

201132041A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 板村繁之

平成24(2012)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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 板村繁之

平成24（2012）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. 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. 剤型の異なる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

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 19

IV. 研究成果の別刷

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, Signal peptide, Transmembrane domain (TM), Cytoplasmic tail (CT) 領域をPR8株の配列に改変した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り、野生株よりも増加する場合があることが明らかになった。従って、ワクチン製造株の改良に、このような手法が応用可能であると考えられる。
- (2) H5型HA特異的なモノクローナル抗体を組み合わせて作製したサンドイッチELISA法は、ワクチン中に含まれるHA抗原量を測定するための検出感度は十分であったが、国家検定で使用されているSRD試験と比較して、実験間の誤差が大きく、広くワクチン製剤中のHA含有量測定法として利用するには信頼性・再現性を向上させる必要がある。
- (3) ワクチンの安定性がウイルス株によってはHA蛋白のアミノ酸変異によって大きく影響を受けることから、インフルエンザワクチンの品質管理としてワクチンの抗原性の保持以外に、ワクチンの安定性の観点からもワクチン製造株の変異は重要な品質管理項目である。
- (4) 全粒子ワクチンは、初回免疫時にはスプリットワクチンよりも高い抗体産生誘導能を持つが、追加免疫による増強効果はスプリットワクチンのほうが強かった。得られた知見は、ワクチンの接種戦略を検討するためだけでなく、剤型の異なるワクチンの品質管理を行う上で基礎となる情報を提供する。

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を開発を行い、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 HA 遺伝子の非コード

領域 (Non coding region: NCR)、Signal peptide、また、Transmembrane (TM)、Cytoplasmic tail (CT) 領域の異なるウイルス株をリバーシジェネティクス (RG) 法で作製して、ウイルスの増殖性とウイルス蛋白の生産量について発育鶏卵を用いて解析し、本領域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) での測定結果との比較を行った。

3) 新型インフルエンザワクチンの経時安定性に係る品質管理試験の開発、標準化

ワクチン製造株とワクチンの経時安定性の関係について解析を行った。参照ワクチンの経時安定性について、4℃での1ヶ月、5ヶ月、9ヶ月、12ヶ月のSRD力価を経時的に測定した。また、各ウイルス製造株で精製ウイルス(whole)、split ワクチン、精製 HA の各剤型を調製して、50℃で加速加熱試験を行いSRD力価とHA価を測定して経時安定性を検討した。さらに、各検体からウイルスRNAを抽出しRT-PCR法を用いてHA遺伝子の全長を増幅して、シーケンスを行い、遺伝子配列よりHA蛋白のアミノ酸配列を推定した。

4) 剤型の異なる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抗体応答についてワクチン特異的抗体 (ELISA 抗体)、HI 抗体、中和抗体について調べた。ワクチンは4週間隔で接種を行い、最終免疫2

週間後に血清を採取し各抗体価を測定した。また初回免疫と追加免疫による抗体産生能の違いを調べるため、初回免疫4週後に血清を採取して各抗体価についても測定した。

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、HA 蛋白の Signal peptide、また、Transmembrane (TM)、Cytoplasmic tail (CT) 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、HA 蛋白の Signal peptide、また、Transmembrane (TM)、Cytoplasmic tail (CT) 領域の配列を発育鶏卵で高増殖性の PR8 ウイルス株のものと置き換えたウイルスを作製して増殖性を比較検討した。

H5 と H7 亜型の HA についてはウイルス総蛋白量の増加が認められた。一方、H9 亜型のキメラ HA を有する RG ウイルスでは、H5, H7 亜型とは異なりむしろ減少した。このように試験に用いた HA の亜型によって異なるウイルス蛋白回収量を示した。この原因については不明であるが、ウイルスの遺伝子発現、複製あるいは粒子形成、放出に導入した HA の亜型ごとに異なる影響があり、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、解析したウイルス株は3株のみで、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。しかしながら、解析した H5 亜型ウイルスにおいては HA 含量がもとの野生株と比較して 2.5 倍増加した。このように、少なくとも特定のウイルス株については、ワクチンの生産性の向上が可能となった。従って、ワクチン

製造株の改良に、このような手法が応用可能であると考えられる。高増殖性のワクチン株を計画的に作成するには今後、どのようなメカニズムによって抗原蛋白量が増加したのか、詳細な解析が必要である。

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。昨年度、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 μ g あたりに含有される HA 蛋白量は、国家検定で従来より使用されている SRD 試験での測定結果とほぼ一致することを報告した。本年度は本サンドイッチ ELISA 法によるワクチン製剤中の HA 含有量測定法と SRD 試験法についてその再現性について検討を行った。その結果、SRD 試験法と比較すると測定試験ごとのばらつきがサンドイッチ ELISA 法で大きいことがわかった。本試験法の有用性を高めるためには、試験の再現性を高める検討が必要である。

3) 新型インフルエンザワクチンの経時安定性に係る品質管理試験の開発、標準化

4 種類のワクチン製造株 X-179A 株、X-181 株、IVR-148 株、X-187 株で作製した精製ウイルス (whole)、split ワクチン、精製 HA について、50°C 加熱試験をして HA 価を測定したところ、X-179A の HA 活性は減少した。X-181 の HA 活性も減少するが、X179A より緩やかであり、IVR-148 (H1N1) と X-187 (H3N2) の HA 活性は高い安定性を示した。SRD 力価も同様の傾向を示した。このようにウイルス株によって異なる経時安定性を示すことがわかった。また、安定性の違いは、精製ウイルスよりも split ワクチンや精製 HA で明確にあらわれており、安定性に高次構造が関わることを示唆された。X-179A と

