

201123059A

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

細胞培養インフルエンザワクチンの実用化および流行予測と  
ワクチン株選定に関する研究

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 田代真人

平成 24 年(2012)3 月

## 目次

平成 23 年度 細胞培養インフルエンザワクチンの実用化および流行予測とワクチン株選定に関する研究

<b>I</b>	<b>総括研究報告書</b>	研究代表者 田代真人	P. 1
<b>II</b>	<b>分担研究報告書</b>		
1.	国内外の流行株の収集と性状解析	研究分担者 小田切孝人	P. 18
2.	血清学的調査によるワクチンの交叉反応性の評価	研究分担者 岸田典子	P. 20
3.	新規機能的遺伝子解析法の構築と流行株遺伝子解析	研究分担者 藤崎誠一郎	P. 23
4.	細胞培養法による分離ウイルスの抗原的安定性についての解析	研究分担者 原田勇一	P. 26
5.	細胞培養法による分離ウイルスの遺伝的安定性についての解析	研究分担者 高橋 仁	P. 29
6.	細胞培養ワクチンに適合したリバーシジェネティクス法の開発	研究分担者 信澤枝里	P. 32
7.	細胞培養によるウイルス分離効率の解析、および分離ウイルスの増殖効率、抗原性、 遺伝的安定性、安全性等の検討	研究分担者 浅沼秀樹	P. 35
8.	シードウイルス製造用セルバンク及び迷入ウイルス検出系の構築	研究分担者 山本典生	P. 46
9.	細胞培養法によるウイルス分離効率の検討	研究分担者 中村一哉	P. 53
10.	ウイルスの増殖性に関する因子の解析とウイルス増殖性が向上した新規 MDCK 細胞 の開発に関する研究	研究分担者 浜本いつき	P. 56
<b>III</b>	<b>成果刊行物</b>		P. 60
<b>iv</b>	<b>添付資料 1.</b>	・ Information for WHO Annual Consultation on the Composition of Influenza Vaccine in the Northern Hemisphere ・ Supplement data by NIID ・ Information for WHO Annual Consultation on the Composition of Influenza Vaccine in the Southern Hemisphere ・ Supplement data by NIID	P. 1- 54 P. 1-10 P. 1-50 P. 1-11
	<b>添付資料 2.</b>	WER (P. 81-91、P. 457-468)、病原微生物検出情報月報 (P. 1, 4-10, 13-15)	
	<b>添付資料 3.</b>	細胞培養インフルエンザワクチンの安全性に関する Points to Consider (案) 2011	P. 1-46
	<b>添付資料 4.</b>	細胞培養法による新型インフルエンザワクチン製造におけるバイオ セーフティ対策	P. 1-33

## 細胞培養インフルエンザワクチンの実用化および流行予測と ワクチン株選定に関する研究

研究代表者 田代真人

国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター センター長

**研究要旨** ①国および WHO のインフルエンザ対策・インフルエンザワクチン政策の基本資料となるサーベイランス活動およびその情報の収集、解析、評価、政策提言に関する研究を実施した。地方衛生研究所および WHO 世界インフルエンザ監視対応体制 (GISRS) の中核研究機関として、国内外の流行株の収集と抗原解析、遺伝子解析、抗ウイルス剤性状解析等を検討した。2011/12 シーズンの流行株のサーベイランスの結果、2011/12 シーズンワクチン株に、A/California/7/2009 (H1N1) pdm09 (X-179A)、A/Victoria/210/2009 (H3N2) (X-187) および B/Brisbane/60/2008 (Victoria 系統) を選定するよう提言した。2010/11 シーズンの A (H3N2) および B 型ワクチンの防御効果の減弱が懸念される。B 型インフルエンザウイルスで新規の薬剤耐性マーカー変異を同定した。これは、既存の抗ウイルス薬結合部位とは全く異なる部位で、遺伝子構造解析の手法により同定された。②H5N1 等による強毒型の新型インフルエンザ発生後半年以内に、国民全員分の有効かつ安全なワクチンを国内で製造、供給できる体制を、平成 25 年度までに確立するという国の方針に基づいて、細胞培養ワクチンの開発・実用化を進めた。国内ワクチンメーカーを指導して、臨床試験の計画、実施および製造設備の設計・建設の支援をする一方で、感染研の役割として、有効かつ安全なワクチン製造株の緊急開発と供給、品質管理方法等の安全性、有効性を確保等に関する応用研究を実施した。本研究によって、国際的なハーモナイゼーションの下に国立感染症研究所におけるシードウイルス製造・配布体制の構築、細胞培養ワクチンの品質管理体制の構築を進めることができ、またワクチンメーカーによる実生産施設の建設、臨床試験を始めとする承認申請に必要な試験の実施を促進することができた。平成 25 年度までの細胞培養ワクチン実用化へ向けて大きく前進することができた。

### A. 研究目的

本研究は、インフルエンザウイルス株サーベイランスの実施に関する研究と、新型インフルエンザ大流行に備えた細胞培養ワクチンの実用化という、2 つの研究目的に分かれる。

まず、第 1 は、国および WHO のインフルエ

ンザ対策・インフルエンザワクチン政策の基本資料となるサーベイランス活動およびその情報の収集、解析、評価、政策提言を目的とし、地方衛生研究所および WHO 世界インフルエンザ監視対応体制 (GISRS) の中核研究機関として、国内外の流行株の収集と抗原解

析、遺伝子解析、抗ウイルス剤性状解析等を検討した。

#### 1) 国内外の流行株の収集と性状解析

インフルエンザウイルスは頻りに遺伝子変異し、それにもなつて抗原性が変化するため、ワクチン株は毎年見直す必要がある。本研究では、国内外から収集したインフルエンザウイルスの抗原性解析および遺伝子解析を実施し、適切な季節性インフルエンザワクチン株の選定を行うことを目的とした。

#### 2) 血清学的調査によるワクチンの有効性の評価

ワクチン接種者の血清と実際の流行株との反応性を調べることにより、国内で使用されているワクチンの有効性の評価をすることとした。

#### 3) 新規機能的遺伝子解析法の構築と流行株遺伝子解析

流行株の遺伝子情報を大量に処理し、抗原性試験、薬剤感受性試験で得られる結果を遺伝子の面からサポートし、より適切なワクチン候補株の検索や決定に貢献することを目的としている。また、次シーズンの流行株の変化予測を可能とする解析法の開発を目指した。

一方、第2の目的は、H5N1等による強毒型の新型インフルエンザ発生後半年以内に、国民全員分の有効かつ安全なワクチンを国内で製造、供給できる体制を、平成25年度までに確立するという国の方針に基づいて、細胞培養ワクチンの開発・実用化することである。既に2年間にわたり、ワクチンの基礎開発と非臨床試験を実施し、実用化への見通しが立っているが、本研究はそれに続くものである。3年計画の初年度である今年度は、国内ワクチンメーカーを指導して、臨床試験の計画、実施および製造設備の設計・建設の支援をする一方で、感染研の役割として、有効かつ安全なワクチン製造株の緊急開発と供給、品質管理方法等の安全性、有効性を確保等に関する応用研究を実施した。

#### 4) 臨床試験等、承認申請に必要な試験の進捗状況に関する情報収集と、試験実施における問題点についての検討

細胞培養ワクチンの実用化を着実に進めるために、臨床試験を始めとする承認申請に必要な試験の進捗状況に関する情報収集と、試験実施における問題点についての検討を行った。

#### 5) 細胞培養ワクチン製造施設におけるバイオセーフティー対策についての検討と提言

「新型インフルエンザワクチン開発・生産体制整備臨時特例交付金」の第2次交付事業について4事業者が採択され、ワクチン生産のための実生産施設建設計画が進行している。そこで安全性の高いワクチン製造施設建設に資することを目的として、細胞培養ワクチン製造施設におけるバイオセーフティー対策についての検討と提言を行った。

