

# 研究成果報告書

事業名（補助金名）	基盤的研究開発育成事業（若手研究補助金）
研究開発テーマ名	高病原性鳥インフルエンザに対する CTL 誘導ワクチンの開発
研究代表者名	尾崎 弘一【北海道大学創成科学共同研究機構／特任助教授】
外部協力者名	伊藤 靖 【滋賀医科大学病理第二講座／助教授】

## 背景・目的

ウイルス感染に対する生体防御には自然免疫と獲得免疫がある。とりわけワクチン接種による獲得免疫の中には細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) による感染細胞排除と誘導された特異抗体による中和反応が防御反応の大きな役割を担う。しかしながら、インフルエンザウイルス感染においては CTL の反応と抗体による中和反応のどちらがより重要な効果を示すかは明らかとはなっていない。不活化ワクチンを接種したマウスにはウイルス特異的な抗体が産生される。このマウスに感染性ウイルスを攻撃するとウイルス増殖を抑制し、発症を防御する。一方、抗 CD8 抗体投与や主要組織適合複合体 (MHC) クラス I の発現抑制により CTL の働きを失わせたマウスに感染性ウイルスを攻撃するとウイルス排泄が長引き、致死率が上昇することが知られている。このように CTL の応答はマウスのインフルエンザウイルス感染において発症防御に大きな働きをしていると考えられる。したがって、特異抗体と CTL 反応の双方を誘導することができるワクチンならばより効果的な防御効果が得られるはずである。

ワクチンには弱毒生ワクチンと不活化ワクチンが考えられる。弱毒化生ワクチンはヒトに接種された後体内で増殖するため、病原性の復帰が危惧される。そのため一般に免疫不全の患者等には接種できない。一方、不活化インフルエンザワクチンは現在でも広く使われており、病原性復帰等の危険性はない。現在の不活化ワクチンはエーテルスプリットワクチンで、不活化した精製ウイルスからウイルスの表面抗原を取り出しているものである。これまでの成績ではスプリットワクチンより全粒子を用いたワクチンの方が免疫応答の誘導と発症防御効果がよいという成績が得られている。CTL 反応は実際のウイルス感染または弱毒生ワクチンを接種したときにのみ見られる現象とされていた。生体内からウイルスを排除する際に CTL 反応はどの程度の貢献をするかは調べられていない。また、不活化全粒子ワクチンでは CTL が誘導されるのか否かも不明である。

従来、インフルエンザウイルス感染に対する CTL 反応の評価はクロムリリースアッセイ、MHC クラス I—ペプチドテトラマー染色または細胞内サイトカイン染色によって行われていた。これらの方法は T 細胞の *in vitro* での培養技術や T 細胞レセプターの発現頻度のばらつき等の要素が関与し、安定した成績を得るにはかなりの熟練を要する。そこで本研究では CTL を誘導するインフルエンザウイルス特異的なエピトープ抗原で標識した T 細胞をあらかじめワクチン接種しておいたマウスに投与し、T 細胞の細胞傷害活性を測定する *in vivo* CTL アッセイを用いて H3N2 および H5N1 ウィルスに対する CTL 誘導を評価した。また、エーテルスプリットワクチン接種マウスと全粒子ワクチン接種マウスにおいて抗体誘導と CTL 誘導の差が存在するか否かを評価した。

## 内容・方法

### 1. インフルエンザ A ウィルス・ワクチン

インフルエンザ A ウィルス A/Aichi/2/68 (H3N2) (Aichi (H3N2)) は Mardin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞で、高病原性鳥インフルエンザウイルス A/Vietnam/1194/04 (H5N1)(VN1194(H5N1)) は 10 日齢の発育鶏卵で増殖させ、シードウイルスとした。インフルエンザ A ウィルス A/R(duck/Mongolia/54/01-duck/Mongolia/47/01) (H5N1) (R(Mong-Mong)

