活化ウイルス液、及び各製造所のワクチンのインフルエンザ感染関連遺伝子の発現に及ぼす影響: ワクチン等がインフルエンザ感染関連遺伝子の発現に及ぼす作用を調べるため、モノサイト系の培養細胞であるTHP-1を用いて Real time PCR による解析を行った。結果を Fig. 3に示した。ウイルス液の処理に用いたエーテル、及びホルムアルデヒドが一部細胞障害性を示すため、たとえばエーテル処理したA型ウイルスによる遺伝子発現は、コントロールとして用いたPBS(-)を加えた場合より抑制されるなど、実験系に多少の問題はあるが、おおよその傾向を知ることは可能であると思われた。この図からわかるように、エーテル処理したB型ウイルスは、A型ウイルスと比較してインフル

エンザ感染関連遺伝子の発現を5倍以上強く惹起することがわかった。ただし、ホルムアルデヒド処理を併用することによって、その発現は低下した。ホルムアルデヒド単独の処理の場合には、A型とB型ウイルスは、同程度の遺伝子発現を示した。市販のインフルエンザワクチンを用いて調べた場合、各社の製品のなかには界面活性剤を含むものもあり、その作用のため、単純な比較はできないが、製造所によってかなりの差があり、なかでもウイルス核酸を本来の形に近い状態で保持しているB社の製品は、A社の製品と比較して、インフルエンザ感染関連遺伝子の発現をより強く惹起する傾向が認められた。

D. 考察

A型インフルエンザウイルスは、ホルムアルデヒドによる不活化期間が長くなるほど特異プライマーによるPCR増幅の効率が低下したが、B型の場合はその低下の程度が小さかった。また、HA 遺伝子のほうが M遺伝子よりもPCR効率の低下が早いことも示唆された。同じ濃度、期間のホルムアルデヒド処理でもウイルスの型によって、またどの遺伝子を主に考えるか、などによって不活化の程度が異なってくるので、ワクチンの製造時には、きめこまかく検討していく必要があると思われる。1kb程度の核酸の増幅が可能の場合もあり、遺伝子が1kb前後の8本に分かれている分節ウイルスであるインフルエンザウイルスの場合は、組み換えにより復帰株などができる可能性もあるため、ホルムアルデヒドによる不活化の過程は、厳密に管理される必要があると考えられる。またホルムアルデヒドによる不活化が一部の塩基にかたよって起こっていることも明らかになった。

市販のインフルエンザHAワクチン(4製造所)を調べたところ、うち2社の製品からは比較的容易にウイルス遺伝子の増幅が可能であったが、他の2社の製品からはほとんど増幅が観察できなかった。後者の製品は、塩基配列の検討から

も、前2社と比較してホルムアルデヒドによる不活化が進んでいると考えられた。添加された界面活性剤の影響も除外できないが、製造所間で、製法その他に大きな差があり、そのことがワクチンの性状の差につながっていることが推察される。各製造所のワクチンの粒子径を調べた矢野の報告書にも、ほぼ同様の結果が示されている。また簡単な評価法ではあるが、モノサイト系の培養細胞であるTHP-1細胞に各ワクチンを添加した実験において、免疫系の遺伝子発現に及ぼす影響の差が示唆され、ホルムアルデヒドによる不活化が一部にとどまる製品のほうがインフルエンザ感染関連遺伝子の発現をより強く惹起する傾向があったことを考えあわせると、各製造所のHAワクチン間には性状の差があり、それにともなって、免疫誘導能力に差がある可能性もある、と考えられる。

E. 結論

インフルエンザウイルスは、ホルムアルデヒドによる不活化期間が長くなるほど特異プライマーによるPCR増幅の効率が低下したが、ウイルスの型や遺伝子によって大きな差があった。市販のインフルエンザHAワクチン(4製造所)を調べたところ、核酸の状態には製造所によって大きな差があり、現在の国家検定項目である、たん白質含量試験と力価試験ではほとんど差が認められない4社の製品間に免疫誘導能力に差があることを示唆する結果も得られた。

