

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業
「新型インフルエンザ用ワクチンの有効性・安全性確保に関する研究」
分担研究報告書

リバーシジェネティクス法による新型インフルエンザワクチン株の作出に使用する
細胞バンクの構築

分担研究者：水野喬介 （財）化学及血清療法研究所

研究要旨 新型インフルエンザの汎流行に際するワクチン製造にあたっては、リバーシジェネティクス (RG) 法によってワクチン製造用の弱毒化種ウイルスを作出することが効率的である。本研究は、①国立感染症研究所 (感染研) が実施する RG 法の確立に当たり、化学及血清療法研究所 (化血研) が所有する Vero 細胞から派生したクローンの樹立・供給と、その他の候補細胞あるいは新たに ATCC(the American Type Culture Collection)より入手する細胞株を感染研へ供給する、②上記細胞株のうち、満足のいく効率を示した細胞株について、マスター及びワーキングセルバンクを調製する、③調製したバンクに関して、感染研と共同で安全性試験を立案し試験を実施する、ことを目的とした。

Vero 細胞については、RG 効率の良い細胞クローン作出のため、クローニング及び無血清馴化クローンの作出を行い、感染研へ供給した。Vero 細胞以外の細胞において、LLC-MK2 Derivative が RG の効率が良いとの感染研の成績より、LLC-MK2 Derivative 細胞のマスター及びワーキングセルバンクの作製を行った。LLC-MK2 Derivative については、感染研と協議し安全性試験を開始した。

A. 研究目的

新型インフルエンザの汎流行が起こった場合、従来のインフルエンザワクチンの製造手順では迅速な対応は困難である。リバーシジェネティクス (RG) 法を用いたワクチン用株の作出が最も効率的であり、国立感染症研究所 (感染研) において RG 法の確立が行われている。本研究は、この RG 法に適した細胞株の検討とその細胞のバンク作製及び、安全性試験を実施することである。

新型インフルエンザ用ワクチンの作製に RG 法を用いる場合、Vero 細胞が至適とされている。本研究においては、化学及血清療法研究所 (化血研)

が所有するワクチン製造用 Vero 細胞をクローニングし、RG 効率がより良い Vero 細胞クローンの選択を行い、感染研が入手した Vero 細胞以外の細胞について RG 効率の検討のための培養を行い感染研へ供給すると共に、効率の良かった細胞株のセルバンクの作製を行い、セルバンクの安全性試験を実施することを目的とした。

B. 研究方法

1. Vero 細胞クローンの作出

化血研で調製・保管している Vero 細胞のワーキングセルバンクを出発材料として、限界

希釈法によって血清含有培地及び無血清培地で増殖する Vero 細胞クローンの作出を行った。作出したクローンは凍結保存を行い、別途培養して感染研へ供給した。

2. 化血研で保存されていた細胞クローン

化血研で以前に作出して凍結保存されていた Vero C1-11、Vero C6-2 細胞クローンを培養して、感染研へ供給した。

3. 感染研が American Tissue Culture Collection (ATCC) より入手したサル由来細胞株

RG 技術確立において、感染研では Vero 細胞以外の細胞を用いた検討も実施された。感染研が ATCC から入手した以下の細胞について培養、拡張し感染研へ供給するとともに、培養した細胞は別途凍結保存を行った。

LLC-MK2 Original (ATCC CCL-7)、LLC-MK2 Derivative (ATCC CCL-7.1)、BS-C-1 (ATCC CCL-26)、CV-1 (ATCC CCL-70)

4. LLC-MK2 Derivative 細胞のセルバンクの調製

感染研での RG 法によるウイルスレスキュー効率の検討の結果、LLC-MK2 Derivative 細胞でもっとも高率に組み換えウイルスが産生されることが明らかとなった。現在 RG によるインフルエンザウイルスの作出は Vero 細胞が至適とされているが、Vero 細胞のみで技術を確立することは危険であり、Vero 細胞のバックアップの位置付けとして、LLC-MK2 Derivative 細胞も RG 用細胞としてセルバンクを作製することとした。

5. LLC-MK2 Derivative 細胞の安全性試験

ATCC では RG 用細胞として各種安全性情報を添付した Vero 細胞を準備中との情報が得られ、Vero 細胞のバックアップの位置付けと

する LLC-MK2 Derivative 細胞も ICH ガイドライン (Q5A、Q5D) を参考に特性解析試験、純度試験、核型分析、造腫瘍性試験等の安全性情報に関する試験を実施することとした。

(倫理面への配慮)

本研究の研究対象はすべて既に樹立されている細胞株を出発材料としており、倫理面の問題は無いと判断した。

C. 研究結果

1. Vero 細胞クローンの作出

①血清含有培地及び無血清培地を用いて限界希釈法による Vero 細胞のクローニングを行った。96well 培養プレートに 2 cells/well、1 cell/well、0.5cell/well となるように播種して培養し、増殖がみられた well の細胞は継代拡張培養を行った。その結果、血清含有培地で増殖するクローンは 31 種、無血清培地で増殖するクローンは 75 種得られた。