(H5N1))は実験室内で作出された遺伝子再集合体で、北海道大学大学院獣医学研究科微生物学教室において A/duck/Mongolia/54/01 (H5N2) 株と A/duck/Mongolia/47/01 (H7N1) 株を 10 日齢の発育鶏卵に混合接種して得られたものである。不活化全粒子ワクチンは上記の H3N2 ウイルスと H5N1 ウィルスをそれぞれ 10 日齢の発育鶏卵で培養し、回収した漿尿液をホルマリンで不活化・精製することで得られた。エーテルスプリットワクチンは回収した漿尿液から精製したウイルスに等量のエーテルを加えて攪拌して破碎したものにホルマリンを加えて得られた。

## 2. 組換え NP タンパク

R(Mong-Mong) (H5N1)からゲノム RNA を抽出し、RT-PCR 法により全長の核タンパク (NP) 遺伝子を増幅した。得られた NP フラグメントは制限酵素 *SacI* で処理して pET30-a ベクターに組み込んだ。組換え NP タンパクは大腸菌で発現させ、イオンアフィニティカラムで精製した。

## 3. 動物実験

6–10 週齢の C57BL/6 (B6) マウスは上記の不活化インフルエンザワクチン、組換え NP タンパクまたは生ワクチン ( $10^4$  pfu/0.1 ml の感染性 Aichi (H3N2)) で皮下接種により免疫された。一部の実験ではアジュバントとして CpG5002 (5'-tccatgacgttctgatgtt-3')、フロイント完全アジュバント (CFA) またはマウスインターフェロン- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) を免疫時に併用した。感染性ウイルスを用いた攻撃試験では  $10^4$  pfu の Aichi (H3N2) を麻酔下のマウスに経鼻接種した。感染後 5 日目の肺を摘出し、ウイルスの定量に供した。

## 4. *in vivo* CTL アッセイ

正常マウスの脾臓から摘出された脾細胞に  $0.5 \mu M$  の卵白アルブミンのエピトープとなる OVA263-274 (SIINFEKL) またはインフルエンザウイルスの NP タンパクのエピトープとなる NP366–374 ペプチド (H3N2 : ASNENMDAM または H5N1 : ASNENMETM) を結合させた。洗浄してフリーのペプチドを除いた後、 $2 \times 10^7$  cells/ml に調製されたペプチド感作脾細胞を異なる濃度 ( $0.25 \mu M$  または  $2.5 \mu M$ ) の carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDA-SE/CFSE) で標識した。洗浄してフリーの蛍光色素を除いた後、 $5 \times 10^6$  個の細胞をワクチンで免疫したマウスの静脈内に接種して 14 時間飼育した。このマウスから摘出した脾細胞から死細胞を除いた後、フローサイトメトリーにより各標識細胞を計数した。NP 特異的な細胞傷害活性の評価は %killing で表し、以下の計算式により算出した。

%killing =

$$[(1 - \{(\text{免疫マウス中の NP366-374 標識細胞数} / \text{免疫マウス中の OVA263-274 標識細胞数}) / (\text{正常マウス中の NP366-374 標識細胞数} / \text{正常マウス中の OVA263-274 標識細胞数})\})] \times 100$$

## 5. ウイルス定量・中和試験・抗体価測定

Aichi (H3N2) ウイルスで攻撃した 5 日目のマウスから肺を摘出し、臓器乳剤を作製した。臓器中のウイルス量は MDCK 細胞を用いたブラークアッセイで定量した。免疫マウスから採取した血清が強毒型の VN1194(H5N1) 株の感染性を中和するか否かを MDCK 細胞を用いた中和試験にて評価した。ワクチン接種による抗体産生は Enzyme linked immuno-sorbent assay (ELISA) で、IgG、IgG1、および IgG2a について測定した。

## 結果・成果

### 1. *in vivo* ウイルス感染による NP 特異的な CTL 反応

まず、我々は現在のワクチン (エーテルスプリットワクチン) は特異的な CTL 反応を起こすか否かを *in vivo* CTL アッセイにより確認した。感染性ウイルスを皮下接種した群 (生ワクチンのモデル) をおき、

