

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業  
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases

研究開発課題名：(日本語) 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  
(英語) Research for effectiveness, safety and cross-immunity against H5N1 influenza viruses

研究開発担当者 (日本語) 藤田保健衛生大学研究支援推進センター最先端医療イノベーション部門  
教授 黒澤 良和

所属 役職 氏名：(英語) Department of Innovation Center for Advanced Medicine, Center for Research  
Promotion and Support, Fujita Health University, Professor, Yoshikazu Kurosawa

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 7 月 31 日

分担研究 (日本語) 開発課題名：単離抗体の各種ウイルス中和活性測定  
(英語) Analysis of neutralizing activity of isolated antibodies against  
influenza H5N1 viruses

研究開発分担者 (日本語) 阪大微生物病研究会観音寺研究所 所長 奥野 良信

所属 役職 氏名：(英語) Research and Development Division, The Research Foundation for Microbial  
Diseases of Osaka University, Director, Yoshinobu Okuno

## II. 成果の概要（総括研究報告）

### ・ 研究開発代表者による報告の場合

平成 27 年度に四種類の H5N1 型プレパンデミックワクチンを二種類ずつ組み合わせて 20 名のボランティアに接種し、一か月後、100 ミリリットルずつ採血し、巨大な抗体ライブラリーを作成した。（2 名は健康上の理由で採血せず。）18 名分の抗体ライブラリーから、ワクチン接種に用いたそれぞれ二種類のウイルス粒子を抗原にして、抗ヘマグルチニン（HA）抗体をそれぞれの人から 100 ないし 200 個単離した。単離した各抗体について、塩基配列を決定して分類し、それぞれの異なる抗体について、そのウイルス株特異性を解析した。抗体は H 鎖に関して VH-D-JH, L 鎖に関して VL-JL という二種類の DNA 再編成により活性型遺伝子が作られる。染色体上には VH 遺伝子が 50 個程度存在し、VL 遺伝子に関しても、カッパ鎖とラムダ鎖それぞれ数十個存在している。抗体産生細胞は、抗原に出会ったのち V 領域の中に突然変異が導入されるために、単離した抗体の V 領域配列と、染色体上にもともと存在した germline 型 V 遺伝子のアミノ酸配列を比較することにより、それぞれの抗体がワクチン接種により産生誘導が起こり新しく出現した細胞が産生する抗体か、ヒト体内にワクチン接種前から記憶細胞としてすでに存在しており、ワクチン接種したウイルス粒子と結合できる抗体であるためにその記憶細胞が増殖刺激を受けて単離可能になったのかを変異の導入頻度から識別できる。このことが研究開発代表者らの用いる研究方法の大きな特徴である。本研究テーマの目標である交差反応性を示す抗体に関して、ワクチン接種により大量に出現する抗体が後者（記憶細胞由来）であれば、それは元来 H5 以外の株（H1, H2, H5 等）に対応してできた抗体であるわけで、H5 株に対して広い交差反応性を示すのは当然であり、また人体内に長期間に存在していた点から見ても安全性が高いことも期待できる。一方、前者の抗体は、接種したワクチン株のみに結合する抗体から、より広い交差反応性を示すものまで様々な性質の抗体が含まれるが、ワクチン接種の特徴から、接種した株に強く応答する抗体が大多数を占めることが多い。そこで交差反応性の高い抗体産生を誘導するために異なる二種類の H5 株を組み合わせて接種するとどうなるかがポイントとなる。すでに得られた結果が示すことは、用いたワクチン株の中で、Clade 1 および Clade 2.1 株をワクチンとして接種すると、接種した株のみに結合する抗体より、交差反応性を示す抗体産生が起こりやすく、一方、Clade 2.2 もしくは Clade 2.3 株をワクチンとして接種すると、接種株にのみ結合する抗体産生が起きやすいという特徴が見られた。本プロジェクトの目的が、将来パンデミックが発生した際に、そのパンデミック株を中和できる抗体産生を備蓄したワクチン株を接種することによりいかに効率的に誘導できるかその接種法を見出すという点であることから見れば、一方を Clade 1 もしくは Clade 2.1 として、もう一方を Clade 2.2 もしくは Clade 2.3 として組み合わせて、二種類のワクチン接種を行うことが、最終結論となる可能性がある。現在、平成 29 年 3 月までの時点で、単離した全クローンのほぼ 80% について配列決定の段階まで終了した。配列の異なる抗体については、代表抗体について、分担研究者の方でウイルス中和活性を測定中である。

From 2015 April to 2016 March 20 volunteers were vaccinated with two kinds of H5N1 pre-pandemic vaccines, then 100 ml of blood was collected from them. Using the B cells in the blood, antibody libraries were constructed. From 2016 April to 2017 March respective libraries were screened with two kinds of virus particles that had been used for vaccination as antigens. Large numbers of anti-HA antibodies were isolated from respective libraries. All the clones were classified by sequencing. 100 -200 anti-HA antibodies were isolated. In the case of antibodies, DNA rearrangement such VH-D-JH joinings for H strand as well as VL-JL joinings for L strand were required for formation of active antibody genes. On the germline genome around 50 VH genes are present, and several tens VL,

V lambda V kappa, genes are present. In Ab-producing cells, mutations are introduced into VH and VL genes after they meet antigens. Therefore, we are able to distinguish whether respective antibodies were produced in B cells whose growth was newly induced by vaccination or whether antibodies were produced in memory B cells that had been present before vaccination and whose growth was stimulated by vaccination by comparison of sequences of variable region. In the case of new B cells, mutation frequency is low. On the other hand, in the case of memory cells mutation frequency is high. In the present study, we analyzed the antibodies whose production is induced by vaccination of H5 viruses. Since nobody experienced infection of H5 viruses in Japan. Therefore, all the clones that are produced in memory cells, but that bind to H5 viruses should show a wide cross-reactivity. On the other hand, in the case of Abs produced by new B cells, most of them should show narrow specificity. Because the regions on HA where mutations are easily introduced are highly immunogenic, most of the Abs bind to the regions that are variable. Therefore, in this project we tried to find the best combination of two different strains for efficient production of widely neutralizing Abs. Until the end of March in 2017, more than 80 % of clones had been sequenced. Analysis of heir binding activity to various kinds of influenza viruses and analysis of neutralizing activity of the representative clones are going beyond March of 2017.

#### 成果の外部への発表

- (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）
- (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表、なし
- (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
- (4) 特許出願  
該当事項なし