

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

尾崎 弘一 [北海道大学 創成科学共同研究機構/特任助教授]

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。しかし現在使用されている不活化インフルエンザワクチンではウイルス特異的なCTL活性を誘導することができない。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。本研究では*in vivo* CTLアッセイを用いてH3N2およびH5N1ウイルス抗原に対するCTL活性を誘導するか否かを評価した。

内容・方法

インフルエンザAウイルスA/Aichi/2/68(H3N2)(Aichi(H3N2))およびA/R(duck/Mongolia/54/01-duck/Mongolia/47/01)(H5N1)(R(Mong-Mong)(H5N1))は10日齢の発育鶏卵で増殖させ、不活化・精製し、不活化全粒子ワクチンとエーテルスプリットワクチンを調製した。6-10週齢のC57BL/6マウスは上記の不活化インフルエンザワクチン、大腸菌で発現させたR(Mong-Mong)(H5N1)の組換えNPタンパクまたは生ワクチン(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')、CFAまたはマウスIFN- α 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。

正常マウスの脾臓から摘出された脾細胞に $0.5\mu\text{M}$ の卵白アルブミン由来のOVA263-274ペプチドまたはインフルエンザウイルスのNPタンパク由来のNP366-374ペプチドを結合させた。CFSEで標識した 5×10^6 個の標識細胞をワクチンで免疫したマウスの静脈内に接種して反応させた後、摘出した脾細胞をフローサイトメトリーにより計数した。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=
$$\left[1 - \left\{ \frac{\text{免疫マウス中のNP366-374標識細胞数}}{\text{免疫マウス中のOVA263-274標識細胞数}} \right\} \right] / \left(\frac{\text{正常マウス中のNP366-374標識細胞数}}{\text{正常マウス中のOVA263-274標識細胞数}} \right) \times 100$$

Aichi(H3N2)ウイルスで攻撃したマウスにおけるウイルス増殖抑制は、MDCK細胞を用いたプラークアッセイで評価した。免疫マウスから採取した血清が強毒株の感染性を中和するか否かを中和試験にて評価した。ワクチン接種による抗体産生はELISAで、IgG、IgG1、およびIgG2aについて測定した。

結果・成果

まず、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。エーテルスプリットワクチンで免疫したマウスはNP特異的なCTL活性を見せなかった。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、生ワクチンは強力にCTL活性を引き出すことが確認された。

生ワクチンは強力にCTL活性を誘導するが、安易に使用することは難しい。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化ウイルスを検討することが必要である。そこで不活化全粒子ワクチンを用いて同様の試験を行ったところ、全粒子ワクチン接種群では生ワクチン接種と同程度の特異的なCTL活性が見られた。一方、エーテルスプリットワクチン免疫マウスでは全くNP特異的なCTL活性が見られなかった。次に、不活化全粒子ワクチンがウイルス攻撃に対して発症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。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)ウイルスを攻撃し、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。スプリットワクチン投与群はCTL活性は見せなかったが、陰性対照と比べてウイルス回収量は減少していた。

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。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ウイルスを作出し、試製ワクチンとしてH3N2ウイルスと同様な実験を実施した。H5N1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。次に、組換えNPタンパクを用いてCTL活性の測定を試みた。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。さらに、免疫するタンパク量を増大させると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。よって、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。

IFN- α 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- α とCFAをワクチンと併用してCTL活性の増強作用を検討した。しかし、IFN- α 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。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。

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。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。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。次に、上記と同じ血清サンプルを用

いて強毒株を用いた中和試験を実施した。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。

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。

今後の展望

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。