

201034068A

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

新型インフルエンザワクチン製造株開発と品質管理及び  
ワクチン使用戦略に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 板村繁之

平成23(2011)年 3月

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

新型インフルエンザワクチン製造株開発と品質管理及び  
ワクチン使用戦略に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 板村繁之

平成23(2011)年 3月

# 目 次

## I. 総括研究報告

- 新型インフルエンザワクチン製造株開発と品質管理及びワクチン使用戦略に関する研究 --- 1  
板村 繁之

## II. 分担研究報告

1. 高増殖性新型インフルエンザワクチン製造株の開発に関する研究 ----- 8  
白倉 雅之
2. 新型インフルエンザワクチンの品質管理に必要な免疫学的試験法の開発 ----- 10  
横田 恭子
3. 新規アジュバント含有ワクチンの品質管理試験の開発、標準化に関する研究 ----- 13  
嶋崎 典子
4. インフルエンザワクチンによる免疫応答の解析に関する研究 ----- 16  
佐藤 佳代子
5. 新型インフルエンザワクチンの品質管理に必要な物理化学試験の開発に関する研究 - 19  
笠井 道之

総括研究報告書

新型インフルエンザワクチン製造株開発と品質管理及びワクチン使用戦略に関する研究

研究代表者 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 第3室長

研究要旨

本研究では発育鶏卵での生産性の高いワクチン製造株の開発のために、生産性の低い原因を解析するとともに、高い生産性のワクチン製造株の開発を行う。また、ワクチンの剤型による免疫応答を解析することにより、新型インフルエンザ出現時に各ウイルス株の亜型によってどのようなワクチン接種戦略が適切であるのか検討を行う。さらに新規アジュバントを含有したワクチンの品質規格試験として適切な試験法の開発を行い、標準化を実施して品質の均一な製剤を供給することなどを目的として、本年度は以下の研究を実施した。

(1) インフルエンザウイルスの非コード領域を改変したウイルス株は、ウイルスの増殖性とウイルス蛋白質量の増加が期待され高生産性ワクチン株の作製の基盤となりうる。

(2) 開発した H5 型 HA 特異的なモノクローナル抗体を組み合わせたサンドイッチ ELISA 法を用いて全粒子不活化ワクチンについて HA 含有量を測定したところ、力価試験として標準に実施されている一元放射免疫拡散試験法（SRD）で測定した値と比較的良く一致した。ワクチンの品質管理のための力価試験として有用なツールとなりうる。

(3) 油系エマルジョンアジュバント添加型インフルエンザ HA ワクチンについて SRD 試験による HA 含量測定を行うために、抗原抗体複合体の形成を促進させるために PEG 添加アガロースゲルを用いる方法、更に、ワクチン検体からアジュバントを分離させるために適切な超遠心処理を行う方法を検討し、有効な改良法を確立した。

(4) 全粒子ワクチンによるウイルス増殖抑制効果はスプリットワクチンによるものよりも高いことを確認した。一方、ワクチン接種後にチャレンジウイルスを感染した3日後のワクチン特異的抗体価はスプリットワクチンによる場合の方が高く、その意味については更なる検討が必要と考えられる。

(5) インフルエンザ全粒子ワクチンおよびスプリットワクチンの蛍光標識方法を確立し、抗原提示細胞が両者ワクチンを取り込む様子の時間変化を調べ、免疫担当細胞への取り込み方が両者ワクチンの間で異なることを明らかにした。この取り込みと輸送の動態に関する時間経過の違いがワクチンの形状及び免疫原性とどのような関係にあるのかが次の課題である。

## 研究組織

### 研究代表者

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

### 研究分担者

横田恭子 国立感染症研究所免疫部 室長

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

佐藤佳代子 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 研究員

白倉雅之 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 研究員

嶋崎典子 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 研究員

## A. 研究の目的と背景

ブタに由来する新型インフルエンザウイルス (H1N1) が 2009 年 4 月にヒトでの流行を急速に拡大してパンデミックとなり、あらためて新型ウイルスの流行拡大の早さと迅速な対応の必要性を再認識させることとなり、ワクチンの準備対応についてもいくつかの課題が明らかになった。第一に、ワクチン製造のためのワクチン製造株開発における課題である。通常通りに、ワクチン製造株を開発したところ、ワクチンの生産性において従来のワクチン製造株の数分の 1 と低くなり、2009 年の秋に向けてのワクチン供給量の見込みが期待よりも少なくなった。このために国内で使用するワクチンが不足することが予想され、海外からワクチンを緊急に輸入することとなった。また、ワクチンの剤型に関して、従来季節性のインフルエンザワクチンに使用しているスプリットワクチンか、高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) を想定したアラムアジュバント添加全粒子不活化ワクチンにすべきか判断するための基礎的なデータが不足していたために、その選択が容易で

はなかった。一方、高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) も、2004 年以来現在に至るまで世界的に流行が拡大しヒトへの感染を繰り返している状況に変化はなく、潜在的なパンデミックを引き起こす脅威として存在し続けている。H5N1 に対するワクチンでは最近の臨床研究においてプライミングとブースターのワクチン接種戦略で効果的であることが示唆されている。また、海外からの輸入ワクチンの導入に関連して、従来わが国での使用経験の無かった oil-in-water のアジュバントが使用され、ワクチンの品質管理試験としての検討が必要ではあったが、これまでに十分な検討はなされてきていなかった。

このような状況に迅速に対応できるように、本研究では発育鶏卵での生産性の高いワクチン製造株の開発のために、生産性の低い原因を解析するとともに、高い生産性のワクチン製造株の開発を行う。それによって新型インフルエンザ出現時に、高生産性のワクチン製造株を開発して提供することによってワクチン接種が必要な人の需要に迅速に対応できることが期待される。また、ワクチンの剤型による免疫応答を解析することにより、新型インフルエンザ出現時に各ウイルス株の亜型によってどのようなワクチン接種戦略が適切であるのか検討を行う。この情報はワクチン政策を検討するのに有用であると考えられる。さらに新規アジュバントを含有したワクチンの品質規格試験法を検討し適切な試験法の開発を行い、標準化を実施する。これらによって、品質の均一な製剤を供給することが可能になり、より有効性、安全性の高いワクチン供給に寄与することが期待される。

## B. 研究方法

### 1) 高増殖性新型インフルエンザワクチン製造株の開発

インフルエンザウイルスの非コード領域 (Non

coding region: NCR) の異なるウイルス株を RG 法で作製して、ウイルスの増殖性とウイルス蛋白量について発育鶏卵を用いて解析し、NCR のワクチン生産性への関与の有無について検討した。

