

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2021

課題番号：17K10037

研究課題名（和文）血清中におけるインフルエンザウイルス亜型間交叉反応性中和抗体の検出法の確立

研究課題名（英文）Method for detection of cross-reactive neutralizing antibodies between influenza virus subtypes in serum.

研究代表者

大島 信子（Ohshima, Nobuko）

藤田医科大学・国際再生医療センター・講師

研究者番号：60387694

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、インフルエンザウイルスの亜型間で交叉反応性を示す血清中の中和抗体を特異的に検出する方法を検討することを目的としており、その検出系をグループ1の亜型ウイルスを対象としてELISAにて構築した。それにより、血清中の交差反応性抗体の検出が可能となり、インフルエンザワクチン接種による交差反応性抗体が誘導され、少なくとも一か月にわたりそのような抗体が血中で維持されることを明らかにした。また、感染経験のないウイルス株に対する交差反応性抗体の検出も可能であることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インフルエンザウイルスの連続抗原変異株だけでなく、複数の亜型に対応する交叉反応性ヒト中和抗体の存在が近年報告されている。本研究での血清中の抗体測定法でこのような抗体を検出することにより、インフルエンザウイルスに対する長期にわたる感染予防効果の可能性の有無を血清レベルで判断することが可能である。更に本研究でも示した通り、ワクチンによる交差反応性誘導効果も検証することが可能となり、新規発生する可能性のあるウイルス株も含めて今後のインフルエンザウイルス予防対策の一助となると考えている。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to investigate a method for specifically detecting neutralizing antibodies in serum that show cross-reactivity among influenza virus subtypes, and such antibodies were detected by a competitive ELISA for Group 1 subtype viruses. This method allowed detection of cross-reactive antibodies in serum. The results showed that influenza vaccination induced cross-reactive antibodies and that such antibodies were maintained in the serum for at least one month. It was also found possible to detect cross-reactive antibodies to virus strains that have never been infected.

研究分野：分子生物学

キーワード：交差反応性抗体 インフルエンザウイルス

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスに対する中和抗体は、ウイルス感染やワクチン接種によりヒト血中に産生される。ウイルス膜上のヘマグルチニン(HA)がその中和抗体のターゲットである。宿主結合領域への変異導入率は非常に高く、この領域を認識する中和抗体は抗原連続変異によりその活性を消失し、比較的短期間(数年)のウイルス株しか中和できない。

一方、ウイルスはA型ではグループさらに亜型に、B型では2系統に分類されており、近年では、亜型、グループ、系統、型の違いを超えて幅広い交叉反応性を持つヒト抗体が複数報告されている。これら抗体は、亜型、グループ、A-B型間で非常に保存度が高いHAの領域を認識し変異が導入されにくいいため、非常に幅広いウイルス株を中和することができる。

血清中のインフルエンザウイルスに対する抗体価を測定する方法としては、赤血球凝集抑制(HI)試験とウイルス中和試験が最も一般的であり、インフルエンザ発症時における感染の有無またはワクチン接種効果を評価するための重要な指標となるため、これら両検出法は非常に有用である。しかし、両測定法では幅広い交叉反応性を示す中和抗体価を特異的に検出することは困難である。

2. 研究の目的

インフルエンザウイルスの中和抗体は、比較的短期間に発生した抗原連続変異株(ドリフト株)に対してのみ反応すると考えられがちであるが、近年、抗原連続変異に左右されにくく、亜型や系統の異なるウイルス株に対し幅広い交叉反応性を持つ抗体が報告されている。我々のこれまでの研究においても同様の抗体の単離に成功しており、このような抗体は血清中に分泌され、長期にわたりヒト体内で様々な型のインフルエンザウイルスに対する生体防御に機能する可能性が考えられる。本研究では、血清中における幅広い亜型間に交叉反応する中和抗体を特異的に検出する方法を検討し、確立することを目的とする。これにより、インフルエンザウイルスに対する長期にわたる感染予防効果の可能性の有無を血清レベルで評価することが可能となる。

3. 研究の方法

季節性インフルエンザワクチンに含まれる株に対し、幅広い交叉反応性中和抗体の検出系を検討し確立する。H1N1株を含むグループ1のウイルス株を対象とする系を検討し、その結果を踏まえてそれ以外の株に対する検出系を実施する。これまでの研究で単離した抗体クローンから競合用抗体を選択し、対象となるウイルス株のリコンビナントHAまたはウイルスワクチン株に対する結合活性を確認する。血清も同様に結合活性を確認し、ELISA用プレートへの抗原の固相化条件と血清の希釈濃度を検討後、競合用抗体の存在下における血清の結合活性を検出することで、交差反応性抗体の存在を確認する。

