

201420024A

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

(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)

インフルエンザワクチン製造種株及び品質管理手法の開発  
に関する研究

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 板村繁之

平成27(2015)年 3月

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

(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)

インフルエンザワクチン製造種株及び品質管理手法の開発  
に関する研究

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 板村繁之

平成27(2015)年 3月

# 目 次

## I. 総括研究報告

|                                  |       |   |
|----------------------------------|-------|---|
| インフルエンザワクチン製造種株及び品質管理手法の開発に関する研究 | ----- | 1 |
| 板村 繁之                            |       |   |

## II. 分担研究報告

|   |       |    |
|---|-------|----|
| 1. ワクチン力価試験法の開発に関する研究                         | ----- | 8  |
| - SRD 試験測定不能な 4 価ワクチンを逆相 HPLC によって定量する方法 -    |       |    |
| 嶋崎 典子   |       |    |
| 2. 剤型の異なるインフルエンザワクチンにより誘導される免疫応答の機構<br>に関する研究 | ----- | 13 |
| 佐藤 佳代子  |       |    |
| 3. ワクチンの新規免疫原性解析法の開発                          | ----- | 17 |
| 大西 和夫   |       |    |

|                     |       |    |
|---------------------|-------|----|
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | ----- | 21 |
|---------------------|-------|----|

## インフルエンザワクチン製造種株及び品質管理手法の開発に関する研究

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、1)異なる剤型の有効成分を測定する力価試験、剤型の違いによる免疫誘導能と関連する指標を測定できる試験法の開発を行い、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できるようにする。2)ウイルスの馴化変異がワクチンの免疫原性に与える影響を調べ、ワクチン製造株の品質管理の手法を確立する。3)ワクチンの免疫応答を抗体遺伝子のレパトアおよび抗体誘導の量的、質的差異について網羅的に解析する方法の開発を行うことを目的として、本年度は以下の研究を実施した。

(1)季節性インフルエンザHAワクチンは、現在の抗原性の大きく異なる3種類のウイルス(A/H1N1、A/H3N2、B)で構成された3価のワクチンからB型ウイルスの2系統のウイルスを含む4価ワクチンへの移行が進められている。その際に、現行のワクチン力価測定法である一元放射免疫拡散(SRD)試験法では、株の組み合わせによっては、B型の力価が測定できない場合があることがわかった。SRD試験で測定不能となったB型混合抗原について、逆相HPLC法を用いてワクチン中のHA含量の測定を検討し、B型2系統の抗原をそれぞれ定量することができ、その値はSRD試験法の値と概ね一致した。本法が、4価ワクチンにおいてB型についてSRD試験が使用できない場合に代替法として使用できることがわかった。

(2)ワクチンによる免疫応答は、投与されたワクチンが抗原提示細胞へ取り込まれることから開始される。抗原提示細胞のワクチンに対するシグナル応答を評価することで、ワクチンの免疫原性を測定できるかについて、ヒト由来単球系細胞株(THP-1細胞)のNF- $\kappa$ Bの活性化を指標に検討した。全粒子ワクチンとスプリットワクチンで有意にNF- $\kappa$ Bの活性化が誘導されることが確認でき、NF- $\kappa$ Bの活性化の程度とマウスにおける抗体産生誘導能に相関が認められた。この測定系では細胞傷害活性を測定することもできることから、ワクチン免疫原性と安全性を同時に評価するのに有用なシステムである。

(3)ワクチン接種によって惹起される免疫応答のうち、ワクチン抗原特異的な抗体群を網羅的に解析できる方法は、ワクチンの免疫原性解析に大きく貢献する。次世代シーケンサを用いた解析法を開発しワクチンの免疫原性について抗体分子レベルの応答を網羅的に解析できるようになった。開発した本法を用いて発育鶏卵と培養細胞の2つの異なる生産系で製造したワクチンによって誘導されてくる抗体群(抗体レパトア)を解析し、2つのワクチンで異なることを明らかにした。ワクチンによって誘導される抗体レパトアの特性によって免疫原性を評価することが可能になった。

## 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

信澤枝里 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

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

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

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

藤 博幸 産業技術総合研究所ゲノム情報  
研究センター 副研究センター長

## A. 研究の目的と背景

季節性およびパンデミックインフルエンザに対するワクチンは、対象ウイルスに対して免疫感作の状態が異なる人を接種の対象としている。パンデミックワクチンや小児に対する季節性ワクチンは、免疫感作のないナイーブな人を対象とするために、プライミングできる免疫賦与能が求められている。一方、成人を対象とした季節性ワクチンでは、過去に関連するウイルスによって何らかの免疫感作を受けた人を接種の対象として、免疫としてはブースター能を有することが重要と考えられる。現在、わが国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、おもに季節性インフルエンザに対するスプリットワクチンと、高病原性鳥インフルエンザ A/H5N1 ウイルスがヒ

トで感染拡大した場合に備えたパンデミックワクチンとしての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。2014年3月には加えて細胞培養法を用いた新規アジュバントを含む新しい剤型のワクチンが A/H5N1 ウイルスに対するパンデミックワクチンとして製造販売承認された。2009年にブタに由来する A/H1N1pdm09 ウイルスによるパンデミックが発生した際に、ヒトに以前より流行していた A/H1N1 ウイルスとは抗原的に交叉性が認められず、いずれの剤型で十分な抗体応答を誘導できるのか、臨床試験による検証がなされるまで剤型選択に明瞭な根拠を提示することができなかった。また、これまでにワクチンの免疫原性について、このような観点から品質管理は実施されてこなかった。一方、季節性インフルエンザの原因ウイルスからワクチン製造のために発育鶏卵での増殖性を確保するために継代馴化を行うと、しばしば宿主馴化変異が起こり、これがワクチンの有効性の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、ワクチン製造株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に、異なる剤型のワクチンの免疫応答を抗体遺伝子のレパトアおよび抗体誘導の量的、質的差異について解析して指標の確立を目指す。また、ワクチン製造株の品質管理の手法を確立するために、ワクチン株に変異を有するワクチンと変異のないワクチンについて同様の解析を行う。同時に、異なる剤型の有効成分を測定する力価試験、剤型の違いによる免疫誘導能と関連する指標を測定できる試験法の開発を行う。

## B. 研究方法

### 1) ワクチンの免疫誘導能に関連する試験法の開発

SRD 試験で測定できない B 型ウイルスを組み合わせた 4 価ワクチンを調製し、逆相 HPLC 法を用いて B 型 2 系統のウイルス株の HA 含量をそれぞれ定量した。定量は SRD 試験に使用する標準抗原を用いて検量線を作製して HA 含量を求めた。

