

抗 HBs ヒト免疫グロブリン一般試験法の見直しについて

研究分担者： 浜口 功 国立感染症研究所 血液・安全性研究部長

研究協力者： 水落利明* 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 第 2 室長

植木英敏 日本赤十字社血漿分画センター 品質管理部

竹内次雄 日本赤十字社血漿分画センター 品質管理部

研究要旨：生物学的製剤基準「一般試験法」の抗 HBs 抗体価測定法は抗 HBs ヒト免疫グロブリンの抗体力価を測定する方法を定めたものである。現行では RIA(放射免疫測定法)と EIA(酵素免疫測定法)が記載されているが、これに CLIA(化学発光免疫測定法)を追加することの正当性を検討した。信頼性、特異性、再現性、測定感度等を現行 EIA 法と比較したところ、同等の性能が確認された。生物学的製剤基準の通則 34 において「生物学的製剤基準に規定する試験法に代わる方法で、それが規定の方法以上の正確さと精密さがある場合は、その方法を用いることができる。ただし、その結果についての疑いのある場合は、規定の方法で最終の判定を行う」と記載されており、現行の記載のままでも代替法の使用が認められている。従って、生物学的製剤基準改正を待たずに CLIA 法を追加適用することは可能であると結論した。

A. 研究目的

抗 HBs 抗体価測定法として生物学的製剤基準「一般試験法」に定められている現行の EIA 法と、今回試験法への追加を希望する CLIA 法（Architect：アボット・ジャパン社）との性能比較を行った。

B. 研究方法

1. 検量線の検証

CLIA 法（Architect）の測定値（RLU）

において、どの範囲で直線性が得られるかを検証する。また、その範囲での同時再現性を検証した。

2. 分析法バリデーション

日本薬局方第十五改正 25.分析法バリデーション 項目に従い、CLIA 法（Architect）の真度・併行精度・室内再現精度・直線性・特異性・範囲のパラメーターについてバリデーションを行った。

3.EIA 法との比較試験

HBIG 等のサンプルを用いて CLIA 法と EIA 法 (AxSYM: アボット・ジャパン) との比較試験を行った。

C. 研究結果

1. 検量線の検証

測定値 (RLU) の範囲 150,000~5,000 で直線性が得られることが分かった。その時の抗体価は約 0.2 IU/mL 以下である。同時再現性の結果は CV 値が抗体価の高い部分では 3.9%、また低い部分では 6.5% と比較的良好的な値であった。以上の結果から、CLIA 法ではスタンダードを RLU の範囲 150,000~5,000 の間の 5 ポイントにより作成することにした。

2. 分析法バリデーション

- ①真度: 95%信頼区間が 0 を含む
- ②併行精度: 変動係数が各濃度で 5% 以内であった。
- ③室内再現精度: 変動係数が各濃度で 5% 以内であった。
- ④特異性: 添加回収試験の結果がすべて 80%~120% の範囲内であった。
- ⑤直線性: 5 ポイントにおける相関係数が $r=0.9992$ であった。
- ⑥範囲: 50%~150% 以上より CLIA 法のバリデーションがなされた。

3. EIA 法との比較試験

現行法 (EIA 法) で HBIG 製剤を測定したときの抗体価と新試験法 (CLIA 法) で測定したときの抗体価を比較した。測定

回数は 1 ポイント 3 重測定で 5 ポイント行い、4 ロットの製剤を 3 人で 1 回測定 計 3 回の平均値で求めた。表の結果から明らかなように CLIA 法は現行の EIA 法と同等の測定値を示した。

表: EIA 法と CLIA 法の比較試験

製剤	ロット	AxSYM (EIA法)	ARCHITECT (CLIA法)
抗HBs人免疫グロブリン 筋注用製剤「日赤」	2B019	262.1	291.0
	2B020	256.9	250.3
	2B021	284.6	272.6
	2B022	375.5	354.8

D. 考察

抗 HBs 抗体価測定において、CLIA 法は EIA 法と同等の性能を有すると考えられた。

E. 結論

生物学的製剤基準の通則 34 を適用することにより、基準改正を待たずに CLIA 法を追加適用することは可能であると結論した。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし
3. 知的所有権の取得状況
なし

グロブリン製剤の麻疹抗体価測定の見直しについて

分担研究者 駒瀬勝啓 国立感染症研究所 ウイルス第3部 室長
研究協力者 長谷紳一郎 血液製剤協会 技術委員会座長 (株式会社ベネシ
ス 保証本部)
竹田 誠 国立感染症研究所 ウイルス第三部 部長

研究要旨：日本を含め世界中で麻疹排除計画がすすめられている。よって将来においてはガンマグロブリン製剤中の麻疹抗体価が低下すると予想され、生物基に定められている麻疹抗体力価の基準を満たさなくなる可能性が危惧される。また、ガンマグロブリン製剤の特徴、用途から、麻疹抗体価を生物基に設定する事の意味も再考する必要があるかもしれない。一方、ELISA 法等の自動化でき、客観的に結果の判定ができる新規の麻疹抗体価測定法の導入の希望が製造所からある。これらの事をふまえて、ガンマグロブリン製剤における生物基での麻疹抗体価測定法の取り扱いについて、血液製剤協会を交えて検討した。その結果、静注用グロブリンについては、当面は生物基に記載を継続するものの、EP に倣って原料に規定を設け、製品に移行したときに相対的に抗体力価が低下しないことを示す方法など GMP に従った品質管理法が提案された。また、製剤中に抗体の活性を保持していることを測定できる他の抗体価測定でも代用は可能と考えられた。筋注用グロブリン製剤については、用法に麻疹の予防の記載があるので、当面は今後も麻疹抗体価を測定する必要があることが確認された。また、ELISA 法等の生物基への掲載は、製造所と共同で評価し、また標準品等を整備しながら検討していく事となった。

A. 研究目的

人免疫グロブリン製剤には筋注用グロブリン製剤、静注用ガンマグロブリン製剤と特殊グロブリン製剤がある(表1)。このうち筋中用と静注用は、抗麻疹ウイルス抗体価をガンマグロブリン 150 mg(ペプシン処理ガンマグロブリンは 100 mg)あたり 5 単位以上含まなければならないと生物基に定められている。筋注用は適応内容に麻疹予防が掲載されているが、静注用においては麻疹の適応はない。一

方、現在、世界で麻疹排除計画が進行しており、将来においては、ガンマグロブリン製剤中の麻疹抗体価が低下すると予想され、ガンマグロブリン製剤が生物基の基準値を満たせなくなる可能性が懸念されている。このような背景の中で、生物基に人免疫グロブリン製剤の麻疹抗体価の基準を設定する事に合理性があるのかも考える必要がある。他方、現在、抗麻疹ウイルス抗体価測定法には HI(赤血球凝集抑制)試験が含まれているが、アフ

リカミドリザルの赤血球を用いるため、将来的には実施が不可能になり、また、より利便性が期待される ELISA 等の新たな試験法の生物基への掲載の希望もある。本研究は将来における人免疫グロブリン製剤における麻疹抗体価測定法のあり方、並びに新規麻疹抗体測定法の導入について検討する事を目的としている。

B. 方法

感染研内でガンマグロブリン製剤における麻疹抗体測定の意義を確認し、今後の生物基、並びに検定のあり方を検討した。また、血液製剤協会に欧州局方、米国局方、WHO ガイドライン等におけるガンマグロブリン製剤の品質管理に関する規定の調査を依頼し、血液製剤協会の意見を聞いた。

C. 研究結果

以下の議論があった。

1. 静注用グロブリン製剤の適応には麻疹治療、予防のための使用が記載されておらず、筋注用の製剤があるため麻疹予防、治療として使用されることはほとんどない。
2. 静注用製剤は種々の病原体に対して、広範囲に一定量の活性を有する事を特徴としている。よって品質の確認方法として、特定の抗体価の測定で、全体の活性を評価することが適切であるかは議論がある。
3. EPでは1000人以上のプール血漿を用いて調整し、2種（細菌とウイルス）の抗体価がプール血漿の3倍以上と規定している。また、USPには規定はない。最終製品の麻疹抗体力価で品質を保証するよりも、原材料の管理や工