#### 6) シードウイルス開発方法の確立に関する国際的ハーモナイゼーション

インフルエンザは世界規模で対処することが必要な感染症であり、細胞培養ワクチンシードウイルスの開発についても国際的なハーモナイゼーションを図りながら進めていくことが必要である。そこで、WHO、WHO協力センター、IFPMAが協同で、シードウイルス開発方法についての検討と情報交換を行った。

#### 7) 細胞培養ワクチンの品質管理体制の確立の準備

有効なワクチンを供給するために、ワクチンの品質管理を適切に行うことは非常に重要である。鶏卵培養法で製造された抗原と細胞培養法により製造された抗原には差異があることが想定されており、鶏卵培養ワクチン用の力価測定試薬が細胞培養ワクチンにそのまま使用できない可能性がある。そこで、近い将来の細胞培養ワクチン実用化に対応するため、細胞培養ワクチンの品質管理体制の確立を目的として、情報収集を行い試薬の準備を進めた。

#### 8) 細胞培養法によるウイルス分離効率の検討

インフルエンザウイルス野外株を効率よく分離出来る培養細胞株を探索し、将来のワクチンシード調製に資することを目的として、MDCK系統の細胞株を用いて近年出現しインフルエンザ流行の主因となった A/H1N1pdm 亜型ウイルスの分離効率を検討した。

#### 9) 細胞培養法による分離ウイルスの遺伝的安定性についての解析

ワクチンシード候補株を培養細胞または鶏卵で分離・継代する過程で、ウイルス遺伝子に変異が導入されると、目的としたワクチン株の抗原性が維持されない可能性がある。そこで分離ウイルスの遺伝的安定性について解析を行うことを目的として本研究を行った。

#### 10) 細胞培養法による分離ウイルスの抗原的安定性についての解析

ワクチンシードウイルス分離用培養細胞に求められる条件のひとつとして、当該細胞から分離されるウイルスは長期の継代にわたって抗原的安定性を維持する必要がある。そこで本研究では MDCK\_N 細胞で分離・継代したウイルスを用いてその抗原的安定性を解析し、MDCK\_N 細胞のワクチンシードウイルス分離用培養細胞としての更なる適性の評価を行うことを目的とした。

#### 11) 細胞培養法によるウイルス分離効率の解析、および分離ウイルスの増殖効率、抗原性、遺伝的安定性、安全性等の検討

細胞培養法で分離されたウイルス株の増殖性、抗原性および免疫原性について、現行の鶏卵培養法と比較検討を目的として本研究を行った。

#### 12) シードウイルス製造用セルバンク及び迷入ウイルス検出系の構築

細胞培養ワクチンの主な長所は(1)ワクチンを短期間に大量に製造することが出来る、(2)鶏卵への馴化過程がないことから、抗原性が流行株に近く有効性のより高いワクチンを製造できる の2点である。これらの利点のうち、後者の優位性を最大限に引き出すためには、鶏卵

培養法を使用せず細胞培養法のみでワクチンシードウイルスを作製する必要がある。そこで本研究では、ワクチンシードウイルス作製システムの基盤形成を目的として、GMP 基準に準拠した MDCK 細胞のセルバンクの構築とセルバンクの安全性試験・特性試験を行った。

#### 13) ウイルスの増殖性に関する因子の解析とウイルス増殖性が向上した新規 MDCK 細胞の開発に関する研究

現在、国内で使用されているインフルエンザワクチンは孵化鶏卵を用いて製造されている。しかし、今後新型インフルエンザの発生に備えて、ワクチン製造用のウイルス株が同定されてから約半年の間に、国民全員分のワクチン製造を完了するために、現行の鶏卵培養法から早期に大量生産が可能な「細胞培養法」へとワクチン製造技術を切り替えていく必要がある。そこで本研究では、細胞培養ワクチンの実用化に向けて従来の MDCK 細胞よりも効率良くウイルスが増殖する新規 MDCK 細胞の開発を試みた。

#### 14) 細胞培養ワクチンに適合したリバースジェネティクス法の開発

細胞培養インフルエンザワクチンの製造にあたって、高増殖性・高タンパク収量を示すワクチンシードウイルスを産生する必要がある。そこで本研究では、リバースジェネティクス法 (RG) を用いた、高増殖性のワクチンシードウイルスの開発を試みた。

## 研究組織

[研究代表者]

田代真人 国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター

[研究分担者]

小田切孝人 国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター

岸田典子 同上

藤崎誠一郎 同上

原田勇一 同上

高橋 仁 同上  
 信澤枝里 同上  
 浅沼秀樹 同上  
 中村一哉 同上  
 浜本いつき 同上  
 山本典生 同上  
 [研究協力者]  
 奥野良信 阪大微生物病研究会  
 野崎周英 化学及血清療法研究所  
 本川賢司 北里第一三共ワクチン株式会社  
 杉本隆司 武田薬品工業株式会社  
 大塚浩史 デンカ生研  
 中田文久 UMN ファーマ  
 小松俊彦 バイオメディカルサイエンス研究会  
 木ノ本雅通 同上  
 高橋昌樹 同上  
 山口照英 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部  
 佐藤征也 新潟バイオリサーチパーク株式会社  
 北里英郎 北里大学医療衛生学部  
 矢野一好 北里環境科学センター微生物部  
 村上 聖 株式会社日立プラントテクノロジー  
 高橋 稔 同上  
 東尾邦彦 同上  
 渋谷啓介 株式会社日立製作所  
 [評価委員]  
 小林和夫 国立感染症研究所免疫部  
 相崎健一 国立医薬品食品衛生研究所毒性部  
 能美健彦 国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部  
 山口照英 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部

## B. 研究方法

サーベイランス関連の研究

### 1) 国内外の流行株の収集と性状解析

国内および海外（中国、台湾、韓国、ラオス、モンゴル、ミャンマー）から収集した A(H1N1)pdm09 の 262 株、A(H3N2) の 223 株、B の 242 株について、赤血球凝集抑制試験による抗原性解析、および遺伝子の進化系統樹解析を行った。

### 2) 血清学的調査によるワクチンの交叉反応性の評価

2010/11 シーズンワクチン接種前後のペア血清（60 歳以下の成人層：24 人、61 歳以上の老人層：24 人）を用いて、ワクチン株、最近の代表的な流行株とその抗原変異株との反応性を赤血球凝集抑制（HI）試験、中和試験により検討した。

### 3) 新規機能的遺伝子解析法の構築と流行株遺伝子解析

国内外の分離株の HA および NA 遺伝子配列を決定した。NA 遺伝子解析では、NA 阻害剤感受性試験結果とアミノ酸置換の解析から、薬剤耐性マーカーとなるアミノ酸置換の推定を行った。

細胞培養ワクチン開発に関する研究

### 4) 臨床試験等、承認申請に必要な試験の進捗状況に関する情報収集と、試験実施における問題点についての検討

研究協力者である各メーカー（化学及血清療法研究所、北里第一三共ワクチン、武田薬品工業、阪大微生物病研究会、デンカ生研、UMN ファーマ）に質問表を送付し、臨床試験を始めとする承認申請に必要な試験の進捗状況について情報提供を依頼した。さらに外部専門家からなる評価委員（小林和夫（国立感染症研究所）、相崎健一（国立医薬品食品衛生研究所）、能美建彦（国立医薬品食品衛生研究所）、山口照英（国立医薬品食品衛生研究所））による研究進

捗評価のためのヒアリングと、厚労省結核感染症課の担当者の同席のもとに WG の会議を行い、研究推進を図った。

5)細胞培養ワクチン製造施設におけるバイオセーフティー対策についての検討と提言

特定非営利活動法人バイオメディカルサイエンス研究会に設置された「新型インフルエンザワクチン短期製造装置等の確立に関する調査研究班」において、細胞培養ワクチン製造施設におけるバイオセーフティー対策についての検討を行い、それを提言としてまとめた。

