

## フェレット抗血清作製とウイルスリスク評価に関する研究

研究分担者 浅沼秀樹

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・第六室長

### 研究要旨

インフルエンザワクチン候補株および市中流行株の抗原性を試験するためのフェレット抗血清の作製を行った。また鶏卵や細胞培養を用いた継代によって生じる変異による病原性の変化ならびに防御抗体の誘導能に関する検討を行った。一方、鶏卵を用いた継代によって変異した H1N1pdm (A/Narita 株) ならびに臨床分離株の感染抗血清を作製し、抗原性試験を行った結果、分離株の抗血清は継代株の抗原性の違いを評価できたが、鶏卵継代株に対する抗血清は原株および分離株の抗原性の違いは評価できなかった。

### A. 研究目的

各国で流行するインフルエンザウイルスは、世界保健機構（WHO）の世界インフルエンザ監視対応ネットワーク（GISRS）が中心となり、発生動向監視（サベイランス）や流行予測が行われており、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はこのネットワークに参加し、日本国内を中心としたサベイランスを行っている。このサベイランスは定点医療機関より各地方衛生研究所に報告されたインフルエンザの遺伝子および抗原情報等を基に、国際間の流行の違いや過去の流行との相違を比較し次年度のワクチン選定やワクチンの有効性を評価している。このような流行株の抗原性解析には、フェレットの感染血清が用いられている。そのため本研究では、流行株およびワクチン株の抗原性解析のためのフェレット抗血清の作製およびその評価を行った。

また、近年のインフルエンザワクチンは鶏卵で増殖を高めるための遺伝子改変が行われているが、この過程で抗原性が変化し、ワクチンの有効性を著しく減弱させることが指摘されている。そのため本研究では鶏卵で馴化されたウイルス株を用いたフェレット抗血清を作製

し、鶏卵馴化による変異がもたらす影響について検討した。

### B. 研究方法

#### ・フェレット

日本 SLC より購入した 6～12 ヶ月齢のフェレット（メスおよびオス）を用いた。なお、本研究における動物実験については国立感染症研究所動物実験委員による審査を受け、同研究所が定める実験動物管理規定を遵守して行われた。

#### ・抗血清採取

A/Saitama/103/2014(A/Saitama;H3N2)、A/Hong Kong/4801/2014(X-263B;H3N2)、A/Yokohama/50/2015(A/Yokohama;H1N1pdm)、A/Ibaraki/N12014/2009(N14;H1N1pdm) および A/Narita/1/2009(A/NCK;H1N1pdm) と鶏卵馴化株 (A/NE15)、それぞれの株を経鼻接種 (100 もしくは 500  $\mu$  L) した。接種 2 週後、部分ないしは全採血を行い、血清を分離し抗血清として使用した。

#### ・感染防御実験

A/NE15 株を投与したフェレットは野外株で

ある N14 株をチャレンジし経時的に鼻腔洗浄液を回収し、ウイルス価を測定した。ウイルス価の測定には単層培養した MDCK 細胞を用いた寒天プラーク法により測定した。

・血球凝集阻害試験 (Hemagglutinin inhibition test; HI) および中和試験 (Neutralization test; NT)

HI および NT は WHO Global Influenza Surveillance Network の “Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza” に記載された手法に則って行った。

HI は RDE 処理した血清の 2 倍階段希釈列を 96 穴プレート上で作製後、4HA 価に調整したウイルス抗原を今後し、0.5%七面鳥もしくは 1%モルモット血球を混合し、血球凝集阻害能を観察した。NT は HI 同様、2 倍階段希釈列を 96 穴プレート上で作製後、100TCID<sub>50</sub>/50 μl に調製したウイルス液と混合、1 時間反応後、細胞懸濁液を添加し、18-20 時間、34°C の CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。培養後の細胞プレートをアセトン固定後、抗インフルエンザウイルス NP 抗体とペロキシダーゼ標識 2 次抗体を用いた酵素免疫抗体 (ELISA) 法によるウェルの呈色反応をもってウイルス感染細胞の有無を判定した。中和抗体価はウイルス感染の阻止が認められた血清希釈倍数に基づいて算定した。

(倫理面への配慮)

本研究ではヒト臨床検体由来のウイルスを用いた。ヒト臨床検体の採材ならびに使用に関しては、国立感染症研究所・倫理委員会の審査を受け行われた。

### C. 研究結果

1) A/Saitama、X-263B および A/Yokohama の抗血清作製

・A/Saitama 株: 3 頭のフェレットに A/Saitama

株を経鼻的に投与し 2 週に血清を回収した。HI 価を測定した結果、ホモ値は 320、640、320 と高い HI 価が認められた (表 1)。埼玉株はクレード 3C.2a に分類されるが、同じクレードの Hong Kong/4801 に対しても高い HI 価を示した。このことから今回作製した抗血清が抗原性の評価に使用可能であることが示唆された。