4. 研究成果

(1)グループ1に属するウイルス株を幅広く中和する抗体の選択

過去の研究においてファージディスプレイ法を用いたヒト抗体スクリーニングにより、グループ1のH1N1株に対する抗体を複数単離している。その中から、VH1-69をgermlineとする抗体群32種類を選択した。VH1-69由来の抗HA抗体は、グループ1に属する亜型ウイルス間で非常に保存度の高いStemの領域をエピトープとしている可能性が高く、グループ内の亜型ウイルスと交差反応する可能性が高い。この32種類のなかからH1N1株、H5N1株に対する結合、中和活性の比較して3種類の抗体を選択した。さらに、中和活性データの比較により(図1)F081-007抗体を検出系構築用の抗体として選択した。この抗体はグループ1のH1N1、H5N1株だけでなく、H2N2株に対する中和活性も示しており、幅広い交差反応性を中和でも示した。また、HAのStemの保存度の高い領域をエピトープとし、グループ1に属する亜型ウイルス株を幅広く中和するC179モノクローナル抗体とも競合することから、同じような領域をエピトープとしている可能性が高く、本研究の目的に合致する検出用抗体として適切であると判断した。

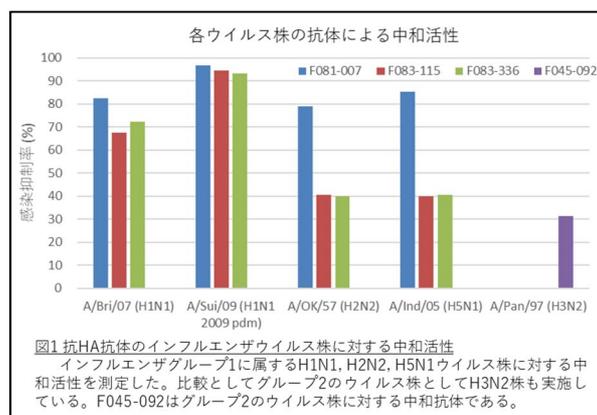


図1 抗HA抗体のインフルエンザウイルス株に対する中和活性
インフルエンザグループ1に属するH1N1、H2N2、H5N1ウイルス株に対する中和活性を測定した。比較としてグループ2のウイルス株としてH3N2株も実施している。F045-092はグループ2のウイルス株に対する中和抗体である。

(2)検出系の構築
本研究の当初の計画では、競合ELISAの系を用いて、スクリーニングにより単離したFab型抗体の共存下における血清のインフルエンザウイルス抗原に対する結合活性を測定し、その活性の減少割合を検証することで検出系を構築する予定であった。しかし、血清中のIgG型抗体に対

し Fab 型抗体を添加する系を検討したものの、活性の減少を検出することが困難であることが判明した。そこで、競合 ELISA の系を用いて、血清共存下における(1)で選択した F081-007 抗体の結合活性の減少割合により評価する方針に変更した。

検出用抗体として用いる F081-007 はヒト IgG 型抗体であることから、検出時に血清中のヒト IgG と区別する必要性が生じた。そのため、抗体をビオチン化し、ビオチン-ストレプトアビジンで検出する系を構築した。抗体へのビオチン化では、抗原への結合活性に影響する可能性が考えられたが、結合性は維持したままビオチン化することに成功した。

抗原は、F081-007 抗体単離時のスクリーニングで使用した H1N1 型の 2009 年パンデミックワクチン(HA スプリットワクチン)を用いて検出系の条件検討を行い、F081-007 IgG 型抗体存在下で効率よく結合抑制する条件を選択した(図 2)。

