

寄らが示したが、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

4. 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.
 5. 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.
 6. 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
- ### 2. 学会発表
1. 信澤枝里、中内美名、松崎葉子、菅原勤悦、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
 6. 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
 7. 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
 8. 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.
 9. 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

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）

総合研究報告書

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。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 50 株ずつ、計 800 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/1/2009 の HA には中和抗体を産生する抗原領域が 4 つ存在していた。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

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、分離した親ウイルス 5 株（P1、P2、P3、P4、P7）を以下の実験に用いた。

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

P1、P2、P3、P4、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 800 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 51 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

16 種類の単クローン抗体と P1、P2、P3 を親株とする 38 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 4 つ存在していることが明らかになった。

3. A/Narita/1/2009 HA 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、38 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ピト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。

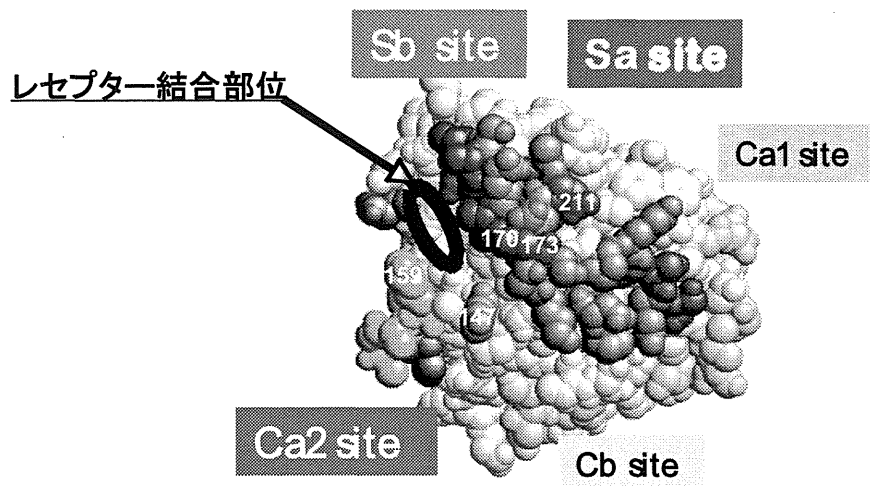


図1 A/Narita/1/2009 の抗原領域 (HA を上から見た図)

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 38 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

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 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

ので、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。

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.
3. Muraki Y, Okuwa T, Furukawa T, Matsuzaki Y, Sugawara K, Himeda T, Hongo S, Ohara Y: Palmitoylation of CM2 is dispensable to influenza C virus replication. *Virus Res.* 157(1): 99-105, 2011.

4. 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.
5. Matsuzaki Y, Mizuta K, Aoki Y, Suto A, Abiko C, Sanjoh K, Sugawara K, Takashita E, Itagaki T, Katsushima Y, Ujike M, Obuchi M, Odagiri T, Tashiro M: A two-year survey of the oseltamivir-resistant influenza A (H1N1) virus in Yamagata, Japan and the clinical effectiveness of oseltamivir and zanamivir. *Virol J* 7(1):53, 2010.
6. Muraki Y, Furukawa T, Kohno Y, Matsuzaki Y, Takashita E, Sugawara K, Hongo S: Influenza C virus NS1 protein upregulates the splicing of viral mRNAs. *J Virol* 84(4):1957-1966, 2010.

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

- 域の解析. 第 60 回日本ウイルス学会, 大阪;2012 年 11 月
3. Matsuzaki Y, Sugawara K, Simotai Y, Hongo S, Nobusawa E: Antigenic structure of the hemagglutinin of pandemic influenza A(H1N1) virus. XV International Congress of Virology, Sapporo; September 2011
 4. 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
 5. 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
 6. Furukawa T, Muraki Y, Sugawara K, Matsuzaki Y, Takashita E, Shimotai Y, Hongo S: The Role of the CM2 Protein in the Influenza C Virus Replication. Options for the Control of Influenza VII, Hong Kong; September 2010
 7. Muraki Y, Okuwa T, Furukawa T, Matsuzaki Y, Sugawara K, Himeda T, Hongo S, Ohara Y: Role of Palmitoylation of CM2 in the Influenza C Virus Replication. Options for the Control of Influenza VII, Hong Kong; September 2010
 8. Hongo S, Muraki Y, Furukawa T, Kohno Y, Matsuzaki Y, Takashita E, Shimotai Y, Sugawara K: Influenza C virus NS1 protein up-regulates viral mRNA splicing. Options for the Control of Influenza VII, Hong Kong; September 2010
 9. Takashita E, Sugawara K, Matsuzaki Y, Hongo S, Goto H, Kawaoka Y, Nobusawa E: Compatibility between hemagglutinin and neuraminidase affects the growth of H3N2 influenza A viruses. 14th International Negative Strand Virus Meeting, Bruges; June 2010