### 2) 剤型の異なるインフルエンザワクチンにより誘導される免疫応答の機構に関する研究

転写因子 NF- $\kappa$ B によって転写を促進する遺伝子領域の下流にレポーター遺伝子として分泌型のアルカリホスファターゼ遺伝子を組み込んだヒト単球系細胞 (THP-1-Xblue 細胞) を PMA と培養してマクロファージ様細胞に分化させた後、ワクチンと混合、培養して NF- $\kappa$ B の活性化を培養上清のホスファターゼ活性を測定することで調べた。同時に混合培養した細胞の生存割合を MTT アッセイにより評価した。

### 3) ワクチンの新規免疫原性解析法の開発

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 によって増幅し、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 (ロッシュ社 454 システム) で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をこれまでに開発した方法で、抗体レパートリーを解析した。また、抗原親和性成熟に伴う体細胞突然変異の蓄積を解析し、系統樹として可視化するプログラムを作製した。抗体レパートリーの網羅的解析法方法で同定した抗体重鎖遺伝子 (複数) および抗体軽鎖遺伝子 (複数)

について、抗体可変領域 (V ドメイン) の DNA 配列を遺伝子合成し、この合成 DNA を抗体定常領域 (ヒト型) を有する発現ベクターに組み込み、培養哺乳類細胞 (CHO 細胞等) に遺伝子導入して抗体タンパク質を発現し、培養上清中に分泌された抗体分子を精製してその性状を解析した。

## C. 研究結果・考察

### 1) ワクチンの免疫誘導能に関連する試験法の開発

現在のインフルエンザ HA ワクチンは、抗原性の大きく異なる 3 種類のウイルス (A/H1N1、A/H3N2、B) で製造された 3 価のワクチンである。B 型ウイルスは抗原性の違いからビクトリア系統と山形系統に分類されるが、これまでいずれかの系統のウイルスについてワクチン株として制定してきた。しかし近年、国内外ともに B 型インフルエンザはビクトリア系統と山形系統のウイルスが混合流行しており、現状においては、次シーズンにどちらの系統のウイルスが流行するかを予想することは極めて困難である。そのため、わが国においても B 型を 2 株入れた 4 価ワクチンへの移行について検討が進められている。米国では既に 2012 年に 4 価ワクチンの製造販売承認が取得されている。さらに、欧州、豪州においても順次、製造販売承認の取得が見込まれている。ところが、4 価ワクチンの場合、ワクチンの力価測定の標準法である生物学的製剤基準で定められた一元放射免疫拡散 (SRD) 試験法では、ウイルス株の組み合わせによっては、B 型が測定不能になる場合があった。

そこで本研究では、SRD 試験で測定できない B 型ウイルスを組み合わせた 4 価ワクチンを調製し、逆相 HPLC 法を用いて B 型 2 系統のウイルス株の HA 含量をそれぞれ定量できないか検討した。

その結果、2種類の4価混合ワクチンについて、逆相 HPLC 法を用いてワクチン中の HA 含量が測定できることがわかった。さらに得られた HA 含量は SRD 試験によって得られた力価と比較すると、概ね一致しており、SRD 試験で測定できなかったワクチンが逆相 HPLC 法で測定できることがわかった。B 型山形系統の2株については、SRD 試験による力価とは概ね一致していたが、一方でビクトリア系統の1株については2種類のワクチンで力価の一致度は異なっており、検討の余地がある。しかしながら、逆相 HPLC 法は抗原活性を測定していないものの、4価ワクチンの B 型について SRD 試験が使用できないような例外的な運用としては、代替法の1つになりうると思われる。使用する標準抗原などについても検討しておく必要がある。

## 2) 剤型の異なるインフルエンザワクチンにより誘導される免疫応答の機構に関する研究

これまでに、全粒子ワクチンとスプリットワクチンの異なる剤型で誘導される抗体応答には量的、質的な違いがあることを明らかにしてきた。本研究では全粒子ワクチンとスプリットワクチンによる抗体誘導の違いについて、抗原提示細胞でのワクチンの取り込み後に誘導される細胞内シグナルに着目して解析を行った。インフルエンザワクチンはマクロファージ/樹状細胞に取り込まれ I 型 IFN を産生することが知られている。インフルエンザワクチンに含有される RNA がリガンドとなって TLR を介したシグナル伝達によって転写因子である IRF3/IRF7 がリン酸化されて、その結果 I 型 IFN 遺伝子の活性化が起こり IFN が産生される。同様に、TLR を介したシグナル伝達により NF- $\kappa$ B が活性化され、炎症性のサイトカイン(IL-6, TNF- $\alpha$  and pro-IL-1 $\beta$  and pro-IL-18)

が誘導される。そこで転写因子 (NF- $\kappa$ B) と結合して転写を促進する遺伝子領域にレポーター遺伝子を組み込んだヒト由来単球系細胞株 (THP-1細胞) を用いてインフルエンザワクチンの全粒子型、スプリット型による応答の違いを評価した。抗体産生誘導と相関して全粒子ワクチン、スプリットワクチンに活性化誘導能があり、全粒子ワクチンに強い誘導能が認められた。同時にワクチンによる細胞傷害活性を同じ細胞を用いて評価できることを確認した。今後、ワクチンを変性させた場合の応答を免疫原性と本活性の関係を調べて品質管理試験として利用できるのか検討を進める予定である。また、臨床試験で使用されたワクチンを用いて評価を行うことにより、ヒトでのワクチン免疫原性との関連を調べる計画である。

## 3) ワクチンの新規免疫原性解析法の開発

ワクチン製造株を作製するために発育鶏卵への継代を行った際にウイルスの抗原変異を伴う宿主馴化変異が起こることが知られているが、このようなウイルスで製造したワクチンが、変異のないウイルスで製造したワクチンと比較して、誘導された抗体応答に違いがあるのか知ることは、ワクチン製造株の品質管理の観点から重要である。また、剤型の異なるインフルエンザワクチンの免疫原性を抗体レパトリーの観点から解析することは、ワクチン剤型の品質管理の点からも意義深い。

そのために本研究では、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てきた。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。これまでに、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るようになった。また、得られた遺伝子配列について、大量の抗体遺伝子配列を解析するプログラムを独自に開発した。このような解析方法を用いて、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として、特定の抗体応答を検出できるのか検討を行って、NP を認識する既知の Vh 遺伝子である Vh186.2 の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 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とが確認できた。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抗体応答を検知できることが示された。

本年度は、これまでの研究で見られたような特定の Vh 遺伝子の高親和性突然変異の発生ダイナミクスを可視化するために系統樹解析を行った。その結果、高親和性突然変異の発生ダイナミクスを可視化することができた。本方法によってワクチンを免疫した後、感染防御に働く抗体群がどのように成熟して抗体力価と抗原エピトープ中和能の上昇を引き起こすかの解析することが可能である事を示唆している。また、同定された抗体遺伝子について配列情報から抗体遺伝子を合成する事により、実際に抗体タンパク質を作製する