X-181 は同じウイルス株に由来するワクチン製造株で HA 蛋白はひとつのアミノ酸残基 N129D の違いのみで、経時安定性に影響を与えていることがわかった。

一方で、X-179A 株で製造された日本の参照ワクチンは、4°C 1 年間保存において、著しい力価の低下は認められなかった。X-179A 株で製造された日本の参照ワクチンの HA 蛋白の変異の有無を調べたところ、X-181 株と同じアミノ酸配列である N129D 変異が起こっていたことから、この変異がワクチンの安定性の向上に寄与していると考えられる。

ワクチンの安定性がウイルス株によっては HA 蛋白のアミノ酸変異によって大きく影響を受けることから、ワクチンの品質管理としてワクチン製造株の変異は重要な管理項目であることがわかった。

4) 剤型の異なるインフルエンザワクチンによる免疫応答の解析

ワクチン製造株 X-179A で製造した全粒子ワクチンおよびスプリットワクチンでは、初回免疫後のワクチン特異的抗体価、HI 抗体価、中和抗体価は全粒子ワクチン接種の方が高い値を示した。一方、追加免疫の後には昨年度報告の通りスプリットワクチン接種の方がワクチン特異的抗体価は高いことが確認され、HI 抗体価、中和抗体価に対しても、スプリットワクチンは同等以上の効果を示すことが分かった。これは別のウイルス株 PR8 を用いて比較しても同様の結果を得ることができた。このように初回免疫と追加免疫では全粒子ワクチンとスプリットワクチンで抗体産生誘導に違いがあることが分かった。今後、全粒子ワクチンとスプリットワクチンにより誘導される抗体産生の仕組みを、抗原提示から最終的な抗体産生にいたる過程について解析を行うことによって、ワクチンの性状、形状の違いが、どの過程で抗体産生に影響を与えているのか解明する予定である。このようにして得られた知見はワクチンの接種戦略を検討するためだけでなく、ワクチンの品質管理を

行う上で、よりワクチンの効果や副反応に関連する特性を明らかにするのに役立つことが期待される。

D. 結論

(1) インフルエンザウイルスの非コード領域、Signal peptide, Transmembrane domain (TM), Cytoplasmic tail (CT) 領域を PR8 株の配列に改変した 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り、野生株よりも増加する場合があることが明らかになった。従って、ワクチン製造株の改良に、このような手法が応用可能であると考えられる。

(2) H5 型 HA 特異的なモノクローナル抗体を組み合わせることで作製したサンドイッチ ELISA 法は、ワクチン中に含まれる HA 抗原量を測定するための検出感度は十分であったが、国家検定で使用されている SRD 試験と比較して、実験間の誤差が大きく、広くワクチン製剤中の HA 含有量測定法として利用するには信頼性・再現性を向上させる必要がある。

(3) ワクチンの安定性がウイルス株によっては HA 蛋白のアミノ酸変異によって大きく影響を受けることから、インフルエンザワクチンの品質管理としてワクチンの抗原性の保持以外に、ワクチンの安定性の観点からもワクチン製造株の変異は重要な品質管理項目である。

(4) 全粒子ワクチンは、初回免疫時にはスプリットワクチンよりも高い抗体産生誘導能を持つが、追加免疫による増強効果はスプリットワクチンのほうが強かった。得られた知見は、ワクチンの接種戦略を検討するためだけでなく、剤型の異なるワクチンの品質管理を行う上で基礎となる情報を提供する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ikeno D, Kimachi K, Ibaragi K, Kudo Y, Goto S, Odoh K, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, and Kino Y. : Differences in the priming effect of various clades/subclades of inactivated H5N1 vaccine for booster injection with heterologous clades of vaccine strains. *Vaccine* 29, 4156- 4161(2011)
- 2) Kazuo Ohnishi, Yoshimasa Takahashi, Naoko Kono, Noriko Nakajima, Fuminori Mizukoshi, Shuhei Misawa, Takuya Yamamoto, Yu-ya Mitsuki, Shu-ichi Fu, Nakami Hirayama, Masamichi Ohshima, Manabu Ato, Tsutomu Kageyama, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Kazuo Kobayashi, Shigeyuki Itamura and Yasuko Tsunetsugu-Yokota: Immunological detection of H5N1 influenza viruses by newly established monoclonal antibodies. *Jpn. J. Infect. Dis.* 65: 19-27 (2012)
- 3) Takashi Ohkura, Yuji Kikuchi, Naoko Kono, Shigeyuki Itamura, Katsuhiko Komase, Fumitaka Momose, Yuko Morikawa. Epitope mapping of neutralizing monoclonal antibody in avian influenza A H5N1 virus hemagglutinin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 418: 38-43 (2012)
- 4) Ruth Harvey, Michelle Hamill, James S Robertson, Philip D Minor, Galina M Vodeiko, Jerry P Weir, Hitoshi Takahashi, Yuichi Harada, Shigeyuki Itamura, Pearl Bamford, Tania Dalla Pozza, and Othmar G Engelhardt. Application of deglycosylation to SDS PAGE analysis improves calibration of influenza antigen standards. *Biologicals* 40: 96- 99 (2012)
- 5) 板村繁之: パンデミックインフルエンザワクチ

