

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、全粒子ワクチン及びスプリットワクチンにより誘導された抗体の質を詳細に解析し、全粒子ワクチンにより誘導された抗体は avidity の高い抗体であり、サブクラスとしては IgG2a が主になっていることが分かった。また抗血清移入実験により、全粒子ワクチンにより誘導された抗体は防御効果が高いことを確認した。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、昨年度までに 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、初回免疫では全粒子ワクチンの方が、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であることが分かった。本年度は、誘導された抗体の質の解析を行った。

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。この時尿素処理し抗原との結合能の低い抗体を変性させ除去することにより、結合能の高い抗体がどの程度含まれているかを測定した。さらに、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。

C. 研究結果

異なる剤形のワクチンにより誘導された抗体の質的解析

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の抗血清を採取し、ワクチン特異的な抗体に含まれる抗原結合能の高い抗体の比率を測定した。初回免疫の場合には高結合能をもつ抗体は全粒子ワクチン、スプリットワクチンのどちらで誘導した場合でも低く、ワクチン剤形による差は認められなかった (図 1A)。一方、追加免疫後の抗血清では、図 1B に示した通り全粒子ワクチン2回免疫の場合に最も高結合能の抗体が多く、スプリットワクチンが初回免疫または追加免疫のいずれかで用い

られた場合には低下することが分かった。

この血清中に含まれる IgG のサブクラスの違いを検討したところ、全粒子ワクチンでは IgG2a が、スプリットワクチンでは IgG1 がそれぞれ優位に産生誘導されていることが確認できた。一方、それぞれのサブクラスにおいて、高結合能を持つ抗体の割合は大きく変わらなかった（表）。

D. 異なる剤形のワクチンにより誘導された抗体移入による防御効果

追加免疫により産生誘導される抗体の質と防御効果を検討するため、全粒子ワクチンとスプリットワクチンで2回免疫した抗血清を非免疫マウスに移入した後ウイルスを感染させ、肺中のウイルス価を測定したところ、図3に示す通り、全粒子ワクチンで免疫した抗血清を移入したマウスでウイルス価の有意な低下が認められたが、スプリットワクチンの場合では認められなかった。この時移入した抗血清の抗体価を表に示した。

D. 考察

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には、結合能に違いがあることを見いだした。これは、B細胞の成熟化に対する影響が剤形により違うことが原因であると考えられ、今後どのようなシグナルで制御されているか検討する必要がある。またサブクラスとしては、全粒子ワクチンにより IgG2a が、スプリットワクチンにより IgG1 がそれぞれ優位に産生誘導されることを確認した。さらに、全粒子ワクチンにより誘導された結合能の高い抗体の割合の多い抗血清を移入した場合の方が防御効果も高く、高結合能を持つ抗体の割合と相関があることが分かった。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。

E. 結論

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 avidity が高かった。

サブクラスとしては IgG2a が高かったが、avidity はサブクラスによる違いは無かった。抗血清移入実験により、ワクチンによる防御効果は抗体によるものであることが確認できた。このように得られた知見は、剤形の異なるワクチンの品質管理を行う上で有益な情報となることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

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)

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42回日本免疫学会学術集会(2012年12月、神戸)