ことができ、これらの抗体は実際に NP 特異的に結合することを示した。このことは、ワクチン接種によって誘導される抗ウイルス抗体を本研究で開発した解析アルゴリズムで調べれば、ワクチンの免疫原性を発揮する全ての抗体群を網羅的に同定、評価し、さらにそれらを遺伝子合成法で作製して、例えば抗体医薬として用いる事が可能となった事を意味している。

次に、発育鶏卵で継代をして抗原変異を有するウイルス株で作製したワクチンと、馴化変異を保有しないウイルス株で作製したワクチンとでマウスに免疫した際に得られる抗体応答について抗体レパートリーとして違いがあるか、本方法によって解析を行った。通常、ワクチンの免疫実験に使用するマウスとして BALB/c マウスを使用しているが、先の研究に使用した C57BL/6 系統のマウスとは異なり BALB/c マウスの抗体遺伝子座の詳細な解析は未だになされていない。そこで、まず抗体 IgH 鎖遺伝子の選定を行った。その後、同様の解析を行ってワクチンの馴化変異の有無による抗体レパートリーの使用パターンの違いについて可視化することができた。今後、候補となる抗体遺伝子について人工合成をしてその結合性について検討を進める予定である。

#### D. 結論

(1) 季節性インフルエンザ HA ワクチンは、現在の抗原性の大きく異なる 3 種類のウイルス (A/H1N1、A/H3N2、B) で構成された 3 価のワクチンから B 型ウイルスの 2 系統のウイルスを含む 4 価ワクチンへの移行が進められている。その際に、現行のワクチン力価測定法である一元放射免疫拡散 (SRD) 試験法では、株の組み合わせによっては、B 型の力価が測定できない場合があることがわかった。SRD 試験で測定不能となった B 型混合抗原



について、逆相 HPLC 法を用いてワクチン中の HA 含量の測定を検討し、B 型 2 系統の抗原をそれぞれ定量することができ、その値は SRD 試験法の値と概ね一致した。本法が、4 価ワクチンにおいて B 型について SRD 試験が使用できない場合に代替法として使用できることがわかった。

(2) ワクチンによる免疫応答は、投与されたワクチンが抗原提示細胞へ取り込まれることから開始される。抗原提示細胞のワクチンに対するシグナル応答を評価することで、ワクチンの免疫原性を測定できるかについて、ヒト由来単球系細胞株 (THP-1 細胞) の NF- $\kappa$ B の活性化を指標に検討した。全粒子ワクチンとスプリットワクチンで有意に NF- $\kappa$ B の活性化が誘導されることが確認でき、NF- $\kappa$ B の活性化の程度とマウスにおける抗体産生誘導能に相関が認められた。この測定系では細胞傷害活性を測定することもできることから、ワクチン免疫原性と安全性を同時に評価するのに有用なシステムである。

(3) ワクチン接種によって惹起される免疫応答のうち、ワクチン抗原特異的な抗体群を網羅的に知る新しい方法があれば、ワクチンの免疫原性解析に大きく貢献する。次世代シーケンサを用いた解析法を開発しワクチンの免疫原性について抗体分子レベルの応答を網羅的に解析できるようになった。開発した本法を用いて発育鶏卵と培養細胞の 2 つの異なる生産系で製造したワクチンによって誘導されてくる抗体群 (抗体レパトア) を解析し、2 つのワクチンで異なることを明らかにした。ワクチンによって誘導される抗体レパトアの特性によって免疫原性を評価することが可能になった。

## E. 健康危険情報

なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yasuko Tsunetsugu-Yokota, Kengo Nishimura, Syuhei Misawa, Mie Kobayashi-Ishihara, Hitoshi Takahashi, Ikuyo Takayama, Kazuo Ohnishi, Shigeyuki Itamura, Hang LK Nguyen, Mai TQ Le, Giang T Dang, Long T Nguyen, Masato Tashiro and Tsutomu Kageyama. Development of a sensitive novel diagnostic kit for the highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus. *BMC Infect Dis.* 2014 Jul 3;14:362. doi: 10.1186/1471-2334-14-362.
- 2) Kobayashi-Ishihara M, Takahashi H, Ohnishi K, Nishimura K, Terahara K, Ato M, Itamura S, Kageyama T, Tsunetsugu-Yokota Y. Broad Cross-Reactive Epitopes of the H5N1 Influenza Virus Identified by Murine Antibodies against the A/Vietnam/1194/2004 Hemagglutinin. *PLoS One.* 2014 Jun 19;9(6):e99201. doi: 10.1371/journal.pone.0099201. eCollection 2014.
- 3) Shuichi Funakoshi, Takeyuki Shimizu, Osamu Numata, Manabu Ato, Fritz Melchers, Kazuo Ohnishi BILL-Cadherin/Cadherin-17 Contributes to the Survival of Memory B Cells. *PLoS One.* 2015 Jan 22;10(1):e0117566. doi: 10.1371/journal.pone.0117566. eCollection 2015.
- 4) S Schultz-Cherry, R J Webby, R G Webster, A Kelso, I G Barr, J W McCauley, R S Daniels, D Wang, Y Shu, E Nobusawa, S Itamura, M Tashiro, Y Harada, S Watanabe, T Odagiri,

- Z Ye, G Grohmann, R Harvey, O Engelhardt, D Smith, K Hamilton, F Claes, and G Dauphin, Influenza gain-of-function experiments: their role in vaccine virus recommendation and pandemic preparedness. MBio 5 (6), e02430-14 (2014)
- 5) Ian G Barr, Colin Russell, Terry G Besselaar, Nancy J Cox, Rod S Daniels, Ruben Donis, Othmar G Engelhardt, Gary Grohmann, Shigeyuki Itamura, Anne Kelso, John McCauley, Takato Odagiri, Stacey Schultz-Cherry, Yuelong Shu, Derek Smith, Masato Tashiro, Dayan Wang, Richard Webby, Xiyan Xu, Zhiping Ye, Wenqing Zhang, and Writing Committee of the World Health Organization Consultation on Northern Hemisphere Influenza Vaccine Composition for 2013- 2014. WHO recommendations for the viruses used in the 2013-2014 Northern Hemisphere influenza vaccine: Epidemiology, antigenic and genetic characteristics of influenza A(H1N1)pdm09, A(H3N2) and B influenza viruses collected from October 2012 to January 2013. Vaccine 32, 4713- 4725 (2014)
- Evaluations of influenza vaccine immunogenicity using human cell lines 第 44 回日本免疫学会学術集会 (2014 年 12 月、京都)
- 3) KONO Naoko, SUN Lin, ITAMURA Shigeyuki, TOH Hiroyuki, OHNISHI Kazuo, Next Generation Sequencer Analysis of the Antibody Repertoire in Response to a Model Antigen. Annual Meeting of Japanese Society for Immunology, Kyoto 2014.
- 4) SUN Lin, KONO Naoko, SHIMIZU Takeyuki, ITAMURA Shigeyuki, TOH Hiroyuki, OHNISHI Kazuo, Statistical prediction of antigen-specific antibodies using next generation sequencer (NGS) and its confirmation by antibody protein expression. Annual Meeting of Japanese Society for Immunology, Kyoto 2014.
- 5) FUNAKOSHI Shuichi, SHIMIZU Takeyuki, OHNISHI Kazuo, BILL-cadherin/cadherin-17 Contributes to the Long-term Maintenance of Memory B Cells by Regulating the Turnover Rate. Annual Meeting of Japanese Society for Immunology, Kyoto 2014.