6)シードウイルス開発方法の確立に関する国際的ハーモナイゼーション

NIBSC にて定期的に開催される国際会議において、WHO、WHO 協力センター（国立感染症研究所を含む）、IFPMA が協同し、シードウイルス開発方法についての検討と情報交換を行った。

7)細胞培養ワクチンの品質管理体制の確立の準備

NIBSC にて定期的に開催される品質管理についての国際会議に参加し、細胞培養ワクチンの品質管理に関する情報の収集を行った。また、細胞培養法および鶏卵培養法によるワクチン抗原の準備を進めた。

8)細胞培養法によるウイルス分離効率の検討

ノバルティス社で樹立された浮遊培養系 MDCK 細胞 MDCK33016PF 株 (MDCK\_NVD) と付着培養系 MDCK 細胞 (MDCK\_Conv) を用いて、A/H1N1pdm09 陽性と判定された臨床検体からウイルスの分離を行い、その効率の比較を行った。

9)細胞培養法による分離ウイルスの遺伝的安定性についての解析

B/Victoria 系統株または B/Yamagata 系統株のウイルスゲノムの存在が確認されている臨床検体から各候補細胞を用いてウイルスを分離・継代し、2 代目と最長継代 (10 代目) ウイルスを用いて、ウイルス HA 及び NA 遺伝

子について解析を行った。

10)細胞培養法による分離ウイルスの抗原的安定性についての解析

ノバルティス社で樹立された浮遊培養系 MDCK 細胞 MDCK33016PF 株 (MDCK\_NVD) と付着培養系 MDCK 細胞 (MDCK\_Conv) を用いて、07/08、08/09 シーズン中に採取された臨床検体から B 型インフルエンザウイルスを分離・継代し、HI 試験による抗原性解析を行った。

11)細胞培養法によるウイルス分離効率の解析、および分離ウイルスの増殖効率、抗原性、遺伝的安定性、安全性等の検討

MDCK 細胞と 10 もしくは 11 日齢発育鶏卵を用いてウイルス分離・継代を行い、分離効率および増殖効率を解析した。

抗原性については、フェレット抗血清 (A/California/7/2009 株) と混合し、TRBC に対する凝集阻害能を測定した。

不活化抗原のタンパク量は Micro-BCA 法を用いて測定し、HA 含有量の定量は SDS-PAGE と SRD 法を用いて行った。

また、細胞培養ワクチンと鶏卵で製造されたワクチンの免疫誘導効果について、A/Narita/1/2009 株のマウスへのチャレンジ試験によって検討した。

12)シードウイルス製造用セルバンク及び迷入ウイルス検出系の構築

ATCC から購入した MDCK 細胞を無血清培地に馴化させ、これを GMP 基準に準拠した方法で拡大培養し、マスターセルバンク (MCB)、ワーキングセルバンク (WCB)、End of Production Cell (EOPC) を作製した。次に MCB、WCB、EOPC について安全性を確認するために GMP 基準に適合する条件で各種の特性試験、安全性試験を行った。

また、迷入ウイルス検出系として、Primerdesign 社製の Real-time PCR pathogen detection kit の検討を行った。

13) ウイルスの増殖性に関与する因子の解析とウイルス増殖性が向上した新規 MDCK 細胞の開発に関する研究

まずゲノム情報のデータベースが充実しているヒト細胞をモデルとして、インターフェロン関連分子に対する siRNA ライブラリーを用い、ノックダウンによってウイルス増殖効率が上昇する遺伝子のスクリーニングを行った。次にこれらの遺伝子について、MDCK 細胞でのノックダウンを行い、ウイルス増殖効率が上昇するものを絞り込んだ。

14) 細胞培養ワクチンに適合したリバーシジェネティクス法の開発

リバーシジェネティクス法を用いて各種の RG ウイルスを作製した。HA、NA 遺伝子については、H1N1pdm09 ワクチンの推奨株である A/California/7/2009 (Cal7) 株のものを使用した。作製した RG ウイルスを MDCK に接種後、10 代目まで継代を行い、ウイルス力価と遺伝子配列の解析を行った。

## C. 研究結果

サーベイランス関連の研究

1) 2010/11 シーズンの国内外分離株サーベイランス

旧季節性 A (H1N1) ウイルス (ソ連型) は 2009 年の 9 月以降は、国内外ともに全く検出されなくなり、全世界から消失したものと推定された。一方、A (H1N1) pdm09、A (H3N2) および B 型流行株は、国内外ともに前シーズンワクチン (A/California/07/2009、A/Victoria/210/2009、B/Brisbane/60/2008) に類似しているものが大勢を占めていることから、ワクチン株の変更は必要ないことが示唆された。これらの解析結果は、年 2 回招集される WHO ワクチン株選定会議へ情報提供 (添付資料 1.) され、ワクチン推奨株の決定通知書 (添付資料 2. : WER 参照) 作成に貢献した。一方、これら解析結果は国内ワクチン株選定会議に

も不可欠であり、次シーズン国内ワクチン株選定のための判断資料 (添付資料 2. : 病原微生物検出情報月報参照) として活用された。

2) 2010/11 シーズンワクチン効果の評価

日本の 2010/11 シーズン A (H1N1) pdm09、A (H3N2) および B 型インフルエンザワクチン株は、A/California/7/2009 (H1N1) pdm09 (X-179A)、A/Victoria/210/2009 (H3N2) (X-187) と B/Brisbane/60/2008 (ビクトリア系統) である。これらワクチンによって誘導されるヒト血清抗体と各型・亜型の代表的な流行株との交叉反応性を HI 試験および中和試験で調べ、ワクチンの有効性について評価した。その結果、A (H1N1) pdm09 ワクチンで誘導される抗体は、流行株とよく反応しワクチンが有効に働くことが示された。しかし、A (H3N2) および B 型ワクチンで誘導される血清抗体は、流行株との反応性が低く、また B 型ワクチンは感染防御レベルの HI 抗体も誘導できないことから、これら 2 つのワクチンの効果はかなり減弱されていることが懸念された。

3) 新規機能的遺伝子解析法の構築と流行株遺伝子解析

HA および NA 遺伝子の大量解析を行い、進化系統樹解析により、流行株の抗原性解析を補完する情報提供をした。これらは、次期ワクチン株選定のための情報として必須であり、株サーベイランスの根幹を成している。一方、ウイルスノイラミニダーゼ (NA) 蛋白を標的とした、抗インフルエンザ薬耐性マーカーの系統的な検索や新規マーカー変異の同定は、薬剤耐性株サーベイランスにとって重要である。本研究では、B 型ウイルスの NA 蛋白に薬剤結合域から離れた位置にある全く新しい耐性マーカー変異の同定に成功した。この変異を獲得すると、現在国内で使用されている 4 つの薬剤 (オセルタミビル、ペラミビル、ラニナミビル、ザナミビル) 全てに対して強い耐性示すことを遺伝子構造解析と薬剤感受性試験の両方で確認した。



この発見は、WHO や国内のインフルエンザ薬剤耐性株サーベイランスにとって、新たなリスク評価のチェックマーカの提示となり、重要な意味をなしている。

#### 細胞培養ワクチン開発に関する研究

4) 臨床試験等、承認申請に必要な試験の進捗状況に関する情報収集と、試験実施における問題点についての検討

「新型インフルエンザワクチン開発・生産体制整備臨時特例交付金」の第2次交付事業について4事業者が採択されるなど、ワクチン実用化へ向けた動きが国家プロジェクトとして進行している。その動きに連動し、細胞培養ワクチンの実用化へのプロセスを促進するため、臨床試験を始めとする承認申請に必要な試験の進捗状況に関する情報収集と、試験実施における問題点についての検討を行った。本研究による開発方向への助言と技術支援により、臨床試験を含む承認申請に必要な試験は予定通りに順調に進捗中である。また、昨年度までの研究班で議論してきた細胞培養ワクチンの安全性に関する考慮点について、最新情報を元にしてさらに議論を深め、「**細胞培養インフルエンザワクチンの安全性に関する Points to Consider (案) 2011**」添付資料 3.としてまとめた。本報告書にこれを添付する。