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

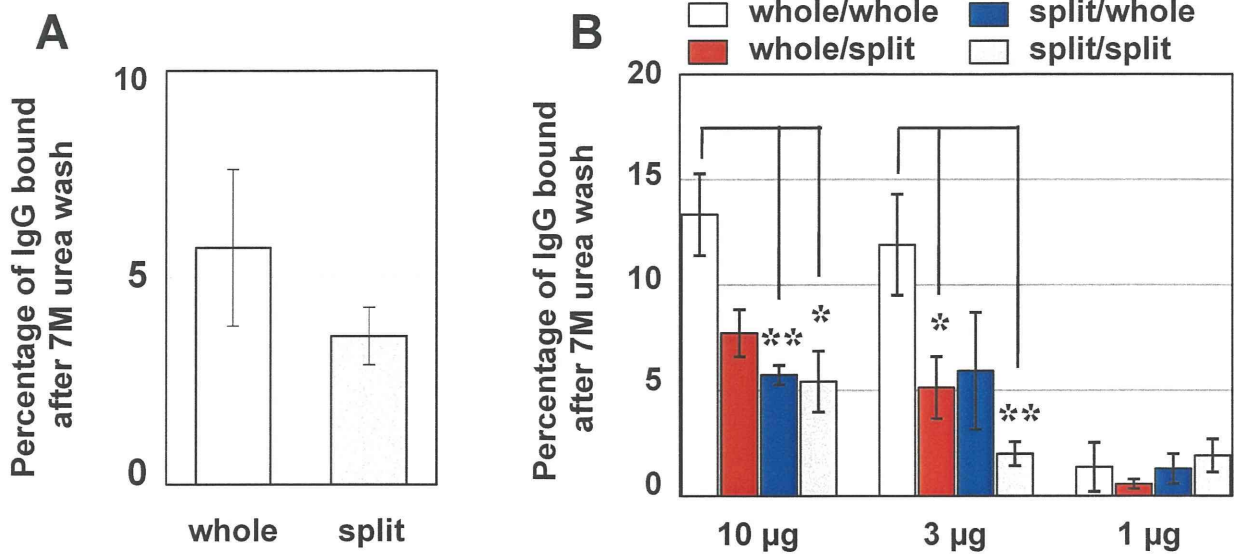


図1 剤形の異なるインフルエンザワクチンにより誘導された抗体の結合能

A)全粒子ワクチンまたはスプリットワクチンを10 µgの用量で接種28日後の血清中のワクチン特異的抗体の抗原結合能を尿素変性法を用いて測定した（白：全粒子ワクチン接種群、グレー：スプリットワクチン接種群）。B)全粒子ワクチンまたはスプリットワクチンを1-10 µgの用量で2回接種（4週間間隔）し14日後の血清中のワクチン特異的抗体の抗原結合能を尿素変性法を用いて測定した（白：全粒子ワクチン2回接種群、赤：初回免疫：全粒子ワクチン、追加免疫：スプリットワクチン、青：初回免疫：スプリットワクチン、追加免疫：全粒子ワクチン、グレー：スプリットワクチン2回接種群）。

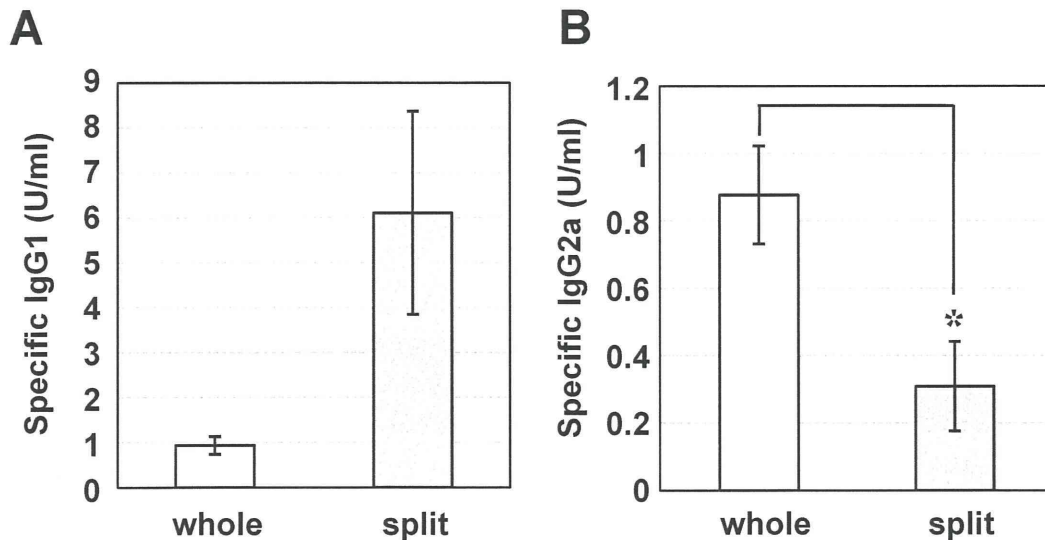


図2 剤形の異なるインフルエンザワクチンにより誘導された抗体のサブクラス

全粒子ワクチンまたはスプリットワクチンを2回接種（4週間間隔）し14日後の血清中のワクチン特異的抗体のIgGサブクラスを測定した（白：全粒子ワクチン2回接種群、グレー：スプリットワクチン2回接種群）。AにIgG1、BにIgG2aの結果をそれぞれ示す。

