

201225019A-B

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

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24年度 総括・分担研究報告書

平成22年度～24年度 総合研究報告書

研究代表者 板村繁之

平成25(2013)年 3月

201225019A

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

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 板村繁之

平成25（2013）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. 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 ----- 9
横田 恭子
2. 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
3. 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 ----- 18
佐藤 佳代子
4. 新型インフルエンザワクチンの品質管理に必要な免疫原性試験法の開発 ----- 22
大西 和夫

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 26

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) H5 亜型 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、2つの異なる領域のエピトープを認識することでワクチンに含有される HA 蛋白を定量していることが明らかにされた。

(2) 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。

(3) 全粒子ワクチンにより産生誘導された抗体は、スプリットワクチンの場合より抗原への結合能が高かった。抗体のサブクラスとしては IgG2a が高かったが、抗原への結合能はサブクラスによる違いは認められなかった。受動免疫実験により、ワクチンによる防御効果はおもに抗体によるもので、抗体の結合能の強さが影響していることが確認できた。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有益な情報である。

(4) インフルエンザワクチンの免疫原性を測定するうえで、ワクチン免疫により誘導される抗体分子の全ての抗原認識特異性（抗体レパートリー）とその存在量を網羅的かつ定量的に解析する事ができれば理想的である。本研究では、次世代遺伝子シーケンサーを応用して抗体応答の網羅的解析を試み、マウスモデルにおいて、抗体レパートリーの網羅的かつ定量的解析を可能にする新規手法の確立に成功した。本方法を用いれば、今後ワクチンの剤型やアジュバント添加による抗体応答の俯瞰的理解に基づいて、ワクチンの使用戦略を考えるために重要な知見を提供することが期待される。

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

大西和夫 国立感染症研究所免疫部
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主任研究官

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

研究協力者

矢野茂生 国立感染症研究所血液・安全性
研究部

高橋仁 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

河野直子 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

A. 研究の目的と背景

ブタに由来する新型インフルエンザウイルス (H1N1) が 2009 年 4 月にヒトでの流行を急速に拡大してパンデミックとなり、あらためて新型ウイルスの流行拡大の早さと迅速な対応の必要性を再認識させることとなり、ワクチンの準備対応についてもいくつかの課題が明らかになった。第一に、ワクチン製造のためのワクチン製造株開発における課題である。通常通りに、ワクチン製造株を開発したところ、ワクチンの生産性において従来のワクチン製造株の数分の 1 と低くなり、2009 年の秋に向けてのワクチン供給量の見込み

が期待よりも少なくなった。このために国内で使用するワクチンが不足することが予想され、海外からワクチンを緊急に輸入することとなった。また、ワクチンの剤型に関して、従来季節性のインフルエンザワクチンに使用しているスプリットワクチンか、高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) を想定したアラムアジュバント添加全粒子不活化ワクチンにすべきか判断するための基礎的なデータが不足していたために、その選択が容易ではなかった。一方、高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) も、2004 年以来現在に至るまで世界的に流行が拡大しヒトへの感染を繰り返している状況に変化はなく、潜在的なパンデミックを引き起こす脅威として存在し続けている。H5N1 に対するワクチンでは最近の臨床研究においてプライミングとブースターのワクチン接種戦略で効果的であることが示唆されている。また、海外からの輸入ワクチンの導入に関連して、従来わが国での使用経験の無かった oil-in-water のアジュバントが使用され、ワクチンの品質管理試験としての検討が必要ではあったが、これまでに十分な検討はなされてきていなかった。

このような状況に迅速に対応できるように、本研究では発育鶏卵での生産性の高いワクチン製造株の開発のために、生産性の低い原因を解析するとともに、高い生産性のワクチン製造株の開発を行う。それによって新型インフルエンザ出現時に、高生産性のワクチン製造株を開発して提供することによってワクチン接種が必要な人の需要に迅速に対応できることが期待される。また、ワクチンの剤型による免疫応答を解析することにより、新型インフルエンザ出現時に各ウイルス株の亜型によってどのようなワクチン接種戦略が適切であるのか検討を行う。この情報はワクチン政策を検討するのに有用であると考えられる。さ

らに新規アジュバントを含有したワクチンの品質規格試験法を検討し適切な試験法の開発を行い、標準化を実施する。これらによって、品質の均一な製剤を供給することが可能になり、より有効性、安全性の高いワクチン供給に寄与することが期待される。

B. 研究方法

1) 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

ワクチンに含有される HA 蛋白の定量のためにサンドイッチ ELISA 法に使用している H5N1 ウイルスの HA 蛋白を認識するモノクローナル抗体 3 種類 (AY-2C2, YH-1A1, OM-b) について、モノクローナル抗体作製に使用したワクチン株 NIBRG-14 のエスケープ変異株を分離して、そのウイルス株の HA 遺伝子を解析することでエピトープの同定を実施した。

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

N129D 変異を有しない X-179 株を発育鶏卵で継代増殖させて、ウイルスの HA 価および HA 遺伝子の塩基配列の変化を解析した。高分子複合体形成については動的光散乱法によって粒子分布を調べた。

3) 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) の抗原への結合能について尿素含有洗浄液の使用によって調べた。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同様に

各抗体価についても測定した。さらに、受動免疫実験として全粒子ワクチン、スプリットワクチンで免疫した抗血清をマウスに移入した後インフルエンザウイルスを感染させ、感染 3 日後の肺ウイルス価を測定することにより、誘導された抗体の防御効果について検討した。

