

A/Ezo red fox/Hokkaido/1/2022 (H5N1)由来ワクチン株は、  
米国乳牛で流行中のH5N1のHAおよびNAに対して  
機能的な抗体を誘導する

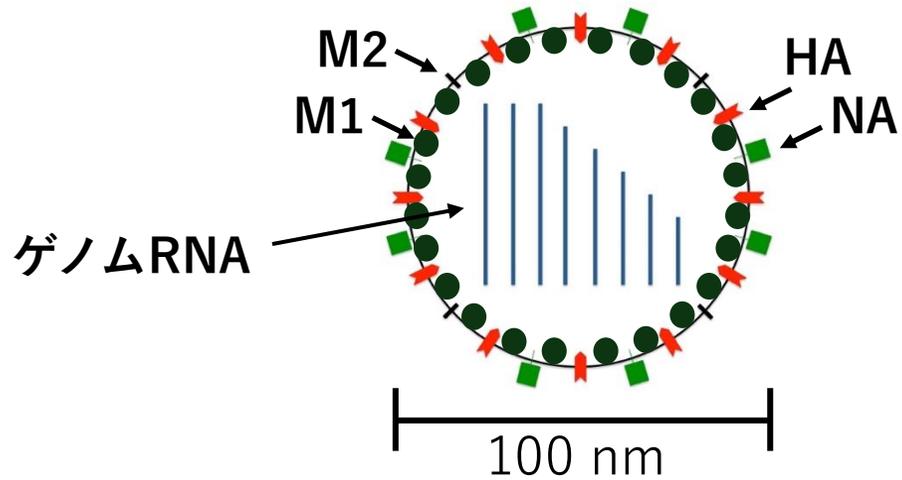
北海道大学 総合イノベーション創発機構ワクチン研究開発拠点

生体応答解析部門

齊藤慎二

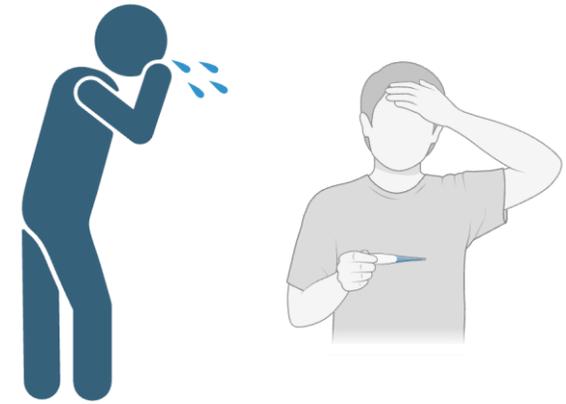
# インフルエンザウイルスとインフルエンザ

## インフルエンザウイルス



- RNAウイルス（オルソミクソウイルス科）
- エンベロープを有し、マイナス鎖一本鎖の分節型RNAゲノム
- A型、B型、C型、D型の四種類
- 表面にスパイクタンパク質（HA: 赤血球凝集素 / NA: ノイラミニダーゼ）
- 遺伝子変異が頻繁（抗原変異 → 季節性流行 / 抗原シフト → パンデミック）

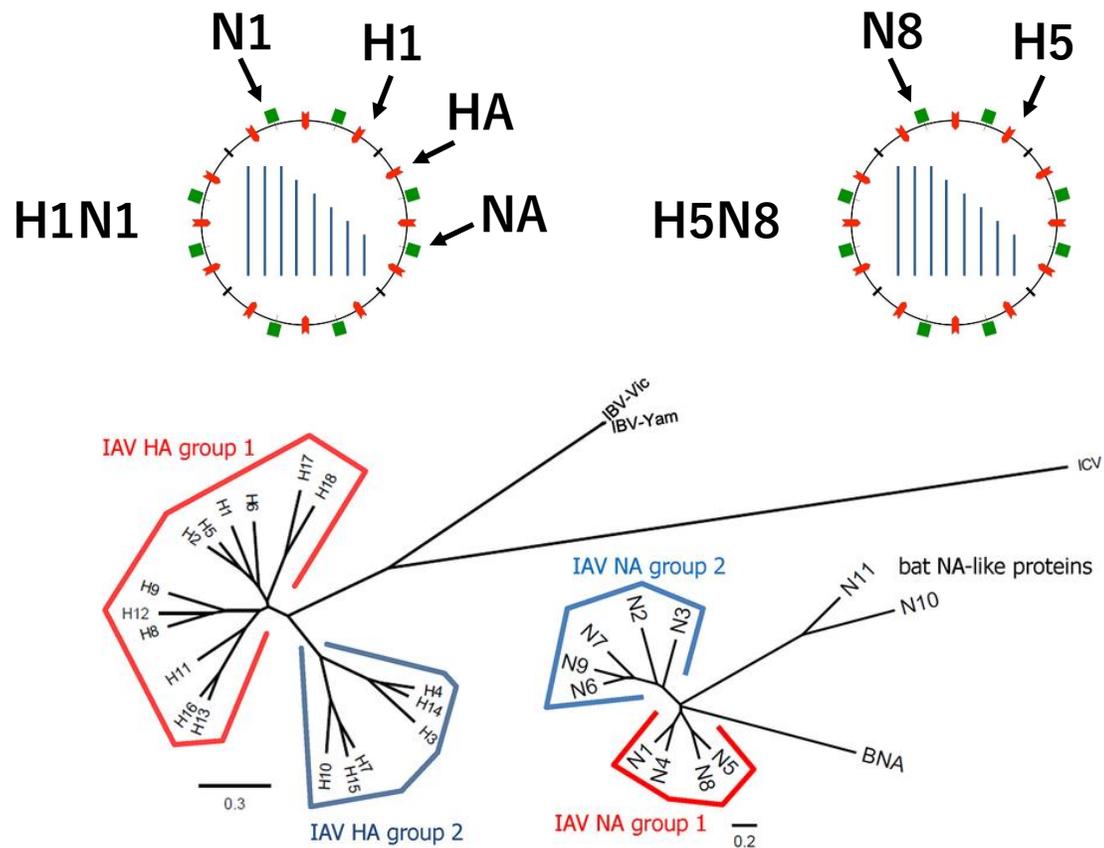
## 疾患としての季節性インフルエンザ



- **症状**  
発熱（38°C以上）  
咳、咽頭痛、全身倦怠感、筋肉痛
- **流行**  
毎年冬に流行（季節性インフルエンザ）  
ワクチン接種で重症化予防
- **重症化リスク**  
高齢者、乳幼児、基礎疾患のある人 2

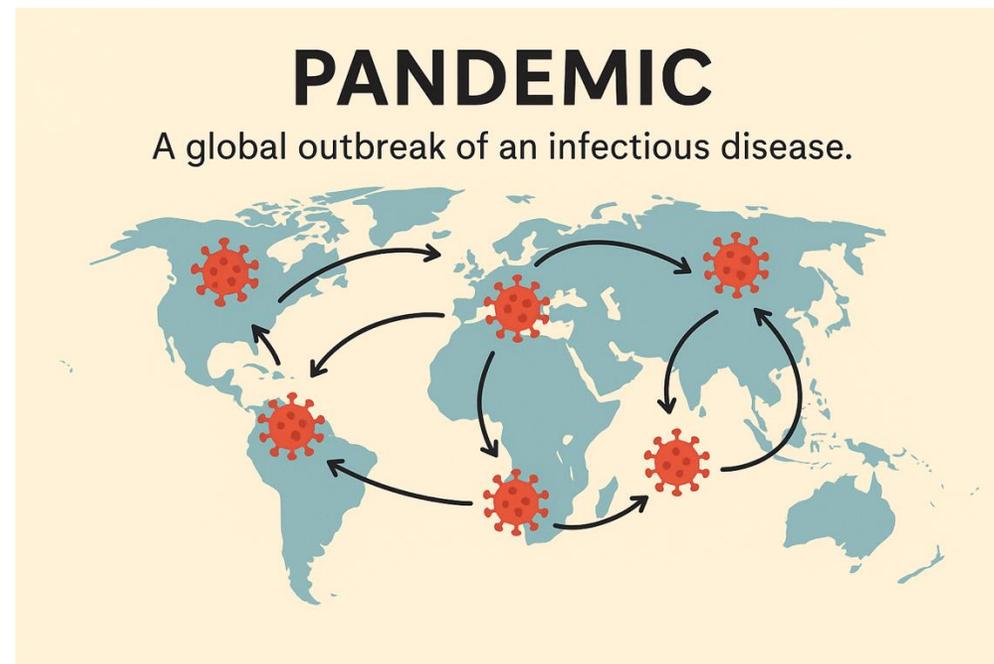
# A型インフルエンザウイルス

## A型インフルエンザウイルス亜型



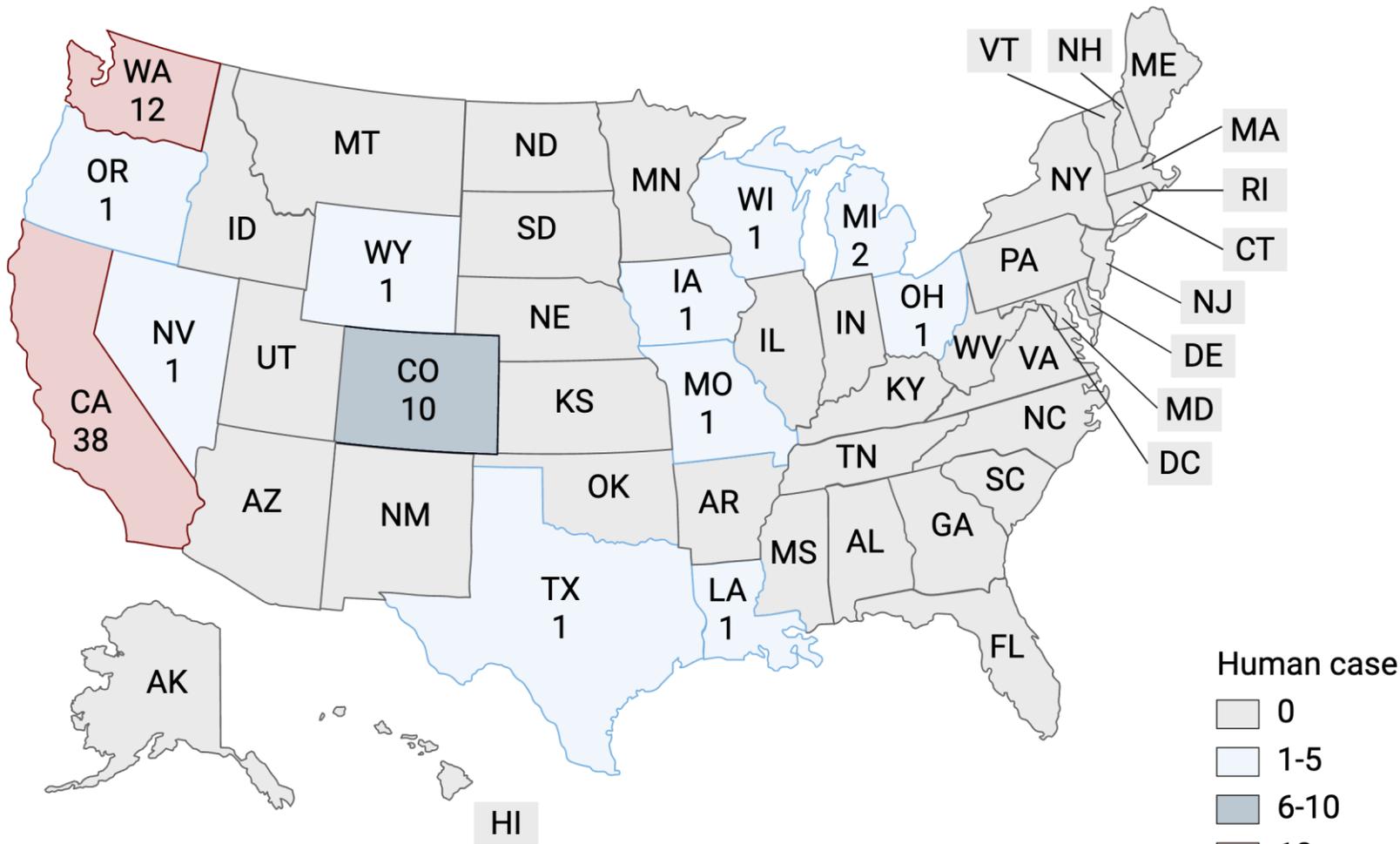
- HAとNAの組み合わせで分類
- (例：H1N1, H3N2, H5N1)
- ヒト・鳥類・豚など幅広い宿主を持つ人獣共通感染症
- 季節性の流行からパンデミックまで引き起こす病原体