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：第57回 日本ウイルス学会学術集会 2009年10月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

不活化ウイルス液 及び 国産HAワクチン中の核酸のPCRによる増幅効率

Fig.1

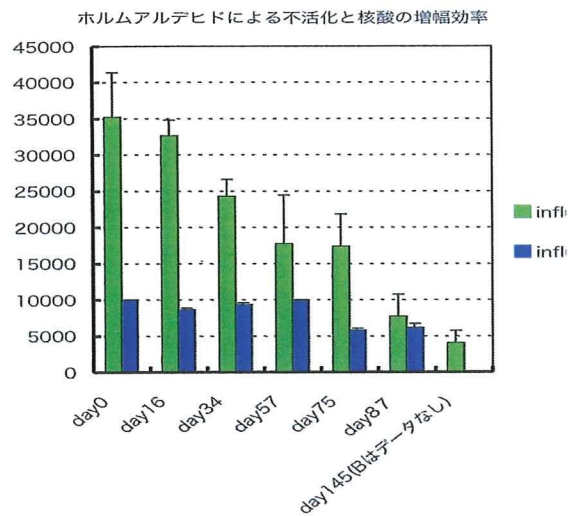


Fig.2

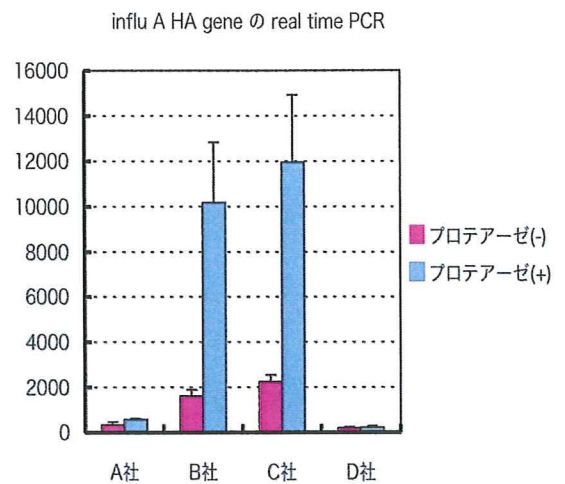


Table 1

プロテアーゼ処理前後の核酸のPCRによる増幅						
samples	製造所	PCR (Ex Taq)			Real time PCR	
		HA gene (A)	M gene	HA gene (B)	プロテアーゼ(-)	プロテアーゼ(+)
インフルエンザ HAワクチン	A	-	++		0.03	0.05
	B	++	+++		0.13	0.85
	C	++	+++		0.19	1.0
	D	-	+++		0.02	0.02
不活化ウイルス液	不活化				HA gene (A)	HA gene (B)
	day 0	+++	++	+++	1.0	1.0
	day16	+++	++	+++	0.93	0.86
	day34	++	+	+++	0.69	0.94
	day57	+	+	++	0.49	0.99
	day87	+	+	++	0.22	0.62
	day 145				0.11	

(不活化ウイルス液 及び)国産HAワクチン中の核酸配列の変化と
インフルエンザウイルス感染関連遺伝子の発現に及ぼす影響

Table 2

M gene clones			HA gene clones		
製造所	分析クローン数	基配列の変化	製造所	分析クローン数	塩基配列の変化
C	2	a(310) → g u(543) → c	B	5	a(158) → g
D	4	c(370) → a u(550) → g	A	5	u(110) → g a(236) → c u(238) → c u(245) → c u(282) → g g(1180) → (c) u(1199) → (c)
ウイルス液	3		ウイルス液	3	g(1170) → a