## 2. 学会発表

- 1) 佐藤佳代子、浅沼秀樹、高橋宜聖、阿戸学、小田切孝人、板村繁之「剤形の異なるインフルエンザワクチンにより誘導される抗体の性状に対する TLR アゴニストの影響」第 18 回日本ワクチン学会学術集会 (2014 年 12 月、博多)
- 2) Kayoko Sato, Manabu Ato, Hideki Asanuma,

## 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  
特記なし

## ワクチン力価試験法の開発に関する研究

- SRD 試験測定不能な 4 価ワクチンを逆相 HPLC によって定量する方法 -

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

### 研究要旨

現在、わが国の季節性インフルエンザ HA ワクチンは、抗原性の大きく異なる 3 種類のウイルス (A/H1N1、A/H3N2、B) で構成された 3 価のワクチンである。B 型ウイルスはビクトリア系統と山形系統に分類されるが、近年、国内外ともに両系統のウイルスが混合流行しているため、B 型両系統を含む 4 価のワクチンが日本国内に導入される計画が進められている。ところが、4 価ワクチンの場合、ワクチン力価測定 of 標準法である一元放射免疫拡散 (SRD) 試験法では、株の組み合わせによっては、B 型が測定不能になるケースがあるという問題が発生した。SRD 試験において、4 価ワクチンの B 型 2 系統の抗原が何らかの相互反応を起こしていると推察され、リング形成不良となる現象である。本研究では、SRD 試験で測定不能となった B 型混合抗原について、逆相 HPLC 法を用いてワクチン中の HA 含量が測定できないか検討した。その結果、B 型 2 系統の抗原をそれぞれ定量することができ、その値は SRD 試験法の値と概ね一致した。以上から、逆相 HPLC 法が、4 価ワクチンの B 型について SRD 試験が使用できない場合の代替法になりうる事が示唆された。

### A. 研究目的

現在のインフルエンザ HA ワクチンは、抗原性の大きく異なる 3 種類のウイルス (A/H1N1、A/H3N2、B) で製造された 3 価のワクチンである。B 型ウイルスは抗原性の違いからビクトリア系統と山形系統に分類されるが、これまでいずれかの系統のウイルスについてワクチン株として制定してきた。しかし近年、国内外ともにビクトリア系統と山形系統のウイルスが混合流行しており、現状においては、来シーズンにどちらの系統のウイルスが流行するかを予想することは極めて困難である。米国では 2012 年から 2013 年に両系統のウイルスを含んだ 4 価ワクチンの製造販売が承認された。わが国においてもワクチンを 4 価にできるように、生物学的製剤基準の改訂が進められ、日本国内でも製造販売ができるように計画が進行している。

ところが、4 価ワクチンの場合、ワクチン力価測定の標準法である、生物学的製剤基準で定められた一元放射免疫拡散 (SRD) 試験法では、株の組み合わ

せによっては、B 型が測定不能になるケースがあるという問題が発生した。具体的には、B/Brisbane/60/2008 株と B/Wisconsin/01/2010 (BX-41A) 株の場合、各株単独では SRD 測定できるが、混合した場合に B/Wisconsin/01/2010 (BX-41A) 抗血清上でリング形成不良が起こってリング境界が判別できず、SRD 測定不能となった。SRD 試験において、B 型 2 系統の抗原が何らかの相互反応を起こし、抗原抗体複合物形成に何らかの影響を及ぼしていると推察される。

そこで本研究では、SRD 試験で測定不能となった B 型混合抗原について、4 価ワクチンを調製し、逆相 HPLC 法を用いて、その 4 価ワクチン中の B 型 2 系統の HA 含量をそれぞれ定量できないか検討した。

更に、逆相 HPLC のメソッド適用範囲を確認するため、B 型山形系の株が異なる 4 価参照ワクチン (2014 年度採用ロット Lot. 2014D) についても逆相 HPLC 法で定量できるか検討した。

## B. 研究方法

### 1. 材料

(1)2012 年度ワクチン原液, 2013 年度参照ワクチン原液 (スプリット) 4 種類

①B/Brisbane/60/2008 株 : ビクトリア系統

(以下 Bris60)

②B/Wisconsin/01/2010 (BX-41A) 株 : 山形系統

(以下 BX-41A)

③A/California/7/2009 (X-179A) (H1N1) pdm09 株

④A/Texas/50/2012 (X-223) (H3N2) 株

(2)2014 年度 4 価参照スプリットワクチン (Lot. 2014D)

含有ウイルス株は以下のとおり。

B/Brisbane/60/2008 株 : ビクトリア系統、

B/Massachusetts/02/2012 (BX-51B) 株 : 山形系統 (以下 BX-51B)、

A/California/7/2009 (X-179A) (H1N1) pdm09 株、

A/New York/39/2012 (X-233A) (H3N2) 株

### 2. 方法

#### (1) SRD 試験

手順は国家検定 SOP に従い、下記の標準抗原ロットと参照抗血清ロットの組み合わせで実施した。

| 株名                               | 標準抗原<br>ロット | 参照抗血清<br>ロット        |
|----------------------------------|-------------|---------------------|
| B/Brisbane/60/2008               | 2011BB      | 2010B-1、<br>2013B-2 |
| B/Wisconsin/01/2010 (BX-41A)     | 2012BB      | 2012B-1             |
| B/Massachusetts/02/2012 (BX-51B) | 2014BB      | 2014B-3             |

#### (2) 逆相 HPLC

Kaptein らの方法 (Vaccine (2006) 24, 3137- 3144) を変法して実施した。HPLC 条件は以下のとおり。なお、ワクチン試料が鶏卵由来であることから、HA0 蛋白は充分 Cleavage していると思われ、Trypsin 処理は省略した。

