

厚生労働科学研究費補助金

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  
(H20-医薬一般-005)

平成20-21年度 総合研究報告書

研究代表者 田中 明子

平成22年 3月

## 目 次

I. 総合研究報告		
新型インフルエンザ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	-----	1
主任研究者 田中 明子 (国立感染症研究所 血液・安全性研究部)		
II. 総合分担研究報告		
1. 動的光散乱(DLS)法によるインフルエンザウイルス粒度分布とこの方法を 適用したインフルエンザワクチンの新しい品質管理の試み	-----	5
分担研究者 矢野 茂生 (国立感染症研究所 血液・安全性研究部)		
2. 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	-----	8
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)		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	13
IV 研究成果の刊行物・別冊	-----	14

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）  
総合研究報告書

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

主任研究者：田中 明子（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：平成20年度と平成21年度で以下の研究を実施した。

わが国で開発、備蓄している新型インフルエンザワクチン(H5N1)はウイルス塩基配列上の強毒性に関与する遺伝子の一部を改変したワクチン株を、ホルムアルデヒドにより不活化し、アルミニウムアジュバントを加えた製品である。増殖させたウイルスの塩基配列が、改変した部分をはじめ、正確に保持されているのか、を常に検討する必要があるなど、現在用いられているHAワクチンと異なるこの製剤の品質管理には、その粒子性やウイルス核酸の状態、アジュバントを含む多様な成分により惹起される免疫誘導能の正確な評価などについての、新しい手法が必要であると考えられる。本研究では、3つの角度から品質管理手法の検討を行い、以下の成果を得た。

1) ホルムアルデヒド処理により不活化したウイルスと処理していないlive ウイルスについて、動的光散乱測定装置による粒度分布の計測を行ったところ、ともにウイルス本来の粒子径付近にシグナルを認めたが、ウイルスの型によっては、前者が超音波処理に抵抗性を示すようになるなど、粒子形状に変化が生じていることが明らかになった。市販HAワクチン（エーテル処理によりウイルス粒子の形状は失っている）についても本装置による計測で比較的容易に凝集物の粒子径等の情報を得ることができた。

2) 不活化ウイルス粒子及びHAワクチンからの核酸の分離、及び定量と塩基配列の解析などを行ったところ、製造所間で差はあるが、プロテアーゼによる処理などにより、市販のインフルエンザHAワクチンからもウイルス核酸が分離出来、PCR増幅後の同定、定量も可能であった。すなわち、目的のワクチン株が正確に複製され、維持されているかどうかを、不活化後でも検証できることがわかった。ただし、ホルムアルデヒドによる処理などの不活化処理が強力に行われた場合には、検出されにくい場合もあった。また、市販のHAワクチン中の核酸の量や性状には、製造所間で著しい差があり、ウイルス核酸が容易に分離、定量できた製品と、困難であった製品とがあった。さらに、核酸が保持されている検体のほうが、インフルエンザ感染関連遺伝子の発現を促進する傾向があることがわかった。

3) 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人由来細胞株を用いてワクチンの免疫誘導能力を評価できる系を構築した。サイトカイン等の測定を経時的に行うことにより、ワクチン中のウイルスの不活化の程度や免疫誘導能を定量でき、それらを用いた品質管理が可能となった。

分担研究者

- ・ 矢野 茂生（国立感染症研究所 血液・安全性研究部 主任研究官）
- ・ 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）
- ・ 板村 繁之（国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター 室長）

## A. 研究目的：

日本で開発中の新型インフルエンザワクチン(H5N1)はウイルス塩基配列の一部を遺伝子工学により改変して作成したワクチン株を不活化した後、アルミニウムアジュバントを加えた全粒子型不活化ワクチンである。しかし、現在行われている品質管理手法は、通常のインフルエンザHAワクチンに対するものとはほぼ同じであり、全粒子ワクチンであるにもかかわらず、その粒子形状を調べる試験や、遺伝子操作を加えた核酸がどのような状態にあるのか、等を検証する試験は、含まれていない。近年、粒子形状やウイルス由来の核酸が、免疫誘導能と密接に関連しているとの報告が数多くなされており、我々は、製剤中のウイルス由来成分の粒径分布やウイルス核酸の状態に関する試験が、ワクチンの有効性や安定度を規定するうえで重要と考え、これらの性状を評価する方法の開発を行った。主に検討した方法は、以下の3つである。1) 動的光散乱測定装置による粒度分布の測定、2) 不活化ウイルス粒子及びHAワクチンからの核酸の分離、及び定量と塩基配列の解析、3) 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人由来細胞株を用いてのワクチンの免疫誘導能力を評価できる系の構築とサイトカイン等の測定による免疫賦活化能の定量。方法についての基礎的検討に加え、品質管理手法として有用であるかどうかを、市販のワクチンに適用して検証した。

## B. 研究材料と方法

2008年度のインフルエンザHAワクチン株である、A/Brisbane/59/2007 (IVR148) (H1N1)、A/Uruguay/1716/2007 (X175C) (H3N2)、B/Florida/4/2006 の3種類をそれぞれ鶏卵で増殖させたのち、精製し、ホルムアルデヒドで不活化したものを実験に供した。不活化の条件については、平成21年度の田中の分担研究報告書(p17)を参照。また、市販(全4社)のインフルエンザHAワクチン(ウイルス粒子を精製した後、エーテル処理して、たんぱく質を解離(split)し、かつホルムアルデヒドで不活化したものを)を購入して解析に用いた。

(倫理面への配慮) 特になし。

## C. 研究結果

1. 動的光散乱法による、ワクチン中のインフルエンザウイルス由来粒子の分布測定：動的光散乱法による粒度分布測定を行い、条件検討を行った後、

実際に、インフルエンザワクチン株を不活化した検体(全粒子型ワクチン)や市販HAワクチンの測定を行った。全粒子型ワクチンは、ホルムアルデヒド処理の有無にかかわらず、電子顕微鏡で観察されるウイルス径にほぼ等しい粒子径として測定できた。ただし、ウイルスの型によっては、ホルムアルデヒド処理後に、性状が変化したかにもえた検体もあった。HAワクチンは、製造工程中で脂質除去のためのエーテル処理が行われており、外膜の破壊により、ウイルス粒子がたんぱく質、核酸等の凝集物(ロゼッタ、半径10-30nm程度)になっていると考えられている。4 製造所のHAワクチンの粒子径を測定したところ、製造所ごとに特徴のあるパターンを示し、各社の製造工程の差が示唆されるとともに、粒子径の測定を、工程中の品質の評価等に用いることが可能であると考えられた。

2. 不活化ウイルス液、及び市販のインフルエンザHAワクチンからの核酸の抽出、PCRによる増幅とその定量：不活化したウイルス液、及びHAワクチンから核酸を抽出する方法を検討したところ、たんぱく質分解酵素で処理することにより、ホルムアルデヒド処理したウイルス粒子、HAワクチンからも解析に十分な量のウイルス核酸を分離できることが明らかになった。Real time PCR等を用いて定量した結果、型によってホルムアルデヒドによる不活化への抵抗性が異なっており、B型ウイルスは、ホルムアルデヒド処理が長期間に及んでも核酸の分離に対する影響はほとんどなかった。市販のHAワクチン中の核酸を同様に解析したところ、製造所間で、増幅効率において、20倍から50倍程度の差があった。また、ホルムアルデヒド処理後の核酸を増幅した場合、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あり、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。ウイルス液をホルムアルデヒド処理せずにPCR増幅後に解析した場合には、上記のような変化は観察されず、塩基配列の変化がホルムアルデヒドによる不活化と密接な関係があることが示唆された。

