

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

201225019B

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

目 次

I. 総合研究報告

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. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 16

III. 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、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や、ウイルス粒子への取り込みに関係すると考えられる領域を改変したウイルスを作出して解析したところ、ウイルスの増殖性とウイルス蛋白量の増加が期待される高生産性ワクチン株の作製の基盤となりうることを明らかにした。

(2) 開発したサンドイッチELISA法を用いて全粒子不活化ワクチンについてHA含有量を測定したところ、力価試験として標準に実施されている一元放射免疫拡散試験法（SRD）で測定した値と比較的良好一致したが、再現性に課題があることがわかった。また、サンドイッチELISA法に使用しているモノクローナル抗体が、ウイルス抗原HAのどの部位を認識しているか、エスケープ変異株を分離してその遺伝子配列から決定した。その結果、2つの異なる部位を認識するモノクローナル抗体に分類され、ワクチンの異なる部位の立体構造の保持を確認するために有用な試験法であることを明らかにした。

(3) 油系エマルジョンアジュバント添加型インフルエンザHAワクチンについてSRD試験によるHA含量測定を行うために、抗原抗体複合体の形成を促進させるためにPEG添加アガロースゲルを用いる方法、更に、ワクチン検体からアジュバントを分離させるために適切な超遠心処理を行う方法を検討し、有効な改良法を確立した。

(4) 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蛍光標識方法を確立し、抗原提示細胞が両者ワクチンを取り込む様子の時間変化を調べ、免疫担当細胞への取り込み方が両者ワクチン間で異なることを明らかにした。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も同程度に高くなることがわかった。また、全粒子ワクチンの2回接種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と比較してウイルス抗原に対して強い結合力(Avidity)を示すことを明らかにした。加えて、誘導された結合力の高い抗体は、インフルエンザウイルスの感染防御に効果が高いことがわかった。

(5) ワクチンによる免疫応答を抗体のレパートリーの観点から次世代シーケンサー技術を応用し

て抗体応答の網羅的解析ができる新規手法の開発に成功した。新規開発した抗体応答の網羅的解析方法はワクチンの接種戦略を検討するのに役立つことが期待される。

(6) HA 蛋白のある種の変異はワクチンの抗原性には影響は与えないが、ワクチンの経時安定性に影響を与えることを明らかにした。このような変異が、ワクチン製造用ウイルス株を発育鶏卵で継代培養することによって導入されることがわかった。またこの HA のアミノ酸変異が主にワクチン力価の安定性に寄与していることを、リアソータントを使用して明らかにした。

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

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) 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スジェネティクス (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) での測定結果と比較を行った。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。

3) 新規アジュバント含有ワクチンの品質管理試験の開発、標準化

油系エマルジョンアジュバント添加型インフルエンザ HA ワクチンに対する SRD 試験改良法の確立を目的として、抗原抗体複合物の形成を促進させるために PEG 添加アガロースゲルを用いる方法、更に、ワクチン検体からアジュバントを分離させるために適切な超遠心処理を行う方法を検討した。

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。さらに、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。また、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。

5) 新型インフルエンザワクチンの品質管理に必要な物理化学試験の開発

全粒子ワクチンおよびスプリットワクチンの間に抗原提示細胞内への取り込みとプロセッシング過程にどのような違いがあるのかを解析する目的で両者のワクチンを蛍光物質で標識し、抗原提示細胞への取り込みとプロセッシング過程を解析した。

6) 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。また、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。

7) 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ケ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) 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。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が、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) 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。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 μg 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した。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ことがわかった。

さらに、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に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。

3) 新規アジュバント含有ワクチンの品質管理試験の開発、標準化

油系エマルジョンアジュバント添加型インフルエンザ HA ワクチンは、小分け製品に予めアジュバントが混合されていることや、アジュバントのない季節性インフルエンザ HA ワクチンより HA 含量が少ないことから、一元放射免疫拡散試験 (SRD 試験) 上の問題点として、従来の SRD 試験より抗原抗体複合物の沈降輪形成が弱く、HA 含量の計測が困難である。本研究では、油系エマルジョンアジュバント添加型インフルエンザ HA ワクチンに対する SRD 試験改良法の確立を目的として、抗原抗体複合物の形成を促進させるために PEG 添