- ン. 総合臨床 60: 2215-2217 (2011)
- 6) 原田勇一、板村繁之: インフルエンザワクチンの最新動向と展望. 日本臨床 69: 1567-1570 (2011)
- 7) Terahara, K., Yamamoto, T., Mitsuki, Y-y, Shibusawa, K., Ishige, M., Mizukoshi, F., Kobayashi, K. and Tsunetsugu-Yokota, Y.: Fluorescent reporter signals, EGFP and DsRed, encoded in HIV-1 facilitate the detection of productively infected cells and cell-associated viral replication levels. *Front. Microbiol.* 2: 1-11, 2012
- 8) Takeuchi, K., Nagata, N., Kato, S., Ami, Y., Suzaki, Y., Suzuki, T., Sato, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y., Mori, K., Nguyen, V. N., Kimura, H. and Nagata, K.: Wild-type measles virus with the hemagglutinin protein of the Edmonston vaccine strain retains wild-type tropism in macaques. *J. Virol.* 86: 3027-3037, 2012
- 9) Salaun, B., Yamamoto, T., Bardran, B., Tsunetsugu-Yokota, Y., Roux, A., Baitsch, L., Rouas, R., Fayyad-Kazan, H., Baumgaertner, P., Devevre, E., Ramesh, A., Braun, M., Speiser, D., Autran, B., Martiat, P., Appay, V. and Romero, P.: Differentiation associated regulation of microRNA expression in vivo in human CD8+ T cell subsets. *J. Transl. Med.* 9:44-52, 2011
- 10) Fujiil, H, Ato, M., Takahashi, Y., Otake, K., Hashimoto, S-I., Kaji, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Fujita, M., Adachi, A., Nakayama, T., Taniguchi, M., Koyasu, S. and Takemori, T.: HIV-Nef impairs multiple T cell functions in antigen-specific immune response in mice. *Int. Immunol.* 23:433-441,
- 11) Sato K, Iwai A, Nakayama Y, Morimoto J, Takada A, Maruyama M, Kida H, Uede T, Miyazaki T. Osteopontin is critical to determine symptom severity of influenza through the regulation of NK cell population. *Biochem Biophys Res Commun.* 417(1):274-9, 2012.
- 12) Morimoto J, Sato K, Nakayama Y, Kimura C, Kajino K, Matsui Y, Miyazaki T, Uede T. Osteopontin modulates the generation of memory CD8+ T cells during influenza virus infection. *J Immunol.* 187(11):5671-83, 2011.
- ## 2. 学会発表
- 1) Mitsuki, Y-y., Shibusawa, K., Terahara, K., Kobayashi, K., Moriakwa, Y., Takeda, M., Yanagi, Y., and Tsunetsugu-Yokota, Y.: HIV-1 infection enhances the susceptibility of T cells to measles virus infection by upregulating signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) expression. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress XV International Congress of Virology. Sapporo. September, 2011
- 2) Tsunetsugu-Yokota, Y.: HIV-1 transmission through immunological synapse and T-cell activation: How can we control virus replication? US-Japan AIDS Panel Meeting, Atlanta, USA, September 21-23, 2011
- 3) Tsunetsugu-Yokota, Y, Ishige, M., Mitsuki, Y-y., Shibusawa, K., Okada, S., and Terahara, K.: Impact of selective infection and expansion of CCR5-utilizing HIV-1 in CD4+CXCR4high CCR5+ memory T cells in humanized mouse model. 8th German-Japanese

- HIV- Symposium, Bochum, Germany, November 21-22, 2011.
- 4) 渋谷謙太郎、寺原和孝、石毛真行、光木裕也、横田（恒次）恭子. 麻疹ウイルス偽型化 HIV-1 抑制性 shRNA 発現レンチウイルスベクターのヒト化マウスにおける in vivo 評価. 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、12 月、東京、2011
- 5) 石毛真行、寺原和孝、渋谷謙太郎、光木裕也、池野翔太、小林和夫、岡田誠治、横田（恒次）恭子. R5 および X4 HIV-1 同時感染ヒト化マウスモデルによる感染早期のウイルス優位性の解析. 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、12 月、東京、2011
- 6) Kayoko Sato, Atsushi Iwai, Yosuke Nakayama, Junko Morimoto, Ayato Takada, Hiroshi Kida, Toshimitsu Uede, and Tadaaki Miyazaki. Distinct involvement of osteopontin in the infection of different types of influenza viruses. 第 10 回オステオポンチン研究会 (2011 年 6 月、札幌)
- 7) Kayoko Sato, Hideki Asanuma, Michiyuki Kasai, Shigeyuki Itamura, Masato Tashiro. Evaluation of the incorporation of influenza vaccines by antigen presenting cells. International Conference of Mucosal Immunology, Paris, France, July 2011
- 8) Kayoko Sato, Hideki Asanuma, Michiyo Kataoka, Noriyo Nagata, Masato Tashiro, Shigeyuki Itamura. Morphological characterization of A/H1N1pdm09 viruses isolated in egg from clinical specimens. 8th International Congress of Virology, Sapporo, September 2011 (第 59 回日本ウイルス学会学術集会併催)
- 9) Kayoko Sato, Michiyuki Kasai. Trafficking and delivery of influenza vaccines by antigen presenting cells. 第 41 回日本免疫学会学術集会 (2011 年 11 月、幕張)
- 10) Noriko SHIMASAKI, Hitoshi TAKAHASHI, Shigeyuki ITAMURA, Masato TASHIRO, Comparison of antigenic stability of influenza viruses and vaccines among different vaccine viruses. XV International Congress of Virology, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, September 2011.
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
1. 特許取得
- H5 亜型インフルエンザウイルスを特異的に認識するモノクローナル抗体
- 出願番号：特願 2011-22774
2. 実用新案登録
- 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、リバースジェネティクス (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、Signal peptide、Transmembrane、Cytoplasmic tail 領域の配列をバックボーンである PR8 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)、Signal peptide、また、Transmembrane (TM)、Cytoplasmic tail (CT) 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。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、HA 遺伝子の NCR 配列、Signal peptide、TM、CT 領域の配列をバックボーンである A/Puerto Rico/8/34 (PR8) 株由来の配列に改変したキメラ HA 遺伝子を有する RG ウイルスを作製し、増殖性、抗原蛋白回収量の比較検討を行い、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/Vietnam/JP1203/2004 (H5N1; JP1203), A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N3; MaNL12), 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、Signal peptide、TM、CT 領域を PR8 株の配列に組換えた 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。HA 含量の測定は、SDS-PAGE で得られた各蛋白のバンドを ATTO CS Analyzer を使用して総蛋白に占める HA 蛋白の割合を求め、総蛋白含量との積で算出した。