3. 免疫誘導能の評価法の開発：数種類のTLRリガンド感受性を有する細胞を、マクロファージへと分化させた後、不活化期間の異なるウイルス液やHAワクチンを加えて共培養し、NF- $\kappa$ B活性とそれによるサイトカインの産生を調べた。その結果、ウイルスのたんぱく質濃度とNF- $\kappa$ B活性が相関を示すこと、不活化の期間に応じて活性の低下が示されたことなどから、不活化プロセスの管理や、免疫賦活化能力などの評価にこの系を用いることができると考えられた。

また、不活化したウイルス液や各製造所のHAワクチンが、モノサイト系の培養細胞のインフルエンザ感染関連遺伝子の発現に及ぼす影響を、Real time PCRにより調べた。粒度分布測定で、大きな粒子径を維持していると考えられた検体のほうが、インフルエンザ関連遺伝子の発現を惹起しやすい傾向があり、ここでも製造所間の差が明確であった。

#### D. 考察

新型インフルエンザワクチン等不活化全粒子ワクチンの品質管理に用いる新しい手法を開発する目的で、ワクチン中に含まれるウイルス粒子の形状の測定、ウイルス由来の核酸の分離とPCRによる増幅、定量、不活化ウイルス粒子による免疫誘導能の定量的測定法の検討を行った。ホルムアルデヒドにより不活化されたウイルス粒子の性状に関しての同様の試みは、我が国でも海外でもほとんど報告されておらず、解明は、すすんでいない。

今回ワクチン中の粒子径測定に用いた動的光散乱法、は対象粒子の情報が測定に必要なため、ウイルスなどの物性（比重や屈折率など）が不明な微粒子の粒径測定に適していると考えられる。測定時間が短いため、測定機器の価格は、かなり高額ではあるが、全粒子ワクチンの品質管理に非常に有用な手法と考えられる。海外ワクチンメーカーでは、ウイルス様粒子を用いたワクチンの品質管理などに、すでに導入しているところも多い。

不活化ワクチン中の核酸の分離と解析には、かなりの困難が伴うと予想していたが、ウイルス粒子の形状が維持されず、核酸の分解がすすんでいると推測されたインフルエンザHAワクチンからでも、解析に十分な量の核酸が容易に分離できた。ワクチン株作製時に、塩基配列上で変異を導入した部位が維持されているか、別の変異が起こっていないかなども、ワクチン製造後、不活化された状態でも検証できると考えられる。また、PCRにより、1.0 kbを越える増幅が可能であったことから、分節ウイルスであるインフルエンザの場合は、一つの遺伝子のほぼ全長が読みとり可能である、と考えられることになり、ホルムアルデヒドの濃度が低い場合、混合感染で新たなウイルスができる可能性も完全には否定できない。ホルムアルデヒドによる不活化の過程は、厳密な品質管理下で行われる必要があると思われる。

市販のインフルエンザHAワクチンの場合、添加された界面活性剤が異なっているため、との可能性も除外できないが、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中の核酸の性状の差

につながっていると推察される。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。

不活化ウイルス液、またはHAワクチンによるIL-1 $\beta$ の産生は、IL-18の産生を示さないことからNF- $\kappa$ Bの活性化を介すると考えられる。反応系中のホルムアルデヒド濃度がかなり低濃度でなければ、NF- $\kappa$ B活性が検出できないことから、活性発現には、細胞膜上のTLRに対する刺激のみではなく、不活化ウイルスの取り込みなどの他の刺激が必要と考えられた。また、A型および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期間の長さに応じてNF- $\kappa$ B活性の低下を示したが、その程度は、型によって異なり、この点からもホルムアルデヒドによる不活化過程の厳密な管理が必要であることが示された。IL-1 $\beta$ 産生能力は、やはり不活化期間の長さやウイルスの型、市販のワクチンの場合は、製造所による差を示した。また、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も、インフルエンザ感染関連遺伝子の発現に大きな差があったことなども考えあわせると、各製造所のHAワクチン間には単なる性状の差のみではなく、免疫誘導能力に差がある可能性もある、と考えられた。

#### E. 結論

本研究では、日本で開発中の新型インフルエンザワクチン（不活化全粒子ワクチン）の新規品質管理手法として、ワクチン中のウイルス粒子の性状や、核酸の状態を測定する方法について検討した。また、ワクチンによるマクロファージ細胞のNF- $\kappa$ B活性発現を指標にした免疫誘導能力の評価系を構築し、これらの方法を用いて、全粒子ワクチンの不活性化プロセス、ワクチン中のウイルス粒子の性状をより精緻に解析することができた。これら3つの方法を、現在市販されているHAワクチンに適用して得られた結果は、密接に関連していた。すなわち、粒子形状が保たれている製品は、核酸の分離も容易で、塩基配列もホルムアルデヒドによる変化が少なく、また、インフルエンザ感染関連遺伝子の発現が惹起されやすい傾向があった。すなわち、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社のインフルエンザHAワクチン間に、単に性状の違いにとどまらず、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：研究成果の刊行に関する一覧表参照  
(p13)

2. 学会発表：

笠井 道之

第37回 日本免疫学会総会・学術集会  
2008年12月

田中 明子、笠井 道之 矢野 茂生  
第57回 日本ウイルス学会学術集会  
2009年10月

原田 勇一、板村 繁之他  
第57回 日本ウイルス学会学術集会  
2009年10月

笠井 道之

第38回 日本免疫学会総会・学術集会  
2009年12月

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし。

## 総合分担研究報告

動的光散乱（DLS）法によるインフルエンザウイルス粒度分布と  
この方法を適用したインフルエンザワクチンの新しい品質管理の試み

分担研究者 矢野 茂生

研究要旨：ホルムアルデヒドによる不活化が粒子的性状に及ぼす効果を明らかにするため、3種（A/H1N1、A/H3N2、B）のインフルエンザウイルスを用いて、動的光散乱（DLS）法によるウイルスの粒度分布を測定した。その結果、不活化処理をしたウイルスの粒度分布と平均粒子半径に顕著な変化は認められなかった。さらに不活化の有無によるウイルス粒子の性状変化を調べるために、超音波を照射して粒度分布を測定した結果、不活化したA型インフルエンザ（H1N1、H3N2）の主粒度分布は不活化をしない検体とほぼ同一で変化が見られなかった。B型の場合、不活化した検体は照射による主粒度分布の変化は見られなかったが、不活化が未処理の検体は照射により粒度分布パターンが変化した。ワクチンの品質管理への応用を考え、このDLS測定システムの測定精度と再現性をポリスチレン標準粒子を使用して評価した。さらに国内メーカー4社の2009年度季節型インフルエンザHAワクチン製剤（A/H1N1、A/H3N2、B）の粒度分布測定を実施し、分析と検討をした。その結果、測定システムは、ポリスチレン粒子などの単分散系の測定では、非常に精度の良い、再現性のある測定結果を与え、システムに十分な堅牢性があることを示した。一方、HAワクチンは、すべての測定で得られた粒度分布から、製剤はすべて多分散系であることが判明した。全く同一のサンプルであっても測定回毎に異なる分布を与え、標準PS粒子の粒度分布のような高い再現性は得られなかった。しかし、これらの分布の相関関数を平均化処理した結果、二峰性又は三峰性粒度分布（粒度半径：1nm～10000nm）が得られた。各分布ピークを、G1（50nm以上：ウイルス粒子又はそれらの凝集体）、G2（10nm以上～50nm未満：ロゼッタ凝集体）、G3（3nm以上～10nm未満のピーク：たんぱく質又はその重合体）、G4（1nm～3nm未満：たんぱく質以外の低分子又はその多量体）の4つに分類し、粒度分布を分析した結果、メーカー別、ロット別により、粒度分布に特徴を有することが判明した。HAワクチン製造工程の品質管理の試験法とするには、現在は堅牢性に問題があるが、抗原の粒子径と免疫活性の関係が示唆されれば、ワクチンの品質管理試験としてだけでなく、粒度分布がワクチンの有効性評価に必要となる可能性があり、将来、この測定法が評価されるものと考えられる。