Fig.3

B社 HA clones



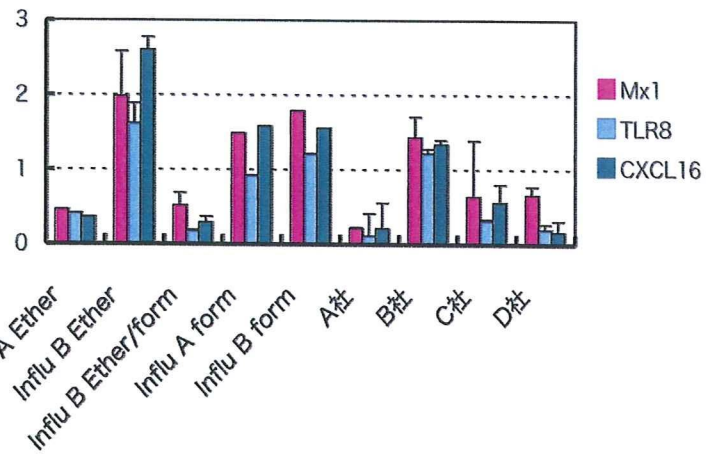
A社 HA clones



Fig.4

ワクチン 及び処理済ウイルス液のTHP-1 細胞に対する作用

PBS (-) の添加時と比較した遺伝子発現の変化



厚生労働科学研究費補助金（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）
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等不活化ワクチンの免疫原性評価方法に関する研究--

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）

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誘導能力の指標はインフルエンザ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のたん白質抗原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。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、昨年度は人由来モノサイト細胞株（THP細胞）を用いて転写因子（NF- κ B）の活性測定を実施した。本年度はNF- κ Bの作用で産生される炎症性サイトカイン（IL-1 β ）を定量することにより不活化型全粒子インフルエンザウイルスおよびそれに由来するHAワクチンの免疫誘導能力を評価した。
マクロファージに分化させたTHP細胞において、不活化型全粒子インフルエンザウイルスおよびHAワクチンにより誘導されるIL-1 β 産生量を指標にしてその免疫誘導能力を評価することができることを示した。

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、抗原提示細胞の抗原取り込みとその提示能力を高め、同時にinflammasomeの活性化を介した免疫誘導能力を発揮する製剤である。従って、新型インフルエンザワクチンの有効性・安全性の確保のためにこれまで以上に不活化型全粒子インフルエンザウイルス自体の精緻な免疫原性の管理（免疫抗原の質と量の管理および免疫誘導能力の管理）が求められる。しかしながら、不活化型全粒子インフルエンザウイルス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のたん白質抗原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。昨年度は、不活化型全粒子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人由来モノサイト（THP-1細胞）細胞株とその転写因子（NF- κ B）の下流にレポーター遺伝子を組み込んだ細胞株を用いて転写因子活性を測定した。本年度はそれに加えてその細胞の産生するIL-1 β 測定を行い、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についての評価系の構築を目指した。

B. 研究方法：① 人由来モノサイト細胞株 (THP-1) 及びその細胞に転写因子NF- κ Bのレポーター遺伝子を組み込んだ細胞株

(THP-Blue-CD14) を用いた転写因子活性測定および培養液中のサイトカイン測定：

細胞は共にinvivogenより購入し、manufacture's protocolに従い培養し、実験に用いた。THP-Blue-CD14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- κ B下流にレポーター遺伝子、SEAP(SEAP: secreted embryonic alkaline phosphatase)をコードするレポーター遺伝子を組み込んである。NF- κ 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- κ B転写因子の活性化の程度を調べることが可能である。

PMAを加えることによりマクロファージ化したTHP-1細胞の培養上清中のサイトカイン (IL-1 β , IL-18, IFN- β) をELISA法により定量した。

②不活化全粒子型インフルエンザウイルスの作成： 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℃の条件で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。不活化したインフルエンザウイルスの全粒子性は、光散乱装置を用いて確認するととも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：① THP-Blue-CD14細胞を用いた