陽性対照とした。Aichi (H3N2)株で作製したエーテルスプリットワクチンは CFA と混合してマウスに皮下投与された。1 週間後に B6 マウスの CTL エピトープとしてすでに知られている NP366–374 ペプチドと蛍光色素で標識された脾細胞を各免疫マウスの静脈内に接種した。14 時間後摘出した脾細胞のうち何%の NP366–374 感作細胞が CTL によって傷害を受けたか測定したところ、エーテルスプリットワクチンで免疫したマウスは NP 特異的 CTL 活性を見せなかった（図 1A）。一方、感染性ウイルスを接種した群では明らかな CTL 活性が見られ、80%以上の NP366–374 感作細胞は傷害を受けていた。生ワクチンは強力に CTL 活性を引き出すことが確認され、それは *in vivo* CTL アッセイでも評価できることが明らかとなった。

## 2. 不活性全粒子ワクチンは NP 特異的な CTL 反応を誘導し、ウイルスの増殖を阻止するか？

生ワクチンは強力に CTL 活性を誘導するが、前述の通り危険度が高く安易に使用することは難しい。したがって、抗体も CTL 活性も誘導する、エーテルスプリットワクチン以外の不活性ウイルスを検討することが必要である。そこで我々は不活性全粒子ワクチンを用いて同様の試験を行った。エーテルスプリットワクチン免疫マウスでは前回の実験と同じく、全く NP 特異的な CTL 活性が見られなかった。一方、全粒子ワクチン接種群では生ワクチン投与と同程度の特異的 CTL 活性が見られた（図 3A）。

次に不活性全粒子ワクチンがウイルス攻撃に対して防御するだけの免疫応答を誘導するか否かを攻撃試験により確認した。上記と同様に全粒子ワクチンとスプリットワクチンを皮下接種したマウスに Aichi (H3N2) ウィルスを攻撃し、5 日目の肺のウイルス量を測定した。全粒子ワクチンを接種したマウスの肺からのウイルス回収量は検出限界以下であった（図 2）。スプリットワクチン投与群は CTL 活性は見せなかつたが、陰性対照と比べてウイルス回収量は減少している。これはワクチン接種により誘導された抗体と自然免疫のためと考えられる。少なくとも H3N2 ウィルスに対して、不活性全粒子ワクチンがエーテルスプリットワクチンより効果的なのは CTL 活性の成績からも言えるであろう。

## 3. H5N1 インフルエンザワクチンによる CTL 活性

H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスは現在も世界中で家禽、ヒトに被害を及ぼしている。ヒト–ヒト感染はまだ起こっていないが、ヒトでのパンデミックに備えたワクチンの準備は急務である。しかし、抗原性が同じ強毒株はウイルスが十分増殖する前に発育鶏卵を殺してしまうのでワクチン製造には適さない。また、病原体の扱いには P3 レベルの封じ込め施設化必要である。本研究では野生水禽より分離した非病原性のウイルス株から H5N1 ウィルスを作出し、試製ワクチンとして実験に使用した。H3N2 ワクチンと同様に H5N1 ワクチンを免疫したマウスに NP366–374 ペプチドと蛍光色素で標識された脾細胞を接種して *in vivo* CTL アッセイを行った。全粒子ワクチンを接種した群では明らかな NP 特異的な CTL 活性が見られた。スプリットワクチンを接種した群では僅かな活性が見られたが、全粒子ワクチン接種群のそれとは優位な差を示した。H3N2 ワクチンの実験同様（図 1B）、可溶化したタンパク抗原に比べ粒子状ワクチンの方が CTL 活性の誘導には効果があることが示唆された。

