

## 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

国立感染症研究所ウイルス第三部・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。そこで、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、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、埼玉株 NA を持つウイルスでは、HA に変異が入りづらいことが示唆された。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 の性状解析を試みた。

## 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℃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 $\mu$ l ずつ接種した。34℃で 1 時間培養後、2 $\times$ MEM と 3.2% Avicel RC/CL 溶液の混合液を 100 $\mu$ l ずつ重層した。34℃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。

我々は、これまでに赤血球吸着試験により、細胞分離 NA と鶏卵分離 NA が赤血球吸着能、すなわちシアル酸結合能を持つことを明らかにし、さらに埼玉株 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も明らかにした。また、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 (A/Victoria/361/2011 (Victoria株) と A/Hong Kong/4801/2014 (香港株)) 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。しかしながら、これらのウイルスを 10 代まで継代したところ、香港株 HA ではアミノ酸置換を伴う変異は認められなかったが、Victoria株においては 6 代継代後から HA の 192 番目の

アミノ酸に変異が入り、9代目でNAの102番目のアミノ酸に変異が入った。ヴィクトリア株では、鶏卵で継代すると6代でHAの4ヶ所に変異が入ることが報告されており、この結果と比較すると、埼玉株NAを持っていると、HAに変異が入りづらいことが示唆された。

さらに、鶏卵分埼玉株NAにこれらの変異が入ることによる構造上の影響を分子動力学シミュレーションにより調べたところ、酵素活性部位周辺と240 loop周辺に構造上の揺らぎが生じることが明らかになった。また、3Dモデルを構築し、 $\alpha 2,3$ 結合のシアル酸（ヒト型）と $\alpha 2,6$ 結合のシアル酸（トリ型）のどちらに親和性を示すかどうかを調べたところ、鶏卵分離埼玉株NAではトリ型のシアル酸への親和性が増している事が明らかになった。

以上の事柄を論文にまとめ、投稿準備中である。

#### **D. 研究発表**

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### **E. 知的財産権の出願・登録状況**

該当なし