

1. 長谷川秀樹、成人 T 細胞性白血病(ATL)モデルマウスを用いた新規治療法の試み 第100回日本病理学会総会 2011年4月横浜
Suzuki, Joe Chiba, Shin-Ichi Tamura, Masato Tashiro, Tetsutaro Sata, Hideki Hasegawa
ANALYSIS OF THE IMMUNE RESPONSES AFTER INTRANASAL BOOSTER INFLUENZA VACCINE WITH HETEROLOGOUS VIRUS PRIMING XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
2. 中島典子、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹、熊坂利夫、羽田悟、田中伸哉、笠井孝彦、鄭子文、飯塚利彦、仲里巖、樋野陽子、濱松晶彦、堀尚、田中智之、長谷川章雄、尾矢剛志、佐多徹太郎 2009H1N1 パンデミックインフルエンザウイルス感染症 20 剖検例の臨床病理学的解析 第100回日本病理学会総会 2011年4月横浜
6. Hideki Hasegawa, Akira Ainai, Elly van Riet, Tadaki Suzuki, Ryo Ito, Takeshi Tanimoto, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Tetsutaro Sata, Takeshi Kurata, Shin-Ichi Tamura, INTRANASAL ADMINISTRATION OF AN INACTIVATED WHOLE-VIRION INFLUENZA VACCINE EFFECTIVELY INDUCES THE NEUTRALIZING ANTIBODIES BOTH IN THE SERUM AND THE NASAL WASH IN HUMAN XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
3. Akira Ainai, Ryo Ito, Hideki Asanuma, Tadaki Suzuki, Takeshi Tanimoto, Takato Odagiri, Shin-Ichi Tamura, Tetsutaro Sata, Masato Tashiro, Hideki Hasegawa INTRANASAL ADMINISTRATION OF 2009/10 ANNUAL INFLUENZA VACCINE INDUCE THE CROSS-PROTECTION AGAINST 2009 PANDEMIC INFLUENZA VIRUS INFECTION, XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
7. Hideki Asanuma, Mina Nakauchi, Kayoko Sato, Eri Nobusawa, Akira Ainai, Norio Yamamoto, Nami Konomi, Hideki Hasegawa, Masato Tashiro COMPARISON OF INFLUENZA A/H1N1 PDM09 VACCINE PRODUCTIONS IN EGGS VERSUS CELL CULTURES AND THE PROTECTIVE IMMUNE RESPONSES INDUCE IN MICE XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
4. Elly van Riet, Akira Ainai, Ryo Ito, Tadaki Suzuki, Shin-Ichi Tamura, Masato Tashiro, Hideki Hasegawa, INFLUENZA SPECIFIC IGA PRODUCING SERUM MEMORY B CELLS CORRELATE TO PROTECTIVE ANTIBODIES IN THE SERUM AS WELL AS LOCAL IGA RESPONSES, XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
8. Tadaki Suzuki, Akira Ainai, Noriyo Nagata,
5. Ryo Ito, Akira Ainai, Hideki Asanuma, Tadaki

- Tetsutaro Sata, Hideki Hasegawa ROLE OF THE N-TERMINAL REGION OF THE PA SUBUNIT IN NUCLEAR IMPORT AND ASSEMBLY OF INFLUENZA A VIRUS RNA POLYMERASE XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
9. Tatsuya Yamazaki, Yasutomo Teshima, Daisuke Ninomiya, Maria Nagashima, Yuka Arai, Akira Fujimoto, Akira Ainai, Hideki Hasegawa, Joe Chiba PASSIVE IMMUNOTHERAPY AGAINST INFLUENZA VIRUS INFECTION USING THE EXPRESSION OF NEUTRALIZING ANTI-HEMAGGLUTININ MONOCLONAL ANTIBODIES FROM PLASMIDS BY HYDRODYNAMICS-BASED PROCEDURE XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
10. Hidekatsu Iha, Emi Ikebe, Akira Kawaguchi, Shinya Taguchi, Akira Nishizono, Yuetsu Tanaka, Hirofumi Sawa, Masao Ogata, Mitsuo Hori, Jun-Ichi Fujisawa, Hideki Hasegawa MOLECULAR CHAPERON INHIBITOR-BASED TREATMENT AGAINST ATL:ITS IN VITRO AND IN VIVO EVALUATION XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
11. Masayuki Saijo, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, Noriyo Nagata, Naoko Yoshikawa, Hideki Hasegawa, Shuetsu Fukushi, Tetsuya Mizutani, Tetsutaro Sata, Ichiro Kurane, Shigeru Morikawa IMMUNE RESPONSES AGAINST EEV AND IMV IN NON-HUMAN PRIMATES INFECTED WITH MONKEYPOX VIRUS OR VACCINATED WITH A HIGHY ATTENUATED SMALLPOX VACCINE LC16M8 AND PROTECTION FROM LETHAL MONKEYPOX XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
12. Noriyo Nagata, Naoko Iwata, Hideki Hasegawa, Yuko Sato, Shigeru Morikawa, Tetsutaro Sata, INTERFERON GAMMA PROTECTS ADULT BALB/MICE FROM LETHAL RESPIRATORY ILLNESS AFTER MOUSEADAPTED SARS-COV INFECTION XV International Congress of Virology, Sep 2011 Sapporo
13. 長谷川秀樹 感染防御に効くインフルエンザ ワクチンを目指して 第15回日本ワクチン学会学術集会 2011年12月東京
14. 相内章、浅沼秀樹、谷本武史、小田切孝人、田村慎一、田代真人、長谷川秀樹 2009/10 季節性インフルエンザワクチンの経鼻投与による A/H1N1pdm09 ウイルスの感染防御 第15回日本ワクチン学会学術集会 2011年12月東京
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得(出願)
- 特許第4817625号 粘膜免疫誘導アジュバントを含む

む新規ワクチン 登録日平成 23 年 9 月 9 日

なし

2. 実用新案登録

新型インフルエンザ H1N1 のウイルスの病原性等の解析に関する研究

新型インフルエンザ H1N1 の HA 分子の抗原構造の解析

研究分担者 松寄葉子 山形大学医学部感染症学講座 准教授

研究協力者 菅原勘悦 山形大学医学部感染症学講座 技官

研究要旨：新型インフルエンザ H1N1 の抗原構造を明らかにする目的で、新型インフルエンザに対する中和抗体が認識するエピトープの同定を行った。A/Narita/1/2009 株に対する 16 種類の単クローン抗体を親株と中和反応を起こさせた後、MDCK 細胞に感染させてプラークを形成させ、生じたプラークをエスケープ変異株とした。得られたエスケープ変異株と各抗体との反応性を調べた結果、A/Narita/1/2009 の HA 分子には中和抗体を産生する抗原領域が 3 つ存在することが明らかになった。アミノ酸置換部位の解析から、H1HA 蛋白の既知の抗原領域の Sa、Sb、Ca2 領域に相当し、Sa と Sb 領域が重なり合っている事が判明した。また、同一抗原領域内であっても季節性 H1HA にみられる変異とは異なるアミノ酸置換をもつ変異株が 8 割を占めた。新型ウイルス HA が多様なアミノ酸置換によって抗体の結合を阻止する構造を備えている可能性が示唆された。