次に、ウイルス粒子中の NP を除く因子の影響を排除して考えるために、組換え NP タンパクを用いて CTL 活性の測定を試みた。接種する組換えタンパク量は全粒子ワクチンの投与量から算出して約 30 μg とした。前述と同様に免疫し、*in vivo* CTL アッセイを実施したところ、CTL 活性は見られなかった。一方、CpG をアジュバントとして組換えタンパクと併用すると、僅かではあるが、特異的な CTL 活性が検出された（図 4）。さらに、免疫するタンパク量 100 μg を CpG とともに免疫した群では CTL 活性の増強が見られた。この成績は可溶化したタンパク抗原を免疫する際に CpG を併用すると接種量依存性に CTL 活性が増強されることを示している。

この実験を踏まえて、スプリットワクチン接種群で見られた僅かな CTL 活性にも接種量依存性があるのではないかと考え、スプリットワクチンを 3 倍量接種した群の CTL 活性を測定した。このワクチンには約 109.5 μg の NP タンパクが含まれていることになる。接種量を増加させると特異的な CTL 活性はやや増強傾向を示したが、組換え NP タンパク接種時のような可能性は見出せなかった（図 3B）。したがって、

エーテルスプリットワクチンに CTL 活性誘導能が無いのは単純に接種量のみによるものではなく、ワクチンそのものの形状も関与していることが示唆された。

#### 4. インターフェロン $\alpha$ とフロイント完全アジュバントは *in vivo* での CTL 活性を増強しない

H5N1 不活化全粒子ワクチンは H3N2 ワクチンと比べて、完全な CTL 活性を誘導しなかった。さらに効果的なワクチンを目指すにはアジュバントを用いた免疫応答の増強が必要となる。

IFN- $\alpha$  は OVA を抗原として使用したときにアジュバントとして機能するとの報告がなされている。そこで IFN- $\alpha$  と CFA を併用して CTL 活性の増強作用を検討した。しかし、IFN- $\alpha$  を用いても CTL 活性の増強は見られず、CFA を用いたときには逆に抑制的に働くことが判った（図 5）。さらに、CpG を併用した試験を実施すると、組換え NP タンパクの免疫時ほどではないが、僅かな CTL 活性の増強が見られた（成績示さず）。