カラム: ABI POROS R1/10  
注入量: 100uL  
EluentA: 0.1%TFA in 5% ACN  
EluentB: 0.1%TFA in 100% ACN  
Temp. of column oven: 60°C  
Flow: 0.8mL/min

gradient method:

| Time(min) | EluentA(%) | EluentB(%) |
|-----------|------------|------------|
| 0         | 80         | 20         |
| 2         | 70         | 30         |
| 5.5       | 65         | 35         |
| 6.5       | 0          | 100        |
| 10        | 0          | 100        |
| 12        | 80         | 20         |
| 14        | 80         | 20         |

検出器: DAD 214nm

## C. 研究結果

### 1. B 型 2 系統混合ワクチンの SRD リング確認

Bris60 株と BX-41A 株の参照ワクチン原液を用いて、各株単ワクチンと 2 株混合ワクチンを終濃度 30ugHA/mL になるように調製して、いくつかの抗血清ロットについて、リング形状を確認した。Fig. 1 に示すように、2 株混合ワクチンは、Bris60 抗血清上ではリング形成したが、BX-41A 抗血清上では、リング形成不良が発生した。調べた抗血清ロットについては Bris60 はリング形成し、BX-41A はリング形成不良となつて、株特異的に現れた。SRD 試験において、B 型 2 系統の抗原が何らかの相互反応を起こし、抗原抗体複合物形成に何らかの影響を及ぼしていると推察される。

以上、BX-41A 株は、リング境界が判別できないため、SRD 測定不能と判断されることが確認できた。

### 2. SRD 試験測定不能な 4 価ワクチンに対する逆相 HPLC の検討

逆相 HPLC の検討用サンプルとして、SRD 測定不能となつた Bris60 株と BX-41A 株の組み合わせの模擬 2 価ワクチン (各株の終濃度 30ugHA/mL) を作製した。また、Bris60 株と BX-41A 株に加えて、A/California/7/2009 (X-179A) (H1N1) pdm09 株と A/Texas/50/2012 (X-223) (H3N2) 株を混合して、各株

の終濃度 30ugHA/mL となるような模擬 4 価ワクチンを作製した。これらの模擬ワクチンを用いて、B 型 2 株のピークが確認できるか調べたところ、Fig. 2 のとおり、Bris60 と BX-41A のピークは分かれ、A/California/7/2009(X-179A) (H1N1) pdm09 や A/Texas/50/2012(X-223) (H3N2) のピークとも重なっていないため、定量できる可能性のあることがわかった。なお、各ピークがどの株の HA1 であるかについては、各株の精製 HA を標品として本測定をした時のリテンションタイムから推定した (data not shown)。

次に、SRD 力価と関連付けできる HA 含量を逆相 HPLC 法によって定量するために、SRD 試験の標準抗原を用いて検量線 (10, 20, 30, 40, 50ugHA/mL) を作製し、模擬 4 価ワクチンを定量したところ、表 1 の結果となった。この標準抗原に含有される HA 量は SRD 試験の力価として値付けされているので、必ずしも HA 含量の物理量を反映しているわけではないが、調製した仕込み計算値の SRD 力価と比較すると、概ね一致しており、良い相関が得られた。

更に、逆相 HPLC を用いた本定量法の適用範囲を確認するため、B 型山形系の株が BX-51B 株である 4 価参照ワクチン (2014 年度採用ロット Lot. 2014D) についても逆相 HPLC 法で定量したところ、表 2 の結果となった。BX-51B 株の場合は SRD リング形成したので、SRD 力価については 4 価参照ワクチン Lot. 2014D の実測 SRD 力価と比較した。なお、交差反応量を緩和する測定法の検討の結果に従い、Bris60 は標準抗原混合法で、BX-51B は標準抗原単品法で行った感染研とメーカー 4 社の合計 5 所社の平均値で示した。すると、Bris60 は多少乖離が見られたが、B 型山形系の BX-51B は概ね一致していた。

#### D. 考察

Bris60 株と BX-41A 株を混合した場合に BX-41A 抗血清上でリング形成不良が起こってリング境界が判別できず、SRD 測定不能となる現象が起こった。4 価ワクチンの導入にあたり、現行の SRD 試験によ

る力価測定に大きな課題を残している。原因はまだ詳細に調べられていないが、抗血清ロットが変わってもリング形成不良となることから、株もしくは株の組み合わせ特異的な現象であると考えられた。リング形状を観察すると、Bris60 株が BX-41A 抗血清に明瞭な交差反応を示しているため、このような B 型抗原の組み合わせの場合に生じる現象なのかもしれない。

今回、SRD 試験で測定不能となった Bris60 と BX-41A の混合ワクチンについて、逆相 HPLC 法を用いてワクチン中の HA 含量が測定できた。更に、仕込み計算値の SRD 力価と比較すると、概ね一致しており、SRD 試験で測定できなかった BX-41A 株がよい相関性をもって逆相 HPLC 法で測定できることがわかった。同じ B 型山形系の BX-51B 株に対しても、SRD 力価とは概ね一致しており、本逆相 HPLC 法は SRD 法との相関性に関して、B 型山形系株において堅牢性をもつ可能性が考えられる。しかしながら、一方で Bris60 については、2 つの異なるワクチンで力価測定の一貫性については異なっており、検討の余地は残る。異なる原因として、ワクチンの HA 含量の物理量と SRD 試験による抗原活性量の割合が、ワクチンロット間で一定でない可能性が考えられる。逆相 HPLC 法による定量に適した標準品についても今後検討が必要と思われる。

逆相 HPLC 法は抗原活性を測定していないものの、4 価ワクチンの B 型について SRD 試験が使用できない場合であれば、代替法の 1 つになりうると思われる。

#### E. 結論

SRD 試験で測定不能となった B 型混合抗原について、逆相 HPLC 法を用いてワクチン中の HA 含量が測定できないか検討したところ、B 型 2 系統の抗原をそれぞれ定量することができ、その値は SRD 試験法で測定した値と概ね一致した。以上から、逆相 HPLC 法が、4 価ワクチンの B 型について SRD 試験が使用できない場合の代替法になりうることが示唆された。

