

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名：インフルエンザワクチン(H5N1 株)の有効性、安全性及び異種株に対する交差免疫性の検討等に関する研究

2. 研究開発代表者：黒澤良和（藤田保健衛生大学）

3. 研究開発の成果：〔計画の概要〕 強病原性 H5N1 型トリインフルエンザウイルスがヒトからヒトへの感染能力を獲得して引き起こす可能性があるパンデミック対策として、わが国は現在四種類（将来的には三種類）のプレパンデミックワクチンをそれぞれ 1000 万人分ずつ備蓄している。本研究はこのワクチンをヒトに接種した場合、どのような性質をした抗体が産生誘導されるかを解析する。インフルエンザウイルスは少しずつ変異し続けているので、それぞれの抗体が示す交差免疫性を解析し、パンデミックを引き起こすウイルスを有効に中和できるかが最大の焦点である。プロジェクトは三段階で進める。第一段階では 20 名のボランティアを対象とし、一週間を挟んで二種類のワクチンを接種—一ヶ月後に 100 ミリリットル採血—抗体ライブラリー作製—ワクチン接種に用いた株の不活化ウイルス粒子を抗原とするスクリーニング—多数の抗ヘマグルチニン(HA)抗体クローン単離—塩基配列決定によるクローンの分類—様々なウイルス株由来の HA との結合性の解析—ウイルス中和活性の解析—各クローンのエピトープ解析と研究を進める。第二段階では 200 名を対象とし、採血量を 10 ミリリットルとして同様の解析をする。単離された様々な交差反応性を示す抗体を検出・定量できる ELISA 法を開発し、ワクチン接種前およびワクチン接種後の抗血清を用いて分泌された抗体を解析し、モノクローン抗体レベルで得た結果と比較する。第三段階では 1000 名を対象とし、ワクチン接種前後での抗血清を用いた ELISA による解析を行い、様々な交差反応性抗体の産生誘導が起こる頻度を解析する。

〔研究進行の現段階〕 研究は次のように進行した。倫理委員会の承認、ボランティアの募集、二度のワクチン接種、一か月後の 100 ミリリットル採血（7 月中頃ここまで終了）、ライブラリー作製条件の検討（8 月）、一組のライブラリー作製（10 の 8 乗の B リンパ球をカバーする 10 の 9 乗のクローン数からなる）に二週間必要で 18 組（二人からは採血せず）のライブラリー作製終了は平成 28 年 1 月末であった。抗体ライブラリーのスクリーニング実施のために平成 27 年度 12 月に二人の研究技術員を雇用した。ワクチン接種は二種類の株を組み合わせて実施しており、その二種類の株の不活化ウイルス粒子を抗原として別々にスクリーニングし、更に各スクリーニングは、ファージ集団の大量増殖、それをパニング法でウイルス粒子に結合させたのち回収、このプロセスを三回繰り返したのち、最終的に菌に感染させてプレートに撒き 200 個ほどのクローンをピックアップする。この中で 30~50%ほどが抗 HA 抗体である。この一連の工程は最低 10 日ほどを要する。二人で実施しているが全てのスクリーニング実施には 200 日必要となり、最速で平成 28 年 8 月末終了と予測している。塩基配列の決定（業者への委託）による分類（各スクリーニングで数種類以上が検出）、様々な株との交差結合性の解析が進んでいる。

〔現時点で結論可能なこと〕 塩基配列を germline 遺伝子の配列と比較し突然変異導入の頻度を調べると、各クローンがワクチン接種により新しく産生誘導された抗体（数パーセント）か、H5 型分子と交差反応性を示す抗体を産生する記憶細胞由来か（10 パーセント以上）を明確に区別可能である。前者にはワクチン接種に用いた型特異的抗体及び H5 型ウイルスに広く結合できる抗体が含まれる。後者には、H1 及び H2 を含む A 型グループ 1 に分類される HA に広く結合する抗体、更により広く結合する抗体も存在する。