#### 5. ワクチン接種による H5N1 ウイルス特異的な抗体産生

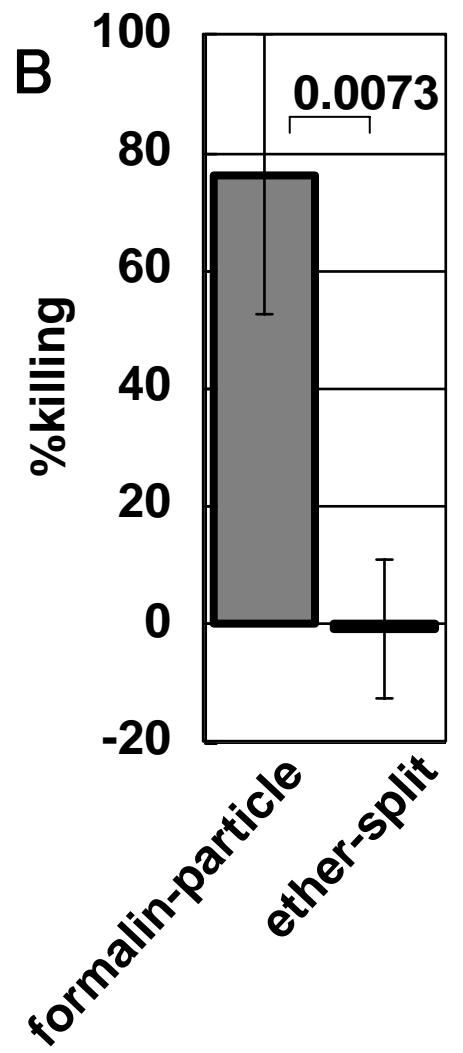
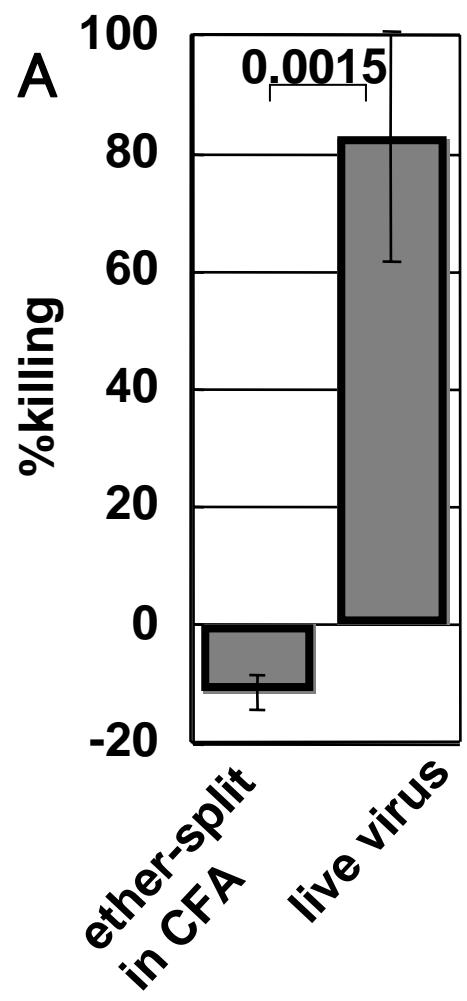
全粒子ワクチンとエーテルスプリットワクチンの抗体産生に違いがあるか否かを調べるために各ワクチン接種群から採取した血清中の IgG 産生を ELISA で比較した。全粒子ワクチン接種群の血清中にウイルス特異的な抗体が検出され、スプリットワクチン接種群のそれよりも優位に高い値であった（図 6A）。特に IgG2a 抗体は全粒子ワクチン接種群の血清から高い値で検出された（図 6C）。一方、スプリットワクチン接種群の血清中には IgG2a 抗体はほとんど検出されなかった。IgG1 抗体は双方とも同レベルの値であった（図 6B）。ワクチン接種時に CpG を併用した群でにおいてスプリットワクチン接種群では CpG による抗体産生増強が見られたが、全粒子ワクチン接種群では IgG 産生量に大きな違いは見られなかった（成績示さず）。

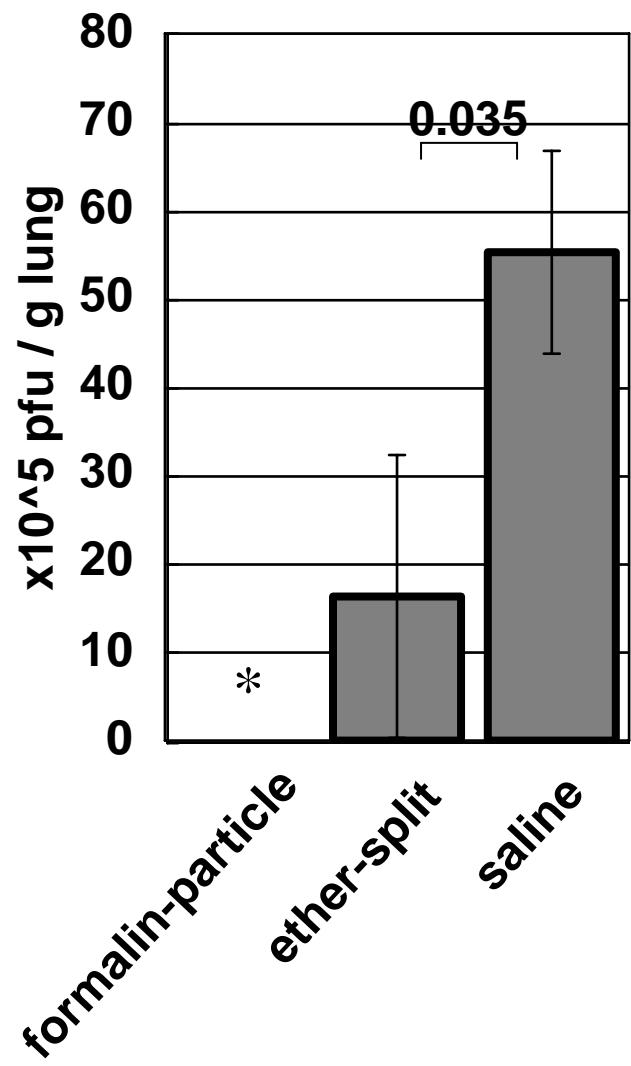
次に、上記と同じ血清サンプルを用いて強毒株である VN1194(H5N1)を用いた中和試験を実施した。50% の細胞を中和する血清の最大希釈で中和抗体価を示すと、全粒子ワクチン接種群において中和活性が見られたが、スプリットワクチン接種群では抗体産生があったにもかかわらず中和活性は見られなかった（表 1）。