A. 研究目的

2009 年に出現した新型インフルエンザウイルス H1N1 は、従来の季節性インフルエンザウイルス H1N1 とは抗原性が異なるため、各ウイルスに対する抗体は交差反応性を示さない。また、新型インフルエンザウイルスの HA 分子上の抗原領域もまだ決定されていない。季節性インフルエンザウイルスとは異なる抗原領域をもつのか、あるいは既知の抗原領域に重要なアミノ酸変異がもたらされたのかを明らかにする必要がある。本研究では、

新型インフルエンザに対する中和抗体が認識するエピトープを明らかにし、HA 蛋白上の抗原地図を作成する事を目的とした。

B. 研究方法

1. 親ウイルスの作成

2009 年の新型インフルエンザ分離株である A/Narita/1/2009 株を MDCK 細胞に感染させてプラークを形成させ、10 株の親ウイルスを分離し、Parent1(P1)から Parent10(P10)とする。

2. エスケープ変異株の分離と変異部位の同定

A/Narita/1/2009 株に対して中和活性をもつ 16 種類の単クローン抗体を、それぞれ親株と抗原抗体反応をさせた後、MDCK 細胞に感染させてプラークを形成させ、各抗体に対するエスケープ変異株を各 10 株分離する。そのアミノ酸置換部位を、HA 遺伝子の塩基配列を比較することにより同定した。

(使用した単クローン抗体は、国立感染症研究所・免疫部・高橋宜聖先生よりご分与戴いた。)

3. 単クローン抗体を用いたエスケープ変異株の抗原解析

分離したエスケープ変異株は 14 種類の単クローン抗体を用いて赤血球凝集抑制(HI)試験を行った。血球は 0.5%七面鳥血球を使用した。

4. 変異部位の HA 蛋白三次構造上への位置づけ

RasMol を用いて、同定したアミノ酸変異部位を A/Narita/1/2009 の HA 蛋白構造モデル上に位置づけ、既知の H1HA 蛋白の抗原領域との比較を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は臨床検体や実験動物を使用していないため、倫理面の問題はない。

C. 結果

1. エスケープ変異株の分離と変異部位の同定

P1、P2、P3 を親株として、中和活性を

もつ 16 種類の単クローン抗体に対するエスケープ変異株を各 10 株、合計約 500 株を採取した。それぞれの変異株の HA1 領域の塩基配列を決定しアミノ酸置換部位を検討したところ、変異箇所と変異アミノ酸が異なる計 40 種類のエスケープ変異株を入手することが出来た。

2. A/Narita/1/2009 HA 蛋白の抗原地図の作成

14 種類の単クローン抗体と、各抗体との反応性を欠く P1 を親株とする 15 種類のエスケープ変異株のすべての組み合わせについて HI 試験を行い、各抗体が認識する抗原領域を決定した。その結果、A/Narita/1/2009 の HA 分子には中和抗体を産生する抗原領域 (エピトープ) が 3 つ存在し、このうちの 2 つは重なり合っていることが明らかになった。

3. A/Narita/1/2009HA 分子上での中和エピトープの位置づけ

中和エピトープの HA 蛋白上での位置を明らかにするため、エスケープ変異株のアミノ酸置換部位と従来の季節性 H1HA 蛋白で知られる 5 つの抗原領域 (Sa, Sb, Ca1, Ca2, Cb) とを比較したところ、A/Narita/1/2009 で明らかになった 3 つの抗原領域は Sa, Sb, Ca2 領域に相当し、Sa と Sb 領域が重なり合っていることが判明した。

さらに、P2 と P3 を親株とするエスケープ変異株を加えた 40 種類の変異株のアミノ酸置換部位を既知の Sa, Sb, Ca2 領域の位置と比較することにより、次の 1)

から4)に要約する結果を得た。1) Sa 領域 (141-142、170-174、176-181) を形成する 13 アミノ酸のうち 10 カ所に変異を認めた。変異アミノ酸を HA 蛋白三次構造モデルに当てはめると、球状部先端の Sa 領域の中で Sb 領域に隣接して中和エпитープを形成していることがわかった (図 1 ピンクの部分)。2) Sb 領域 (201-212) を形成する 12 アミノ酸のうち、5 カ所に変異を認めた。その領域は、既知の Sb 領域の中でもレセプター結

合部位とは離れた位置にあることがわかった (図 1 空色の部分)。3) Ca2 領域 (154-159、238-239) を形成する 8 アミノ酸のうち 5 カ所に変異を認めた (図 1 黄緑の部分)。レセプター結合部位に近い 238、239 番目に変異はみられなかった。4) 季節性 H1HA 分子の抗原領域には含まれていないアミノ酸置換部位が 5 カ所みつかった。このうち 3 カ所が Sa 領域、1 カ所が Sb 領域、1 カ所が Ca2 領域に近接していた。

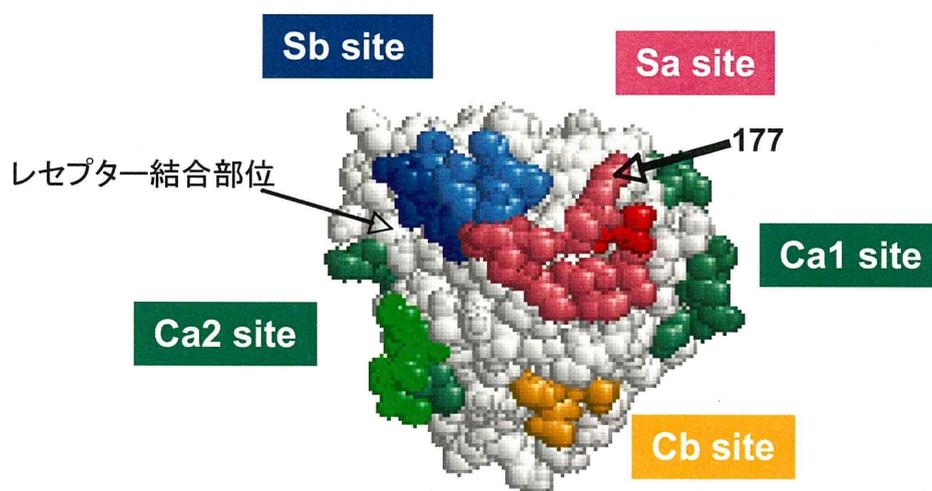


図1 既知のHAH1抗原領域上に確認されたA/Narita/1/2009の抗原領域 Sa領域内のものをピンク、Sb領域内のものを空色、Ca2領域内のものを黄緑で表す。(HAを上から見た図)