## パンデミック



- 世界規模での新型インフルエンザ流行
- **抗原シフト**によって新しいHA/NA組み合わせのウイルスが出現
- 人から人への効率的な感染伝播が成立すると発生
- 過去には1918年（スペインかぜ）、1957年（アジアかぜ）、1968年（香港かぜ）、2009年（新型H1N1）がある

# 米国における乳牛由来の鳥インフルエンザウイルスのヒトへの感染伝播



## ・高病原性鳥インフルエンザウイルス (HPAIV) の広がり

2022年以降、野鳥・家きんでHPAI H5が複数州で検出。

## ・乳牛での感染確認

2024年3月、米国で初確認。複数州へ拡大。

## ・乳牛からのヒト感染例

2024年に初確認、現在までに約70例、主に**農場関係者**。

家畜または家きんへの曝露が背景で、ヒトからヒトの感染は確認されていない。流行しているウイルスのHAは**2.3.4.4b**系統。

## ・パンデミックリスク

公衆衛生上のリスクは現時点では低いとの評価。

変異や拡散の可能性に注視が必要。

2025/11/20時点

# A/Ezo red fox/Hokkaido/1/2022 (H5N1)



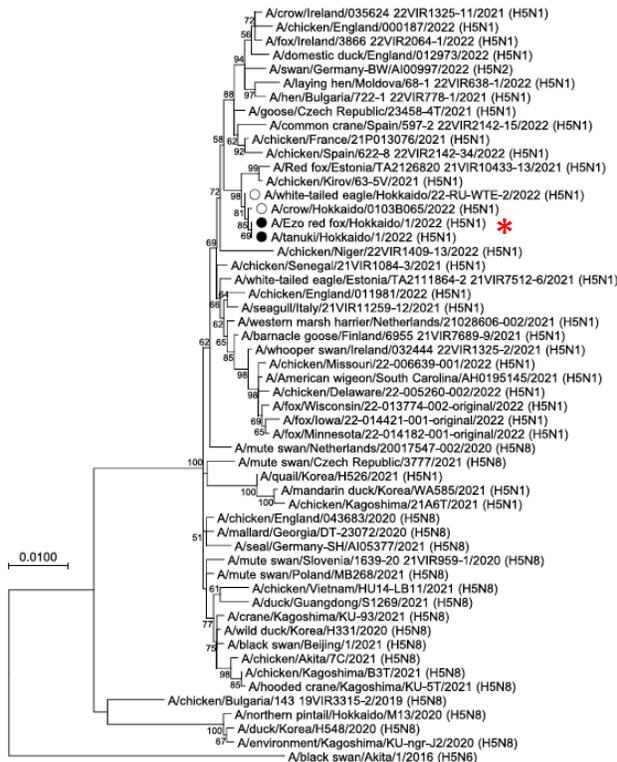
Virological, pathological, and glycovirological investigations of an Ezo red fox and a tanuki naturally infected with H5N1 high pathogenicity avian influenza viruses in Hokkaido, Japan

Takahiro Hiono<sup>a,b,1</sup>, Daiki Kobayashi<sup>a,1</sup>, Atsushi Kobayashi<sup>c,d</sup>, Tamami Suzuki<sup>e</sup>, Yuki Satake<sup>e</sup>, Rio Harada<sup>a</sup>, Keita Matsuno<sup>d,e,f</sup>, Mariko Sashika<sup>e</sup>, Hinako Ban<sup>g</sup>, Maya Kobayashi<sup>e</sup>, Fumihito Takaya<sup>h</sup>, Hiroko Fujita<sup>h</sup>, Norikazu Isoda<sup>h,b,d</sup>, Takashi Kimura<sup>e</sup>, Yoshihiro Sakoda<sup>a,b,d,i,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Microbiology, Department of Disease Control, Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido, 060-0818, Japan  
<sup>b</sup> International Collaboration Unit, International Institute for Zoonosis Control, Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido, 001-0020, Japan  
<sup>c</sup> Laboratory of Comparative Pathology, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Hokkaido, 000-0018, Japan  
<sup>d</sup> One Health Research Center, Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido, 060-0818, Japan  
<sup>e</sup> Division of Risk Analysis and Management, International Institute for Zoonosis Control, Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido, 001-0020, Japan  
<sup>f</sup> Division of International Research Promotion, International Institute for Zoonosis Control, Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido, 001-0020, Japan  
<sup>g</sup> Laboratory of Wildlife Biology and Medicine, Department of Environmental Veterinary Science, Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido, 060-0818, Japan  
<sup>h</sup> Botanic Garden, Field Science Center for Northern Biosphere (FSC), Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido, 060-0003, Japan  
<sup>i</sup> Hokkaido University, Institute for Vaccine Research and Development (HUIVR&D), Sapporo, Hokkaido, 001-0021, Japan

## A/Ezo red fox/Hokkaido/1/2022 (H5N1)

- 2022年、HPAIV (H5N1)に感染したキタキツネ (Ezo red fox) 由来
- 北海道大学の日尾野先生・迫田先生らのグループにより分離され北大インフルエンザライブラリーに収蔵
- HA : clade 2.3.4.4b
- 米国では同クレードのH5N1が乳牛→ヒトへ人獣共通感染



Ezo red fox



Clade 2.3.4.4b  
Clade 2.3.4.4e



PUBLISHED: 2024年11月27日

## Summary of status of development and availability of A(H5N1) candidate vaccine viruses and potency testing reagents

Antigenic and genetic analyses are performed by the WHO Collaborating Centres of the Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS). Unless otherwise indicated all candidate vaccine viruses posted on this table have passed two-way haemagglutination inhibition (HI) test. [National or Regional control authorities approve the composition and formulation of vaccines used in each country](#)

23 February 2024

### Candidate vaccine viruses\*

Antigenic prototype	Clade	Candidate vaccine virus	Developing institute	Available from
A/Vietnam/1194/2004	1	Wild type virus		WHO CCs
		NIBRG-14*	MHRA, UK	MHRA, UK
A/American wigeon/South Carolina/22-000345-001/2021-like	2.3.4.4b	Wild type virus		CDC, USA
		IDCDC-RG78A*	CDC, USA	
A/Ezo red fox/Hokkaido/1/2022-like	2.3.4.4b	NIID-002**	NIID, Japan	NIID, Japan

\* New CVV shown in blue

\*These viruses are candidate vaccine viruses which have passed relevant safety testing and two-way haemagglutination inhibition (HI) tests. They can be handled under BSL-2 enhanced containment<sup>1</sup>.



## プレパンデミックワクチン株の選定ならびにワクチンの準備状況について

(IASR Vol. 45 p197-198: 2024年11月号)

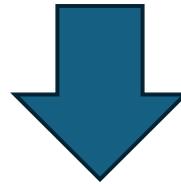
2023年度に、備蓄用プレパンデミックワクチンは、前年までのH7N9株〔A/Guangdong/17SF003/2016 (IDCDC-RG56N)〕からH5N8株〔A/Astrakhan/3212/2020 (IDCDC-RG71A)〕に変更となり、2024年度はH5N1株〔A/Ezo red fox/Hokkaido/1/2022 (NIID-002)〕に変更となった。

- 国立感染症研究所（現：国立健康危機管理研究機構）がEzo red fox株を低病原性化し、NIID-002株を作製
- 本株は2024年にWHOにより鳥インフルエンザ感染症用候補ワクチンウイルス（CVV）に選定。
- 2024年に日本においてもプレパンデミックワクチン製造株として選定。

# 目的

---

北海道で単離されたA/Ezo red fox/Hokkaido/1/2022 (H5N1) ウイルス由来のワクチン株が、広く使われるようになった。



以前のプレパンデミックワクチン備蓄株 (A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8)) と抗原性を比較し、現在流行しているH5N1に対するワクチン候補としての有用性を評価する。

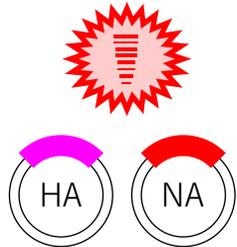
# リバースジェネティクス法を用いた低病原性ウイルスの作製

A/Ezo red fox/Hokkaido/1/2022 (H5N1)

または

A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8)

HEK293T細胞へトランスフェクション

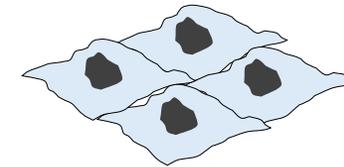
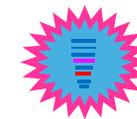
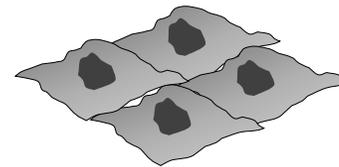
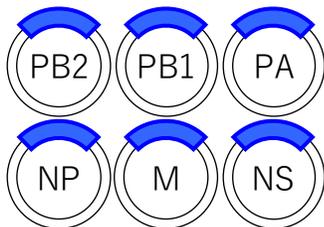


- ▶ HAの開裂部位を改変し、低病原性化  
REKRRKR → RETR  
(各ワクチン株で導入されたものと同変異)

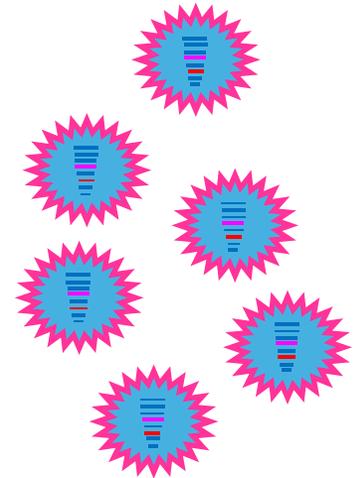


A/Puerto Rico/8/34(H1N1)  
(親株)

