

平成28年度医療研究開発推進事業費補助金

(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) 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

補助事業課題名：(日本語) 新規インフルエンザワクチンの品質管理試験法の開発及び有効性の検証方法の確立のための研究
(英語) Studies on the development of new quality control tests for influenza vaccines and establishment of measurement of vaccine efficacy

補助事業担当者 (日本語) 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
室長・板村繁之

所属 役職 氏名：(英語) Influenza Virus Research Center, National Institute of Infectious Diseases, Lab Chief, Shigeyuki Itamura

実施期間：平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究課題名：(日本語) 抗体レパトアから見た免疫原性解析法の開発
(英語) Development of immunogenicity test based on the usage of antibody repertoire

補助事業分担者 (日本語) 国立感染症研究所免疫部・主任研究官・大西和夫

所属 役職 氏名：(英語) Department of Immunology, National Institute of Infectious Diseases, Senior Scientist, Kazuo Ohnishi

分担研究課題名：(日本語) 生ワクチンの力価評価法及び新規弱毒性試験法の開発
(英語) Development of potency and virus attenuation assays for live influenza vaccines

補助事業分担者 (日本語) 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・原田勇一

所属 役職 氏名：(英語) Influenza Virus Research Center, National Institute of Infectious Diseases, Senior Scientist, Yuichi Harada

分担研究課題名： (日本語) ワクチンの免疫原性に関与する免疫応答解析法の開発
(英語) Development of assay for immune responses involving immunogenicity of vaccines

補助事業分担者 (日本語) 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
研究員・佐藤佳代子

所属 役職 氏名： (英語) Influenza Virus Research Center, National Institute of Infectious Diseases, Research Associate, Kayoko Sato

分担研究課題名： (日本語) ワクチン力価新規試験法の開発
(英語) Development of new potency assay for vaccines

補助事業分担者 (日本語) 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
研究員・嶋崎典子

所属 役職 氏名： (英語) Influenza Virus Research Center, National Institute of Infectious Diseases, Research Associate, Noriko Shimasaki

II. 成果の概要

これまで、抗体応答を抗体遺伝子レパトアの発現パターンとして検出するために次世代遺伝子シーケンサーを用いて網羅的解析手法の開発を行ってきた。鶏卵馴化によって変異したワクチン株で製造されたワクチンは、ワクチン株には高い抗体応答を誘導するが、流行株には低い抗体応答しか誘導できないことが知られており、この現象を抗体レパトアの発現パターンの観点から開発してきた手法を用いて解析を行った。その結果、鶏卵馴化したウイルス株と馴化していないウイルス株で、それぞれ製造されたワクチンに対するマウスでの抗体応答の違いを抗体レパトアの使用パターンの違いとして見出すことができた。この技術を用いて全粒子ワクチンとスプリットワクチンの剤型の違いによる抗体応答について、抗体遺伝子のレパトアの使用パターンを調べている。このようなアプローチによって、ワクチンの有効性に関連する抗体レパトアの発現様式を同定し、これまでに無い考え方に基づくワクチンの品質管理試験の開発を目指している。

これまでに鶏卵ワクチンの剤型の異なる全粒子とスプリットワクチンの抗体応答とマウスでの致死感染からの防御能との関係について解析したところ、従来抗体価測定として用いられていた HI、中和、ELISA 抗体価とは関連が認められず、ウイルスに結合する抗体の Avidity が防御能により重要であることを見出した。マクロファージ様細胞を指標細胞としたときに、この剤型の違いにより NF- κ B 活性化の違いが認められた。全粒子ワクチンでは高い活性化が認められたが、スプリットワクチンでは活性化がほとんど検出できなかった。そこで、ワクチンの有効成分であるヘマグルチニン (HA) を組換え DNA 技術で製造された組換えワクチンについて NF- κ B の活性化について調べたところ、スプリットワクチンと同様にほとんど活性化が検出できなかった。そのため、全粒子ワクチンのウイルス粒子構造に関連した防御能を測定する *in vitro* の試験法として、ワクチン効果に関連する免疫応答解析法のひとつになる可能性が示唆された。一方、スプリットワクチンや組換えワクチンによるワクチン効果については、本試験法では検出できないことから、異なる経路の免疫応答を測定する試験法を開発する必要性があることが判った。

平成 27 年度より導入された 4 価ワクチンでは B 型ウイルス 2 株の間で従来用いてこられた一元放射免疫拡散試験法による力価試験では交差反応が起こるために正確な力価測定が難しくなっている。交差反応がないモノクローナル抗体を使用した新規な力価試験法を開発を進めている。これまでに交差反応のないモノクローナル抗体を使用して ELISA 法による力価測定法を開発を行った。その結果、B 型ウイルス 2 株が混合されたワクチンにおいて、それぞれの系統のウイルス株によるワクチン成分を区別して測定できることを明らかにした。また、これらのモノクローナル抗体を従来法である一元放射免疫拡散試験法へ応用したところ、一部のモノクローナル抗体が利用できることが判り、短期間での実用化が期待できる。

