

- 2) Sasaki I, Hoshino K, Sugiyama T, Yamazaki C, Yano T, Iizuka A, Hemmi H, Tanaka T, Saito M, Sugiyama M, Fukuda Y, Ohta T, Sato K, Aina A, Suzuki T, Hasegawa H, Toyama-Sorimachi N, Kohara H, Nagasawa T, Kaisho T. Spi-B is critical for plasmacytoid dendritic cell function and development. *Blood*. 2012 Oct 11. [Epub ahead of print]
- 3) van Riet E, Aina A, Suzuki T, Hasegawa H. Mucosal IgA responses in influenza virus infections; thoughts for vaccine design. *Vaccine*. 2012 Aug 31;30(40):5893-900. Epub 2012 Jul 24.
- 4) Yanagita H, Yamamoto N, Fuji H, Liu X, Ogata M, Yokota M, Takaku H, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Hoshino T. Mechanism of Drug Resistance of Hemagglutinin of Influenza Virus and Potent Scaffolds Inhibiting Its Function. *ACS Chem Biol*. 2012 Jan 13.
- 5) Aina A, Tamura S, Suzuki T, Ito R, Asanuma H, Tanimoto T, Gomi Y, Manabe S, Ishikawa T, Okuno Y, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Kurata T, Hasegawa H. Characterization of neutralizing antibodies in adults after intranasal vaccination with an inactivated influenza vaccine. *J Med Virol*. 2012 Feb;84(2):336-44.
2. 学会発表
- 1) 長谷川秀樹: 次世代ワクチンとしての経鼻インフルエンザワクチン。第 60 回日本ウイルス学会学術集会(大阪)2012 年 11 月
- 2) 山本典生、浅沼秀樹、佐藤佳代子、中内美奈、高橋仁、許斐奈美、相内章、長谷川秀樹、田代真人: 細胞培養もしくは鶏卵で製造されたインフルエンザワクチンの品質管理試験および免疫応答への影響。第 60 回日本ウイルス学会学術集会(大阪)2012 年 11 月
- 3) 川口晶、鈴木忠樹、相内章、佐藤由子、信澤枝里、田代真人、長谷川秀樹: 喘息発作誘発モデルを用いたインフルエンザウイルス感染症の病態解析。第 60 回日本ウイルス学会学術集会(大阪)2012 年 11 月
- 4) 池田千将、伊藤良、相内章、鈴木忠樹、田村慎一、田代真人、浅沼秀樹、長谷川秀樹: 基礎免疫を有する個体に対する経鼻投与型インフルエンザワクチン効果。第 60 回日本ウイルス学会学術集会(大阪)2012 年 11 月
- 5) 泉地恭輔、相内章、鈴木忠樹、浅沼秀樹、長谷川秀樹: 経鼻投与型インフルエンザワクチンによるマウス母子免疫の解析。第 60 回日本ウイルス学会学術集会(大阪)2012 年 11 月
- 6) 鈴木忠樹、川口晶、相内章、田村慎一、伊藤良、小田切孝人、田代真人、長谷川秀樹: インフルエンザワクチン経鼻接種により鼻腔内に誘導される分泌型 IgA 抗体の性状解析。第 16 回日本ワクチン学会学術総会(横浜)2012 年 11 月
- 7) 相内章、池田千将、伊藤良、鈴木忠樹、泉地恭輔、田村慎一、田代真人、浅沼秀樹、長谷川秀樹: 感染あるいはワクチン接種歴が経鼻投与型インフルエンザワクチンにより誘導される抗体応答に対して与える影響。第 16 回日本ワクチン学会学術総会(横浜)2012 年 11 月
- 8) Elly van Riet, Aina A, Ito R, Senchi K, Suzuki T, Tamura S-I, Tashiro M, Hasegawa H: Characteristics of IgA versus IgG human

monoclonal antibodies cloned from human plasma cells induced upon intranasal H5N1 vaccination. 第 16 回日本ワクチン学会学術総会(横浜)2012 年 11 月

- 9) Hasegawa H, Ainai A, Suzuki T, Tamura S-I, Tashiro M, Kurata T: Analysis of protective immune responses after intranasal administration of an inactivated whole-virion influenza vaccine in human. 第 16 回日本ワクチン学会学術総会(横浜)2012 年 11 月
- 10) 浅沼秀樹、相内章、佐藤佳代子、許斐奈美、岸田典子、長谷川秀樹、山本典生、田代真人: 野外株より細胞培養インフルエンザワクチンの種候補株を選定する基準の検討。第 16 回日本ワクチン学会学術総会(横浜)2012 年 11 月
- 11) 山崎達也、二宮大輔、長島麻里亜、荒井由佳、手嶋保智、長谷川秀樹、相内章、藤本陽、千葉丈: インフルエンザ中和抗体発現プラスミドを用いた受動免疫法の応用研究～長期的なウイルス防御効果と免疫不全マウスへのウイルス防御効果の検討～第 16 回日本ワクチン学会学術総会(横浜)2012 年 11 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得(出願)
2. 実用新案登録
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 24 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