②上記で得られたすべての Vero 細胞クローンを凍結保存した。

③血清含有培地で増殖する Vero 細胞クローンのうち増殖性の良い 5 種、同じく無血清培地で増殖する Vero 細胞クローンの 12 種を別途培養し、感染研へ供給した。

結果：ウイルスレスキュー効率の良い細胞クローンは無かったとの報告を受けた。

2. 化血研で保存されていた細胞クローン

①化血研で以前に作出して保存されていた Vero C1-11、Vero C6-2 細胞クローンを復元培養し、感染研へ供給した。

結果：ウイルスレスキュー効率の良い細胞クローンは無かったとの報告を受けた。

3. 感染研が ATCC より入手したサル由来細胞株

①感染研が ATCC へ分与申請したサル由来細胞

胞株は、一旦感染研が受領した後、未開封の状態では血研へ再送付された。これらの細胞株を復元培養し、凍結保存した。

②別途培養して、感染研へ供給した。

4. RG 法によるウイルスレスキュー効率の検討

①感染研において、供給した上記細胞株での RG 法によるウイルスレスキュー効率の検討が実施された。その結果、LLC-MK2 Original、及び LLC-MK2 Derivative 細胞で効率的なウイルスレスキューが認められた。LLC-MK2 Derivative 細胞は、再現性も確認された。

②上記の検討結果、及び細胞の増殖性を基に、LLC-MK2 Derivative 細胞を Vero 細胞のバックアップとしてセルバンクを作製することとした。

5. LLC-MK2 Derivative 細胞のセルバンクの調製

①治験薬製造の構造設備を使用して、GMP 基準に準じたセルバンクを調製し、マスターセルバンク 162 本を調製した。マスターセルバンクは、気相式液体窒素保存容器にて保管・管理した。

②同様の方法で、ワーキングセルバンク 162 本を調製した。ワーキングセルバンクは、気相式液体窒素保存容器にて保管・管理した。

6. LLC-MK2 Derivative 細胞の安全性試験

①調製したマスター及びワーキングセルバンクについて、ICH ガイドライン (Q5A、Q5D) を参考に特性解析試験、純度試験、核型分析、造腫瘍性試験等試験を英国 BioReliance 社に依頼した。試験項目は以下の通りである。

1) マスターセルバンク

- Qualification of test article material for sterility by direct inoculation method
- Sterility testing by direct inoculation method

- Mycoplasma Detection EP
 - Other services (Mycobacterium)
 - Transmission Electron Microscopic Examination of Cell Culture (200 cell profiles)
 - Fluorescent Product Enhanced Reverse Transcriptase (FPERT) assay
 - 28Day In Vitro assay for the Detection Viral Contaminants – 3 detector cell lines (MRC-5, Vero, BCS)
 - In Vivo assay for cell substrates according to EP requirements
 - Q-PCR detection of a range of human viruses (CBER PTC and CPMP)
 - Q-PCR detection of Bovine polyomavirus (BPyV)
 - Q-PCR detection of Bovine/porcine circovirus
 - PCR detection of Simian Immunodeficiency Virus (SIV)
 - Other Services (Karyology)
 - Identification and Characterisation of Cultured Cells By Analysis of 4 Isoenzymes
 - In vivo tumorigenicity (FDA points to Consider 1993)
 - Detection of viral contaminants in Bovine serum according to CPMP and US 9CFR requirements
 - In vitro assay for the detection of Porcine viruses according to 9CFR
- ##### 2) ワーキングセルバンク
- Qualification of test article material for sterility by direct inoculation method
 - Sterility testing by direct inoculation method
 - Mycoplasma Detection EP

・ Identification and Characterisation of Cultured Cells By Analysis of 4 Isoenzymes

②これら試験項目の中には、試験期間が長期にわたるものが含まれており、最終的な試験報告書が入手できるのは、H17年10月の予定である。

D. 考察

クローニングした Vero 細胞については、ウイルスレスキュー効率の良い細胞は得られなかった。しかし、検討の後も感染研において、RG 技術の改良が検討され、これによってウイルスレスキュー効率を高めることにより、現在保有している Vero 細胞クローンでも使用可能になる可能性が期待される。特に無血清馴化クローンは、安全性の面からも今後候補となり得る可能性を持っていることから、RG 技術の改良が望まれる。

一方、Vero 細胞については、ATCC が新型インフルエンザワクチンを想定した RG 用細胞として、各種の安全性試験を実施した Vero 細胞を H17 年中に市販するという情報もある。この細胞株が入手可能となった際には、RG 用のセルバンクの一つとして検討を予定している。