## A. 研究目的

ワクチンの有効性、保存安定性、および品質管理等に関係して、ワクチン中の抗原粒子の粒径の大きさを研究した報告は少ない。また、ウイルス粒子がワクチン製造の各工程でどのような変化を生じるのかについて情報は十分ではない。この試験研究は、当初、パンデミックインフルエンザ対策として、現在国内で製造、備蓄されている新型インフルエンザワクチンが、従来のコンポーネントHAワクチン（季節型）と性状・製法が大きく異なる全粒子ワクチンであることから、ワクチンの抗原粒子の大きさを検討課題と考え、インフルエンザワクチンの粒度分布を動的光散乱法を用いて測定し、粒子的性状を明らかにしようとした。初年度はウイルス粒子の種類と不活化による粒径変化を明らかにするための基礎研究を実施した。次年度は、初年度の結果をふまえ、ワクチンの品質管理試験と有効性の評価法として適用できるか、HAワクチンを用いて、粒度分布を測定し、検討した。

## B. 研究方法

## (1) 使用した測定機器

- ・動的光散乱測定装置：Viscotek製 Model 802DLS  
レーザー光源：50mW、 $\lambda=830\text{nm}$   
測定範囲：1nm～1000nm  
（定性表示は>2000nm）  
測定用石英セル：最小容量 12  $\mu\text{L}$   
解析ソフト：OmniSIZE Ver. 3

- ・粘度測定装置：AND製 SV-10 振動式粘度計

- ・屈折計：ATAGO製 PAL-RI

- ・超音波洗浄機 YAMATO Branson 2200 (60W、45kHz)

## (2) 試料

- ・標準ポリスチレン粒子（トレーサブル）：JSR製 STADEX（濃度1%、10mL；粒径：29nm、61nm、100nm）。測定にはこれらの液を100倍希釈して使用した。
- ・インフルエンザウイルス液（A型H1N1、A型H3N2、B型）の培養液およびこれらの不活化ウイルス液
- ・ワクチン：国内メーカー4社が2009年度に製造市販した3株（A/H1N1、A/H3N2、B）からなる季節型

インフルエンザ HA ワクチン(0.5 mL 又は 1 mL / 1 バイアルの無色透明液)

・局方注射用水 (20 mL、大塚製薬)

### (3) 測定法

・測定温度: 20°C

・データサンプリング時間: 10 秒または 30 秒 / 1

回

・測定測定に使用したサンプル量: 40 ~ 50  $\mu$  L

・測定測定回数: 10 回以上 (測定上限: 99 回)

データ棄却条件を次のように設定した。

・測定粒子カウント数の設定:  $300 \times 10^3$

・測定スパイクピーク許容: 20%

・測定ベースライン変動: 15%

ウイルス粒子測定の場合、P2 室クリーンベンチ内に動的光散乱装置を設置し、そのエリア内にてサンプリングと測定を実施した。検体液 40  $\mu$  L を測定用石英セルに採取し、密栓して 20°C の装置にセットした。5 分後、測定を実施した。超音波処理の検体測定は 3 回に時間を分割して次の手順で超音波照射を実施した。約 500  $\mu$  L の検体をポリプロピレン遠心管に採り、水浴 (20°C) に浸け、1 分間超音波照射後、取り出し、その一部 (40  $\mu$  L) を採取し測定に用いた。さらに残液を超音波処理 (5 分間) し、その一部を測定した。最後に、残液を再度、超音波処理 (5 分間) し測定した。データ採取は連続 10 回繰り返して 1 検体の測定を完了した。解析では、PBS の屈折率と粘度をそれぞれ、1.3330 と 1.0190 とした。インフルエンザ HA ワクチン測定の場合、測定セルは 20°C の測定装置に固定装着した。サンプル注入前に注射用水 (5 mL) を用いて、アスピレーターで吸引洗浄し、キャリアオーバーがないことを確認し、サンプルを充填して 3 分後に測定を開始した。

## C. 研究結果

動的光散乱 (DLS) 装置で、ブラウン運動している液体や微粒子の散乱光を観測し、拡散係数を評価して粒子の流体力学的回転半径 (R) を求めることができる。この原理では微粒子の材質は関係がない。必要なパラメーターは分散媒体の粘度 ( $\eta$ ) と屈折率 (n) のみで、ウイルスなどの物性 (比重や屈折率など) が不明な微粒子の粒径測定に非常に適していると判断した。また測定操作に熟練度を必要とせず、測定時間も非常に短時間であった。粒度分布測定データは横軸に粒度 (流体力学半径)、縦軸を相対比で表示した。分布は散乱強度 (I)、容量/質量 ( $I/R^3$ )、数量 ( $I/R^6$ ) の 3 種のモードで表示した。粒径の不明なインフルエンザウイルス粒度分布の測定では数量表示を、HA ワクチンの粒度分布では成分量が問題となるため、質量表示を選択した。

### (1) ウイルス粒度と不活化の効果

動的光散乱測定から得られる流体力学的回転半径 (R) の値は、一般に  $R$  (散乱強度)  $> R$  (容量)  $> R$  (数量)

となることを、標準品ポリスチレン粒子 (60 nm) とインフルエンザウイルス (A 型 H1N1) の粒度分布測定から確認した。また、得られた粒度分布は、いずれも単一ピークの分布を示した。ウイルスの平均分布中心は 110 nm (平均半径 55 nm  $\times$  2) と計算され、これは予想されたウイルスの粒径 (80-120 nm) の範囲内の値であったことから、この測定分布がウイルス粒子の粒度分布であると判断した。3 種類のウイルス液にホルムアルデヒドを加え、4°C で 40 日間処理した不活化ウイルスと未処理のウイルスについて、粒度分布を測定した結果、粒径 (nm) はそれぞれ、A 型 H1N1: 110 (不活化あり)、109.2 (不活化なし); A 型 H3N2: 110 (不活化あり)、117 (不活化なし); B 型: 111 (不活化あり)、108 (不活化なし) であった。不活化処理した 3 種類のウイルスのウイルス液は 100 nm ~ 2000 nm の領域で微量ながら凝集塊の存在が検出されたが、主分布と比較してほとんど無視できる量であった (0.1% 以下)。一方、不活化を実施しなかったウイルス液には検出されず、検出限界以下であった。平均粒径や分布の形がほとんど同一の結果が得られたことから、試験に使用したホルムアルデヒド濃度 (0.1%) を用いた不活化はウイルス粒度分布に影響を及ぼさなかった。ホルムアルデヒドがウイルス粒子に力学的強度の変化を与えているのか調べるために、A 型 H1N1、A 型 H3N2、B 型の各ウイルスの不活化処理と未処理のウイルスについて、超音波を一定条件で照射し、その粒度分布変化を測定した。微弱な変化を強調するため、数量表示に代えて散乱強度表示した。超音波は間隔を空けて 1 分間、5 分間、5 分間の順に照射した。H1N1 (不活化なし) では照射前では小さな凝集塊が観測されが、1 分間の照射により消失した。新たな粒度分布の生成はなく、主分布の変化はほとんど観察されなかった。H1N1 (不活化あり) も照射前では凝集塊が観測された。照射により主分布の左右の領域に新たな小分布の発生があった。特に、20 nm 付近の小分布は照射時間が増加するに従い、粒度低下が観測されたが、主分布の変化はほとんど観察されなかった。H3N2 は主分布以外にやや大きい分布が観察され、照射後、この分布は変化したが、主分布パターンに変化は見られなかった。B (不活化あり) は照射前に主分布の左右に小分布が観測され、照射後も分布パターンであった。主分布の変化はみられなかった。B (不活化なし) は照射前に主分布よりおおきな凝集塊が観測されたが、照射後に消失した。主分布は照射 1 分間で粒度分布が変化し、主分布より粒度が小さい分布が生成したと考えられる分布パターンが観測された。

