

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
分担研究報告書

インフルエンザウイルス A ヘマグルチニンに対する
モノクローナル抗体を用いた ELISA 法の確立

研究分担者 阿戸 学 (国立感染症研究所・免疫部)
研究協力者 高橋 宜聖 (国立感染症研究所・免疫部)

研究要旨

インフルエンザウイルスは、ヘマグルチニン (HA) の違いによる多数の亜型があり、新型インフルエンザのアウトブレイク等では季節性インフルエンザとの鑑別が極めて重要になると考えられる。本研究では、中国で鳥からヒトへの感染が発生している H7N9 ウイルスと、同じグループに属する季節性 H3N2 ウイルスの鑑別を可能にするマウスモノクローナル抗体の作製を試みた。3 種類の prime / boost プロトコールによりマウスを免疫した後、ハイブリドーマ法により 14 種類のモノクローナル抗体を樹立することに成功した。今後、これらの抗体の特異性、結合性を詳細に解析し、H7 と H3 亜型鑑別を可能にする抗体の組み合わせを選択する必要がある。

A. 研究目的

2013/2014 シーズンにおいて、H7N9 感染者数が中国で増加している状況を考慮し、本研究では、H7 亜型鑑別法の開発に着手した。

17 種類の HA 亜型が自然界に存在していることが知られている。しかし、過去にヒトで流行したことのある亜型、動物からヒトへの感染が問題となっている亜型は、H1, H2, H3, H5, H7 の 5 種類に限られ、その構造からグループ 1 (H1, H2, H5) とグループ 2 (H3, H7) に分類

される。近年、複数の HA 亜型に交差結合する抗体が分離され注目を集めているものの、そのほとんどは比較的相同性の高い同じグループ内の交差結合性に限られている。そのため本研究では、同じグループ 2 に属する H7 と H3 の鑑別に焦点を当て、これを可能にするマウスモノクローナル抗体の作製を行った。

B. 研究方法

(1) H1, H3, H5, H7 リコンビナント HA タンパクの作製

H1 亜型のウイルス (A/Narita/1/2009)、H3 亜型のウイルス (X31、A/Uruguay/716/2007)、H5 亜型のウイルス (NIBRG-14)、H7 亜型のウイルス (A/Anhui/1/2013) の HA 塩基配列から、バキュロウイルス発現系を用いることによりリコンビナント HA タンパクを作製した。

(2) ハイブリドーマ法によるモノクローナル抗体の作製

リコンビナント HA タンパクを 2 回皮下接種した BALB/c マウスから脾臓細胞を調製し、SP2/O ミエローマとの細胞融合によりハイブリドーマを作製した。限界希釈によりクローニングした後、培養上清中に産生される抗体の特異性を後述の ELISA 法により検証した。

(3) ELISA による抗体特異性の検証

様々な亜型のリコンビナント HA タンパクをコーティングした ELISA プレートを用意し、1% BSA でブロッキング後、ハイブリドーマの培養上清を添加した。プレートに結合したマウス抗体は、ペルオキシダーゼ標識した抗マウス IgG/A 抗体で検出・定量した。

倫理面への配慮

病原体を使用する実験は、国立感染症研究所戸山庁舎高度安全実験施設において、国立感染症研究所病原体等安全管理規程に従い実施した。動物実験は、動物

実験委員会規程に従い、動物実験委員会の承認を得てから行った。

C. 研究結果

1) モノクローナル抗体の作製

H7 と H3 の鑑別を可能にする抗体として、

1) H7 亜型のみ結合する抗体、

2) H3 亜型のみ結合する抗体、

3) H7、H3 の両方の亜型に結合する抗体を作製し、これらの抗体を組み合わせ、

H7 特異的な検出、H3 特異的な検出、

H7 と H3 の同時検出、といった 3 グループの検出法の開発を試みた。抗原特異性の異なる 3 種類の抗体を作製するため、図 1 に示す 3 つの prime / boost プロトコルを用いて、マウスを免疫した。

まず H7 亜型のみ結合する抗体を作製するため、H7 HA を 2 回接種したマウスを用意した。次に H3 亜型特異的に結合する抗体作製用として、H3 HA を 2 回接種したマウスを用意した。H3 亜型には、1968 年の発生以来多数の抗原変異株が存在しており、H3 亜型内で共通の構造を認識する抗体の分離が必要である。この目的のため、同じ株由来の H3 HA を追加接種するのではなく、1968 年に分離された H3 HA を初回免疫に使用した後、追加免疫には 2007 年に分離された H3 HA を使用した。約 40 年に渡る抗原変異の結果、ここで使用した 2 種類の H3 HA の相同性は 86.9% であり、この 2 種類の H3 HA に交差結合する抗体は、H3 亜型内の抗原変異に寛容