研究分担者：信澤枝里（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）

研究協力者：中内美名（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・主任研究官）

高橋宜聖（国立感染症研究所免疫部・室長）

西村秀一（国立病院機構仙台医療センター・室長）

松崎葉子（山形大学医学部・准教授）

菅原勘悦（山形大学医学部・技官）

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、昨年度までに血清抗体が認識する新型 HA の抗原領域の概略を同定した 40 血清を用いて、エピトープ構造の詳細を解析した。手法としては、新型 HA の各抗原領域を有するキメラ 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、エピトープが含まれる抗原領域を同定した。その結果、調べた血清の約 70% が Ca2 あるいは Sa+Sb 領域に結合し、また約 50% の血清は複数の抗原領域に結合することが判明した。さらに、新型 HA に対するモノクローナル抗体エスケープ変異株 19 株に対する反応性を検討した結果、147 位、158 位、159 位の変異の影響を受ける血清が約 50% 同定された。一方、158 位の変異は流行株でも検出されており、上記 50% のヒト血清はこの株に対しても反応性が低下していた。

A. 研究目的

2009 年 4 月以降、ブタウイルスに由来すると考えられる 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、2009

年以前の旧 H1N1 季節性インフルエンザウイルスとは抗原性が異なるため、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、昨年度に解析した血清抗体のエピトープ構造の詳細を明らかにするため、新型 HA の各抗原領域を有するキメラ HA と 19 株のモノクローナル抗体エスケープ変異株を用いた HI 試験を行った。

B. 研究方法

1. ヒト血清

2009/10 シーズン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 40 人のペア血清を用いた。

2. キメラ HA の構築

新型 HA として A/Narita/1/2009 (NRT) 株の HA を用いて、昨年までと同様 WSN 株との間でキメラ HA を作製した。昨年までに作製した、複数の抗原領域を有するキメラの他、WSNHA を母体とし、Sa, Sb, Ca1, Ca2 および Sa+Sb のみが NRT 由来の計 9 種のキメラ HA を作製した。各 HA は 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

A/Narita/1/2009 株に対するモノクローナ

ル抗体エスケープ変異株のうち Sa, Sb, Ca2 領域それぞれに 1 アミノ酸変異を有する 19 株および国内の流行株 (山形衛研、水田克巳先生よりご分与戴いた) を用いてヒト血清との HI 試験を行った。

(倫理面への配慮)

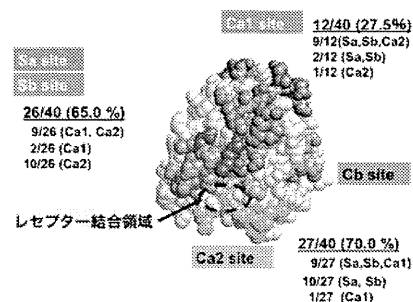
全ての実験は国立感染症研究所村山庁舎高度安全実験施設において、国立感染症研究所病原体等安全管理規程に従い実施した。ヒト試料を用いた実験は、ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

(1) キメラ HA との結合実験

ワクチン接種後のみで、NRT 株の HA1 領域に特異的に結合する 40 血清が結合する抗原領域の詳細を調べた。その結果、約 7 割の血清が、Sa+Sb 領域あるいは Ca2 領域に結合し、約 3 割が Ca1 領域を認識した。また、このうち複数の抗原領域に結合する血清が約 5 割同定された。

NRT HA 抗原領域への post 血清の結合分布



(2) エスケープ変異株及び流行株に対する HI 試験

エスケープ変異株のうち、1 アミノ酸変異が Sa 領域 (5 株、Sa と Sb 領域が重なっている Sa+Sb 領域 (3 株)、Sb 領域 (3 株)、Ca2 領域 (7 株)、147 位にそれぞれ同定された計 19 株を用いて、(1) で結合領域を同定した 40 血清それぞれと HI 試験を行い、各血清抗体の結合部位の推定を行った。その

結果、変異の影響を全く受けないグループと影響を受けるグループに分かれ、さらに後者は(i) Sa, Sb, Ca2 領域全ての変異の影響を受ける(ii) 特定の抗原領域の変異の影響を受ける(iii) 147 位の変異の影響を受けるの3グループに分かれた。

次に2010年、2011年に分離された野外分離株に対して各血清でHI試験を行った結果、エスケープ変異株に対する各血清の反応性を反映する結果だった。すなわち、分離株に生じている変異がエスケープ変異株と同じ部位の場合、反応性が低下した血清は、エスケープ変異株の場合と一致した。2011年に分離され158位に変異がある山形株との反応性は、158位に1アミノ酸変異を有するエスケープ変異株との反応性が低下したほとんどの血清で、低下していた。

エスケープ変異株で生じたアミノ酸変異のうち、調べた血清との反応性に及ぼす影響の大きさを調べた。血清のHI価を親株であるNRTと比較して8倍以上低下させる変異のうち、約5割の血清に影響を及ぼしたのは、147, 158, 159位の変異であった。

D. 考察

昨年度までに作製したキメラHAは、生物学的活性が維持されていたため、WSNでは欠失し、新型HAでは挿入されている147位のアミノ酸を考慮しなかった。しかし、本年度はキメラHAのWSN株配列部位に147位を導入した。昨年度の結果の一部で血清の結合実験結果と、HI試験結果とで齟齬が生じていた血清で、矛盾点が解消した。このことは、新型HAの147位のアミノ酸が抗原構造維持に果たす役割が大きいこと示す。