転写因子活性測定とサイトカイン測定による不活化型全粒子インフルエンザウイルスの免疫誘導能の評価： THP-Blue-CD14細胞をPMA処理した後、マクロファージへと分化させ(以下PMA-Macと略す)、TLRリガンドと24時間共培養後、NF- κ 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性にNF- κ B活性が検出された。ODN2006 (TLR9) に対しては弱いNF- κ B活性が検出された(図1)。一方、polyI:C (TLR3), CLO87 (TLR7) のTLRリガンドに対してはNF- κ B活性を示さなかった。NF- κ B活性を示した培養上清中のIL-1 β , IL-18, およびIFN- β の量を測定したところ、Pam3CSK4 (TLR1/2), HKLM (TLR2), LPS (TLR4), FSL-1 (TLR2/6), ssRNA40 (TLR8) の各リガンドに対し、200pg/mL以上のIL-1 β を産生した。LPS (TLR4) とssRNA40 (TLR8) の場合に限りIFN- β が産生された。ODN2006 (TLR9) に対してIL-1 β とIFN- β は共にほとんど産生されていなかった(図2)。

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加えて共培養した後、NF- κ B活性を調べた。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- κ B活性の低下を示した。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2, 3)。さらに、IL-1 β の産生量も不活化期間の長さに応じて減少した。両者の不活化型全粒子ウイルスは共にIFN- β を産生しなかった(図2, 3)。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たワクチンの

場合は、IL-1 β に加えてIFN- β の産生が認められた。ワクチンの場合にはNF- κ B活性化およびIL-1 β とIFN- β の産生をほとんど示さなかった(図2)。

THP-1細胞を用いたサイトカイン測定によるインフルエンザワクチンの免疫誘導能の評価：①の実験は全てレポーター遺伝子を導入した細胞株を用いて行ったので、特にサイトカイン産生能力がもとのTHP-1細胞と異なる場合が想定された。そこで、THP-1細胞をPMA処理しマクロファージへと分化させた細胞を用いてサイトカイン測定を行った。

不活化型全粒子インフルエンザウイルス、そのHA化ワクチンおよび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たワクチンの3つの剤型についてサイトカイン測定を行った。3つの剤型いずれもIL-1 β とIFN- β を産生した(図4)。特に、HA化ワクチンの場合においてもIL-1 β とIFN- β 産生を認めたことは、HA化した場合でもIL-1 β とIFN- β の産生を誘導するリガンド成分があることを示唆していた。IL-1 β とIFN- β 産生は市販HAワクチンにも認められた。さらに、マウス腹腔内にHAワクチンを0.5mL投与し一日後に脾臓を摘出、ホルムアルデヒド固定・パラフィン包埋し、その薄切切片を抗IL-1 β 抗体で染色した。脾臓の白脾髄の間質細胞領域にIL-1 β 産生が認められ、HA化したワクチンのIL-1 β 産生能力をin vivoでも確認することができた(図5)。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たワクチンの場合はIL-1 β とIFN- β の産生に加えて、IL-18も産生した。アルミニウムアジュバントを加えたワクチンの場合、NF- κ B活性化を介したIL-1 β 産生に付け加えてinflammasome活性化によるIL-1 β 産生もあることを示唆していた(図4)。

D. 考察：

1. 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- κ B活性の低下とIL-1 β の産生能力の低下を示す。ホルムアルデヒド処理による両者の低下は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、処理時間に対して一次的な低下を示すのではないと考えられる。さらに、この減少の割合はB型の場合と比べて小さい。以上のことから、不活化型全粒子インフルエンザウイルスの免疫賦活能力は、ホルムアルデヒドの処理時間とウイルスの種類に依存することを示唆している。