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 22-24 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ならびに抗体のエピトープ構造を解析するため、ワクチン接種者の末梢血からウイルス結合性記憶B細胞を単離・同定する新しい技術を開発した。さらに、近年別のグループが開発した方法と組み合わせることにより、記憶B細胞やプラズマ細胞から、迅速にウイルス結合性モノクローナル抗体を作製する実験システムを構築した。その結果、7名のドナーから16種類のモノクローナル抗体を作製することに成功し、数名のドナーからは、複数のウイルス株に結合する交差結合性抗体を得ることができた。このことは、H1N1pdmワクチンにより、ユニークなエピトープ構造を認識する記憶B細胞が再活性化して、交差結合性抗体を産生する可能性を示唆する。

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作製したモノクローナル抗体を用いて、エピトープ構造を解析する。

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ヘマグルチニン (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
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 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) 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 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 HA 結合性を ELISA により検証したところ、記憶 B 細胞から 2 種類のモノクローナル抗体と、プラズマ細胞から 1 4 種類のモノクローナル抗体を製作することに成功した (図 3)。さらに興味深いことに、得られた 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。

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価のワクチン接種後に誘導される H1N1 ウイルス結合性の抗体エピトープ構造の解析を目標として、H1N1 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

H1N1pdm 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。さらに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
- 7) Harada, Y., A. Ninomiya-Mori, Y. Takahashi, M. Shirakura, N. Kishida, T. Kageyama, Y. Tada, M. Tashiro, and T. Odagiri. 2011. 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*, 29: 8330-8337.
- 8) Fujii, H., M. Ato, Y. Takahashi, K. Otake, S. Hashimoto, T. Kaji, Y. Tsunetsugu-Yokota, M. Fujita, A. Adachi, T. Nayakaya, M. Taniguchi, S. Koyasu, and T. Takemori. 2011. HIV-1 Nef impairs multiple T-cell functions in antigen-specific immune response in mice. *Int. Immunol.*, 23: 433-441.
- 9) 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
- 10) Kurosaki, T., Y. Aiba, K. Kometani, S. Moriyama, Y. Takahashi. 2010. Unique properties of memory B cells of different isotypes. *Immunol. Rev.*, 237: 104-116.
- 11) Nakashima, H., Y. Hamaguchi, R. Watanabe, N. Ishiura, Y. Kuwano, H. Okochi, Y. Takahashi, K. Tamaki, S. Sato, T.F. Tedder, and M. Fujimoto. 2010. CD22 expression mediates the regulatory functions of peritoneal B-1a cells during the remission phase of contact hypersensitivity reactions. *J. Immunol.*, 184: 4637-4645.
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)
- 4) Takahashi, Y. 2011. Protective memory B cell responses to influenza virus infection. 第40回日本免疫学会 (千葉、11月)
- 5) Onodera, T., R. Aizawa, A. Hosono, S. Kaminogawa, K. Kobayashi, and Y. Takahashi. 2011. Role of Toll-like

receptor signaling for the development and reactivation of virus-specific memory B cells. 第40回日本免疫学会 (千葉、11月)