インフルエンザウイルスの抗原変異はヒト血清による変異株の選択が原因であると考えられているが、本研究の結果、pdmウイルス流行株に生じた変異が、前のシーズンのワクチン接種者の血清抗体により中和

されず、選択されて生じた可能性を示したことになる。

近年の旧H1HAでは欠失し、新型HAで再度挿入された147位が、Sa, Sb領域の残基とともに新型HA特異的なエピトープを形成していることをマウスモノクローナル抗体エスケープ変異株の解析から分担者の松崎らが示したが、ヒト抗体でも同一領域がエピトープを形成している可能性が示唆された。このようにヒト血清抗体が認識するエピトープ構成アミノ酸残基が明らかになると、その部位の変異しやすさを予測することで、抗原変異の予測が可能になる。また、本研究のように各残基を認識するヒト血清の割合を調べることができれば、その部位の変異による流行規模の大きさの推定も可能になる。

E. 結論

新型ワクチン接種者の血清中の中和抗体は、複数の抗原領域に結合すること、約5割の血清は、147, 158, 159位のアミノ酸変異の影響を受けることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Shirakura M, Kawaguchi A, Tashiro M, and Nobusawa E. Composition of hemagglutinin and neuraminidase affects the antigen yield of influenza A(H1N1)pdm09 candidate vaccine viruses. *JJID*. 66(2013) pp. 65-68.
2. Uchida Y, Suzuki Y, Shirakura M, Kawaguchi A, Nobusawa E, Tanikawa T, Hikono H, Takemae N, Mase M, Kanehira K, Hayashi T, Tagawa Y, Tashiro M, Saito T. Genetics and infectivity of H5N1 highly

pathogenic avian influenza viruses isolated from chickens and wild birds in Japan during 2010–11. *Virus Res.* 170 (2012) pp. 109–117.

3. 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.* 56 (2012) pp. 99–106

2. 学会発表

1. 信澤枝里、中内美名、松寄葉子、菅原勘悦、有田知子、廣津伸夫、田代真人、西村秀一：A/H1N1pdm09 ワクチン被接種者血清抗体が認識する HA 上の抗原領域の解析。第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月
2. 松寄葉子、菅原勘悦、下平義隆、本郷誠治、信澤枝里：パンデミックインフルエンザ A/H1N1pdm09 の HA 分子の抗原構造の解析。第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月
3. 嶋崎典子、白倉雅之、信澤枝里、矢野茂生、板村繁之、田代真人：インフルエンザワクチン製造株のアミノ酸変異による抗原蛋白経時安定性への影響。第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月
4. 川口晶、鈴木忠樹、相内章、佐藤由子、信澤枝里、田代真人、長谷川秀樹：喘息発作誘発モデルを用いたイ

ンフルエンザウイルス感染症の病態解析。第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月

5. 有田知子、白倉雅之、信澤枝里、田代真人：H5N1 インフルエンザワクチン種株候補の抗原収量の検討。第 16 回日本ワクチン学会学術集会、横浜、2012 年 11 月

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 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。昨年度に引き続きブラッククローニングした A/Narita/1/2009 株を A/Narita/1/2009 株 HA に対する 16 種類のマウス単クローン抗体存在下で培養し、各抗体に対するエスケープ変異株を新たに計 320 株分離した。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/1/2009HA の中和抗体を産生する抗原領域が新たに 1 つみつき、全部で 4 つあることが明らかになった。アミノ酸置換部位の解析から、3 つは H1HA の既知の抗原領域である Sa、Sb、Ca2 領域に相当し、新型 H1HA では Sa と Sb 領域が重なり合っていることが明らかになった。また、旧 H1N1 で 1997 年以降に欠失したアミノ酸残基が新型 H1HA の新たな中和エピトープになっ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（旧 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。旧 H1HA 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ことを目的とした。

B. 研究方法

1. 親ウイルスの作成

本年度は、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て分離した親ウイルス 5 株（P1、P2、P3、P4、P7）のうち、P4 と P7 を実験に用いた。

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 種類のマウス単クローン抗体を、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分離し、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 16 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

本年度は P4 と P7 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 320 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、昨年度までに P1、P2、P3 を親株にして得られたエスケープ変異株とは異なる置換をもつエスケープ変異株を 13 株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

昨年度に引き続き今年度は、P2 と P3 を親株とする 31 種類のエスケープ変異株と 16 種類の単クローン抗体と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、新たなエピトープの存在が示唆され、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 4 つ存在し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(図1)

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旧 H1HA 蛋白の 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 4 つの抗原領域のうちの 3 つは 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(図1の紫の部分)。

さらに、31 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 アミノ酸のうちの 9 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 アミノ酸のうちの 5 カ所に変異を認めた (図 1 黄緑の部分)。

4) 旧 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 4 カ所みつかった。このうち旧

H1HA では欠失している 147 位のアミノ酸に変異を持つ変異株の解析から、147 位が新型 H1HA の新たなエピトープになっている可能性が示唆された (図 1 オレンジの部分)。