2. 抗原提示細胞のIL-1 β の産生はNF- κ Bの活性化を介する場合とinflammasomeの活性化を介する場合が報告されている。不活化型全粒子インフルエンザウイルスおよびHA化ワクチン(またはHAワクチン)によるIL-1 β 産生はIFN- β の産生を伴うがIL-18の産生を示さないことから、主にNF- κ Bの活性化を介すると考えられる。逆に、アルミニウムアジュバントを加えた場合におけるIL-1 β の産生はIL-18の産生を伴うことから、inflammasomeの活性化を介すると考えられる。また、マウス腹腔内に0.5 mLのHAワクチンを投与した場合も脾臓の白脾髄の間質部分にIL-1 β の産生を認めた。以上の結果は、IL-1 β の検出と定量は不活化型全粒子インフルエンザウイルスのもならず、アジュバント添加ワクチンやHAワクチンの免疫誘導能力を推測する上で重要な因子になることを示唆する。

E. 結論：不活化型全粒子ワクチンによるマクロファージ細胞のNF- κ B活性発現とIL-1 β の産生を指標にした免疫誘導能力の評価系を構築することができた。特に、培養細胞株による

IL-1 β の産生を指標として、ワクチン株の免疫賦活化能力の評価ならびに全粒子ワクチンの不活性化プロセスやHA化プロセスの管理が可能であることを示している。さらに、ワクチンの免疫誘導能力をマウスなどのin vivoの系で評価する可能も示している。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表：

笠井道之：細胞質抗原のMHCクラスIIによる提示、
臨床免疫/アレルギー科，51(6)：573-579，
2009

2. 学会発表：

第57回 日本ウイルス学会学術集会 2009年
10月

第39回 日本免疫学会総会・学術集会 2009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

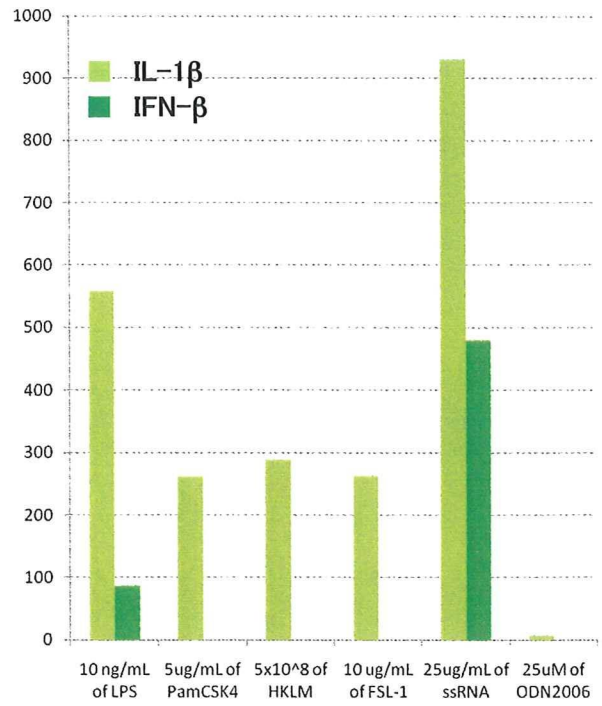
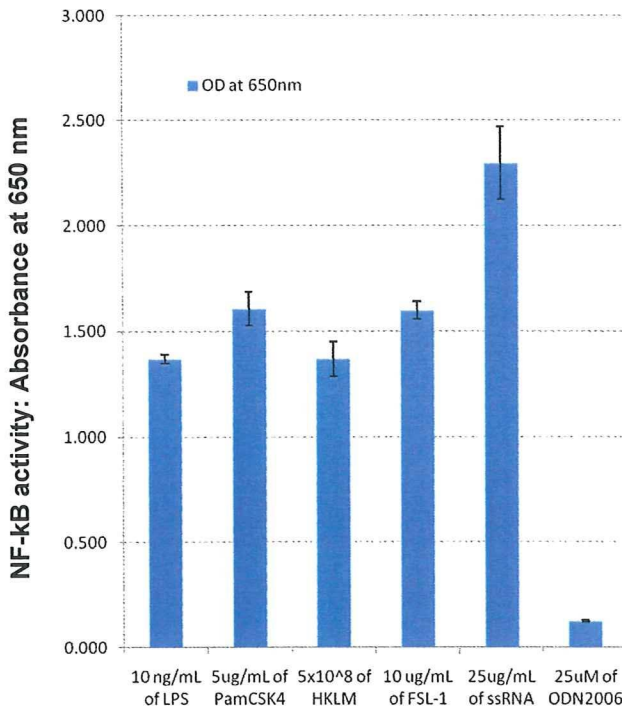