4) 新型インフルエンザワクチンの品質管理に必要な免疫原性試験法の開発

抗体応答レパートリーの網羅的解析のため、抗体遺伝子の mRNA を抗体定常部ドメイン 1 (CH1) と mRNA の 5'末端の間で PCR によって増幅できるように、プライマーを設定した。増幅された 400 から 500bp のアンプリコン配列を次世代遺伝子シークエンサーであるロッシュ社 454 システムを用いて、塩基配列を決定した。得られた 7 万から 20 万リードの遺伝子配列は、独自に開発したプログラムや、既存の解析プログラムとして Vh, Dh, Jh 遺伝子の同定のために IMGT (The International Immunogenetics Information System®, Montpellier France, <http://www.imgt.org/HighV-QUEST/index.action>) サーバを利用した。

C. 研究結果・考察

1) 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

これまでに H5 亜型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 法を利用してワクチンに含有される主要な有効成分である HA 蛋白の定量方法の開発を行ってきた。本年度は、本定量法が HA 蛋白のどの部分を認識して定量しているのかを明らかにすることを目的として、使用したモノクローナル抗体が認識する HA 蛋白上のエピトープの解析を実施した。3 種類のモノクローナル抗体についてワクチン株である NIBRG-14 株のエスケープ変異ウイルスを分離し

て、その HA 遺伝子の変異領域を同定することでエピトープを解析した。その結果、AY-2C2 と OM-b のモノクローナル抗体は HA 蛋白の 43 番目のアミノ酸であるアスパラギン酸を共通して認識していることがわかった。興味深いことに OM-b では 45 番目のアスパラギン酸及び 46 番目のグリシンも認識していることがわかった。AY-2C2 が、OM-b の認識するエピトープと同一領域を認識するのはさらに詳細な検討が必要であるが、得られた情報では少なくともエピトープの一部が共通していることがわかった。もうひとつのモノクローナル抗体 YH-1A1 はこの 2 つのモノクローナル抗体が認識しているエピトープとは異なる領域である 139 番目のグリシン、140 番目のリジンを認識していた。H5 亜型の HA 分子の立体構造予測から AY-2C2 抗体および OM-b 抗体が認識すると推定される抗原部位は Site C であり、YH-1A1 抗体が認識すると推定される部位は Site A であった。このことから開発したサンドイッチ ELISA 法による HA 蛋白の定量法は、2 つの異なる HA の抗原決定部位を認識することで HA 蛋白を定量していることが明らかになった。

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

これまでの研究で、2009 年に発生したパンデミックに対するワクチン株として開発された A/California/7/2009 (X-179A) 株について HA 蛋白の N129D のアミノ酸変異が、ワクチンの主要有効成分である HA 蛋白の経時安定性に寄与していることを明らかにしてきた。本年度は、(1) X-179 株を発育鶏卵において継代したときに導入されるアミノ酸変異として N129D のアミノ酸変異が含まれるのか、(2) HA 蛋白の N129D のアミノ酸変異が、それ以外のウイルス蛋白の構成によっ

て影響を受けるのか、(3) N129D 変異のある HA 蛋白を含有するワクチンの加熱による SRD 力価、HA 価の減少と高分子複合体形成の関係について調べた。

N129D 変異を有しない X-179 株を発育鶏卵で継代して、継代とともに HA 価の変化と HA 遺伝子の変異の有無について調べたところ継代 4 代頃から N129D の変異が認められるようになり、6 代目では N129D 変異にほぼ置き換わっていることがわかった。それとともに、HA 価の上昇も認められたことから、N129D 変異はウイルスの発育鶏卵での増殖性を高めるように作用したと考えられる。HA 蛋白の熱安定性がウイルスの発育鶏卵での増殖性と直接関連しているのかは不明であるが、ウイルス株の増殖性と HA 蛋白の熱安定性が連動する可能性があることが確認できた。ワクチンの品質管理としてワクチンの経時安定性は重要な管理項目のひとつであることから、ワクチン製造株の変異について抗原性の維持のみならず、熱安定性についても評価が必要と考えられる。

次に、HA 蛋白の N129D 変異が異なるウイルス株に由来する他のウイルス蛋白との組合せによって、熱安定性に影響を受けるかどうかについてリバースジェネティック (RG) 法によって作製したウイルス株と比較することによって解析を行った。N129D 変異のみを導入した X-179 株と同じ遺伝子構成 (5:3) のウイルスでも発育鶏卵で継代して得られた N129D 変異を有する X-179 株と同様の熱安定性を示したことから、N129D 変異が一義的に熱安定性に重要であることが確認できた。また、熱安定性の高い変異を有しない X-179 株 (5:3) の遺伝子構成を 6:2、7:1 に改変しても熱安定性に変化は認められなかった。以上のことから、N129D 変異による熱安定性は HA 蛋白固有の性質によって規定されていることが示唆された。

この熱安定性と高分子複合体形成との関係について、熱処理の有無によって得られたワクチンを動的光散乱法によって解析したところ、SRD 力価や HA 価の低下が認められる条件の熱処理を施したワクチンと、無処理のワクチンとの間で高分子複合体形成の程度に違いは認められなかった。従って、熱安定性を規定する構造として必ずしも大きな構造変化を伴う必要がないことが示唆された。

3) 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

これまでにワクチン製造株 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。しかしながら、ウイルス感染に対する防御効果は全粒子ワクチンの方が高い効果が認められた。そこで本年度は、全粒子ワクチンとスプリットワクチンで誘導された抗体の質的違いについて検討を行った。各ワクチンを免疫した後、血清中のワクチン特異的抗体の抗原結合能の程度を通常の ELISA 法に尿素を添加した溶液で洗浄することで測定した。その結果、初回免疫後の血清では、全粒子ワクチンとスプリットワクチンのいずれにも、高い結合能を有する抗体の産生は低いレベルに留まっていた。一方、2 回接種した場合には、全粒子ワクチンを接種した場合の方がより高い結合能をもつ抗体の産生が認められた。また、これらの血清を受動免疫してウイルスによる攻撃試験を実施したところ全粒子ワクチ