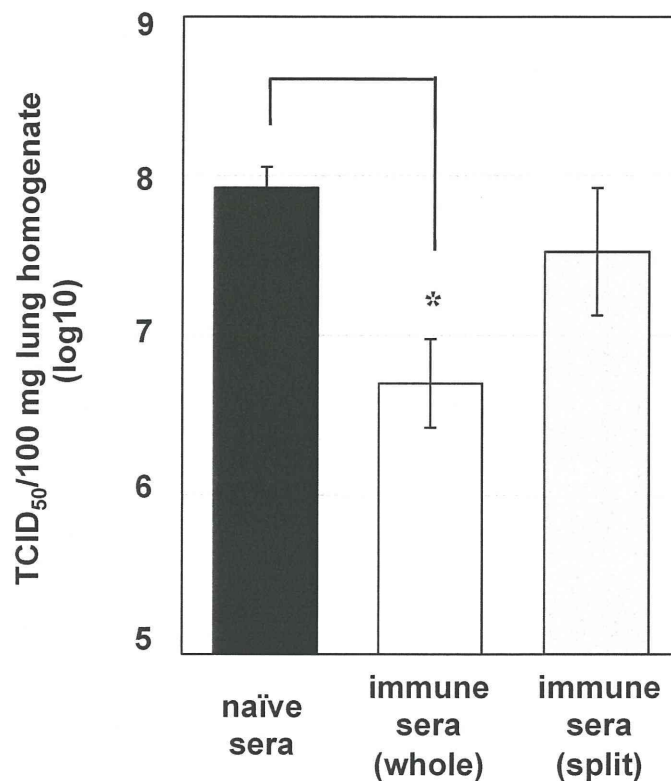


図3 剤形の異なるインフルエンザワクチンにより誘導された抗体移入による防御効果

全粒子ワクチンまたはスプリットワクチンを2回接種（4週間間隔）し14日後の血清を非免疫マウスに接種し翌日インフルエンザウイルスを感染した。感染3日目に肺を採取し、肺中のウイルス価を測定した。対照群として、非免疫マウスの抗血清を接種した。（黒：対照群、白：全粒子ワクチン接種マウス血清移入群、グレー：スプリットワクチン接種マウス血清移入群）

表：移入実験に用いた抗血清の抗体価

	初回免疫：全粒子ワクチン 追加免疫：全粒子ワクチン	初回免疫：スプリットワクチン 追加免疫：スプリットワクチン	非免疫血清
ワクチン特異的IgG(μg/ml)	18.0	140.5	N.D.
HI価	160	1280	N.D.
中和抗体価	320	2560	N.D.
高結合IgGの割合 (%)	7.8	1.3	N.D.
高結合IgG1の割合 (%)	9.6	1.9	N.D.
高結合IgG2aの割合 (%)	14.9	1.9	N.D.
IgG1/IgG2aの比	1.0	20.9	N.D.

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

研究分担者 大西 和夫 国立感染症研究所免疫部・主任研究官

研究協力者 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

研究協力者 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

研究要旨

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出来れば理想的である。本研究では、近年急速な進展を見た次世代シーケンサ技術を応用し、独自の方法を開発してワクチン等抗原免疫で惹起される抗体応答の網羅的解析を試みた。その結果、マウスモデルにおいて、抗体レパートリーの網羅的解析を可能にする新規手法の確立に成功した。