147 位を認識する単クローン抗体からは、147 位以外にも近傍の Sa 領域と Sb 領域にそれぞれ 1 アミノ酸変異を持つエスケープ変異株を生じていた。さらに HI 試験の結果、この単クローン抗体は Ca2 領域の 159 位のアミノ酸に変異をもつエスケープ変異株との反応性が低下していた。したがって、147 位を中心に近傍の Sa、Sb、Ca2 領域を含む領域が新型 H1HA の特異的な中和エピトープになっている可能性が示唆された。

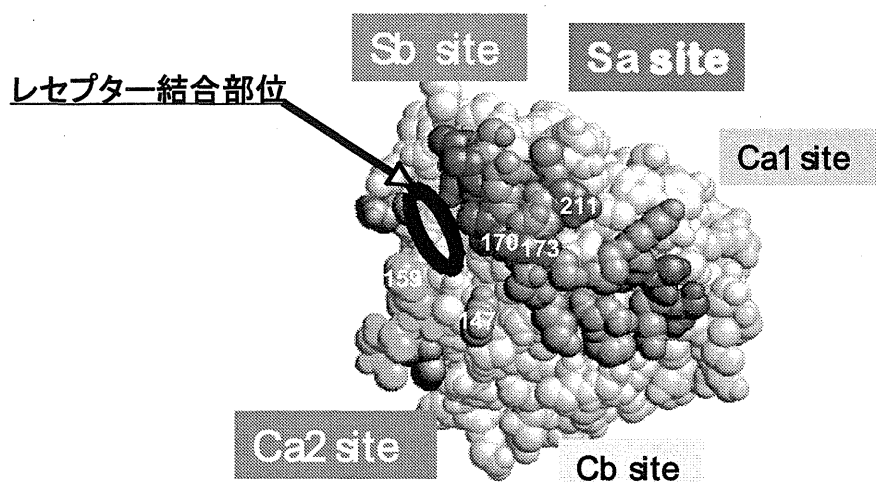


図1 A/Narita/1/2009 の抗原領域 (HA を上から見た図)

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
紫は Sa と Sb 領域が重なり合っているアミノ酸を表す

4. 旧 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旧
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 31

種類のアミノ酸置換のうち 80%は旧 H1HA にみられた変異とは異なるものであり、同じ変異は 8 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 4 つあることを明らかにした。4 つのうち 3 つは、旧 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、旧 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、旧 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 8 種類あった。このうち Sa 領域の 177 番目に糖鎖が付加された変異株について各抗体との反応性が失われるかを解析したところ、Sa 領域の 11 種類の抗体のうちの 4 種類と反応性が低下するのみであった。糖鎖付加によって、より多くの中和抗体との反応性を逃れる仕組みはみられなかった。

新型 H1HA 分子の 4 つの抗原領域のうちの残りの 1 つは、147 位のアミノ酸がつくる中和エピトープである。147 位を認識する単クローン抗体は近傍の Sa、Sb、Ca2 領域のアミノ酸とも反応することから、この領域が新たな抗原領域になっていることが示唆される。147 位は 1977 年の H1N1 の再出現時にはあったが、1997 年以降の旧 H1HA では欠失している。このアミノ酸の今後の変異が注目される。

E. 結論

本研究により新型インフルエンザの H1HA 蛋白は、旧 H1HA とほぼ同じ領域が抗原領域になっていることが明らかになった。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ため、新型 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。

解析. 第 60 回日本ウイルス学会, 大阪;2012 年 11 月

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsuzaki Y, Ikeda T, Abiko C, Aoki Y, Mizuta K, Shimotai Y, Sugawara K, Hongo S: Detection and quantification of influenza C virus in pediatric respiratory specimens by real-time PCR and comparison with infectious viral counts. J Clin Virol. 54(2): 130-134, 2012.
2. Takashita E, Muraki Y, Sugawara K, Asao H, Nishimura H, Suzuki K, Tsuji T, Hongo S, Ohara Y, Kawaoka Y, Ozawa M, Matsuzaki Y. Intrinsic temperature sensitivity of influenza C virus hemagglutinin-esterase-fusion protein. J Virol. 86(23):13108-11, 2012.

2. 学会発表

1. 松寄葉子, 菅原勘悦, 下平義隆, 本郷誠治, 信澤枝里: パンデミックインフルエンザ A/H1N1pdm09 の HA 分子の抗原構造の解析. 第 60 回日本ウイルス学会, 大阪;2012 年 11 月
2. 中内美名, 松寄葉子, 菅原勘悦, 廣津伸夫, 西村秀一, 田代真人, 信澤枝里: A/H1N1pdm09 ワクチン被接種者血清抗体が認識する HA 上の抗原領域の

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきものなし

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) |
| | 信澤 枝里 | (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) |
| | 西村 秀一 | (仙台医療センターウイルスセンター長) |
| | 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のエピトープ構造を解析するため、昨年度に引き続きワクチン接種者の末梢血からウイルス結合性モノクローナル抗体の作製を試みた。ワクチン接種一週間後の末梢血からプラズマ細胞を分離し、抗体遺伝子のクローニング/抗体タンパクの発現を行ったところ、新たに7種類のウイルス結合性モノクローナル抗体を作製することができた。興味深いことに、得られたモノクローナル抗体の中には、複数のウイルス株に交差結合するものが高頻度（7分の4）で含まれていた。このことから、新型インフルエンザワクチンが従来の季節性ワクチンと比較して、ユニークなエピトープ構造を認識する抗体をより高頻度で惹起する可能性が示唆された。