5) 細胞培養ワクチン製造施設におけるバイオセーフティー対策についての検討と提言

「新型インフルエンザワクチン開発・生産体制整備臨時特例交付金」の第2次交付事業によって臨床試験とともにワクチン実生産設備の建設計画が進行している。その動きに連動し、細胞培養ワクチンの実用化へのプロセスを促進するため、細胞培養ワクチン製造施設におけるバイオセーフティー対策についての検討を行い、それを「**細胞培養法による新型インフルエンザワクチン製造におけるバイオセーフティ対策**」添付資料 4.としてまとめた。本報告書

にこれを添付する。

6) シードウイルス開発方法の確立に関する国際的ハーモナイゼーション

細胞培養ワクチンシードウイルスの開発を国際的なハーモナイゼーションを図りながら進めるため、WHO、WHO 協力センター、IFPMA が協同で、シードウイルス開発方法についての検討と情報交換を行った。国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センターは、WHO 協力センターとして細胞培養ワクチンシードウイルスに関する国際プロジェクトに参画し、試験結果を発表する等情報を発信するとともに、他機関からの情報の収集を行った。これまでにシードウイルス分離用細胞の候補としてノバルティス社のMDCK細胞やメドイミュン社のMDCK細胞があげられているが、さらに国立感染症研究所の保有するGMP準拠条件下で構築されたMDCK細胞バンクも選択肢の1つとなっている。

7) 細胞培養ワクチンの品質管理体制の確立の準備

細胞培養ワクチン実用化に対応して細胞培養ワクチンの品質管理体制を確立するため、WHO ERL の品質管理に関する会議に参加し、情報収集を行った。また細胞培養ワクチンと鶏卵培養ワクチンの力価測定に必要な試薬の準備を進めた。

8) 細胞培養法によるウイルス分離効率の検討  
MDCK\_NVD および比較対象としてのMDCK\_Conv を用いての臨床検体からのウイルス分離結果を表1に示した。両細胞種共に、患者臨床検体の接種により全検体からウイルスが分離され、高い分離効率を確認した。MDCK\_NVD 細胞においては、10検体中9検体で臨床検体から直接の分離が可能であったが、MDCK\_Conv を用いた場合にはウイルス分離に盲継代を必要とした例が6検体存在した。一方、分離ウイルスを継代した場合、MDCK\_Conv での継代を経た方が

MDCK\_NVD で継代した場合よりも高い HA 価を示す傾向があった。

H1pdm 分離ウイルスの HA 価平均値を他の亜型ウイルスと比較した場合、MDCK\_NVD、MDCK\_Conv のいずれで分離、継代した場合においても、1 / 8 倍以下の低い値を示していた。

表 1

	MDCK NVD	MDCK Conv
供試検体数	10	10
初回接種時の分離数	9	4
盲継代後の分離数	1	6
分離総数	10	10
分離率	100%	100%

#### 9) 細胞培養法による分離ウイルスの遺伝的安定性についての解析

培養細胞での 10 継代を経た B/Victoria 系統 5 株については、5 株全てに遺伝子変異が認められ、高い変異出現が観察された。また、観察された変異は全て抗原部位に存在し、多くは糖鎖付加に影響を与えるものであった。また、これらのウイルスの幾つかは鶏卵継代を行うことによって、更に遺伝子変異が認められ、その部位は細胞継代では認められなかった HA 遺伝子の抗原部位および糖鎖付加に影響する箇所であった。

培養細胞での 10 継代を経た B/Yamagata 系統 5 株については、HA、NA 遺伝子への変異導入は認められなかった。これらの株は鶏卵継代によって、HA 遺伝子のウイルス抗原性に影響する箇所に変異導入が認められた。

#### 10) 細胞培養法による分離ウイルスの抗原的安定性についての解析

MDCK\_N、MDCK\_C 両細胞から分離された B/Victoria 系統株の抗細胞由来ウイルス抗血清への反応性を解析したところ、継代 2 代目のウイルスの HI 価は両細胞分離株とも基準ウイルスの反応性と比較して 1/4 程度低い値であった。この HI 価は、両細胞分離株とも継代 10 代目においてもほとんど変化しなかった。一方、抗鶏卵由来ウイルス抗血清への反応性については、両細胞分離ウイルス株とも基準ウイルスの反応性と比較して、継代 2 代目のウイルスでは HI 価が多くの場合 1/8 以下と、低反応性であった。しかしながら、継代 10 代目のウイルスでは HI 価が上昇し、基準ウイルスの HI 価と大差なかった。

MDCK\_N、MDCK\_C 両細胞より分離された B/Yamagata 系統株を用いた解析では、抗細胞由来ウイルス抗血清に対する反応性は基準ウイルスのそれと同等であり、継代 2 代目と 10 代目のウイルス間の HI 価にも大きな変化は観察されなかった。抗鶏卵由来ウイルス抗血清を用いた場合、分離ウイルスの継代 2 代目の HI 価は基準ウイルスの HI 価の 1/4 から 1/8 であり、継代 10 代目のウイルスでも HI 価に大きな変動は観察されなかった。また B/Yamagata 系統株についても、MDCK\_N、MDCK\_C いずれの細胞から分離されたウイルスともその抗原性は類似していた。

#### 11) 細胞培養法によるウイルス分離効率の解析、および分離ウイルスの増殖効率、抗原性、遺伝的安定性、安全性等の検討

##### 1. ウイルスの分離効率および増殖能の検討

簡易診断キットで A 型インフルエンザ陽性が認められた患者から回収した鼻腔スワブ 33 例について、サブタイプ判定を PCR で行い、A/H1N1pdm09 株であることを確認後、MDCK 細胞および発育鶏卵を用いてウイルス分離を行った。その結果、MDCK 細胞では 25/33 例、分離率 76%であったが、発育鶏卵では 13/33 例、分離率 39%であった。発育鶏卵

で HA 価が認められた株 13 例のうち 5 例は初代漿尿液(E1)で HA 価が認められておらず、2 代目の漿尿液(E2)で HA 価が確認できた。一方、MDCK を用いて分離した場合、CPE を示した検体はすべてに HA 価が認められた。分離されたウイルスを細胞と鶏卵それぞれで継代した結果、細胞分離株では 17/25 株、68%で 10 代の継代までに 512 以上の高い HA 価が認められたが、鶏卵分離株では 5/13 株、38%であった。そのため患者検体よりウイルスを分離し、高増殖性を獲得するには細胞培養を用いた場合には 52% (17/33 株) であったのに対し、発育鶏卵では 15% (5/33 株) と顕著に低いことが明らかとなった。

## 2. 細胞もしくは発育鶏卵で分離・継代した株の抗原性の検討

本研究では A/H1N1pdm09 株陽性検体からウイルスを分離したため、ワクチンシードとして用いられている X-179A の原株である A/California/07/2009 (A/C07) 株に対するフェレット抗血清を使用して抗原性を検討した。その結果、A/C07 株と 2 環以上の相違を示した株と継代歴は、TK7(C3)、TK8(C3)、TK12(E4, C4)、TK17(C3)、TK18(E10,C4)、TK19(C3)、TK27(E4,E10)、TK29(E4)であった。特に TK18(C4)、TK27(E10)、TK29(E4) は 4 環以上の相違を示し、顕著な抗原性の変異が認められた。その一方では、発育鶏卵による繰り返しの継代に関わらず、抗原性の変異示さなかった株も数株認められた。

## 3. ワクチン株選定と種ウイルス株の不活化と品質管理

ワクチン株は流行株と顕著な抗原性の変異を認めず高い生産性を有する株が選択されている。そのため、本研究においても鶏卵による分離・継代ウイルス株から回収されたタンパク量を測定し、抗原性試験の結果をふまえ、種ウイルスの選択からワクチン化、さらには品質評価まで行った。ウイルスを鶏卵で増殖させ、漿