C. 研究結果

各亜型において、野生型 (WT)、NCR 配列のみ PR8 株由来 (PR8-NCR)、また NCR 配列、Signal peptide、TM、CT 領域 (PR8/SPTMCT) を PR8 株に改変した 3 種類の 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、各亜型において総蛋白回収量を定量した結果、図 1 に示すように、キメラ HA に組換えた RG ウイルス (PR8/SPTMCT) は、WT の RG ウイルスと比較し、H5 亜型では約 2 倍、H7 亜型では約 1.6 倍増加した。

しかしながら、H9 型については、約 0.6 倍となり減少した。

次に、JP1203 (H5 亜型) について HA 含量を測定した結果 (図 2)、野生型と比較して、キメラ RG ウイルスは約 2.5 倍増加した。

図 1

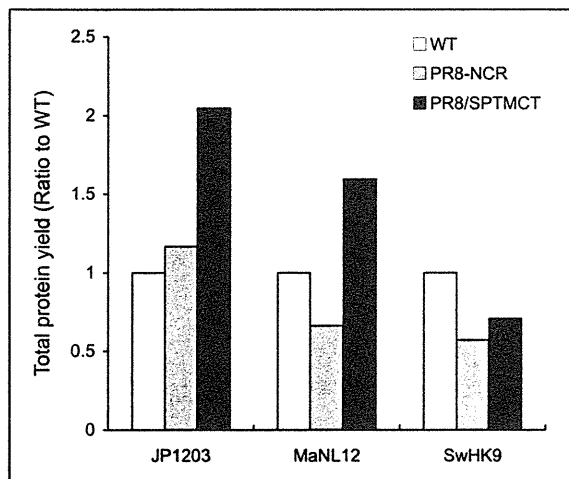
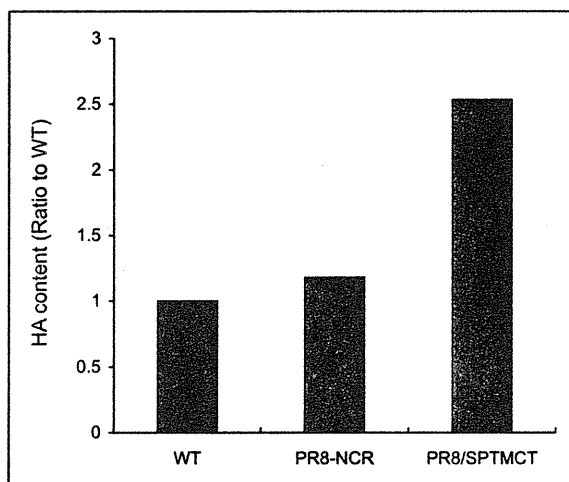


図 2



D. 考察

NCR 配列、Signal peptide, TM, CT 領域 (PR8/SPTMCT) を PR8 株に改変したキメラ HA を有する RG ウイルスは、H5 と H7 亜型の HA についてはウイルス総蛋白量の増加が認められた。一方、H9 亜型のキメラ HA を有する RG ウイルスでは、H5, H7 亜型とは異なりむしろ減少した。このように試験に用いた HA の亜型によって異なるウイルス蛋白回収量を示し、単純に増殖性の高い親株である PR8 ウイ

ルスとのキメラ HA 蛋白を有するウイルスが高生産性とはならなかった。この原因については不明であるが、ウイルスの遺伝子発現、複製あるいは粒子形成、放出に導入した HA の亜型ごとに異なる影響があり、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。また、JP1203 (H5 亜型) において HA 含量を測定した結果、WT と比較して、2.5 倍増加した。このことは、HA 蛋白の粒子への取り込み量が高まった結果、含量が増加したと考えられる。HA 蛋白の取り込みについて、H7 亜型、H9 亜型についても、HA 含量を比較検討する必要がある。

E. 結論

NCR 配列、Signal peptide, Transmembrane domain (TM), Cytoplasmic tail (CT) 領域を PR8 株の配列に改変した 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、ワクチン製造株の改良に、このような手法が応用可能であると考えられる。高増殖性のワクチン株を計画的に作成するには今後、どのようなメカニズムによって抗原蛋白量が増加したのか、詳細な解析が必要であると考えられる。

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 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

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)をはじめ全てのクレードの H5HA に反応するモノクローナル抗体 3 つを用い、サンドイッチエライザ法を確立した。このエライザ法でワクチン原液である精製不活化ウイルス液中に含まれる H5HA 抗原量を 3 回測定した結果、測定値は国家検定で使用されている SRD 試験の測定結果とほぼ一致するものの、エライザ法では実験間のばらつきが SRD よりもかなり大きく、その有用性を高めるには更に改良が必要であると思われた。

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. 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 4 度 C 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 (OD₄₅₀)。

2. 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 2011AH5A (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