であると推定される。そして最後に、H7 HA で免疫した後、H3 HA で追加免疫したマウスを用意し、H7 と H3 に交差結合する抗体の分離を試みた。

2) マウスモノクローナル抗体の結合性
本研究でこれまでに得られたマウスモノクローナル抗体のリストと、様々な亜型の HA に対する結合性を表 2 に記した。これまで H7 HA に特異的に結合する抗体として 1 種類、H3 HA に特異的に結合する抗体として 7 種類、H7 と H3 に交差結合する抗体として 6 種類のマウスモノクローナル抗体を作製することに成功した。

D. 考察

様々な prime / boost プロトコールを用いることにより、目的の抗原特異性を有するマウスモノクローナル抗体を作製することができた。今後、これら抗体の抗原エピトープと検出感度を解析し、H7 と H3 亜型の鑑別を可能とする抗体の組み合わせ、抗体濃度を決定する必要がある。

E. 結論

H7 と H3 の鑑別に利用可能なマウスモノクローナル抗体を作製することに成功した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ato M., Takahashi Y., Fujii H, Hashimoto S, Kaji T, Itamura S, Horiuchi Y, Arakawa Y, Tashiro M, Takemori T. 2013. Influenza A whole virion vaccine induces a rapid reduction of peripheral blood leukocytes via interferon- α -dependent apoptosis. *Vaccine*. 31:2184-90.

2. 学会発表

1. Sato K., Takahashi Y., Ato M., Asanuma H. 2013. TLR agonists induce high avidity of virus-specific antibodies upon a booster conditions. 第 42 回日本免疫学会学術集会 . 12 月 11 日 ~ 13 日 . 千葉市 .
2. Onodera T., Adachi T., Tsubata T., Kurosaki T., Adachi Y., Ato M., Takahashi Y. 2013. Replenishment of Long-Live Plasma Cells is constitutively restricted by CD4+T cells in their maintenance phase after influenza vaccination. 第 42 回日本免疫学会学術集会 . 12 月 11 日 ~ 13 日 . 千葉市 .
3. Adachi Y., Ato M., Takahashi Y. 2013. The development and persistence of broadly cross-reactive germinal center and memory B cells in the lungs following influenza virus infection. 第 42 回日本免疫学会学術集会 . 12 月 11 日 ~ 13 日 . 千葉市 .

4. **Ato M., Takahashi Y.,** Fujii H., Hashimoto S., Kaji T., Itamura S., Horiuchi Y., Arakawa Y., Tashiro M. Takemori T. 2014. Influenza A whole virion vaccine induces a rapid reduction of peripheral blood leukocytes via interferon- α -dependent apoptosis. The 7th Meeting of Japan Vaccine Adjuvant Research Consortium. 1月21日 .大阪府吹田市 .

阿戸 学、高橋宜聖 . 2014 . B細胞内因性 TLR シグナルによるインフルエンザワクチンの奏功機序 . The 7th Meeting of Japan Vaccine Adjuvant Research Consortium. 1月21日 .大阪府吹田市 .

5. 小野寺大志、田代真人、黒崎知博、

H. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

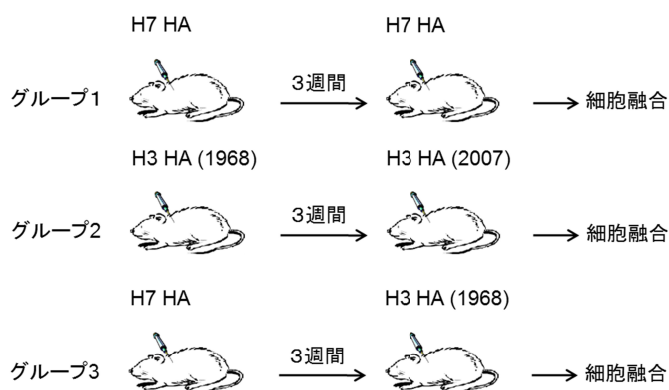


図1 3つのprime / boost法によるマウスモノクローナル抗体の作製

表2 マウスモノクローナル抗体の亜型特異性

Clone	H3 (1968)	H3 (2007)	H7	H1	H5
C208	-	-	+	-	-
B5	+	+	-	-	-
B11	+	+	-	-	-
B33	+	+	-	-	-
E5	+	+	-	-	-
E28	+	+	-	-	-
C151	+	+	-	-	-
E10	+	+	+	-	-
C11	+	+	+	-	-
C43	+	+	+	-	-
C57	+	+	+	-	-
C59	+	+	+	-	-
C73	+	+	+	-	-
C88	+	+	+	-	-