4. 季節性 H1HA でみられるアミノ酸変異との比較

新型インフルエンザウイルスは、スペインかぜウイルスと抗原領域を形成するアミノ酸が似ていることが知られている。新型ウイルスの今後の抗原変異を予測す

るために、エスケープ変異株に生じた変異を過去の季節性 H1HA 蛋白にみられた変異と比較した。その結果、Sa、Sb、Ca2 領域内に生じた 36 種類のアミノ酸置換のうち 80%は季節性 H1HA にみられた変異とは異なるものであり、同じ変異は

7種類のみだった。このうち、Sa 領域にある 177 番目のアミノ酸に生じた変異（リジンからアスパラギンへの変異）は、新たに糖鎖結合部位を導入する変異であった。同部位の糖鎖付加は 2008 年の季節性 H1HA 分子にも認められている。

D. 考察

新型ウイルス HA 分子の抗原地図の作成を、P1 を親株とするエスケープ変異株を用いて行い、中和抗体が認識する抗原領域が 3 つあることを明らかにした。3 つの抗原領域は従来の季節性 H1HA 蛋白で知られている 5 つの抗原領域の中の Sa、Sb、Ca2 領域に相当した。これまでの解析結果から推測される新型ウイルス HA 分子の抗原構造の特徴を次にあげる。

1 つは、Sa と Sb 領域が重なり合って 1 つの抗原領域を形成している可能性である。これは、Sa 領域を認識する抗体との反応性を欠くエスケープ変異株の中に Sb 領域にアミノ酸変異をもつものがみついていること、Sb 領域を認識する抗体との反応性を欠くエスケープ変異株の中にも Sa 領域にアミノ酸変異をもつものがあることから推測される。おそらく該当するアミノ酸置換部位が境界領域に相当し、変異による構造変化により両方の抗体が結合できなくなるものと考えられる。もう 1 つは、季節性 H1HA でみられたアミノ酸置換とは異なる変異で抗体との反応性を逃れる可能性である。既知の Sa、Sb、Ca2 領域内にあってもアミノ酸の種

類の異なる置換によって反応性を失っているエスケープ変異株が 80% を占めたことから推測される。抗体が結合できなくなる変異が 1 アミノ酸について 1 種類ではないこともエスケープ変異株の解析から明らかになっている。

一方、季節性 H1HA にみられた変異と同じアミノ酸置換をもつエスケープ変異株は 7 種類あった。このうち糖鎖が新たに付加された可能性がある変異株について各抗体との反応性が失われるかを解析することにより、新型ウイルスが従来の H1HA と同様に糖鎖付加によって中和抗体を逃れる仕組みをもっているか探る予定である。

既知の抗原領域のうち Ca1 と Cb 領域を認識する抗体はみつからなかった。新型ウイルス HA の抗原領域が少ない可能性がある一方、多様なアミノ酸置換によって抗体の結合を阻止する構造を備えている可能性が示唆された。

E. 結論

本研究により新型インフルエンザの H1HA 蛋白の抗原構造の一端が明らかになった。来年度以降は、P1 に引き続き P2、P3 を親株とするエスケープ変異株と各抗体との反応性をみることにより、抗原地図の完成を目指す。さらに、各抗体と過去に分離された季節性インフルエンザ H1N1 や新型ウイルス流行株との反応性を調べ、交差反応性をもつ抗体の有無や新型ウイルスと季節性ウイルスとのエ

ピトープ構造の類似性を検討する予定である。また、新型コロナウイルスに感染したヒトの血清中には主にどの領域に対する中和抗体が出来ているかを、これまでに得られたエスケープ変異株との反応性をみることにより解明していく予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Itagaki T, Abiko C, Aoki Y, Ikeda T, Mizuta K, Noda M, Kimura H, Matsuzaki Y: Scaffold cardiovirus infection in children associated with respiratory disease and its similarity to coxsackievirus infection. *Pediatr Infect Dis J* 30(8):680-683, 2011.
2. Furukawa T, Muraki Y, Noda T, Takashita E, Sho R, Sugawara K, Matsuzaki Y, Shimotai Y, Hongo S: Role of the CM2 protein in the influenza C virus replication cycle. *J Virol* 85(3):1322-1329, 2011.

2. 学会発表

1. Yoko Matsuzaki, Kanetsu Sugawara, Yoshitaka Simotai, Seiji Hongo, Eri Nobusawa: Antigenic structure of the hemagglutinin of pandemic influenza A(H1N1) virus. Meetings of the three divisions of the international union of

microbiological societies 2011, Sapporo; September 2011.

2. 松寄葉子, 池田辰也, 青木洋子, 菅原勘悦, 下平義隆, 本郷誠治, 安孫子千恵子, 水田克巳:リアルタイムPCR法を用いたC型インフルエンザウイルス検出の試み. 第65回日本細菌学会東北支部総会, 山形;2011年8月
3. 下平義隆, 村木 靖, 菅原勘悦, 松寄葉子, 本郷誠治:C型インフルエンザウイルスCM2タンパク質の細胞質領域の解析. 第65回日本細菌学会東北支部総会, 山形;2011年8月
4. 板垣勉, 松寄葉子:鼻咽喉からScaffold cardiovirusが検出された小児の臨床症状の検討. 第114回日本小児科学会学術集会, 東京;2011年8月
5. 松寄葉子:ヒトメタニューモウイルス-迅速診断によってみえてきた臨床的特徴-. 第60回日本感染症学会東日本地方会学術集会, 山形;2011年10月
6. 板垣勉, 松寄葉子:2008年に鼻咽喉から検出されたScaffold cardiovirusの9例-気道感染症としてのSAFV-. 第60回日本感染症学会東日本地方会学術集会, 山形;2011年10月

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきものなし

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
平成 23 年度分担研究報告書
新型インフルエンザ H1N1 のウイルスの病原性等の解析に関する研究