### (2) サンプル液と DLS の 90° 散乱光強度

4 種のサンプル (局方注射用水、直径 100 nm のポリスチレン (PS) 標準粒子、製造メーカー 2 社のインフルエンザ HA ワクチン製剤) を用いて、入射光の 90° 散乱光強度と測定セルの温度の変動の 8 分間のデータ



採取モニターを比較した。散乱強度は $300 \times 10^3$  カウントになるように入射強度を自動設定した。局方注射用水はスパイクノイズや散乱光強度の時間変動(400カウント程度)がほとんど無いことを確認した。実験に適した水の選択については、ミリQ水、局方注射用水、局方生理食塩液を調べた結果、散乱強度のノイズ、品質の均一性、使い易さ(容量:20mL)の点で、局方注射用水が優れていた。ポリスチレン(PS)標準粒子では8分間にスパイクノイズによりデータ採取が3回棄却された。PS微粒子の熱運動による揺らぎが顕著に散乱光に反映され、約2秒の周期で小さな振幅(10カウント)の変動波が観測された。2つのインフルエンザHAワクチン製剤では、データ棄却が多数生じた。また棄却数に差があることから、変動パターンやスパイクピーク量が明らかに製剤毎に異なることが判明した。

### (3) 分布の精度と信頼性

実験に使用した粒度測定装置の精度と再現性を標準ポリスチレン粒子(直径 $100 \pm 3$  nm、NIST公証品)を用いて調べた。測定は上記の測定条件で11回実施した。その結果、11回の粒子半径の測定値はほぼ一定で再現性が非常に高かった。測定される粒子の粒子半径が均一(偏差:  $\pm 3$  nm)に揃った単分散の集団の測定の場合、我々の実験に使用した装置では再現性のよい相関関数が得られ、内臓されているアルゴリズム処理により極めて正確に平均粒子半径が測定された。また狭い分布パターンが得られ、サンプルの特性をかなり忠実に表示できることが確認された。次に、多分散系の粒度分布測定の場合として、 $100 \mu\text{g/mL}$ の標準PS粒子(粒径が①:60 nm、②:200 nm)とこれらの等量混合液の測定を実施し、それぞれの粒度分布を得た。単分散の場合は、それぞれの半径が31.1 nm、99.5 nmと測定され、非常に精度よい値が得られた。一方、等量混合物の場合は二峰性分布が得られたが、その分布の粒度半径はそれぞれ、21.0 nmと87.8 nm表示され、単分散の場合の70%~80%に減少した。また、単分散時と比べて、①の分布幅は狭くなり、②は広く変化した。この結果から、DLS法による多分散系の粒度分布測定では単分散系の場合の高い精度が得られないことだけでなく、得られたピークが実際の分布を正確に表していない可能性があることが判明した。

### (4) インフルエンザHAワクチンの粒度分布

製造メーカー4社(A、B、C、D)の各5ロットの製剤を1ロットあたり10回以上測定し、粒度分布を得た。その結果、全く同一のサンプルであっても測定回毎に分布結果が異なることがあり、標準PS粒子の粒度分布のような高い再現性は得られなかった。また、すべての測定で得られた粒度分布から、製剤はすべて多分散系であることが判明した。粒度分布(半径表示)に表示されるピークを、G1(50 nm以上:ウイルス粒子又

はそれらの凝集体)、G2(10 nm以上~50 nm未満:ロゼッタ凝集体)、G3(3 nm以上~10 nm未満のピーク:たんぱく質又はその重合体)、G4(1 nm~3 nm未満:たんぱく質以外の低分子又はその多量体)の4つに分類し、以下の様に分析した。A:全ロットで主ピークがG2からG4に亘って現れた。G4が主ピークの分布の頻度が他メーカーより特に多く表示された。B:G4のピークが5ロット全部に現れたが、ほとんどのロットでG1からG4のピークが観測され、特にG2-G3の領域に主ピークが幅広く分布していた。G1は10%を超えることはないがすべてのロットで表示された。C:G1~G4のすべてを含んだピークの分布を示し、Bとよく似た結果がえられた。D:G4のピーク数は非常に少なかった。G2~G3のピークが主要な分布であった。さらに、これらの10回以上/1ロットの測定に対応するそれぞれの相関関数を加算平均化処理した相関関数を用いて新たに粒度分布を作成して、分析を続けた結果、A:4ロットでG4が90%を占める分布を与えた。またG1は4ロットで現れたがピーク面積はすべて2%以下であった。G4を無視すれば、G1とG2の二峰性分布であった。B:G4のピークが5ロットから2ロットに減少した。G4を無視すれば、Aと類似のG1とG2の二峰性分布が4ロットで観測された。C:特に、面積比を無視すれば、G1とG2の領域で二峰性(G2>G1)の連続したピークが全ロットで観測された。D:4メーカーで、最もばらつきの少ない粒度分布を与えた。G4のピークは全く表示されず、ほとんどのピークがG1とG2であった。主ピークはG2で、粒径は20 nm~30 nmであったが、100 nm付近にも強いピークが表示された(G2:G1=8:3)。

### D. 考察

動的光散乱法による粒度分布測定を用いて、インフルエンザウイルス粒子の測定を実施し、粒度分布を得ることができた。この分布から得られた平均半径はA、B型ウイルスをホルムアルデヒドで不活化した場合と比較しても変化が見られなかった。超音波処理を行った場合には、A型は主分布に変化は見られなかったが、B型は不活化の前後で分布パターンの変化が観測された。しかし、照射実験は超音波強度の定量性確保が困難であり、室温での短時間の効果しか観測できず、十分な実験結果ではなかった。超音波処理の効果を判断するには、条件検討(温度、時間、照射強度の定量等)が必要と判断した。以上の基礎データを考慮して、市販HAワクチンの粒度分布測定を計画した。良質の測定結果を得るために、測定データの棄却条件を設定した。ワクチンサンプル中のスパイクノイズの原因を除去する方法として、フィルターによるろ過や遠心処理が可能だが、粒度分布が変化する可能性があるため、採用しなかった。測定に使用したセルはバッチ用であるが、連続測定が実行できるようにした。セル温度の変動を