程管理等の一貫したGMPで製剤を管理した方が上述した、製剤の特徴にあった品質管理ができる可能性が考えられる（表2.3）。

4. 本試験の目的は最終製剤中に含まれるガンマグロブリンが抗原との結合活性を保持している事を確認するあり、他に適当な測定法があれば別の方法への変更も可能である。
5. 長期にわたって国家検定の麻疹抗体価試験で不合格になった製剤はない。したがって、現在承認されている製剤に関してはGMPの適用により製造法、および製剤の品質は安定していると考えられ、麻疹抗体価測定試験を生物基に残す必要はないとも考えられる。しかし、新規参入する製造所もある可能性もあるので、生物基からの削除は慎重に行う必要がある。
6. 麻疹抗体価が近年下がっていることから、今後、グロブリンが正常であっても麻疹抗体価試験において不合格になることが危惧される。
7. 麻疹抗体価以外の抗体価を最終製品で測定するのならば、抗体価の変化が予想されないかつ測定が容易な感染症等を選択すべきで、ワクチンが存在しない、常に流行し、抗原性が変化しない感染症に体する抗体が考えられる。筋注用製剤はウイルス性疾患（麻疹、A型肝炎、ポリオ）が適応になっており、麻疹以外の適応のあるウイルス感染症を選択するのは合理的である。
8. 筋注用グロブリンについては麻疹予防、症状の軽減化は製剤の適応となっているので、麻疹抗体価の測定は製剤の力価を確認する意味で必要である。

9. 省力化でき客観的な判定が可能な ELISA 等の測定方法の生物基一般試験法への掲載は、HI 試験用のアフリカミドリザル血球の入手が困難になる事を考慮しても検討する必要がある。

D. 考察

現時点では麻疹抗体価試験法を筋注用、静注用グロブリンの生物基からは削除しないこととした。だが、筋注用、静注用グロブリンを問わず、今後、麻疹罹患者が減少し、人の保持する麻疹抗体価が低下する可能性がある。よって製剤の品質に問題がなくても、生物基の基準値を維持できなくなる事が予想される。また、特に静注用グロブリンは幅広い抗体スペクトルを持つ事が特徴であり特定の抗体価を測定することでは、製剤の品質を保證する方法として適切ではない可能性もある。一般に、最終製品の基準値で製品の品質を管理するよりも、原材料や一貫した製造工程等から品質の管理をはかる方がより合理的であると考えられている。麻疹抗体価の低下が予想される現在、製造承認の内容とあわせて、生物基を見直す事が必要になる可能性がある。一方、ELISA 法等の麻疹抗体価測定法の採用に関しては、客観的な判定が可能である事や、HI 抗体価測定に用いるアフリカミドリザルの血球の供給の困難さを考慮し

て、血液製剤協会と協力して導入を検討していく必要があるだろう。

E. 結論

生物基にあるガンマグロブリン製剤の麻疹抗体価測定試験は当面、削除しない。近い将来、血液中の麻疹抗体価が低減する可能性があることから、グロブリン製剤の品質を管理できる合理的な方法があれば常に検討すべきでありそれに応じて生物基の改訂も必要になるかもしれない。ELISA 等の新規の麻疹抗体価測定法は生物基に掲載する方向で検討する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

表1. ガンマグロブリン製剤

筋注用グロブリン製剤	エタノール分画で取り出した免疫グロブリン、筋注なので局所に疼痛があり、大量投与ができない。速効成にかける	麻疹、A型肝炎、ポリオ等の感染予防、発症予防等
静注用グロブリン製剤	筋注用グロブリンから副作用の原因であった凝集体等処理したことにより静注を可能にしたもの	無、低ガンマグロブリン血症 ギラン・バレー症候群 川崎病 特発性血小板減少性紫斑症
特殊グロブリン製剤	ある特定の抗体を多く含んだ免疫グロブリン	抗HBs人免疫グロブリン 抗破傷風人免疫グロブリン 抗D人免疫グロブリン

表2. 筋注用グロブリン製剤の規格の比較

【筋注用】	生物製剤基準	EP4	USP32	WHO TRS 626
製造プール数	—	1000人以上	1000人以上	1000人以上
製剤の抗体価	—	2種(ウイルス1種、細菌1種)の抗体価がプール血漿の10倍以上(たん白16%のとき)	2種の抗体価がプール血漿の10倍以上	2種(ウイルス1種、細菌1種)の抗体価がプール血漿の10倍以上
性状	無色ないし黄褐色の液剤	(液剤) 澄明又は微黄色から淡褐色、保存中にわずかに混濁あるいは少量の微粒子を生じることがある。	—	—
溶解性	—	20分以内(凍結乾燥品)	—	—
pH試験	6.4~7.2	6.4~7.2(1%)	6.4~7.2(1%)	6.4~7.4(1%)
チメロサル含量試験	0.012w/v%以下	—	—	—
免疫グロブリンG含量試験	90%以上	90%以上	90%以上 (96%以上、Sec.640.103)	90%以上
含量	10%以上	10~18%	15~18%	10~18%
同定試験	適合	適合	—	適合
無菌試験	適合	適合	適合	適合
(異常)毒性試験	適合	適合	—	適合
発熱試験	適合(エンドトキシン)	適合	—	適合
麻疹抗体価試験	5単位/150mg	—	参照品以上(中和抗体)	—
単量体、二量体	—	85%以上	—	適合(フラグメント)
重合物	—	10%以内	—	適合
含湿度	—	規格内	—	規格内
HBs抗体価	—	0.15IU/g以上	—	—
HAV抗体価	—	100IU/mL以上 (HAV予防に用いる場合)	—	—
熱安定性	—	—	ゼラチン化を認めない	ゼラチン化を認めない
濁度	—	—	濁度を認めない	—
ジフテリア抗毒素	—	—	2単位/mL以上	—
ポリオtype1,2,3中和抗体	—	—	いずれか1種、参照品以上	—
製造日	—	—	抗体価測定日	—
貯法	-(10℃以下)	遮所	2~8℃	—

表3. 静注用グロブリンの規格の比較

【静注用】	生物製剤基準 (共通項)	EP4	USP32 静注グロブリン規定なし
製造プール数	—	1000人以上	—
製剤の抗体価	—	2種(ウイルス1種、細菌1種)の抗体価がプール血漿の3倍以上(たん白5%のとき)	—
性状	各条	(液剤)澄明又は様かに白濁した、無色から微黄色	—
サブクラス分布	—	表示義務	—
溶解性	—	30分以内(凍結乾燥品)	—
pH試験	各条	4.0~7.2(1%)	—
免疫グロブリンG含量試験	各条	85%以上	—
含量	5w/v%以上	3w/v%以上	—
単量体、二量体	—	90%以上	—
重合物	各条	3%以内	—
同定試験	適合	適合	—
抗補体否定試験	各条	1CH50/mg以下	—
無菌試験	適合	適合	—
(異常)毒性試験	適合	—	—
発熱試験	適合	適合	—
麻疹抗体価	各条(ペプシン処理以外5単位/150mg以上)	—	—
浸透圧	—	240mOsmol/kg以上	—
PKA	—	35IU/mL以下(3%)	—
抗A抗B抗体	—	1:64以下(3%)	—
含湿度	各条	適合	—
抗HBs抗体	—	0.5IU/g	—
アルキル化確認試験	各条	—	—
スルホ化確認試験	各条	—	—
貯法	各条	(液剤)表示どおり (乾燥)25℃以下	—
有効期間	各条	—	—
参考	—	—	—

動物を用いた安全性試験について

研究分担者	浜口 功	国立感染症研究所	血液・安全性研究部	部長
研究協力者	益見厚子	国立感染症研究所	血液・安全性研究部	
	倉光 球	国立感染症研究所	血液・安全性研究部	

研究要旨：ワクチン製剤の異常毒性否定試験の検定実施について、日本における当該試験の意義や設定の考え方についての理解を深め、共通の認識で今後の検定設定および廃止の考え方を明確に示すことを目標にする。国立感染症研究所とメーカーとの意見交換を行い、班研究での議論を開始した。

A. 研究背景と目的

日本における異常毒性否定試験は、製剤をモルモットに 5 ml 接種し、接種後の体重変動と健康状態を 7 日間記録し、これまで同一製剤で得られた母集団データとの間の体重変動の隔たりを統計学的に解析することにより、試験品固有の均質性を確認し品質を確認する目的で実施されている。

日本のロットリリースにおいては、ワクチン製造工程のすべてをチェックできるサマリーロットプロトコルのシステムを導入していないため、最終小分け製品の試験結果で判定しており、これにより、ロットの安全性・均質性・有効性が担保されるシステムとなっている。そのため本邦の現システム下において異常毒性否定試験は、基本的にすべてのワクチン製剤について試験を行う設定が望ましいと考えられる。

