

抗原変異が誘導されにくいインフルエンザワクチン株の開発

研究分担者：桑原 朋子

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・主任研究官

研究要旨

現行の季節性インフルエンザワクチンには、発育鶏卵（鶏卵）で分離されたウイルスが用いられるが、近年、特に A(H3N2)ウイルスにおいては、鶏卵で継代すると、ウイルスの抗原部位に変異が入り、その結果、流行株とワクチン株の抗原性が乖離してしまう現象が起こっている。しかしながら、我々は鶏卵で分離してもウイルスの抗原部位に変異を持たない A/Saitama/103/2014(H3N2)株（埼玉株）の分離に成功した。我々は、埼玉株の性状を明らかにすれば、鶏卵で分離しても抗原変異を起こしにくいウイルスの分離調製法の確立に繋がるのではないかと考え、埼玉株の性状解析を試みた。その結果、埼玉株 NA にはシアル酸レセプター結合能があり、埼玉株は鶏卵において NA を介したレセプター結合により増殖が可能であることが明らかになった。また、リバーズジェネティクス法により、埼玉株以外の HA と埼玉株 NA を持つウイルスを作製し、鶏卵で継代したところ、5代継代後も HA に変異は認められなかった。今後さらに研究を進めることにより、埼玉株 NA を用いた鶏卵馴化による抗原変異が誘導されにくいワクチン株の開発につながることを期待される。

A. 研究目的

WHO の季節性インフルエンザワクチン推奨株は、WHO Collaborating Centre (WHOCC)により鶏卵で分離されたウイルスの中から選定される。我々、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も WHOCC の一つであり、より有効性の高いワクチン株の選定に貢献するため、全国の地方衛生研究所や提携医療機関から分与された臨床検体を鶏卵に接種し、ワクチン候補株の分離を行っている。しかしながら、近年の A(H3N2)ウイルスにおいては、鶏卵で増殖しづらく、鶏卵で増殖しても主要抗原である HA に変異が入り、ウイルスの抗原性が変化してしまう現象が起きている。ワクチン株の抗原性の変化は、ワクチン株と流行株の抗原性の乖離を意味しており、これによりワクチンの有効性も低下することが報告されている。このような背景のもと、我々は、鶏卵で A/Saitama/103/2014 (H3N2) (埼玉株) を分離した。通常、鶏卵でワクチン株を分離する際には、臨床検体を直接鶏卵に接種し継代するが、我々は埼玉株を分離

する際に、臨床検体が少量であったため、まず当研究所で細胞ワクチン開発用に品質管理している MDCK 細胞で継代し、十分なウイルス量を確保した後に鶏卵で継代した。鶏卵で分離した埼玉株の遺伝子を調べたところ、HA には臨床検体と比較して、抗原部位ではない場所 1ヶ所に変異が入っていた。一方で、HA とともにウイルス粒子上に存在する NA には、複数の変異が入っていることが明らかになった。このウイルスのフェレット感染血清を作製し、流行株との反応性を調べたところ、鶏卵分離埼玉株は、流行株と類似の抗原性を保持していることが明らかになった。これは、HA の抗原部位に変異が入っていなかったためであると推測された。また、NA には多数の変異が入っていたことから、埼玉株の鶏卵における増殖には、NA が重要な役割を果たすのではないかと考えた。

そこで、本研究では、鶏卵分離埼玉株の NA に着目し、その性状を明らかにすることにより、鶏卵で継代しても HA の抗原部位に変異が入りづらいワクチン株の開発につながるのではない

かと考え、鶏卵分離埼玉株 NA の性状解析を行った。

B. 研究方法

1) 赤血球吸着試験

Cos-7 細胞に埼玉株の臨床検体 NA、細胞分離 NA、または鶏卵分離 NA をそれぞれ発現させ、0.5%ニワトリ血球を加え、4°Cで 1 時間吸着させた。1 時間後、PBS で細胞を洗い、吸着しなかった赤血球を取り除いた。続いて、顕微鏡下で赤血球の吸着を観察し、さらに蒸留水を添加して赤血球を破壊し、吸着していた赤血球のヘモグロビン濃度を測定した。

2) ウイルス力価測定

MDCK 細胞を 96well プレートに単層培養し、10 倍階段希釈したウイルスを 100 μ l ずつ接種した。34°Cで 1 時間培養後、2 \times MEM と 3.2% Avicel RC/CL 溶液の混合液を 100 μ l ずつ重層した。34°Cでさらに 20 時間培養した後、細胞を PBS で洗浄し、10%ホルマリン溶液で固定した。細胞固定後、0.5% Triton-X-100 in 20mM Glycine PBS 溶液で細胞核を透過し、1 次抗体と 2 次抗体で染色し、True Blue™ (KPL) 溶液で plaque を可視化した。抗体には抗 A 型インフルエンザウイルス NP マウスモノクローナル抗体と抗マウス IgG HRP 抗体を用いた。

(倫理面への配慮)

- 該当なし

C. 研究結果

通常、インフルエンザウイルスは、HA が細胞表面のシアル酸レセプターと結合することにより、感染を成立させる。また、感染する宿主が変わると、その宿主のレセプターと結合できるように主に HA に変異が入る。しかしながら、埼玉株においては、鶏卵に馴化する際に HA ではなく、NA に複数の変異を獲得していた。このことから、我々は埼玉株の鶏卵での増殖には NA が重要な役割を果たしており、その役割とは、レセプター結合なのではないかと考えた。