加アガロースゲルを用いる方法、更に、ワクチン検体からアジュバントを分離させるために適切な超遠心処理を行う方法を検討した。その結果、PEG 添加アガロースゲルを用いる方法によって HA 含量の少ない HA ワクチンであっても、従来法と同様に SRD 試験による HA 含量測定ができることが確認された。更に、適切な超遠心条件によってワクチン検体中のアジュバントを再現性良く除去できることが HPLC で確認できた。このように、油系エマルジョンアジュバント添加型インフルエンザ HA ワクチンの SRD 試験による HA 含量測定に有効な改良法が確立できたと言える。

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。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。

次に、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。

5) 新型インフルエンザワクチンの品質管理に必要な物理化学試験の開発

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・形状はワクチンの抗原提示細胞へのデリバリーとそのプロセッシングをコントロールする上で重要である。両ワクチン製剤の蛍光標識方法を確立し、ついで、抗原提示細胞が両者ワクチンを取り込む様子の時間変化を調べ、免疫担当細胞への取り込み方が両ワクチンの間で異なることを明らかにした。全粒子ワクチンもスプリットワクチンも H2-DM 存在リソソームコンパートメントへの輸送される一連の過程は同じであったが、スプリットワクチンは短時間に取り込

まれ、H2-DM 存在リソソームコンパートメントへ輸送されるのに対して、全粒子ワクチンは時間経過と共に取り込み量と H2-DM 存在リソソームコンパートメントへの輸送量が増加した。この取り込みと輸送の動態に関する時間経過の違いがワクチンの形状とどのような関係にあるのか、さらにこの違いがアジュバントの存在でどのような変化を受けるのかについては今後の研究課題である。このような研究を通じて、ワクチンの物理化学的性状がどのようにワクチンの免疫原性に関与するのか明らかにすることによって、ワクチンの新しい品質管理ができる可能性がある。

6) 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

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が示唆された。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。

次に N129D 変異がどのようにして導入されたのか明らかにするために、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。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場面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。また、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シジェネティック (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。

7) 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トリーの構成パターンに高い類似性が認められた。本研究では、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出できることが示された。抗体レパ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) インフルエンザウイルスの非コード領域や、ウイルス粒子への取り込みに関係すると考えられる領域を改変したウイルスを作出して解析したところ、ウイルスの増殖性とウイルス蛋白量の増加が期待される高生産性ワクチン株の作製の基盤となりうることを明らかにした。

(2) 開発したサンドイッチ ELISA 法を用いて全粒子不活化ワクチンについて HA 含有量を測定したところ、力価試験として標準に実施されている一元放射免疫拡散試験法 (SRD) で測定した値と比較的良く一致したが、再現性に課題があることがわかった。また、サンドイッチ ELISA 法に使用しているモノクローナル抗体が、ウイルス抗原 HA のどの部位を認識しているか、エスケープ変異株を分離してその遺伝子配列から決定した。その結果、2つの異なる部位を認識するモノクローナル

抗体に分類され、ワクチンの異なる部位の立体構造の保持を確認するために有用な試験法であることを明らかにした。

(3) 油系エマルジョンアジュバント添加型インフルエンザ HA ワクチンについて SRD 試験による HA 含量測定を行うために、抗原抗体複合体の形成を促進させるために PEG 添加アガロースゲルを用いる方法、更に、ワクチン検体からアジュバントを分離させるために適切な超遠心処理を行う方法を検討し、有効な改良法を確立した。

(4) 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蛍光標識方法を確立し、抗原提示細胞が両者ワクチンを取り込む様子の時間変化を調べ、免疫担当細胞への取り込み方が両者ワクチンの中で異なることを明らかにした。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も同程度に高くなることがわかった。また、全粒子ワクチンの 2 回接種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と比較してウイルス抗原に対して強い結合力 (Avidity) を示すことを明らかにした。加えて、誘導された結合力の高い抗体は、インフルエンザウイルスの感染防御に効果が高いことがわかった。

(5) ワクチンによる免疫応答を抗体のレパートリーの観点から次世代シーケンサー技術を応用して抗体応答の網羅的解析ができる新規手法の開発に成功した。新規開発した抗体応答の網羅的解析方法はワクチンの接種戦略を検討するのに役立つことが期待される。

(6) HA 蛋白のある種の変異はワクチンの抗原性には影響は与えないが、ワクチンの経時安定性に影響を与えることを明らかにした。このような変異が、ワクチン製造用ウイルス株を発育鶏卵で継代