昨年度はベトナムとインドネシア株の HA 標準抗原を用い、サンドイッチエライザ法の検出感度を検討した結果、ベトナム株の場合は 250 ng/ml から 16 ng/ml の範囲、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ことが明らかとなった。また、ワクチン製剤中の HA 定量のために現在国家検定で使用されている Single Radial Immuno diffusion (SRD)法と本エライザ法の測定の結果を比較すると、イ

ンドネシア株とベトナム株ワクチンの HA 含有量はほぼ等しかった (昨年度の報告書参照)。

そこで、上述の HA 標準抗原をスタンダードとし、インドネシア株とベトナム株のワクチンウイルス粒子タンパク中の HA 抗原量についてそれぞれ 3 枚のエライザプレートで 3 回実験を繰り返して HA 含有量を測定した(図 1)。同様に SRD 試験も 3 回繰り返してこれらの方法の測定精度を比較検討した。その結果を表 1 にまとめた。インドネシア株においてもベトナム株においても 2 つの方法でもとめた HA 抗原量の平均値はそれほど変わらなかった。しかしながら、エライザ法の場合、同一プレート内での測定は精度が高いものの、異なるプレート (実験)での結果は SRD 法と比較して CV 値が高く、実験の再現性にはまだ問題があることが明らかとなった。

考察

エライザ法では通常プレート毎に必ずスタンダードを置いてそれをもとにサンプル濃度を測定する。我々の開発したエライザ法は検出感度は十分であったが、プレート毎に測定値がばらつき、再現性に問題があることが明らかになった。エライザ法のこのような欠点をどうやって改良していくかは、今後の検討課題である。更に、SRD 法とエライザ法で用いる界面活性剤の違いや熱変性処理したワクチンでの HA 測定値の変化の有無等を比較する必要がある。まだ再現性に問題はあつたものの、エライザ法は検体処理能の高さや得られるデータの客観性という点で優れていると思われる。今後更なる改良を重ね、インフルエンザワクチンの品質管理に欠かせない

HA 含有量の試験法として従来の SRD 試験法に替えて使用することが可能となれば、高病原性鳥インフルエンザのパンデミックに備えて大量に製造されるであろうワクチンの検定に威力を発揮することが期待される。

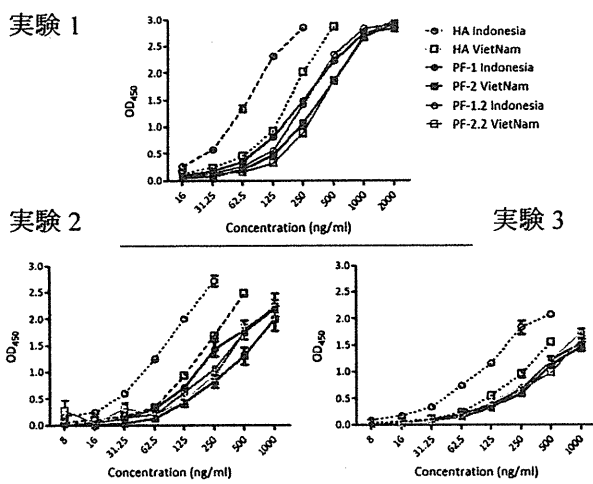


図1 エライザ法の繰り返し実験

HA タンパク量を横軸に、吸光度を縦軸にプロットした。標準 HA 抗原の吸光曲線を破線で、不活化ウイルス液のそれを実線で表す。不活化ウイルス液に関しては同一プレート上で duplicate として 2 か所、即ち 4 つのレーンに加えた。

表1 SRD とエライザ法の比較

A/Indonesia/05/2005(Indo05/PR8-RC2)									
SRD					ELISA				
Exp.	N	mean	SD	CV	N	mean	SD	CV	
1	1	325			2	315			
2	4	296	19.5	6.6%	2	226			
3	6	304	8.5	2.8%	2	265			
total		308		4.7%		269	44.4	16.5%	

A/Vietnam/1194/9004(NIBRG-14)									
SRD					ELISA				
Exp.	N	mean	SD	CV	N	mean	SD	CV	
1	0				2	548			
2	6	378	18.6	4.9%	2	377			
3	6	355	9.6	2.7%	2	476			
total		366		3.8%		467	85.9	18.4%	

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て作製したサンドイッチエライザ法は、ワクチン中に含まれる HA 抗原量を測定するための検出感度は十分であったが、国

家検定で使用されている SRD 試験と比較して、実験間の誤差が大きく、広くワクチン製剤中の HA 含有量測定法として利用するには信頼性・再現性においてまだ解決すべき問題があると思われた。しかしながら、サンドイッチエライザ法は簡便であり、一度に大量の検体を処理できるという利点があり、今後更に改良を重ねてワクチンの品質管理のために有用な試験法として開発していく必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