ンを免疫して得た血清の方が、スプリットワクチンを免疫して得られた血清より高いウイルス感染防御効果が認められた。また、誘導された免疫グロブリンのサブクラスは全粒子ワクチンでは IgG2a がスプリットワクチンでは IgG1 が優勢に産生されていることがわかった。これらのことから、全粒子ワクチンによって誘導された抗体は、スプリットワクチンによって誘導された抗体よりも抗原への結合能が高く、それがウイルス感染防御に効果的に機能することが示唆された。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。

4) 新型インフルエンザワクチンの品質管理に必要な免疫原性試験法の開発

剤型の異なるインフルエンザワクチンの免疫原性を適切に品質管理するための試験方法の開発のため、ワクチンの免疫原性を抗体レパトリーの観点から測定する試験法について、マウスモデルを用いて開発を実施した。方法としては次世代遺伝子シーケンサーによって、ワクチンによって免疫した抗体応答を抗体遺伝子の発現レパトリーとして網羅的に解析する手法の確立を目指した。まずは、未免疫のマウス脾臓より精製したトータル RNA を用いて各抗体クラスの抗原結合部位として重要な免疫グロブリン重鎖の VDJ と C 領域の一部を網羅的に増幅させる PCR 手法を確立した。その結果、およそ 400 から 500bp のアンプリコン配列として 7 万から 20 万の独立した遺伝子配列を 1 回のシーケンシングによって決定することができた。得られた配列をマウスの抗体遺伝子座のゲノム配列のどの Vh 遺伝子に由来す

るのか配列データを解析し、抗体レパートリーの構成パターンを視覚化して解析を行った。その結果興味深いことに、未免疫のマウス間で抗体レパートリーの構成パターンに高い類似性が認められた。研究では、上記のような解析ができるように、既存のプログラムだけではなく独自に解析プログラムの開発を実施した。

次に、マウスでこれまでに詳細な解析がなされているハプテン- キャリアーのニトロフェノール (NP) を認識する抗体誘導をモデル系として、本網羅的解析方法によって特定の抗体応答を検出できるのか検討を行った。その結果、既知の NP を認識する Vh 遺伝子に相当する抗体レパートリーの発現が免疫群において顕著に認められ、加えて高親和性突然変異の蓄積についても既知の変異が確認できた。このことから、本方法によって個体の全抗体レパートリーを網羅的に解析することによって、特定の免疫応答を検知できることが示された。抗体レパートリーの観点から網羅的に抗体応答を捉えることが可能になり、今後ワクチンの剤型やアジュバント添加による抗体応答がどのようになっているのか俯瞰的に理解することができ、ワクチンの使用戦略を考えるために重要な知見を提供することが期待される。

D. 結論

(1) H5 亜型 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、2 つの異なる領域のエピトープを認識することでワクチンに含有される HA 蛋白を定量していることが明らかにされた。

(2) 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。

(3) 全粒子ワクチンにより産生誘導された抗体は、スプリットワクチンの場合より抗原への結合能が高かった。抗体のサブクラスとしては IgG2a が高かったが、抗原への結合能はサブクラスによる違いは認められなかった。受動免疫実験により、ワクチンによる防御効果はおもに抗体によるもので、抗体の結合能の強さが影響していることが確認できた。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有益な情報である。

(4) インフルエンザワクチンの免疫原性を測定するうえで、ワクチン免疫により誘導される抗体分子の全ての抗原認識特異性 (抗体レパートリー) とその存在量を網羅的かつ定量的に解析する事ができれば理想的である。本研究では、次世代遺伝子シーケンサを応用して抗体応答の網羅的解析を試み、マウスモデルにおいて、抗体レパートリーの網羅的かつ定量的解析を可能にする新規手法の確立に成功した。本方法を用いれば、今後ワクチンの剤型やアジュバント添加による抗体応答の俯瞰的理解に基づいて、ワクチンの使用戦略を考えるために重要な知見を提供することが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Alexander I. Klimov, Rebecca Garten, Colin Russell, Ian G. Barr, Terry G. Besselaar, Rod Daniels, Othmar G. Engelhardt, Gary Grohmann, Shigeyuki Itamura, Anne Kelso, John McCauley, Takato Odagiri, Derek Smith,