内部遺伝子



MDCK細胞で増殖



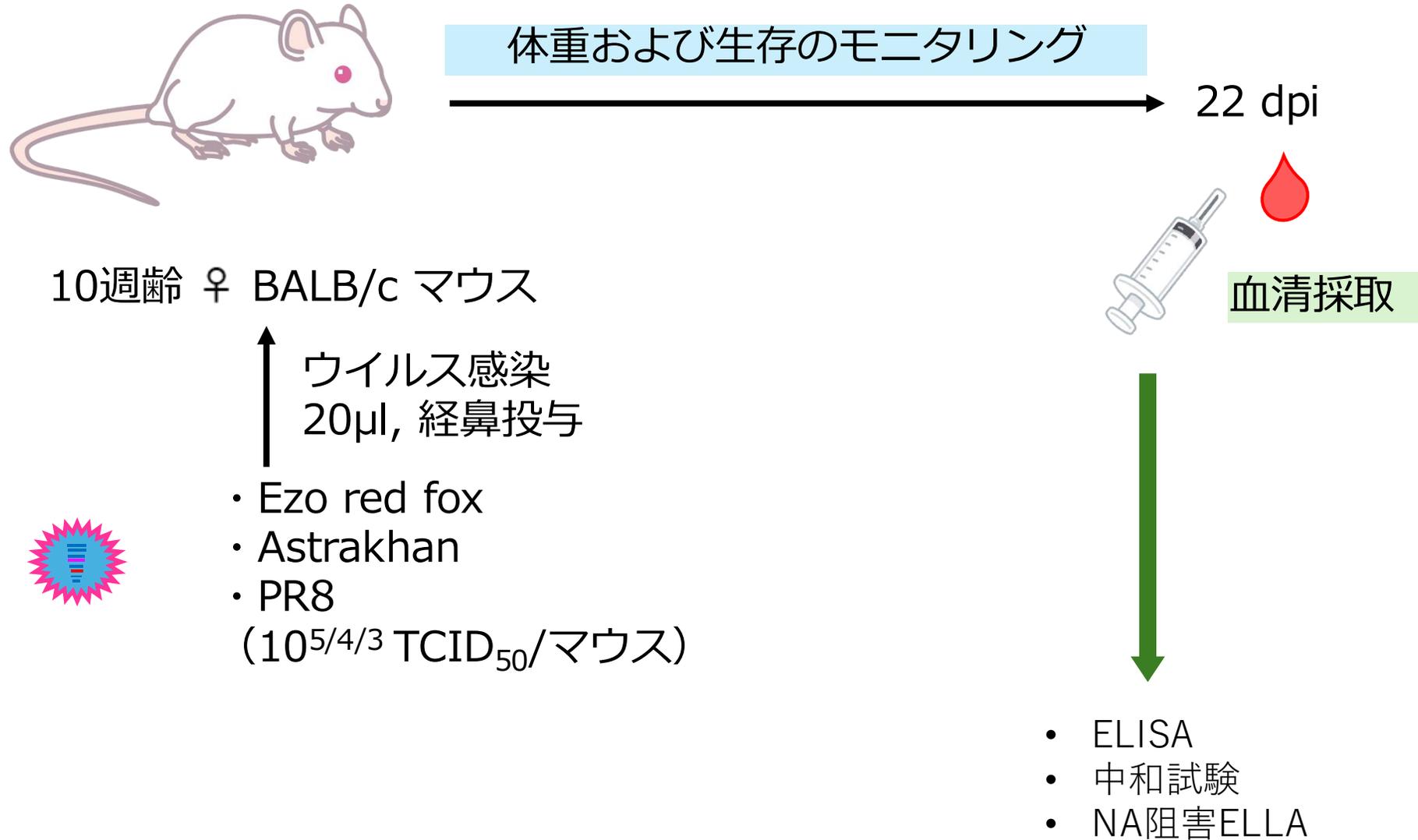
低病原性化したワクチン株と同一配列を持つインフルエンザウイルスを作製

# リバースジェネティクス法で作製したウイルスの増殖性

	PR8 (H1N1)	Ezo red fox (H5N1)		Astrakhan (H5N8)
	RG	WT	RG (LPAI)	RG (LPAI)
TCID <sub>50</sub> /mL	1.23×10 <sup>8</sup>	2.14×10 <sup>8</sup>	3.09×10 <sup>8</sup>	4.27×10 <sup>8</sup>

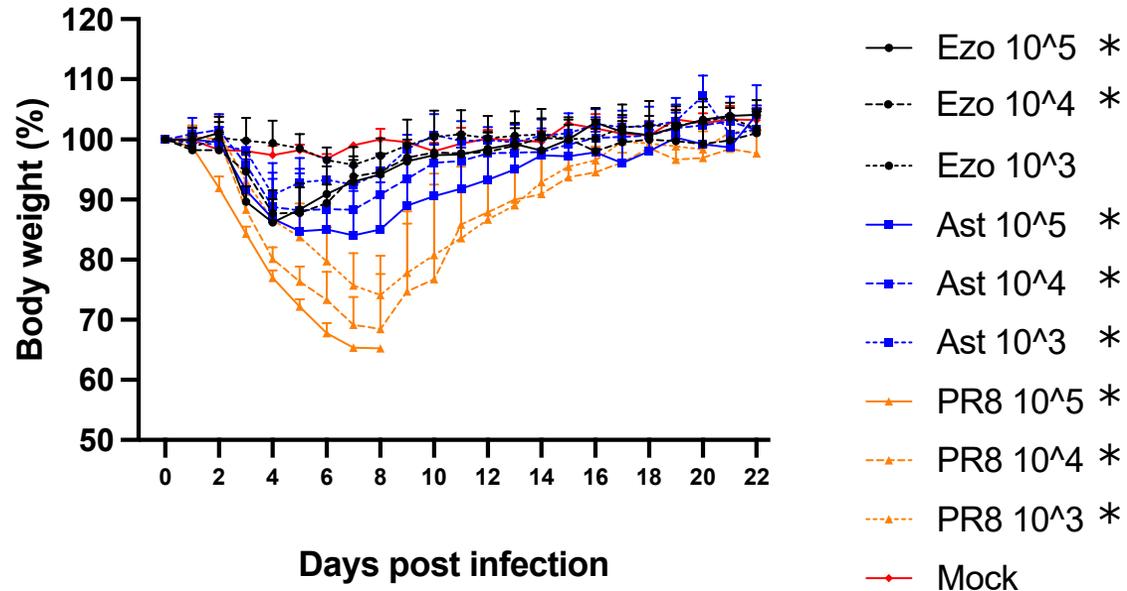
リバースジェネティクス法により作製したウイルスは、親株であるPR8や野生型のEzo red fox株と同等の増殖性を示した。

# マウスでの病原性評価と血清採取

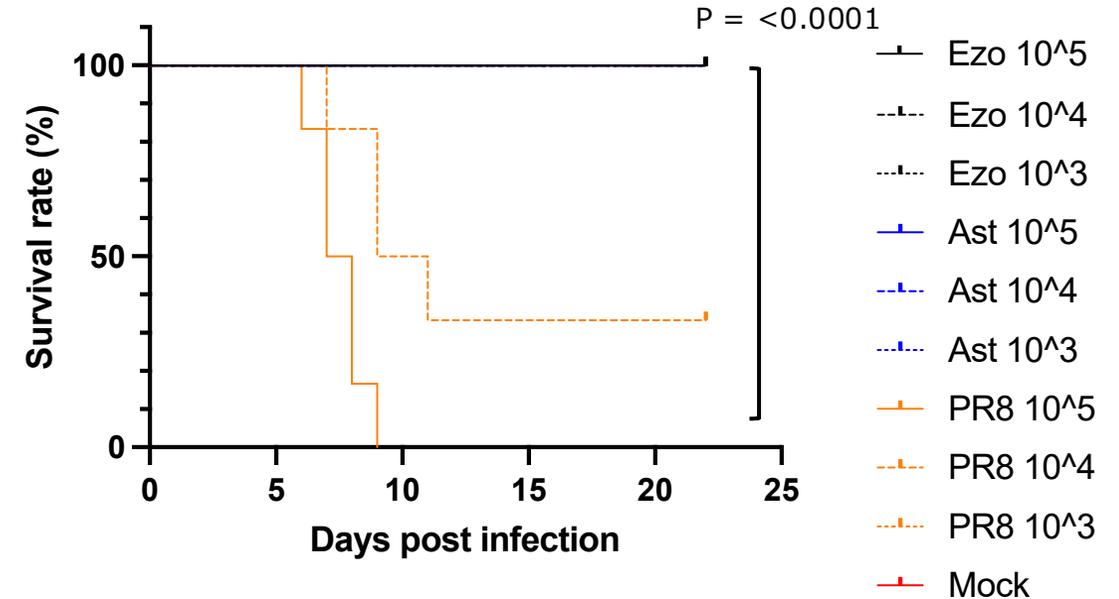


# ウイルス感染後の体重変化と生存率

## 体重変化



## 生存率



\* Mock群と比較して、少なくとも1日以上の有差有り。

本研究で作製した2種類の低病原性株は、PR8よりも病原性が低く、NiidやCDCで作製されたワクチン株と同様に低病原性化された。



Ezo red fox株およびAstrakhan株に感染させたマウスから採取した血清を解析

# 抗HA抗体の防御的役割

*J. Hyg., Camb.* (1972), **70**, 767  
Printed in Great Britain

767

## The role of serum haemagglutination-inhibiting antibody in protection against challenge infection with influenza A2 and B viruses

BY D. HOBSON AND R. L. CURRY

*Department of Medical Microbiology, University of Liverpool*

A. S. BEARE

*M.R.C. Common Cold Research Unit, Salisbury*

AND A. WARD-GARDNER

*Medical Department, Esso Refinery, Fawley*

(Received 17 May 1972)

- 血清HI抗体価を測定した1032名の成人ボランティアにおいて、HI抗体価と感染可能性の間には一貫した逆相関関係が認められた。(Hobson and Curry., 1972)。

- すべての試験モデルにおいて、HI価とインフルエンザに対する臨床的防御効果との間に有意かつ正の相関が認められた (Coudeville et al., 2010)。

- 抗HA全長抗体および抗HA茎部抗体のELISA価の上昇に伴いLRS発生確率が低下することが示された (Aydillo et al., 2020)。

Coudeville et al. *BMC Medical Research Methodology* 2010, **10**:18  
<http://www.biomedcentral.com/1471-2288/10/18>



RESEARCH ARTICLE

Open Access

Relationship between haemagglutination-inhibiting antibody titres and clinical protection against influenza: development and application of a bayesian random-effects model

Laurent Coudeville<sup>1\*</sup>, Fabrice Bailleux<sup>1</sup>, Benjamin Riche<sup>2</sup>, Françoise Megas<sup>1</sup>, Philippe Andre<sup>1</sup>, René Ecohard<sup>2</sup>

Cell Reports Medicine



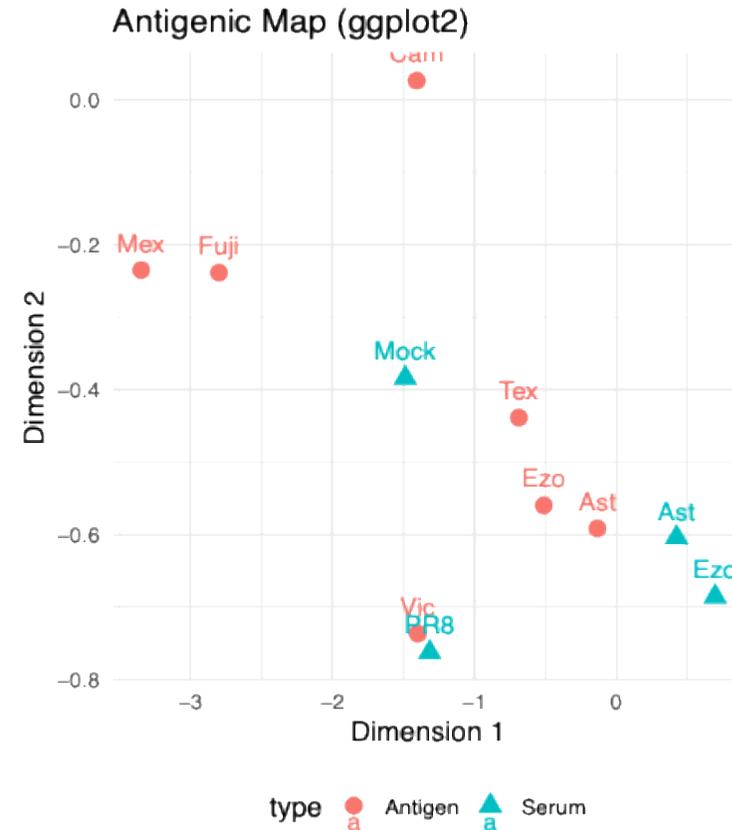
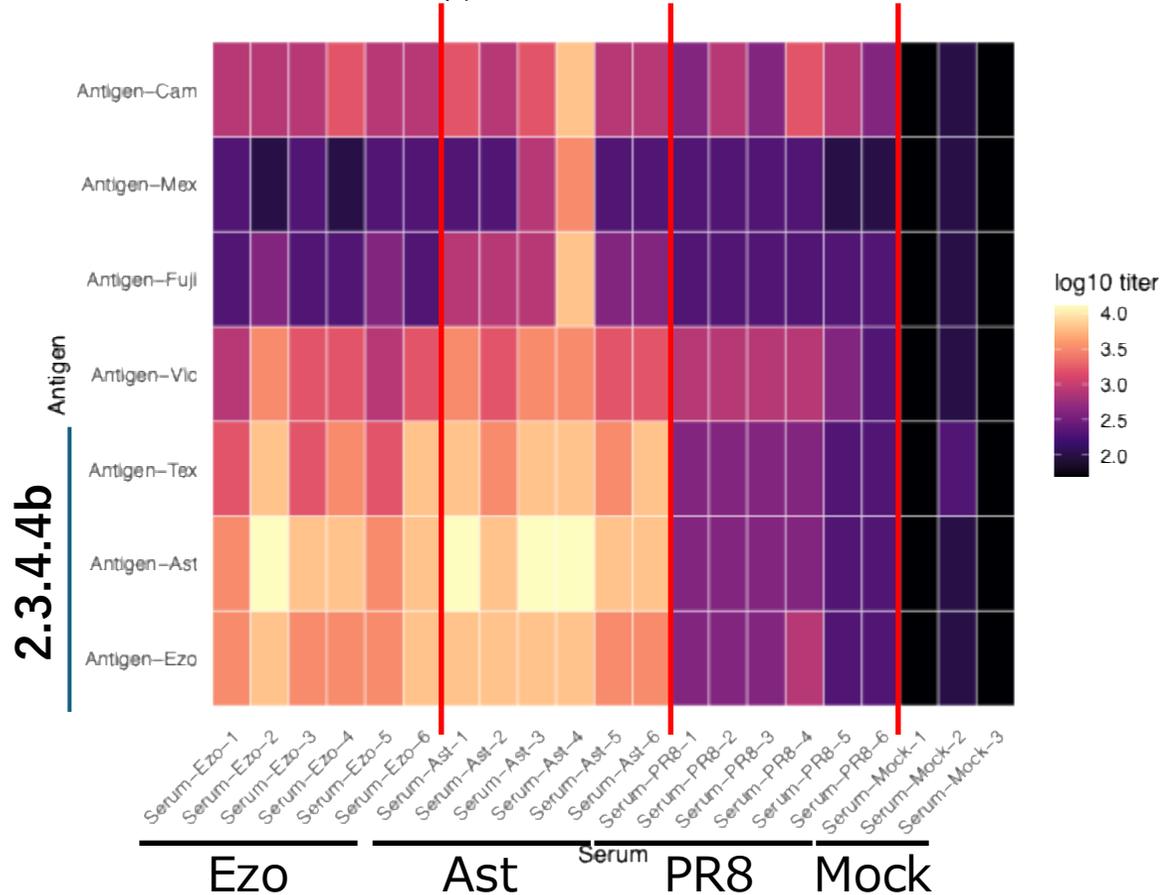
Report