## 2) 新型インフルエンザワクチンの品質管理に必要な免疫学的試験法の開発

H5N1 ウイルスの HA 蛋白を認識するモノクローナル抗体を作製して、サンドイッチ ELISA 法による抗原検出系を開発して、HA 含量の既知の標準抗原を用いて全粒子不活化ワクチン原液について HA 含量の測定を実施し、ワクチンの力価試験として HA 含量の標準的手法である一元放射免疫拡散試験法 (SRD) で測定結果と比較を行った。

## 3) 新規アジュバント含有ワクチンの品質管理試験の開発、標準化

油系エマルジョンアジュバント添加型インフルエンザ HA ワクチンに対する SRD 試験改良法の確立を目的として、抗原抗体複合物の形成を促進させるために PEG 添加アガロースゲルを用いる方法、更に、ワクチン検体からアジュバントを分離させるために適切な超遠心処理を行う方法を検討した。

## 4) インフルエンザワクチンによる免疫応答の解析 インフルエンザ全粒子ワクチンおよびスプリットワクチン接種後のウイルス増殖抑制効果及び抗体応答を調べた。

## 5) 新型インフルエンザワクチンの品質管理に必要な物理化学試験の開発

全粒子ワクチンおよびスプリットワクチンの間に抗原提示細胞内への取り込みとプロセッシング過程にどのような違いがあるのかを解析する目的で両者のワクチンを蛍光物質で標識し、抗原提示細胞への取り込みとプロセッシング過程を解析した。

## C. 研究結果・考察

### 1) 高増殖性新型インフルエンザワクチン製造株の

### 開発

インフルエンザウイルスの非コード領域は、ウイルス RNA の複製、転写、翻訳、そして、ウイルスゲノムのパッケージング、ウイルス粒子形成に関与している。本研究では、より増殖性が高く、ウイルス蛋白の回収量の多い RG ワクチン製造株の作製のため、非コード領域の配列を他のウイルス株のものと取り換えたウイルスを作製して増殖性を比較検討した。解析した 3 株のウイルスでは H9 亜型のウイルスについて他のウイルス株の非コード領域の配列と取り換えるとウイルス蛋白の回収量が低下した。その他の 2 株のウイルスについて差異は認められなかった。特定のウイルス株について影響が見られたことから、NCR 配列と翻訳領域とで何らかの相互作用が存在することが示唆された。そのメカニズムについては不明であるが、このような考え方に基づく高生産性ワクチン株作製の基盤となる知見が得られた。

### 2) 新型インフルエンザワクチンの品質管理に必要な免疫学的試験法の開発

H5 型 HA 特異的なモノクローナル抗体を組み合わせたサンドイッチ ELISA 法を開発してワクチンに含有される HA 蛋白の定量を行った。インドネシア株およびベトナム株で製造されたワクチン中の総タンパク量 1  $\mu\text{g}$  あたりに含有される HA 蛋白量は、後者の数値は国家検定で従来より使用されている SRD 試験の測定結果とほぼ一致していた。従って、今回確立した簡便なサンドイッチ ELISA 法によるワクチン製剤中の HA 含有量測定は、生物学的活性試験と組み合わせることにより、ワクチンの品質管理のための有用なツールとなりうる。今後、測定系の頑強性、再現性などの検討を進めていく必要がある。

### 3) 新規アジュバント含有ワクチンの品質管理試験の開発、標準化

油系エマルジョンアジュバント添加型インフルエンザ HA ワクチンは、小分け製品に予めアジュバント

が混合されていることや、アジュバントのない季節性インフルエンザ HA ワクチンより HA 含量が少ないことから、一元放射免疫拡散試験 (SRD 試験) 上の問題点として、従来の SRD 試験より抗原抗体複合物の沈降輪形成が弱く、HA 含量の計測が困難である。本研究では、油系エマルジョンアジュバント添加型インフルエンザ HA ワクチンに対する SRD 試験改良法の確立を目的として、抗原抗体複合物の形成を促進させるために PEG 添加アガロースゲルを用いる方法、更に、ワクチン検体からアジュバントを分離させるために適切な超遠心処理を行う方法を検討した。その結果、PEG 添加アガロースゲルを用いる方法によって HA 含量の少ない HA ワクチンであっても、従来法と同様に SRD 試験による HA 含量測定ができることが確認された。更に、適切な超遠心条件によってワクチン検体中のアジュバントを再現性良く除去できることが HPLC で確認できた。このように、油系エマルジョンアジュバント添加型インフルエンザ HA ワクチンの SRD 試験による HA 含量測定に有効な改良法が確立できたとと言える。

4) インフルエンザワクチンによる免疫応答の解析  
インフルエンザ全粒子ワクチンおよびスプリットワクチンの性状・形状の違いはワクチンの抗原提示細胞へのデリバリーとそのプロセッシングをコントロールする上で重要なファクターである。この差異がワクチンの免疫原性の違いを説明できるのか調べるために、本年度はこれらのワクチン製剤接種後のウイルス増殖抑制効果及び抗体応答を調べた。全粒子ワクチンによるウイルス増殖抑制効果はスプリットワクチンによるものよりも高いことを確認した。一方、ワクチン接種後にチャレンジウイルスを感染した3日後のワクチン特異的抗体価はスプリットワクチンによる場合の方が高く、その意味については更なる検討が必要と考えられる。この抗体誘導の差がチャレンジウイルス感染によるブースター効果によ

って上昇したのか、ウイルス感染前の抗体価についても測定する必要がある。今後、全粒子ワクチンとスプリットワクチンの免疫原性の違いが、どのようなメカニズムで起こるのか検討を進める計画である。  
5) 新型インフルエンザワクチンの品質管理に必要な物理化学試験の開発

インフルエンザ全粒子ワクチンおよびスプリットワクチンの性状・形状はワクチンの抗原提示細胞へのデリバリーとそのプロセッシングをコントロールする上で重要である。本年度は両者ワクチン製剤の蛍光標識方法を確立し、ついで、抗原提示細胞が両者ワクチンを取り込む様子の時間変化を調べ、免疫担当細胞への取り込み方が両者ワクチンの間で異なることを明らかにした。全粒子ワクチンもスプリットワクチンも H2-DM 存在リソソームコンパートメントへの輸送される一連の過程は同じであったが、スプリットワクチンは短時間に取り込まれ、H2-DM 存在リソソームコンパートメントへ輸送されるのに対して、全粒子ワクチンは時間経過と共に取り込み量と H2-DM 存在リソソームコンパートメントへの輸送量が増加した。この取り込みと輸送の動態に関する時間経過の違いがワクチンの形状とどのような関係にあるのか、さらにこの違いがアジュバントの存在でどのような変化を受けるのかについては今後の研究課題である。このような研究を通じて、ワクチンの物理化学的性状がどのようにワクチンの免疫原性に関与するのか明らかにすることによって、ワクチンの新しい品質管理ができる可能性がある。