培養することによって導入されることがわかった。またこの HA のアミノ酸変異が主にワクチン力価の安定性に寄与していることを、リアソータントを使用して明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ikeno D, Kimachi K, Kino Y, Harada S, Yoshida K, Tochiyama S, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Okada K, Miyazaki C, Ueda K.
Immunogenicity of an inactivated adjuvanted whole-virion influenza A (H5N1, NIBRG-14) vaccine administered by intramuscular or subcutaneous injection. *Microbiol Immunol* 54: 81-88 (2010)
- 2) Yuma Iwai, Hitoshi Takahashi, Dai Hatakeyama, Kazunori Motoshima, Minoru Ishikawa, Kazuyuki Sugita, Yuichi Hashimoto, Yuichi Harada, Shigeyuki Itamura, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Yoshihisa Sei, Kentaro Yamaguchi, Takashi Kuzuhara
Anti-influenza activity of phenethylphenylphthalimide analogs derived from Thalidomide. *Bioorg Med Chem* 18: 5379-5390 (2010)
- 3) 信澤枝里、板村繁之：新型インフルエンザに対するワクチン開発. *呼吸器内科* 17:51-57 (2010)
- 4) 佐藤佳代子、板村繁之：インフルエンザワクチンの開発動向と今後の展望. *日本臨床* (2010)
- 5) Tsunetsugu-Yokota, Y. and Yamamoto, T.:
Mammalian microRNAs.: post-transcriptional gene regulation in RNA virus infection and

- therapeutic applications. *Frontiers in Microbiology* 1:1-9, 2010
- 6) Hagiwara, K., Murakami, T., Xue, G. Shimizu, Y., Takeda, E., Hashimoto, Y., Honda, K., Kondoh, Y., Osada, H., Tsunetsugu-Yokota, Y., and Aida, Y.: Identification of a novel Vpr-binding compound that inhibits HIV-1 multiplication in macrophages by chemical array. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 403:40-45, 2010
- 7) Y. Tanaka, M. Taneichi, M. Kasai, T. Kakiuchi, and T. Uchida.: Liposome-Coupled Antigens Are Internalized by Antigen-Presenting Cells via Pinocytosis and Cross-Presented to CD8 T Cells. *Plos One*, 5(12):e15225, 2010.
- 8) Terahara, K., Nochi, T., Yoshida, M., Takahashi, Y., Goto, Y., Hatai, H., Kurokawa, S., Ho Jang, M., Kweon, M-N., Domino, S.E., Hiroi, T., Yuki, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y., Kobayashi, K., and Kiyono, H.: Distinct fucosylation of M cells and epithelial cells by Fut1 and Fut2, respectively, in response to intestinal environmental stress. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 404:822-828, 2011
- 9) 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)
- 10) 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)
- 11) 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)
- 12) 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
- 13) 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.
- 14) Takashi Ohkura, Yuji Kikuchi, Naoko Kono, Shigeyuki Itamura, Katsuhiro 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)
- 15) 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)
- 16) 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
- 17) 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
- 18) 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, 2012
- 19) 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.
- 20) 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)
- 21) Tsunetsugu-Yokota, Y. and Terahara, K. : Receptor usage and the pathogenesis in acute and chronic virus infections. *Front. Microbiol.* 3:289, 2012.
- 22) 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.
- 23) 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 hitocompatibility complex class I haplotypes with disease progression after simian immunodeficiency virus challenge in Burmese rhesus macaques. *J. Virol.* 86:6481-6490, 2012.
- 24) 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.
- 25) 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.
- 26) 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.
- 27) 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)
- 28) 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.
2. 学会発表
- 1) Shirakura M., Nobusawa E., Asanuma H., Kishida N., Aina A., Iwata N., Nagata N., Hasegawa H., Kageyama T., Odagiri T. and Tashiro M. Generation of the novel influenza H1N1 vaccine viruses by reverse genetics. *Options For The Control Of Influenza VII*, Hong Kong, 2010.
- 2) Tsunetsugu-Yokota, Y. : The impact of chemokine receptor usage of HIV-1 in the pathogenesis of HIV infection. *The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity*, Awaji, Japan, September, 2010.
- 3) Terahara, K., Ishige, M., Mitsuki, Y-y, Shibusawa, K., Watanabe, S., Okada, S., Kobayashi, K., Tsunetsugu-Yokota, Y. : Characteristic activation/differentiation phenotype of CD4+ T cells and their distinct susceptibility to X4-type and/or R5-type HIV-1 infection in humanized NOD/SCID/Jak3-null mice. *The 14th International Congress of Immunology*, Kobe, Japan, August, 2010.
- 4) Shibusawa, K., Mitsuki, Y-y, Terahara, K., Yanagi, Y. Kogayashi, K., Tsunetsugu-Yokota, Y. : Inhibition of HIV-1 replication by engineered lentivirus vectors: a potential advantage of SLAM-mediated virus entry. *The 14th International Congress of Immunology*,