尿液 30mL を回収、ウイルス精製後、蛋白定量を行った。現行のワクチン株である X-179A の基準とし、タンパク量が有意に高かったのは TK1 と TK14 株であり、他の分離株は現行株以下であった。そのため TK14 株をワクチン候補株とし、細胞分離株とともに SRD 試験を行った。その結果、発育鶏卵で分離・増殖させた場合には、SRD で使用した標準ヒツジ血清と反応し、HA 含有量の定量が可能であったが、細胞分離・増殖させて株は標準血清に対する反応性が著しく低下していた。しかし、HA 含有量を SDS-PAGE で検討した場合には、この両者の HA 含有量に相違はなかった。以上の結果から、細胞培養によって得られたウイルスは、抗原性試験におけるフェレット血清との反応性は維持しているが、SRD 試験における、ヒツジ血清に対する応答性は著しく低下することが示唆された。

## 4. 細胞もしくは鶏卵分離・継代株より製造されたワクチンの免疫応答と防御効果

細胞培養ワクチンと鶏卵で製造されたワクチンの免疫誘導効果について、マウスを用いて検討した。マウスに細胞もしくは鶏卵で分離・増殖させたワクチンに 2 回接種後、分離株と同じ A/H1N1pdm 株である A/Narita/1/2009(A/N)株とチャレンジし、防御効果ならびに免疫誘導能を検討した。その結果、細胞分離・増殖株と鶏卵分離・増殖株で接種用量依存的な抗体応答が認められた。またここで誘導された抗体応答と相関して、防御効果が認められた。このことは、細胞培養で作製されたワクチンも現行の鶏卵培養ワクチンと同等の効果が得られることを示唆している。

## 12) シードウイルス製造用セルバンク及び迷入ウイルス検出系の構築

### 1. セルバンクの評価について

GMP 基準に準拠した方法で構築した MCB、WCB、EOPC について特性試験および安全性試験を行ったところ、これまで実施したものに

については、全体として特に問題となる点は認めなかった。

#### [MCB]

##### ・ Sterility Testing by Direct Inoculation Method

THIO medium および TSB medium において細菌・真菌の増殖を認めなかった。

##### ・ Test for the presence of Agar-cultivable and Non Agar-cultivable Mycoplasma

Agar Isolation assay と Indicator Cell assay を用いてマイコプラズマ (Agar-cultivable と Non Agar-cultivable の両タイプ) の存在を確認したところ、陰性であった。

##### ・ Test for Mycobacterium spp Culture Medium Method

結核菌培養用の培地にて 56 日間培養を行ったが、菌の増殖を認めなかった。結核菌は陰性であった。

##### ・ Identification & Characterisation of Cultured Cells by Analysis of 4 Isoenzymes

Authentikit を用いて Isoenzyme の電気泳動における移動度を解析したところ、イヌ由来細胞と同様のパターンを示した。従って、MCB が由来する動物種はイヌと確認できた。

##### ・ DNA fingerprinting of cell lines

制限酵素処理した細胞 DNA を電気泳動し、フィルターに転写してプローブをハイブリダイゼーションした。その後バンドパターンを比較したところ、MCB は標準となる MDCK と同様のパターンを示した。

##### ・ Karyology of non-human mammalian cell lines (50 metaphases)

核型分析を行ったところ、これまでに報告されている MDCK のパターンと一致した。他の細胞株が混入している所見やイヌ以外の種の細胞が混入している所見は認められなかった。

#### [WCB]

##### ・ Sterility Testing by Direct Inoculation Method

MCB と同様、THIO medium および TSB medium において細菌・真菌の増殖を認めなかった。

##### ・ Test for the presence of Agar-cultivable and Non Agar-cultivable Mycoplasma

Agar Isolation assay と Indicator Cell assay を用いてマイコプラズマ (Agar-cultivable と Non Agar-cultivable の両タイプ) の存在を確認したところ、MCB と同様陰性であった。

##### ・ Test for Mycobacterium spp Culture Medium Method

MCB と同様、結核菌は陰性であった。

##### ・ In vitro Assay for the Presence of Adventitious Viral Contaminants

WCB から調製した cell lysate を 3 種類の indicator cell line (MRC-5, Vero, MDCK) の培養系に加え、28 日間培養を行ったが、細胞変性効果、赤血球凝集活性、赤血球吸着活性は検出されなかった。

##### ・ Identification & Characterisation of Cultured Cells by Analysis of 4 Isoenzymes

Authentikit を用いて isoenzyme の電気泳動における移動度を解析したところ、4 つの isoenzyme のうち 3 つについてはイヌ由来細胞のパターンを示したが、NP についてはその範囲から外れるという結果を得た。このアッセイ系においてイヌ由来と判定する基準を精査したところ、2 つのイヌ由来細胞の電気泳動移動度の平均値が使用されていた。そこで再試験において標準となる MDCK の移動度と WCB の移動度を比較したところ、両者は同等の移動度を示した。従って、WCB は MDCK と同等であると確認できた。

##### ・ DNA fingerprinting of cell lines

MCB と同様、WCB も標準となる MDCK と同様のパターンを示した。

##### ・ Karyology of non-human mammalian cell

lines (50 metaphases)

核型分析を行ったところ、MCBと同様、これまで報告されているMDCKのパターンと一致した。他の細胞株が混入している所見やイヌ以外の種の細胞が混入している所見は認められなかった。

[EOPC]

・ Sterility Testing by Direct Inoculation Method

THIO medium および TSB medium において細菌・真菌の増殖を認めなかった。

・ In vitro Assay for the Presence of Adventitious Viral Contaminants

EOPC から調製した cell lysate を 3 種類の indicator cell line (MRC-5, Vero, MDCK) の培養系に加え、28 日間培養を行ったが、細胞変性効果、赤血球凝集活性、赤血球吸着活性は検出されなかった。

・ Transmission Electron Microscopic Examination of Cell Cultures (200 Cell profiles)

電子顕微鏡で観察したところ、ウイルス、ウイルス様粒子、マイコプラズマ、真菌、酵母、細菌は検出されなかった。

・ Detection and Quantification of Reverse Transcriptase activity by QFPERT Assay

EOPC 由来の検体からは、逆転写酵素活性は検出されなかった。

・ In vitro Assay, Detection of porcine Viral Contaminants using PPK indicator Cells According to 9CFR

EOPC 由来の検体を PPK indicator cell の培養系に加え、少なくとも 21 日間培養した後に、CPE の有無、封入体形成等の異常所見の有無、赤血球吸着活性の有無、抗 Porcine parvovirus 抗体に対する反応性の有無を確認したところ、全て陰性であった。

・ Real Time PCR Detection of

Bovine/Porcine Circovirus (PCV)

リアルタイム PCR 法 (検出感度 20 copies/reaction) で PCV 由来核酸の有無を調べたところ、陰性であった。

2. 迷入ウイルス検出系の評価について

Primerdesign 社の pathogen detection kit を用いてまずパラインフルエンザウイルス 1 型の検出を行い、感度についての検討を行った。そのためにパラインフルエンザウイルス 1 型を LLC-MK2 細胞にて増殖させ、感染力価を測定し、力価既知のウイルスストックを調製した。検出感度を確認したところ、本キットは 0.1 TCID<sub>50</sub>/reaction のウイルスを検出することが出来たことから、十分高い感度を持っていると考えられた。同様にしてパラインフルエンザウイルス 2 型についてもウイルスストックを調製し、検出感度を確認したところ、1 型のキットに比べると低い検出感度であった (10 TCID<sub>50</sub>/reaction)。まだ検討したキットの数は少ないが、キットによって検出感度が異なることがこれまでの結果から示唆された。今後さらにキットの数・種類を増やし、検討を進めていく必要があると考える。