また近年、海外で安全性・有効性が高く評価された様々なワクチンが国内で承認され、販売が開始され始めた。これらのワクチンについて海外での実績から日本国内での異常毒性否定

試験の実施の廃止を求める要望が出されており、試験の設定あるいは廃止について、異常毒性否定試験の試験実施機関である国立感染症研究所での検討が求められている。

しかしながら、これまで異常毒性否定試験をどのような条件のもと国家検定として設定し、どのような条件が整えば廃止するかについての基準が確立されていなかった。そこで当研究班において、異常毒性否定試験を今後はどのように実施して行くかについて、国内外のワクチンメーカーと国立感染症研究所で意見交換を行い、これからの試験のあり方について双方が一定の共通見解を持つための議論を進める。

B. 検討内容

平成 21 年度、今後の異常毒性否定試験のあり方に関する第 1 回の会議として、異常毒性否定試験について検討する必要のある問題点をまとめ、国内外のワクチンメーカーと国立感染症研究所との間で意見交換を行った。以下、第 1 回会議での検討内容

- ① B 型肝炎ワクチンの異常毒性否定試験廃止の検討について
- ② 肺炎球菌ワクチンの異常毒性否定試験廃止の検討について
- ③ 異常毒性否定試験設定と廃止の考え方について
- ④ 新しいアジュバント含有製剤の取り扱いについて
- ⑤ 生物学的製剤基準改正へ向けての研究

C. 研究結果

① B 型肝炎ワクチンの異常毒性否定試験廃止の検討について

B 型肝炎ワクチンは、化血研（ビームゲン®：組換え沈降 B 型肝炎ワクチン）および万有製薬（メルク）（ヘプタボックス®-II：組換え沈降 B 型肝炎ワクチン）より出検されているが、メーカーより異常毒性否定試験の廃止を求める要望が提出されている。本製剤は、平成 3 年の試験開始以来、不合格となった試験品はなく、日本における異常毒性否定試験の考え方の観点からも均質性は担保されていると考えられる。本製剤については試験廃止に向けた議論を進める。

② 肺炎球菌ワクチンの異常毒性否定試験廃止の検討について

肺炎球菌ワクチンは、平成 17 年に異常毒性否定試験において試験不合格になった経緯があるため、海外の実績から試験廃止の要望が提出されているが、今後も注意深く製品を観察しなければならないと考えられる。ただし、肺炎球菌ワクチン接種によるモルモットの体重減少は、他の製剤と比べても著しく、近年はある一定の割合以上の体重減少を示す場合は動物愛護の観点から試験続行は望ましくないとの考え方があることから、試験の接

種量の改訂は、十分議論されるべき問題であると考えられた。

③ 異常毒性否定試験設定と廃止の考え方について

ほぼ同時に承認された 2 つの海外メーカーのワクチンのプレベナー®とサーバリックス®について、プレベナー®は異常毒性否定試験が設定されず、サーバリックス®は、試験が実施されることになっている。

これに対して国立感染症研究所の見解として、プレベナー®に関しては、これまでの海外試験法により十分なロット数の毒性否定試験が合格となり、また 10 年にわたる海外での接種とその副作用調査の結果、極めて高い均質性・安全性が認められると判断されたため異常毒性否定試験が設定されなかったことが製剤担当室長から説明された。しかしながら、試験が設定されなかった際に明確な基準が設けられていた訳ではなく、今後の設定基準を明確にするため、各ワクチンメーカーでコンセンサスの取れる方法で試験の導入基準を設定しておく必要があることが課題として挙げられた。

そのため今後の異常毒性否定試験のあり方についてメーカーと感染症研究所で意見交換し、これからの試験の設定の条件・廃止の条件を建設的に議論して行くことで合意を得た。

④ 新しいアジュバント含有製剤の取り扱いについて

平成 21 年度に海外で開発されたアジュバント入りワクチンで日本の一般試験法の試験設定で異常毒性否定試験を行った場合、試験そのものが成立しない場合があることを経験した。現在の所は特例承認に限られた経験

であるが、今後様々な特性を持ったワクチンが開発される中で、このようなアジュバント入り製剤が通常の承認審査を経て日本国内で使用される可能性も十分考えられ得ることである。その場合、どのような方法で製品の均質性を担保すべきかについて、あらかじめ検討して行くことは非常に重要な課題であると考えられた。

⑤ 生物学的製剤基準改正へ向けての研究

平成 21 年度、平成 22 年度で議論された内容を基に生物基改正の際に提言を行うことは可能であると考えられる。よって現段階での日本の異常毒性否定試験の検定の設定の考え方について十分に議論された後に、生物基に記載される異常毒性否定試験の削除の考え方についても議論を進めて行く。

D. 考察・結論

海外メーカーの異常毒性否定試験の考え方は、製造工程の間に混入する毒性物質を検出する試験であるという位置付けであり、WHO の推奨する SLP のシステムが導入されていない日本のロットリリースにおける異常毒性否定試験の意義に対して、海外メ

ーカーの理解がまだ十分に得られていないと考えられる。しかしながら当研究班において本邦の異常毒性否定試験に対するメーカーからの要望と現在の異常毒性否定試験の問題点を相互に意見交換する中で、本邦の異常毒性否定試験についての理解が深まり、今後の異常毒性否定試験のあり方について、双方が建設的に検討を進めていくことが肝要と考えられた。

E. 研究発表

論文発表

Mizukami T, Masumi A, Momose H, Kuramitsu M, Takizawa K, Naito S, Maeyama J-I, Furuhashi K, Tsuruhara M, Hamaguchi I, Yamaguchi K. An improved abnormal toxicity test by using reference vaccine-specific body weight curves and histopathological data for monitoring vaccine quality and safety in Japan. *Biologicals*, 37, 8-17, 2009

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

V. 研究成果の刊行に関する一覧表

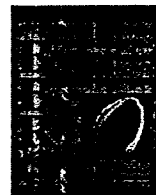
書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社	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	巻号	ページ	出版年
Sat, H., R. Kusumoto -Matsuo, Y. Ishii, S. Mori, T. Nakahara, F. Shinkai-Ouchi, K. Kawana, T. Fujii, Y. Taketani, T. Kanda, and <u>I. Kukimoto.</u>	Identification of nucleolin as a protein that binds to human papillomavirus type 16 DNA.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	387	525-530	2009
Mizukami, T., Masumi, A., Momose, H., Kuramitsu, M., Takizawa, K., Naito, S., Maeyama, J-I., Furuhata, K., Tsuruhara, M., <u>Hamaguchi, I.</u> , Yamaguchi, K.	An improved abnormal toxicity test by using reference vaccine -specific body weight curves and histopathological data for monitoring vaccine quality and safety in Japan.	Biologicals	37	8-17	2009
Momose, H., Imai, J-I, <u>Hamaguchi, I.</u> , Kawamura, M., Mizukami, T., Naito, S., Masumi, A., Maeyama, J-I., Takizawa, K., Kuramitsu, M., Nomura, N., Watanabe, S., Yamaguchi, K.	Induction of indistinguishable gene expression patterns in rats by Vero cell-derived and mouse brain-derived Japanese encephalitis vaccines.	Jpn. J. Infect. Dis.	63	25-30	2010

VI. 研究成果の刊行物



Identification of nucleolin as a protein that binds to human papillomavirus type 16 DNA

Hidetaka Sato^{a,b}, Rika Kusumoto-Matsuo^a, Yoshiyuki Ishii^a, Seiichiro Mori^a, Tomomi Nakahara^a, Fumiko Shinkai-Ouchi^c, Kei Kawana^b, Tomoyuki Fujii^b, Yuji Taketani^b, Tadahito Kanda^a, Iwao Kukimoto^{a,*}

^aPathogen Genomics Center, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan

^bDepartment of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

^cDepartment of Biochemistry and Cell Biology, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 June 2009

Available online 16 July 2009

Keywords:

Human papillomavirus

Nucleolin

Host factor

Genome maintenance

ABSTRACT

Transcription, replication, and segregation of human papillomaviruses (HPVs) are regulated by various host factors, but our understanding of host proteins that bind to the HPV genome is limited. Here we report the results of a search of cellular proteins that can associate with specific genomic regions of HPV type 16 (HPV16). We found that human nucleolin, an abundant nucleolar protein, was preferentially captured *in vitro* by an HPV16 genomic fragment from nucleotide positions (nt) 531–780. Electrophoretic mobility shift assays with a bacterially expressed nucleolin revealed that nucleolin bound to an HPV16 genomic region between nt 604 and 614 in a sequence-dependent manner. Chromatin immunoprecipitation analysis showed that both exogenous and endogenous nucleolin bound to a plasmid containing the HPV16 genomic region in HeLa cells. Furthermore, nucleolin associated with the HPV16 genome stably maintained in HPV16-infected W12 cells, suggesting that the nucleolin binding may be involved in the dynamics of the HPV genome in cells.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Human papillomaviruses (HPVs), which are recognized as the causative agents of cervical cancer, have circular double-stranded DNA genomes with sizes close to 8 kbp [1]. HPV infects basal cells in the epidermis and its genome is maintained as episomes, whereas the viral genome amplification occurs in upper differentiating epithelium [2]. Due to the limited coding capacity of its small genome, HPV relies heavily on the function of host cell proteins for viral transcription, replication and segregation [3,4]. The transcription of the HPV genome is driven by two major promoters: in HPV type 16 (HPV16) genome, the early promoter P₉₇ directs early gene transcription, while the late promoter P₆₇₀ induces capsid expression. After initial unwinding of the replication origin by the coordinated action of the HPV E1 and E2 proteins, the HPV DNA replication progresses with the use of cellular replication proteins. For viral genome maintenance, the HPV genome is passively segregated by being tethered to host chromosomes, then passed into nuclei of daughter cells. Because of a lack of cell culture systems for efficient HPV propagation, molecular mechanisms of these processes are not fully understood.

Nucleolin is an abundant, ubiquitously expressed protein that is found in the nucleolus, the nucleoplasm, and on the cell surface, and is involved in regulation of ribosomal DNA (rDNA) transcription and the maturation of pre-ribosomal RNA [5]. In addition, nucleolin exerts several nuclear functions related to the transcription of several genes by the RNA polymerase II [6–8], genotoxic stress response [9], and chromosome congression in mitosis [10].

To gain new insights into how the dynamics of the HPV genome are regulated by host factors, we searched for cellular proteins that can bind to the two promoter regions of HPV16 using an unbiased proteomic approach. We describe the identification and characterization of nucleolin as an HPV16 genome-binding protein that may play a role in regulation of the HPV life cycle.

Materials and methods

Isolation of HPV16 genome-binding protein and its identification by peptide mass fingerprinting. Three HPV16 DNA fragments, I (nt 7791–120, 234 bp), II (nt 131–360, 230 bp), and III (nt 531–780, 250 bp), were generated by PCR using following primers: I forward, 5'-biotin-TAC ATG AAC TGT GTA AAG GTT AGT CA-3'; I reverse, 5'-TGT GGG TCC TGA AAC ATT GCA GTT CTC TTT-3'; II forward, 5'-biotin-AGA AAG TTA CCA CAG TTA TGC ACA GA-3'; II reverse, 5'-GTT CCA TAC AAA CTA TAA CAA TAA TGT CTA-3'; III forward, 5'-biotin-CAA GAA CAC GTA GAG AAA CCC AGC TG-3'; III reverse, 5'-GTG TGT

* Corresponding author. Address: Pathogen Genomics Center, National Institute of Infectious Diseases, 4-7-1 Gakuen, Musashi-murayama, Tokyo 208-0011, Japan. Fax: +81 42 567 5632.

E-mail address: ikuki@nih.go.jp (I. Kukimoto).

GCT TTG TAC GCA CAA CCG-3'. The biotinylated PCR products were purified using the Wizard SV gel and PCR clean-up system (Promega) and coupled to Dynabeads M-280 streptavidin (DynaL, Norway) in a buffer consisting of 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 mM EDTA, and 1 M NaCl. The HeLa nuclear extract was prepared by Dignam's procedure and incubated with the HPV16 DNA-coupled magnetic beads at 4 °C overnight. The beads were then washed three times in a wash buffer (10 mM Hepes, pH 7.9, 200 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1% NP-40, and 10% glycerol). The bound proteins were released from the beads in SDS-sample buffer by boiling for 5 min and fractionated in a 4–20% gradient SDS-polyacrylamide gel (Daiichi Pure Chemicals, Japan), followed by silver staining. The 95-kDa protein band bound to fragment III was excised from the gel and subjected to in-gel trypsin digestion. The resultant peptide mixtures were analyzed by MALDI-QIT-TOF MS (AXIMA-QIT, Shimadzu Biotech, Japan). Mascot software (Matrix Science) was used for protein identification.

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA). The full-length cDNA of human nucleolin was amplified by RT-PCR from mRNA of HeLa cells. The resultant cDNA sequence completely matched the nucleolin sequence in the GenBank (NM 005381). To generate an expression plasmid for glutathione *S*-transferase (GST) fused nucleolin, the cDNA fragment encoding nucleolin amino acid (aa) from 289 to 710 was amplified by PCR with the full-length nucleolin cDNA as a template, and cloned into pGEX-2TK (GE Healthcare). GST-nucleolin and GST were expressed in *Escherichia coli* and purified using a GSTrap HT column and an AKTAPrime (GE Healthcare). The EMSA was performed as described previously [11]. The DNA/protein complex was separated on a 5% polyacrylamide gel and visualized by autoradiography on X-ray films.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay. An expression plasmid for N-terminally FLAG-tagged nucleolin (FLAG-nucleolin) was constructed by cloning the full-length cDNA of nucleolin into p3xFLAG-CMV10 (Sigma). The ChIP assay was performed as described previously [11] with some modifications. Briefly, HeLa cells were transfected with pGL3-P₆₇₀ or pGL3-Basic (Promega) together with the FLAG-nucleolin expression plasmid or p3xFLAG-CMV10 using FuGENE6 (Roche). At 48 h after the transfection, the cells were fixed with 1% formaldehyde at 37 °C for 5 min, lysed and sonicated using a Bioruptor (Cosmobio, Japan). The sonicated extract was immunoprecipitated with specific antibodies that had been coupled to Dynabeads M-280 sheep anti-mouse IgG (DynaL). Antibodies used were anti-FLAG M2 (Sigma), anti-nucleolin (MS-3, Santa Cruz, or 4E2, Abcam), or control mouse IgG (Santa Cruz). After washing the beads, the immunoprecipitated DNA/protein complexes were eluted, and reverse cross-linked. DNA was purified and subjected to PCR for HPV16 DNA (from nt 501 to 670), 18S rDNA, or pGL3-Basic. PCR primers were as follows: HPV16 forward, 5'-CCG GTC GAT GTA TGT CTT GTT GCA GAT CAT-3'; HPV16 reverse, 5'-CAT CCT CCT CTG AGC TGT CAT TTA ATT-3'; 18S rDNA forward, 5'-GCC TGG ATA CCG CAG CTA GGA ATA ATG G-3'; 18S rDNA reverse, 5'-TTG ATT AAT GAA AAC ATT CTT GGC AAA TG-3'; pGL3-Basic forward, 5'-AGA CCC ACG CTC ACC GGC TCC AGA-3'; pGL3-Basic reverse, 5'-ACG AGC GTG ACA CCA CGA TGC CTG T-3'. The amounts of the immunoprecipitated DNA were quantified by real-time PCR analysis using a LightCycler 480 (Roche) with the LightCycler 480 SYBR Green I Master reagent (Roche). W12 cells were cultured in an undifferentiated state as described [12], and the ChIP assay was performed without plasmid transfection.

Generation of nucleolin-knockdown cells and Western blotting. The stable nucleolin-knockdown cell line derived from HeLa cells was established by transfection of an expression plasmid for small hairpin RNA (shRNA) against nucleolin and subsequent selection of cells in the presence of 10 µg/ml puromycin. The shRNA-expression plasmid was constructed by cloning the shRNA target sequence for nucleolin (5'-GGA AGA CCG TGA AAT TGA T-3') [13]

into pBasi-hU6 (Takara, Japan). For Western blot analysis, cell extracts were prepared by boiling cells in SDS-sample buffer. Protein samples were separated on a 12% SDS-polyacrylamide gel, transferred to a nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell, Germany), and probed with a specified primary antibody and a peroxidase-conjugated secondary antibody. Antibodies used were anti-nucleolin (MS-3, Santa Cruz, or 3G4B20, Active Motif), anti-PCNA (PC10, Santa Cruz), and anti-FLAG M2. Specific proteins were visualized using an ECL Western blot detection system (GE Healthcare).