・X-263B 株: 4 頭のフェレットを用い、X-263B 株の感染 2 週目の抗血清を作製した。これら抗血清を用いた HI 試験を行った結果、4 頭すべてに 2560 以上の高いホモ値を示した (表 2)。同じクレードの Saitama 株に対する反応性はホモ値よりも 2 冠以上低いが、X-263B は HGR 株であるため、HA に変異を伴っていることがこのような反応性の低下につながったことが示唆される。今後、他の株との反応性を精査し試験血清としての適否を評価する。

・A/Yokohama 株: 4 頭のフェレットを用いて抗血清を作製した。これら抗血清を用いた HI 試験を行った結果、4 頭すべて 5120 の高いホモ値が認められた (表 3)。他の H1N1pdm 株である A/California および A/Narita に対しても 1280~5120 と一律に高い HI 価が認められたことから、試験血清として高い有用性があることが示唆される。

2) 鶏卵馴化 A/Narita 感染フェレットにおける野外株に対する感染阻止能および抗血清の反応性の検討

鶏卵馴化 A/Narita 株 (A/NE15) もしくは原株 (A/NCK) をそれぞれ 3 頭のフェレットに経鼻投与後 2 週間後に部分採血により抗血清を採取した、その 2 週後、野外株である N14 株を感染し、経時的に鼻腔洗浄液を回収し、ウイルス価を測定した。N14 株は 2009 年に国内で流行し、リファランス株の A/California/7/2009 株の類似株であることが明らかとなっている株である (結果非表示)。その結果、原株を感染させた 1/3 頭で、感染 1 日目に僅かなウイルスが検出されたのみで、他の全ての鼻腔洗浄液

でウイルスの完全な防御が認められた (図 1)。これら感染血清を用いて抗原性試験を行ったところ、馴化株および原株で免疫したすべてのフェレットで感染株の N14 に対する高い HI 抗体価が確認された。しかしその一方、N14 の抗血清で抗原性試験を行った場合には、鶏卵馴化株との抗原性の著しい乖離が認められた (表 4)。以上の結果は、A/Narita 株の場合、鶏卵で馴化した株を感染させたフェレットでは原株および原株との類似株の抗原性を高く認識できることが示唆された。

#### D. 考察

近年の H3N2 株は鶏卵での分離および増殖が困難になっており、また鶏卵で分離できた株でも変異を伴っていることが多い。一方、インフルエンザワクチンは鶏卵を用いて製造するため、遺伝子を改変し、鶏卵での増殖性を高める必要があるが、この過程で生じた変異により、ワクチンの抗原性が流行株と乖離し、効果が著しく減弱する。それに加え野外株も毎年変異を繰り返しているため、適切に流行株を評価するサベイランスの重要性が一段と増している。

現在流行株やワクチン種株の抗原性の評価にはフェレット感染血清が用いられている。しかしウイルス株や個体間で抗血清の反応性が異なるため、適切な抗血清の作製はウイルス株の抗原性を適切に評価するためには重要である。

今回評価血清として 3 株の抗血清を作製した。それぞれ 3 ないし 4 頭のフェレットを用いたが、個体間での大きな差異は認められなかった。しかし、X-263B および A/Yokohama 株の抗血清は全てのフェレットで 2560 以上の高いホモ値を示したが、A/Saitama 株の抗血清は 320~640 のホモ値であった。A/Saitama と X-263B は同じ H3N2 株の同クレードに分類されている株であり、それぞれの株に対する反応性を確認したが、A/Saitama の抗血清では X-263B の抗原性との差異は認められなかったが、

X-263B の抗血清では A/Saitama との抗原性の違いに有意性が認められた。他の NIC では CDC で 1280 のホモ値が示されているため、今後、本血清を用いた抗原性の評価が他の NIC の評価との相違に繋がることも考えられる。

このような現象は鶏卵で馴化した Narita 株を用いた検討でも認められている。A/NCK 株の抗血清で馴化株の抗原性を検討した場合、1/3 頭で 2 冠、2/3 頭で 1 冠の違いを示した。しかしながら A/NE15 株の抗血清では A/NCK 株の抗原性に相違が認められなかった。さらにこのような現象は分離株である N14 株でより顕著であった。N14 株の抗血清を用いて A/NE15 の抗原性を評価した場合には、3/3 頭全ての抗血清で 4 冠の低下を示したのに対し、A/NE15 の抗血清は 3/3 頭全ての血清が N14 との抗原性の違いを示さなかった。すでに A/NE15 株は HA の 155 および 223 番目のアミノ酸の変異が明らかとなっているため、このような変異が免疫血清の反応性に影響を与えていることが示唆される。その一方で、今回鶏卵で馴化した株の抗血清が原株や流行株と高い反応性を示したことは、必ずしも鶏卵を介することで生じる変異が流行株の感染を阻止できない訳ではないことを示唆している。実際に A/NE15 株で免疫したフェレットでは N14 株の感染を完全に阻止している。