- 6) Yokoi, Y., T. Onodera, S. Hachimura, M. Ato, K. Kobayashi, and Y. Takahashi. 2011. Localization and reactivation of virus-specific memory B cells at the site of virus infection. 第40回日本免疫学会 (千葉、11月)
- 7) 高橋宜聖 2010. Protective memory B cells against influenza virus infection in the lungs. 千葉大G-COEシンポジウム. (東京, 12月)
- 8) 小野寺大志、相澤竜太郎、細野朗、上野川修一、小林和夫、高橋宜聖 2010. T cell-independent activation of virus-specific memory B cells requires Toll-like receptor (TLR) signaling. 第14回国際免疫学会 (神戸、8月)
- 9) 疋田正喜、加地友弘、高橋宜聖、Klaus Rajewsky、竹森利忠 2010. IgG1 memory B cell compartment undergoes qualitative alteration after its initial generation early in the immune response. 第14回国際免疫学会 (神戸、8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

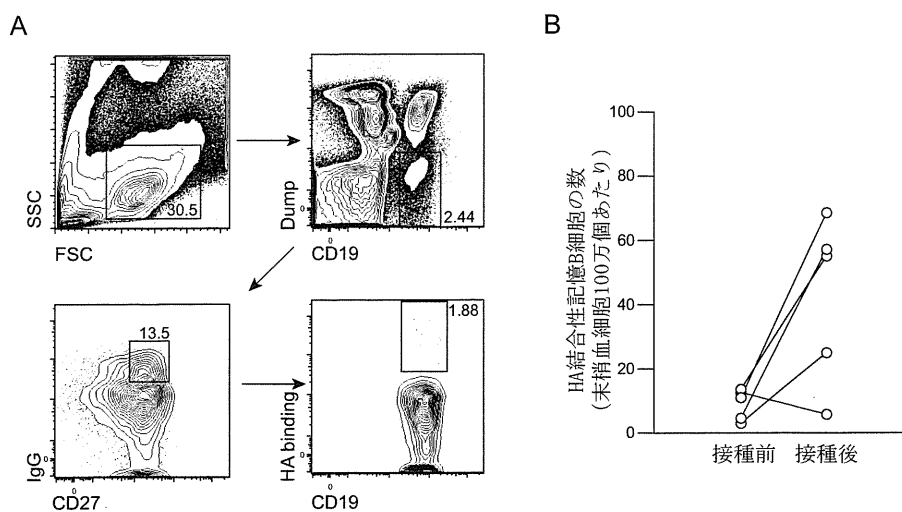


図2 フローサイトメトリによるプラズマ細胞の検出

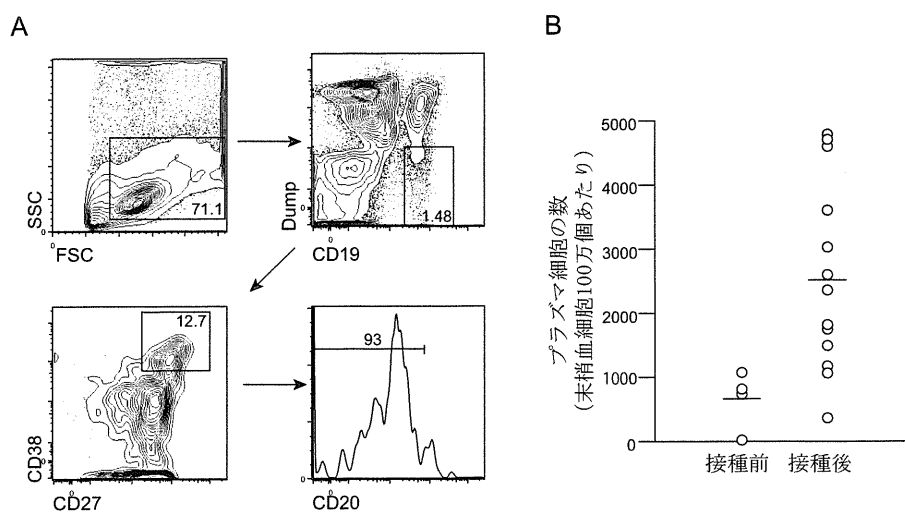
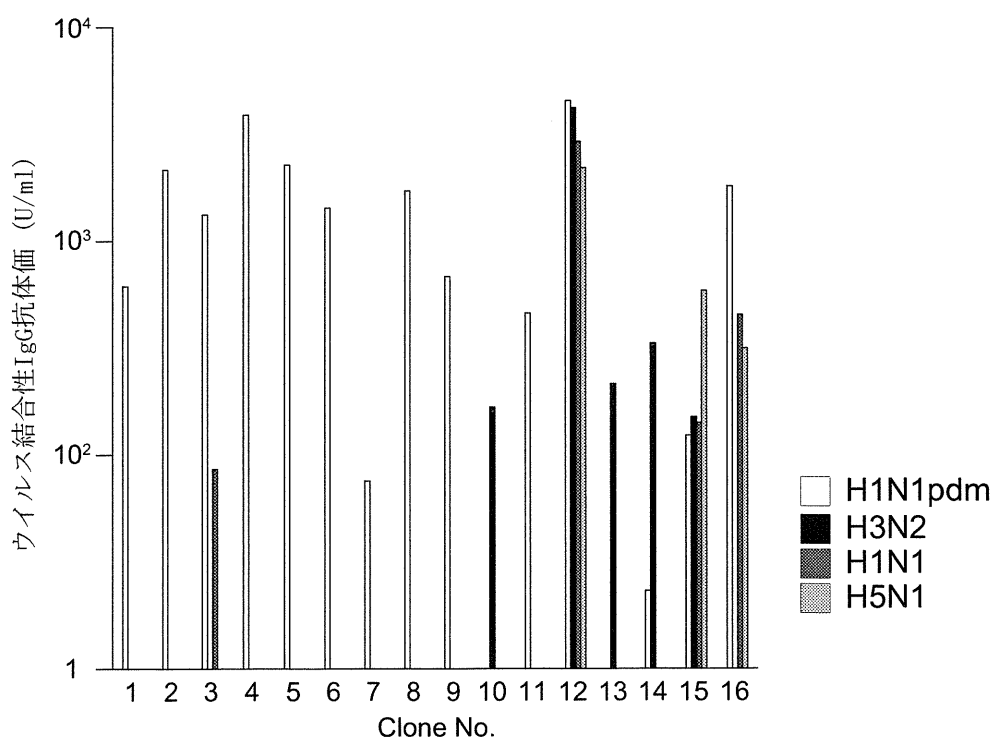


図3 作製したモノクローナル抗体のウイルス結合性



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 22～24 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～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つ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 例を除きみなが中和抗体でも低い抗体価しか示さなかった。HI 抗体無/低反応者のペア血清検体について中和抗体の測定を試みた結果、自然感染では、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かほとんどなかった。