13) ウイルスの増殖性に関与する因子の解析とウイルス増殖性が向上した新規 MDCK 細胞の開発に関する研究

1. ウイルス産生量を増加させる I 型 IFN 誘導性遺伝子群のスクリーニングと同定

A549 細胞において I 型 IFN 誘導性遺伝子群を標的とする 78 種類の siRNA ライブラリー作製し、網羅的にスクリーニングした結果、23 種類の遺伝子をノックダウンするとコントロールと比較してウイルス産生量が 2 倍以上増加した。さらに、IPA を用いてパスウェイ解析した結果、23 種類の遺伝子のうち半数以上の遺伝子が RIG-I/IPS-1 経路に関連する遺伝子であることが示唆された。IRF7 をノックダウンするとコントロールに比べて再現性よくウイルス産生量が 2~4 倍増加した。一方、IRF3 を

ノックダウンしてもウイルス産生量への影響は認められなかった。

## 2. 同定したイヌ遺伝子のクローニングと塩基配列の決定及び siRNA の設計合成

MDCK 細胞において IRF7 をクローニングしたが、非感染細胞と比較して PR8 ウイルス感染細胞では IRF7 の発現量の増加が認められた。クローニングした遺伝子の N 末端(〜70 塩基)の塩基配列は難読領域なため解析不可能であったが、その他の領域はデータベースと一致していた。

## 3. MDCK 細胞への siRNA 導入及びウイルス産生量への影響

イヌ IRF7 に対する 3 種類の siRNA を MDCK 細胞に導入し、PR8 感染後の培養上清中に放出されるウイルス量を定量した結果、A549 細胞と同様に IRF7 をノックダウンするとコントロールと比較してウイルス産生量は約 4 倍まで増加した。一方、IRF3 をノックダウンしても A549 細胞と同様にウイルス産生量への影響はなかった。

## 4. shRNA 安定発現 MDCK 細胞株樹立

IRF7 の発現を恒常的に抑制する MDCK 細胞を樹立し、shRNA 発現ベクターによるウイルス増殖への影響がないことを確認した。従来の MDCK 細胞と shRNA コントロール細胞と shRNA\_IRF7 発現細胞に A/Narita/1/2009 株(A/H1N1pdm)を感染させて、24 時間後の培養上清中に放出されるウイルス RNA 量をリアルタイム PCR 法にて定量した結果、ウイルス産生量がコントロールと比較して約 4 倍増加した。

## 14) 細胞培養ワクチンに適合したリバーシジェネティクス法の開発

7:1 226R を除くすべての RG ウイルスは MDCK 細胞から回収可能であり、その増殖性は継代を経るごとに増大することが明らかとなった。MDCK 細胞で 10 代継代したウイルスの力価は 16〜128 HAU、感染力価は約  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL であった。7:1 226R ウイルスについては 5 代目まで盲継代

を繰り返したが、ウイルスを回収することはできなかった。また、MDCK 細胞で 10 代継代したウイルスでは、ウイルスの HA、NA、PB1、NS1 遺伝子に点変異が生じることが明らかとなった。このうち、226Q をもつ 2 株の RG ウイルスの HA 遺伝子に観察された変異は、MDCK 細胞で継代することによって特異的に発生することが知られている変異であった。6:2 226R ウイルスの HA 遺伝子上にも点変異は観察されたが、アミノ酸配列上宿主受容体との親和性に関与する部分ではなかった。PB1 と NS1 遺伝子上の変異は継代 10 代目においても 2 種類の塩基の混合状態であった。また、すべての遺伝子変異は継代 5 代目より後に観察された。

## D. 考察

### サーベイランスに関する研究

インフルエンザ株サーベイランスは、次シーズンの流行予測と適切なワクチン株の選定をすることを最終目的としている。このためには、全国地衛研および近隣諸国ナショナルインフルエンザセンターへのサーベイランス抗原・抗体キットの無償提供と技術支援が不可欠である。本研究では、これら関連機関との密な相互協力関係に基づいて、国内外から毎年大量の流行株を収集し、それらの性状解析を実施してきた。2010/11 および 2011/12 シーズンは、国内外ともに流行株は現行のワクチン株に類似していることを把握できたことから、ワクチン株の変更は不要であることを提言した。これにより、最近 2 シーズンの WHO ワクチン株および国内ワクチン株は変更されなかった。

一方、インフルエンザワクチンの有効性の判定に関しては、海外では主にワクチン株に対する免疫原性のみが評価され、また、国内においてはワクチンウイルスの蛋白含量が測定されるのみで、ワクチンの免疫原性すら評価されていない。よって、本研究は、ワクチン接種後に誘導されるヒト血清抗体が流行株をどの程度

抑制できるかを評価し、年度ごとのワクチンの防御効果を本質から評価したものである。このような研究は、毎年ワクチン接種前に実施されるべきであり、国民へよりよいワクチンを提供するためには、国のワクチン政策の一つとして予算化され毎年実施されるべきである。

インフルエンザウイルス遺伝子解析は、塩基配列の大量解析による網羅的解析から、機能的解析へと変わりつつある。本研究でも、遺伝子構造解析法の手法開発を進めており、それと並行してその技術を応用して、新規の薬剤耐性マーカー遺伝子変異の同定に成功した。これは、薬剤耐性株サーベイランスにとって、また、新規抗インフルエンザ薬の開発にとっても重要な発見であり、本研究の貢献は大である。

#### 細胞培養ワクチン開発に関する研究

新型インフルエンザに対応するため有効かつ安全な新型ワクチンの緊急開発・大量製造の体制を整えておくことは非常に重要である。細胞培養ワクチンは、現行の発育鶏卵に依存しないことから、(1)何時でも、短期間に大量のワクチン株を増殖させることができる。(2)ヒト分離株に由来するワクチン株は、鶏卵に比べて哺乳類細胞で効率よく増殖しやすい。(3)発育鶏卵への馴化に伴う遺伝子変異が起こらず、ヒト流行株の抗原性が維持されて有効性が高いことが期待できる(4)閉鎖密閉系での細胞培養系により、ワクチン製剤への細菌汚染のリスクと作業員への感染リスクを最小に出来る等の利点があり、そのためインフルエンザ対策の柱となる次世代ワクチンとして国内外で非常に注目されている。

細胞培養ワクチンの実用化を達成するには、ワクチンメーカーによる実生産施設の建設、臨床試験を始めとする承認申請に必要な試験の実施、承認の取得に加えて、国立感染症研究所におけるシードウイルス製造・配布体制の構築、細胞培養ワクチンの品質管理体制の構築など

が必須である。しかもインフルエンザは地球規模で広がる感染症であるため、国際的に協調しながらこれらの体制の構築を進める必要がある。

これまでに、ワクチンメーカーによる細胞培養ワクチンの実用化を促進することを目的として「新型インフルエンザワクチン開発・生産体制整備臨時特例交付金」の第2次交付事業が実施され、ワクチンの実生産施設の建設等の計画が進行している。こうした動きに連動し、ワクチンメーカーの実用化へのプロセスをさらに加速させるため、本研究では、臨床試験を始めとする承認申請に必要な試験の進捗状況に関して情報収集を行い、試験実施における問題点についての検討を行った。ワクチンメーカーに質問表を送付して承認申請への進捗状況について情報提供を頂き、評価委員によるヒアリングと研究班員・ワクチンメーカーによるWG会議を厚労省結核感染症課の担当者の同席の下に行った。本研究による開発方向への助言と技術支援により、臨床試験を含む承認申請に必要な試験は予定通りに順調に進捗している。また、細胞培養ワクチン実用化において各班員に共通する一般の問題点を抽出・整理し、最新情報を元にしてさらに議論を深め、「細胞培養インフルエンザワクチンの安全性に関する Points to Consider (案) 2011」としてまとめた。このように各班員共通の問題について班全体で議論し情報を共有することは、プロジェクト全体を推進する上で大きな意味がある。また、安全性の高いワクチン製造施設建設に資することを目的として、細胞培養ワクチン製造施設におけるバイオセーフティー対策についての検討を行った。バイオセーフティーとGMPは、しばしば相反する条件を設定する必要を生じる。例えばバイオセーフティーの見地からは、「ウイルス等を外部に拡散させない」という立場をとるため、製造施設は内部を陰圧、外部を陽圧に設定することが推奨される。一方、