- Masato Tashiro, Xiyan Xu, Richard Webby, Dayan Wang, Zhiping Ye, Shu Yuelong, Wenqing Zhang, Nancy Cox, Writing Committee of the World Health Organization Consultation on Southern Hemisphere Influenza Vaccine Composition for 2012: WHO recommendations for the viruses to be used in the 2012 Southern Hemisphere Influenza Vaccine: Epidemiology, antigenic and genetic characteristics of influenza A(H1N1)pdm09, A(H3N2) and B influenza viruses collected from February to September 2011. *Vaccine* 30: 6461- 6471 (2012)
- 2) Manabu Ato, Yoshimasa Takahashia, Hideki Fujiia, I, Shu-ichi Hashimoto, Tomohiro Kaji, Shigeyuki Itamura, Yoshinobu Horiuchi, Yoshichika Arakawa, Masato Tashiro, Toshitada Takemori: Influenza A whole virion vaccine induces a rapid reduction of peripheral blood leukocytes via interferon- α -dependent apoptosis. *Vaccine* 31: 2184-2190 (2013)
- 3) Terahara, K., Ishige, M., Ikeno, S., Mitsuki, Y-y, Okada, S., Kobayashi, K. and Tsunetsugu-Yokota, Y.: Expansion of activated memory CD4+ T cells affects infectivity of CCR5-tropic HIV-1 in humanized NOD/SCID/JAK3null mice. *PLoS One*, 8:e53495, 2013.
- 4) Tsunetsugu-Yokota, Y. and Terahara, K.: Receptor usage and the pathogenesis in acute and chronic virus infections. *Front. Microbiol.* 3:289, 2012.
- 5) Sugimoto, C., Nakamura, S., Hagen, S. I., Tsunetsugu-Yokota, Y., Villinger, F., Ansari, A.A., Suzuki, Y., Yamamoto, N., Nagai, Y., Picker, L.J., Mori, K. : Glycosylation of SIV influences immune-tissue targeting during primary infection that leads to immunodeficiency or viral control *J. Virol.* 86:9323-9336, 2012.
- 6) Nomura, T., Yamamoto, H., Shiino, T., Takahashi, N., Nakane, T., Iwamoto, N., Ishii, H., Tstukamoto, T., Kawada, M., Matsuoka, S., Takeda, A., Terahara, K., Tsunetsugu-Yokota, Y., Iwata-Yoshikawa, N., Hasegawa, H., Sata, T., Naruse, T.K., Kimura, A., Matano, T. : Association of major histocompatibility complex class I haplotypes with disease progression after simian immunodeficiency virus challenge in Burmese rhesus macaques. *J. Virol.* 86:6481-6490, 2012.
- 7) Mitsuki, Y-Y., Terahara, K., Shibusawa, K., Yamamoto, T., Tsuchiya, T., Ishige, M., Kobayashi, K., Morikawa, Y., Nakayama, T., Takeda, M., Yanagi, Y., and Tsunetsugu-Yokota, Y. : HIV-1 infection ex vivo accelerates measles virus infection by upregulating signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) in CD4+ T cells. *J. Virol.* 86:7227-7234, 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) 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. Newly established monoclonal antibodies for immunological detection of H5N1 influenza virus. Jpn. J. Infect. Dis. 65:13-18, 2012.

2. 学会発表

- 1) Kayoko Sato, Hideki Asanuma, Michiyo Kataoka, Hitoshi Takahashi, Kiyohiko Matsui, Noriyo Nagata, Masato Tashiro, Shigeyuki Itamura: Characterization of A/H1N1pdm09 viruses isolated in egg from clinical specimens. 6th Orthomyxovirus Research Conference, Bromont, Canada, September, 2012.
- 2) Ikeno, S., Terahara, K., Ishige, M., Suzuki, M., Mitsuki, Y-y, Morikawa, Y., Nakayama, T., Tsunetsugu-Yokota, Y.: Application of humanized mice for the evaluation of measles virus vector. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Hyogo, September 11-14, 2012.
- 3) Tsunetsugu-Yokota, Y., Ishige, M. Ikeno, S., and Terahara, K.: Humanized mice as an animal model for human-tropic virus infection, in Immunological Mechanisms of Vaccination, Keystone Symposium, Ottawa, Canada, December 13-18, 2012.
- 4) Kayoko Sato, Yoshimasa Takahashi, Manabu Ato, Hideki Asanuma: Split-virion influenza

vaccines induce high levels of virus-specific antibodies upon responses to a booster immunization. 第41回日本免疫学会学術集会、2012年12月、神戸

- 5) 陳富、船越舟一、孫琳、大西和夫。インフルエンザウイルス・ワクチン特異的なB細胞の検出と評価、第41回日本免疫学会学術集会、2012年12月、神戸
- 6) 嶋崎典子、白倉雅之、信澤枝里、矢野茂生、板村繁之、田代眞人、インフルエンザHAワクチンにおける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。
- 7) 池野翔太、寺原和孝、石毛真行、鈴木基臣、光木裕也、森川裕子、中山哲夫、横田恭子。ヒト化マウスの麻疹ウイルスベクター評価系への応用。第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、平成24年11月。
- 8) 岩田奈緒子、永田典代、鈴木忠樹、佐藤由子、横田恭子、西條政幸、森川茂、長谷川秀樹。SARS-CoV感染動物モデルを用いたUV不活化SARS-CoVの副反応発生機序について。第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、平成24年11月。

H. 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
-H5N1 ウイルスの HA タンパク質を認識する抗体のエピトープ解析-

研究分担者 横田 恭子 国立感染症研究所免疫部・第一室長

研究協力者 高橋 仁 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

研究要旨

昨年度までに H5N1 ワクチン株(NIBRG-14)をはじめ、様々なクレードの H5HA に反応する 3 つのモノクローナル抗体を作製した。さらに、新型インフルエンザワクチンの品質管理試験に使用可能な新たな HA 含量測定法として、作製した抗体を用いてのサンドイッチエライザ法の確立および改良を行ってきた。本年度は作製した 3 種類のモノクローナル抗体のエピトープ解析を行い、それぞれの抗体が認識する HA タンパク質のアミノ酸部位を推定した。その結果、推定される部位は全て H5HA タンパク質の表面上であり、抗体の種類により異なる 2 つの認識部位があることが示唆された。これらの解析結果は、新型インフルエンザワクチンのエライザ法を用いた HA 含量測定試験の確立を行う際、より反応性の高いモノクローナル抗体の選択に役立つ情報である。