#### D. 結論

(1) インフルエンザウイルスの非コード領域を改変したウイルス株は、ウイルスの増殖性とウイルス蛋白量の増加が期待され高生産性ワクチン株の作製の基盤となりうる。

(2) 開発した H5 型 HA 特異的なモノクローナル抗体

を組み合わせたサンドイッチ ELISA 法を用いて全粒子不活化ワクチンについて HA 含有量を測定したところ、力価試験として標準に実施されている SRD 試験法で測定した値と比較的良く一致した。ワクチンの品質管理のための力価試験として有用なツールとなりうる。

(3) 油系エマルジョンアジュバント添加型インフルエンザ HA ワクチンについて SRD 試験による HA 含量測定を行うために、抗原抗体複合体の形成を促進させるために PEG 添加アガロースゲルを用いる方法、更に、ワクチン検体からアジュバントを分離させるために適切な超遠心処理を行う方法を検討し、有効な改良法を確立した。

(4) 全粒子ワクチンによるウイルス増殖抑制効果はスプリットワクチンによるものよりも高いことを確認した。一方、ワクチン接種後にチャレンジウイルスを感染した3日後のワクチン特異的抗体価はスプリットワクチンによる場合の方が高く、その意味については更なる検討が必要と考えられる。

(5) インフルエンザ全粒子ワクチンおよびスプリットワクチンの蛍光標識方法を確立し、抗原提示細胞が両者ワクチンを取り込む様子の時間変化を調べ、免疫担当細胞への取り込み方が両者ワクチンの間で異なることを明らかにした。この取り込みと輸送の動態に関する時間経過の違いがワクチンの形状及び免疫原性とどのような関係にあるのかが次の課題である。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Ikeno D, Kimachi K, Kino Y, Harada S, Yoshida K, Tochiwara S, Itamura S, Odagiri T, Tashiro

M, Okada K, Miyazaki C, Ueda K. Immunogenicity of an inactivated adjuvanted whole-virion influenza A (H5N1, NIBRG-14) vaccine administered by intramuscular or subcutaneous injection. *Microbiol Immunol* 54: 81-88 (2010)

2) Yuma Iwai, Hitoshi Takahashi, Dai Hatakeyama, Kazunori Motoshima, Minoru Ishikawa, Kazuyuki Sugita, Yuichi Hashimoto, Yuichi Harada, Shigeyuki Itamura, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Yoshihisa Sei, Kentaro Yamaguchi, Takashi Kuzuhara Anti-influenza activity of phenethylphenylphthalimide analogs derived from Thalidomide. *Bioorg Med Chem* 18: 5379-5390 (2010)

3) 信澤枝里、板村繁之：新型インフルエンザに対するワクチン開発。呼吸器内科 17:51-57 (2010)

4) 佐藤佳代子、板村繁之：インフルエンザワクチンの開発動向と今後の展望。日本臨床 (2010)

5) Tsunetsugu-Yokota, Y. and Yamamoto, T.: Mammalian microRNAs.: post-transcriptional gene regulation in RNA virus infection and therapeutic applications. *Frontiers in Microbiology* 1:1-9, 2010

6) Hagiwara, K., Murakami, T., Xue, G. Shimizu, Y., Takeda, E., Hashimoto, Y., Honda, K., Kondoh, Y., Osada, H., Tsunetsugu-Yokota, Y., and Aida, Y.: Identification of a novel Vpr-binding compound that inhibits HIV-1 multiplication in macrophages by chemical array. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 403:40-45, 2010

7) Terahara, K., Nochi, T., Yoshida, M., Takahashi, Y., Goto, Y., Hatai, H., Kurokawa, S., Ho Jang, M., Kweon, M-N., Domino, S.E.,

- Hiroi, T., Yuki, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y., Kobayashi, K., and Kiyono, H.: Distinct fucosylation of M cells and epithelial cells by Fut1 and Fut2, respectively, in response to intestinal environmental stress. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 404:822-828, 2011
- 8) Y. Tanaka, M. Taneichi, M. Kasai, T. Kakiuchi, and T. Uchida. Liposome-Coupled Antigens Are Internalized by Antigen-Presenting Cells via Pinocytosis and Cross-Presented to CD8 T Cells. *Plos One*, 5(12):e15225, 2010.
2. 学会発表
- 1) Shirakura M., Nobusawa E., Asanuma H., Kishida N., Ainai A., Iwata N., Nagata N., Hasegawa H., Kageyama T., Odagiri T. and Tashiro M. Generation of the novel influenza H1N1 vaccine viruses by reverse genetics. *Options For The Control Of Influenza VII*, Hong Kong, 2010.
- 2) Tsunetsugu-Yokota, Y.: The impact of chemokine receptor usage of HIV-1 in the pathogenesis of HIV infection. *The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity*, Awaji, Japan, September, 2010.
- 3) Terahara, K., Ishige, M., Mitsuki, Y-y, Shibusawa, K., Watanabe, S., Okada, S., Kobayashi, K., Tsunetsugu-Yokota, Y.: Characteristic activation/differentiation phenotype of CD4+ T cells and their distinct susceptibility to X4-type and/or R5-type HIV-1 infection in humanized NOD/SCID/Jak3-null mice. *The 14th International Congress of Immunology*, Kobe, Japan, August, 2010.
- 4) Shibusawa, K., Mitsuki, Y-y, Terahara, K., Yanagi, Y. Kogayashi, K., Tsunetsugu-Yokota, Y.: Inhibition of HIV-1 replication by engineered lentivirus vectors: a potential advantage of SLAM-mediated virus entry. *The 14th International Congress of Immunology*, Kobe, Japan, August, 2010.
- 5) Mitsuki, Y-y, Shibusawa, K., Tsuchiya, T., Terahara, K., Kobayashi, K., Takeda, M., Yanagi, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y.: HIV-1 infection enhances the susceptibility of T cells to measles virus infection by upregulating signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) expression. *The 14th International Congress of Immunology*, Kobe, Japan, August, 2010.
- 6) Tsunetsugu-Yokota, Y. and Terahara, K.: Factors crucial for the preferential propagation of R5-tropic HIV-1 in the early phase of HIV-1 infection. *The 5th Japanese-German HIV-Symposium*, Tokyo, Japan, May, 2010.
- 7) Shibusawa, K., Mitsuki, Y-y, Terahara, K., Yanagi, Y. Kogayashi, K., Tsunetsugu-Yokota, Y.: Inhibition of HIV-1 replication by engineered lentivirus vectors: a potential advantage of SLAM-mediated virus entry. *The 5th Japanese-German HIV-Symposium*, Tokyo, Japan, May, 2010.
- 8) Mitsuki, Y-y, Shibusawa, K., Tsuchiya, T., Terahara, K., Kobayashi, K., Takeda, M., Yanagi, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y.: HIV-1 infection enhances the susceptibility of T cells to measles virus infection by upregulating signaling lymphocyte activation

molecule (SLAM) expression. The 5th Japanese-German HIV-Symposium, Tokyo, Japan, May, 2010.