ヒト抗体による新型ウイルス HA 上の抗原領域の認識機構の解析

研究代表者：信澤枝里（国立感染症研究所 室長）
研究協力者：中内美名（国立感染症研究所 研究員）
廣津伸夫（廣津医院・院長）
萩原温久（萩原医院・副院長）

研究要旨 2009 年 4 月にブタウイルスを起源とする A/H1N1pdm09（新型ウイルス）によるパンデミックが発生した。新型ウイルスは、従来の季節性 A/H1N1 インフルエンザウイルス（季節性ウイルス）とは抗原性が異なるが、ヒトの血清抗体が、新型ウイルス主要抗原 HA（新型 HA）上のどこの抗原領域を認識するのかは、明らかにされていない。本研究では新型ウイルスワクチン接種者約 100 名を対象とし、ヒト血清中中和抗体が認識する、新型 HA の抗原領域の同定を行った。手法としては、新型 HA と WSN 株 HA の間でキメラ HA を作製し哺乳動物細胞上で単独発現させ、ワクチン接種前後のペア血清を結合させ、蛍光免疫染色法により結合能を測定した。対象としたワクチン接種後血清のうち約 40%が新型 HA の HA1 領域に特異的に結合したため、さらに血清抗体が認識結合する抗原領域の特定を試みた。その結果、大半の血清が site Ca に結合した。さらに、これらの血清の、新型 HA に対するモノクローナル抗体エスケープ変異株に対する反応性を検討した結果、Ca 領域に変異を有する変異株に対して、反応性の著しい低下が見られた。

A. 研究目的

2009 年 4 月以降、ブタウイルス由来の A/H1N1pdm09 インフルエンザウイルス（新型ウイルス）が世界規模の大流行を引き起こした。新型ウイルスは、季節性 A/H1N1 インフルエンザウイルス（季節性ウイルス）とは抗原性が異なるため、季節性ウイルスに対する抗体は交叉反応性を示さない。今後、新型ウイルスの持続的流行によりウイルス

の病原性、抗原性が変化し、犠牲者が増加することが懸念される。本研究では、ヒト中和抗体が認識する HA 上の抗原領域を特定し、今後生じる抗原変異との関連を明らかにし、抗原変異に対する迅速な対応を可能にすることを目的とする。本年度は、昨年度に加え、ワクチン接種前後のヒトペア血清の検体数を増やし、ヒト血清抗体が結合する新型ウイルス HA 上の特異的抗原領

域の同定を、結合実験および HI 試験により試みた。

B. 研究方法

1. ヒト血清

新型ウイルスワクチン(1 価のワクチン)接種前、接種後で新型ウイルスに対する HI 価が上昇した 108 人のペア血清を用いた。

2. キメラ HA の構築

昨年度までに構築したキメラ HA, Narita/WSN (HA1/HA2), WSN/Narita (HA1/HA2), Narita Ag/WSN (HA1 の抗原領域のみ Narita HA に組み換えた WSN HA)、Narita Sa/WSN(主に Sa 領域を Narita HA に組み換えた WSN HA)、Narita Sb/WSN(主に Sb 領域を Narita HA に組み換えた WSN HA)に加え、Narita Ca/WSN(主に Ca 領域を Narita HA に組み換えた WSN HA)を PCR により作製し、pME18s 発現 vector にクローニングした。

3. HA 蛋白質の単独発現

発現ベクターにクローニングした各キメラ HA cDNA を COS 1 細胞にトランスフェクションし、48 時間後にエタノール・アセトン(1:1)により固定した。

4. ヒト血清を用いた蛍光免疫染色

各ヒト血清の Narita HA、WSN HA および各キメラ HA に対する結合能を間接蛍光免疫染色法により測定した。ヒト血清(100 分の 1 希釈)は各キメラ HA 発現固定化細胞と 37°C、1 時間反応後、FITC 標識抗ヒト抗体とさらに反応し、蛍光顕微鏡下で観察した。

5. HI 試験

マウスモノクローナル抗体を用いて得られた A/Narita/1/2009 株エスケープ変異株 21 株を用いてヒト血清との HI 試験を行った。

(倫理面への配慮)

全ての実験は国立感染症研究所村山庁舎高度安全実験施設において、国立感染症研

究所病原体等安全管理規程に従い実施した。ヒト試料を用いた実験は、ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

キメラ HA Narita/WSN および WSN/Narita と 108 人のヒトペア血清との反応性を検討した。その結果(i)ワクチン接種前後共に Narita /WSN、WSN /Narita に反応するグループ(グループ 1、31 人)、(ii)ワクチン接種前の血清は反応しないが、ワクチン接種後の血清が Narita /WSN、WSN /Narita 両 HA に反応するグループ(グループ 2、37 人)、(iii)ワクチン接種後の血清のみが Narita/WSN にのみ反応するグループ(グループ 3、40 人)、の 3 つのグループに分けられた(図 1)。

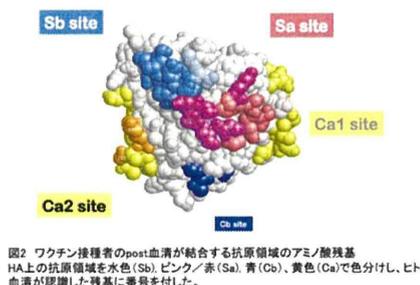
図1. ワクチン接種者ペア血清のNarita HA1に対する結合能

HA1	HA2	Expressed HA	Human sera					
			Group1		Group2		Group3	
			pre	post	pre	post	pre	post
WSN	WSN	WSN	+	+	-	+	-	-
NRT	NRT	NRT	+	+	-	+	-	+
WSN	NRT	WSN/NRT	+	+	-	+	-	-
NRT	WSN	NRT/WSN	+	+	-	+	-	+
No. of sera			31		37		40	

グループ 3 は新型ウイルス特異的抗原領域を認識すると考えられるため、さらに検討したところ、Narita Ag/WSN、Narita Sa/WSN に反応するグループ A、Narita Ag/WSN、Narita Sb/WSN に反応するグループ B、Narita Ag/WSN、Narita Ca/WSN に反応するグループ C、それ以外のグループ D に分けられた。グループ C に分類される血清が最も多かった。

さらにグループ 3 の血清とマウスモノクローナル抗体を用いて得られた A/Narita/1/2009 株エスケープ変異株を用いて HI 試験を行ったところ、A/Narita/1/2009 原株と比較して Ca 領域に変異がある変異株において多くの血清の HI 価が減少した。さらに反応性の低下は、特

定の変異株に対して観察された (図 2)。



D. 考察

新型ワクチン接種者 108 人のペア血清が認識する新型 HA 上の抗原領域を解析した。キメラ HA に対する結合能およびエスケープ変異株に対する反応性から、ワクチン接種後に、新型 HA の HA1 領域に特異的に結合する血清の多くが、Ca, Sa 領域の特定のアミノ酸残基を認識する事が、明らかとなった。一方、ワクチン接種後に、WSN 株と Narita 株の両 HA に対する結合能が増加する血清とワクチン接種前、接種後ともに、両 HA を認識する血清に関しては、新型ワクチン接種前のどのような抗原に対する抗体産生細胞が、惹起されているのか、検討を要する。