#### E. 結論

今回作製した A/Saitama、X-263B および A/Yokohama 株に対する抗血清は、流行株およびワクチン株の抗原性の評価に高い有用性がある。また鶏卵を介した変異株は、原株に対する抗血清の反応性は低いが、変異株に対する抗血清は原株との反応性が高かった。これがワクチンの効果にどのように反映されるかが今後の検討課題となった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Aina A, Hasegawa H, Obuchi M, Odagiri T, Ujike M, Shirakura M, Nobusawa E, Tashiro T, Asanuma H. Host adaptation and the alteration of viral properties of the first influenza A/H1N1pdm09 virus isolated in Japan. PLoS ONE, 2015; 10(6): e0130208.
- Asanuma H, Ohori J, McGhee JR, Fujihashi K. Past Efforts and Future Prospects for a Nasal Influenza Vaccine. Clinical Immunology, Endocrine & Metabolic Drugs, 2015; VOL.2 ISSUE:1, 13-26.
- Li TC, Yang T, Ami Y, Suzaki Y, Shirakura M, Kishida N, Asanuma H, Takeda N, Wakita T. Ferret Hepatitis E Virus Infection Induces Acute Hepatitis and Persistent Infection in Ferrets. Vet Microbiol, 2016 Feb 1;183:30-6.

## 2. 学会発表

- 原田勇一、高橋 仁、浜本いつき、浅沼秀樹、許斐奈美、小田切孝人、信澤枝里
- 季節性培養細胞インフルエンザワクチン製造開発への取り組み（製造株作製用ウイルスの分離）
- 第 63 回日本ウイルス学会、福岡、2015
- Ohori J, Asanuma H, Aso K, Ikeda Y, Sugita G, Fujihashi K, McGhee JR, Fujihashi K. Nasal Delivery Of Plasmid Flt3 Ligand And CpG ODN Restore Influenza Virus-Specific Secretory IgA Ab Responses
- 第 44 回日本免疫学会学術集会、札幌、2015
- Kayoko Sato, Hideki Asanuma, Manabu Ato. NF- $\kappa$ B activation by influenza vaccines mediates through TLR3, TLR7, and RIG-I
- 第 44 回日本免疫学会学術集会、札幌、2015

## G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

## H. 健康危険情報

該当なし

表1 A/Saitama株の抗血清による抗原性試験

Test Antigen	Passage history	Saitama/103/2014			Switzerland/9715293/2013
		Egg No. NIID1	Egg No. NIID2	Egg No. NIID3	Cell No.3
A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	SIAT1/SIAT2 +SIAT1 <sup>1)</sup>	160	160	160	320
A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2)	E6(Am1A1)/E1+ 1 <sup>2)</sup>	320	320	640	80
A/Hong Kong/7127/2014 (H3N2)	E6/E1+1	160	320	640	160
A/Hong Kong/7127/2014 (H3N2)	MDCK1+SIAT1	80	80	80	80
A/Saitama/103/2014 (H3N2)	NC0+3+E8 (Am4A14) <sup>3)</sup>	320	640	320	80
A/Narita/1/2009 (H1N1)pdm09	MDCK1 +2	<10	<10	<10	<10
B/PHUKET/3037/2013 Byam	MDCK2 +1	<10	<10	<10	<10
B/Texas/02/2013 Bvic	MDCK1/MDCK2+1	<10	<10	<10	<10

<sup>1)</sup> SIAT: Canine cocker spaniel kidney sialic acid over expression

<sup>2)</sup> Am: amniotic cavity

<sup>3)</sup> NC: NIID-MDCK

表2 X-263B株の抗血清による抗原性試験

Test Antigen	Passage history	Switzerland/ 9715293/13 (NIB-88)	Saitama/103 /14	HK/4801/14 (X-263B)			
		Egg No.2	SIAT No.1	Egg No.1	Egg No.2	Egg No.3	Egg No.4
	SIAT1/SIAT						
A/Switzerland/9715293/2013	2 +SIAT1*	80	80	40	80	80	40
A/Switzerland/9715293/2013	E4 +1	1280	160	160	80	160	80
A/Switzerland/9715293/2013 (NIB-88)	E5 +1	640	80	20	20	40	20
	MDCK 1						
A/Saitama/103/2014	+SIAT1	320	1280	640	320	640	640
	MDCK 1						
A/Hong Kong/4801/2014(X-263B)	+SIAT1	20	1280	2560<	2560<	2560<	2560<