さらに A(H1N1)Pdm09 ワクチン接種者について 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結果、HI 抗体高反応群は H3 に対してもほぼ有効な抗体を獲得していた一方、低反応群でのそれは約 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、また双方に対する無/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

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 割に抗体獲得があつ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 割にものぼつたことになる。これは公衆衛生上無視できない事実と思われる。

本研究で分担者は、インフルエンザワクチン無/低応答者について、その割合の把握とそれにかかわる特徴的な因子の有無についての探索を試みた。

B. 研究方法

本研究は大きく次の 4 つで構成された。1) 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) 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 抗体価の獲得状況とその後
の時間的推移による変動の解析

3) 上記で判明した A(H1N1)Pdm09 ワクチン HI 抗体無/低反応群に注目した同ワクチンに対する反応性についての種々の解析

3-1) 中和抗体、CF 抗体、NA 抗体価の測定

3-2) 比較のための自然感染患者のペア血清の収集とその抗体価の解析

4) A(H1N1)Pdm09 ワクチン無/低反応群の、他の不活化ワクチンに対する反応性の検討

4-1) 狂犬病ワクチン

4-2) B 型肝炎ワクチン (以上、大学生集団)

4-3) B 型肝炎ワクチン (病院職員)

4-4) H3 亜型季節性ワクチン (病院職員)

詳細は結果参照

(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(重心)病棟入院患者の血清検体ライブラリーづくり等

抗体価測定に供する目的で、以下の検体を収集保存し、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。

平成 22 年度 (2009-2011)

当院職員血清	2,432 検体
重心病棟入院患者血清	854 検体
市中小児科血清	350 検体
自衛隊仙台病院職員血清	337 検体
医学生血清	213 検体
合計	