A. 研究目的

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を目的とする。本年度は今までに作製した 3 つのモノクローナル抗体のエピトープ解析を行い、それぞれの抗体が認識する HA タンパク質のアミノ酸部位を推定する。この解析結果を、新型インフルエンザワクチンの品質管理試験(エライザ法を用いた HA 含量測定試験)の確立を行う過程において、より反応性の高いモノクローナル抗体を選択するための一助とする。

B. 材料と方法

1. エスケープミュータントウイルスの選別

H5N1 ワクチン株 (NIBRG-14) ウイルス (10^6 TCID₅₀/50 μ l)に、中和活性を示す濃度の各モノクローナル抗体 (AY-2C2、YH-1A1、OM-b)を加え 37°C で 30 分間保温した。このウイルスとモノクローナル抗体の混合液を 96 ウェルプレートを用いて階段希釈し、予め 96 ウェルプレートに培養して

おいた MDCK 細胞に接種した。その後、接種 5 日目から 7 日目までに CPE が認められたウェルからウイルス(エスケープミュータントウイルス)を回収した。回収したエスケープミュータントウイルスを再度、中和活性を示す濃度の各モノクローナル抗体と 37°C で 30 分間保温した後、予め 6 ウェルプレートに培養しておいた MDCK 細胞に接種し、プラーク法により出芽したエスケープミュータントウイルスの単離を行った。

2. HA 遺伝子配列解析

プラーク単離したエスケープミュータントウイルスからウイルス RNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて HA 遺伝子の全長を増幅させた。この PCR 産物を鋳型としてシーケンス解析を行い、塩基配列とアミノ酸配列を決定した。この HA アミノ酸配列と NIBRG-14 ウイルスの HA アミノ酸配列とを比較することにより、それぞれの抗体が認識する HA タンパク質のアミノ酸部位を推定した。

C. 研究結果

NIBRG-14 ウイルスと各モノクローナル抗体 (AY-2C2、YH-1A1、OM-b)とを混合し、96 ウェルプレートに培養しておいた MDCK 細胞に接種して CPE が認められたウェルからエスケープミュータントウイルスの回収を行った。その結果、AY-2C2 抗体を使用することにより 44 ウェルからエスケープミュータントウイルスが回収され、YH-1A1 抗体では 81 ウェル、OM-b 抗体では 27 ウェルからエスケープミュータントウイルスが回収された。

回収されたエスケープミュータントウイルスのプラーク単離を各モノクローナル抗体存在下で行った。その結果、AY-2C2 抗体混合時には 2 ウェルのエスケープミュータントウイルスから 7 クローンが単離され、YH-1A1 および OM-b 抗体混合時には各 1 ウェルのエスケープミュータントウイルスからそれぞれ 10 クローンと 8 クローンが単離された。

単離された各クローンについて HA 遺伝子解析を行い HA アミノ酸配列を決定し、NIBRG-14 ウイルスの HA アミノ酸配列との比較を行った。その結果、AY-2C2 抗体エスケープミュータントウイルスでは 43 番目のアスパラギン酸からチロシンまたはアスパラギンへの変異がみられた。YH-1A1 抗体エスケープミュータントウイルスでは 139 番目のグリシンからグルタミン酸、140 番目のリジンからグルタミン酸への変異がみられた。OM-b 抗体エスケープミュータントウイルスでは 43 番目のアスパラギン酸からチロシンまたはアスパラギンへの変異、45 番目のアスパラギン酸からチロシンへの変異、46 番目のグリシンからグルタミン酸への変異がみられた(表 1)。

D. 考察

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として、HA モノクローナル抗体を用いたサンドイッチエライザ法による HA 含量測定法の確立および改良を行ってきた。作製した 3 種類のモノクローナル抗体 (AY-2C2、

AY-2C2

クローン No.	ウェル No.	HA aa change
AY1	123	D43Y
AY2		D43Y
AY3		D43Y
AY4	122	D43N
AY5		D43N
AY6		D43N
AY7		D43N

YH-1A1

クローン No.	ウェル No.	HA aa change
YH1	63	G139E
YH2		G139E
YH3		G139E
YH4		K140E
YH5		K140E
YH6		G139E
YH7		G139E
YH8		G139E
YH9		K140E
YH10		K140E

OM-b

クローン No.	ウェル No.	HA aa change
OM1	87	D43N
OM2		D43N
OM3		D43Y
OM4		D43N
OM6		G46E
OM7		D43N
OM8		D43N
OM10		D45Y

表 1 NIBRG-14 エスケープミュータントウイルスの HA アミノ酸配列の変異解析 (アミノ酸番号は H5 ナンバリング)

YH-1A1、OM-b)の中和逃避ウイルス変異株によるエピトープ解析を行ったところ、AY-2C2 抗体は H5HA タンパク質の 43 番目のアスパラギン酸を、YH-1A1 抗体は 139 番目のグリシンと 140 番目のリジンを、OM-b 抗体は 43 番目と 45 番目のアスパラギン酸、46 番目のグリシンを認識していると推定された。

H5HA の立体構造予測から AY-2C2 抗体および

OM-b 抗体が認識すると推定される抗原部位は Site C であり、YH-1A1 抗体が認識すると推定される部位は Site A であった。どちらも HA タンパク質の表面上の部位であるとともに、該当するアミノ酸は抗原エピトープまたはその近傍部位に位置する。従って、作製したモノクローナル抗体は HAH5 タンパク質の表面を認識し、OM-b と AY-2C2、YH-1A1 抗体は 2 つの異なる部位を認識していることが示唆された。これらの解析結果をもとに、新型インフルエンザワクチンの HA タンパク質の中でこれらの抗体が認識すると推定されるアミノ酸情報を更に異なる手法で比較検討することにより、より反応性の高い抗体の選択が可能となると考えられる。