F. 研究発表

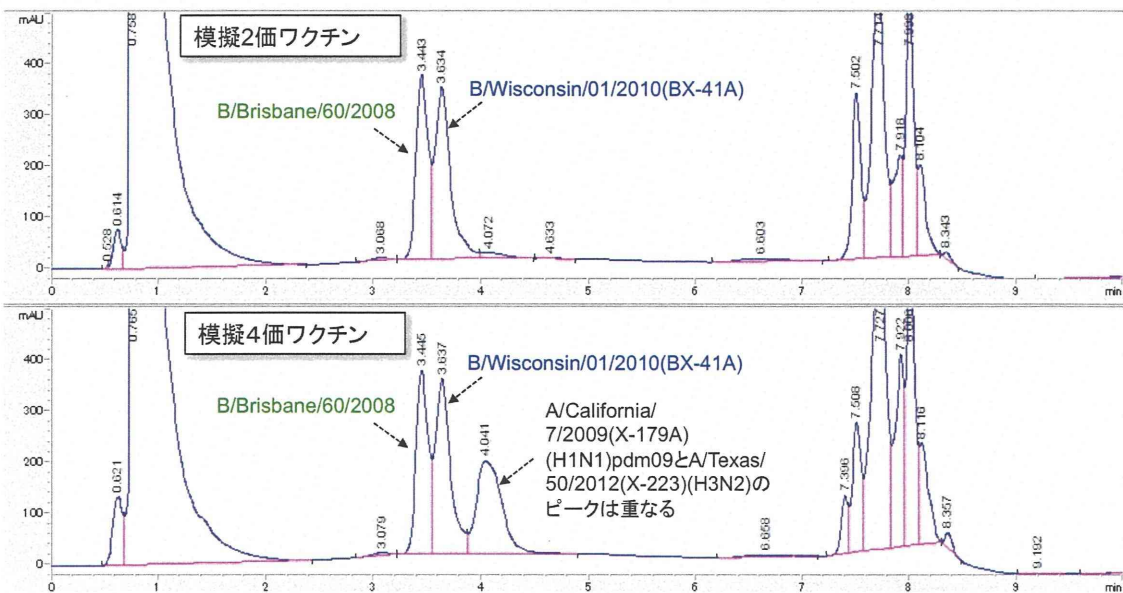
1. 論文発表       なし
2. 学会発表       なし

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

| 株                  | 抗血清ロット                 | 交差の有無              | Bris60標準抗原 (2011BB) | (1)Bris60単ワクチン | (3)混合ワクチン | (2)BX-41A単ワクチン | BX-41A標準抗原 (2012BB) |
|--------------------|------------------------|--------------------|---------------------|----------------|-----------|----------------|---------------------|
| B/Brisbane/60/2008 | 2010B-1                | なし○                |                     |                |           |                |                     |
|                    | 2013B-2(バイオシーラムSH-231) | 僅かに有り△             |                     |                |           |                |                     |
| BX-41A             | 2012B-1                | 有り×、輪郭不明瞭になり計測できない |                     |                |           |                |                     |
|                    | バイオシーラムMen-385         | 有り×、輪郭不明瞭になり計測できない |                     |                |           |                |                     |

【Fig. 1】 B/Brisbane/60/2008 株と B/Wisconsin/01/2010 (BX-41A) 株の混合ワクチンの SRD リング形状



【Fig. 2】 模擬2価ワクチンと模擬4価ワクチンのクロマトグラフ

【表 1】 模擬4価ワクチンの HPLC による定量および SRD 値との比率

|          | 株名                          | Concentration by HPLC(ugHA/mL) | Concentration by SRD(ugHA/mL) | Ratio(%)=HPLC/SRD |
|----------|-----------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------|
| 模擬4価ワクチン | B/Brisbane/60/2008          | 29.9                           | 30                            | 99.8%             |
|          | B/Wisconsin/01/2010(BX-41A) | 32.7                           | 30                            | 109.1%            |

【表 2】 4 価参照ワクチン (Lot. 2014D) の HPLC による定量および SRD 値との比率

|                     | 株名                              | Concentration by HPLC(ugHA/mL) | Concentration by SRD(ugHA/mL) | Ratio(%)=HPLC/SRD |
|---------------------|---------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------|
| 4 価参照ワクチン Lot.2014D | B/Brisbane/60/2008              | 41.4                           | 30.5                          | 135.7%            |
|                     | B/Massachusetts/02/2012(BX-51B) | 39.0                           | 36.2                          | 107.7%            |

注) SRD 力価: B/Brisbane/60/2008 は標準抗原混合法、  
B/Massachusetts/02/2012(BX-51B) は標準抗原単品法で行った  
感染研とメーカー4社の合計5所社の平均値を示す。

剤型の異なるインフルエンザワクチンにより誘導される免疫応答の機構に関する研究

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

ワクチンによる免疫応答は、投与されたワクチンを抗原提示細胞が取り込むことから開始するとされている。本年度は、抗原提示細胞のワクチン取り込みの評価をすることでワクチンの免疫原性を評価出来るかについて、ヒト細胞株における NF- $\kappa$ B の活性化を指標に検討した。全粒子ワクチンとスプリットワクチンで有意に NF- $\kappa$ B の活性化が誘導されることが確認できた。さらに NF- $\kappa$ B の活性化の程度とマウスにおける抗体産生誘導能に相関が有ることが確認された。同時にこの系を用いることにより、細胞傷害活性を測定することも可能であることから、ワクチン免疫原性を評価する上で有用なシステムとなりうることを期待される。

### 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。現行の力価評価は一次放射免疫拡散法による HA 含量の測定であり、抗原取り込み細胞を用いたワクチン免疫原性を評価することはワクチンの有効性を担保する上で有用であると考えられる。インフルエンザワクチンはマクロファージ/樹状細胞に取り込まれ I 型 IFN を産生することが知られている。インフルエンザワクチンに含有される RNA がリガンドとなって TLR を介したシグナル伝達によって転写因子である IRF3/IRF7 がリン酸化されて、その結果 I 型 IFN 遺伝子の活性化が起こり IFN が産生される。同様に、TLR を介したシグナル伝達により NF- $\kappa$ B が活性化され、炎症性のサイトカイン(IL-6, TNF- $\alpha$  and pro-IL-1 $\beta$  and pro-IL-18)が誘導される。そこで転写因子 (NF- $\kappa$ B) と結合して転写を促進する遺伝子領域にレポーター遺伝子を組み込んだヒト由来単球系細胞株 (THP-1 細胞) を用いてインフルエンザワクチンの全粒子型、スプリ

ット型による応答の違いを評価した。

### B. 研究方法

転写因子 (NF- $\kappa$ B) と結合して転写を促進する遺伝子領域にレポーター遺伝子 (SEAP: secreted embryonic alkaline phosphatase) を組み込んだヒト単球系細胞 (THP1-Xblue 細胞) を Invivogen より購入し、manufacture's protocols に従い培養した。PMA によりマクロファージ様細胞に分化することで取り込み効率が增大し、TLRs に対する感受性も高まるため、ワクチンとの混合培養前に分化させた。マクロファージ様細胞に分化させた細胞にインフルエンザ全粒子ワクチンまたはインフルエンザスプリットワクチン (A/H1N1pdm09, X-179A) と混合培養した。培養 20 時間後に培養上清中の SEAP の活性を測定することによりワクチン添加による NF- $\kappa$ B 活性化の指標とした。同時に混合培養した細胞の生存割合を MTT アッセイにより評価した。