Results

Identification of nucleolin as a protein binding to an HPV16 genomic fragment

Two regions in the HPV16 genome were chosen as targets to screen for cellular proteins that might potentially regulate transcription and/or replication of HPV (I and III in Fig. 1A). Fragment I (nt 7791–120) contains the regulatory sequence for the HPV16 early promoter P₉₇ and the replication origin, whereas fragment III (nt 531–780) includes the late promoter P₆₇₀. To find specific binding proteins for these fragments, fragment II (nt 131–360) was used as a control for comparison, because no particular binding proteins were assigned to this region. These DNA fragments were generated by PCR so as to have 5'-biotin-labeled ends, coupled to streptavidin-conjugated magnetic beads and then incubated in a nuclear extract prepared from HeLa cells. After washing the beads, bound proteins were released and separated by SDS-PAGE, followed by silver staining. Among many protein bands detected, fragment III selectively bound to a 95-kDa protein (Fig. 1B), while no specific proteins were detected for fragment I. To identify the 95-kDa protein, the band was excised from the gel, digested with trypsin, then subjected to peptide mass fingerprinting. The list of observed mass fingerprints significantly fitted the predicted mass fingerprint of human nucleolin (*p* value = 0.0094). Western blot analysis with an anti-nucleolin antibody verified an enrichment of nucleolin in the bound fraction of fragment III (Fig. 1C).

In vitro binding of nucleolin to the HPV16 DNA

An electrophoretic mobility shift assay (EMSA) revealed that a recombinant nucleolin bound to a site in the HPV16 genome from nt 591 to 620. Human nucleolin from amino acid 289 to 710, which contains four RNA-binding domains and a C-terminal glycine/arginine-rich region (Fig. 2A), was expressed as a fusion protein with GST (GST-nucleolin) in bacteria and affinity purified (Fig. 2B). This truncated nucleolin has been shown to exhibit DNA-binding activity [6]. GST-nucleolin was examined in EMSA for its capability to form a complex with overlapping DNA probes having the HPV16 sequences from nt 531 to 660. Among the HPV16 probes tested, probe *f* generated a shifted band with GST-nucleolin (Fig. 2C).

Nucleolin has been previously reported to bind to a different location in the HPV18 genome *in vitro*, and the binding site has been assigned to the sequence 5'-TTGCTGCATAA-3' (nt 7642–7653 in the HPV18 genome) [14]. Similarity between the HPV18 sequence and probe *f* was explored, and the same sequence motif, 5'-TTGXXXCAXA-3', was found in the two sequences (Fig. 2D, upper panel). To test whether this sequence motif was recognized by nucleolin, base substitutions that have been shown to abolish the nucleolin binding to the HPV18 site were introduced into probe *f*. The mutations completely disrupted the GST-nucleolin binding to the probe (Fig. 2D), demonstrating that nucleolin bound to this motif in probe *f* in a sequence-dependent manner.

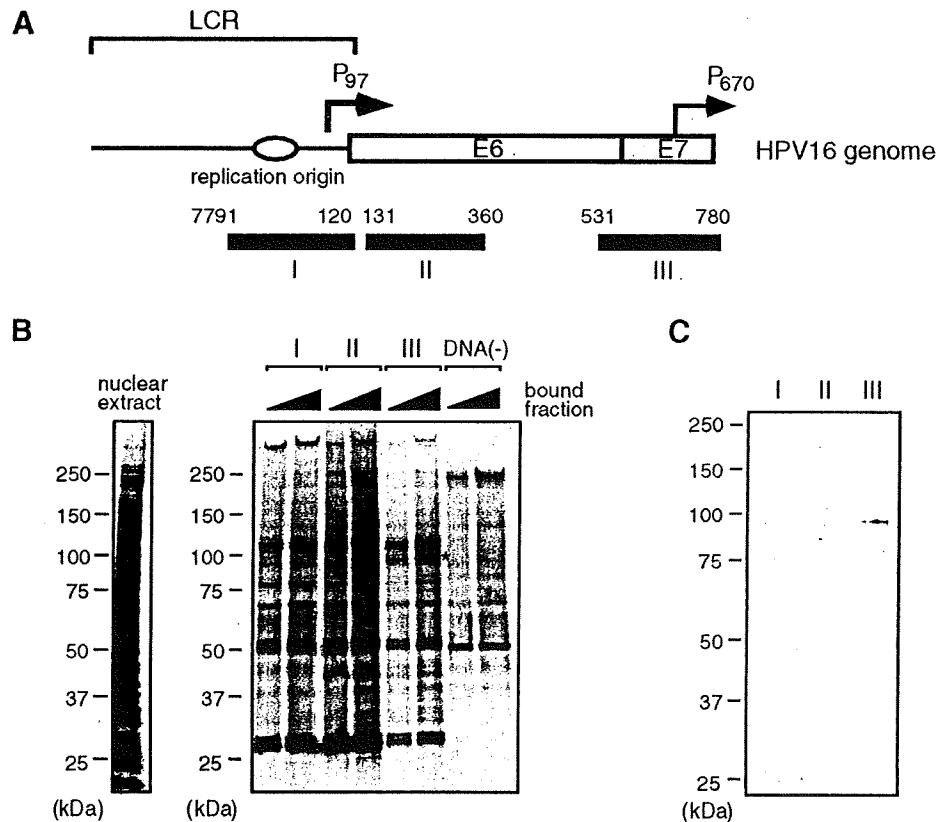


Fig. 1. Isolation of cellular proteins bound to HPV16 genomic fragments. (A) Schematic for locations of three HPV16 DNA fragments (I, II, and III) used to screen for binding proteins to HPV16 DNA. Numbers above the fragments indicate nucleotide positions in the HPV16 genome. The positions of the early promoter (P_{97}), the late promoter (P_{670}), the long control region (LCR), and the replication origin are presented. (B) The nuclear extract of HeLa cells was incubated with magnetic beads that were coupled with the HPV16 DNA fragments or with the beads alone. The bound fractions were recovered and resolved by SDS-PAGE, followed by silver staining. A 95-kDa band bound to fragment III is indicated by an asterisk. (C) Western blot analysis of the bound fractions using anti-nucleolin antibody (Santa Cruz).

GST-nucleolin bound to an HPV18 probe having the nucleolin-binding motif (Fig. 2D), which confirmed the integrity of our GST-nucleolin preparation. Additionally, several base substitutions were introduced into the motif in probe f (Fig. 2E, upper panel). All mutated probes gave rise to a band shift more efficiently than the original probe f (Fig. 2E), indicating that nucleolin recognizes this motif but it is not an optimal sequence for nucleolin binding.

Binding of nucleolin to the HPV16 DNA in cells

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) analysis demonstrated that exogenous nucleolin bound to the HPV16 DNA in cells. An expression plasmid for FLAG-tagged nucleolin (FLAG-nucleolin) (Fig. 3A) was constructed and used for ChIP analysis. HeLa cells were transfected with the HPV16 reporter plasmid pGL3- P_{670} , which contains the HPV16 genomic region from nt 7003 to 868 [11], with or without the FLAG-nucleolin expression plasmid. In the presence of FLAG-nucleolin, an anti-FLAG antibody precipitated the HPV16 DNA fragment containing from nt 501 to 670 compared to the control IgG precipitate (Fig. 3B). Without FLAG-nucleolin expression, the anti-FLAG antibody did not precipitate the HPV16 DNA. The anti-FLAG antibody recovered an endogenous target of nucleolin, 18S rDNA, which indicated that exogenous FLAG-nucleolin behaved as endogenous one. The backbone plasmid lacking the HPV16 sequence was not precipitated with the anti-FLAG antibody in the presence of FLAG-nucleolin (Fig. 3C), demonstrating that the HPV16 sequence was responsible for the FLAG-nucleolin binding in cells. Similar results were obtained with

human primary foreskin keratinocytes (data not shown), suggesting that the nucleolin binding to the HPV16 DNA is not specific to cancer cells.

Endogenous nucleolin also associated with the HPV16 DNA in cells. When the ChIP assay was performed in HeLa cells transfected with pGL3- P_{670} alone, the precipitate with an anti-nucleolin antibody showed an enrichment of the HPV16 DNA compared to basal level DNA obtained with a control antibody (Fig. 3D). To further examine binding properties of nucleolin to the HPV16 DNA in cells, a stable HeLa cell line expressing a reduced level of nucleolin was generated using an shRNA-mediated knockdown technique. Western blot analysis showed that the nucleolin level was reduced by one-third in the knockdown cells relative to parental cells (Fig. 3E). The ChIP assay revealed that the binding of nucleolin to the transfected HPV16 DNA was weakened in the knockdown cells compared to wild-type cells, and a similar reduction of nucleolin binding to rDNA loci was observed (Fig. 3F), suggesting that nucleolin's affinity for the HPV16 DNA is comparable to that for endogenous rDNA loci.