9) 石毛真行、寺原和孝、光木裕也、渋谷謙太郎、小林和夫、岡田誠治、横田(恒次)恭子：HIV-1 感染モデルとしてのヒト化マウスの妥当性と X4 および R5 HIV-1 感染, 第58回ウイルス学会、徳島、平成22年11月。

10) 渋谷謙太郎、光木裕也、寺原和孝、石毛真之、柳雄介、小林和夫、横田(恒次)恭子：麻疹ウイルスエンベロープを用いた HIV-1 増殖抑制性レンチウイルスベクターの開発とその有効性、第58回ウイルス学会、徳島、平成22年11月。

11) Kayoko Sato, Hideki Asanuma, Takiko Matsukura, Naoki Matsumoto, Masato Tashiro. KLRG1 expression in the lungs by influenza A virus infection in mice. 14th International congress of immunology, Kobe, Japan, August 2010

12) Kayoko Sato, Shigeyuki Itamura, Masato Tashiro. Development of quantitative ELISA for influenza virus haemagglutinin for the use of quality control test of inactivated influenza split-virus vaccine. Options for the control of influenza VII HK September 2010

13) 笠井道之、池田通。マクロオートファジーは胸腺内 MHC クラス II 抗原提示過程に關与する 第20回 Kyoto T Cell Conference 2010 年6月

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

なし

高増殖性新型インフルエンザワクチン製造株の開発に関する研究

研究分担者 白倉 雅之 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

**研究要旨**

新型インフルエンザ対策では、迅速に安全かつ有効なワクチンを開発し、供給することが重要な課題である。しかしながら、リバーシジェネティクス (RG) 法によって作製されたワクチン製造株は、必ずしも増殖性、ウイルス蛋白回収量が高いとは限らない。そこで、本研究では、増殖性が高くウイルス蛋白回収量の多いワクチン製造株を迅速に作製することを目的とし、非コード領域の配列をバックボーンである PR8 株あるいは、親ウイルス株由来の配列に改変した RG ウイルスを作製した。その結果、改変した RG ウイルスは、亜型あるいは株によって、ウイルス蛋白回収量が異なることが明らかとなった。

**A. 研究目的**

インフルエンザウイルスの非コード領域 (Non coding region: NCR) は、ウイルス RNA の複製、転写、翻訳、そして、ウイルスゲノムのパッケージング、ウイルス粒子形成に関与している。そこで、本研究では、より増殖性が高く、ウイルス蛋白の回収量の多い RG ワクチン製造株の作製のため、非コード領域の配列をバックボーンウイルスの A/PR/8/34 (PR8) 株由来か、あるいは親ウイルス株由来かで増殖性を比較検討し、どちらの配列がより増殖性が高いか、また、ウイルス蛋白回収量が多いのか調べて、RG 法によるワクチン株作製法の改良を試みた。

**B. 研究方法**

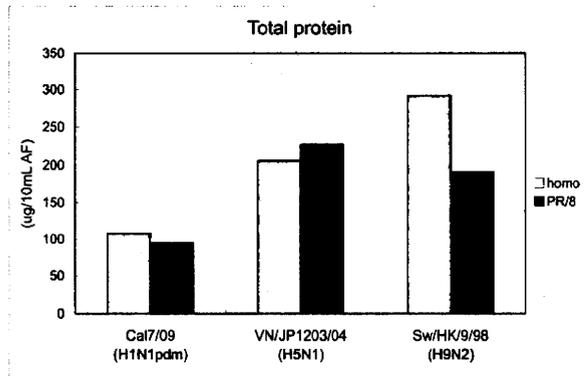
ウイルス： A/California/07/2009 (H1N1pdm09) (Cal7), A/Vietnam/JP1203/2004 (H5N1) (JP1203), A/swine/Hong Kong/9/98 (H9N2) (SwHK9)、細胞： LLC-MK2 細胞 (GMP 準拠)、RG ウイルスの作製：① 各ウイルス株由来の HA 遺伝子をクローニングし、NCR 配列をその株由来の配列、あるいは、PR8 株の配列の cDNA を各々、RNA 合成用プラスミドに導入

した。②①のプラスミド及び、A/PR/8/34 (PR8) 株由来の 7 種類 (PB2, PB1, PA, NP, NA, M, NS) の RNA 合成用プラスミド、4 種類 (PB2, PB1, PA, NP) の蛋白質発現用プラスミドの合計 12 種類のプラスミドを LLC-MK2 細胞にトランスフェクションした。48 時間後の培養上清を回収し、発育鶏卵に接種し、漿尿液を回収し、HA 価を測定した。また、漿尿液中のウイルス精製を行い、BCA 法により総蛋白回収量を定量した。

**C. 研究結果**

Cal7, JP1203, SwHK9 の 3 種類のウイルス株について、NCR の配列をバックボーンの PR8 由来の配列、あるいは、そのウイルス株由来の配列 (ホモ配列) に改変した RG ウイルスを作製した。その結果、3 種類の株で HA 価に差は認められなかった。次に、蛋白回収量を測定した結果、Cal7, JP1203 においては、両者の差は認められなかった。しかしながら、SwHK9 では、PR8 由来の配列を有するウイルスと比較して、ホモ配列のウイルスの方が、約 1.5 倍多くなった (図 1 参照)。

図 1



#### D. 考察

Cal7、JP1203 と異なり SwHK9 において、蛋白回収量がホモ配列を有するウイルスで多くなったのは、NCR 配列と翻訳領域とで何らかの相互作用が存在することが示唆された。また、異なる NCR 配列が、ウイルスの遺伝子発現、複製あるいは粒子形成に何らかの影響を及ぼした結果、ウイルス蛋白の回収量に違いが観察されたと考えられる。今回、H9 型では、SwHK9 株のみの解析だけ行ったが、同亜型の他のウイルス株についても、同様な結果であるか、または、その株特有であるのかどうか検証する必要がある。

#### E. 結論

NCR 配列を改変した RG ウイルスは、亜型もしくは株によって、ウイルス蛋白回収量が異なることが明らかとなった。従って、ワクチン製造株作製の際、どちらの配列が、増殖性、ウイルス蛋白回収量がより高いかどうか、今後更なる詳細な解析が必要である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

Shirakura M., Nobusawa E., Asanuma H., Kishida N., Ainai A., Iwata N., Nagata N., Hasegawa H., Kageyama T., Odagiri T. and Tashiro M.