極力さけ、サンプルのキャリーオーバーが生じないようにするため、測定セルを測定装置に装着固定したまま、測定毎にセル内を注射用水 5 mL で減圧吸引して十分に洗浄した。装置の性能確認の試験を単分散系と多分散系の試料で実施した。標準 PS 粒子の粒度分布測定では、非常に高い精度の分布が得られ、簡便で有効な測定法であることを示した。しかし、標準 PS 粒子の混合液では、粒度分布の精度と信頼度が劣ることが示され、我々の DLS 測定装置の性能は、単分散と同程度の正確な粒度分布を多分散系で得るには十分でないことが示された。HA ワクチンは上述の三つのウイルス株の混合であるが、各ウイルスの粒径がほぼ同じであることから、単一ウイルス株の状態と看做すことができた。これは多分散系測定が不利な DLS 法の測定サンプルとしては、特に有利であった。インフルエンザウイルスの主成分はたんぱく質 75%、脂質 18%、RNA 1% である (Frommhagen, L. H., et al., Viorogy 8, 176-197, 1959)。脂質は製造工程のエーテル処理により除去される。この処理によりウイルス粒子の大部分が壊れ、表層に存在していた多量の糖たん白質 (HA, NA) び核酸や他の微量の構成たんぱく質の一部は分散し、一部は凝集してロゼッタ状凝集体 (粒径は 30 nm ~ 50 nm) を形成することが電顕により観測されている。以上のことから、ワクチンの粒度分布で観測されるピークのほとんどがウイルス由来たん白質成分から構成されていると判断した。DLS 法で表示される粒子の大きさの例として、低分子の C60 フラーレンは約 1 nm と観測され、ウシ血清アルブミン (分子量 6.6 万) は半径が約 4 nm の粒子として観測される。単純に分子容積が分子量に比例すると考えると分子量 100 万の球状たんぱく質の半径は約 10 nm になると推定される。ワクチンの粒度分布に現れたピークを分類するために、ワクチン成分を粒径の大きさに応じて、G1、G2、G3、G4、の 4 つのグループを設定した。4 社の粒度分布を分析した結果、測定ごとに粒度分布に変化があり、表面的には再現性のある分布を得ることの困難さを示した。しかし、我々の粒度分布の目的は、高い精度よりも粒度分布のパターンにより品質を評価できる可能性を示すことと考へ、複数回の測定により得られた粒度分布の相関関数を平均化して、ワクチンの品質 (粒度組成としての成分) を評価することを試みるために、10 回以上の測定から得た相関関数を平均化して変換した。1 nm ~ 10 nm の粒径分布の寄与が大きい相関関数の  $10^{-6}$  秒オーダーの付近のデータが、大きな粒径の散乱データに組み込まれた結果、新たに生成した粒度分布では G4 のピークが減少または消失した。この処理により元データにあった敏感 (minor) な部分が切り捨てられるが、この粒度分布は実際の分布を現す可能性が最も高いと判断した。さらに、同質成分から構成され、且つ、製造法が大きく異なっていないと予想される同じメーカーのワクチンに対しては、特徴的な粒度分布が存在

すると予想した。処理を実施した結果、粒度分布には、各メーカー毎の分布パターンが存在することが判明した。この事実は、粒度分布が製品の品質を特徴づけることが可能で、品質管理に適用可能であることを強く示唆した。ワクチンの粒径と免疫活性の関係は明らかにされるべき重要な問題であるが、インフルエンザワクチンについての実験報告は知られていない。しかし、免疫分野の研究の進展により、ワクチン抗原成分の大きさに関心が増えつつあり、近年認可され市場されている HPV ワクチンや肺炎球菌ワクチンには、ワクチンの有効性の保持と品質管理の観点から、抗原成分の高分子量あるいは粒径の大きさが品質規格試験の一つに定められている。DLS 試験法は、現在は堅牢性に問題が多いが、将来、粒度とワクチン効果の関係が一般に認められれば、この粒度分布測定が評価されると考える。

#### E. 結論

3 種 (A/H1N1、A/H3N2、B) のインフルエンザウイルスの粒度分布を動的光散乱法を用いて測定した。その結果、ウイルス粒径は文献に記載されている範囲にあることが示された。ホルムアルデヒドによる不活化による 3 種のインフルエンザウイルスの粒度分布と平均粒子半径に変化は認められなかった。超音波照射した結果、不活化の有無によらず、A、B 型インフルエンザの主粒度分布には変化が見られなかった。4 メーカーのインフルエンザ HA ワクチンの粒度分布を測定した結果、二峰性又は三峰性粒度分布が得られ、メーカー別 / ロット別により、粒度分布に特徴を有することが判明した。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

1. 論文発表 (著書を含む) 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

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

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）

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不活化全粒子型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、人由来モノサイト細胞株（THP細胞）を用いて転写因子（NF- $\kappa$ B）の活性測定とその作用で産生される炎症性サイトカイン（IL-1 $\beta$ ）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により誘導されるNF- $\kappa$ B活性発現とそれによるIL-1 $\beta$ 産生能力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。すなわち、ヒト培養細胞のIL-1 $\beta$ 産生能力に基づいて、不活化型全粒子インフルエンザウイルスの不活性化プロセスの管理とその免疫賦活化能力の管理を行うことが可能であることを示唆している。

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。そこで、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- $\kappa$ 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およびIL-1 $\beta$ 測定を行い、この二つの測定系を主軸とした不活化型

全粒子インフルエンザウイルスの免疫誘導能力を評価する測定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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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 $\beta$ , IL-18, IFN- $\beta$ ) 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。

③ マウス脾臓薄切切片と抗IL-1 $\beta$ 抗体を用いた免疫組織染色によるワクチン免疫賦活化能力の評価： 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 $\beta$ 抗体で染色した。

(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)、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性にNF- $\kappa$ B活性が検出された。ODN2006 (TLR9) に対しては弱いNF- $\kappa$ B活性が検出された。一方、polyI:C (TLR3), CLO87 (TLR7) のTLRリガンドに対してはNF- $\kappa$ B活性を示さなかった。NF- $\kappa$ B活性を示した培養上清中のIL-1 $\beta$ , IL-18, およびIFN- $\beta$ 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 $\beta$ を産生した。LPS (TLR4) とssRNA40 (TLR8) の場合に限りIFN- $\beta$ が産生された。ODN2006 (TLR9) に対してIL-1 $\beta$ とIFN- $\beta$ は共にほとんど産生されていなかった。

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-κB活性を調べ、以下の成果を得た。

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-κB活性を示さない。
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-κB活性は上昇した。
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-κB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。IL-1βの産生量も不活化期間の長さに応じて減少し、NF-κB活性と相関性を示した。この場合、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。
4. 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、IL-1βに加えてIFN-βの産生が認められた。一方、HAワクチンの場合、NF-κB活性化およびIL-1βとIFN-βの産生をほとんど示さなかった。

α 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-1βとIFN-βを産生した。特に、HA化ワクチンの場合においてもIL-1βとIFN-β産生を認めたことは、HA化した場合でもIL-1β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-1βとIFN-β産生は市販の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-1β抗体で染色したところ、脾臓の白髄の間質細胞領域にIL-1β産生が認められ、HA化したワクチンのIL-1β産生能力をin situで確認することができた。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、IL-1β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-κB活性化を介したIL-1β産生に付け加えてinflammasome活性化によるIL-1β産生もあること示唆していた。

#### 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ではなく生存しているが、0.0078%以下の濃度でないとNF-κB活性を示さない。このことから、不活化全粒子ウイルスはPMA-Mac細胞膜上のTLRを刺激するのに加えて、不活化全粒子ウイルス自体を取り込むなどの動的刺激がPMA-MacのNF-κB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活性の低下とIL-1 $\beta$ 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、この減少の度合いはB型の場合と比べて小さいことから、ホルムアルデヒドの処理時間に依存する以外に、ウイルスの種類やロットの性質に依存することを示唆している。

3. 抗原提示細胞のIL-1 $\beta$ の産生はNF- $\kappa$ 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 $\beta$ 産生はIFN- $\beta$ の産生を伴うがIL-18の産生を示さないことから、NF- $\kappa$ 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 $\beta$ 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。IL-1 $\beta$ の産生とIL-18産生を指標とすることにより、ワクチンの免疫賦活化能力の程度と同時にワクチンによる炎症反応の程度についての情報を得ることが出来ることを示唆している。