以上の結果により、グループ 3 の血清を用いることにより、ヒト血清中抗体が認識する新型 HA 上の抗原領域の同定が可能となった。今後、発生から 3 年経た現在流行している株の変異箇所について検討する予定である。さらに、感染前後のペア血清を用いて同様の解析を行い、ワクチン接種による抗体応答との比較を行う。

E. 結論

新型ワクチン接種後の血清中の中和抗体の多くが、HA 上の抗原領域 Ca を認識することが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Eri Nobusawa, K. Omagari, S. Nakajima, K. Nakajima Reactivity of human convalescent sera with influenza virus HA protein mutants at antigenic site A. *Microbiology and Immunology*. In press (2012)
2. Akio.Yoshioka, K. Takematsu, I. Kurisaki, K. Fukuzawa, Y. Mochizuki, T. Nakano, E. Nobusawa, K. Nakajima, and S. Tanaka, "Antigen-Antibody Interactions of Influenza Virus Hemagglutinin Revealed by the Fragment Molecular Orbital Calculation", *Theor. Chem. Acc.* 130 (2011) pp. 1197-1202.
3. Akio. Yoshioka, K. Fukuzawa, Y. Mochizuki, K. Yamashita, T. Nakano, Y. Okiyama, E. Nobusawa, K. Nakajima, and S. Tanaka, "Prediction of Probable Mutations in Influenza Virus Hemagglutinin Protein Based on Large-Scale Ab Initio Fragment Molecular Orbital Calculations", *J. Mol. Graph. Model.* 30 (2011) pp. 110-119.
4. Kaori Fukuzawa, Katusmi Omagari, Katsuhisa Nakajima, Eri Nobusawa, Shigenori Tanaka. Sialic acid recognition of the pandemic influenza 2009 H1N1virus: binding mechanism between human receptor and influenza hemagglutinin. *Protein and Peptide letters.* 18, 530-539, 2011

5. Nakauchi M, Ujike M, Obuchi M, Takashita E, Takayama I, Ejima M, Oba K, Konomi N, Odagiri T, Tashiro M, Kageyama T; the influenza virus surveillance group of Japan. Rapid discrimination of oseltamivir-resistant 275Y and -susceptible 275H substitutions in the neuraminidase gene of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus by duplex one-step RT-PCR assay. *Journal of Medical Virology*. 83(7):1121-1127, 2011
2. 学会発表
1. Mina Nakauchi, Emi Takashita, Masato Tashiro, Hidekazu Nishimura, Eri Nobusawa: Analysis of antigenic sites on the HA protein of pandemic influenza H1N1pdm09 virus, recognized by human antibody. XV International Congress of Virology, Sapporo, September, 2011
 2. Yoko Matsuzaki, Kanetsu Sugawara, Yoshitaka Simotai, Seiji Hongo, Eri Nobusawa Antigenic structure or the hemagglutinin of pandemic influenza A (H1N1) virus. XV International Congress of Virology Sep 11-16. 2011
 3. Yuichi Harada, Hiroshi Takahashi, Masayuki Shirakura, Eri Nobusawa, Norio Yamamoto, Kazuya Nakamura, Itsuki Hamamoto, Hideki Asanuma, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Shigeyuki Itamura Growth Ability of reverse genetically generated influenza A/H1N1 pdm09 viruses in MDCK and LLC-MK2 cell lines. XV International Congress of Virology Sep 11-16. 2011.
 4. Hideki Asanuma, Mina Nakauchi, Kakyoko Sato, Eri Nobusawa, Akira Ainai, Norio Yamamoto, Nami Konomi, Hideki Hasegawa, Masato Tashiro: Comparison of influenza A/H1N1pdm09 vaccine productions in eggs versus cell cultures and the protective immune responses induce in mice. XV International Congress of Virology, Sapporo, September, 2011
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
該当なし
 2. 実用新案登録
該当なし
 3. その他
該当なし

新型インフルエンザウイルスを認識するモノクローナル抗体の作製

研究分担者	高橋 宜聖	(国立感染症研究所免疫部・室長)
研究協力者	阿戸 学	(国立感染症研究所免疫部・室長)
	小林 和夫	(国立感染症研究所免疫部・部長)
	萩原温久	(萩原医院・副院長)
	築地 信	(星薬科大学・准教授)

研究要旨 2009年新型インフルエンザウイルス (H1N1pdm) が惹起する液性免疫応答ならびに抗ヘマグルチニン (HA) 抗体のエピトープ構造を解析するため、ワクチン接種により誘導された末梢血記憶B細胞とプラズマ細胞を分離し、HA特異的なモノクローナル抗体の作製を試みた。ワクチン接種前と接種後一ヶ月以上経過した末梢血から、HA結合性記憶B細胞の頻度をフローサイトメトリで測定したところ、HI抗体価と相関して頻度の増加が確認された。さらに、このHA結合性記憶B細胞を分離し、使用する抗体遺伝子を細胞株で発現させモノクローナル抗体の作製を試みたが、細胞頻度が低く (0.01%以下)、2種類のモノクローナル抗体の作製にとどまった。これに対し、ワクチン接種後一週間後の末梢血からプラズマ細胞の頻度を測定したところ、より高頻度 (0.2%以上) で出現することが判明し、1名のドナーから8種類の抗HAモノクローナル抗体を作製することに成功した。

A. 研究目的

H1N1 インフルエンザワクチン接種により活性化された HA 結合性 B 細胞を分離し、その抗体遺伝子からモノクローナル抗体を作製する。

B. 研究方法

(1) ヒト血清ならびに末梢血細胞の調製
新型インフルエンザワクチンを接種したボランティアからヘパリン含有末梢血を採取し、フィコ

ール遠心分離により末梢血単核球を分離した。血漿からフィブリンを除去することにより血清化を行い、HI 抗体価の測定に使用した。

(2) フローサイトメトリによる HA 特異的記憶 B 細胞とプラズマ細胞の同定と分離

ヒト末梢血単核球を抗IgG FITC抗体または抗CD38 FITC抗体、抗CD19 Pacific Blue抗体、抗CD27 APC抗体、HA-PE、Propidium iodide、抗CD20 AlexaFluor700 抗体で染色し、CD19⁺CD27⁺IgG⁺細

胞の中から、HA結合性を有する記憶B細胞を同定した。プラズマ細胞は、CD19⁺CD27⁺CD38⁺CD20⁻細胞として同定した。さらに、これらの細胞をFACS Ariaを用いて 96 ウェルプレートの各ウェルに、1 cell per wellにて分離した。