図1：様々なTLR agonistと共にPMA-activated THP-1を24時間培養した後、NF-κB活性とサイトカイン（IL-1βおよびIFN-β）量を測定した。

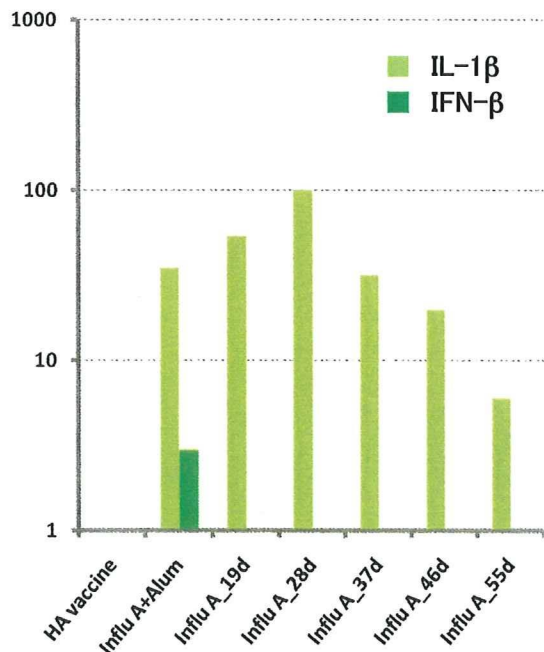
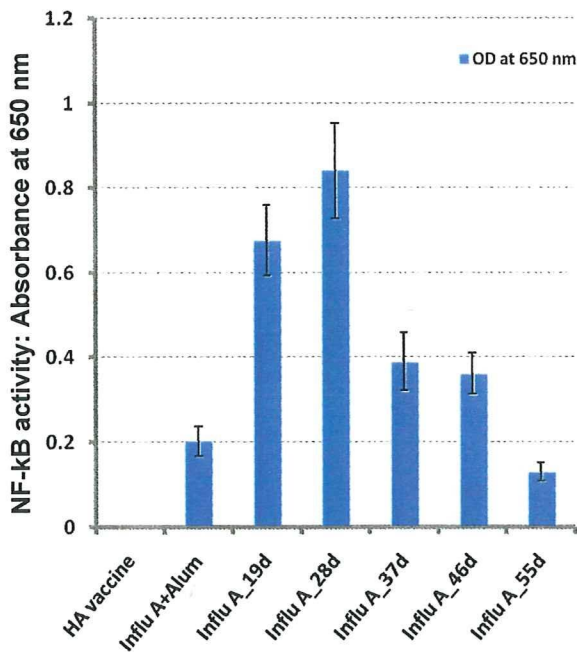


図2：異なる不活化期間のH3N2ウイルスを培養液に加えてPMA-activated THP-1-blue-CD14を24時間培養した後、NF-κB活性とサイトカイン（IL-1βおよびIFN-β）量を測定した。