また、一般に知られている I 型インターフェロンへの影響を確認するため、ワクチンと混合培養し 3 時間または 5 時間後に RNA を抽出し、定量 PCR 法により遺伝子の発現変化を測定した。



## C. 研究結果

### ワクチン取り込みによる NF- $\kappa$ B 活性化とサイトカイン遺伝子発現変化との相関

全粒子ワクチンおよびスプリットワクチン (A/H1N1pdm09、X-179A) を各種濃度 (0.1-10  $\mu$ g/ml) で細胞と混合培養 20 時間において、NF- $\kappa$ B の活性化が濃度依存的に認められた (図 1)。スプリットワクチンの場合は全粒子ワクチンに比べて低下しているものの、有意に活性化していることが分かった。この同じ細胞を用いて全粒子ワクチンと 3 時間または 5 時間混合培養後のサイトカイン遺伝子発現変化を PCR 法にて測定した。NF- $\kappa$ B 活性化により誘導されると考えられているサイトカイン遺伝子 (TNF- $\alpha$ 、IL-12、IL-18、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\beta$ ) についてまず評価したところ、IFN- $\beta$  でのみ顕著な上昇が認められた。そこで混合培養する各ワクチンの濃度を変えて評価したところ表 1 に示すように TNF- $\alpha$  では発現変化がほとんど無く IFN- $\beta$  で濃度依存的に発現上昇が認められた。全粒子ワクチンには IFN- $\beta$  の遺伝子発現誘導能と NF- $\kappa$ B の活性化能があることが確認できた。一方、スプリットワクチンでは IFN- $\beta$  の遺伝子発現の誘導は認められなかった。また、TLR の遺伝子発現を同様に検討したところ、表 1 に示した通り、3 時間後では差はなかったが、5 時間培養することで TLR7 や TLR9 には変化は無いにも関わらず TLR3 の遺伝子発現が濃度依存的に増強することが分かった。

### ワクチンによるマクロファージ様細胞への細胞傷害効果

NF- $\kappa$ B 活性化を評価するために培養上清を採取した後、残った細胞を用いて MTT アッセイを行い細胞生存率の測定をした。図 2 に示した通り、細胞生存率はワクチン無添加群と同等であり、NF- $\kappa$ B の活性化は細胞傷害とは無関係であることを確認できた。同一細胞を用いて細胞生存率を評価することは、ワクチンの安全性の確認だけでなく今後アジュバントの評価をする際に有用な系の一つとなりうる

と考えられる。

## D. 考察

マクロファージ様細胞がインフルエンザ全粒子ワクチンとスプリットワクチンを取り込んだ際の免疫応答は、I 型 IFN 遺伝子発現は全粒子ワクチンでのみ誘導された。NF- $\kappa$ B 活性化という観点では全粒子ワクチンとスプリットワクチンで程度の問題であり、同じ TLR を通じたシグナル伝達経路による可能性があると考えられる。また全粒子ワクチンによる TLR3 の発現変化はワクチン取り込みによる直接の影響というより、I 型 IFN が産生誘導されたことによる二次的な影響であると考えられる。全粒子ワクチンにより TLR アゴニストへの感受性が変化する可能性があるため、この知見はワクチンに添加するアジュバント選択の際に有用な知見となる。

## E. 結論

インフルエンザ全粒子ワクチンとスプリットワクチンがマクロファージ様細胞へ取り込まれる際の免疫応答を NF- $\kappa$ B 活性化という指標で評価した。抗体産生誘導と相関して全粒子ワクチン、スプリットワクチンに活性化誘導能があるが全粒子ワクチンの方が強いことを見いだした。同時にワクチンによる細胞傷害活性を同じ細胞を用いて評価できることを確認した。今後、ワクチンを変性させた場合の応答を免疫原性と本活性の関係を調べて品質管理試験として利用できるのか検討を進める予定である。また、臨床試験で使用されたワクチンを用いて評価を行うことにより、ヒトでのワクチン免疫原性との関連を調べる計画である。

## F. 研究発表

1. 論文発表  
なし

2. 学会発表

佐藤佳代子、浅沼秀樹、高橋宜聖、阿戸学、小田切孝人、板村繁之  
剤形の異なるインフルエンザワクチンにより誘導される抗体の性状に対する TLR アゴニストの影響  
第 18 回日本ワクチン学会学術集会 (2014 年 12 月、

博多)

Kayoko Sato, Manabu Ato, Hideki Asanuma  
Evaluations of influenza vaccine immunogenicity  
using human cell lines  
第44回日本免疫学会学術集会(2014年12月、京都)

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

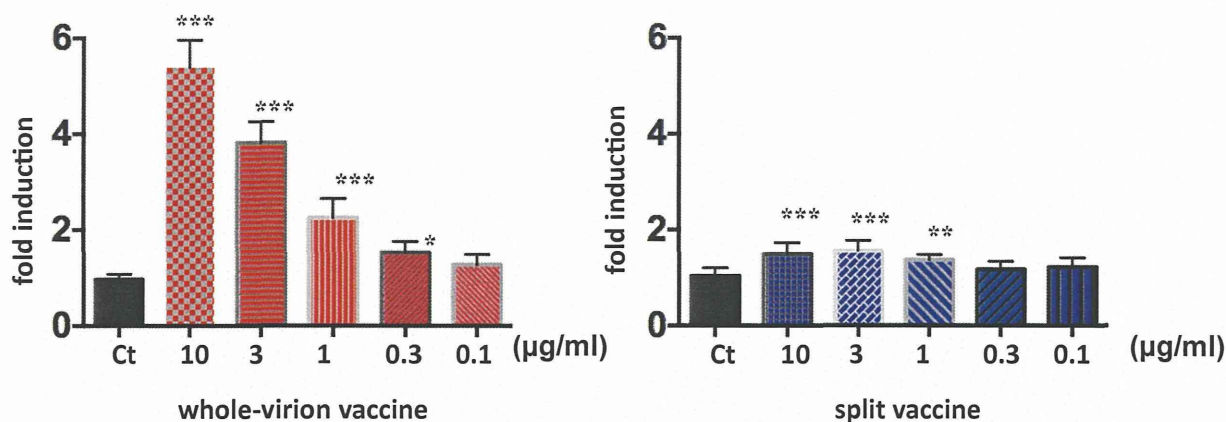


図1 インフルエンザ全粒子ワクチンとスプリットワクチンによるNF-kB活性化

ヒト単球系細胞株THP-1をPMAでマクロファージ様細胞に分化した後、インフルエンザ全粒子ワクチンまたはスプリットワクチンと共培養20時間後のNF-kB活性化をワクチン無添加群との比で示す。