- 論文発表
 - Ohnishi K., Takahashi Y., Kono N., Noriko Nakajima N., Mizukoshi F., Misawa S., Yamamoto T., Mitsuki Y., Fu S., Hirayama N., Ohshima M., Ato M., Kageyama T., Odagiri T., Tashiro M., Kobayashi K., Itamura S. and Tsunetsugu-Yokota Y. : Immunological detection of H5N1 influenza viruses by newly established monoclonal antibodies. *Jpn.J.Infect.Dis.* 65:13-18, 2012
 - Terahara, K., Yamamoto, T., Mitsuki, Y-y, Shibusawa, K., Ishige, M., Mizukoshi, F., Kobayashi, K. and Tsunetsugu-Yokota, Y.: Fluorescent reporter signals, EGFP and DsRed, encoded in HIV-1 facilitate the detection of productively infected cells and cell-associated viral replication levels. *Front. Microbiol.* 2: 1-11, 2012
 - Takeuchi, K., Nagata, N., Kato, S., Ami, Y., Suzaki, Y., Suzuki, T., Sato, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y., Mori, K., Nguyen, V. N., Kimura, H. and Nagata, K. : Wild-type measles virus with the hemagglutinin protein of the Edmonston vaccine strain retains wild-type tropism in macaques. *J. Virol* 1: JVI Accepts, published online ahead of print on 11 January 2012 *J. Virol.* doi:10.1128/JVI.06517-11, 2012
 - Salaun, B., Yamamoto, T., Bardran, B., Tsunetsugu-Yokota, Y., Roux, A., Baitsch, L., Rouas, R., Fayyad-Kazan, H., Baumgaertner, P., Devevre, E., Ramesh, A., Braun, M., Speiser, D., Autran, B., Martiat, P., Appay, V. and Romero, P.: Differentiation associated regulation of microRNA expression in vivo in human CD8+ T cell subsets. *J. Transl. Med.* 9:44-52, 2011
 - Fujii, H., Ato, M., Takahashi, Y., Otake, K., Hashimoto, S-I., Kaji, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Fujita, M., Adachi, A., Nakayama, T., Taniguchi, M., Koyasu, S. and Takemori, T.: HIV-Nef impairs multiple T cell functions in antigen-specific immune response in mice. *Int. Immunol.* 23:433-441,

2. 学会発表

1) Mitsuki, Y-y., Shibusawa, K., Terahara, K., Kobayashi, K., Moriakwa, Y., Takeda, M., Yanagi, Y., and Tsunetsugu-Yokota, Y.: HIV-1 infection enhances the susceptibility of T cells to measles virus infection by upregulating signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) expression. International Union of Micro- biological Societies 2011 Congress XV International Congress of Virology. Sapporo. September, 2011

2) Tsunetsugu-Yokota, Y.: HIV-1 transmission through immunological synapse and T-cell activation: How can we control virus replication? US-Japan AIDS Panel Meeting, Atlanta, USA, September 21-23, 2011

3) Tsunetsugu-Yokota, Y., Ishige, M., Mitsuki, Y-y., Shibusawa, K., Okada, S., and Terahara, K.: Impact of selective infection and expansion of CCR5-utilizing HIV-1 in CD4+CXCR4high CCR5+ memory T cells in humanized mouse model. 8th German-Japanese HIV- Symposium, Bochum, Germany, November 21-22, 2011.

4) 渋谷謙太郎、寺原和孝、石毛真行、光木裕也、横田 (恒次) 恭子. 麻疹ウイルス偽型化 HIV-1 抑制性 shRNA 発現レンチウイルスベクターのヒト化マウスにおける in vivo 評価. 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、12 月、東京、2011

5) 石毛真行、寺原和孝、渋谷謙太郎、光木裕也、池野翔太、小林和夫、岡田誠治、横田 (恒次) 恭子. R5 および X4 HIV-1 同時感染ヒト化マウスモデルによる感染早期のウイルス優位性の解析. 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会、12 月、東京、2011

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

H5 亜型インフルエンザウイルスを特異的に認識するモノクローナル抗体

出願番号：特願 2011-22774

2. 実用新案登録

なし

ワクチンの品質管理試験の開発、標準化に関する研究

- インフルエンザワクチンの力価経時安定性に関するワクチン製造株間の比較 -

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

研究要旨

H1N1pdm09 ウイルスに対する A/California/7/2009(X-179A)株由来の1価ワクチンに関して、カナダやオーストラリアでワクチン力価の大幅な低下が見られワクチンの有効期限を短縮したとの報告があった。そこで本研究では、ワクチンの品質管理としてワクチンの安定性に関する管理基準を作成するための知見を収集することを目的として、X-179A 株で製造された日本の参照ワクチンや他のワクチン製造株で作製したワクチンの力価の経時安定性を調べた。また、ワクチンに含有される主要有効成分である HA 蛋白のアミノ酸変異と安定性の関係についても解析を行い、ワクチンの安定性がウイルス株によっては HA 蛋白のアミノ酸変異によって大きく影響を受け、インフルエンザワクチンの品質管理としてワクチンの抗原性の保持以外に、ワクチンの安定性の観点からもワクチン製造株の変異は重要な品質管理項目であることを明らかにした。

A. 研究目的

2009 年に出現したインフルエンザウイルス A/H1N1pdm09 は、従来の A/H1N1 ウイルスとは抗原的に大きく異なるため、急速に世界中に広がった。その対策として、A/H1N1pdm09 (推奨株: A/California/7/2009) のみの一価ワクチンが製造された。ところが、カナダや豪州において、ワクチン製造株 A/California/7/2009(X-179A) 由来のワクチン力価について保存期間中に想定以上の低下が見られたためワクチンの有効期限を短くしたとの報告があった。

そこで本研究では、ワクチンの品質管理としてワクチンの安定性に関する管理基準を作成するための知見を収集することを目的として、日本で製造した X-179A の参照ワクチンについて、冷蔵保管中(有効期限1年間)の力価の経時変化を調べた。また、ワクチンの安定性とワクチンの主要防御抗原である HA 蛋白の変異との関連性を調べるため、参照ワクチンに含有される HA 蛋白の変異について HA 遺伝子配列を解析して調べた。さらに異なるワクチンウ