Pre-existing Hemagglutinin Stalk Antibodies Correlate with Protection of Lower Respiratory Symptoms in Flu-Infected Transplant Patients

Teresa Aydillo,<sup>1,2</sup> Alba Escalera,<sup>1,2</sup> Shirin Strohmeyer,<sup>1</sup> Sadaf Aslam,<sup>1,2</sup> Javier Sanchez-Cespedes,<sup>3,13</sup> Juan Ayllon,<sup>1,2,16</sup> Cristina Roca-Oporto,<sup>3,13</sup> Pilar Perez-Romero,<sup>4,13</sup> Miguel Montejo,<sup>5,13</sup> Joan Gavalda,<sup>6,13</sup> Patricia Munoz,<sup>7,13</sup> Francisco Lopez-Medrano,<sup>8,13</sup> Jordi Carratala,<sup>9,13</sup> Florian Krammer,<sup>1</sup> Adolfo Garcia-Sastre,<sup>1,2,10,11,14,\*</sup> and Elisa Cordero<sup>3,12,13,\*</sup>

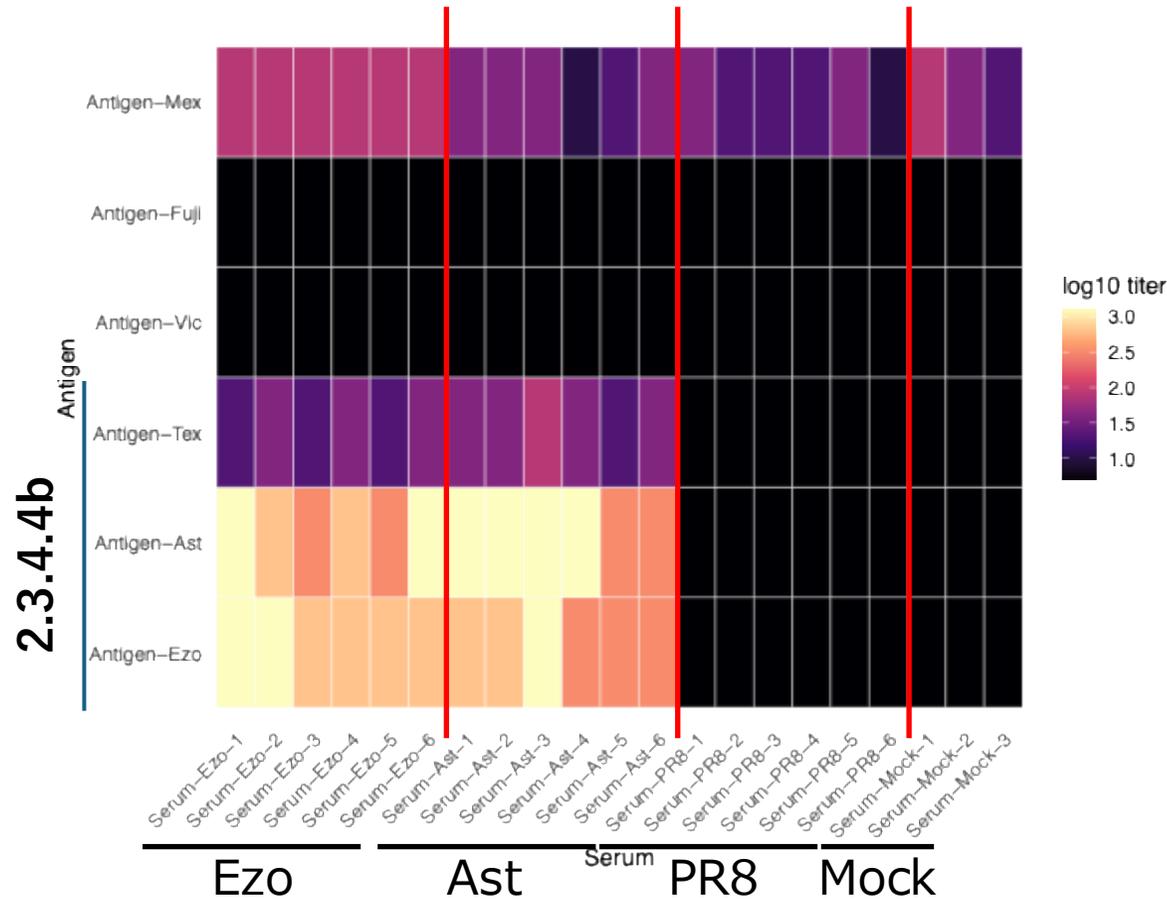
# 感染血清中のHA特異的抗体応答のELISA解析

## 2.3.2.1c カンボジア株のクレード



- Ezo red foxおよびAstrakhan株で免疫した群は、乳牛由来H5N1（Texas株）のHAに対して高い抗体価を示した。
- 他のH5亜型のHAに対する抗体価は低値傾向であったが、交差反応性抗体の誘導は認められた。

# 感染血清中の中和抗体の解析



- Ezo red foxおよびAstrakhan免疫群は、Ezo red foxおよびAstrakhanの両ウイルスに対して高い中和抗体価を示した。
- 乳牛由来 H5N1 (Texas) に対する中和抗体価は低値傾向だが、両群とも中和活性を検出。

# 抗NA抗体の防御的役割

## Antibody Correlates and Predictors of Immunity to Naturally Occurring Influenza in Humans and the Importance of Antibody to the Neuraminidase

Robert B. Couch,<sup>1,2</sup> Robert L. Atmar,<sup>1,2</sup> Luis M. Franco,<sup>1,3</sup> John M. Quarles,<sup>6</sup> Janet Wells,<sup>2</sup> Nancy Arden,<sup>6</sup> Diane Niño,<sup>2</sup> and John W. Belmont<sup>3,4,5</sup>

<sup>1</sup>Department of Medicine, <sup>2</sup>Department of Molecular Virology and Microbiology, <sup>3</sup>Department of Molecular and Human Genetics, <sup>4</sup>Department of Pediatrics, <sup>5</sup>Department of Pathology and Immunology, Baylor College of Medicine, Houston, Texas; and <sup>6</sup>Department of Microbial and Molecular Pathogenesis, College of Medicine, Texas A&M Health Science Center, College Station

Clinical Infectious Diseases

MAJOR ARTICLE



## Pre-existing Antineuraminidase Antibodies Are Associated With Shortened Duration of Influenza A(H1N1)pdm Virus Shedding and Illness in Naturally Infected Adults

Hannah E. Maier,<sup>1,6</sup> Raffael Nachbagauer,<sup>2</sup> Guillermina Kuan,<sup>3,4</sup> Sophia Ng,<sup>1</sup> Roger Lopez,<sup>3,5</sup> Nery Sanchez,<sup>2</sup> Daniel Stadlbauer,<sup>2</sup> Lionel Gresh,<sup>2</sup> Amy Schiller,<sup>1</sup> Arvind Rajabhatthor,<sup>2</sup> Sergio Ojeda,<sup>2</sup> Andrea F. Guglia,<sup>2</sup> Fatima Amanat,<sup>2,6</sup> Angel Balmaseda,<sup>3,5</sup> Florian Krammer,<sup>2,6</sup> and Aubree Gordon<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup>Department of Epidemiology, School of Public Health, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan, USA; <sup>2</sup>Department of Microbiology, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, New York, USA; <sup>3</sup>Sustainable Sciences Institute, Managua, Nicaragua; <sup>4</sup>Centro de Salud Sócrates Flores Vivas, Ministry of Health, Managua, Nicaragua; and <sup>5</sup>Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia, Ministry of Health, Managua, Nicaragua; and <sup>6</sup>Graduate School of Biological Sciences, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, New York, USA



Editor's Pick | Immunology | Full-Length Text

## Binding antibody titers against the hemagglutinin and neuraminidase correlate with protection against medically attended influenza A and B disease

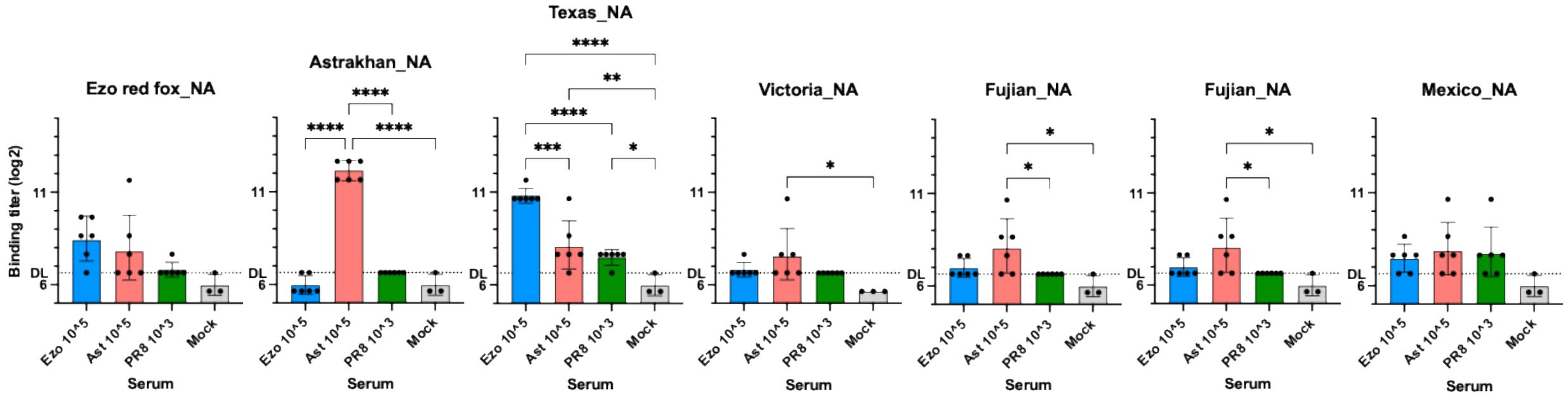
Marios Koutsakos,<sup>1</sup> Arnold Reynaldi,<sup>2</sup> Malet Aban,<sup>3</sup> Ian G. Barr,<sup>1,3</sup> David S. Khoury,<sup>2</sup> Miles P. Davenport,<sup>2</sup> Ali H. Ellebedy,<sup>4,5,6</sup> Philip A. Mudd<sup>5,6,7</sup>

- **抗NA抗体は、抗HA抗体とは独立した防御相関指標として機能する。**
- **高い抗NA抗体価は、感染リスクおよび症状の重症度を低減する（Couch et al., 2013）。**