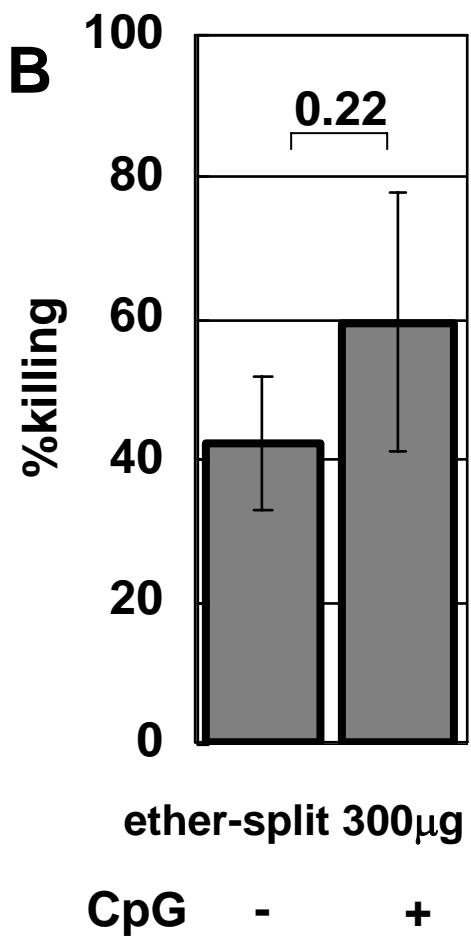
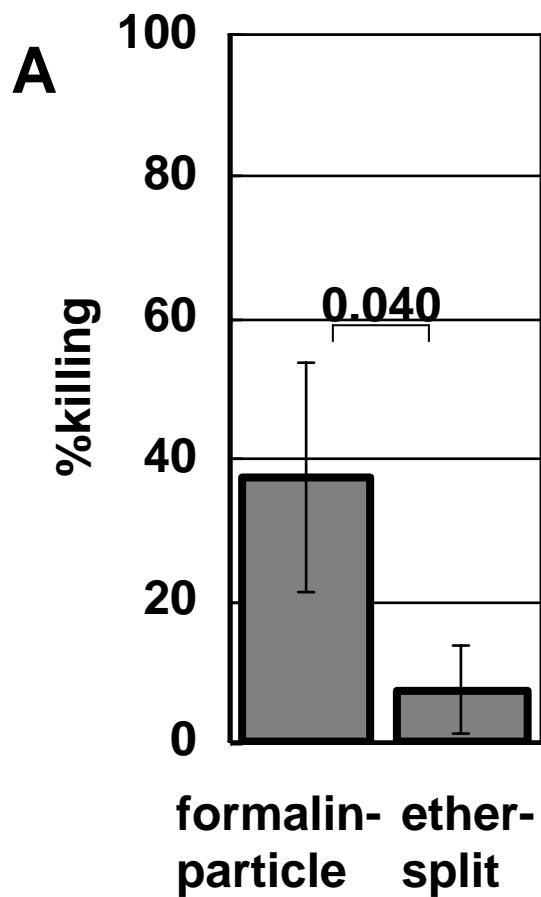
以上の成績をまとめると、不活化全粒子ワクチンは抗体誘導と CTL 活性誘導の両面において効果が期待できることが判明した。