従来の不活化ワクチンでは効果的に得られないウイルスに対する感染防御に重要な呼吸器粘膜における粘膜免疫を獲得する目的で弱毒生ワクチンが開発されて、本邦においても製造販売承認を目指して開発が進められている。弱毒生ワクチンの力価については通常、感染価を測定することになるが、ウイルスの感染価は使用する細胞によって大きく変動することが知られている。これまでに培養細胞を用いて力価測定の変動範囲や変動要因について検討した。その結果、使用する細胞に依っては、ウイルスの増殖がトリプシン非添加にもかかわらず多段階増殖して、力価測定に影響が大きいことを見出した。力価測定に使用する細胞が、極めて重要な変動因であることを明らかにした。

We have been developing systematic analysis protocol of antibody repertoire elicited by influenza vaccine using next generation sequencer (NGS) in order to describe the antibody responses as expression patterns of antibody repertoire. Vaccines derived from chicken egg-adapted viruses elicit high antibody response to the vaccine viruses, but not to the circulating viruses. This observation was analyzed through the newly developed approach. Unique usage patterns of antibody repertoires were found between mice immunized with either egg-derived or cell-derived vaccine. Antibody responses induced by whole and split virus vaccines were also investigated. We are seeking the establishment of new quality control tests based on this unique approach.

Investigation on the different protective ability between whole and split virus vaccines in mice revealed that this difference was caused by antibody binding avidity to the virus rather than the hemagglutination inhibition (HI), virus neutralizing and ELISA antibody titers, which have been used for measurement of antibody titer as protective surrogate indicators. Different formulation of the vaccines induced different activation of NF- κ B pathway in human macrophage-like cells. Whole virus vaccine highly activated NF- κ B pathway, but not split virus vaccine. Recombinant hemagglutinin vaccine produced by using recombinant DNA technology could not activate NF- κ B pathway like as split virus vaccine. This *in vitro* assay can be used for measurement of protective potency of whole virus vaccine. On the contrary, other assays based on the different pathway are required to measure protective potency of split and recombinant vaccines because both vaccines do not show any activation in this assay.

Single radial immuno-diffusion (SRID) assay is currently used to measure the HA content of each influenza vaccine component. However, cross-reactivity of antisera against two lineages of influenza B virus frequently hampers accurate quantification of HA content in quadrivalent influenza vaccine (QIV) introduced since 2016 season by SRID assay. We produced new monoclonal antibodies (mAbs) specific for B/Yamagata-lineage (BYam) and B/Victoria-lineage (BVic) viruses to quantitate the HA content of each IFVB components in QIV. It was found that these mAbs can be used for a novel alternative potency assay such as antigen-capture ELISA, and applicable for SRID assay, suggesting potential usage of the mAbs within the short time of period.

Live attenuated influenza vaccine has been developed to gain the better protection from the infection at the respiratory epithelial cells, and are currently seeking for marketing licensures in Japan. Potency of live vaccine is usually measured for its infectivity on the susceptible cells. However, it is well recognized that potency will be fluctuated depending on the cells used for the assay. We measured potencies of the several viruses using different origin of the susceptible cells, and found that cells are the key factor of the accuracy of the measurement.

III. 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 1 件）

1. Naoko Kono, Lin Sun, Hiroyuki Toh, Takeyuki Shimizu, Hanbing Xue, Osamu Numata, Manabu Ato, Kazuo Ohnishi, Shigeyuki Itamura. Deciphering antigen-responding antibody repertoires by using next-generation sequencing and confirming them through antibody-gene synthesis. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2017, 487, 300-306.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. An evaluation of single radial immuno-diffusion assay to determine the HA content of two influenza B virus components in quadrivalent influenza vaccine, ポスター発表, Yuichi Harada, Noriko Shimasaki, Masaki Ochiai, Takato Odagiri and Shigeyuki Itamura, Options for the Control of Influenza IX, 2016/8/26, 国外.
2. Comprehensive analysis of the antibody repertoire in response to egg-derived and cell-derived influenza vaccine using next generation sequencer, ポスター発表, Naoko Kono, Kazuo Ohnishi, Lin Sun, Hiroyuki Toh and Shigeyuki Itamura, Options for the Control of Influenza IX, 2016/8/27, 国外.
3. ヒト由来マクロファージ様細胞の活性化能に基づくインフルエンザワクチンの免疫原性定量法の構築, 口頭, 佐藤佳代子, 浅沼秀樹, 小田切孝人, 田代真人, 板村繁之, 第20回日本ワクチン学会学術集会, 2016/10/23, 国内.
4. Newly established lineage-specific monoclonal antibodies against influenza B viruses to measure the HA content of two influenza B virus components in quadrivalent influenza vaccine, ポスター発表, Noriko Shimasaki, Takato Odagiri, Shigeyuki Itamura, 第64回日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/23, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. インフルエンザワクチン, 板村繁之, 知の市場・連携市民セミナー, 2016/10/11, 国内.

(4) 特許出願

なし