4. 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 $\beta$ の産生を認めたことから、in situにおけるIL-1 $\beta$ 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およびHAワクチンの生体内における免疫誘導能力を推測する上で重要であることを示唆している。

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- $\kappa$ B活性発現とIL-1 $\beta$

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出来ることを示した。この評価系により、全粒子ワクチンの不活性化プロセスやHA化プロセスを管理することが可能である。同時に、ワクチン株の選定にも有用であると考えられる。

さらに、免疫組織染色によるin situにおけるIL-1 $\beta$ とIL-18の検出と定量を組み合わせることにより、ワクチンの免疫誘導能力をマウスなどのin vivoの系でワクチンの免疫誘導能力を評価することも可能である。

今後は、不活化型全粒子ウイルスとHAワクチンの免疫誘導能力に関与する分子をIL-1 $\beta$ の産生を指標に次の3つの方法を組み合わせて同定し、その分子を指標にしてより精緻なワクチンの免疫誘導能力の管理を目指したい。

1. 抗原提示細胞による不活化型全粒子ウイルス取り込み・分解プロセスの解析。
2. 不活化型全粒子ウイルスにおけるTLRリガンド分子の分離解析。
3. 不活化型全粒子ウイルスから分離されるTLRリガンド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（和文）：

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38回 日本免疫学会総会・学術集会  
2009年 12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。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

発表者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集社名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
Ogata, T, Yamazaki, Y, Okabe, N, Nakamura, Y, Tashiro, M, Nagata, N, Itamura, S, Yasui, Y, Nakashima, K, Doi, M, Izumi, Y, Fujieda, T, Yamato, S, and Kawada, Y.	Human H5N2 avian influenza infection in Japan and the factors associated with high H5N2-neutralizing antibody titer.	J Epidemiol	18	160-166	2008
Ikeno D, Kimachi K, Kudo Y, Goto S, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, and Kino Y.	A prime-boost vaccination of mice with heterologous H5N1 strains.	Vaccine	27	3121-3125	2009
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	573-579	2009

Original Article

## Human H5N2 Avian Influenza Infection in Japan and the Factors Associated with High H5N2-Neutralizing Antibody Titer

Tsuyoshi Ogata,<sup>1</sup> Yoshinao Yamazaki,<sup>2</sup> Nobuhiko Okabe,<sup>3</sup> Yosikazu Nakamura,<sup>4</sup> Masato Tashiro,<sup>5</sup> Noriko Nagata,<sup>6</sup> Shigeyuki Itamura,<sup>5</sup> Yoshinori Yasui,<sup>3</sup> Kazutoshi Nakashima,<sup>3</sup> Mikio Doi,<sup>6</sup> Youko Izumi,<sup>6</sup> Takashi Fujieda,<sup>6</sup> Shin'ichi Yamato,<sup>6</sup> and Yuichi Kawada.<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Chikusei Health Center, Ibaraki Prefectural Government.

<sup>2</sup>Ibaraki Prefectural Institute of Public Health.

<sup>3</sup>Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases.

<sup>4</sup>Department of Public Health, Jichi Medical University.

<sup>5</sup>Department of Virology, National Institute of Infectious Diseases.

<sup>6</sup>Department of Health and Welfare, Ibaraki Prefectural Government.

Received November 27, 2007; accepted March 2, 2007; released online July 7, 2008

### ABSTRACT

**Background:** H5N2 avian influenza virus infection of humans has not been reported thus far. The first H5N2 avian influenza infection of poultry in Japan occurred in Ibaraki.

**Methods:** The subjects were workers at 35 chicken farms in Ibaraki Prefecture, where the H5N2 virus or antibody was isolated from chickens. None of the subjects exhibited influenza symptoms. The H5N2-neutralizing antibody titers of the first and second paired sera samples were compared. To investigate the possible factors for this increase, the H5N2-neutralizing antibody titer (1:40 or more) was calculated for the second samples. A logistic regression analysis was performed to examine the association of these factors with H5N2-neutralizing antibody positivity.

**Results:** We performed Wilcoxon matched-pairs signed-ranked test on data collected from 257 subjects, and determined that the H5N2 antibody titers of the second paired sera samples were significantly higher than those of the first samples ( $P < 0.001$ ). The H5N2 antibody titers of paired sera of 13 subjects without a history of seasonal influenza vaccination within the previous 12 months increased 4-fold or more. The percentage of antibody positivity was 32% for subjects with a history of seasonal influenza vaccination (28% of all subjects) and 13% for those without a history of the same. The adjusted odds ratio of H5N2-neutralizing antibody positivity was 4.6 (95% confidence interval: 1.6-13.7) for those aged over 40 and 3.1 (95% confidence interval: 1.6-6.1) for those with a history of seasonal influenza vaccination within the previous 12 months.

**Conclusion:** The results suggest that this may have been the first avian influenza H5N2 infection of poultry to affect humans. A history of seasonal influenza vaccination might be associated with H5N2-neutralizing antibody positivity.

**Key words:** Influenza, Human Influenza, H5N2, Neutralization Tests, Vaccination.

### INTRODUCTION

Highly pathogenic avian influenza is currently prevalent in poultry worldwide. The H5N2 as well as H5N1 subtype of the avian influenza virus is also found to infect poultry. Highly pathogenic avian influenza infection may become pandemic through a virus mutation or reassortment in the future; therefore, control of avian influenza infection has been

recognized as a public health issue of importance on a global scale.

Ibaraki Prefecture is located in the northeast of Tokyo, Japan, and has a population of 3 million. The chicken population in chicken farms in this prefecture is 11 million—the largest among all the prefectures in Japan. In June 2005, the anti-H5N2 avian influenza A antibody was isolated from a chicken on a farm in this prefecture for the first time in



Japan.<sup>1-3</sup> By December 2005, the virus was isolated or an anti-H5 antibody was identified from chickens in 40 chicken farms in Ibaraki Prefecture and in 1 chicken farm in Saitama Prefecture. The isolates were closely related to the Guatemala strain<sup>2-4</sup> with high homology with regard to the nucleotide sequences, and the prototype strain was designated A/chicken/Ibaraki/1/2005(H5N2).<sup>5</sup> As in earlier cases in Taiwan and South Korea, in Japan too, the chickens at these farms where the H5N2 virus or antibody was detected were destroyed and disposed of. In Ibaraki, 5.7 million chickens were culled.

To date, no cases of H5N2 avian influenza type A virus infection in humans have been reported.<sup>6</sup> Considering the fact that the avian influenza H5N1 virus has been transmitted from poultry to humans,<sup>7</sup> it is not surprising that H5N2 avian influenza virus infections would also be transmitted from infected poultry to human beings.

In the case of inhabitants with high avian influenza antibody titers, the cross-reactivity by infection or inoculation with a seasonal influenza virus as well as an avian influenza infection is considered to be a possible cause of the increased antibody titer. Myers et al, however, reported that human influenza vaccination in the previous 3 years was not associated with elevated titers against viral subtypes H5, H6, H7, and H9.<sup>8</sup> No studies have reported an increase in the H5N2 avian influenza antibody titers as a result of seasonal influenza vaccination of humans.

This investigation was undertaken to ascertain whether there were suspected cases of H5N2 human infection in H5N2 virus-positive chicken farms. In addition, we examined whether the increased antibody titer was associated with factors such as a history of seasonal influenza vaccination.