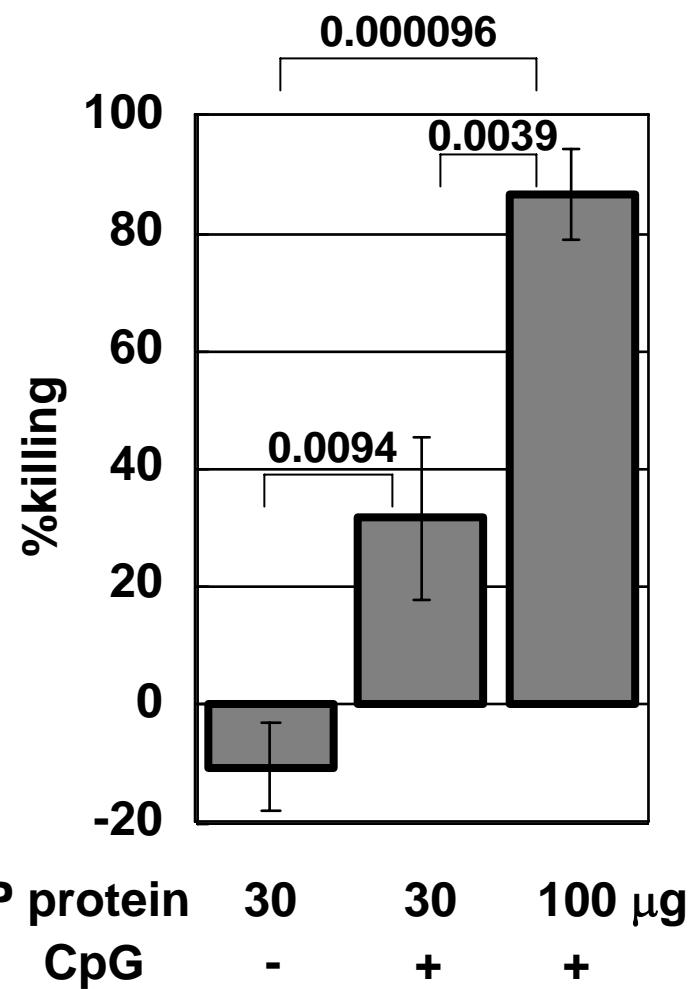
#### 今後の展開

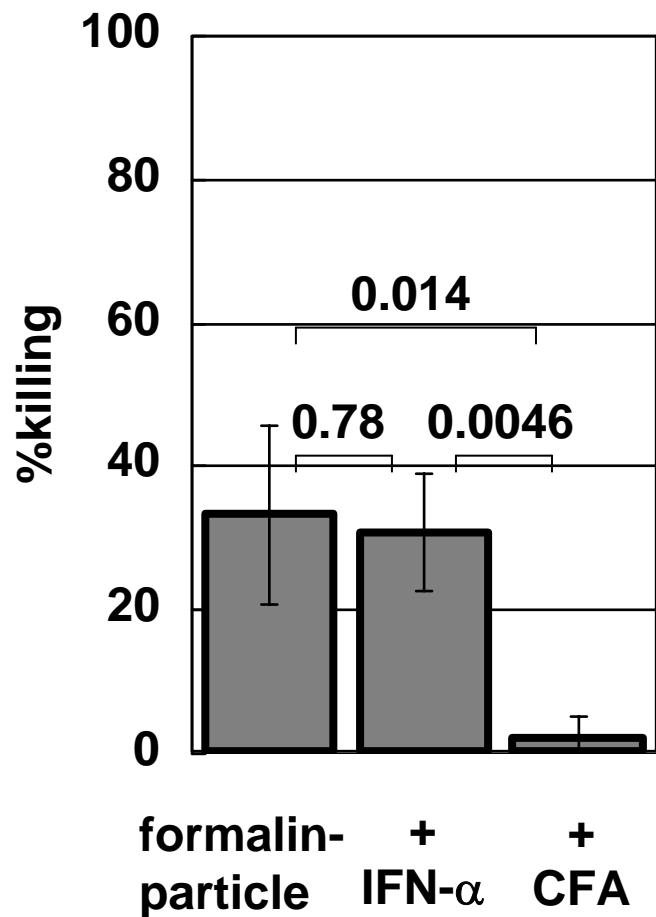
本研究ではインフルエンザワクチンとして不活化全粒子を用いることが抗体産生および CTL 活性の誘導の両面で効果があることが示された。今回は H5N1 強毒株を用いたマウスへの攻撃試験は実施されていないが、今後の攻撃試験で非病原性ウイルスから作出した試製ワクチンが高病原性鳥インフルエンザウイルス感染による発症防御効果を確認する予定である。また、ワクチンの効果を最大限に高める有用なアジュバントの探索も継続し、ワクチン接種と併用することを考えている。現在、本研究で用いられた試製ワクチンをカニクイザルのモデルを利用して評価をしている。

