

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・招聘型主任研究官

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。これまでに我々は、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、埼玉株 NA にシアル酸レセプター結合能があり、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を明らかにした。さらに、最新の研究活動において、HA を埼玉株以外の HA に置き換えた際にも埼玉株 NA があれば、HA への鶏卵馴化による変異を回避できるかどうかを検証したところ、5 代継代後も HA に変異は認められなかった。以上の結果から、埼玉株 NA のワクチン開発において汎用性が高いことが示唆された。

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。

これまでに、本研究において、埼玉株 NA はシアル酸結合能を有し、鶏卵において NA を介して増殖できることが明らかになった。さらに、

この NA のシアル酸結合の獲得には、NA の T148I 変異が必須であることも明らかにした。そこで、今回、埼玉株 NA を持っていれば、これまでに鶏卵で継代すると HA に鶏卵馴化の変異を獲得することが知られている他の A(H3N2)ウイルスの HA に置き換えた際にも、HA への変異を回避することができるのかをリバーズジェネティクス法を用いて検証した。

B. 研究方法

1) ウイルスの作製

これまでに HA に鶏卵馴化の変異を獲得することが知られている A(H3N2)株、A/香港/4801/2014 (香港株) と A/Victoria/361/2011 (ビクトリア株) の HA を発現するプラスミドを作製し、リバーズジェネティクス法(Neumann et.al. , PNAS, 1999)を用いてウイルスを作製した。

2) 鶏卵におけるウイルスの継代

鶏卵の 10 日卵に 100FFU でウイルスを接種し、35°C で 72 時間培養した。一連の作業を 5 回繰り返し、鶏卵で 5 代継代した。ウイルス力価は以下の方法で測定した。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 BlueTM (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

リバーズジェネティクス法により、香港株 HA と埼玉株 NA、ビクトリア株 HA と埼玉株 NA を持つウイルスをそれぞれ作製した。これらのウ

イルスを鶏卵にそれぞれ 100FFU 接種し、5 代継代し、回収したウイルスの HA と NA の塩基配列を調べたところ、どちらのウイルスにおいても、鶏卵で 5 代継代後 HA に鶏卵馴化による変異は認められなかった。また、それぞれの HA において、これまでに報告されていた鶏卵馴化の変異も認められなかった。しかしながら、香港株の HA と埼玉株 NA を持つウイルスにおいては、NA の 1 箇所に G401S 変異が認められた。

D. 考察

今回の結果から、埼玉株 NA を持つウイルスでは、埼玉株以外のウイルスの HA においても鶏卵馴化の変異を回避することが示唆された。さらに、香港株 HA を持つウイルスにおいては、HA ではなく NA の 1 箇所に変異が認められた。このことから、鶏卵馴化による変異の圧は NA に働いていることも示唆された。

E. 結論

埼玉株 NA を持つウイルスでは、HA に鶏卵馴化の変異を獲得しなかったことから、埼玉株 NA の鶏卵馴化による影響を受けにくいワクチンの開発への汎用性が高いことが示唆された。現行の季節性インフルエンザワクチンには、リバーズ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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ・ Takashita E, Yasui Y, Nagata S, Morita H, Fujisaki S, Miura H, Shirakura M, Kishida N, Nakamura K, Kuwahara T, Sugawara H, Sato A, Akimoto M, Kaido T, Watanabe S, Hasegawa H; Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Detection of a Peramivir-Resistant Influenza B/Yamagata-Lineage Virus Imported from Indonesia in Aichi, Japan, March 2019. Jpn J Infect Dis. 2020 9, 73(5), 386-390
- ・ Takashita E, Fujisaki S, Yokoyama M, Shirakura M,

Morita H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Sato H, Doi I, Sato Y, Takao S, Shimazu Y, Shimomura T, Ito T, Watanabe S, Odagiri T, The Influenza Virus Surveillance Group Of Japan. In Vitro Characterization of Multidrug-Resistant Influenza A(H1N1)pdm09 Viruses Carrying a Dual Neuraminidase Mutation Isolated from Immunocompromised Patients. Pathogens. 2020 9, 9(9), 725

- Takashita E, Abe T, Morita H, Nagata S, Fujisaki S, Miura H, Shirakura M, Kishida N, Nakamura K, Kuwahara T, Mitamura K, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Hasegawa H, Influenza Virus Surveillance Group of Japan, Influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting reduced susceptibility to baloxavir due to a PA E23K substitution detected from a child without baloxavir treatment. Antiviral Res. 2020 8, 180, 104828

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

- なし