(3)抗体重鎖・軽鎖遺伝子のクローニング

分離した細胞からcDNAを合成し、PCRにより抗体遺伝子V_H/V_Lを増幅した。各遺伝子を抗体発現ベクターに組み込みクローニングを行った。

(4)培養細胞を用いた抗体タンパクの発現

HEK293 細胞株にクローニングした抗体V_H/V_L発現ベクターを形質転換し、5 日間培養した後、上清中に産生された抗体のHA結合性をELISAにより確認した。

(倫理面への配慮)

全ての実験は国立感染症研究所戸山庁舎高度安全実験施設において、国立感染症研究所病原体等安全管理規程および動物実験委員会規程に従い実施した。ヒト試料を用いた実験は、ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

(1) HA に結合する記憶 B 細胞の同定

ワクチン接種前・接種後の末梢血単核球を蛍光標識した HA や記憶 B 細胞のマーカー分子に対する抗体で染色した。安定した解析に必要な 50 万個の細胞数をフローサイトメトリにて取り込むことのできた 5 名のドナーから HA 結合性の記憶 B 細胞数を測定した結果、全てのドナーにおいてその存在頻度は末梢血リンパ球 100 万個あたり 100 個以下 (0.01%以下) であった (図 1)。しかし、ワクチン接種前と接種後後 1 ヶ月以上経過した時点で頻度を比較したところ、多くのドナーにお

いて頻度の増加が確認された (図 1)。

(2) プラズマ細胞の同定

ワクチン接種 1 週間後の末梢血単核球から、フローサイトメトリによりプラズマ細胞の頻度を計測したところ、末梢血リンパ球 100 万個あたり 2000 個以上 (0.2%以上) の抗体産生細胞を検出することができた (図 2)。

(3) 記憶 B 細胞とプラズマ細胞が発現する抗体 V_H/V_L 遺伝子のクローニングと抗体タンパクの発現

Wardemann のグループにより開発されたヒト抗体遺伝子クローニングシステムを用い、HA 結合性記憶 B 細胞とプラズマ細胞が発現する抗体遺伝子の増幅ならびにクローニングを試みた。まずフローサイトメトリにより単一化した細胞から、V_H/V_L 遺伝子をクローニンし、HEK293 細胞に遺伝子導入した。その結果、約 40%の単一化した細胞から V_H/V_L 遺伝子を増幅することに成功し、さらに、遺伝子導入した HEK293 細胞の培養上清に含まれる抗体の HA 結合性を ELISA により検証したところ、これまで記憶 B 細胞から 2 種類の HA 結合性のモノクローナル抗体と、プラズマ細胞から 8 種類のモノクローナル抗体を作製することに成功した (図 3)。

D. 考察

近年、単一のヒト B 細胞から、抗体 V_H/V_L 遺伝子をクローニングし、モノクローナル抗体タンパクを作製する技術が開発され、季節性インフルエンザワクチンが惹起するヒト抗体の結合性解析や HIV に対するヒト中和抗体の単離など、様々な研究成果が報告されている。本研究では、この方法を H1N1 インフルエンザワクチン接種者に適用し、H1N1 インフルエンザウイルス HA に結合するモノクローナル抗体の迅速な作製システムを構築

する事に成功した。

今後、この手法を用いて、ワクチン接種歴、インフルエンザ感染履歴の異なる様々なグループのドナーからモノクローナル抗体を作製し、その結合性解析に役立てて行きたいと考えている。

E. 結論

H1N1 インフルエンザウイルスに結合するヒト記憶B細胞とプラズマ細胞を分離し、その抗体遺伝子からモノクローナル抗体を作製することに成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Harada, Y., Ninomiya-Mori, A., Takahashi, Y., Shirakura, M., Kishida, N., Kageyama, T., Tada, Y., Tashiro, M., Odagiri, T. Inactivated and adjuvanted whole-virion clade 2.3.4 H5N1 pre-pandemic influenza vaccine possesses broad protective efficacy against infection by heterologous clades of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus in mice. *Vaccine*, Sep 10. [Epub ahead of print] 2011
- (2) Fujii, H., Ato, M., Takahashi, Y., Otake, K., Hashimoto, S., Kaji, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Fujita, M., Adachi, A., Nayakaya, T., Taniguchi, M., Koyasu, S., Takemori, T. HIV-1 Nef impairs multiple T-cell functions in antigen-specific immune response in mice. *Int. Immunol.*, 23, 433-441, 2011
- (3) 高橋宜聖、小野寺大志、小林和夫「ウイルス感染局所における記憶B細胞応答」実験医学増刊、29、81-86、2011

2. 学会発表

(第41回日本免疫学会、千葉、2011年11月)

- (1) Takahashi, Y. 「Protective memory B cell responses to influenza virus infection」(シンポジウム、招待講演)
- (2) Onodera, T., Aizawa, R., Hosono, A., Kaminogawa, S., Kobayashi, K., Takahashi, Y. 「Role of Toll-like receptor signaling for the development and reactivation of virus-specific memory B cells」
- (3) Yokoi, Y., Onodera, T., Hachimura, S., Ato, M., Kobayashi, K., Takahashi, Y. 「Localization and reactivation of virus-specific memory B cells at the site of virus infection」