A. 研究目的

現在、国内で製造販売承認されているインフルエンザワクチンには、スプリットワクチンとアラムアジュバント添加全粒子ワクチンの2種類の剤型のワクチンがある。また、新規（開発中）のアジュバントとしてMF59、AS03、各種TLRリガンドなどがある。これらの剤型やアジュバントによって誘導される抗体応答の差異の詳細を測定する方法は未だ樹立されていない。また、ワクチン製造のための発育鶏卵継代馴化ウイルスでは、しばしば宿主馴化変異が起こりワクチン有効性低下の一因となる場合がある。ウイルスのどのような馴化変異がワクチンとしての免疫原性に影響を与えるのかを知ることは、ワクチンの品質管理の観点から重要である。

本研究では、異なる免疫賦与能が必要とされる季節性およびパンデミックインフルエンザワクチン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ートリーの観点から測定する試験法について、おもにマウスモデルを用いて開発に着手した。

ワクチンやワクチン製造株の特性に応じた性能を評価する品質管理試験を確立すれば、ワクチンが一定の品質で供給され国民の健康や医療費の抑制などに貢献できる。

B. 研究方法

ワクチン免疫によって引き起こされる抗体応答の抗原認識多様性、抗体産生細胞のクローン構成、各抗体レパートリーの抗体産生量、各抗体クラスの構成比などについて網羅的に解析する新規手法を以下のように考案し実用化を検討した。

1) 抗体応答レパートリーの網羅的解析法の開発（基本的枠組み）：抗体レパートリーの質と量を網羅的に測定するために、マウスのリンパ組織（脾臓）または全白血球細胞より mRNA を抽出し、cDNA 合成後、3'-末端に SMARTer_oligomer をライゲーションした。生体中で各クラスの抗体タンパク質として発現する mRNA のみを検出するために抗体定常部ドメイン1（CH1）の領域に PCR 増幅のための reverse primers を各抗体クラスごとに設定した。PCR 増幅の条件を最適化し、各クラ

スの抗体レパートリーcDNA を十分量増幅する条件を設定した。次世代シーケンサとしてロッシュ社 454 システムを用いて、上記抗体レパートリーcDNA をピロシーケンサ法で解析し、400-500bp の配列として7 - 20 万リードのアンプリコン配列を取得した。

2) 抗体応答レパートリー配列データのバイオインフォマティクスの解析：上記、次世代シーケンサにより取得した大量の抗体遺伝子発現配列データをバイオインフォマティクスの手法を用いて解析するプロトコルを開発した。454 システムを用いて取得した配列データは各種ノイズを含むが、これを一括して軽減するために、塩基配列データをアミノ酸配列に翻訳し、最長の ORF を与える読み枠でフィルターをかけるプログラムを作成した。このフィルターを通過した配列について、その Vh、Dh、Jh 遺伝子を同定するため、

IMGT (The International Immunogenetics Information System®, Montpellier France, <http://www.imgt.org/HighV-QUEST/index.action>)

サーバを利用した。この時、実験に使用したマウス系統 (C57BL/6) の抗体遺伝子座のゲノム配列から、既報論文を参考にして各 Vh、Dh、Jh 遺伝子のレファレンス配列を設定した。各 read のVDJ 再構成のパターン、体細胞突然変異のパターン、各 read の系統解析について、既存のプログラムおよび独自に開発したプログラムを用いて解析した。

3) モデル抗原に対する抗体応答の解析：従来、免疫学領域において最も広範に研究されて来たモデル抗原に NP-CGG (Nitrophenol - Chicken gamma globulin)がある。C57BL/6 系統のマウスに対して NP-CGG を免疫すると抗体 V 遺伝子として Vh186.2 が優性に応答する事が報告されている。また、Vh186.2 遺伝子から構成される抗体の抗原認識部位のうち、33 番目のアミノ酸残基がロイシンに変異する場合と 99 番目のアミノ酸残基がグリシンに変異する場合に抗体の抗原に対する親和性が飛躍的に上昇する事が知られている。この NP-CGG に対する抗体応答をモデルシステムとし