\* SIAT: Canine cocker spaniel kidney sialic acid over expression

表3 A/Yokohama株の抗血清による抗原性試験

Test Antigen	Passage history	A/Yokchama/50/2015 MDCK2 +1				A/California/07/2009
		NIID No.1	NIID No.2	NIID No.3	NIID No.4	NIID No.2
A/Yokohama/50/2015	MDCK2 +1	5120	5120	5120	5120	5120
A/California/07/2009pdm	E2 +2	2560	1280	1280	1280	2560
A/California/07/2009pdm (X-179A)	Ex/E1 +2	5120	5120	5120	5120	5120
A/Narita/1/2009 (H1N1)pdm09	MDCK1 +2	5120	2560	2560	2560	5120
A/Sapporo/163/2011 (H1N1)pdm09	MDCK2 +2	80	40	40	40	80
A/Texas/50/2012 (H3N2)	MDCK1/MDCK2 +SIAT1*	<10	<10	<10	<10	<10
B/Texas/02/2013	MDCK1/MDCK2+1	40	20	40	80	40
B/PHUKET/3037/2013	MDCK2 +1	20	20	40	80	40

\* SIAT: Canine cocker spaniel kidney sialic acid over expression

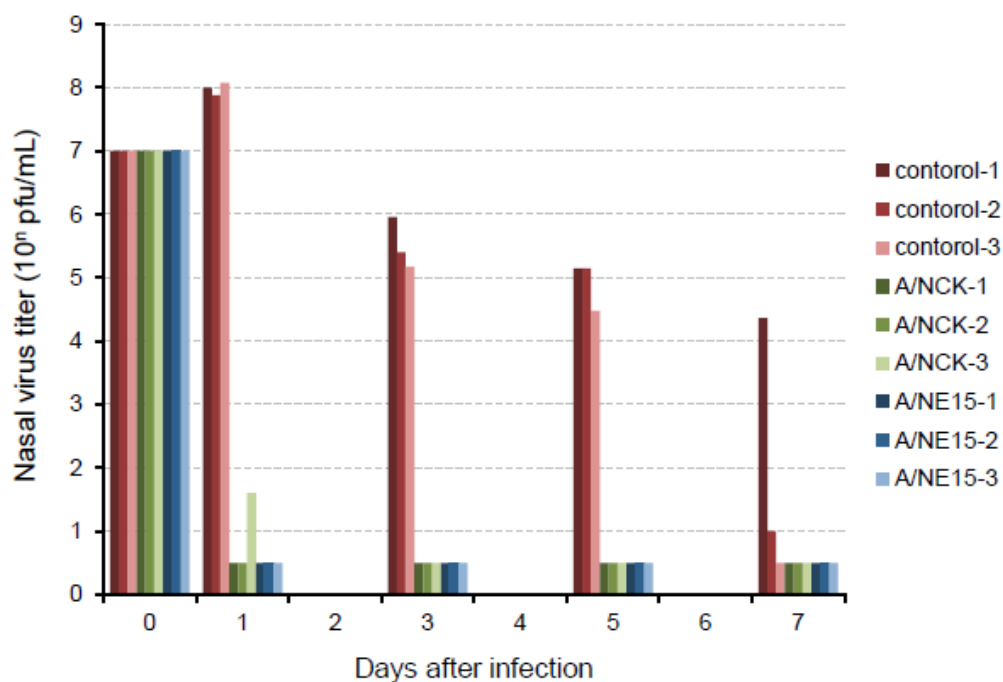


図1 鶏卵馴化株で免疫したフェレットにおける野外株に対する防御効果  
 鶏卵で馴化したA/Narita (A/NE15) もしくは原株 (A/NCK) を感染後、経時的に  
 鼻腔洗浄液を回収し、ウイルス価を測定した。

表4 鶏卵馴化フェレット抗血清による抗原性試験

Test Serum	Test antigen		
	A/NCK	A/NE15	N14
A/NCK-1	2560	640	2560
A/NCK-2	1280	640	2560
A/NCK-3	2560	1280	2560
A/NE15-1	640	640	1280
A/NE15-2	640	640	1280
A/NE15-3	1280	640	1280
N14C3-1	2560	320	5120
N14C3-2	2560	320	5120
N14C3-3	640	160	2560