Generation of the novel influenza H1N1 vaccine viruses by reverse genetics. Options For The Control Of Influenza VII, Hong Kong, 2010.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

分担研究報告書

新型インフルエンザワクチンの品質管理に必要な免疫学的試験法の開発

研究分担者 横田 恭子 国立感染症研究所・免疫部・第一室長

**研究要旨** 免疫部で確立したH5N1 ワクチン株(NIBRG-14)のHAに反応するモノクローナル抗体3つを用いて確立したサンドイッチエライザ法により、ワクチンの原液となる精製不活化ウイルス液中のH5HAの量を測定した。インドネシア株ワクチン中には総タンパク量1 µgあたり314 ng、ベトナム株ワクチン中には1 µgあたり499 ngのHAタンパクが含まれていると計算され、後者の数値は国家検定で従来より使用されているSRD試験の測定結果とほぼ一致していた。従って、我々の確立した簡便なサンドイッチエライザ法によるワクチン製剤中のHA含有量測定は、生物学的活性試験と組み合わせることにより、ワクチンの品質管理のための有用なツールとなりうる。

A. 研究目的

粘膜に投与する新型インフルエンザワクチンの品質管理に有用な免疫学的試験法を確立する。

B. 材料と方法

1. モノクローナル抗体の作成

抗HA抗体を産生するハイブリドーマを無血清培地(GIBCO-Invitrogen)で増殖させ、その培養上清に産生するモノクローナル抗体をプロテインAアフィニティーカラムで精製した。

2. サンドイッチエライザによる抗原検出系

1次抗体として1A1と2C2を2 µg/mlずつPBSで希釈してエライザプレートに一晚摂氏4度でcoatingした。翌日プレート洗浄後、HRP標識2次抗体(OM-b)を1 µg/mlの濃度にPBS/0.05% Tween 20で調整して加え、室温で1時間以上放置した。洗浄後TMB(+)基質を加え、エライザリーダーで検出した(OD<sub>450</sub>)。

3. 不活化ワクチンウイルス抗原および標準抗原

沈降インフルエンザワクチン(H5N1株)原液としてNo.10-PF-1(インドネシア株:総タンパク量701 µg/ml)およびNo.10-PF-2(ベトナム株:総タンパク量644 µg/ml)を用いた。定量曲線作成のためのHA標準抗原として、インドネシア株はロット2011AH5B(57.0 µg/ml)、ベトナム株はロット2011AH5A(48.1 µg/ml)を500 ng/mlから2段階希釈して用いた。

C. 研究結果

1A1と2C2をcapture抗体とし、HRP標識したOM-bを用いたサンドイッチエライザでは、当初

検体にdetergentを何も加えないで測定したところ、発色が弱く、感度が非常に低いことがわかった。そこでウイルス核抗原検出時によく通常用いられるdetergentとしてTriton-X100を最終濃度0.1%を全ての抗原に加えて一晚放置後に測定したところ、スタンダードHA蛋白量と吸光測定値(対数表示)は十分なlinearityを示した。この結果から判断して、ベトナム株の場合は250 ng/mlから16 ng/mlの範囲で、インドネシア株の場合はおそらく数ナノグラム以下まで定量可能であると推測される(図1)。

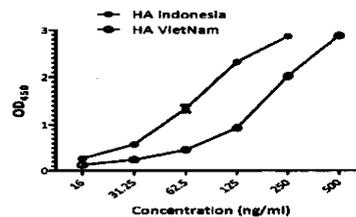


図1 各HAタンパクのスタンダード曲線  
HAタンパク量を横軸に、吸光度を縦軸にプロットした。

精製不活化ウイルス全粒子は2 µg/mlから2段階

希釈して吸光度を測定した(図2)。図1のそれぞれのHAをスタンダードとして図2のウイルス粒子タンパク量の吸光度から計算した結果、インドネシア株ウイルスワクチンのタンパク1 $\mu$ g中のHAタンパク量は314 ngであり、一方、ベトナム株ウイルスワクチンではタンパク1 $\mu$ g中499 ngであると計算された。なお、ベトナム株ウイルスワクチンは国家検定で使用されているSRD試験では、 $378 \pm 19$  ng HA/ $\mu$ g protein、インドネシア株ウイルスワクチンでは $296 \pm 20$  ng HA/ $\mu$ g proteinという結果となっており、我々の確立したエライザの結果とほぼ一致した。

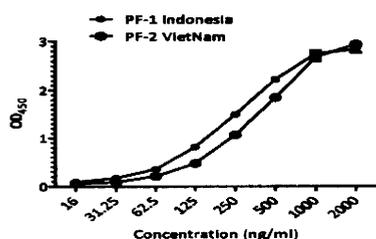


図2 不活化ウイルス溶液のエライザ解析総タンパク含量を横軸に、吸光度を縦軸にプロットした。

## 考察

エライザに用いた3つの抗体はそれぞれインドネシア株とベトナム株に共通のエピトープを認識しているが、この組み合わせにおいて、免疫原として用いたベトナム株よりもむしろインドネシア株に対してより強い結合能をもつことが示唆された。

Triton X100を加えないサンプルではHAもウイルス液もエライザでの反応は非常に弱かった。HAタンパクはウイルス粒子上であれ、精製タンパクであれ、凝集しやすいことがその要因であると考えられる。このエライザ法では2次抗体にHRP標識OMbを使用して数ng/mlまで測定かのうであった。2次抗体をビオチン化抗体HRP-Streptavidinの系にすると更に感度があがることが期待される。

## E. 結論

我々が確立したH5型HA特異的なモノクローナル抗体を組み合わせたサンドイッチエライザ法

を用いてHAの定量を行った。インドネシア株ワクチン中には総タンパク量1 $\mu$ gあたり314 ng、ベトナム株ワクチン中には1 $\mu$ gあたり499 ngのHAタンパクが含まれていると計算され、後者の数値は国家検定で従来より使用されているSRD試験の測定結果とほぼ一致していた。従って、我々の確立した簡便なサンドイッチエライザ法によるワクチン製剤中のHA含有量測定は、生物学的活性試験と組み合わせることにより、ワクチンの品質管理のための有用なツールとなりうる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Tsunetsugu-Yokota, Y. and Yamamoto, T.: Mammalian microRNAs.: post-transcriptional gene regulation in RNA virus infection and therapeutic applications. *Frontiers in Microbiology* 1:1-9, 2010
- 2) Hagiwara, K., Murakami, T., Xue, G. Shimizu, Y., Takeda, E., Hashimoto, Y., Honda, K., Kondoh, Y., Osada, H., Tsunetsugu-Yokota, Y., and Aida, Y.: Identification of a novel Vpr-binding compound that inhibits HIV-1 multiplication in macrophages by chemical array. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 403:40-45, 2010
- 3) Terahara, K., Nochi, T., Yoshida, M., Takahashi, Y., Goto, Y., Hatai, H., Kurokawa, S., Ho Jang, M., Kweon, M-N., Domino, S.E., Hiroi, T., Yuki, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y., Kobayashi, K., and Kiyono, H.: Distinct fucosylation of M cells and epithelial cells by Fut1 and Fut2, respectively, in response to intestinal environmental stress. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 404:822-828, 2011