## METHODS

### Subjects

In Ibaraki Prefecture, from June through December 2005, the virus was isolated or anti-H5 antibody was identified from chickens on 40 chicken farms. No chickens in these yards exhibited symptoms, except for a temporary drop in the egg-laying rate at the farm where the antibody was first detected. A total of 332 workers (210 males and 122 females) were employed on these 40 farms, and they were at risk of exposure to the infected chickens.

The subjects were 311 workers (199 males and 112 females) who worked at 35 chicken farms where the virus was isolated or anti-H5 antibody was identified in chickens from June through November 2005; they were at risk of exposure to the virus. No subjects had symptoms that indicated an influenza viral infection. Human influenza rapid diagnostic tests and human influenza H5 virus-specific PCR showed that all the pharyngeal swabs of workers on the chicken farms were negative for the virus.<sup>1,2</sup> In the 35 farms,

the number of exposed farm workers was over 20 in 4 chicken farms.

### Data Collection and Serological Tests

When the H5N2 virus or antibody was detected in chickens on a farm, public health nurses affiliated with any of the 4 public health centers of the Ibaraki Prefectural Government immediately checked on the people associated with the farm, using a questionnaire to record age, sex, current symptoms, history of vaccination against seasonal influenza since 2004, and the time in case of vaccination.

During the 2004-2005 influenza season, the composition of trivalent vaccines with which most of the chicken farm workers were vaccinated was A/New Caledonia/20/99(H1N1), A/Wyoming/3/2003(H3N2), and B/Shanghai/361/2002, while the composition for the 2005-2006 influenza season during which some of the chicken farm workers were vaccinated was A/New Caledonia/20/99(H1N1), A/New York/55/2004(H3N2), and B/Shanghai/361/2002.

Paired serum samples were collected from the subjects by public health nurses employed by the government at intervals of at least 4 weeks and up to 2 months. The peak of the influenza antibody titers generally occurs 4-7 weeks after an infection.<sup>9</sup> The first blood samples of paired sera were obtained immediately after the H5N2 virus or antibody was detected in chickens on the aforementioned chicken farm. In most cases, however, these chickens exhibited no symptoms and the first samples of paired sera were collected when the H5N2 virus was no longer detected in them. A certain period of time might have elapsed after exposure to the infected chickens.

Measurement of the neutralization titer of the antibody against avian influenza virus A/chicken/Ibaraki/1/2005(H5N2) was performed at the National Institute of Infectious Diseases according to the method previously described.<sup>10</sup> The neutralization titer was expressed as the highest dilution rate that inhibited a 50% tissue culture infection dose. The antibody titers were measured at least twice for confirmation.

### Statistical Analyses

The proportions of subjects with seasonal influenza vaccination were calculated according to the subject's age. Chi-square tests were used to examine the differences with regard to sex and histories of seasonal influenza vaccination within the previous 12 months, among the age classes. The number of chicken farms where the H5N2 virus or antibody was detected in the chickens and the number of employees on these farms were tabulated for each month.

H5N2 antibody titers of the first and second paired sera samples were compared for each subject and totaled. To determine whether a subject was infected by the H5N2 virus, the following criterion was considered noteworthy: a 4-fold or greater rise in the neutralizing antibody titer in paired sera.

The geometric mean of the antibody titer of the first and second samples of the subjects' paired sera was calculated and then compared using the Wilcoxon matched-pairs signed-rank test.

Positive rates of the H5N2-neutralizing antibody in the second paired sera samples were also calculated according to age and history of seasonal influenza vaccination within the previous 12 months. A neutralizing antibody titer of 1:40 or more was used as a criterion for determining the positivity of a neutralizing antibody because the criterion for determining the positivity of an H5N2-neutralizing antibody for a single serum had not yet been established.

Crude odds ratios (ORs) and their 95% confidence intervals (CIs) were estimated by variables. Unconditional logistic regression analyses were performed using sex, categorized age, chicken farm categorized by the number of workers, and history of seasonal influenza vaccination as independent variables, and adjusted ORs and their 95% CIs were estimated by variables, to examine their association with a neutralizing antibody that was positive against the H5N2 virus.

Statistical analyses were performed using Dr. SPSS<sup>®</sup> 11.0J for Windows software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

### Ethical Issues

The Ibaraki Prefectural Government established a research committee for the implementation of this study. Approval of the Ibaraki Joint Committee for Ethical Review of Epidemiological Research was obtained on April 17, 2006. A written explanation was provided to each subject and his signed consent was obtained.

## RESULTS

We excluded subjects who failed to provide paired sera or appropriate data. Thus, 257 people (83%) were analyzed; Table 1 shows their characteristics. Seasonal influenza vaccinations had been administered to 28% of the subjects. No significant differences were found with regard to the history of seasonal influenza vaccination among different age classes. A smaller number of females were included in the younger age groups.

Table 2 shows the number of chicken farms where the H5N2 virus or antibody was detected in the chickens for each month and the number of persons employed at these farms.

The interval between the time at which the H5N2 virus or antibody was detected in the chickens on these farms and the time at which the first sample was collected from the workers was an average of 1.6 days and a maximum of 5 days. The shortest and longest intervals for sampling of paired sera were 28 and 63 days, respectively. Table 3 shows the relationship between the first and second samples of the paired sera in terms of the H5N2 antibody titers. A 4-fold or greater increase in antibody titers was observed in the paired sera of 20 chicken farm employees; 13 (65%) had no history of seasonal influenza vaccination in the previous 12 months. In 65 subjects (including the abovementioned 20), either a 4-fold or greater increase in the antibody titer of paired sera was observed, or the antibody titer of the first or second samples of paired sera was 1:40 or greater. H5N2 antibody titers of the second samples of paired sera of the subjects were significantly higher than those of the first samples when examined by a Wilcoxon matched-pairs signed-rank test ( $P <$

**Table 1. Characteristics of the study subjects**

	Age (year)					Total	P-value*	Subjects with a history of seasonal influenza vaccination within the previous 12 months (%)
	<29	30-39	40-49	50-59	60<			
Total	32	33	39	92	61	257		71 (28)
Sex								
Males	26	27	28	56	34	171	0.02	44 (26)
Females	6	6	11	36	27	86		27 (31)
History of seasonal influenza vaccination in the previous 12 months (%)								
Yes	9 (28)	6 (18)	10 (26)	27 (29)	19 (31)	71 (28)	0.72	
No	23 (72)	27 (82)	29 (74)	65 (71)	42 (69)	186 (72)		

\* : P-value for the difference among age classes according to variables by the Chi-square test

**Table 2. Number of chicken yards where the H5N2 virus or antibody was detected in the chickens and the number of subjects employed on these yards according to the month, in 2005.**

	June	July	August	September	October	November	Total
Chicken yards*	6	3	12	9	1	4	35
Subjects	25	18	120	37	5	52	257

\* : No. of chicken yards where the H5N2 virus or antibody was detected in the chickens for a given month

**Table 3. Relationship between the first and second paired sera samples of subjects, with regard to the H5N2 antibody titers.**

First samples	Neutralizing antibody								Four-fold or greater increase in antibody titers	
	Second samples								Total	Without a history of seasonal influenza vaccination within the previous 12 months
	<10	10	20	40	80	160	320<			
<10	80	44	30	5	1				6	5
10	111	14	50	36	10	1			11	8
20	29		6	12	10	1			1	0
40	21		4	6	6	4	1		1	0
80	10	1	1		3	2	2	1	1	0
160	3					2	1		0	0
320<	2					1		2	0	0
Total	257	59	91	59	30	11	4	3	20	13
Geometric mean titer	11.4				14.0					<i>P</i> -value* = 0.000

\* : *P*-value for the difference between the first and second samples based on Wilcoxon matched-pairs signed-rank test

**Table 4. Positive rate of H5N2-neutralizing antibody titer of the second paired sera samples according to age and histories of seasonal influenza vaccination within the previous 12 months.**

Age (year)	Neutralizing antibody positive* / Total (%)					
	<29	30-39	40-49	50-59	60<	Total
Total	4/32 (13)	0/33 (0)	10/39 (26)	23/92 (25)	11/92 (18)	48/257 (19)
History of seasonal influenza vaccination within the previous 12 months						
Yes	4/9 (44)	0/6 (0)	4/10 (40)	10/27 (37)	5/19 (26)	23/71 (32)
No	0/23 (0)	0/27 (0)	6/29 (21)	13/65 (20)	6/42 (14)	25/186 (13)

\* : Subjects whose neutralizing antibody titer for the second paired sera samples is 1:40 or more

0.001).