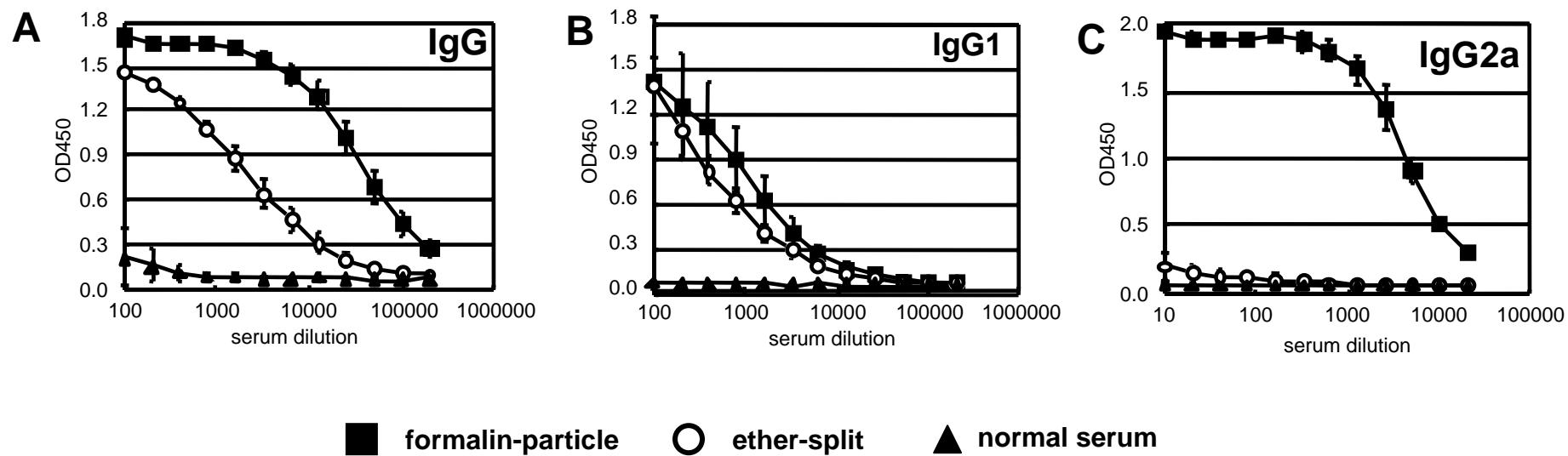












H17-若-138 尾崎 図6

表1 免疫マウス血清中のA/Vietnam/1194/04 (H5N1)株に対する中和抗体価

Vaccine	50% neutralization titer (log2)
Whole particle	0.83
Whole particle + CpG 1 $\mu$ g	1.47
Ether split	<0
Ether split + CpG 1 $\mu$ g	<0
Negative control	<0