

創薬基盤推進研究事業（創薬総合推進研究事業）

平成 26 年度分担研究報告書

経鼻ワクチンの挙動と安全性評価技術の開発

研究分担者 奥野良信（一財）阪大微生物病研究会 観音寺研究所長

研究要旨

経鼻ワクチンの投与時のウイルス由来抗原の検出系構築のため、遺伝子組み換えの手法を用い、インフルエンザウイルス由来の組換え HA (hemagglutinin) 抗原を作製した。作製した組換え抗原について、ELISA 法を用い、不活化インフルエンザワクチンを投与した動物の抗血清及び鼻腔洗浄液との反応性を確認したところ、株特異的な反応が認められた。また、今後の安全性試験に用いるための 2014/2015 シーズン用のワクチン原液を作製した。

A. 研究目的

- (1) 鼻粘膜における経鼻インフルエンザワクチンの安全性を評価するための材料の作製
- (2) 安全な経鼻インフルエンザワクチンの開発に寄与する

B. 研究方法

インフルエンザウイルス由来組換え抗原の作製

抗原を取得するためのウイルスとしては、2014/2015 シーズン用インフルエンザワクチン株ウイルスである、A/California/7/2009 (H1N1) pdm09 を用いた。ウイルス培養液からウイルス由来 RNA を抽出し、HA 遺伝子をコードする DNA を逆転写法により作出・クローニングした。この遺伝子を用い、C 末に FLAG タグを持つバキュロウイルス系発現ベクターに導入し、発現用プラスミドを作製した。このプラスミドをカイコ幼虫に投与し、蛹になった段階で、そのホモジネートから発現された HA 蛋白をアフィニティ精製した。

インフルエンザウイルス由来組換え抗原の評価

前述の抗原を 96 ウェル ELISA プレートに固層化し、インフルエンザウイルス A/California/7/2009 (H1N1) pdm09 株由来ワクチンを投与したマウスの血清または鼻腔洗浄液と反応させた。反応した抗体は HRP 標識した抗マウス IgG 抗体または抗マウス IgA 抗体で検出した。反応の特異性を確認するため、対照用の抗原として、A/California/7/2009 (H1N1) pdm09 株、及び A/Texas/50/2012 (H3N2) 株の不活化ウイルスとの反応性も確認した。また、インフルエンザウイルス A/Texas/50/2012 (H3N2) pdm09 株由来ワクチンを投与したマウスの血清または鼻腔洗浄液との反応性についても確認した。

安全性評価用経鼻投与型インフルエンザワクチンの作製

2014/2015 シーズンの季節性インフルエンザワクチン株ウイルスである

- ・ A/California/7/2009 (H1N1) pdm

- ・ A/Victoria/361/2011 (H3N2)
- ・ B/Massachusetts/2/2012 (山形系統)

の 3 株を用い、ホルマリンにより不活化した全粒子ワクチン原液を作製した。

C . 研究結果

インフルエンザウイルス由来組換え抗原の作製

カイコ 10 頭から約 320 μ g の組換え HA 蛋白を取得した。CBB 染色による SDS-PAGE 泳動像から、純度は 86% と見積もられた。

インフルエンザウイルス由来組換え抗原の評価

作製した組換え蛋白は、その由来ウイルスである A/California/7/2009 (H1N1) pdm09 株由来ワクチンを投与したマウスの血清及び鼻腔洗浄液との特異的反応が見られ、A/Texas/50/2012 (H3N2) 株由来ワクチンを投与したマウスの血清及び鼻腔洗浄液との反応は認められなかった。一方、A/California/7/2009 (H1N1) pdm09 株及び A/Texas/50/2012 (H3N2) 株の不活化ウイルスは上記のいずれの株由来ワクチンを投与したマウスの検体とも反応が認められた。

但し、投与されたワクチンの方に強く反応する傾向は認められた。このことから、株特異的な抗原に対する抗体と、いずれのウイルスにも共通して存在する抗原に反応する抗体の両方が誘導されていると考えられた。

安全性評価用経鼻投与型インフルエンザワクチンの作製

調製したワクチン原液について、HA 含量試験を行なったところ、ワクチン原液の HA 含量は、設定値 \pm 10% の範囲内であった。また、無菌試験も適合したため、このワクチン原液を次期安全性評価試験用として用いることとした。

D . 考察

作製した組換え蛋白は、その由来株特異的に反応することから、経鼻ワクチン投与時の病理試験の陽性対象として用いることが出来るほか、これをアフィニティーカラムに固定化して特異的抗体を精製し、ワクチンまたはウイルス由来 HA 抗原の検出に利用することが出来ると考えられた。

また、安全性評価用ワクチン原液は次シーズン用に作製したのも問題なく使用できるものと判断された。

E . 結論

昨年度はウイルス由来 NP 蛋白の検出系作出を試みた。これに続き、今年度は HA 蛋白の検出系の材料となる組換え蛋白も取得できた。これらを利用すれば、投与した経鼻ワクチン成分の挙動が特定できると期待される。

また、次シーズン用ワクチン原液も作成できたことから、次シーズン以降も、継続してこれを利用した安全性の評価が可能と考えられる。

F . 研究発表

1 . 論文発表

Kumagai, T., Nakayama, T., Okuno, Y., Kase, T., Nishimura, N., Ozaki, T., Miyata, A., Suzuki, E., Okafuji, T., Ochiai, H., Nagata, N., Tsutsumi, H., Okamatsu, M., Sakoda, Y., Kida, H., Ihara, T. Humoral immune response to influenza A(H1N1)pdm2009 in patients with natural infection and in vaccine recipients in the 2009 pandemic. *Viral Immunology* 27:368-374, 2014.

Haredy, AM., Yamada, H., Sakoda, Y., Okamatsu, M., Yamamoto, N., Omasa, T., Mori, Y., Kida, H., Okamoto, S., Okuno, Y., Yamanishi, K. Neuraminidase gene homology contributes to the protective activity of influenza vaccines prepared from the influenza virus library. *J Gen Virol* 95:2365-2371, 2014.

2 . 学会発表

なし

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

なし