G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

図1 フローサイトメトリによるHA結合性記憶B細胞の検出

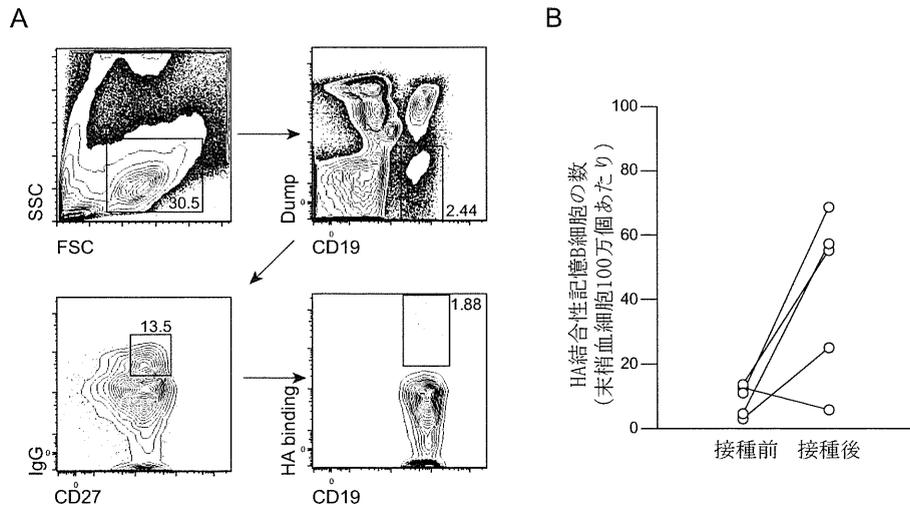


図2 フローサイトメトリによるプラズマ細胞の検出

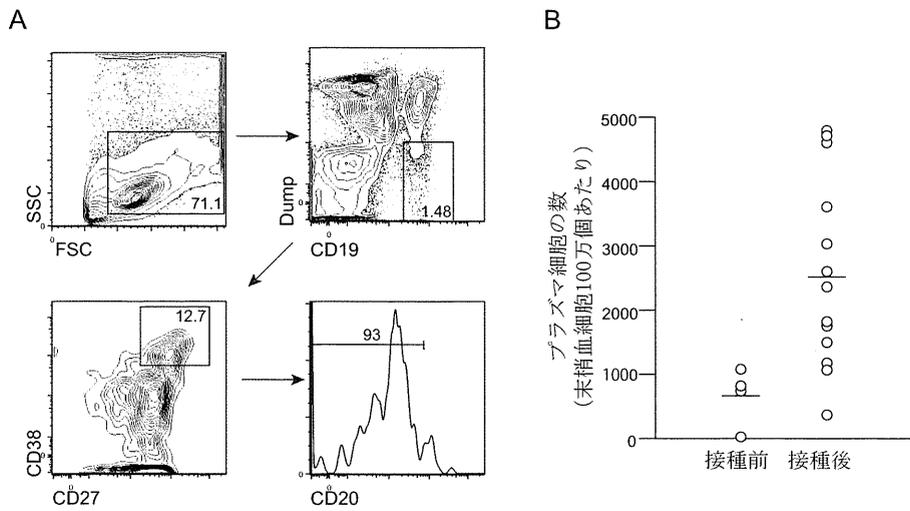
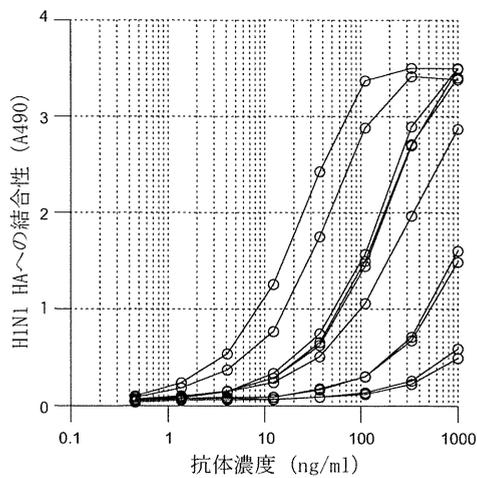


図3 作製したモノクローナル抗体のHA結合性



新型インフルエンザ H1N1 のウイルスの病原性等の解析に関する研究
新型ウイルスに対するヒトの免疫応答の解析

研究分担者 西村秀一 国立病院機構仙台医療センター臨床研究部病因研究室長

研究要旨 2009 年～2011 年にかけて、インフルエンザ A(H1N1)Pdm09 ウイルスワクチン接種をした病院職員 419 人の HI 抗体価をしらべ、さらに年 2 回のシリーズ血清でも調べた。その結果、被接種者の約 3 割が、HI 抗体無応答者であり、さらにその 3 割は、その後同ワクチンの再接種があったにもかかわらず有効な抗体価を獲得していなかった。さらに、同ウイルスに罹患した患者 86 例から得た血清を調べ、そのうち 1 割弱が自然感染でも HI 抗体無応答者であり、1 例を除きみな中和抗体でも低い抗体価しか示さなかった。

A. 研究目的

2009 年に出現した新型インフルエンザに対して作られたワクチンは、臨床試験において 1 回接種で接種者の約 7 割に抗体獲得があったことでワクチンとして認可された。これは逆に言えば、このワクチンを 1 回接種しても十分な抗体獲得できなかった人たち（無～低応答群）が接種者の約 3 割にもものぼっていたことになる。こうした応答群は公衆衛生上無視できない存在と思われる。本研究で分担者は、健康成人における無応答者について、その割合と特徴的な因子の有無、それが新型インフルエンザワクチンだけのことか、さらには自然感染においてはどうか、について調べた。

B. 研究方法

本研究は大きく次の 3 つで構成される。

1) 2009 年～2011 年にかけて、インフルエン

ザ A(H1N1)Pdm09 ウイルスワクチン接種をした病院職員の HI 抗体価の獲得状況を 419 名の血清を対象に調べ、さらにその後の時間的推移による抗体価の変動を年 2 回（6 月、11 月）の健康診断時に得られたシリーズ血清で調べた。

2) 新型インフルエンザワクチンに対する無応答群が、本ワクチンだけに対する応答が悪いのかあるいは他の不活化ワクチンに対しても悪いのかを検討する目的で、某医科大学学生、計 93 人を対象に、季節性インフルエンザに対する抗体の獲得性を調べ、更に可能な者については B 型肝炎ならびに狂犬病ワクチンに対する応答性も調べ、新型インフルエンザワクチンに対するそれとの相関性を検討した。

3) 不活化ワクチンに対する低応答性との比較のために、自然感染によっても抗体価が上が

りにくい人を探した。2009年のパンデミックの際に、短期間のうちに二度 A (H1N1) pdm09 ウイルスに感染したとする海外での報告があるが、わが国でもこれと同じような症例を多く経験した市中クリニックがあった。そのため、二度の感染を血清学的に証明する目的で、そうした患者の回復期血清で、HI 試験、中和試験さらには、感度が高い放射免疫沈降試験 (RIP) を行った。

それとあわせ、2010年1月から2011年6月までに得られた86件のインフルエンザ患者のペア血清について、同様の方法で、自然感染であっても抗体価の上昇に乏しい症例の検索を行った。

(倫理面への配慮) 対象となった患者あるいはその親権者からのインフォームドコンセントは得ており、また得られた情報の扱いも適切に行った。

C. 研究結果

1) A(H1N1)Pdm09 ウイルスワクチン接種をした病院職員のHI抗体価の推移

接種前後の抗体価を419名の職員血清で調べたところ、有効防御免疫の指標とされている1:40倍以上のHI抗体価を有する率は、ワクチン接種前(5.3%)、ワクチン接種後に(76.1%)であり、被接種者の約4割が十分な抗体価を獲得できていなかった。

男女別、年台別に比較検討した結果、男女別ではあまり大きな差は認められなかったが、20歳台の若い年齢層では、ワクチン接種後、幾何平均抗体価(213)抗体保有率(84%)、抗体陽転率(81%)のすべてが他の世代より高い値を示した一方、50歳台はそれぞれ66、52、47%と、低値を示し、この年台からワクチンに対する応答性が低い人が多くなっていることが判明した。