- **自然感染例では、NA抗体価が高いほどウイルス排出期間と症状持続期間が短い（Maier et al., 2020）。**

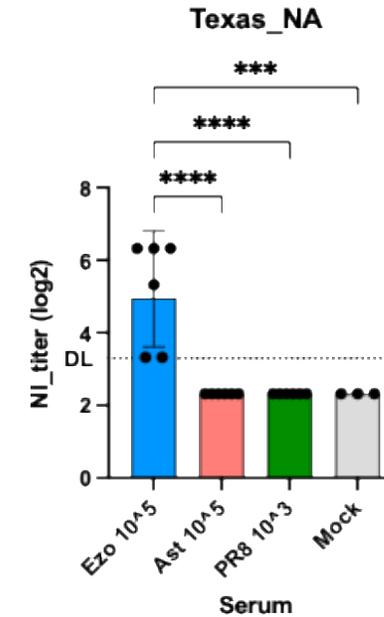
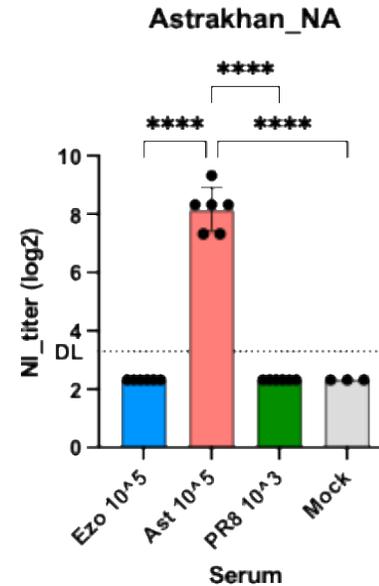
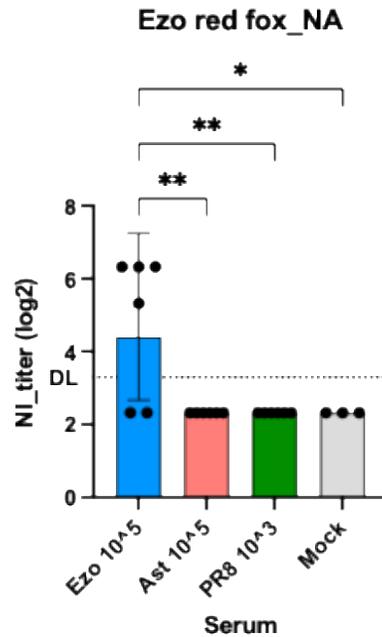
- **高い抗NA抗体価が「医療受診を伴う」インフルエンザ発症率の低下と相関することが示された（Koutsakos et al., 2025）。**

# 感染血清中のNA特異的抗体応答のELISA解析



- Ezo red fox群は、自身のNAに加えTexas株NAに対しても高い抗体価を示した。
- Astrakhan群は、自身のNAに対してのみ高い抗体価を示した。
- その他のNAに対しては、両群とも低力価であった。

# 感染血清中の抗NA抗体の解析



- Ezo red fox群は、自身のNAに加え、Texas株のNAに対してもノイラミニダーゼ阻害（NI）活性を示した。
- Astrakhan群は自身のNAに対してのみ強いNI活性を示した。

# まとめ

---

- ✓ A/Ezo red fox/Hokkaido/1/2022 (H5N1)由来ワクチン株は、以前の備蓄株と同様に、現在アメリカで流行しているH5N1ウイルスに対して中和抗体を誘導した。
- ✓ A/Ezo red fox/Hokkaido/1/2022 (H5N1)由来ワクチン株は現在アメリカで流行しているH5N1ウイルスに対するノイラミニダーゼ阻害 (NI) 抗体も誘導した。

これらの知見は、A/Ezo red fox/Hokkaido/1/2022 (H5N1) 由来のウイルス株が、現在流行中のH5N1ウイルスに対するワクチン候補株として最も有望である可能性を示唆している。

# へニパウイルス感染症ワクチン開発に向けた技術基盤の創出と 抗原設計戦略

呼吸器内科学教室より学内留学でIVReDに在籍する大崎智史先生が、推進している研究

# ヘニパウイルス (Henipavirus) とは？

## 分類と代表的ウイルス

科：Paramyxoviridae (パラミクソウイルス科)

属：Henipavirus

## Henipavirusの代表ウイルス

- ニパウイルス (Nipah virus; NiV) (本研究におけるメインターゲット)
- ヘンドラウイルス (Hendra virus; HeV)

## ニパウイルスの自然宿主

自然宿主：オオコウモリ

中間宿主：ブタや牛 → ヒト、またはコウモリから直接ヒトへ

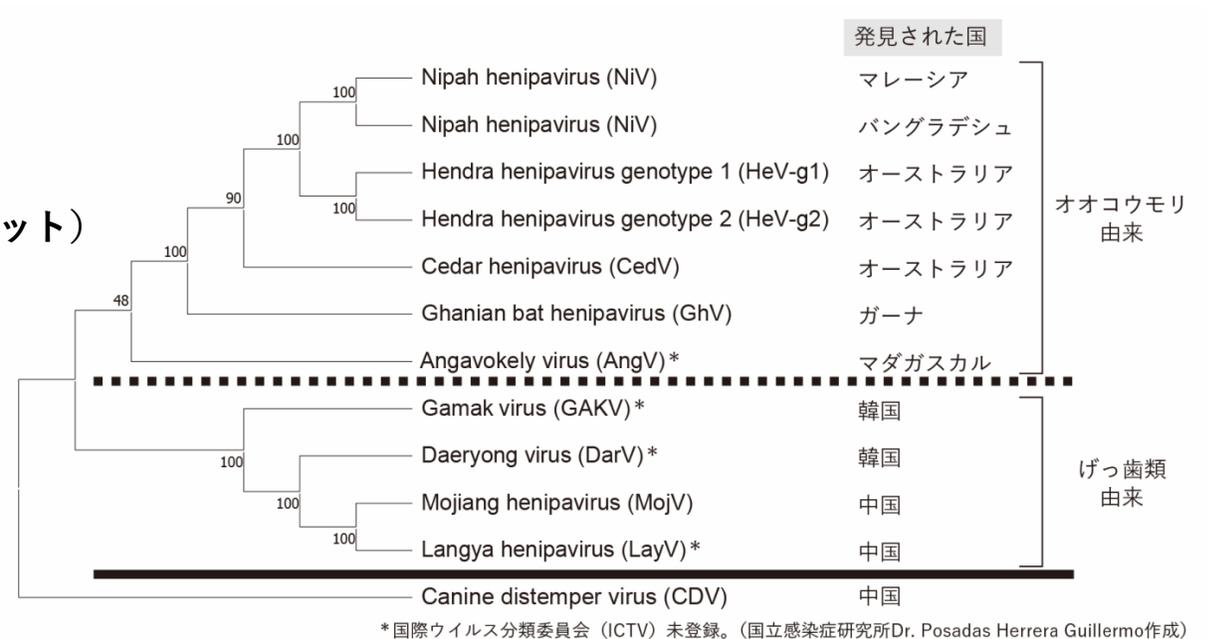


図. ヘニパウイルスL蛋白質アミノ酸配列に基づく系統解析

IASR

国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 HP  
<https://id-info.jihs.go.jp/niid/ja/typhi-m/iasr-reference/11813-516r02.html>

# ニパウイルスのヒトにおける臨床症状

- 呼吸器症状と神経症状を主徴として急激な経過（数日）で進行する

- 呼吸器症状 (●)

一般的な上気道症状、咳嗽、呼吸困難など

- 神経症状 (●)

意識障害、昏睡、頭痛、痙攣など

- 消化器症状

嘔吐、下痢など



Homaira N, et al. *Epidemiol Infect.* 2010;138(11):1630-1636.

Table 1. Clinical characteristics of Nipah virus infection during different outbreaks in Bangladesh.

Characteristic	Outbreak				
	Meherpur, 2001 (n = 13)	Naogaon, 2003 (n = 12)	Rajbari, 2004 (n = 31)	Faridpur, 2004 (n = 36)	All (n = 92)
Age, years					
Mean ± SD	40.2 ± 16.2	17.4 ± 13.5	15.3 ± 10.5	35.4 ± 14.7	27.0 ± 17.0
Median (range)	38 (4-60)	12 (4-42)	12 (2-50)	35 (5-60)	26 (2-60)
Fever	13/13 (100)	12/12 (100)	31/31 (100)	36/36 (100)	92/92 (100)
Altered mental status <sup>a</sup>	13/13 (100)	10/12 (83)	30/30 (100)	29/36 (81)	82/91 (90)
Unconsciousness <sup>b</sup>	3/13 (23)	9/12 (75)	28/30 (93)	27/36 (75)	67/91 (74)
Headache	8/13 (62)	10/12 (83)	16/27 (59)	30/36 (83)	64/88 (73)
Severe weakness	NC	3/12 (25)	23/28 (82)	25/36 (69)	51/76 (67)
Cough and/or cold	10/13 (77)	6/12 (50)	14/29 (48)	26/36 (72)	56/90 (62)
Respiratory difficulty	9/13 (69)	7/12 (58)	19/29 (66)	27/36 (75)	62/90 (69)
Vomiting	7/13 (54)	6/12 (50)	20/30 (67)	20/36 (56)	53/91 (58)
Diarrhea	2/13 (15)	1/12 (8)	8/29 (28)	15/36 (42)	26/90 (29)
Convulsion	3/13 (23)	3/12 (25)	14/30 (47)	1/36 (3)	21/91 (23)
Plantar reflex					
Absent	ND	ND	1/12 (8)	0/5 (0)	1/17 (6)
Equivocal	ND	ND	2/12 (17)	2/5 (40)	4/17 (24)
Extensor	ND	ND	6/12 (50)	0/5 (0)	6/17 (35)
Flexor	ND	ND	3/12 (25)	0/5 (0)	3/17 (35)
Deep tendon reflex					
Absent	ND	ND	4/11 (36)	0/3 (0)	4/14 (29)
Diminished	ND	ND	5/11 (45)	0/3 (0)	5/14 (36)
Exaggerated	ND	ND	0/11 (0)	0/3 (0)	0/14 (0)
Normal	ND	ND	2/11 (18)	3/3 (100)	5/14 (36)
Case fatality	9/13 (69)	8/12 (67)	23/31 (74)	27/36 (75)	67/92 (73)

NOTE. Data are proportion (%) of patients, unless otherwise indicated. NC, not collected; ND, not done.

<sup>a</sup> Altered mental status was defined as lack of orientation to time, place, and person. Unconsciousness was included as altered mental status.