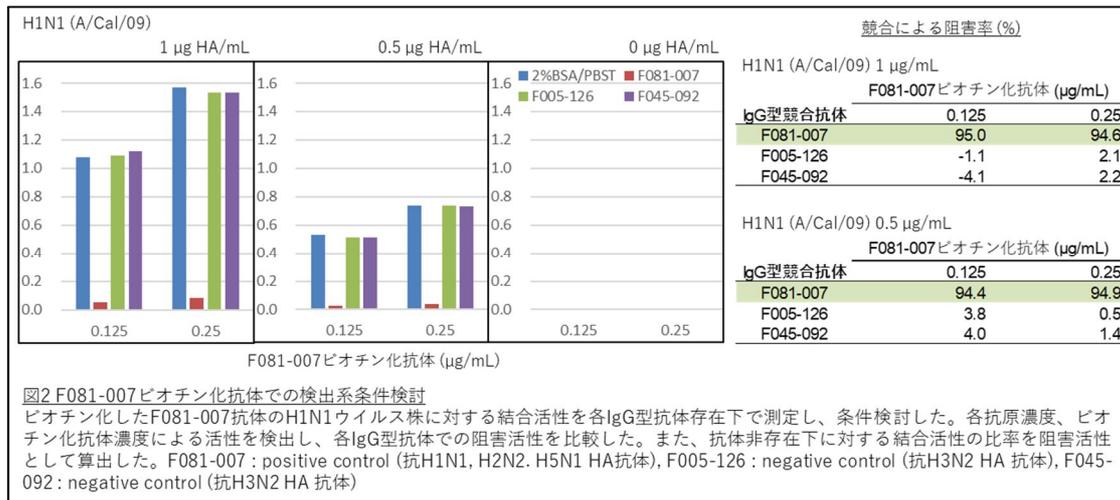


図2 F081-007 ビオチン化抗体での検出系条件検討
 ビオチン化したF081-007抗体のH1N1ウイルス株に対する結合活性を各IgG型抗体存在下で測定し、条件検討した。各抗原濃度、ビオチン化抗体濃度による活性を検出し、各IgG型抗体での阻害活性を比較した。また、抗体非存在下に対する結合活性の比率を阻害活性として算出した。F081-007 : positive control (抗H1N1, H2N2, H5N1 HA抗体), F005-126 : negative control (抗H3N2 HA 抗体), F045-092 : negative control (抗H3N2 HA 抗体)

(3)条件を設定した検出系の検証と血清中の交差反応性中和抗体評価

(2)での検討により得られた条件の検出系で血清の評価を行い、2009年 H1N1 パンデミックワクチン接種前後の血清での結合阻害率の結果から、ワクチン接種による交差反応性中和抗体価の上昇が検出された。そこで、2009年 H1N1 パンデミックワクチン、2013-2014の季節性インフルエンザワクチン、および H5N1 型ワクチンを接種した同一人物から採取した血清中の交差反応性中和抗体を検出し、ワクチン接種による交差反応性抗体産生に及ぼす影響を検討した(図 3)。

H1N1 パンデミックワクチンおよび同じウイルス株の H1 型が添加されている 2013-2014 年季節性ワクチン接種時の血清では、未経験の株であるにも関わらず、第 1 回ワクチン接種日にはすでに交差反応性抗体の存在が検出されていた。ワクチン接種後 1 週間後までは、結合阻害率の上昇はみられなかった。しかし、2 回目のワクチン接種時(1 回目ワクチン接種から約 2 週間)では阻害率の上昇が検出できており、ワクチン接種による交差反応性中和抗体産生が確認できた。パンデミックワクチンでは、2 回目接種の段階では最大量が血清中に産生されておらず、2 回目の接種後約 1 週間後には最大量に達し、それから 1 か月間は維持されていることが確認できた。これは、それまで未経験の初めて免疫されたウイルスであることから 1 回目ワクチンはプライミングとして機能しており、抗体産生までに時間かかっていることを示している。

パンデミックワクチン接種 5 年後に接種した季節性ワクチンでは、10 日後には血清中に最大量産生されおり、かつその量はパンデミックワクチン時の最大量の 1.5 倍量まで上昇していた。このことからパンデミックワクチン時に作られた抗体産生 B 細胞がワクチンによってブーストされたと考えられた。さらに 1 年後の H5N1 ワクチン接種時にはその抗体量は減少することなく血清中で維持されていた。

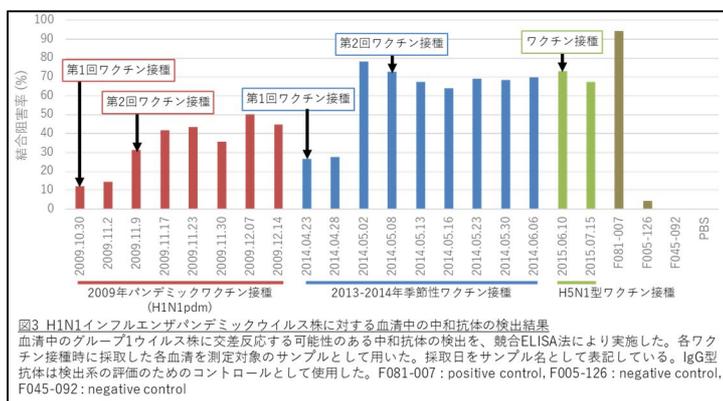


図3 H1N1インフルエンザパンデミックウイルス株に対する血清中の中和抗体の検出結果
 血清中のグループ1ウイルス株に交差反応する可能性のある中和抗体の検出を、競合ELISA法により実施した。各ワクチン接種時に採取した各血清を測定対象のサンプルとして用いた。採取日をサンプル名として表記している。IgG型抗体は検出系の評価のためのコントロールとして使用した。F081-007 : positive control, F005-126 : negative control, F045-092 : negative control