そこで、まず埼玉株 NA がシアル酸と結合するかどうかを明らかにするため、埼玉株の臨床検体 NA (変異なし)、細胞分離 NA (T148I 変異)、鶏卵分離 NA (T148I, T153N, N329T, T369K 変異) をそれぞれ細胞に単独で発現させ、赤血球表面のシアル酸と結合するかどうかを赤血球吸着試

験により調べた。T148I 変異は、A(H3N2)ウイルスを MDCK 細胞で継代した際に入る変異であり、NA に赤血球凝集能を付与することがこれまでに報告されている。赤血球吸着試験の結果、細胞分離 NA と鶏卵分離 NA が赤血球吸着能を持つことが明らかになった。さらに、細胞分離 NA と鶏卵分離 NA では、鶏卵分離 NA のほうが、より高い赤血球吸着能を示した。また、鶏卵分離埼玉株 NA で認められた 4 箇所の変異を 1 つずつ戻し、赤血球吸着試験を行ったところ、T148I 変異を T に戻すと NA の赤血球吸着能が著しく低下した。この結果から、埼玉株 NA のシアル酸結合能の獲得には、T148I 変異が不可欠であることがわかった。

続いて、埼玉株が NA によるシアル酸レセプター結合のみで感染を成立させられるかどうかを、埼玉株 HA のシアル酸結合能において重要な部分に変異を挿入し、シアル酸結合能を弱めた HA(HAmut)を作製し、HAmut と埼玉株の細胞分離 NA、または鶏卵分離 NA を持つウイルスを作製した。そして、これらのウイルスの MDCK 細胞と鶏卵における増殖を調べた。その結果、細胞分離 NA を持つウイルスは、MDCK 細胞では増殖したが、鶏卵では増殖しなかった。一方で、鶏卵分離 NA を持つウイルスは、MDCK 細胞と鶏卵の両方で増殖した。この結果から、埼玉株は NA を介して MDCK 細胞と鶏卵で増殖することが可能であるが、鶏卵で増殖するには、T148I 変異に加え、鶏卵分離 NA で認められた他の変異も必要であることが明らかになった。

また、埼玉株以外の HA でも、同様の現象が見られるかどうかを明らかにするため、埼玉株以外の A(H3N2)ウイルスの HA と鶏卵分離埼玉株 NA を持つウイルスを作製し、鶏卵で継代して HA に変異が入るかどうかを検証した。その結果、鶏卵で 5 代継代後も HA に変異は入っていなかった。したがって、埼玉株 NA を持っている、埼玉株以外の HA でも、鶏卵馴化による抗原変異が起こりづらいことが示唆された。

D. 考察

本研究では、赤血球吸着試験により、埼玉株の細胞分離と鶏卵分離の NA はシアル酸レセプター結合能を持つことを明らかにし、この結合能の獲得には T148I 変異が不可欠であることを同定した。また、埼玉株は NA を介したレセプター結合により MDCK 細胞と鶏卵で増殖することができるが、鶏卵での増殖には T148I 変異に加え、鶏卵分離 NA で認められた他の変異も必要であることを明らかにした。さらに、埼玉株以外の HA においても、鶏卵分離埼玉株 NA を持っていれば、鶏卵で継代後も HA に変異が入りづらいことが示唆された。

以上の結果から、埼玉株は、NA がレセプター結合能を獲得することにより、HA ではなく NA に選択圧がかかり、その結果、鶏卵で継代しても HA に変異が入りづらくなったのではないかと考えられた。また、埼玉株以外の HA においても同様の現象が見られたことから、今後鶏卵馴化による影響を受けづらいワクチン株の開発への貢献も期待される。

E. 結論

現行の季節性インフルエンザワクチンには、リバースジェネティクス法で作製されたウイルスはワクチン株として用いられていないが、将来的に、この方法を用いて流行株の HA と埼玉株 NA を持つワクチン株を作製し、鶏卵で継代しても抗原変異を起こしづらいワクチン株として使用されることが期待される。また、さらに埼玉株の鶏卵分離 NA の性状を明らかにすることにより、HA の抗原部位に変異を獲得しにくいワクチン株の分離法の確立にもつながることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Kuwahara T, Yamayoshi S, Noda T, Kawaoka Y. G Protein Pathway Suppressor 1 Promotes Influenza Virus Polymerase Activity by Activating the NF- κ B Signaling Pathway. *mBio*. 2019 Dec 17;10(6).
- Takashita E, Ichikawa M, Morita H, Ogawa R, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Sugawara H, Sato A, Akimoto M, Mitamura K, Abe T, Yamazaki M, Watanabe S, Hasegawa H, Odagiri T. Human-to-Human Transmission of Influenza A(H3N2) Virus with Reduced Susceptibility to Baloxavir, Japan, February 2019. *Emerg Infect Dis*. 2019, 11, 25(11), 2108-2111

2. 学会発表

- Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Takahashi H, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Kawaoka Y, Watanabe S, Odagiri T. Biological significance of neuraminidase of egg-adapted influenza A(H3N2) virus without amino acid substitutions in the antigenic sites of its hemagglutinin. Options X、シンガポール、2019
- Watanabe S, Nakamura K, Fujisaki S, Shirakura M, Takashita M, Kishida N, Kuwahara T, Sato A, Ogawa R, Sugawara H, Akimoto M, Miura H, Odagiri T, The Influenza Surveillance Group of Japan Characterizations of circulating influenza viruses in the 2018/2019 season and vaccine viruses selected for the 2019/20 season. 第 67 回日本ウイルス学会学術集会、東京都、2019