### 2. 学会発表

- 1) Tsunetsugu-Yokota, Y.: The impact of chemokine receptor usage of HIV-1 in the pathogenesis of HIV infection. The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, September, 2010.
- 2) Terahara, K., Ishige, M., Mitsuki, Y-y, Shibusawa, K., Watanabe, S., Okada, S., Kobayashi, K., Tsunetsugu-Yokota, Y.: Characteristic activation/differentiation phenotype of CD4+ T cells and their distinct susceptibility to X4-type and/or R5-type HIV-1 infection in humanized NOD/SCID/Jak3-null mice. The 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, August, 2010.
- 3) Shibusawa, K., Mitsuki, Y-y, Terahara, K., Yanagi, Y. Kogayashi, K., Tsunetsugu-Yokota, Y.: Inhibition of HIV-1 replication by engineered lentivirus

vectors: a potential advantage of SLAM-mediated virus entry. The 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, August, 2010.

4) Mitsuki, Y-y, Shibusawa, K., Tsuchiya, T., Terahara, K., Kobayashi, K., Takeda, M., Yanagi, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y.: HIV-1 infection enhances the susceptibility of T cells to measles virus infection by upregulating signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) expression. The 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, August, 2010.

5) Tsunetsugu-Yokota, Y. and Terahara, K.: Factors crucial for the preferential propagation of R5-tropic HIV-1 in the early phase of HIV-1 infection. The 5th Japanese-German HIV-Symposium, Tokyo, Japan, May, 2010.

6) Shibusawa, K., Mitsuki, Y-y, Terahara, K., Yanagi, Y. Kogayashi, K., Tsunetsugu-Yokota, Y.: Inhibition of HIV-1 replication by engineered lentivirus vectors: a potential advantage of SLAM-mediated virus entry. The 5th Japanese-German HIV-Symposium, Tokyo, Japan, May, 2010.

7) Mitsuki, Y-y, Shibusawa, K., Tsuchiya, T.,

Terahara, K., Kobayashi, K., Takeda, M., Yanagi, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y.: HIV-1 infection enhances the susceptibility of T cells to measles virus infection by upregulating signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) expression. The 5th Japanese-German HIV-Symposium, Tokyo, Japan, May, 2010.

8) 石毛真行、寺原和孝、光木裕也、洪沢謙太郎、小林和夫、岡田誠治、横田(恒次)恭子：HIV-1 感染モデルとしてのヒト化マウスの妥当性と X4 および R5 HIV-1 感染、第 58 回ウイルス学会、徳島、平成 22 年 11 月。

9) 洪沢謙太郎、光木裕也、寺原和孝、石毛真之、柳雄介、小林和夫、横田(恒次)恭子：麻疹ウイルスエンベロープを用いた HIV-1 増殖抑制性レンチウイルスベクターの開発とその有効性、第 58 回ウイルス学会、徳島、平成 22 年 11 月。

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得  
準備中
2. 実用新案登録  
なし

新規アジュバント含有ワクチンの品質管理試験の開発、標準化に関する研究  
-油系アジュバント添加型 HA ワクチンに対する一元放射免疫拡散試験 (SRD 試験) 改良法の確立-

研究分担者 嶋崎典子 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研究員  
協力研究者 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**

油系エマルジョンアジュバント添加型インフルエンザ HA ワクチンは、小分け製品に予めアジュバントが混合されていることや、アジュバントのない季節性インフルエンザ HA ワクチンより HA 含量が少ないことから、一元放射免疫拡散試験 (SRD 試験) 上の問題点として、従来の SRD 試験より抗原抗体複合物の沈降輪形成が弱く、HA 含量の計測が困難な状況があげられる。そこで本研究では、油系エマルジョンアジュバント添加型インフルエンザ HA ワクチンに対する SRD 試験改良法の確立を目的として、抗原抗体複合物の形成を促進させるために PEG 添加アガロースゲルを用いる方法、更に、ワクチン検体からアジュバントを分離させるために適切な超遠心処理を行う方法を検討した。その結果、PEG 添加アガロースゲルを用いる方法によって HA 含量の少ない HA ワクチンであっても、従来法と同様に SRD 力価測定ができることが確認された。更に、適切な超遠心条件によってワクチン検体中のアジュバントを再現性良く除去できることが HPLC で確認された。

以上から、油系エマルジョンアジュバント添加型 HA ワクチンの SRD 測定に有効な改良法が確立できたとと言える。

**A. 研究目的**

現在、わが国で製造されているインフルエンザワクチンはウイルス抗原のみのスプリットワクチンと高病原性鳥インフルエンザ H5N1 ウイルスに対するアラムアジュバントを添加した全粒子不活化ワクチンであるが、従来わが国での使用経験の無かった油系エマルジョンアジュバントを添加したワクチンが緊急輸入ワクチンとして導入された。今後新規に開発されたワクチンの品質管理を実施することに備えて、ワクチンやアジュバントの品質管理を行うための試験法の開発及び標準化を行う必要がある。

油系エマルジョンアジュバント添加型 HA ワクチンにおける SRD 試験上の問題点としては、小分け製品に予めアジュバントが混合されていることや、アジュバントのない季節性 HA ワクチンより HA 含量が少ないことから、従来の SRD 試験より抗原抗体複合

物の沈降輪形成が弱く、HA 含量の計測が困難な状況があげられる。そこで本研究では、油系アジュバント添加型 HA ワクチンに対する SRD 試験改良法の確立を目的として、抗原抗体複合物の沈降を促進させるために PEG 添加アガロースゲルを用いる方法、更に、ワクチン検体からアジュバントを分離させるために適切な超遠心処理を行う方法を検討した。

**B. 研究方法**

(1) 材料

- 標準抗原 : A/California/7/2009 (X-179A) (H1N1) pdm09, Lot. 2009/83B (TGA)
- 参照抗血清 : anti-A/California/7/2009 (X-179A) (H1N1) pdm09 ヒツジ抗血清, Lot. 09/152 (NIBSC)
- スクワレン添加型 (oil-in-water) HA ワクチン : A/California/7/2009 (X-179A) (H1N1) pdm09、スプリット、小分け品 5 ロット、HA 含有量

3.00ugHA/0.25mL 以上相当品

- ・HA ワクチンモノバルク：上記スクワレン添加型 HA ワクチンの HA ワクチン原液、HA 含有量 190ugHA/mL (SRD)