現在、WHO は RG 技術による新型インフルエンザワクチンの開発には Vero 細胞を推奨しているが、プラスミドの取り込み効率のより高い細胞株を検索し、それをを用いたセルバンクの構築を行うことにより、RG 法に用いる細胞株の選択肢を広げることが可能となる。本研究においては、Vero 細胞の検討と並行して LLC-MK2 Derivative 細胞のウイルスレスキュー効率についても検討し、組み換えウイルス回収効率が Vero 細胞より数十倍高いことを確認した。そこで、LLC-MK2 Derivative 細胞についてマスター及びワーキングセルバンクを治験薬製造設備内にて作製した。現在各種試験中であり最終的な結論は

出ていないが、安全性に問題がなければ LLC-MK2 Derivative 細胞のセルバンクシステムは、新型インフルエンザワクチンの種ウイルス作出の際に使用される Vero 細胞のバックアップとして、リスク分散の意味からも重要な位置付けとなり得る。

E. 結論

本研究において、RG 用細胞として Vero 細胞以外に LLC-MK2 Derivative 細胞を用いることができる可能性が明らかとなった。

LLC-MK2 Derivative 細胞についてマスター及びワーキングセルバンクを作製した。

このセルバンクについて細胞特性、安全性試験が進行中である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	頁	出版年
Masaki Imai, Shinji Watanabe, Ai Ninomiya, Masatsugu Obuchi and <u>Takato Odagiri</u>	Influenza B virus BM2 protein is a crucial component for incorporation of viral ribonucleoprotein complex into virions during virus assembly.	J. Virol.	78	11007-11015	2004
Takahiko Saito, Yoko Nakaya, Takashi Suzuki, Reiko Ito, Toshinori Saito, Hiroyuki Saito, Shinichi Takao, Keiji Sahara, <u>Takato Odagiri</u> , Takeomi Murata, Taiichi Usui, Yasuo Suzuki and Masato Tashiro	Antigenic alteration of influenza B virus associated with loss of a glycosylation site due to host-cell adaptation.	J. Med. Virol.	74	336-343	2004
Naomi Takasuka, Hideki Fujii, Yoshimasa Takahashi, Masataka Kasai, Shigeru Morikawa, Shigeyuki Itamura, Koji Ishii, Msahiro Sakaguchi, Kazuo Ohnishi, Masamichi Ohshima, Shu-ichi Hashimoto, <u>Takato Odagiri</u> , Masato Tashiro, Hiroshi Yoshikura, Toshinori Takemori, Tasuko Tsunetsugu- Yokota	A subcutaneously injected UV-inactivated SARS coronavirus vaccine elicits systemic humoral immunity in mice.	International Immunol.	16	1423-1430	2004
Saito, T., W. Lim, and <u>M. Tashiro.</u>	Attenuation of a human H9N2 influenza virus in mammalian host by reassortment with an avian influenza virus.	Arch. Virol	149	1397-1407	2004
Saito, T., Nakaya, Y., Suzuki, T., Ito, R., Saito, T., Saito, H., Takao, S., Sahara, K., Odagiri, T., Murata, T., Usui, T., Suzuki, Y., and <u>Tashiro, M. Kida H.</u>	Antigenic alteration of influenza B virus associated with loss of a glycosylation site due to host-cell adaptation.	J. Med. Virol.	74	336-343	2004
T. Iwasaki, S. Itamura, H. Nishimura, Y. Sato,	Productive infection in the murine central nervous system with avian	Acta Neurapat	108	485-492	2004