イルスに由来するワクチンで安定性に違いがあるのか調べるために、別の3つのワクチン製造株 (IVR-148、X-181、X-187) について、経時安定性加速試験として加熱試験(50°C)を実施し、安定性を比較した。なお、ワクチン剤型の影響も考慮して、各ワクチン製造株について、精製ウイルス(whole)、split、精製 HA の各剤型を調製して検討した。

B. 研究方法

1. 材料

(1) 参照ワクチン

- 1価参照ワクチン(Lot. 2010Apdm, 2010Bpdm)
: A/California/7/2009(X-179A) (H1N1)pdm09
- 3価参照ワクチン(Lot. 2010A, 2010B)
: A/California/7/2009(X-179A) (H1N1)pdm09、
A/Victoria/210/2009 (X-187) (H3N2)、
B/Brisbane/60/2008

(2) ワクチン製造株

- A/California/7/2009(X-179A) (H1N1)pdm09、
- A/California/7/2009(X-181) (H1N1)pdm09

- ・ A/Brisbane/59/2007 (IVR-148) (H1N1) 、
- ・ A/Victoria/210/2009 (X-187) (H3N2)

発育鶏卵で増殖させた各株を、精製ウイルス、split、精製 HA に調製して用いた。

2. 方法

(1) 冷蔵保管中の力価の経時安定性

4℃保管された参照ワクチンについて、1ヶ月、5ヶ月、9ヶ月、12ヶ月のSRD力価を経時的に測定した。

(2) ワクチンのH1pdmHA遺伝子解析

各参照ワクチンからウイルス RNA を抽出し、RT-PCR法を用いてH1pdmHA遺伝子の全長を増幅させた。このPCR産物を鋳型としてシークエンス解析を行い、塩基配列を決定した。この遺伝子配列からHA蛋白のアミノ酸配列を推定した。

(3) 加熱試験

各ウイルス製造株を50℃で所定時間加熱し、SRD力価とHA価(0.5%TRBC)を測定した。

C. 研究結果

1. 参照ワクチン力価の経時安定性

1価の参照ワクチン(H1N1pdm09)は2ロットともに、4℃1年後でも、90%以上のSRD力価が維持されており、顕著な力価低下は見られなかった。また、3価の参照ワクチンについてもH1、H3、Bそれぞれ90%以上のSRD力価が維持されており、顕著な力価低下は見られなかった。

2. 参照ワクチンの遺伝子解析

1価参照ワクチン(Lot. 2010Apdm、2010Bpdm)、3価参照ワクチン(Lot. 2010A、2010B)それぞれのH1pdmHA遺伝子を調べたところ、A/California/7/2009(X-179A)株由来の参照ワクチンの全てのロットで、アミノ酸配列N129D変異が見られた。これはA/California/7/2009(X-181)株と相同な配列である。

そこで、ワクチン製造株X-179A株、IVR-148株、X-187株の他にX-181株についても、精製ウイルス、

split、精製HAを調製して経時安定性の加速試験となる50℃加熱試験を行い、安定性を評価した。なお、調製したX-179A株のHA蛋白にN129D変異は認められないことは確認した。

3. ワクチン製造株の50℃加熱試験

まず、精製ウイルス(whole状態)のX-179A株、X-181株、IVR-148株、X-187株について、50℃加熱試験をしてHA価を測定したところ、X-179AのHA活性は減少した。X-181のHA活性も減少するが、X179Aより緩やかであり、IVR-148(H1N1)とX-187(H3N2)のHA活性は高い安定性を示した。SRD力価も同様の傾向を示した。

次に、split状態のX-179A株、X-181株、IVR-148株についても同様に、50℃加熱試験をしてHA価を測定したところ、X-179AのHA活性は減少し、その減少率は精製ウイルス状態の時より大きかった。X-181のHA活性も減少するが、X179Aより緩やかであり、IVR-148(H1N1)のHA活性は高い安定性を示した。SRD力価も同様の傾向を示した。

精製HA状態のX-179A株、X-181株、IVR-148株についても同様に、50℃加熱試験をしてHA価を測定したところ、X-179AのHA活性は大きく減少し、その減少率はスプリット状態の時より大きかった。X-181のHA活性も減少するが、X179Aより緩やかであり、IVR-148(H1N1)のHA活性は高い安定性を示した。

D. 考察

ワクチン製造株間での50℃加熱安定性を比較すると、H1N1pdm09の2株(X-179AとX-181)は、H1N1(IVR-148)株やH3N2(X-187)株に比べて、whole、split、精製HAのどの状態でも加熱安定性が低かった。但し、X-181の方がX-179A株に比べて安定であった。安定性の違いは、whole virusよりもsplitや精製HAで明確にあらわれており、安定性に高次構造が関わると示唆された。

一方で、X-179A株で製造された日本の参照ワクチンは、4℃1年間保存において、著しい力価の低

下は見られなかった。X-179A 株で製造された日本の参照ワクチンの HA 蛋白の変異の有無を調べたところ、X-181 株と同じアミノ酸配列である N129D 変異が起こっていたことから、この変異がワクチンの安定性の向上に寄与していると考えられる。

ワクチンの安定性がウイルス株によっては HA 蛋白のアミノ酸変異によって大きく影響を受けることから、ワクチンの品質管理としてワクチン製造株の変異は重要な管理項目である。

E. 結論

ワクチンの安定性がウイルス株によっては HA 蛋白のアミノ酸変異によって大きく影響を受けることから、インフルエンザワクチンの品質管理としてワクチンの抗原性の保持以外に、ワクチンの安定性の観点からもワクチン製造株の変異は重要な品質管理項目である。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Noriko SHIMASAKI, Hitoshi TAKAHASHI, Shigeyuki ITAMURA, Masato TASHIRO, Comparison of antigenic stability of influenza viruses and vaccines among different vaccine viruses. XV International Congress of Virology, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, September 2011.