A. 研究目的

H1N1pdm インフルエンザワクチン接種により活性化されたウイルス結合性 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プラズマ細胞の同定と分離

ヒト末梢血単核球を抗 CD38 FITC 抗体、抗 CD19 Pacific Blue 抗体、抗 CD27 APC 抗体、Propidium iodide、抗 CD20 AlexaFluor700 抗体で染色し、プラズマ細胞 (CD19⁺CD27⁺CD38⁺CD20⁻) を同定・

分離した。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

クローニングした抗体 V_H/V_L 発現ベクターを HEK293 細胞株に形質転換し、5 日間培養した後、上清中に産生された抗体のウイルス結合性を 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

(1) 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 1)。

(2) 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、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グし、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ウイルス結合性を ELISA により検証したところ、新たに 7 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 2)。さらに興味深いことに、得られた 7 種類 (No.10-16) のうち 4 種類のモノクローナル抗体は、複数のウイルス株に交差結合することが明らかとなった (図 2)。

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や新型インフルエンザワクチンが惹起するヒト抗体の特性が明らかにされつつある。本研究では、日本で使用されている三種混合ワクチン接種後に誘導される抗 H1N1 ウイルス抗体のエピトープ構造の解析を目標として、H1N1 インフルエンザウイルス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、今回得られた交差結合性のモノクローナル抗体を用い、ウイルス中和や交差結合性に関わるエピトープ構造の詳細な解析を進める予定である。さらに、将来的に H1N1 ウイルスが流行した場合には、ウイルス罹患者で誘導される抗体についても同様な解析を行い、ワクチン接種者と罹患者でのエピトープ構造の相違を明らかにしていきたいと考えている。

E. 結論

プラズマ細胞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、得られた抗体のいくつかが交差結合性を示すことを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yanagibashi, T., A. Hosono, A. Oyama, M. Tsuda, A. Suzuki, S. Hachimura, Y. Takahashi, Y. Morose, K. Itoh, K. Hirayama, K. Takahashi, and S. Kaminogawa. 2012. IgA production in the large intestine is modulated by a different mechanism than in the small intestine: *Bacteroides acidifaciens* promotes IgA production in the large intestine by inducing germinal center formation and increasing the number of IgA⁺ B cells. Immunobiology Aug 8, Epub ahead of print
- 2) Kaji, T., A. Ishige, M. Hikida, J. Taka, A. Hijikata, M. Kubo, T. Nagashima, Y. Takahashi, T. Kurosaki, M. Okada, O. Ohara, K. Rajewsky, and T. Takemori. 2012. Distinct cellular pathways select germ-line encoded and somatically mutated antibodies into immunological memory. J. Exp. Med., 209: 2079-2097.
- 3) Onodera, T., Y. Takahashi, Y. Yokoi, M. Ato, Y. Kodama, S. Hachimura, T. Kurosaki, and K. Kobayashi. 2012. Memory B cells in the lung participate in protective humoral immune responses to pulmonary influenza virus reinfection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 109: 2485-2490
- 4) Ohnishi, K., Y. Takahashi, N. Kono, N. Nakajima, F. Mizukoshi, S. Misawa, T. Yamamoto, Y. Mitsuki, S. Fu, N. Hirayama, M. Ohshima, M. Ato, T. Kageyama, T. Odagiri, M.

Tashiro, K. Kobayashi, S. Itamura, Y. Tsunetsugu-Yokota. 2012. Newly established monoclonal antibodies for immunological detection of H5N1 influenza virus. Jpn. J. Infect. Dis., 65: 19-27.

- 5) Yuki, N., Y. Takahashi, T. Ihara, S. Ito, T. Nakajima, K. Funakoshi, K. Furukawa, K. Kobayashi, and M. Odaka. 2012. Lack of antibody response to Guillain-Barre syndrome-related gangliosides in mice and men after novel influenza vaccination. J. Neurol, Neurosurg. & Psychiatry 83: 116-117.
- 6) 小野寺大志 小林和夫 高橋宜聖 臨床免疫・アレルギー科 (科学評論社) B細胞内因性TLRシグナルによるB細胞応答の制御機構、58、275-282、2012

2. 学会発表

- 1) Takahashi, Y., T. Onodera, M. Tsuiji, and K. Kobayashi. 2012. Increased affinity maturation in lung memory B cells following influenza virus infection. 第41回日本免疫学会 (神戸、12月)
- 2) Onodera, T., T. Kurosaki, K. Kobayashi, and Y. Takahashi. 2012. B-cell intrinsic Toll-like receptor signaling accelerates memory B cell response to booster influenza vaccination. 第41回日本免疫学会 (神戸、12月)
- 3) Sato, K., Y. Takahashi, M. Ato, and H. Asanuma. 2012. Split-virion influenza vaccines induce high levels of virus-specific antibodies upon responses to a booster immunization. 第41回日本免疫学会 (神戸、12月)