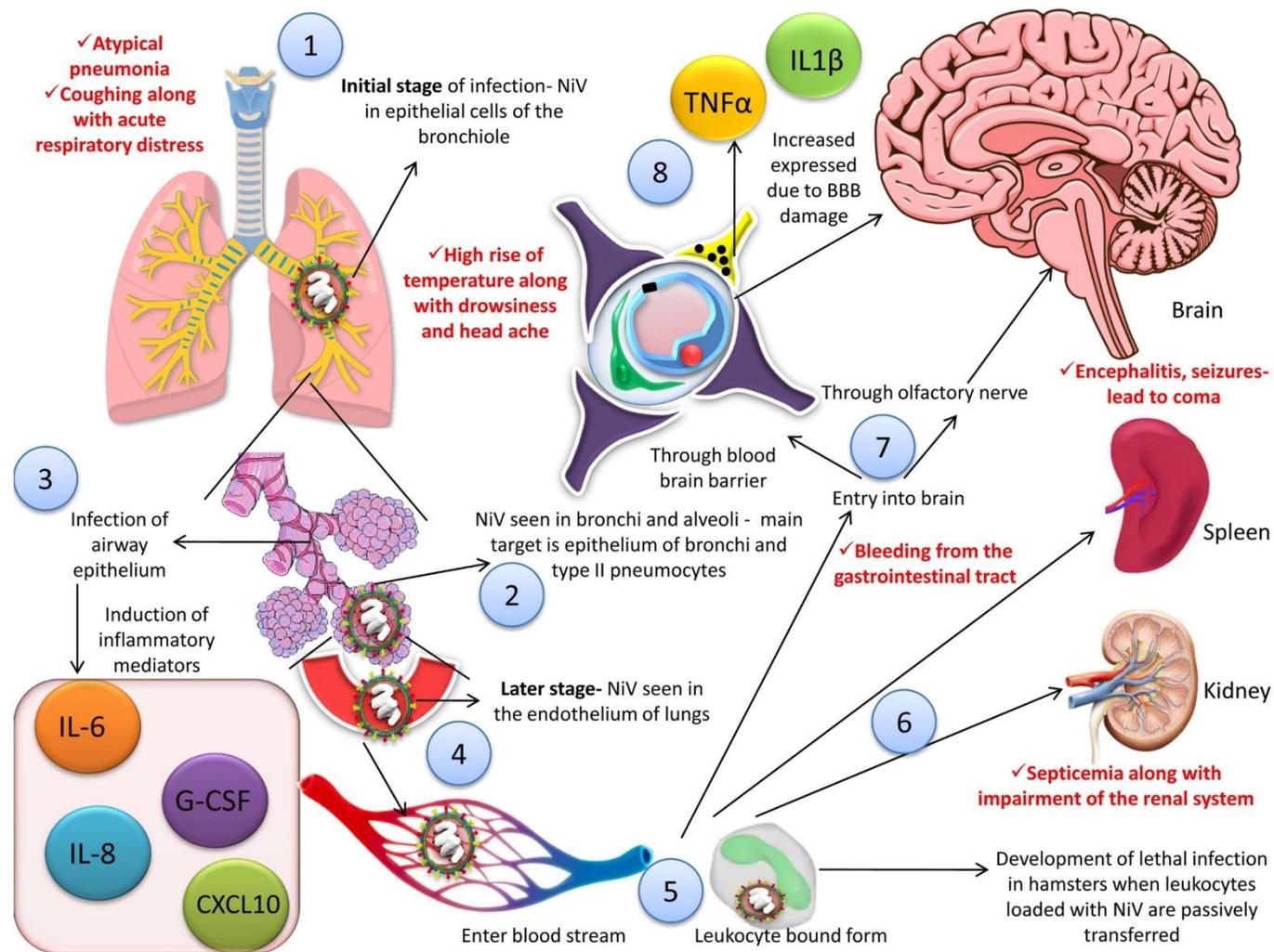
<sup>b</sup> Unconsciousness was defined as inability to give meaningful response to any stimuli.

# ニパウイルスのヒトにおける臨床症状

NiVは主に血管内皮細胞と神経細胞に発現する

**Ephrin B2/B3**を受容体として細胞に侵入する

- NiVはまず気管支上皮細胞とII型肺胞上皮細胞に感染して呼吸器症状を引き起こす
- 呼吸器上皮に感染したNiVは血管内に移行してウイルス血症を起こす
- 血管内皮細胞のEphrin B2/B3を受容体にして全身の血管炎症状を引き起こす  
肺胞出血、ARDS、腎障害、肝障害、血栓症 etc
- 中枢神経は破綻した血液脳関門（BBB）から感染+嗅神経経由で直接感染して重篤な脳炎を引き起こす



Singh RK, Dhama K, Chakraborty S, et al. Vet Q. 2019;39(1):26-55.

# ニパウイルスの疫学

## 発生地域

- ニパウイルス感染症 (★)

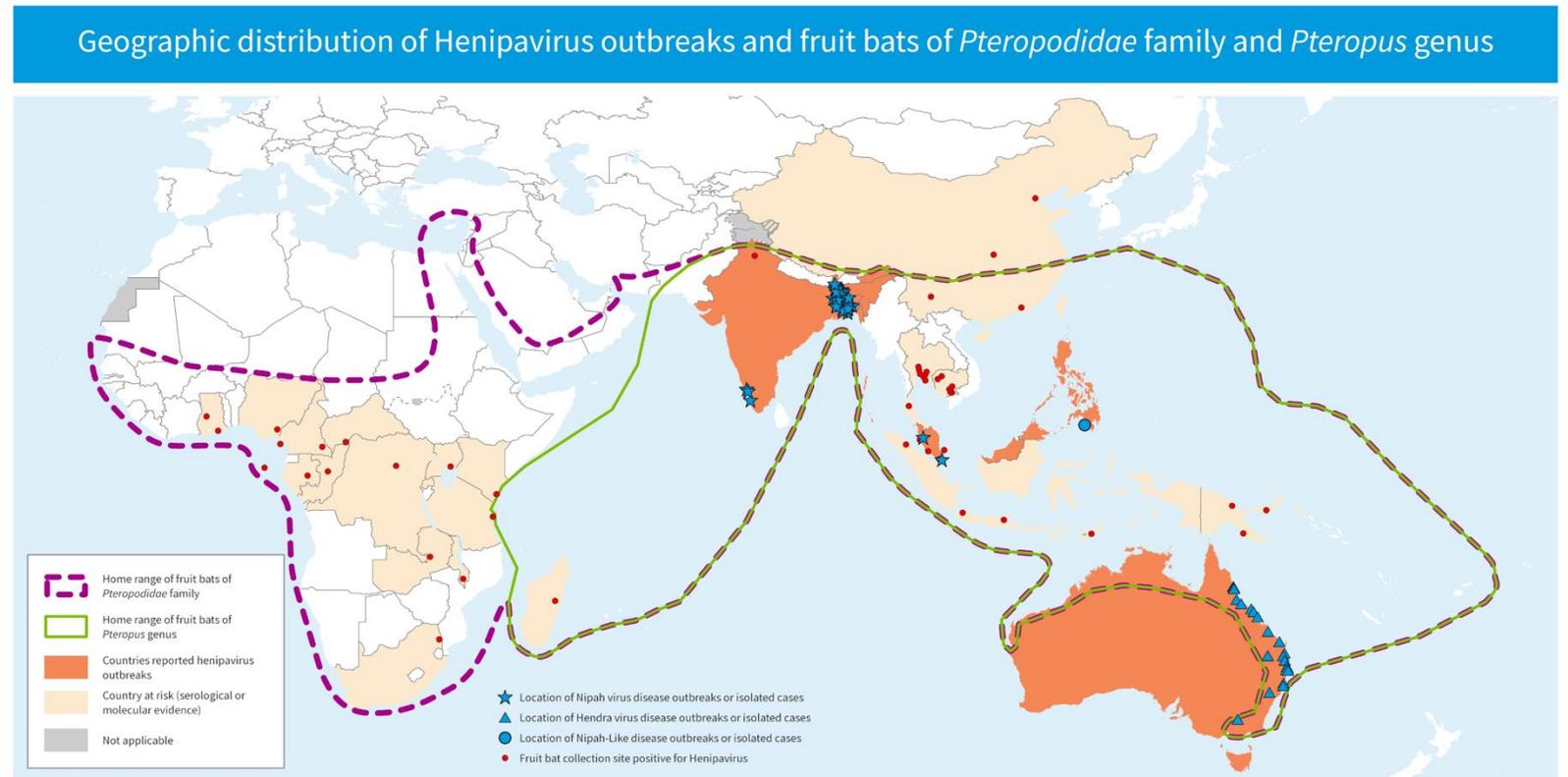
マレーシア、バングラデシュ、インド  
など

- ヘンドラウイルス感染症 (▲)

オーストラリア

## ヒトヒト感染

ニパウイルスはヒトヒト感染が報告されており、WHOにパンデミックを起こしうる病原体として警戒されている



The designations employed and the presentation of the material in this publication do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of WHO concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted and dashed lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement.

Data Source: World Health Organization  
Map Production: WHO Health Emergencies Programme  
Request ID: RITM00110  
Map date: 25 January 2024

# ニパウイルス感染症の問題点と研究の目的

## ニパウイルス感染症の問題点

- ニパウイルス感染症には極めて高い致死率を示すのにもかかわらず、検査法も確立されておらず、特異的治療法やワクチンが存在しない

## 研究の目的

ニパウイルス感染症の制御を目的として、新規ワクチン開発に向けた技術基盤の創出と新規抗原設計を実施する

# ニパウイルス (NiV) の基本構造

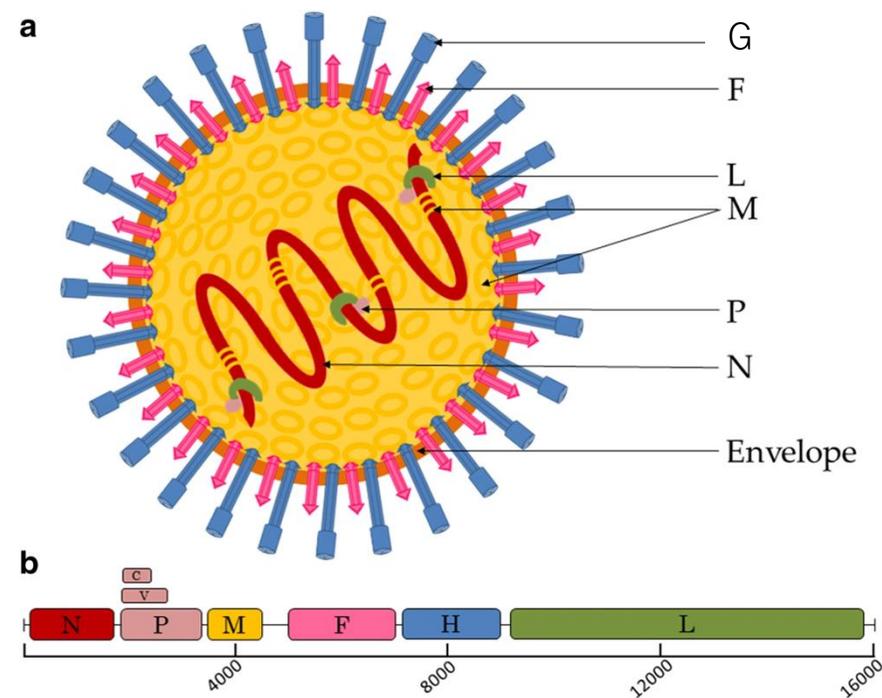
2つのスパイクタンパク質がワクチン抗原の主要な標的である

## レセプター結合タンパク質

- Gタンパク質 (NiV-G) と呼び、細胞の**Ephrin B2/B3**と結合する

## Fタンパク質 (Fusion Protein)

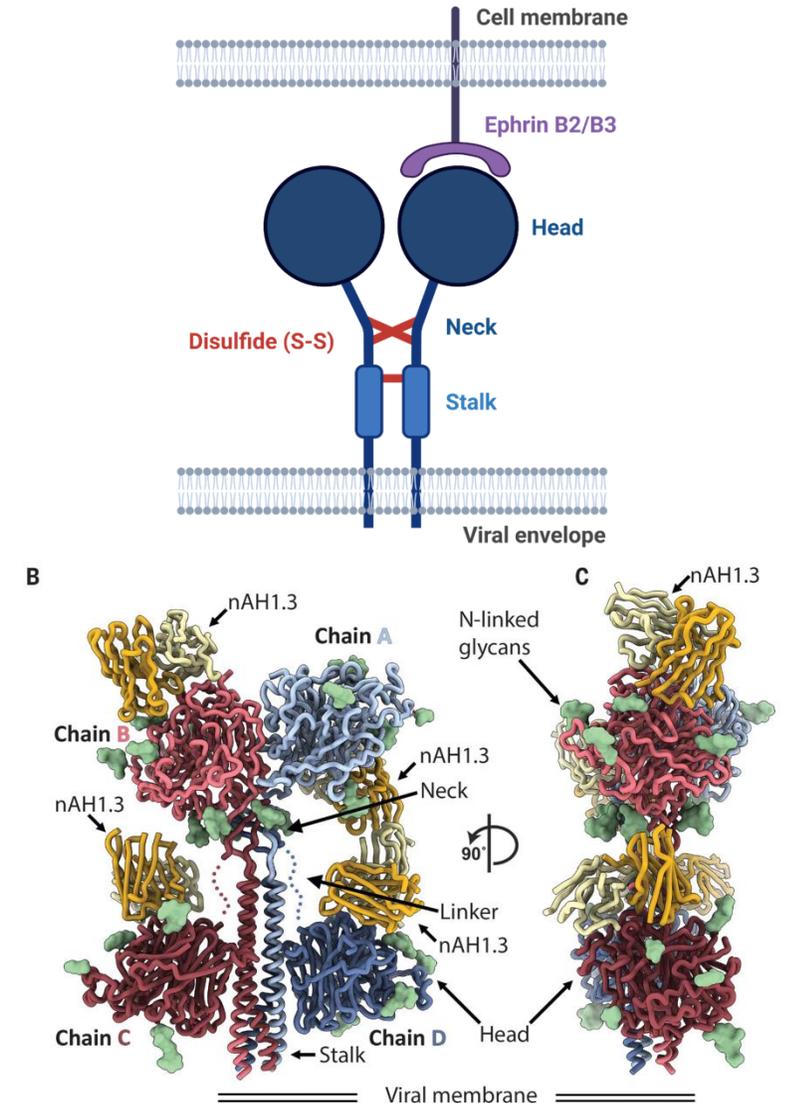
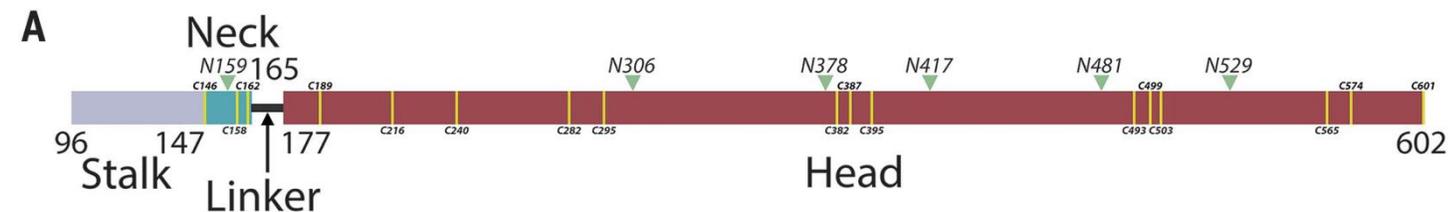
- 構造的に不安定でPre-FusionとPost-Fusionの2つの構造をとる
- ウイルスが細胞に結合するとPre→Postに形態変化を起こし、細胞膜と融合する