E. 結論

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に向けて作製した 3 種類の H5HA モノクローナル抗体のエピトープ解析を行った。その結果、これらの抗体は H5HA タンパク質の表面上を認識し、抗体により 2 つの異なる認識部位があることが示唆された。これらの解析結果は、新型インフルエンザワクチンのエライザ法を用いた HA 含量測定試験の確立を行う際、より反応性の高いモノクローナル抗体の選択に役立つ。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Terahara, K., Ishige, M., Ikeno, S., Mitsuki, Y-y, Okada, S., Kobayashi, K. and Tsunetsugu-Yokota, Y.: Expansion of activated memory CD4⁺ T cells affects infectivity of CCR5-tropic HIV-1 in humanized NOD/SCID/JAK3^{null} mice. *PLoS One*, 8:e53495, 2013.
- 2) Tsunetsugu-Yokota, Y. and Terahara, K.: Receptor usage and the pathogenesis in acute and chronic virus infections. *Front. Microbiol.*3:289, 2012.
- 3) Sugimoto, C., Nakamura, S., Hagen, S. I., Tsunetsugu-Yokota, Y., Villinger, F., Ansari,

A.A., Suzuki, Y., Yamamoto, N., Nagai, Y., Picker, L.J., Mori, K. : Glycosylation of SIV influences immune-tissue targeting during primary infection that leads to immunodeficiency or viral control *J. Virol.* 86:9323-9336, 2012.

- 4) Nomura, T., Yamamoto, H., Shiino, T., Takahashi, N., Nakane, T., Iwamoto, N., Ishii, H., Tstukamoto, T., Kawada, M., Matsuoka, S., Takeda, A., Terahara, K., Tsunetsugu-Yokota, Y., Iwata-Yoshikawa, N., Hasegawa, H., Sata, T., Naruse, T.K., Kimura, A., Matano, T. : Association of major histocompatibility complex class I haplotypes with disease progression after simian immunodeficiency virus challenge in Burmese rhesus macaques. *J.Virol.* 86:6481-6490, 2012.
 - 5) Mitsuki, Y-Y., Terahara, K., Shibusawa, K., Yamamoto, T., Tsuchiya, T., Ishige, M., Kobayashi, K., Morikawa, Y., Nakayama, T., Takeda, M., Yanagi, Y., and Tsunetsugu-Yokota, Y. : HIV-1 infection ex vivo accelerates measles virus infection by upregulating signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) in CD4⁺ T cells. *J. Virol.* 86:7227-7234, 2012.
 - 6) 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.
 - 7) 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. Newly established monoclonal antibodies for immunological detection of H5N1 influenza virus. *Jpn.J.Infect.Dis.* 65:13-18, 2012.
- ### 2. 学会発表
- 1) Ikeno, S., Terahara, K., Ishige, M., Suzuki, M., Mitsuki, Y-y, Morikawa, Y., Nakayama, T., Tsunetsugu-Yokota, Y.: Application of humanized mice for the evaluation of measles

virus vector. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Hyogo, September 11-14, 2012.

- 2) Tsunetsugu-Yokota, Y., Ishige, M. Ikeno, S., and Terahara, K.: Humanized mice as an animal model for human-tropic virus infection, in Immunological Mechanisms of Vaccination, Keystone Symposium, Ottawa, Canada, December 13-18, 2012.
- 3) 池野翔太、寺原和孝、石毛真行、鈴木基臣、光木裕也、森川裕子、中山哲夫、横田恭子。ヒト化マウスの麻疹ウイルスベクター評価系への応用。第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、平成24年11月。
- 4) 岩田奈緒子、永田典代、鈴木忠樹、

佐藤由子、横田恭子、西條政幸、森川茂、長谷川秀樹。SARS-CoV感染動物モデルを用いたUV不活化SARS-CoVの副反応発生機序について。第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、平成24年11月。

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：申請中
2. 実用新案登録
3. その他
特記なし

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 －

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

研究協力者 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

研究協力者 矢野茂生 国立感染症研究所血液・安全性研究部

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。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、これまでに、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製造されたワクチンのSRD力価の経時安定性や、ワクチンの主要有効成分であるHA蛋白のアミノ酸変異について調べ、X-179A株でHA蛋白のN129Dアミノ酸変異したワクチンはSRD力価安定性が上昇している可能性を見いだした。本年度は、X-179A株のSRD力価安定性に関わる要因を、発育鶏卵継代によりHA蛋白にどのようなアミノ酸変異が導入されるか、更にHA以外の遺伝子構成による影響や蛋白凝集の点から検討したところ、X-179A株の鶏卵馴化で起こったN129Dアミノ酸変異が主要因としてHA抗原蛋白の経時安定性上昇に寄与したと示唆された。以上から、ウイルス株によってはワクチンの安定性が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年パンデミックへの対策としてA/California/7/2009(X-179A)株で製造された1価ワクチンに関して、カナダや豪州において、ワクチンHA抗原含量の経時低下によりワクチン使用期限を短縮するという報告がされた。

我々はこれまでに、ワクチンHA抗原含量(SRD力価)の経時安定性に関する管理基準を作成するための知見収集を目的として、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製造されたワクチンのSRD力価の経時安定性や、ワクチンの主要有効成分であるHA蛋白のアミノ酸変異について調べ、X-179A株でHA蛋白のN129Dアミノ酸変異したワクチンはSRD力