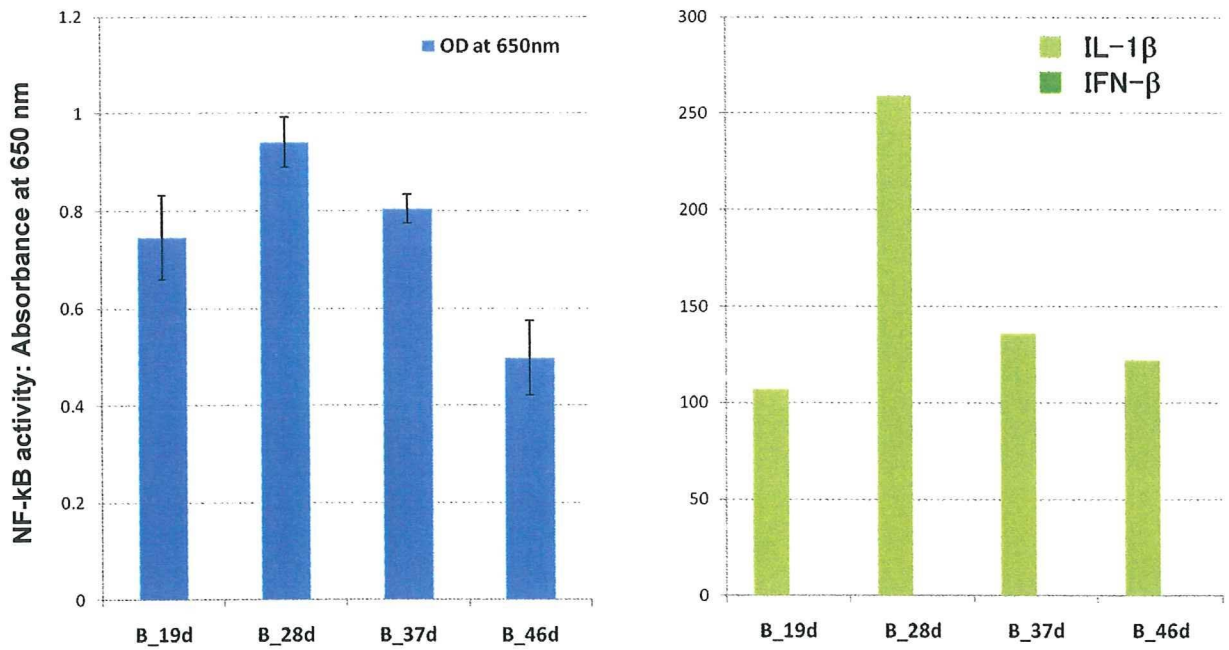


図3：異なる不活化期間のB型ウイルスを培養液に加えてPMA-activated THP-1-blue-CD14を24時間培養した後、NF-κB活性とサイトカイン（IL-1βおよびIFN-β）量を測定した。