## (2) 方法

SRD 測定における検体の調製は、従来法と同様に行った。但し、アジュバントを含む検体は、前処理として超遠心 (64k×g、30 分、4°C) による分離処理を行った。また、従来法の 1%アガロースゲルの代わりに、2%PEG 添加 1.5%アガロースゲルを用いた。検体をアプライして 18hr 以上 20°C でインキュベートした後、PBS 洗浄 20hr 以上、D. W. 洗浄 1hr 行い、従来法同様にゲル乾燥、CBB 染色を行い、沈降輪を計測した。以降は従来法に従い、平行線定量法から HA 含量を求めた。

また、本ワクチンのアジュバントはスクワレンであるので、スクワレン含有量については、スクワレン標準液による検量線を用いて、ワクチン試料を 2-プロパノールで希釈したのち 12000rpm10min 遠心して上清を RP-HPLC で測定した。

## C. 研究結果

(1) 従来ゲルと改良ゲル (2%PEG 添加) での SRD 試験の比較

従来法の 1%アガロースゲルでの SRD 力価と、改良法である 2%PEG 添加 1%アガロースゲルを用いた場合の SRD 力価に乖離がないか調べるために、HA ワクチンのモノバルクを従来法で測定できる抗原量 (6ugHA/0.25ml 以上) に調製した試料について、従来ゲルと改良ゲル (2%PEG 添加) を用いて 6 回 SRD 測定を行い、平均値を比較した。なお、参照抗血清 Lot. 09/152 の希釈濃度は 7ul/mL Agarose とした。

結果は図 1 に示すように、従来法のゲルを用いた場合は  $6.83 \pm 0.24$  ugHA/0.25mL、改良法である PEG 添加ゲルを用いた場合は  $6.70 \pm 0.17$  ugHA/0.25mL となった。得られた値の差について t 検定を行ったところ、統計学的有意差は検出できなかった ( $P > 0.1$ )。

2%PEG 添加ゲルは従来ゲルと比べて SRD 力価に顕

著な影響を及ぼさないことがわかったので、次に、HA 含有量を減らして、スクワレン添加型 HA ワクチン基準量 (3.75ugHA/0.25ml) と同じになるようにモノバルクを調製した試料について、PEG 添加ゲルと従来ゲルと比較したところ、沈降輪が明瞭に見える効果を確認できた (図 2)。なお、参照抗血清 Lot. 09/152 の希釈濃度は 4ul/mL Agarose とした。

## (2) 超遠心処理によるアジュバント除去効率

いくつか超遠心条件を試したところ、64k×g、30 分、4°C という条件でスクワレン分離が目視確認できたので、以後この条件で検討を進めた。

次に、この条件でのアジュバント除去効率を確認するため、スクワレン添加型 HA ワクチン小分け品 5 ロットに対して、この条件で超遠心操作を行った。超遠心処理前後の試料について、HPLC でスクワレン含有量を測定し残留率を求めたところ、表 1 のように平均残留率 1.9% (Ave. +3SD は 2.3%) となり、超遠心処理で約 98% のスクワレンが除去できることがわかった。

## (3) アジュバント除去後のワクチン試料の SRD 試験

表 1 のワクチン検体 P1~P5 について、超遠心処理によるアジュバント除去後の試料を、改良ゲル (2%PEG 添加) を用いて SRD 試験をしたところ、測定値を得ることができた。

更に、少量残存するアジュバントの SRD 試験への影響を確認するため、スクワレン添加型 HA ワクチン基準量 (3.75ugHA/0.25ml) にモノバルクを調製し、スクワレンを除去前含有量の 3% になるように添加した試料と添加しない試料の SRD 力価を比較した。なお、スクワレンを除去前含有量の 3% になるように添加した理由は、表 1 の結果から超遠心処理によるスクワレン残留量 Ave. +3SD が 2.3% となったので、多めに見積もってスクワレン残留量を 3% と設定した。その結果、図 3 に示すように、アジュバントなしの場合  $3.46 \pm 0.12$  ugHA/0.25mL、アジュバント残留 3% の場合は  $3.39 \pm 0.10$  ugHA/0.25mL となり、得られた値の差について t 検定を行ったと

ころ、統計学的有意差は検出できなかった ( $P > 0.2$ )。

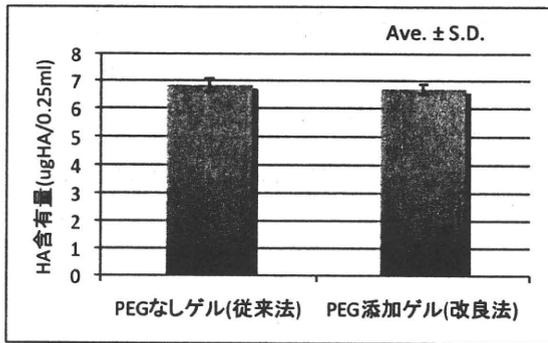


図1 SRD 試験における従来ゲルと改良ゲル(2%PEG 添加)の比較

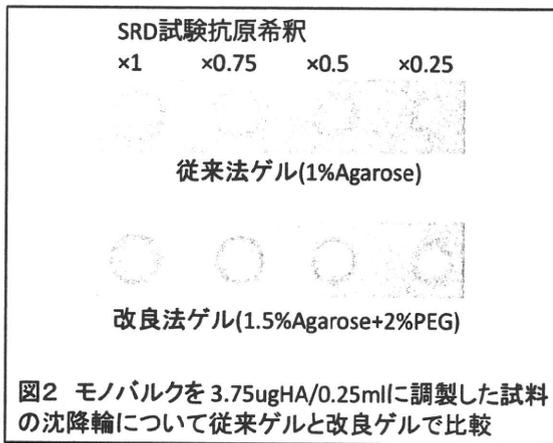


図2 モノバルクを 3.75ugHA/0.25ml に調製した試料の沈降輪について従来ゲルと改良ゲルで比較

表1 スクワレン添加HAワクチンの遠心処理後のスクワレン残留率

試料No.	残留率(%)	Ave.	S.D.	Ave.+3SD
P1	1.90%	1.90%	0.1%	2.30%
P2	2.09%			
P3	1.80%			
P4	1.96%			
P5	1.75%			

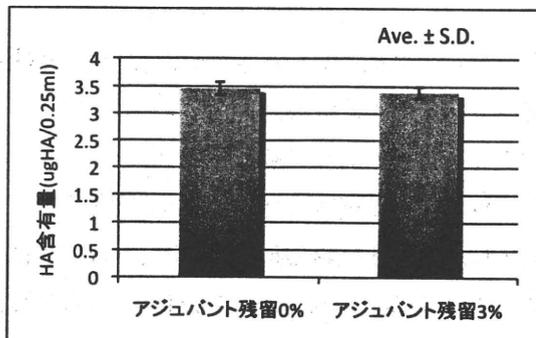


図3 超遠心処理後アジュバント残留量の違いによる SRD 力価の比較

#### D. 考察

(1)の結果から、2%PEG 添加ゲルは従来ゲルとほぼ同じSRD 力価となることがわかった。また、抗原量が少ない時 (3.75ugHA/0.25ml) に沈降輪が明瞭に見える効果を確認できた。PEG によって抗原抗体複合物の形成が促進されたと推察する。