価安定性が上昇している可能性を見いだした。

本年度は、X-179A株のSRD力価安定性に関わる要因を、以下の点から検討した。

- (1)発育鶏卵での継代によりHA蛋白にどのようなアミノ酸変異が導入されるか
- (2)HA以外の遺伝子構成による影響
- (3)加熱試験におけるSRD力価やHA価の減少と蛋白凝集の有無

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)

: A/California/7/2009(X-179A)

(H1N1)pdm09

(2) ワクチン製造候補株

- ・ A/California/7/2009(X-179A) (H1N1)pdm09、
- ・ A/California/7/2009(X-181) (H1N1)pdm09、
- ・ A/California/7/2009(NIIDRG-5) (6:2)、
- ・ A/California/7/2009(NIIDRG-7) (7:1)

NIIDRG-5 株および NIIDRG-7 株(感染研で RG 法により作製した RG ウイルスで、HA/NA 又は HA が A/California/7/2009 由来の株である。

これらの各株を発育鶏卵で増殖させ採取したしょう尿液を、ショ糖クッション法にて精製して用いた。

2. 方法

(1) 発育鶏卵での継代

X-179A 株を 10 日卵に接種し、34°C48 時間培養後しょう尿液を採取し、PBS(-)で 1000 倍に希釈して、次の 10 日卵に接種した。

(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

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

(4) 液中の蛋白凝集

加熱による蛋白凝集の有無は、動的光散乱法(DLS)によって調べた。サンプル液を DLS 測定器(Model 802DLS with software Omni Size 3.0, Viscotek)にて室温で 10 秒間測定した。

C. 研究結果

1. 発育鶏卵での継代による HA 遺伝子変異

X-179A 株を発育鶏卵で継代したところ、HA のアミノ酸配列に N129D 変異の起こることが確認

できた(Table 1)。

2. X-179A 由来 N129D 変異株及びワクチン製造候補株の 50°C 加熱試験

次に、X-179A の N129D 変異株(EX/E1/E9)をウイルス精製し(Whole Virus:WV)、50°C 加熱試験をして X-179A 株(WV)や X-181 株(WV)と比較したところ、Fig. 1 に示すように、X-179A の N129D 変異株は、SRD 力価および HA 価に関して、X-179A 株より加熱安定性が向上し、アミノ酸配列が相同(129D)である X-181 株と同程度の安定性となった。

一方、X-179A 株(5:3)と HA 以外の遺伝子構成の影響を調べるため、NIIDRG-5(6:2)(WV)、NIIDRG-7(7:1)(WV)を用いて同様の 50°C 加熱試験を行ったところ、X-179A 株(5:3)と比較して、安定性に差がなかった(Fig. 1)。

3. 液中の蛋白凝集

株間の差はあるが、加熱試験により SRD 力価や HA 価が経時的に低下する現象が見られるので、これらが蛋白凝集によって引き起こされているのか調べるため、加熱試験後の参照ワクチンについて、DLS 測定を行った。Fig. 2 に示すように、加熱試験の前後で液中の粒度分布は殆ど変化がなく、蛋白凝集は見られなかった。なお、粒度分布のピーク粒子半径(55-60nm)は、参照ワクチンの TEM 像から、ロゼッタ状 HA-NA 集合体の大きさと推察された。

D. 考察

昨年度の研究では、50°C 加熱安定性について、ワクチン製造株 X-179A 株 と X-181 株を比較すると、whole、split、精製 HA のどの状態でも X-181 株の方が SRD 力価や HA 価の経時低下が穏やかであり、X-181 株の方が加熱安定性の高いことがわかった。

一方で、海外からの報告とは異なり、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見られなかったこともわかった。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関連している可能性が推察された。

以上を踏まえて、本年度の研究では、X-179A 株の SRD 力価安定性に関わる要因を、(1) 発育鶏卵での継代により HA 蛋白にどのようなアミノ酸変異が導入されるか、(2) HA 以外の遺伝子構成による影響、(3) 加熱試験における SRD 力価や HA 力価の減少と蛋白凝集の有無 の点から検討した。その結果、発育鶏卵での継代により、X-179A 株の HA 蛋白に N129D 変異が導入されることがわかった。更に、この N129D 変異株は加熱安定性が向上している一方で、X-179A 株(5:3)と HA 遺伝子は同じで他の遺伝子構成の異なる NIIDRG-5(6:2)株、NIIDRG-7(7:1)は、加熱安定性が向上しなかった。

また、ワクチンの DSL 解析により、加熱試験による SRD 力価の減少は、蛋白凝集によるものではないことが明らかとなった。更に、昨年度の知見として、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ることから、HA 蛋白自体の立体構造の安定性が大きな要因となっている可能性が推察された。

以上まとめると、X-179A 株の鶏卵馴化で起こった N129D アミノ酸変異が主要因として HA 抗原蛋白の経時安定性上昇に寄与したと考察できる。

ウイルス株によっては、ワクチンの安定性が 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

ウイルス株によってはワクチンの安定性が 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

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 HA ワクチンにおける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。