- Kobe, Japan, August, 2010.
- 5) Mitsuki, Y-y, Shibusawa, K., Tsuchiya, T., Terahara, K., Kobayashi, K., Takeda, M., Yanagi, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y.: HIV-1 infection enhances the susceptibility of T cells to measles virus infection by upregulating signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) expression. The 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, August, 2010.
- 6) Tsunetsugu-Yokota, Y. and Terahara, K.: Factors crucial for the preferential propagation of R5-tropic HIV-1 in the early phase of HIV-1 infection. The 5th Japanese-German HIV-Symposium, Tokyo, Japan, May, 2010.
- 7) Shibusawa, K., Mitsuki, Y-y, Terahara, K., Yanagi, Y. Kogayashi, K., Tsunetsugu-Yokota, Y.: Inhibition of HIV-1 replication by engineered lentivirus vectors: a potential advantage of SLAM-mediated virus entry. The 5th Japanese-German HIV-Symposium, Tokyo, Japan, May, 2010.
- 8) Mitsuki, Y-y, Shibusawa, K., Tsuchiya, T., Terahara, K., Kobayashi, K., Takeda, M., Yanagi, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y.: HIV-1 infection enhances the susceptibility of T cells to measles virus infection by upregulating signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) expression. The 5th Japanese-German HIV-Symposium, Tokyo, Japan, May, 2010.
- 9) 石毛真行、寺原和孝、光木裕也、渋谷謙太郎、小林和夫、岡田誠治、横田(恒次)恭子: HIV-1 感染モデルとしてのヒト化マウスの妥当性と X4 および R5 HIV-1 感染, 第 58 回ウイルス学会、徳島、平成 22 年 11 月。
- 10) 渋谷謙太郎、光木裕也、寺原和孝、石毛真之、柳雄介、小林和夫、横田(恒次)恭子: 麻疹ウイルスエンベロープを用いた HIV-1 増殖抑制性レンチウイルスベクターの開発とその有効性、第 58 回ウイルス学会、徳島、平成 22 年 11 月。
- 11) Kayoko Sato, Hideki Asanuma, Takiko Matsukura, Naoki Matsumoto, Masato Tashiro. KLRG1 expression in the lungs by influenza A virus infection in mice. 14th International congress of immunology, Kobe, Japan, August 2010
- 12) Kayoko Sato, Shigeyuki Itamura, Masato Tashiro. Development of quantitative ELISA for influenza virus haemagglutinin for the use of quality control test of inactivated influenza split-virus vaccine. Options for the control of influenza VII HK September 2010
- 13) 笠井道之、池田通. マクロオートファジーは胸腺内 MHC クラス II 抗原提示過程に関与する第 20 回 Kyoto T Cell Conference 2010 年 6 月
- 14) 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

- 15) 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
- 16) 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.
- 17) 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
- 18) 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
- 19) 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)
- 20) 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
- 21) 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)
- 22) 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)
- 23) 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.
- 24) 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.
- 25) 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.

26) 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.

27) 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

28) 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

29) 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。

30) 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。

31) 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

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

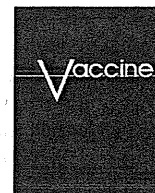
出願番号：特願2011-22774

2. 実用新案登録

なし

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 Takahashia, Hideki Fujii, Shu-ichi Hashimoto, Tomohiro Kaji, Shigeyuki Itamura, Yoshinobu Hatoriuchi, 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
Kazuo Ohnishi, Yoshimasa Takahashi, Naoko Kondo, 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	Newly established monoclonal antibodies for immunological detection of H5N1 influenza virus	Jpn. J. Infect. Dis.	65	19-27	2012
Ruth Harvey, Michelle Hamill, James S Roberts, 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



Influenza A whole virion vaccine induces a rapid reduction of peripheral blood leukocytes via interferon- α -dependent apoptosis

Manabu Ato^{a,*}, Yoshimasa Takahashi^a, Hideki Fujii^{a,1}, Shu-ichi Hashimoto^{a,2}, Tomohiro Kaji^{a,b}, Shigeyuki Itamura^c, Yoshinobu Horiuchi^{d,e}, Yoshichika Arakawa^{d,3}, Masato Tashiro^c, Toshitada Takemori^{a,b}

^a Department of Immunology, National Institute of Infectious Diseases, Toyama 1-23-1, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan

^b Laboratory for Immunological Memory, Riken Research Center for Allergy and Immunology, Suehiro-cho 1-7-22, Tsurumi-ku, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan

^c Influenza Virus Research Center, National Institute of Infectious Diseases, Gakuen 4-7-1, Musashi-Murayama, Tokyo 208-0011, Japan

^d Department of Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases, Gakuen 4-7-1, Musashi-Murayama, Tokyo 208-0011, Japan

^e Division of Quality Assurance, National Institute of Infectious Diseases, Gakuen 4-7-1, Musashi-Murayama, Tokyo 208-0011, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 October 2012

Received in revised form 24 January 2013

Accepted 6 February 2013

Available online 19 February 2013

Keywords:

Inactivated influenza vaccine

Leukocytopenia

Innate immunity

Type-I interferons

Apoptosis

ABSTRACT

Infection with single strand RNA (ssRNA) viruses, such as influenza A virus, is known to induce protective acquired immune responses, including the production of neutralizing antibodies. Vaccination also causes a reduction in the number of peripheral blood leukocytes (PBL) shortly after inoculation, a result which may have undesirable adverse effects. The cellular mechanisms for this response have not been elucidated so far. Here we report that formalin-inactivated influenza A whole virus vaccine (whole virion) induces a significant decrease in PBL in mice 5–16 h after administration, whereas an ether-split vaccine (HA split) made from the same influenza virus strain does not induce a similar loss of PBL. Concordant with this reduction in the number of PBL, a rapidly induced and massive production of interferon (IFN)- α is observed when mice are injected with whole virion, but not with HA split vaccines. The role of Toll-like receptors (TLR), which are involved in signal transduction of influenza virus, and the subsequent induction of IFN α were confirmed using mice lacking TLR7, MyD-88, or IFN α / β receptor. We further demonstrated that the observed PBL loss is caused by apoptosis in an IFN α -dependent manner, and not by leukocyte redistribution due to chemokine signaling failure. These findings indicate that RNA-encapsulated whole virion vaccines can rapidly induce a loss of leukocytes from peripheral blood by apoptosis, which may modulate the subsequent immune response.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: ssRNA, single strand RNA; PBL, peripheral blood leukocytes; IFN, interferon; TLR, Toll-like receptor; PAMPs, pathogen-specific molecular patterns; RIG-I, retinoid acid-inducible gene-I; poly (I:C), polyinosinic-polycytidylic acid; HA, hemagglutinin; SRD, single-radial-immunodiffusion; PTX, Pertussis toxin; FITC, fluorescein isothiocyanate; PE, phycoerythrin; ELISA, Enzyme-linked immune solvent assay; pDC, plasmacytoid dendritic cells; PRRs, pattern recognition receptors; S1P, sphingosin-1-phosphate.

* Corresponding author. Tel.: +81 3 5285 1111; fax: +81 3 5285 1156.

E-mail addresses: ato@nih.go.jp (M. Ato), ytakahas@nih.go.jp (Y. Takahashi), hfujii@z5.keio.jp (H. Fujii), shashimoto@chiome.co.jp (S.-i. Hashimoto), t-kaji@rcai.riken.jp (T. Kaji), sitamura@nih.go.jp (S. Itamura), ib4y-hruc@asahi-net.or.jp (Y. Horiuchi), yakarakawa@med.nagoya-u.ac.jp (Y. Arakawa), mtashiro@nih.go.jp (M. Tashiro), mtoshi@rcai.riken.jp (T. Takemori).

¹ Present address: Department of Microbiology and Immunology, Keio University School of Medicine, Tokyo, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan.

² Present address: Chiome Bioscience Inc., 2-3-13 Minami, Wako-shi, Saitama 351-0104, Saitama 315-0104, Japan.

³ Present address: Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya 466-8550, Japan.

1. Introduction

Viral infection or vaccination is known to elicit a rapid and robust innate immune response by the host. Activation of the innate immune system is believed to play a key role in host protection against infection by inducing cytokines and chemokines, recruiting leukocytes at the site of infection, and the subsequent activation of adaptive immune responses [1]. On the contrary, some viral infections and vaccinations have immunosuppressive effects, such as the loss of peripheral blood leukocytes (PBL), decreased lymphocyte numbers in the secondary lymphoid organs and immune cell apoptosis, which may result in the suppression of protective immune responses or unsuccessful vaccination [2–5].

Influenza A virus infection [6] or administration of inactivated influenza vaccine [7] can induce an acute and transient lymphocytopenia, suggesting that the activation of innate immune responses may be associated with the loss of PBL. Recent studies have demonstrated that innate immunity activation is dependent on the recognition of pathogen-specific molecular patterns (PAMPs)