# NiV-Gの構造

- NiVGは**四量体を形成するII型膜タンパク質**である
- 各サブユニットは同一アミノ酸配列であるが、向きが異なっており、NiVは2つのサブユニットが上を向いており、Hostの受容体である**EphrinB2 (EB2)**と結合する
- NiV-GはNeck領域で多量体間に二重のジスルフィド結合 (S-S結合) が存在し、強固に固定されている
- Stalk領域にも多量体間のジスルフィド結合 (S-S結合) が1か所存在する

Wang Z, Amaya M, Addetia A, et al. *Science*. 2022;375(6587):1373-1378.

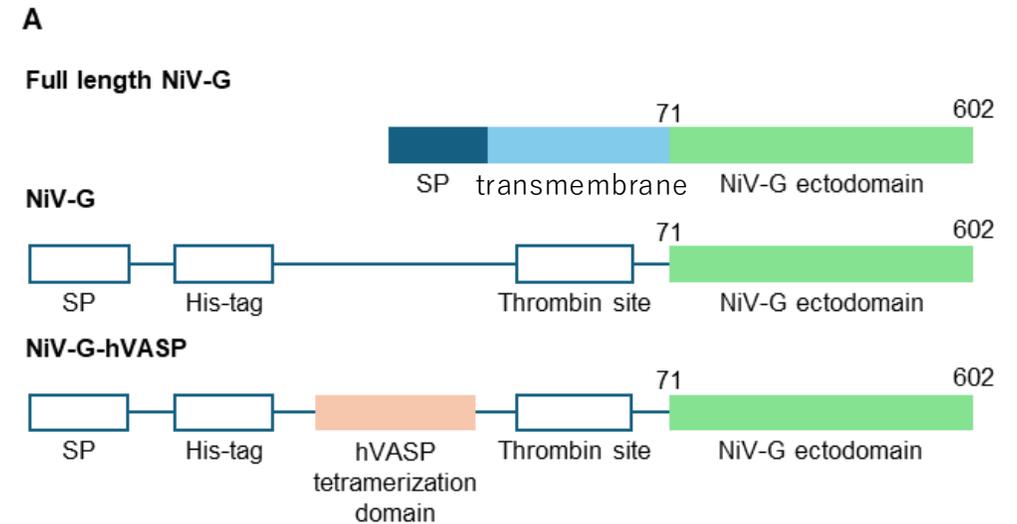


# 四量体構造安定型組換えNiV-Gタンパク質のデザイン

- 従来型組換えNiV-Gと新規組換えNiV-G-hVASPを設計
- インフルエンザ組換えNAで用いられるhVASP (Vasodilator-stimulated phosphoprotein) tetramerization domainを導入した組換えNiV-G (**NiV-G-hVASP**) を新規に設計

Kuhnel K, Jarchau T, Wolf E, Schlichting I, Walter U, Wittinghofer A, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(49):17027–32.

Xu X, Zhu X, Dwek RA, Stevens J, Wilson IA. J Virol. 2008;82(21):10493–501.



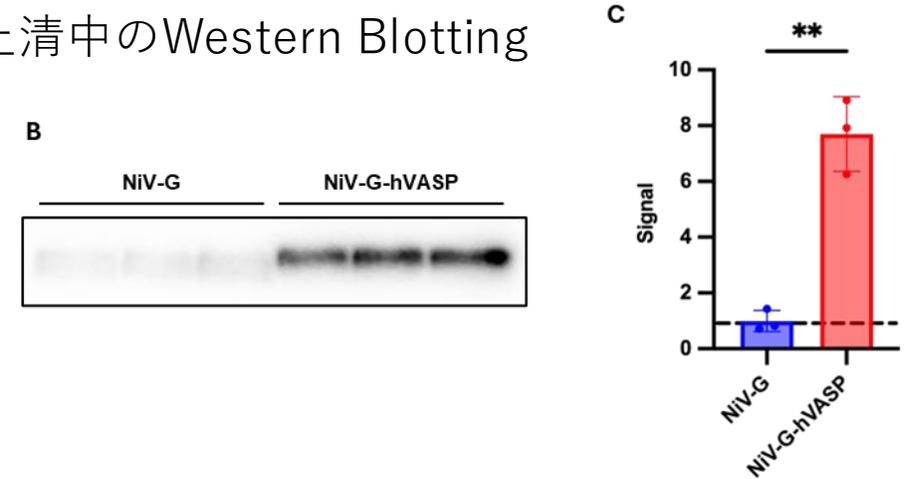
**Fig. 1. Enhanced expression yield of recombinant NiV-G-hVASP compared with conventional NiV-G.**

(A) Schematic representation of full-length NiV-G, recombinant NiV-G, and recombinant NiV-G-hVASP construct.

# NiV-G-hVASPは哺乳類細胞において発現量が増加する

- HEK293T細胞にトランスフェクションさせて培養上清のウエスタンブロットで発現量を比較
- 細胞培養上清のNiV-G発現量は明らかな差を認めた (Fig. 1B,C)

## 上清中のWestern Blotting



**Fig. 1. Enhanced expression yield of recombinant NiV-G-hVASP compared with conventional NiV-G.**

(B) Expression levels in HEK293T cell supernatants collected 3 days post-transfection were analyzed by Western blot (n = 3).

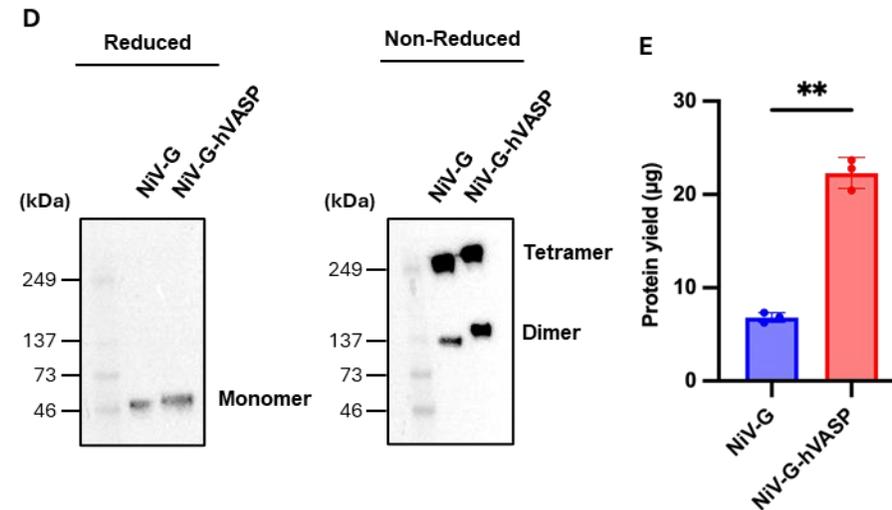
(C) Quantification of Western blot band intensities in (B), normalized to NiV-G (set to 1).

Data in (C), (E), and (F) are presented as mean  $\pm$  SD (n = 3). Unpaired two-tailed Welch's t-test was performed: \*p < 0.05, \*\*p < 0.01; ns, not significant.

# NiV-G-hVASPは哺乳類細胞において発現量が増加する

- 精製物は還元条件で単量体、非還元条件で二量体および四量体で存在していることがわかった (Fig. 1D)

## 精製物のWestern Blotting



**Fig. 1. Enhanced expression yield of recombinant NiV-G-hVASP compared with conventional NiV-G.**

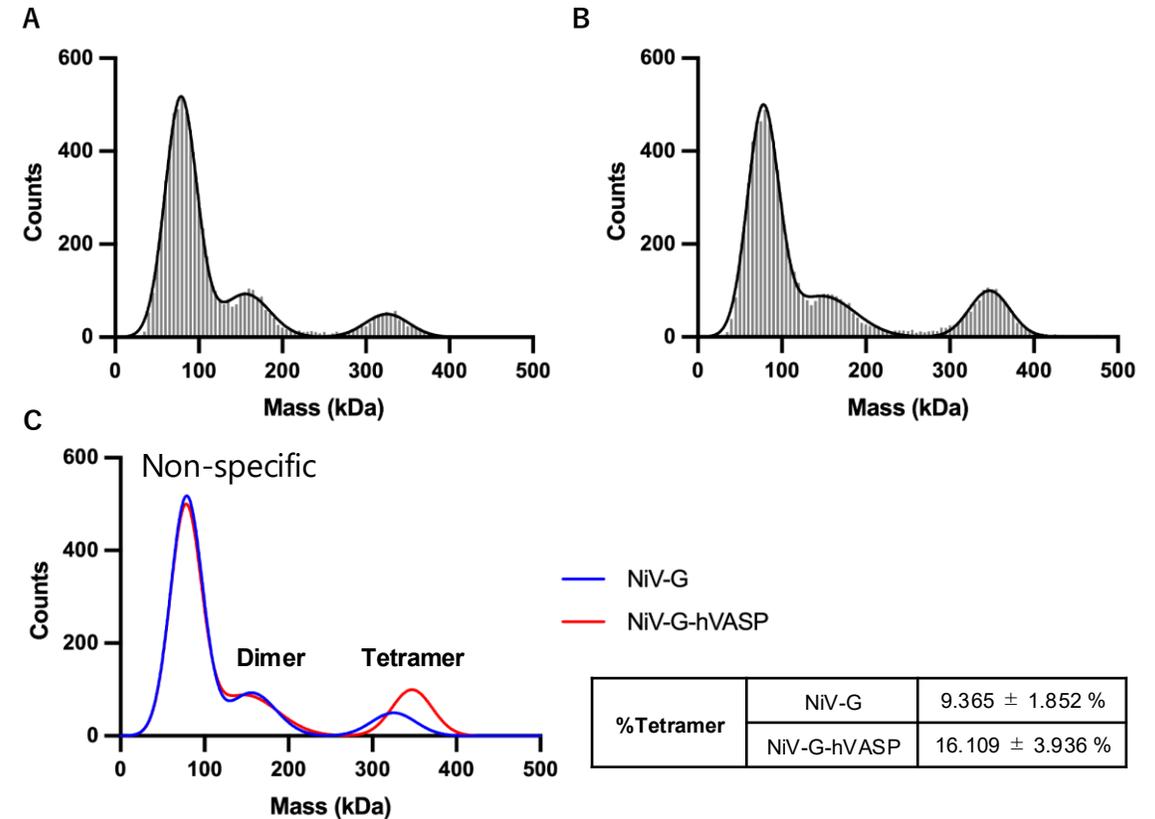
(E) Total recombinant protein amounts in purified samples were quantified by SDS-PAGE with BSA standards.