て、今回開発した新規方法を評価した。

4) ワクチンウイルス株特異的抗体産生細胞のフローサイトメトリーを用いた分離法の確立：上述した抗体レパートリー解析は、個体のもつ抗体レパートリーの全体像を俯瞰することが可能である。しかし、ワクチン応答性抗体産生細胞のうちどの抗体レパートリー群が記憶B細胞に組み込まれるか、また、どのレパートリー群が長期プラズマ細胞として保持されるか等の知見を得るには、ウイルス抗原特異的B細胞を免疫学的マーカーによって分類し、分取する必要がある。そこで、不活化ウイルス粒子をビオチン標識または蛍光色素標識した上で、抗体産生B細胞の細胞膜表面に発現する膜型抗体分子 (B細胞受容体) との結合をフローサイトメトリーにより検出する測定系を開発した。

C. 研究結果

1) 抗体応答レパートリーの網羅的解析法の開発：未免疫の C57BL/6 マウス 4 匹より脾臓を摘出し、Trizol を用いて mRNA を抽出し、cDNA 合成後、上述の方法で、発現している抗体遺伝子群の VhDhJhCh1 領域の塩基配列を 454 システムを用いて網羅的に取得した。この時、VhDhJhCh1 領域の PCR 増幅の条件を詳細に検討し、最適化した。また、各抗体クラス (IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgA) の CH1 部位に設定した PCR reverse primer の塩基配列についても最適化した。その結果、400-500bp のアンプリコン配列として抗体レパートリーcDNA 由来の塩基配列を7万 ~ 20 万リード取得することが出来た。このリード数は、以下で述べるように、Vh 遺伝子領域に内在する全ての Vh 遺伝子 (C57BL/6 においては偽遺伝子を除くと 110 個) から発現する抗体レパートリーの全域をカバーしているものと考えられた。また、興味ある事に、4 匹のマウスより取得した抗体レパートリー構成パターンは非常に高度な類似性を持っていた。

2) 抗体応答レパートリー配列データのバイオインフォマティクスの解析：取得した大量の抗体遺

伝子発現配列データを解析するプロトコールを確立するために 11 個の独自の Perl プログラムを開発した。実験に使用したマウス系統 (C57BL/6) の抗体遺伝子座のゲノム配列から、Vh、Dh、Jh 各遺伝子のレファレンス配列を設定し、IMGT サーバを利用して Vh-Dh-Jh 再構成パターンを分類した。その結果、未免疫マウスの抗体レパートリーが構築される過程に働くルールについて興味ある新知見を得ることが出来た。

3) モデル抗原に対する抗体応答の解析：NP-CGG をモデル抗原として 3 匹の C57BL/6 マウスを免疫した。対照群として NP 非結合 CGG を免疫した同系統マウスを 3 匹、および、未免疫同系統マウスを 3 匹おいた。NP-CGG を免疫した 3 匹のマウスにおいて Vh186.2 が顕著に応答しており、NP 非結合 CGG 免疫マウス、未免疫マウスにおいては Vh186.2 の発現は顕著に低かった。また、Vh186.2 配列上に起こった突然変異についても詳細に検討した結果、IgM に比べてクラススイッチの起こった IgG1 において高親和性突然変異 (33 位ロイシン、99 位グリシン) の蓄積が顕著に高かった。これらの結果は、単一の抗原に対する抗体応答が、抗体レパートリーの網羅的解析から検出可能であることを示しており、その応答パターンは従来の報告を再確認するものであった。本手法により抗体レパートリー変動が的確に把握できる事が示された。本方法では、個体の全抗体レパートリーの抗原免疫によるダイナミックな変動の中の一局面として Vh186.2 遺伝子発現の動態変化を捉えることができる点が新規であり、その世界初の事例となった。

4) ワクチンウイルス株特異的抗体産生細胞のフローサイトメトリーを用いた分離法の確立：不活化インフルエンザウイルス粒子をビオチン標識または蛍光色素標識 (Alexa654, Alexa700, Alexa405) して、インフルエンザウイルス・ワクチン免疫マウス由来の脾細胞と反応させた。この時、脾細胞をシアリダーゼ処理する事により、標識ウイルスの非特異的な結合を除去できる事を見つけた。各種シアリダーゼ酵素の有効性の検討、