これらの結果から、本検出系において血清中の交差反応性中和抗体の検出が可能であると判断した。

(4)他のウイルス株での交差反応性中和抗体の検出

検出用抗体である F081-007 抗体は、ウイルス株に対するその幅広い交差反応性により、グループ 1 に属する H5N1 株とも結合活性を示す。そこで、他のグループ 1 ウイルス株での中和抗体

検出の可能性を検討した。図3で評価した血清を用いた。血清ドナーは未経験であるH5N1株のプレパンデミックワクチン接種を行っており、その段階でも血清を回収していることから、H5N1株を抗原として用いての検出を試みた(図4)。

H5N1株での交差反応性抗体の検出が確認できたことから、検出用抗体の交差反応性を利用することで、その交差範囲内にあるウイルス株での検出が可能であることが示された。また、各ワクチン接種時における血清中の抗体については、H1N1ワクチン接種時には交差反応性抗体はほとんど検出されなかったが、2回目ワクチン接種時にはH5N1株にも交差反応する抗体が存在す

し、その後上昇して1か月は維持されていることが示された。このことは、同一グループのワクチン接種によりH5N1株にまで交差反応する抗体が産生されたことを意味する。検出用抗体はグループ1に属するウイルス株を中和する特性を持っており、この検出法は同じ部位をエピトープとする抗体の検出を行っている。(3)で示したH1N1株での検出系でも、未経験にもかかわらずパンデミックワクチン

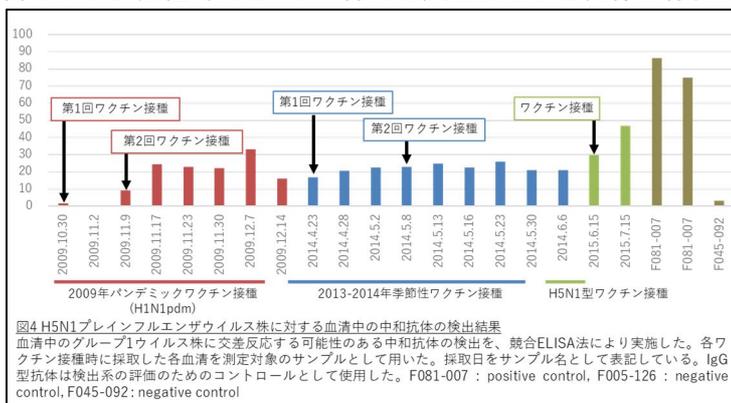


図4 H5N1プレパンデミックウイルス株に対する血清中の中和抗体の検出結果
血清中のグループ1ウイルス株に交差反応する可能性のある中和抗体の検出を、競合ELISA法により実施した。各ワクチン接種時に採取した各血清を測定対象のサンプルとして用いた。採取日をサンプル名として表記している。IgG型抗体は検出系の評価のためのコントロールとして使用した。F081-007: positive control, F005-126: negative control, F045-092: negative control

接種日にすでに血清中に抗体が存在していたことも考慮すると、他のウイルス株のワクチン接種により、未経験のウイルス株防御に役立つ交差反応性抗体が産生されたと考えられる。またH5N1株ワクチン接種後1か月には血清中の抗体濃度が上昇していることが確認できた。

(5)他のインフルエンザのグループにおける検出法開発について

本研究において、グループ2のインフルエンザウイルスに対する交差反応性中和抗体の検出法を検討した。グループ2に属するウイルスすべてに対し交差反応する抗体はいまだ単離できていないため、H3株を交差反応する抗体群から検出用抗体選択した。グループ1同様、抗体をビオチン化したのち、ビオチン-ストレプトアビジンの系での検出を試みたが、抗原に対する結合活性が消失したため、この系での検出は困難であることが判明した。また、tagによる検出を可能にするため、検出用IgG型抗体のCH2領域にmyc tagを導入した抗体を作製し、競合による評価を行ったが、検出用抗体を高濃度で添加しなければ競合がかかりにくい状況であった。さらに抗体Fc領域のビオチン化による検出系も試みたものの、抗原の固相化濃度およびビオチン化抗体濃度も高くする必要があり、その結果検出用抗体での競合がかかりにくく、本研究目的の検出系の構築は困難であったことから、この抗体での系は難しいと判断した。しかしながら、新たな抗体の選択により、検出が可能であると考えられる。

(6)本研究により、幅広い交差反応性中和抗体の検出系の構築が可能となった。この検出法は、複数のウイルス株に対する交差反応性抗体の検出だけでなく、検出用抗体が交差反応するウイルス株を抗原として用いて構築することが可能である。さらに、抗原には、通常考慮されるリコンビナントタンパクだけでなく、インフルエンザワクチン原液でも使用可能であることから、比較的簡単に系が構築できるという点が大きな利点となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------