GMPの見地からは、製造区域の清浄性を保つために内部を陽圧、外部を陰圧に設定することが求められる。そこで、バイオセーフティーとGMPを両立する施設の立案に資するため、検討結果を「細胞培養法による新型インフルエンザワクチン製造におけるバイオセーフティ対策」としてまとめた。ワクチン製造施設の構造を策定する上で、非常に有用な資料になると思われる。

また先に触れた通り、細胞培養ワクチンの実用化には、ワクチンメーカー側のプロセスを促進するだけでなく、国立感染症研究所における細胞培養ワクチンシードウイルス製造・供給体制の構築と細胞培養ワクチンに適合した品質管理体制の構築が必須である。

細胞培養ワクチンシードウイルス製造・供給体制の構築については、シードウイルス製造用の候補細胞としてノバルティス社の浮遊系MDCK細胞と付着系MDCK細胞の評価を行った。これまで試験結果からは両者ともウイルス分離効率、ウイルス増殖効率、遺伝的安定性、抗原的安定性に問題はないと考えられた。

また、海外に依存せず国内だけで細胞培養ワクチン用のシードウイルス製造を行うための基盤を構築するため、GMP基準に適合したMDCKセルバンクの構築を行い、その特性試験と安全性試験を行った。その結果、これまで実施した試験の範囲では特に問題となる点を認めなかった。これから実施する試験もあり結果が揃うのを待たなければならないが、全ての試験で問題がないという結果が得られれば、感染研で構築したMDCKセルバンクは臨床検体からのシードウイルスの分離、リバースジェネティクスによるシードウイルス作製、及び海外からのリファレンス株の増殖などに使用することが出来る。安全性が確認されたGMPグレードのMDCKセルバンクは、鶏卵培養によらない細胞培養ワクチンシードウイルス製造の基盤確立へ大きく貢献するものになると言っ

て良いであろう。

また細胞培養ワクチンシードウイルス開発方法の確立に関しては、国際的ハーモナイゼーションが重要である。そのため、国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センターはWHO、WHO協力センター、IFPMAによる国際会議に参加し、シードウイルス開発方法についての検討と情報交換を行った。さらに当センターは、WHO協力センターとして細胞培養ワクチンシードウイルスに関する国際プロジェクトに参画し、試験結果を発表する等情報を発信するとともに、他機関からの情報の収集を行った。これまでにシードウイルス分離用細胞の候補としてノバルティス社のMDCK細胞やメドイミュン社のMDCK細胞があげられているが、さらに国立感染症研究所の保有するGMP準拠条件下で構築したMDCK細胞バンクも、国際会議において選択肢の1つと認識されている。MDCK細胞が企業から提供される場合、毎年数本程度が供給されることになるが、企業の方針転換や突発的な事態によって細胞の供給がストップしてしまう危険性は常に存在する。従って、危機管理上の観点からも、国内で細胞培養ワクチンシードウイルス開発の基盤を構築しておくことは非常に重要である。細胞培養ワクチンに適合した品質管理体制の構築については、WHO ERLの品質管理に関する会議に参加して情報を収集するとともに、細胞培養ワクチンと鶏卵培養ワクチンの力価測定に必要な試薬の準備を進めた。鶏卵培養法による抗原と細胞培養法による抗原では、力価測定用試薬に対する反応性がそれぞれ異なることが懸念される。実際、A/H1N1pdm09について臨床検体から鶏卵培養法と細胞培養法でウイルスを分離・継代し、抗原を調製して既存のSRD試薬（鶏卵培養法による抗原とそれに対するヒツジ抗血清）で試験を行ったところ、細胞培養法による抗原に対して反応性が大きく低下していた。今後さらなる解析を進め、知



見を蓄積し、細胞培養ワクチンに適合した品質管理体制の構築を進めていく必要がある。

## E. 結論

サーベイランスに関する研究

- ・2011/12 シーズンの流行株のサーベイランスの結果、2011/12 シーズンワクチン株に、A/California/7/2009 (H1N1) pdm09 (X-179A)、A/Victoria/210/2009 (H3N2) (X-187)およびB/Brisbane/60/2008 (Victoria 系統)を選定するよう提言した。
- ・2010/11 シーズンの A (H3N2) および B 型ワクチンの防御効果の減弱が懸念される。
- ・B 型インフルエンザウイルスで新規の薬剤耐性マーカー変異を同定した。これは、既存の抗ウイルス薬結合部位とは全く異なる部位で、遺伝子構造解析の手法により同定された。

細胞培養ワクチン開発に関する研究

本研究によって、国際的なハーモナイゼーションの下に国立感染症研究所におけるシードウイルス製造・配布体制の構築、細胞培養ワクチンの品質管理体制の構築を進めることができ、またワクチンメーカーによる実生産施設の建設、臨床試験を始めとする承認申請に必要な試験の実施を促進することができた。以上によって、細胞培養ワクチン実用化へ向けて大きく前進することができたと考える。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

サーベイランスに関する研究

Ujike M, Ejima M, Anraku A, Shimabukuro K, Obuchi M, Kishida N, Xu Hong, Takashita E, Fujisaki S, Yamashita K, Horikawa H, Kato Y, Oguchi A, Fujita N, Tashiro M, Odagiri T, and the Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Monitoring and Characterization of Oseltamivir-Resistant Pandemic (H1N1) 2009

Virus, Japan, 2009–2010 *Emerging Infect Dis.*: 17, 470-479, 2011

Nakauchi M, Ujike M, Obuchi M, Takashita E, Takayama I, Ejima M, Oba K, Konomi N, Odagiri T, Tashiro M, Kageyama T; the influenza virus surveillance group of Japan. Rapid discrimination of oseltamivir-resistant 275Y and -susceptible 275H substitutions in the neuraminidase gene of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus by duplex one-step RT-PCR assay. *J Med Virol.* 2011 Jul;83(7):1121-1127

Harada Y, Ninomiya-Mori A, Takahashi Y, Shirakura M, Kishida N, Kageyama T, Tada Y, Tashiro M, Odagiri T. Inactivated and adjuvanted whole-virion clade 2.3.4 H5N1 pre-pandemic influenza vaccine possesses broad protective efficacy against infection by heterologous clades of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus in mice. *Vaccine.* 2011 Oct 26;29(46):8330-8337

Dapat C, Suzuki Y, Kon M, Tamura T, Saito R, Dapat IC, Yamazaki O, Odagiri T, Fujisaki S, Suzuki H. Phylogenetic analysis of an off-seasonal influenza virus A (H3N2) in Niigata, Japan, 2010. *Jpn J Infect Dis.* 2011;64(3):237-41.

Fujisaki S, Yokomaku Y, Shiino T, Koibuchi T, Hattori J, Ibe S, Iwatani Y, Iwamoto A, Shirasaka T, Hamaguchi M, Sugiura W. Outbreak of hepatitis B virus genotype A and transmission of genetic drug resistance in cases coinfecting with HIV-1 in Japan. *J Clin Microbiol.* 2011 Mar;49(3):1017-24.

藤崎誠一郎、田代真人 インフルエンザの歴史と疫学 呼吸と循環 2011;59(10):961-971.

細胞培養ワクチン開発に関する研究

Yanagita H, Yamamoto N, Fuji H, Liu X, Ogata M, Yokota M, Takaku H, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Hoshino T. Mechanism of Drug Resistance of Hemagglutinin of Influenza Virus and Potent Scaffolds Inhibiting Its Function.

ACS Chem Biol. 2012 Jan 13. [Epub ahead of print]

Harada Y, Ninomiya-Mori A, Takahashi Y, Shirakura M, Kishida N, Kageyama T, Tada Y, Tashiro M, Odagiri T.