M. Tashiro, T. Hashikawa, T. Kurata	influenza A (H5N1) after intranasal inoculation	hol			
Hatta M, Goto H, <u>Kawaoka Y</u>	Influenza B virus requires BM2 protein for replication.	J Virol.	78	5576-83	2004
Horimoto T, Takada A, Iwatsuki-Horimoto K, <u>Kawaoka Y.</u>	A protective immune response in mice to viral components other than hemagglutinin in a live influenza A virus vaccine	Vaccine	22	2244-7	2004
Horimoto T, Iwatsuki-Horimoto K, Hatta M, <u>Kawaoka Y</u>	Influenza A viruses possessing type B hemagglutinin and neuraminidase: potential as vaccine components	Microbes Infect.	6	579-83	2004
Neumann G, <u>Kawaoka Y.</u>	Reverse genetics systems for the generation of segmented negative-sense RNA viruses entirely from cloned cDNA.	Curr Top Microbiol Immunol.	283	43-60	2004
Iwatsuki-Horimoto K, Horimoto T, Fujii Y, <u>Kawaoka Y</u>	Generation of influenza A virus NS2 (NEP) mutants with an altered nuclear export signal sequence.	J Virol.	78	10149-55	2004
Kiso M, Mitamura K, Sakai-Tagawa Y, Shiraishi K, Kawakami C, Kimura K, Hayden FG, Sugaya N, <u>Kawaoka Y</u>	Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir	Lancet	364	759-65	2004
Kobasa D, Takada A, Shinya K, Hatta M, Halfmann P, Theriault S, Suzuki H, Nishimura H, Mitamura K, Sugaya N, Usui T, Murata T, Maeda Y, Watanabe S, Suresh M, Suzuki T, Suzuki Y, Feldmann H, <u>Kawaoka Y</u>	Enhanced virulence of influenza A viruses with the haemagglutinin of the 1918 pandemic virus.	Nature	431	703-7	2004
Mase M, Tsukamoto K, Imada T, Imai K, Tanimura N, Nakamura K, Yamamoto Y, Hitomi T, Kira T, Nakai T, Kiso M, Horimoto T, <u>Kawaoka Y, Yamaguchi S</u>	Characterization of H5N1 influenza A viruses isolated during the 2003-2004 influenza outbreaks in Japan.	Virology	332	167-76	2004
Fujii K, Fujii Y, Noda T, Muramoto Y, Watanabe T, Takada A, Goto H, Horimoto T, <u>Kawaoka Y</u>	Importance of both the Coding and the Segment-Specific Noncoding Regions of the Influenza A Virus NS Segment for Its Efficient Incorporation into Virions.	J Virol.	79	3766-74	2004

Imai M., Watanabe S., Ninomiya A., Obuchi M., Odagiri T.	Influenza B virus BM2 protein is a crucial component for incorporation of viral ribonucleoprotein complex into virion during virus assembly	J. Virol.	78	11007 -1100 7	2004
Ohishi K, Kishida N, <u>Ninomiya A</u> , Kida H, Takada Y, Miyazaki N, Boltunov AN, Maruyama T	Antibodies to Human-Related H3 Influenza A Virus in Baikal Seals (<i>Phoca sibirica</i>) and Ringed Seals (<i>Phoca hispida</i>) in Russia.	Microbiol Immunol	48	905-9 09	2004
Imai M, Watanabe S, <u>Ninomiya A</u> , Obuchi M, Odagiri T	Influenza B virus BM2 protein is a crucial component for incorporation of viral ribonucleoprotein complex into virions during virus assembly	J Virol	78	11007 -1101 5	2004
Takahashi H, Sawa H, <u>Hasegawa H</u> , Nagashima K, Sata T, Kurata T	Topoisomerase I dissociates human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase from genomic RNAs.	Biochem Biophys Res Commun	23	1073- 8	2004
Ueno T, Tokunaga K, Sawa H, Maeda M, Chiba J, Kojima A, <u>Hasegawa H</u> , Shoya Y, Sata T, Kurata T, Takahashi H.	Nucleolin and the Packaging Signal, Ψ , Promote the Budding of Human Immunodeficiency Virus Type-1 (HIV-1)	Microbiol Immunol.	48	111-8	2004
<u>Hasegawa H</u> , Katano H, Tanno M, Masuo S, Ae T, Sato Y, Takahashi H, Iwasaki T, Kurata T, Sata T	BCL-6-positive Human Herpesvirus 8-associated Solid Lymphoma Arising from Liver and Spleen as Multiple Nodular Lesions.	Leuk Lymphoma	45	2169- 72	2004
Nagata N, Iwasaki T, Ami Y, Tano Y, Harashima A, Suzaki Y, Sato Y, <u>Hasegawa H</u> , Sata T, Miyamura T, Shimizu H.	Differential localization of neurons susceptible to enterovirus 71 and poliovirus type 1 in the central nervous system of cynomolgus monkeys after intravenous inoculation.	J Gen Virol.	85	2981- 9	2004
<u>Hasegawa H</u> , Ichinohe T, Strong P, Watanabe I, Ito S, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T	Protection against influenza virus infection by intranasal administration of HA vaccine with chitin microparticles as an adjuvant.	Journal of Medical Virology	75	130-1 36	2004

Ichinohe T, Watanabe I, Ito S, Fujii H, Moriyama M, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, and <u>Hasegawa H*</u> ,	Synthetic double-stranded RNA [poly (I:C)] combined with mucosal vaccine protects against influenza virus infection.	Journal of Virology	79	2910-9	2004
神谷 齊	ワクチンの開発と今後の方向性.	臨床検査感染症	48	361-362	2004
神谷 齊	インフルエンザ	小児感染	61	259-264	2004
神谷 齊	2001/2002 年の三重県における乳幼児に対するインフルエンザ HA ワクチンの有効性と安全性.	免疫 愛知県小	16	11-20	2004
神谷 齊	予防接種の現状と今後の方向	児科医会 会報	80		2004
神谷 齊	小児の感染症を予防するための混合ワクチン	小児科診療	67	2020-2025	2004