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

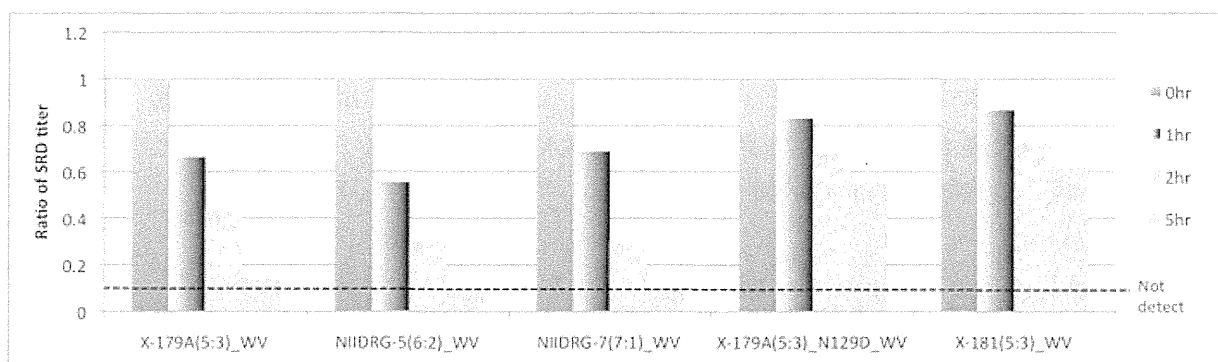
3. その他 特記事項なし

【Table 1】

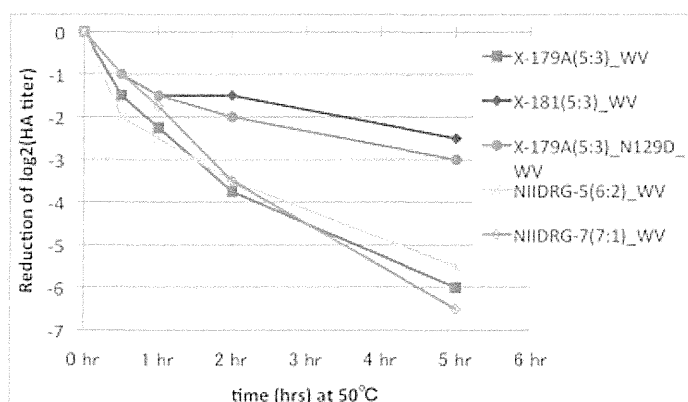
Mutations by egg-passage observed in HA gene of X-179A. HA amino acid residues are numbered without the signal peptide sequence.

vaccine strain	Passage No.	HA gene		HA titer (0.5%TRBC)	Remark
		Position	Amino acid		
A/California/7/2009(X-179A)	EX/E1/E2	129	N	512	EX/E1 is the vaccine seed of Japan
	EX/E1/E3	129	N	512	
	EX/E1/E4	129	N	512	
	EX/E1/E5*	129	Mix(N>D)	1024	
	EX/E1/E6*	129	Mix(N<D)	1024	
	EX/E1/E7*	129	D	1024	
	EX/E1/E8*	129	D	1024	
	EX/E1/E9*	129	D	2048	

* A453T of nucleic acid, a silent mutation, was also observed.

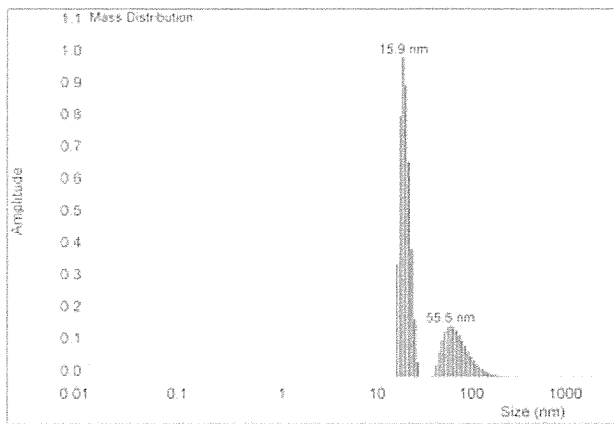


(a) Heat stability of SRD titer

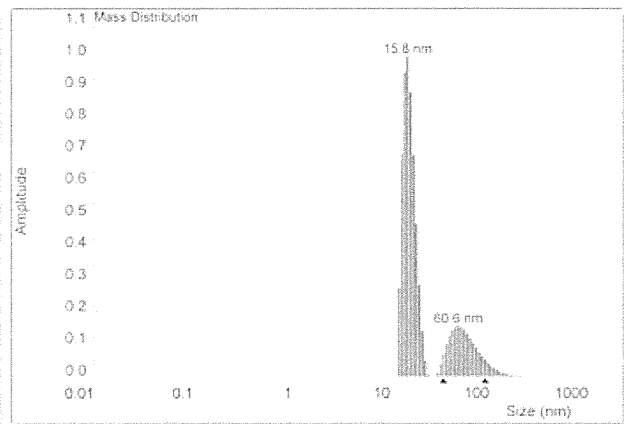


(b) Heat stability of HA titer

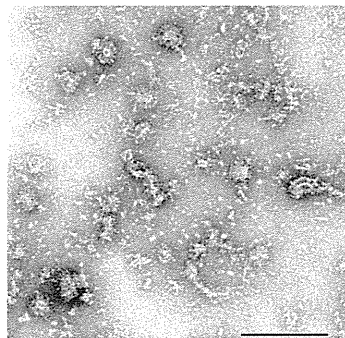
【Fig.1】 Heat stability of SRD titer and HA titer on N129D mutation virus and genetic reassortant viruses (NIIDRG-5, NIIDRG-7).



(a) DLS of the reference vaccine without heat



(b) DLS of a reference vaccine with heat (50°C1hr)



(c) TEM of the reference vaccine without heat

【Fig. 2】 Particle size distribution of the reference vaccine (Lot 2010Apdm) (a) without heat and (b) with heat (50°C1hr) by DLS. Size on the horizontal axis indicates Hydrodynamic Radius (Rh). (c) The negative staining figure by TEM of the reference vaccine without heat. Scale bar is 200nm.