処理条件の最適化を行った結果、非特異的結合をほぼ完全に除く条件を設定できた。フローサイトメトリーを用いた解析で、不活化ウイルスを免疫したマウスの脾細胞のうち、B220+IgD-IgM-IgG1+細胞の約 1 % が標識ウイルス粒子特異的であった。この B 細胞集団の記憶 B 細胞分画への移行、長期プラズマ細胞への分化について検討中である。

D. 考察

ワクチン免疫に誘起される抗体応答を網羅的に解析する新規手法を検討した。

モデルマウスのリンパ組織 (脾臓) または全白血球細胞の mRNA を抽出し、抗体 VhDhJh-CH1 ドメイン配列を PCR 増幅するための reverse primers を各抗体クラスごとに設定した。抗体各クラスの VhDhJh-CH1 領域を PCR 増幅して 454 システムによるピロシーケンス法で解析することにより、抗体レパートリーの質と量を十分な厚みで網羅的に測定することができた。マウスのリンパ組織の全 mRNA を出発材料としている点で、得られた抗体レパートリーには免疫細胞精製過程などで生ずるバイアスがかかっておらず、マウス個体の抗体レパートリーの全体像を歪めずに俯瞰できる方法であるところが画期的な点で、世界初の成果と言える。本手法は、抗体レパートリー発現量の定量的測定を行える点でも優れている。

得られた大量の抗体遺伝子発現配列データの意味付けを行うために、新規に開発したプログラムを多数作成し、既存プログラムの利用も含めて独自の解析プロトコールを構築する事が出来た。今後、得られたデータを詳細に解析する必要がある、さらに改良して行く。

4 匹の未免疫マウスより取得した抗体レパートリー構成パターンは非常に高度な類似性を持っていた。この事は、従来、抗体遺伝子の VDJ 再構成がランダムに起こり、それが抗体の抗原認識多様性の生成要因になるという既成概念と相反するようにも見える。さらに詳細な解析を行い、免

疫学的な意義付けを行う必要がある。

NP-CGG をモデル抗原として免疫した 3 匹の C57BL/6 マウスを解析した結果、Vh186.2 が顕著に応答しており、Vh186.2 配列上に起こった突然変異も、IgG1 において高親和性突然変異（33 位ロイシン、99 位グリシン）の蓄積が有意に測定された。この事は、従来の報告と一致し、本手法により抗体レパートリー変動が的確に把握できる事が確認された。本手法の革新的な点として、個体の全抗体レパートリーのダイナミックな変動の中の一局面として Vh186.2 遺伝子発現の動態変化を捉えることができる点が挙げられ、その点で世界初の事例となる。

フローサイトメトリーを用いたウイルス抗原特異的 B 細胞分離法を検討した結果、抗体産生細胞分画をシアリダーゼ処理する事により、標識ウイルスの非特異的な結合を除去できる事を見つけ、その条件を最適化した。この方法を用いて、ウイルス免疫マウスの B220+IgD-IgM-IgG1+細胞の約 1 %が標識ウイルス粒子特異的であることを示した。ワクチンにより誘起された抗原特異的抗体レパートリーのうち、ワクチンに対する免疫記憶としてどのレパートリーが組み込まれるのかといった解析が、この方法を応用・発展させる事で可能になる。

E. 結論

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出来れば理想的である。本研究では、近年急速な進展を見た次世代シーケンサ技術を応用し、独自の方法を開発して抗原免疫で惹起される抗体応答の網羅的解析を試みた。その結果、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。本方法を用いて、ワクチンやワクチン製造株の特性に応じた性能を評価する品質管理試験を確立すれば、ワクチンが一定の品質で供給され

国民の健康や医療費の抑制などに貢献できると考える。

F. 研究発表

1. 論文発表
準備中

2. 学会発表

「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」、陳富・船越舟一・孫琳・大西和夫、第 4 1 回日本免疫学会総会、神戸 (2012)

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
特になし

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Manabu Ato, Yoshimasa Takahashi, Hideki Fujii, 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