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プラズマ細胞の検出

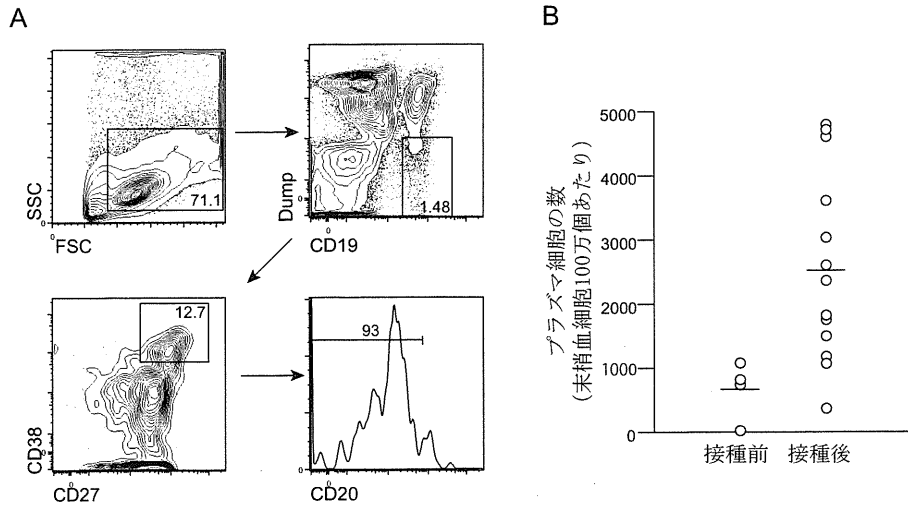
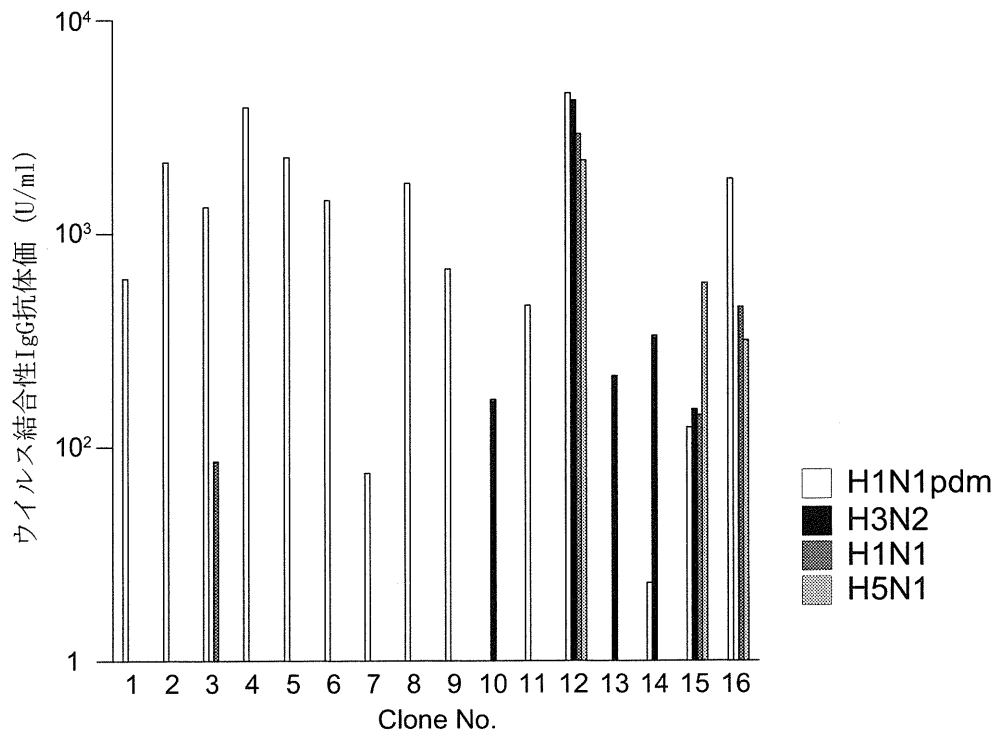


図2 作製したモノクローナル抗体のウイルス結合性



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 24 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

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～2010 年にかけての A(H1N1)Pdm09 インフルエンザワクチン接種あるいは同インフルエンザ患者のうち HI 抗体無/低反応者ペア血清検体について、中和抗体の測定を試みた。その結果、後者では HI 抗体が上がらなくとも中和抗体の上昇傾向が見られたが、ワクチン接種者では上昇は皆無あるいはほとんどなかった。

上記の H1pdm ワクチン HI 抗体高反応群 47 例と無/低反応群 28 例について、2010/11 シーズンの季節性 H3 ワクチンに対する反応性を調べた。その結果、高反応群は H3 に対し 1 例を除きすべて 1:40 以上を獲得していた一方、低反応群では 1:40 以上獲得者は約 3 割のみであった。

A(H1N1)Pdm09 ワクチン接種歴を有する B 型肝炎ウイルス S 抗原陰性の新人医療従事者 67 名の 2 回目の B 型肝炎ワクチン接種後の抗体反応性を調べた結果、2 つの不活化ワクチン間で反応性が相関する集団 15 例としない集団 50 例にきれいに分かれ、双方に対する無/低反応例が 8 例確認され、無/低反応者は B 型肝炎ワクチンに対しても抗体反応が低い傾向が見られた。