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

剤型の異なる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・形状の管理はワクチンの効果と副反応に関連する生体応答をコントロールする上で重要と考えられる。本年度はこれらのワクチン製剤の抗体応答を、初回免疫のみの場合と追加免疫を実施した場合でどのように変化するか検討したところ、全粒子ワクチンでは初回免疫の場合の抗体価は高いものの、追加免疫後の抗体価はスプリットワクチンの方が高くなることがわかった。このようにして得られた知見はワクチンの品質管理を行う上で、よりワクチンの効果や副反応に関連する特性を明らかにするのに役立つことが期待される。

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ワクチンとウイルス粒子をさらにエーテルで処理し脂質膜を除去し部分的に HA 成分を精製したスプリットワクチンの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免疫原性が高いことが知られており、ワクチンの性状、形状の管理はワクチンの品質管理項目として重要と考えられる。しかしながら、昨年度 H1N1pdm09 に対するワクチンを用いて抗体産生誘導能を評価したところ、2回接種においてはスプリットワクチンの方が全粒子ワクチンよりも強い効果を示す結果が出たため、本年度は初回免疫と追加免疫による抗体産生誘導能への影響の違い及び株特異性の有無について評価した。

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4週間の間隔をあけて計2回各 10ug/mouse の用量で皮下接種した。最終免疫の2週間後血清を採取し、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ELISA法にて測定した。同様に血清中に含まれる HI 抗体価、中

和抗体価をそれぞれ測定した。また初回免疫と追加免疫による抗体産生能の違いを確認するため、初回免疫後4週間で血清を採取し、同様の評価を行った。

さらに、株特異性について検討するため同様の評価を、PR8 株を用いて実施した。

C. 研究結果

初回免疫時及び追加免疫時において誘導される抗体価の解析

全粒子ワクチンおよびスプリットワクチン (A/H1N1pdm09、X-179A) を初回免疫のみまたは追加免疫後に、血清中のワクチン特異的抗体価、HI 抗体価、中和抗体価を測定した。初回免疫後のワクチン特異的抗体価、HI 抗体価、中和抗体価は全粒子ワクチン接種の場合の方が高い値を示した。一方、追加免疫の後には昨年度報告の通りスプリットワクチン接種の方がワクチン特異的抗体価は高いことが確認され、HI 抗体価、中和抗体価に対しても、スプリットワクチンは同等以上の効果を示すことが分かった (表1)。

同様の検討を、PR8 株を用いて作製した全粒子ワクチン、スプリットワクチンを用いて検討したところ、表2に示すように X-179A 接種の結果と同様、初回免疫時には全粒子ワクチンの方が高い抗体産

生誘導能を示したが、追加免疫を実施するとスプリットワクチンを接種した方がワクチン特異的抗体価は高く、HI 抗体価、中和抗体価に対しても同等以上の効果であった。

D. 考察

初回免疫と追加免疫では全粒子ワクチンとスプリットワクチンで抗体産生誘導に違いがあることが分かった。今後、全粒子ワクチンとスプリットワクチンにより誘導される抗体産生の仕組みを、抗原提示から最終的な抗体産生にいたる過程について解析を行うことによって、ワクチンの性状、形状の違いが、どの過程で抗体産生に影響を与えているのか解明する予定である。このようにして得られた知見はワクチンの品質管理を行う上で、よりワクチンの効果や副反応に関連する特性を明らかにするのに役立つことが期待される。

E. 結論

全粒子ワクチンは、初回免疫時にはスプリットワクチンよりも高い抗体産生誘導能を持つが、追加免疫による増強効果はスプリットワクチンのほうが強かった。得られた知見は、剤型の異なるワクチンの品質管理を行う上で基礎となる情報を提供する。

F. 研究発表

1. 論文発表

Sato K, Iwai A, Nakayama Y, Morimoto J, Takada A, Maruyama M, Kida H, Uede T, Miyazaki T. Osteopontin is critical to determine symptom severity of influenza through the regulation of NK cell population. *Biochem Biophys Res Commun.* 417(1):274-9, 2012.

Morimoto J, Sato K, Nakayama Y, Kimura C, Kajino K, Matsui Y, Miyazaki T, Uede T. Osteopontin modulates the generation of memory CD8+ T cells during influenza virus infection. *J Immunol.* 187(11):5671-83, 2011.

2. 学会発表

Kayoko Sato, Atsushi Iwai, Yosuke Nakayama, Junko Morimoto, Ayato Takada, Hiroshi Kida, Toshimitsu Uede, and Tadaaki Miyazaki. Distinct involvement of osteopontin in the infection of different types of influenza

viruses

第10回オステオポンチン研究会 (2011年6月、札幌)

Kayoko Sato, Hideki Asanuma, Michiyuki Kasai, Shigeyuki Itamura, Masato Tashiro. Evaluation of the incorporation of influenza vaccines by antigen presenting cells. International Conference of Mucosal Immunology, Paris, France, July 2011

Kayoko Sato, Hideki Asanuma, Michiyo Kataoka, Noriyo Nagata, Masato Tashiro, Shigeyuki Itamura. Morphological characterization of A/H1N1pdm09 viruses isolated in egg from clinical specimens. 8th International Congress of Virology, Sapporo, September 2011 (第59回日本ウイルス学会学術集会併催)

Kayoko Sato, Michiyuki Kasai. Trafficking and delivery of influenza vaccines by antigen presenting cells. 第41回日本免疫学会学術集会(2011年11月、幕張)

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

なし