平成 23 年度 当院職員血清 1733 検体

重心病棟入院患者血清 743 検体

市中小児科血清 41 検体

自衛隊仙台病院職員血清 19 検体

合計

平成 24 年度 当院職員血清 1,850 検体

重心病棟入院患者血清 534 検体

これらは、本研究ならびに将来の血清額の研究のためのライブラリーとなるものである。

2) 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 抗体価の獲得状況とその後 の時間的推移による変動の解析

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、年代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、この年代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。(以下、これらを無/低反応群と呼ぶ。)

3) A (H1N1) Pdm09 ワクチン HI 抗体無/低反応群に注目した同ワクチンに対する反応性についての種々の解析

3-1) 中和抗体、CF 抗体、NA 抗体価の測定

中和抗体価測定：大学生血清で

A (H1N1) Pdm09 ワクチン接種と同ウイルス感染者のペア血清について中和試験を行った結果、自然感染では 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一方、ワクチンによる中和抗体価の変動は皆無あるいは極めて低かった。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。

CF 試験：A (H1N1) Pdm09 ワクチン 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。それらのうち 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。

NA 抗体：NA 抗体については、NA 阻害薬の効果判定に NA 活性測定に用いられる簡便な NA Star 法を試みたが成功しなかった。

3-2) 比較のための自然感染患者のペア血清の収集とその抗体価の解析

自然感染者の中の抗体応答の低い人の検索を目的に、2009 年のパンデミックで短期間

のうちに二度の A (H1N1) pdm09 ウイルス感染が疑われた 9 症例について解析した。その結果すべてが 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。

さらに 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なされ、感染のウイルス学的証明の裏づけがある。これら自然感染例の中で、抗体価の上昇に乏しい症例の検索を行った結果、A (H1N1) pdm09 株に対する 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。

4) A (H1N1) Pdm09 ワクチン無/低反応群の、他の不活化ワクチンに対する反応性の検討

無/低応答群が、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同様に悪いのかを検討する目的で以下のワクチンに対する反応性も調べてみた。

4-1), 2) 大学生での狂犬病ワクチンと B 型肝炎ワクチンに対する反応性

2009~2010 年に得られた大分大学医学部学生、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、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る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 ($r=0.68750$)

だが、これらについては例数が少ないため、偶然に一見相関に見える結果となった可能性も否定できなかった。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。

これを受けて、例数を増やす目的で病院職員におけるB型肝炎ワクチンとA(H1N1)Pdm09ワクチンとの反応性について以下のように検討した。

4-3) B型肝炎ワクチン (病院職員)

2010-11シーズンにA(H1N1)Pdm09ワクチン接種歴があっ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、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。

4-4) H3亜型季節性ワクチン (病院職員)

健康成人 H1pdm ワクチン HI 抗体高反応群の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、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。

さらに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。

2) 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が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。

3) A(H1N1)Pdm09 感染者血清での 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一方、同ワクチン 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、古い成書で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もあり、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。感染で CF 抗体価が上昇するのにワクチンでは上がらないということについての理由付けと CF 抗体の本体、感染防御における位置づけである。

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どうかも調べる必要もあろう。

NA 抗体については、NA 阻害薬の効果判定に NA 活性測定に用いられる簡便な NA Star 法を試みたが成功しなかった。それに用いる基質の分子量が小さ過ぎたためか抗体による活性阻止能の測定には、不向きであったようである。今後は、分子量の大きなフェツインを基質とした古典的な NA 活性定量法による解析が必要である。

4) 学生その他のペア血清で、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がり方に違いが認められたが、これについてはさ

らに当院職員健康成の検体で数を増やして現在解析中であり、その結果が待たれる。だが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かもしれない。ただ中和抗体の測定は煩雑であり実施者の技量で結果がおおきく変動する。もっと簡便で免疫状態を的確に反映する抗体測定法が望まれよう。

5) 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成績が次に必要である。

6) 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、また双方に対する無/低反応例も確認され、る結果となったが、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っても不思議ではなく、今後、そうした領域での解析も必要となろう。

それは不活化ワクチンに対する無/低反応者を抗体獲得に仕向けるための工夫にもかかわってくる可能性もある。たとえば、もし抗原提示の前段階での問題であれば、アジュバント活性を持つ物質による反応性の向上について検討することも面白いかもしれない。