A. 研究目的

昨年度は、2009 年の新型インフルエンザワクチン 1 回接種で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 割にのぼり、さらにその 3 割がその後同ワクチンの再接種でも有効な抗体価を獲得していなかったことを報告した。本年度は、そうした無/応答者について、他の方法による抗体測定、特徴的な因子の有無の検討、他の不活化ワクチンへの反応性との相関性の有無をさらに検討した。

B. 研究方法

今年度における本研究は、大きく次の 3 つで構成された。

1) 新たな血清検体の収集と保存による血清ライブラリーの作成

2) A(H1N1)Pdm09 ウイルスワクチン被接種者ならびに同ウイルス感染者に対する無/低反応者の中和抗体価と CF 抗体価測定

昨年度までは 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、HI 試験無/低反応者を特定したが、今年度は、それらの中和抗体価と CF 抗体価を測定した。

また、自然感染者についてもこれまで抗体価が上がりにくい人も存在することを明らかにしてきたが、それらについても同様に中和ならびに CF 抗体価を測定した。

3) 2009-10 シーズンA(H1N1)Pdm09 ワクチンに対するHI抗体の反応性と他の不活化ワクチンに対する反応性の相関性の有無の解析

前年度は大学生を対象に、2009-10 シーズンの A(H1N1)Pdm09 ワクチンと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が、本年度は、例数を増やすことを目的に、医療従事者における季節性インフルエンザワクチンならびにB型肝炎ワクチンの反応性と新型インフルエンザワクチンに対するそれとの相関性の有無を検討した。

(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) 健康成人ならびに重症心身障害者病棟入院患者の血清検体ライブラリーづくり

本年度は、当院職員の血液 1850 検体と重症心身障害者病棟入院患者の血液 534 例(12月31日現在)を確保し、血清を分離、保存し、またそれぞれのワクチン接種歴を記録した。

また、検体によっては、インフルエンザ感染診断の情報も、あわせて収集した。

2) A(H1N1)Pdm09 ウイルスワクチン被接種者ならびに同ウイルス感染者に対する無/低反応者における中和抗体価ならびにCF抗体価の獲得状況調査

a) CF抗体価測定

A(H1N1)Pdm09 ワクチンに対する HI 試験無/低反応性の健康成人検体 28 例について CF 抗体

価測定を試みたものの、検体の抗補体性が高く不成功に終わった。

一方、感染者血清での HI 抗体無/低反応血清 6 例にも CF 抗体価測定を試みたところ 4 例で CF 抗体価の有意上昇が認められた。それのうち 2 例は、中和抗体価も上がらないものの CF 抗体価が有意に上昇していた。

b) 中和抗体価測定

昨年度は、学生血清については Pre の血清検体のみの中和試験にとどまっていたが、本年度は post 血清も含めて実施した。その結果、自然感染とワクチン接種者で、前者では HI 抗体価の上昇がほとんど見られなくとも有意の中和抗体価の上昇あるいは顕著な上昇が認められた。その一方、ワクチンによる中和抗体価の変動は皆無か、あるいは極めて低いものであった。

なお、ワクチン接種者についての中和試験については、さらに当院職員健康成人の検体について現在継続中である。

3) A(H1N1)Pdm09 ウイルスワクチンに対するHI抗体の反応性と他の不活化ワクチンに対する反応性の相関性の有無に関する解析

3-1) B型肝炎ワクチンへの反応性と相関性の検討: 昨年度の学生血清でのスタディでは、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という結果を示したが、例数が少なかったため、今年度は例数を増やす方法として2010-11シーズンに A(H1N1)Pdm09 ワクチン接種歴があつてその際ペア血清で抗体獲得性をしらべたことがありさらに、本院に就職する際に B型肝炎ウイルスに対する抗体価を有せず、2 回同ワクチン接種を受けた(た抗体価測定が未実施であった本院職員の保存血清 67 名について、改めて B型肝炎ウイルス抗体価を調べ、同一人物における 2

つの不活化ワクチンに対する反応性を調べた。

その結果、ワクチン間で反応性が相関する集団 15 例としない集団 50 例にきれいに分かれ、また双方に対する無/低反応例が 8 (12%) 確認され、インフルエンザワクチン側から見て、反応性の低い人は B 型肝炎ワクチンでも反応性が低い傾向が見られた。

3-2) A(H1N1)Pdm09 ワクチン HI 抗体高反応群と無/低反応群の季節性インフルエンザワクチンに対する反応性:

健康成人 H1pdm ワクチン HI 抗体高反応群 47 例と無/低反応群 28 例について、2010/11 シーズンの H3 と B 型インフルエンザワクチンに対する反応性を調べた。その結果高反応群は、H3 に対し 1 例を除きすべて 1:40 以上を獲得していた。一方、低反応群では 1:40 以上獲得者は 9 例 (約 3 割) のみであった。