Data in (C) and (E) are presented as mean  $\pm$  SD (n = 3). Unpaired two-tailed Welch's t-test was performed:

\*p < 0.05, \*\*p < 0.01; ns, not significant.

# NiV-G-hVASPは四量体の割合が増加する

- タンパク質がnaiveな状態で四量体がどれくらい存在するかをMass photometry法 (Refyne) で解析した (Fig. 3A, B)
- hVASP融合によりnaiveな四量体が増加することがわかった (Fig. 3C)



**Fig. 3. hVASP fusion increases the proportion of tetrameric NiV-G assemblies.**

(A) Mass photometry analysis of conventional NiV-G.

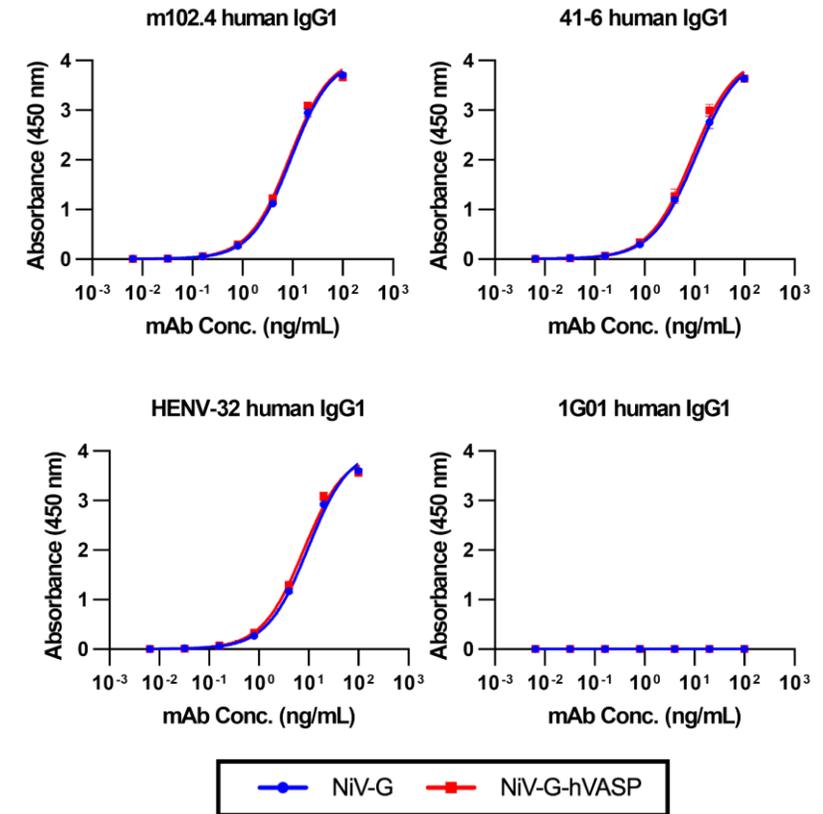
(B) Mass photometry analysis of NiV-G-hVASP.

(C) Summary of tetramer ratios calculated from the AUC of the tetramer peak.

Measurements in (A)–(C) were independently repeated three times, and results were averaged for display.

# NiV-G-hVASPはモノクローナル抗体との反応性を維持している

- NiV-G-hVASPが抗原性を維持しているのを確認する目的で異なるエピトープを認識するNiV-G特異抗体m102.4、41-6、HENV-32との反応性を検証した
- いずれもNiV-GとNiV-G-hVASPで反応性に差を認めず、抗原性が維持されていることがわかった

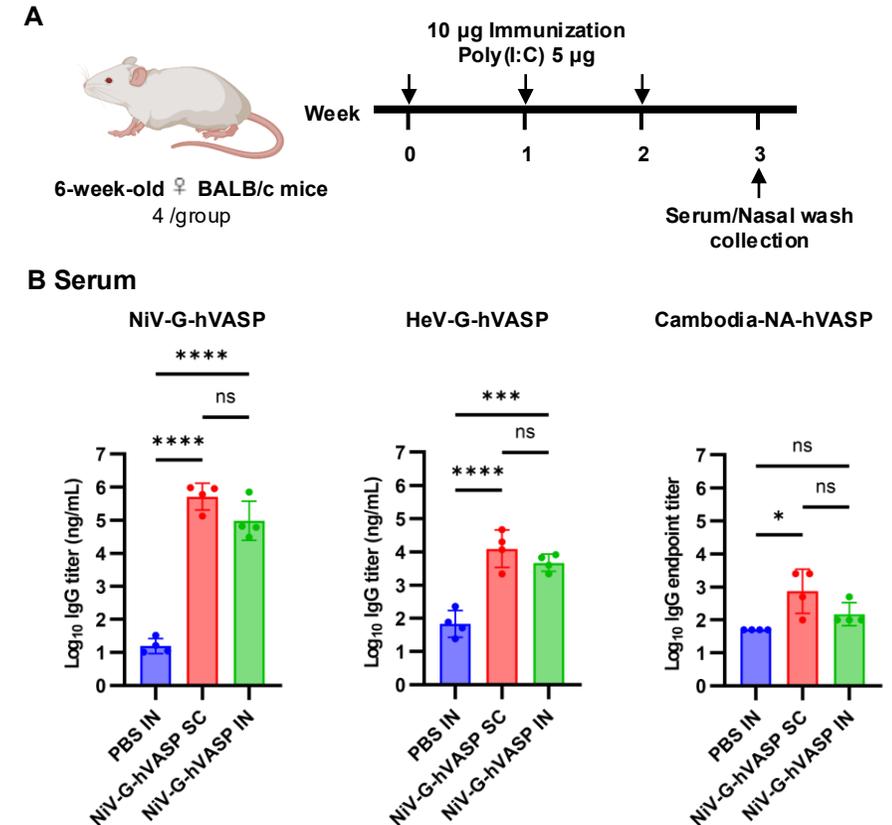
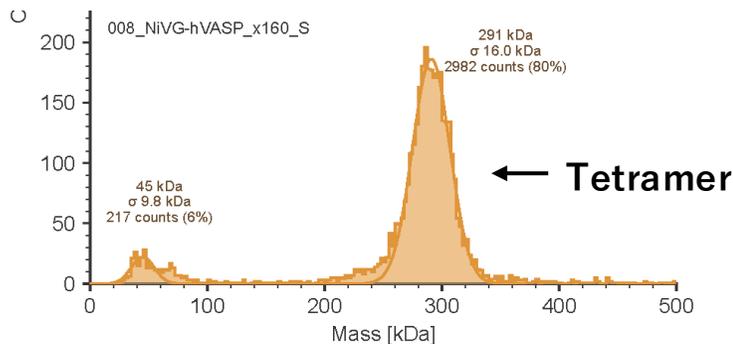


**Fig. 2. Comparable binding reactivity of NiV-G-hVASP and NiV-G to NiV-G-specific monoclonal antibodies.**

Binding of recombinant NiV-G and NiV-G-hVASP to human monoclonal antibodies m102.4, 41-6, and HENV-32 was assessed by indirect ELISA. Influenza NA-specific antibody 1G01 served as a non-specific control.

# NiV-G-hVASPは皮下及び経鼻接種において血清中にIgG抗体を誘導する

- BALB/cマウスをNiV-G-hVASP（アジュバント：Poly(I:C)）で皮下、経鼻で免疫し、血清IgGを調べた
- NiV-G-hVASPに対する抗体誘導が確認できた
- HeV-G-hVASPへの交差反応を示す抗体の誘導も確認できた
- hVASPドメインに誘導された抗体を調べるために無関係のインフルエンザNA-hVASPとの反応性も検証したが、hVASPドメインへの抗体誘導は限定的だった



**Fig. 4. NiV-G-hVASP elicits strong systemic and mucosal antibody responses via subcutaneous and intranasal immunization.**

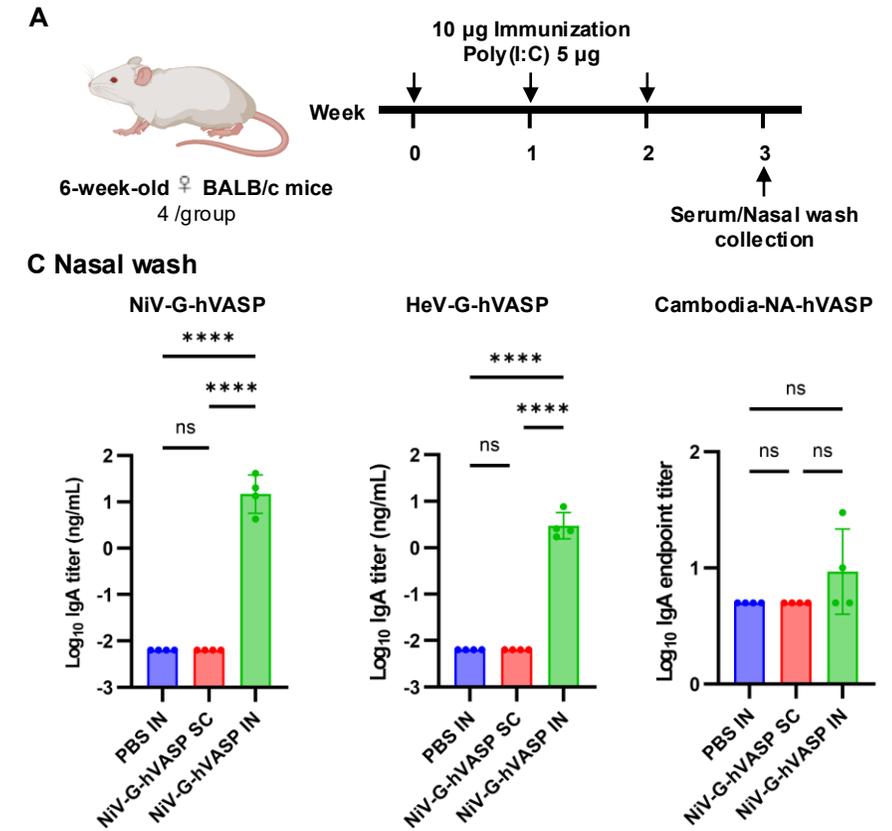
(A) Mouse immunization schedule.

(B) Serum IgG responses to NiV-G-hVASP, HeV-G-hVASP, and Cambodia-NA-hVASP. NiV-G-hVASP and HeV-G-hVASP IgG were quantified relative to m102.4 mouse IgG1. Cambodia-NA-hVASP responses are shown as endpoint titers.

Data in (B) and (C) are presented as mean ± SD (n = 4). One-way ANOVA was performed: \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001; ns, not significant.

# NiV-G-hVASPの経鼻接種のみ、鼻腔中にIgA抗体を誘導する

- 鼻腔洗浄液IgAも同様に調べた
- 経鼻接種群でのみ、NiV-G-hVASP、HeV-G-hVASPに反応を示すIgAの誘導が確認できた
- インフルエンザNA-hVASPとの反応性は認めず、hVASPドメインへのIgA誘導はないと考えられた



**Fig. 4. NiV-G-hVASP elicits strong systemic and mucosal antibody responses via subcutaneous and intranasal immunization.**

(A) Mouse immunization schedule.

(C) Nasal IgA responses against the same antigens. IgA responses to NiV-G-hVASP and HeV-G-hVASP were quantified relative to m102.4 mouse IgA; Cambodia-NA-hVASP responses are shown as endpoint titers.

Data in (B) and (C) are presented as mean  $\pm$  SD (n = 4). One-way ANOVA was performed: \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001; ns, not significant.

# まとめ

---

- ✓ NiV-G と hVASP の融合により NiV-G の四量体構造が安定化され、タンパク質収量が向上した。
- ✓ NiV-G-hVASP はエピトープを維持し、マウスにおいて NiV-G 反応性抗体を誘導した。
- ✓ NiV-G-hVASP 誘導抗体は、ヘンドラウイルス (HeV) G タンパク質に対しても交差反応性を示した。

現在、構造改変型NiV-G-hVASPを新たに設計し、ワクチン抗原としての評価を実施中である。