The ChIP assay was further extended to another human cell line, W12 cells, established from a cervical intraepithelial lesion and shown to maintain up to 1000 copies of the complete HPV16 genome as episomes in cell culture [12,15]. The immunoprecipitation with the anti-nucleolin antibody from the cross-linked chromatin of W12 cells enriched the HPV16 genomic DNA two to threefold compared to the control IgG precipitate, and a similar enrichment was observed with rDNA (Fig. 4). The results suggest that endogenous nucleolin is inherently bound to the HPV16 genome in the HPV16-infected cells.

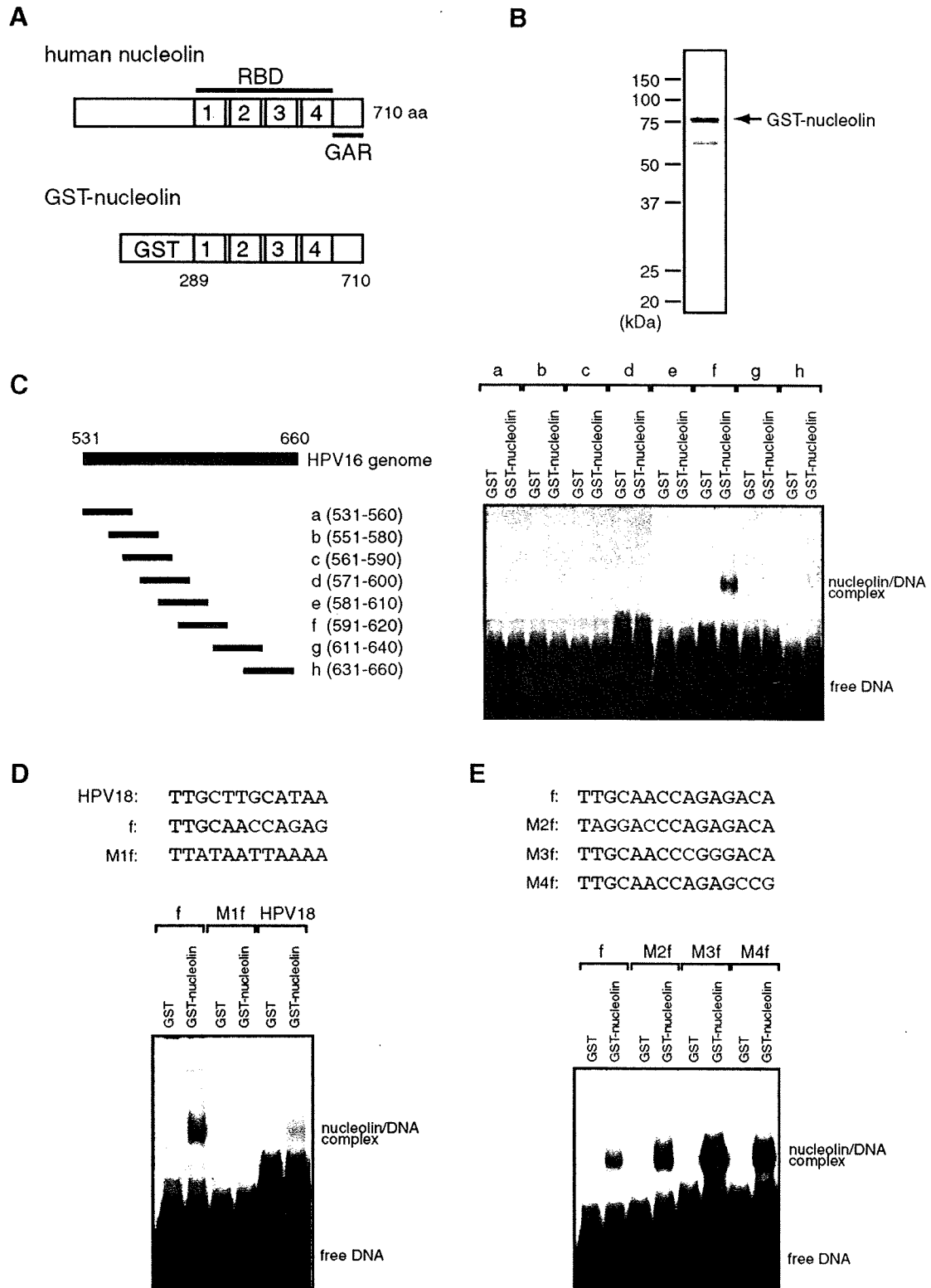


Fig. 2. *In vitro* binding of nucleolin to HPV16 DNA. (A) Schematic representation of human nucleolin and recombinant GST-nucleolin. Four RNA-binding domains (RBD1–4) and the glycine/arginine-rich region (GAR) are indicated. (B) SDS-PAGE analysis of GST-nucleolin with GelCode stain (Pierce). (C) EMSA showing a complex formation between GST-nucleolin and [³²P]-labeled oligonucleotide probes having the HPV16 genome sequence from nt 531 to 660. The genomic locations of the probes are presented on the left. (D) EMSA using mutated probe f to examine a sequence-specific binding of GST-nucleolin. Sequence alignment among the HPV18 nucleolin-binding sequence, probe f, and mutated probe f (M1f) is shown above. (E) Mutational analyses of probe f by EMSA. Base substitutions introduced into probe f are shown above.