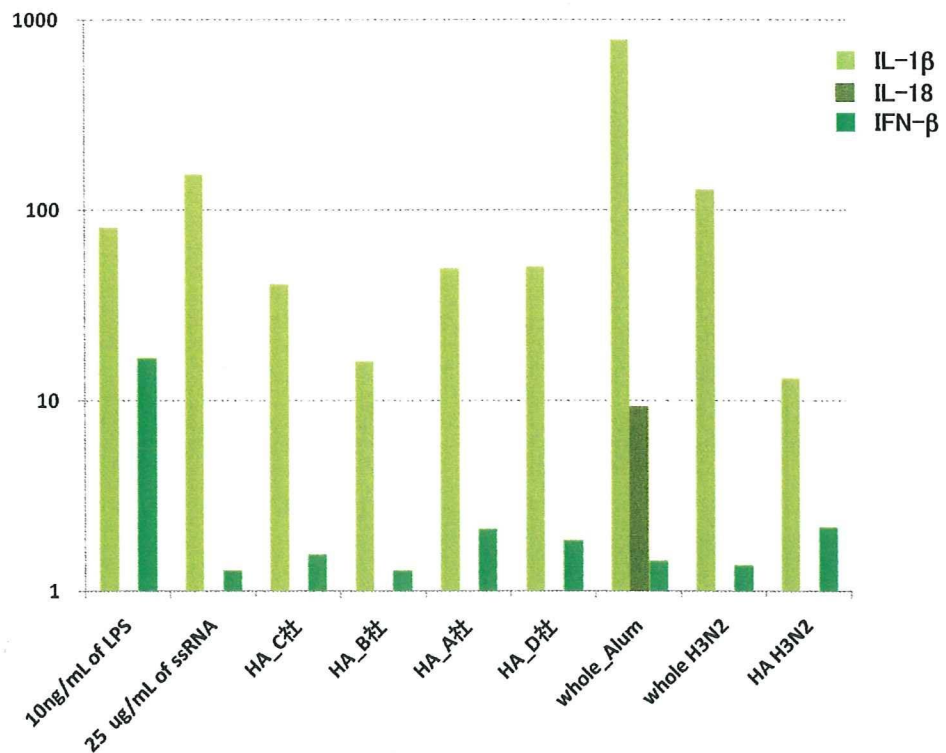
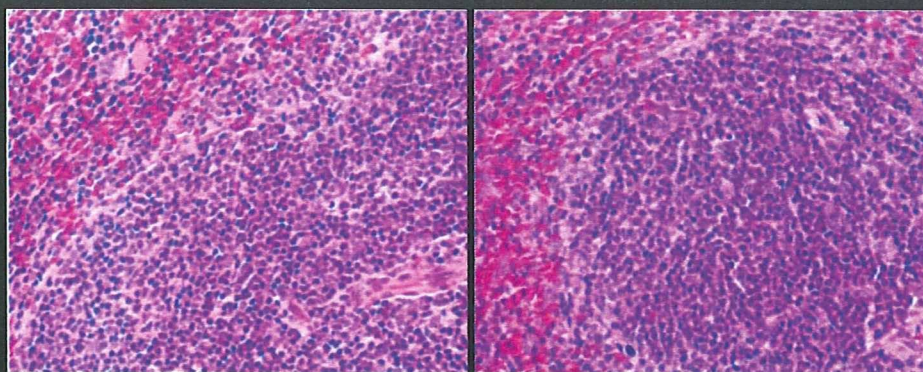
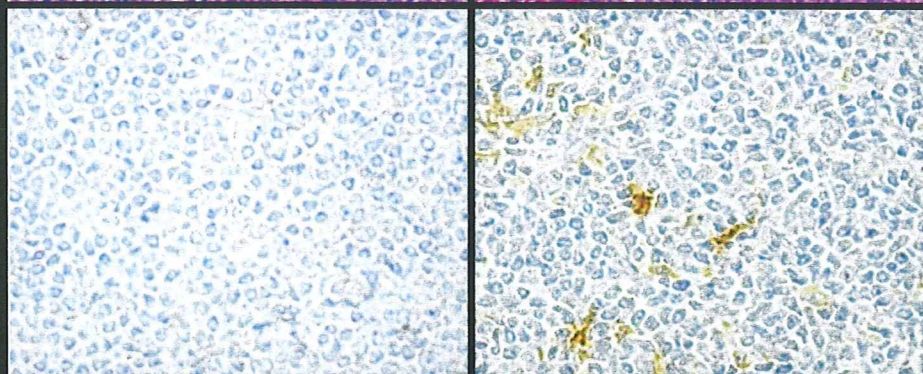


図4：不活化型全粒子インフルエンザウイルス、HAインフルエンザワクチンおよび不活化型全粒子インフルエンザウイルス+アルミニウムアジュバントを培養液に加えてPMA-activated THP-1を24時間培養した後、IL-1β、IFN-βおよびIL-18の産生量を測定した。

HE染色



抗IL-1 β
抗体



生理食塩水

HAワクチン

図5: マウス腹腔内に生理食塩水またはHAワクチンを0.5mL投与し一日後に脾臓を摘出、ホルムアルデヒド固定・パラフィン包埋し、その薄切切片を抗IL-1 β 抗体で染色した。