表1 インフルエンザ全粒子ワクチンとスプリットワクチンによるサイトカイン遺伝子及びTLR遺伝子発現変化(ワクチン無添加群との比)

|         | 3h culture |       |       |      |      |      | 5h culture |       |      |      |      |
|---------|------------|-------|-------|------|------|------|------------|-------|------|------|------|
|         | (µg/ml)    | IFN-β | TNF-α | TLR3 | TLR7 | TLR9 | IFN-β      | TNF-α | TLR3 | TLR7 | TLR9 |
| whole   | 100        | 99.3  | 2.2   | 2.2  | 1.2  | 0.9  | 142.7      | 2.4   | 6.8  | 2    | 0.7  |
| -virion | 10         | 81    | 1.6   | 1.9  | 1    | 1    | 88.8       | 2.2   | 7.1  | 1.9  | 0.8  |
|         | 1          | 16.4  | 1.3   | 1.4  | 1.1  | 1.2  | 27.9       | 1.7   | 4.7  | 1.4  | 1.1  |
|         | 0.1        | 1.7   | 1.2   | 1.1  | 1.1  | 1.3  | 1.4        | 1.4   | 0.8  | 1    | 1.1  |
|         | split      | 100   | 2     | 1.4  | 1.2  | 1.1  | 1          | 1.6   | 1.9  | 0.7  | 1    |

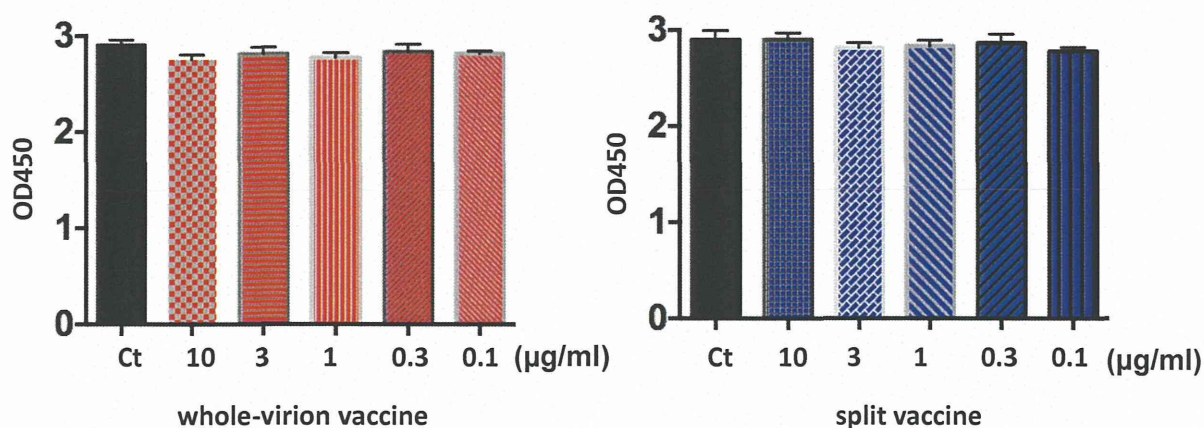


図2 インフルエンザ全粒子ワクチンとスプリットワクチンによるマクロファージ様細胞への細胞傷害活性

ヒト単球系細胞株THP-1をPMAでマクロファージ様細胞に分化した後、インフルエンザ全粒子ワクチンまたはスプリットワクチンと共培養20時間後の細胞生存率をMTTアッセイで評価した結果を示す。

## ワクチンの新規免疫原性解析法の開発

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 室長  
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  
藤 博幸 産業技術総合研究所 ゲノム情報研究センター 副研究センター長

### 研究要旨：

ワクチン接種によって惹起される免疫応答のうち、ワクチン抗原特異的な抗体群を網羅的に知る新しい方法があれば、ワクチンの免疫原性解析に大きく貢献する。本研究ではこの目的のために、次世代シーケンサ(NGS)を用いた独自の技術の開発に着手し、昨年度の研究で基本的な新規技術基盤を確立した。本年度は、この技術の深化と応用を様々な角度から進めた。特に、本来の目的である、製造法の異なるインフルエンザワクチン(発育鶏卵法と培養細胞法)の免疫により、誘導されてくる抗体群(抗体レパートリー)が明らかに異なる事を詳細に解析することが出来た。すなわち、本解析法でワクチンの免疫原性について抗体分子レベルの応答を網羅的に明示することが初めて可能になった。

### A. 研究目的

ワクチン抗原特異的な抗体群を網羅的に知る新しい方法があれば、ワクチンの新規免疫原性開発に大きく貢献する。本研究ではこの目的のために、次世代シーケンサ(NGS)を用いた独自技術の開発をおこなった。この新規技術を用いて、例えば、ワクチン製造のために発育鶏卵での増殖性を確保する継代馴化を行った結果生ずる宿主馴化変異によるワクチン有効性低下の原因を知ることができるのではないかと考えた。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、ワクチン製造株の品質管理の観点から重要である。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新規技術基盤の開発のために、ワクチンの免疫応答を抗体遺伝子のレパートリーおよび抗体誘導の量的、質的差異について解析する指標の確立を目指す。

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

次世代シーケンサ(NGS)を用いた抗体レ

パートリーの網羅的解析法については、昨年度の研究でその基本的な新規技術基盤を確立した。本年度は以下の点について本解析法の深化と応用を行った。

1) 抗原特異的抗体レパートリーの抗原親和性成熟に伴う系統樹解析：C57BL/6系統のマウスに対してNP-CGG(Nitrophenol-Chicken gamma globulin)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、抗体親和性成熟にかかわるアミノ酸変異についても詳細に解析が進んでいる。このNP-CGGに対する抗体応答をモデルシステムとしてNGSを用いた抗体レパートリーの網羅的解析を行い、抗原特異的抗体レパートリーの同定アルゴリズムと、抗原親和性成熟に伴う体細胞突然変異の蓄積を解析し、系統樹として可視化するプログラムを作製した。

2) BALB/c系統マウスの抗体遺伝子座の解析と抗体レパートリーの網羅的解析：インフルエンザワクチンの力価試験に用いられるマウス系統はBALB/cであり、C57BL/6系統のマウスとは異なる抗体遺伝子座の構成を持つ。昨年度、C57BL/6系統に対して開発した、NGSを用いた抗体レパートリーの網羅的解析法をBALB/c系統に適用するため、BALB/c系統の抗体遺伝子をデータバンクから集めて解析した。BALB/c