B 型については、両者とも反応性が悪く、1:40 以上の獲得者は、どちらも約 2 割のみであった。

D. 考察

1) 本年度の研究により、A(H1N1)Pdm09 感染者の HI 抗体無/低反応血清で、CF 抗体価の有意上昇が認められ、それらの中には中和抗体価も上がらないものの CF 抗体価が有意に上昇しているものがあるとの結果が得られたが、同ワクチンに対する HI 抗体無/低反応者での CF 試験は、血清の保存条件が悪かったためか成功しなかった。ただ、古い成書に不活化インフルエンザワクチン接種では CF 抗体価が上がらないとの記述がすでにあることから、CF 抗体価の意義をあらためて学習/検討していくことも必要であろう。

健常者の中に散見される HI、中和、CF 抗体反応の無/低反応群の検体についてさらに感度の高い RIP による解析により、それらに本当に

まったく抗体産生がないのかも調べる必要もあろう。

2) 本年度は、学生血清についてはペア血清について中和抗体価の測定を実施した。その結果、同じように HI 抗体価の上昇がほとんど見られなくともワクチンと自然感染の間で中和抗体価の上昇に違いが認められた。これについてはさらに当院職員健康成の検体について現在解析中であり、その結果が待たれる。

その結果しだいでは、HI 抗体価の意義の限界が示され、中和抗体をはじめその他の抗体指標が必要となってくる可能性がある。

3) B 型肝炎ワクチンとの相関についての解析で、ワクチン間で反応性が相関する集団としない集団にきれいに分かれ、また双方への無/低反応例も確認される結果となった上、無/低反応性は B 型肝炎ワクチンでも反応性が低かったが、これを免疫学的に説明するのは、容易ではない。それぞれのワクチンに対しては免疫提示の段階でのそれぞれの抗原に特異的な提示のし方があって、そこで個々人の反応性が規定されるという考え方からすれば相関性は想定されないものの、その段階に至る自然免疫系の能力や抗原提示以降のプロセスでのウイルス抗原間で共通した個人特性があるかもしれない。今後、そうした領域での解析も必要となろう。

H1pdm ワクチン HI 抗体高反応群と無/低反応群の、2010/11 シーズンの H3 亜型インフルエンザワクチンに対する HI 抗体での反応性で、後者で十分なで 1:40 以上獲得者は約 3 割に過ぎなかったが、この試験に対応する中和試験が今後予定されている。

E. 結論

本年度の研究により、新型インフルエンザ

ワクチンに対する HI 抗体反応の無/低応答群の血清検体が、自然感染に対するそれと、中和や CF 試験で反応性が異なること、無/低応答群は、季節性インフルエンザワクチンに対しても反応性が悪いこと、また同じ不活化ワクチンである B 型肝炎ワクチンに対しても反応性が低いといった所見が得られた。そうした諸々の興味深い現象についての理論付けが、待たれる。

本年度、いくつかやり残した仕事もあり、本研究の目的達成のために、今後の研究継続が必須である。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

伊藤洋子ほか、不活化ワクチンに対する抗体反応無/低反応群の解析，第 66 回日本細菌学会東北支部総会，2012 年 8 月 24 日，仙台市

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

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 24 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

インフルエンザウイルス表面タンパク質の分子認識の計算機シミュレーションによる研究

研究分担者：田中 成典（神戸大学大学院システム情報学研究科 教授）

研究協力者：福澤 薫（みずほ情報総研）

尾曲 克己（名古屋市立大学）

中島 捷久（名古屋市立大学）

牛尾 律子（神戸大学）

研究要旨 宿主の糖鎖及び抗体と結合したインフルエンザウイルス HA タンパク質の抗原領域にある重要なアミノ酸残基の分子認識に関わる情報を計算機シミュレーションによって求め、病原性、抗原性等に係る解析を行った。

A. 研究目的

H24 年度は特に、糖鎖レセプター結合（特にトリ型 α 2-3）に重要なアミノ酸残基の特定をすることで、ワクチン開発に貢献することを研究の目的とした。

B. 研究方法

古典力学的な分子動力学（Molecular Dynamics; MD）法に基づく高速高精度の計算機シミュレーションを行い、タンパク質内のアミノ酸の糖鎖レセプターとの相互作用や熱力学的安定性に関する解析を行う。多数の変異株を用意してアミノ酸残基レベルでの病原性、抗原性を実験的に特定するのは困難であるが、計算機シミュレーションの手法を用いることにより、タンパク質内の全アミノ酸の網羅的・系統的な解析が可能となり、実験では困難な、HA の変異に対するミクロな構

造変化や結合（自由）エネルギーの微小変化をアミノ酸ごとに解析することができる。

C. 研究結果

今年度得られた主な研究成果は以下の通りである。

（1）生体分子複合系の電子状態計算を高速高精度で行う有力な手法であるフラグメント分子軌道（Fragment Molecular Orbital; FMO）法の基礎的方法論の開発に関して重要な進展（フラグメント分割の精密化と遮蔽効果を取り入れた相互作用解析手法の開発）があった（Chemical Physics Letters に 2 報の論文発表）。

（2）HA とヒト型・トリ型レセプターの複合体構造で、HA の 190, 225, 226 番目のアミノ酸に対し、変異の導入と相互作用解析の計算機実験を行い、アミノ酸残基の重要性を定量