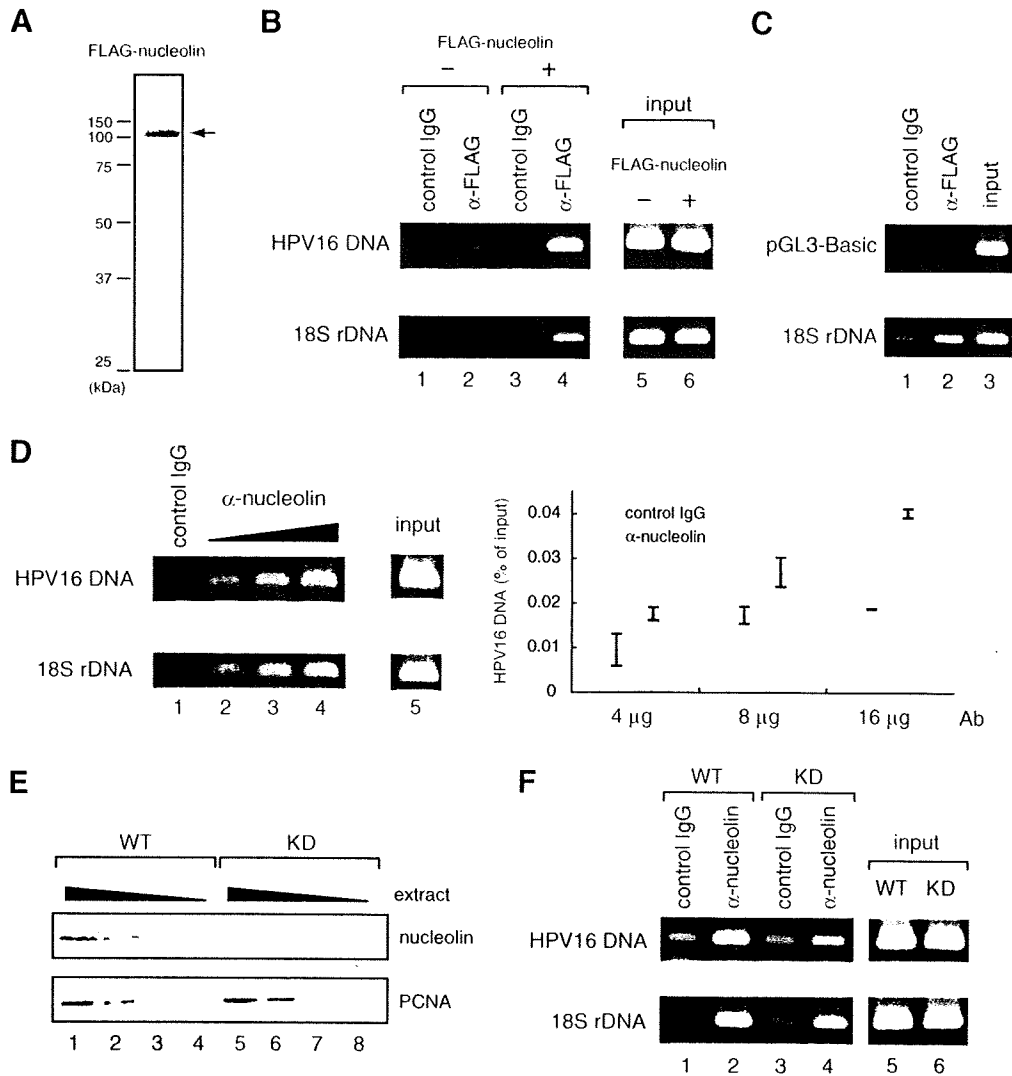


Fig. 3. Binding of nucleolin to HPV16 DNA in HeLa cells. (A) Western blot analysis of exogenous FLAG-nucleolin in HeLa cells using anti-FLAG antibody. (B) Chromatin immunoprecipitation analysis to detect binding of FLAG-nucleolin to HPV16 DNA in HeLa cells transfected with pGL3- P_{670} , which contains the HPV16 genome sequence from nt 7003 to 868, together with the FLAG-nucleolin expression plasmid or its backbone plasmid. Cross-linked FLAG-nucleolin/DNA complexes were immunoprecipitated with anti-FLAG antibody (lanes 2 and 4) or control mouse IgG (lanes 1 and 3), and the immunoprecipitated DNA was purified and subjected to PCR for the HPV16 DNA (nt 501–670) or 18S rDNA. The PCR products were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis with ethidium bromide stain. Part (0.3%) of the input chromatin was analyzed. (C) ChIP analysis using HeLa cells transfected with pGL3-Basic and the FLAG-nucleolin expression plasmid. ChIP was performed with anti-FLAG antibody (lane 2) or control IgG (lane 1), followed by PCR for the pGL3-Basic sequence or 18S rDNA. (D) ChIP analysis to detect binding of endogenous nucleolin to the HPV16 DNA in HeLa cells transfected with pGL3- P_{670} alone. Anti-nucleolin antibody (Santa Cruz) was used to recover DNA/nucleolin complexes. The increasing amounts of antibodies (lanes 1 and 2, 4 μ g; lane 3, 8 μ g; lane 4, 16 μ g) were used for ChIP. The amounts of immunoprecipitated HPV16 DNA were quantified by real-time PCR and shown as a percentage of the input HPV16 DNA in the right panel. Results are presented as means \pm standard errors of two independent experiments. (E) Western blot analysis using total cell extracts from wild-type (WT) and nucleolin-knockdown (KD) HeLa cells. Twofold serially diluted extracts (lanes from 1 to 4 for WT cells; lanes from 5 to 8 for KD cells) were subjected to Western blotting with anti-nucleolin (Active Motif) or anti-PCNA antibodies. (F) ChIP analysis using wild-type and nucleolin-knockdown HeLa cells. Cross-linked nucleolin/DNA complexes from WT (lanes 1 and 2) and KD cells (lanes 3 and 4) were immunoprecipitated with anti-nucleolin antibody (Abcam) (lanes 2 and 4) or control mouse IgG (lanes 1 and 3), and the immunoprecipitated DNA was subjected to PCR for the HPV16 DNA (upper panel) or 18S rDNA (lower panel).

Discussion

Here we report the preferential binding of nucleolin to the HPV16 genomic region from nt 531 to 780. This genomic region is a “hot spot” for interactions with many cellular transcription factors that regulate the late promoter P_{670} . CCAAT displacement protein (CDP) and YY1 associate with this region to suppress the basal transcription from P_{670} [16–18], whereas multiple bindings of hSkn-1a and CCAAT/enhancer-binding protein β (C/EBP β) to the same region relieved the repression by CDP and YY1, leading to activation of P_{670} [11,19]. Nucleolin bound to the HPV16 genomic region from nt 591 to 620 and recognized the sequence motif 5'-TTGCXXXCAXA-3' from nt 604 to 614. This sequence partially

overlaps with a binding site for C/EBP β [11], which suggests functional competition between C/EBP β and nucleolin for P_{670} regulation. However, contrary to the previous report showing an enhancing effect of nucleolin on the HPV18 early promoter [14], neither expression of FLAG-nucleolin nor knockdown of endogenous nucleolin by RNAi in HeLa cells had obvious effects on the P_{670} activity in a transient reporter assay (Sato et al., unpublished observation), questioning nucleolin's role in the HPV transcription.

Since nucleolin associated with the HPV16 genome in W12 cells, the nucleolin binding to the HPV16 genome likely occurs in the context of natural infection. With regard to maintenance of the viral genome, it is worth noting that a plasmid containing an HPV16 genomic fragment from the E6 to E7 region can be stably

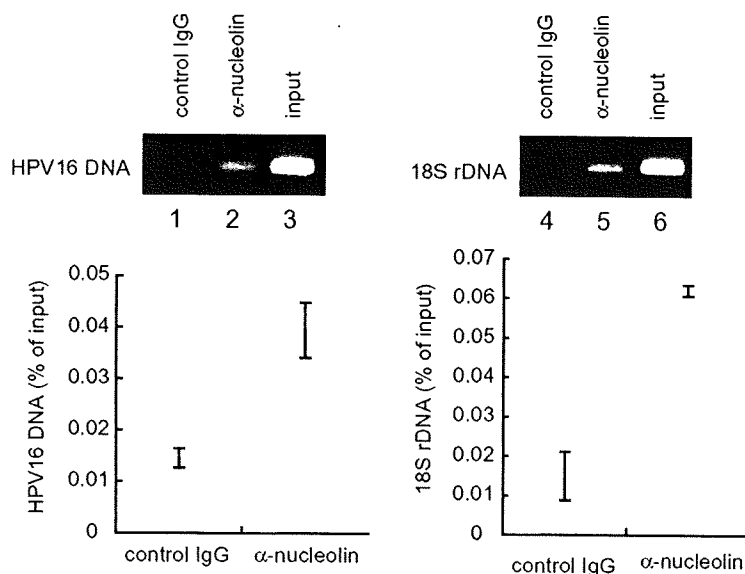


Fig. 4. Binding of nucleolin to HPV16 genome in W12 cells. ChIP analysis using W12 cervical neoplasia cells to detect binding of endogenous nucleolin to the HPV16 genome or rDNA. Cross-linked nucleolin/DNA complexes were immunoprecipitated with anti-nucleolin antibody (Abcam) (lanes 2 and 5) or control mouse IgG (lanes 1 and 4), and the immunoprecipitated DNA was subjected to PCR for the HPV16 DNA (nt 501–670) (lanes 1 and 2) or 18S rDNA (lanes 4 and 5). Part (0.3%) of the input chromatin was analyzed (lanes 3 and 6). The amounts of immunoprecipitated DNA were quantified by real-time PCR and shown as a percentage of the input DNA. Results are presented as means \pm standard errors of two independent experiments.

maintained in human cells in the absence of the viral E1 and E2 proteins [20]. This finding indicates a genome maintenance mode that is completely dependent on host proteins (independent of virally encoded proteins). Given that the nucleolin-binding site located from nt 604 to 614 lies in the E7 region, nucleolin may facilitate E1/E2-independent maintenance of the HPV genome. Detailed analysis of subcellular localization of nucleolin has demonstrated that nucleolin becomes localized at the chromosome periphery during mitosis in HeLa cells [10]. Thus, nucleolin might be involved in tethering the HPV genome to host chromosomes, which prevents the HPV genome from diffusing into cytoplasm during mitosis.

Lastly, nucleolin has been reported to play roles in the life cycle of other human viruses. Nucleolin interacts with nonstructural protein 5B of hepatitis C virus (HCV) and this interaction seems to be required for efficient replication of HCV [13]. Nucleolin localizes to the viral replication compartments of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) in the nucleus during productive infection and the knockdown of nucleolin by RNAi inhibits HSV-1 replication [21]. Thus, it will be of particular interest to investigate the exact function of nucleolin in the HPV life cycle in future studies.

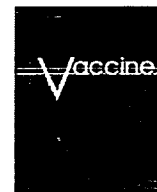
Acknowledgment

We thank Dr. Paul Lambert for providing us with the W12 cell line.

References

- [1] H. zur Hausen, Papillomavirus infections—a major cause of human cancers, *Biochim. Biophys. Acta* 1288 (1996) F55–F78.
- [2] M.S. Longworth, L.A. Laimins, Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68 (2004) 362–372.
- [3] F. Thierry, Transcriptional regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma, *Virology* 384 (2009) 375–379.
- [4] A.A. McBride, Replication and partitioning of papillomavirus genomes, *Adv. Virus Res.* 72 (2008) 155–205.
- [5] F. Mongelard, P. Bouvet, Nucleolin: a multiFACeTed protein, *Trends Cell Biol.* 17 (2007) 80–86.