Inactivated and adjuvanted whole-virion clade 2.3.4 H5N1 pre-pandemic influenza vaccine possesses broad protective efficacy against infection by heterologous clades of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus in mice. *Vaccine*. 29(46): 8330-8337, 2011

山本典生:「細胞培養インフルエンザワクチンの開発」,化学療法の領域,27(12):78-84,2011

山本典生:「新型インフルエンザ」,クリンネス,313:8-9, 2011

原田勇一、板村繁之:インフルエンザワクチン 日本臨牀, 日本臨牀社, 69 (9): 1567-1570, 2011

## 2. 学会発表

サーベイランスに関する研究

Xu H, Kishida N, Takashita E, Fujisaki S, Ito R, Doi T, Sugawara H, Ejima M, Kim N, Tashiro M, Odagiri T. The Influenza Virus Surveillance Group of Japan Antigenic and genetic characterizations of influenza viruses isolated in 2010/11 season in JAPAN. The IUMS 2011 Sapporo Congress, Sapporo, September 2011  
N. Kishida, H. Xu, H. Sugawara, R. Ito, T. Doi, E. Takashita, S. Fujisaki, M. Ejima, N. Kim, R. Saito, H. Ikematsu, M. Tashiro, and T. Odagiri  
Cross-reactivity of human serum antibodies elicited by trivalent influenza vaccine for 2010/11 season against influenza A/H3N2 and B viruses isolated in embryonated eggs and MDCK cells.' The IUMS 2011 Sapporo Congress, Sapporo, September, 2011

Kawakami C, Takashita E, Ejima M, Fujisaki S, Kim N, Usuku S, Kurata E, Iwata M, Toyozawa

T. Odagiri T, Tashiro M. Neuraminidase inhibitor-resistant influenza A viruses detected in the 2010/11 season in Yokohama, Japan.

International Union of Microbiological Societies, Sapporo, 2011 September.

Takashita E, Ejima M, Takayama I, Nakauchi M, Fujisaki S, Kim N, Kishida N, Xu H, Sugawara H, Itoh R, Doi T, Kageyama T, Tashiro M, Odagiri T. Detection of antiviral-resistant pandemic influenza A(H1N1)2009 (A/H1N1pdm09) viruses by a combination of chemiluminescent and fluorescent neuraminidase inhibitor susceptibility assays in Japan. International Union of Microbiological Societies, Sapporo, 2011 September.

岸田典子、藤崎誠一郎、横山勝、佐藤裕徳、齋藤玲子、池松秀之、徐紅、高下恵美、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、江島美穂、金南希、佐藤彩、田代真人、小田切孝人 「インフルエンザワクチン接種後のヒト血清抗体の交叉反応性をもとに評価した 2010/11 シーズンA(H3N2)およびB型ワクチンの効果」 2011年12月東京、第15回日本ワクチン学会

細胞培養ワクチン開発に関する研究

Asanuma et al. 'Comparison of influenza A/H1N1pdm09 vaccine productions in eggs versus cell cultures and the protective immune responses induce in mice.

2011年国際ウイルス学会(2011年9月、札幌)  
H.Takahashi, Y.Harada,

N.Shimasaki, K.Nakamura, I.Hamamoto, N.Yamamoto, T.Odagiri, S.Itamura, M.Tashiro : Inefficient ability of LLC-MK2 cells in supporting the growth of influenza viruses isolated from clinical specimens: Analysis of adaptation of viruses to LLC-MK2 cells and underlying mechanism.

8th International Congress of Virology, Sapporo, September 2011 第59回日本ウイルス学会学術

集会併催

Virology, Sapporo, September 2011 第 59 回日本  
ウイルス学会学術集会併催

Y.Harada, H.Takahashi, M.Shirakura, E. Nobusawa, N.Yamamoto, K.Nakamura, I.Hamamoto, H.Asanuma, T.Odagiri, M.Tashiro and S.Itamura : Growth ability of reverse genetically generated influenza A/H1N1pdm09 viruses in MDCK and LLCMK2 cell lines.  
8th International Congress of Virology, Sapporo, September 2011 第 59 回日本ウイルス学会学術集会併催

K.Nakamura, Y.Harada, H.Takahashi, I.Hamamoto, M.Tashiro, N.Yamamoto: Applicability of plaque-cloning method to a prevention against genetic alteration of influenza vaccine-seed.  
8th International Congress of Virology, Sapporo, September 2011 第 59 回日本ウイルス学会学術集会併催

I.Hamamoto, N.Yamaguchi, S.Ogishima, K.Miyaguchi, Y.Harada, H.Takahashi, M.Tashiro, and N.Yamamoto. Analysis of influenza virus infection in human nasopharyngeal and oropharyngeal cells.  
The Fourth ESWI Influenza Conference. 11 September 2011, Malta

I.Hamamoto, N.Yamaguchi, S.Ogishima, K.Miyaguchi, Y.Harada, H.Takahashi, M.Tashiro, and N.Yamamoto. Analysis of influenza virus infection in human nasopharyngeal and oropharyngeal cells. 第 34 回日本分子生物学会、横浜、2011 年 12 月

T.Hoshino, H.Yanagita, H.Fuji, Xinli Liu, N.Yamamoto. Development of the anti-viral agents blocking the function of hemagglutinin of influenza virus: 8th International Congress of

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
無し
2. 実用新案登録  
無し
3. その他  
無し

## 国内外の流行株の収集と性状解析

研究分担者 小田切孝人 国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター  
第 1 室長  
研究協力者 岸田典子、徐行、藤崎誠一郎、高下恵美、今井正樹、伊東玲子、  
土井輝子、菅原裕美、金南希、佐藤彩、江島美穂（国立感染症研究所  
インフルエンザウイルス研究センター第 1 室）

**研究要旨** 適切なワクチン株の選定を行うことを目的とし、国内および海外（中国、台湾、韓国、ラオス、モンゴル、ミャンマー）から収集したインフルエンザウイルスの抗原性解析および遺伝子解析を行った。その結果、A(H1N1)pdm09、A(H3N2)および B 型分離株の大半がそれぞれのワクチン株である A/California/7/2009、A/Victoria/210/2009、B/Brisbane/60/2008 と類似していたことから、2011/12 シーズン用のワクチン株は、2010/11 シーズン用ワクチンと同じものを採用することになった。

### A. 研究目的

インフルエンザウイルスは頻繁に遺伝子変異し、それによってもって抗原性が変化するため、ワクチン株は毎年見直す必要がある。本研究課題では、国内外の分離株の抗原性解析および遺伝子の進化系統樹解析の情報にもとづいて、適切な季節性インフルエンザワクチン株の選定を行うことを目的とする。

### B. 研究方法

国内および海外（中国、台湾、韓国、ラオス、モンゴル、ミャンマー）から収集した A(H1N1)pdm09 の 262 株、A(H3N2)の 223 株、B の 242 株について、赤血球凝集抑制試験による抗原性解析、および遺伝子の進化系統樹解析を行った。

### C. 研究結果

**2010/11 シーズンの国内分離株サーベイランス：**旧季節性 A(H1N1)ウイルスは 2009 年の A(H1N1)pdm09 ウイルスによるパンデミック発生以降は、全く分離されなくなった。A(H1N1)pdm09 分離株の 99%が抗原的、遺伝的にワクチン株である A/California/7/2009 類似株であった。A(H3N2)分離株の 100%がワクチン株である A/Victoria/210/2009 類似株であった。B 型ウイルスでは Victoria 系統株が 9 割以上を占めた。Victoria 系統分離株はワクチン株の B/Brisbane/60/2008 と類似した株が 97%と大勢を占めた。

**2010/11 シーズンのアジア諸国分離株サーベイランス：**当該国でのインフルエンザの流行はわが国と同様、A(H1N1)pdm09、A(H3N2)および B 型ウイルスの混合流行であり、殆どの国で A(H1N1)pdm09 の流行が主流であった。モンゴルでは、A(H3N2)が主流であった。2010/2011