さらに半年おきに連続5回採取された血清(シリーズ血清)のある150例について、そ

の間のワクチン接種の影響も含め追跡調査した。2011年6月時点でのHI抗体保有状況を年代ごとに比較した結果、1:160以上の抗体価を維持していたのは20歳台が最も多く、年代が進むにつれて高い抗体価を維持している割合が少なかった。ワクチン接種後抗体価が有意上昇を示さなかった例は99例(24%)だったが、その内シリーズで追跡できた例88例中28例(32%)もの人がシリーズ中一度も40倍以上の抗体価を獲得していなかった。

2) 医学生における新型ワクチンを含む不活化ワクチンに対する反応性の調査

2009~2010年に得られたA大学医学部医学科学生、男性56例(平均22.1歳)、女性37例(平均20.8歳)の血清について、新型インフルエンザならびに、それ以外の不活化ワクチンとして、季節性インフルエンザ、B型肝炎ならびに狂犬病ワクチンへの応答性を調べた。

その結果、A/H1N1pdm09に対してはワクチン接種前に十分な抗体価を持つ人の割合が高かった。これは同ウイルスの大流行による抗体獲得の表れと考えられたが、その一方で、季節性ワクチンでは、接種後も有効な抗体価とされるHI価1:40以上を持つ被接種者の割合は、A(H1N1)型で約7割、A(H3N2)型、B型でそれぞれ3割、2割と少なかった。

新型ワクチンへの応答性がHI試験で陰性だった症例について、中和抗体価も測定してみた。その結果、新型インフルエンザ罹患もしくはワクチン接種にもかかわらずHI抗体価が1:10だったものが10例あり、また、それらのうち2例は、中和抗体価でも陰性であった。

つぎに、複数種のワクチン接種を受けていた症例について、ワクチン間の獲得抗体量の相関関係を調べた。その結果、a) 狂犬病とB型肝炎のワクチンによる抗体獲得にはある程度の相関性が認められた(スピアマン係数 $r=0.571429$)。ただし、やはり両方のワクチンに対して抗体価が上昇しにくい者も存在し

た。また、前者によって高い抗体価を獲得していながら後者に対しては抗体価が上昇がほとんどない、あるいはその逆の、例外的な例の存在も明らかとなった。b) 新型ワクチン接種群では、B型肝炎への抗体価の獲得との間にある程度の相関が認められた($r=0.68750$) c) さらに新型インフルエンザと狂犬病ワクチンとの関係を見ようと試みたが、使用可能な症例数が少なく、計算不能であった。

3) 自然感染者の中の抗体応答の低い人の検索

2009年のパンデミックで短期間のうちに二度A(H1N1)pdm09ウイルスに感染したことが疑われた9症例について、血清学的に二度の感染を証明しようとした検査で、9例すべてがHI試験で第1回目の感染の回復期の抗体価が $1:<10$ であった。量の少なかった2例を除く7例について中和試験を試みたところ、中和抗体価もすべて $1:<10$ 以下であり、さらに感度の良い放射免疫沈降(RIP)法での抗体検出も試みたが、抗体の存在を証明するに至らなかった。また、この際対照としておいたA(H1N1)pdm09ワクチン接種後血でも、RIP法で抗体の明らかな上昇が認められない例が、相次いだ。

つぎに2010年1月から2011年6月までの間に107ペアを含む376件のインフルエンザ疑い患者の血清を得た。それぞれの症例についてはウイルス分離も試み、感染のウイルス学的証明の裏づけのある自然感染例の中で、抗体価の上昇に乏しい症例の検索を行った。

その結果、ウイルス分離ができ、型、亜型分類ができた例が86件あった。これらの血清について、A(H1N1)pdm09株に対するHI抗体価を測定した結果、ウイルス分離で感染が証明されていてもHI抗体価が $1:<10$ の例が6例(7%)見つかった。それらについて、中和抗体価も測定したところ、急性期がすべて $1:<10$ であったが、回復期は $1:10$ が1例、 $1:20$ と 40 がそれぞれ2例、そして $1:160$ が1例であった。

D. 考察

1) 本研究により、新型インフルエンザワクチンによって十分な抗体価が得られない人たちが、健常人の中にも無視できない割合で存在することが確認された。また、その割合は従来考えられていた高齢者の範疇に入らない50歳台あたりで急に増えることがわかった。シリーズ血清の追跡調査の結果、そういった人たちは、ワクチン接種を数回繰り返し受けても有効防御免疫の指標とされている $1:40$ 倍以上のHI抗体価を一度も得られていない場合も多いことがわかった。

さらに、ワクチン接種を受けた結果ある程度の高い抗体価を獲得した中で、抗体価を1年間にわたって持続させる人もいれば6ヵ月後には大きく抗体価を落とす人たちがいる。こうした人たちの抗体反応をさらに良く理解するために、今後さらなる追跡調査ならびに中和抗体、補体結合抗体(CF抗体)、NA阻止抗体などの他の抗体価測定が必要である。

2) 季節性インフルエンザワクチンでは今回意外にも、20歳台の健常群において抗体価を上昇させる役割をあまり果たしていないように見える結果となった。また、2つ以上の不活化ワクチンに共通して抗体価が上昇しない人が確実に存在していた一方で、まったく相関しない例も存在していた。新型インフルエンザ不顕性感染群では、ワクチン接種群とは異なり、B型肝炎の抗体価と相関性が見られなかった。それにより、自然感染による抗体価の上昇と、不活化ワクチンによるそれは反応性が異なる可能性が示唆された。

3) 新型ウイルスに対する抗体検査により、自然感染でもHI試験では拾い上げられず、中和試験でなんとか抗体反応を拾い上げられる程度の低い抗体反応しか示さない例を、実際に見つけ出すことができ、健常人の中にもワクチン接種のみならず自然感染でも抗体価の上がりにくい人が存在することが明らかにな

った。季節性のインフルエンザウイルスにおいても同様な例を探しだし、血清中に HI 抗体や抗 HA 抗体を中心とする中和抗体のほか、どのような抗体ができているかを明らかにしていく必要がある。

E. 結論

本研究により、新型インフルエンザワクチンに対する抗体反応の無～低応答者が、健常人の広範な年齢層にかなりの割合で存在することが確認された。さらには、ワクチン接種に対してのみならず、自然感染を受けた健常人の中にも、そうした人間がいることが明らかになった。今後は、そうした無～低応答者の割合を、被接種者あるいは罹患者の属性ごとに詳細に調べることで、ならびにそういった人たちがどのようにして感染から生体レベルで守られているのかを明らかにすることにも力を注ぐべきである。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 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