Table 4 shows the percentage of positive H5N2-neutralizing antibody titers of the second samples stratified by age and history of seasonal influenza vaccination within the previous 12 months. A positive rate of 32% was observed for subjects with a history of seasonal influenza vaccination within the previous 12 months, and it was 13% for those without a history of the same. In each of the age classes, the positive rate was also higher for those with a history of seasonal influenza vaccination within the previous 12 months than for those without. The positive rate was more likely to be higher among subjects aged over 40 than among those under 40. Therefore, the subjects were divided into those who were older than 40 and under 40 years of age. There were no antibody-positive subjects among those who were under 40 and did not have a history of seasonal influenza vaccination within the previous 12 months. Multivariate logistic regression analyses revealed that the adjusted OR for the positivity of H5N2-neutralizing antibody was 4.6 (95% CI: 1.6-13.7) for those aged over 40 years and 3.1 (95% CI: 1.6-6.1) for those with a history of seasonal influenza vaccinations within the previous 12 months (Table 5).

## DISCUSSION

In this study, it has been shown that the H5N2 antibody titer increased significantly in the paired sera of workers at the chicken farms where the virus or specific antibody was identified, and that the H5N2 antibody titers of the paired sera of 13 workers at the chicken farms who had no history of seasonal influenza vaccination in the previous 12 months also showed a 4-fold or greater increase. Some subjects also had an H5N2 antibody titer of 1:40 or more. The results with a single serum sample showed that the positive rate for H5N2 neutralization antibody titer was significantly higher for those with a history of seasonal influenza vaccination in the previous 12 months and for those older than 40 years, although no significant differences were found with regard to the history of seasonal influenza vaccinations among age classes.

These data suggested that an avian-derived H5N2 influenza virus might infect humans through exposure to infected chickens. Four strains of avian influenza A virus-H5N1,<sup>7</sup> H7N3,<sup>11</sup> H7N7,<sup>12</sup> and H9N2<sup>13</sup>-are known to infect humans. Although the H5N2 subtype of the avian influenza virus has been found in the United States, Mexico, Italy,

**Table 5. Odds ratios for positivity of H5N2-neutralizing antibody titers according to variables.**

	No. at risk	No. of cases positive for neutralizing antibody* (%)	Crude odds ratio (95% CI)	Adjusted odds ratio† (95% CI)
<b>Sex</b>				
Male	171	32 (19)	1.00 (reference)	1.00 (reference)
Female	86	16 (19)	0.99 (0.51-1.93)	0.73 (0.35-1.51)
<b>Age (year)</b>				
<39	65	4 (6)	1.00 (reference)	1.00 (reference)
40<	192	44 (23)	4.5 (1.56-13.2)	4.6 (1.56-13.7)
<b>Number of workers in the chicken farm</b>				
<19	157	30 (19)	1.00 (reference)	1.00 (reference)
20<	100	18 (18)	0.92 (0.49-1.78)	0.86 (0.42-1.76)
<b>History of seasonal influenza vaccination within the previous 12 months</b>				
Yes	71	23 (32)	3.1 (1.61-5.9)	3.1 (1.59-6.1)
No	186	25 (13)	1.00 (reference)	1.00 (reference)

\* : Subjects whose neutralizing antibody titer for the second paired sera samples is 1:40 or more

† : Multivariable logistic regression model was adjusted for variables listed in the Table.

CI: confidence interval

Taiwan, and South Korea, thus far, there has been no report of this virus subtype infecting humans.<sup>6</sup>

The H5N1 virus has been responsible for the greatest number of human influenza cases with very severe disease and the highest mortality rate. Infection of humans with H7N3, H7N7, and H9N2 viruses has resulted in mild symptoms and, very rarely, in severe illness. The H5N2 influenza virus did not result in death of the infected chickens<sup>1-3</sup>, and no worker at the chicken farms in Ibaraki had symptoms that indicated a viral influenza infection. The increase in the antibody titers of the 13 workers was moderate: the amount of H5N2 virus on the chicken farms might be small or viral transmission or its pathogenic ability to inflict humans might be weak. On the other hand, the H5N2 virus in poultry later gained accentuated virulence in the United States<sup>14</sup> and Mexico.<sup>15</sup> Because this virus can become highly virulent against chickens, it may also prove to be highly virulent against humans. Although we should take utmost precautions against the H5N1 virus as the causative agent of an influenza pandemic, we cannot exclude the possibility that other influenza viruses may also cause the disease.

In the current study, the single serum specimen showed that the positive rate of the H5N2 neutralization antibody titer was significantly higher for the subjects with a history of seasonal influenza vaccination within the previous 12 months. This is the first observation of this phenomenon for the avian H5N2 virus. Immunity acquired via antibody targeting of the neuraminidase antigen is thought to be a possible cause of cross-reactivity of the human influenza virus antibody with that of an avian influenza virus.<sup>16</sup> Gioia et al recently reported that seasonal vaccination could raise the neutralizing immunity against influenza (H5N1) in a large number of donors.<sup>9</sup> A neutralizing antibody titer may only represent a

nonspecific reaction, and it is possible to determine whether it is effective for the prevention of an avian influenza infection. Further examinations will be required to evaluate the significance of this finding.

The positive rate of the anti-H5N2-neutralizing antibody for subjects over 40 years of age was significantly higher when compared to that of subjects under 40 years. This could be because the aged may have been exposed to more diverse influenza viruses.<sup>17</sup> The mortality rate of the younger generation was high for the Spanish flu (H1N1 subtype),<sup>18</sup> which may have been due to their lack of exposure to the preceding pandemic virus. There were no neutralizing antibody-positive subjects among those aged under 40 and without a history of seasonal influenza vaccination within the previous 12 months. In any case, further study of the H5N2- and H5N1-neutralizing antibody titers in the serum is recommended; moreover, the impact of an influenza vaccination or one's age on the antibody titer should be noted for animals and general inhabitants who have not been exposed to infected chickens.<sup>19</sup>

For determining H5N1 avian influenza infections, the World Health Organization (WHO) has adopted the following criterion: a person meeting the criterion for an H5N1-neutralizing antibody titer of 1:80 or more in a single serum specimen should be considered positive.<sup>20</sup> However, if their age and seasonal influenza vaccination influence the antibody titer of avian influenza H5N2, they might also influence that of H5N1. Further examinations will be required to review the validity of this criterion by WHO.

This study had several limitations. First, data were extracted only from those chicken farms in Ibaraki Prefecture where chickens were infected with avian influenza; thus, the results might not be widely applicable to other areas or general inhabitants who are not exposed to infected chickens.