また(2)の結果、超遠心処理 (64k×g、30分、4℃) による5検体のスクワレン残留率は1.75%~2.09%と安定していることがわかった。Ave.+3SDが2.3%であることから、通常の家検検数80ロットぐらいであれば全てのロットに対して再現性よく97%以上のスクワレンが除去できると見積もれる。

更に(3)の結果、超遠心処理後アジュバントが少量残留していたとしても、アジュバントが全く含まれていない試料とほぼ同じSRD 力価を示し、この超遠心条件によって、SRD 力価に影響しない程度に充分アジュバントが除去されていることが確認できた。

#### E. 結論

PEG 添加ゲルを用いる方法によって HA 含量の少ない HA ワクチンであっても、従来法と同様に、SRD 力価の乖離もなく、SRD 力価測定できることが確認された。更に、適切な超遠心条件によってワクチン検体中のアジュバントを再現性良く除去できることが HPLC で確認された。

以上から、油系アジュバント添加型 HA ワクチンの SRD 測定に有効な改良法が確立できたとと言える。

#### F. 研究発表

なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

- |           |        |
|-----------|--------|
| 1. 特許取得   | なし     |
| 2. 実用新案登録 | なし     |
| 3. その他    | 特記事項なし |

## インフルエンザワクチンによる免疫応答の解析に関する研究

研究分担者 佐藤 佳代子 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

### 研究要旨

インフルエンザ全粒子ワクチンおよびスプリットワクチンの性状・形状の違いはワクチンの抗原提示細胞へのデリバリーとそのプロセッシングをコントロールする上で重要なファクターである。本年度はこれらのワクチン製剤を接種後のウイルス増殖抑制効果及び抗体応答を調べた。全粒子ワクチンによるウイルス増殖抑制効果はスプリットワクチンによるものよりも高いことを確認した。一方、ワクチン接種後にチャレンジウイルスを感染した3日後のワクチン特異的抗体価はスプリットワクチンによる場合の方が高く、その意味については更なる検討が必要である。

### A. 研究目的

現在国内ではインフルエンザワクチンはウイルス粒子をホルムアルデヒドで固定した全粒子型と全粒子型をさらにエーテルで処理し脂質膜や核酸成分を除去し部分的にHA成分を精製したスプリット型の2種類のワクチンが生産されている。一般に全粒子ワクチンの方がスプリットワクチンよりも防御効果が高いことは知られているが、そのメカニズムとしては、形質細胞様樹状細胞によるI型インターフェロン産生により制御されていることが報告されているものの、ワクチン接種後の細胞動態や貪食細胞や抗原提示細胞への取り込みと抗原提示、さらに最終的な免疫誘導能への影響に関しては解明されていないことも多い。さらに、そのような理解に基づくインフルエンザワクチンの品質管理はほとんど行われていない。

全粒子型およびスプリット型ワクチンの免疫原性の違いを確認するため、2009年に流行したH1N1pdm09に対するワクチンを用いてその防御効果及び抗体産生能について評価した。

### B. 研究方法

全粒子ワクチンまたはスプリットワクチン(A/H1N1pdm09, X-179A)を1、3、10 µg/mouseずつ4週間の間隔をあけて計2回免疫した。最終免疫

の2週間後、A/Narita/1/2009をマウスに感染させ、感染3日後の肺と血清を採取した。採取した肺は、ウイルス価をTCID<sub>50</sub>法により測定した。また血清中に含まれるワクチン特異的なイムノグロブリンGを測定した。

### C. 研究結果

#### 全粒子ワクチンおよびスプリットワクチン投与後の防御効果：

全粒子ワクチンおよびスプリットワクチンを接種し、A/Narita/1/2009株を感染後3日目の肺におけるウイルス価を測定した。図1に示したように、非感染群におけるウイルス価が10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub>/ml前後であったのに対し、ワクチン投与群はいずれも低いウイルス価を示した。さらに全粒子ワクチンの方がスプリットワクチンよりも効果が強いことが確認出来た。

#### ワクチン接種、感染後のマウス血清におけるワクチン特異的抗体価の測定：

全粒子ワクチンおよびスプリットワクチンを2回皮下接種し、A/Narita/1/2009株を感染後3日目の血清中の抗体価を新規に確立したELISA法にて測定した。図2に示した通り、新規に確立したELISA法は免疫群の血清にのみ反応し、非免疫群には反応しないことが確認された。また、全粒子ワク

チン接種群の血中抗体価は、スプリットワクチン接種群よりも低いことが分かった。

#### D. 考察

A/H1N1pdm09 株のワクチンを用いて全粒子ワクチンとスプリットワクチンの免疫原性の違いについて評価したところ、ワクチン接種後にチャレンジウイルスを感染させた3日後でのワクチン特異的抗体産生はスプリットワクチンの方が高かったが、ウイルス増殖抑制効果では、これまでに報告のある通り全粒子ワクチンの方が高い効果を示すことが確認出来た。抗体価に関しては、ワクチン特異的な抗体価だけではなく、産生されている抗体の特性を検討する必要があると考えられるため、今後中和抗体価やHI 価についても測定する予定である。加えて、この抗体誘導の差がチャレンジウイルス感染によるブースター効果によって上昇したのか、ウイルス感染前の抗体価についても測定する必要がある。また、今後抗原提示細胞による抗原提示過程に全粒子ワクチンとスプリットワクチンがどのような違いがあるかを検討することにより、免疫誘導や抗体産生能への影響についても解明出来ることが期待される。

#### E. 結論

全粒子ワクチンはスプリットワクチンよりもマウスにおけるウイルス増殖抑制効果が高かった。ワクチン接種後のチャレンジウイルス感染3日目のワクチン特異的抗体産生はスプリットワクチンの方が全粒子ワクチンよりも高かった。今後抗原提示細胞による抗原提示過程に全粒子ワクチンとスプリットワクチンがどのような違いがあるかを検討することにより、免疫誘導や抗体産生能への影響についても解明出来ることが期待される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

Kayoko Sato, Hideki Asanuma, Takiko Matsukura,

Naoki Matsumoto, Masato Tashiro.  
KLRG1 expression in the lungs by influenza A virus infection in mice.  
14th International congress of immunology, Kobe, Japan, August 2010

Kayoko Sato, Shigeyuki Itamura, Masato Tashiro  
Development of quantitative ELISA for influenza virus haemagglutinin for the use of quality control test of inactivated influenza split-virus vaccine  
Options for the control of influenza VII HK  
September 2010

#### G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

##### 1. 特許取得

なし