- [6] E. Grinstein, Y. Du, S. Santourlidis, J. Christ, M. Uhrberg, P. Wernet, Nucleolin regulates gene expression in CD34-positive hematopoietic cells, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 12439–12449.
- [7] S. Samuel, J.C. Twizere, K.K. Beifuss, L.R. Bernstein, Nucleolin binds specifically to an AP-1 DNA sequence and represses AP1-dependent transactivation of the matrix metalloproteinase-13 gene, *Mol. Carcinog.* 47 (2008) 34–46.
- [8] G.G. Ying, P. Proost, J. van Damme, M. Bruschi, M. Introna, J. Golay, Nucleolin, a novel partner for the Myb transcription factor family that regulates their activity, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 4152–4158.
- [9] K. Kim, D.D. Dimitrova, K.M. Carta, A. Saxena, M. Daras, J.A. Borowiec, Novel checkpoint response to genotoxic stress mediated by nucleolin-replication protein a complex formation, *Mol. Cell. Biol.* 25 (2005) 2463–2474.
- [10] N. Ma, S. Matsunaga, H. Takata, R. Ono-Maniwa, S. Uchiyama, K. Fukui, Nucleolin functions in nucleolus formation and chromosome congression, *J. Cell Sci.* 120 (2007) 2091–2105.
- [11] I. Kukimoto, T. Takeuchi, T. Kanda, CCAAT/enhancer binding protein beta binds to and activates the P670 promoter of human papillomavirus type 16, *Virology* 346 (2006) 98–107.
- [12] S. Jeon, B.L. Allen-Hoffmann, P.F. Lambert, Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells, *J. Virol.* 69 (1995) 2989–2997.
- [13] T. Shimakami, M. Honda, T. Kusakawa, T. Murata, K. Shimotohno, S. Kaneko, S. Murakami, Effect of hepatitis C virus (HCV) NS5B-nucleolin interaction on HCV replication with HCV subgenomic replicon, *J. Virol.* 80 (2006) 3332–3340.
- [14] E. Grinstein, P. Wernet, P.J. Snijders, F. Rosl, I. Weinert, W. Jia, R. Kraft, C. Schewe, M. Schwabe, S. Hauptmann, M. Dietel, C.J. Meijer, H.D. Royer, Nucleolin as activator of human papillomavirus type 18 oncogene transcription in cervical cancer, *J. Exp. Med.* 196 (2002) 1067–1078.
- [15] M.A. Stanley, H.M. Browne, M. Appleby, A.C. Minson, Properties of a non-tumorigenic human cervical keratinocyte cell line, *Int. J. Cancer* 43 (1989) 672–676.
- [16] W. Ai, E. Toussaint, A. Roman, CCAAT displacement protein binds to and negatively regulates human papillomavirus type 6 E6, E7, and E1 promoters, *J. Virol.* 73 (1999) 4220–4229.
- [17] W. Ai, J. Narahari, A. Roman, Yin yang 1 negatively regulates the differentiation-specific E1 promoter of human papillomavirus type 6, *J. Virol.* 74 (2000) 5198–5205.
- [18] K. Sato, T. Takeuchi, I. Kukimoto, S. Mori, T. Yasugi, T. Yano, Y. Taketani, T. Kanda, Human papillomavirus type 16 P670 promoter is negatively regulated by CCAAT displacement protein, *Virus Genes* 35 (2007) 473–481.
- [19] I. Kukimoto, T. Kanda, Displacement of YY1 by differentiation-specific transcription factor hSkn-1a activates the P(670) promoter of human papillomavirus type 16, *J. Virol.* 75 (2001) 9302–9311.
- [20] D. Pittayakhajonwut, P.C. Angeletti, Analysis of cis-elements that facilitate extrachromosomal persistence of human papillomavirus genomes, *Virology* 374 (2008) 304–314.
- [21] A. Calle, I. Ugrinova, A.L. Epstein, P. Bouvet, J.J. Diaz, A. Greco, Nucleolin is required for an efficient herpes simplex virus type 1 infection, *J. Virol.* 82 (2008) 4762–4773.



A prime–boost vaccination of mice with heterologous H5N1 strains

Daisuke Ikeno^{a,*}, Kazuhiko Kimachi^a, Yasuhiro Kudo^a, Shuro Goto^a, Shigeyuki Itamura^b, Takato Odagiri^b, Masato Tashiro^b, Yoichiro Kino^a

^a The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute, Kikuchi Research Center, Kawabe Kyokushū, Kikuchi, Kumamoto 869-1298, Japan

^b National Institute of Infectious Diseases, Gakuen 4-7-1, Musashi-Murayama, Tokyo 208-0011, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 June 2008

Received in revised form

28 November 2008

Accepted 5 January 2009

Keywords:

Influenza

Pandemic

Prime–boost vaccination

ABSTRACT

We evaluated the priming effect of an H5N1 pandemic vaccine in a mouse model to investigate strategies for influenza pandemic vaccination. For priming, an alum-adjuvanted inactivated whole H5N1 vaccine (NIBRG-14, clade 1) was used. As booster vaccines, several formulations of Indo05/05/2005(H5N1)PR8-IBCDC-RG2 vaccines (clades 2–1) were evaluated, including split, whole, alum-adjuvanted split, and alum-adjuvanted whole vaccines.

Any type of booster vaccination elicited a significant HI antibody response despite the difference in antigenicity between the priming and booster vaccines. The split vaccine elicited a much stronger booster response than the alum-adjuvanted whole vaccine. When the mice were primed with the H1N1 or H3N2 vaccines, this did not affect the booster response to the H5N1 vaccine. These results indicated that an alum-adjuvanted whole vaccine is able to confer immunological memory to haemagglutinin even if the primed and boosted vaccine strains are in different clades and, once vaccinated, a split vaccine is preferred to evoke recall responses.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Since December 2003, an unprecedented epizootic and highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus has affected poultry and wild birds in more than 60 countries in 3 continents [1]. In addition, there have been 387 confirmed human cases of H5N1 virus infection and its fatality rate is approximately 63% (September 10th, 2008) [2]. Although very few cases of human-to-human transmission have been reported so far [3–5], a research group reported statistical evidence of such transmission in Sumatra [6]. Considering the risk of large scale human-to-human transmission of the H5N1 virus, such as occurred during the 1918 influenza pandemic, it is essential to develop vaccines that could control a possible pandemic. Under these circumstances, the pandemic influenza preparedness action plan of Japan stipulates that, when the Minister of Health, Labour and Welfare declares a phase 4 state, health care workers and public servants may be vaccinated with the stockpile of prototype vaccines as an emergency measure [7]. This means that the stockpiled vaccines will be used as priming vaccines with the hope of achieving cross protection against the pandemic virus and a cross-priming effect when the pandemic vaccine is administered as a booster. Under this action plan, alum-adjuvanted inactivated whole vaccines have been developed in Japan.

Previous investigations have revealed a priming effect before booster injection of homologous strains in clinical trials of the MF59-adjuvanted vaccine [8] and the subunit vaccine [9]. Another clinical trial has also shown a priming effect against a different strain of H5N1, with the priming effect of A/HK/156/97 (H5N1, clade 0) recombinant haemagglutinin vaccine [10]. However, we do not know how an alum-adjuvanted vaccine will be able to act as a primer for booster vaccines with different immunogenicities.

In Japan, the alum-adjuvanted whole vaccine was rationally selected to improve immunogenicity since whole vaccines are generally more immunogenic than split vaccines and aluminum salt, the only licensed adjuvant with a widely accepted safety profile, was expected to reduce antigen dosage, expanding vaccine supply in pandemic. The alum-adjuvanted whole vaccine seems appropriate for a priming vaccine because it enhances cross-reactivity to various H5N1 viruses [11]. In general, split vaccines are less reactogenic than whole vaccines and whole virus vaccines are more immunogenic than split vaccines in naïve vaccines [12–15]. On the other hand, primed vaccinees show no difference of their response to whole and split vaccines [12–15]. Therefore, a split vaccine may be an appropriate booster vaccine if an adequate immune response can be elicited.

In this study, we evaluated several prime–boost regimens using vaccines with different antigenicities because we assumed that administration of a priming pandemic vaccine would be followed by a booster pandemic vaccine. We also evaluated the influence of

* Corresponding author. Tel.: +81 968 37 4090; fax: +81 968 37 3616.
E-mail address: ikeno-da@kaketsuken.or.jp (D. Ikeno).