

シーズンの A(H1N1)pdm09 株は抗原的、遺伝的にワクチン株の A/California/07/2009 類似株であった。A(H3N2) ウイルスの流行株はワクチン株である A/Victoria/210/2009 類似株であった。B 型ウイルスについては、Victoria 系統が流行の主流であり、ワクチン株の B/Brisbane/60/2008 類似株で、Yamagata 系統のウイルス株は B/Bangladesh/3333/2007 類似株であった。

D. 考察

A(H1N1)pdm09、A(H3N2)、B のいずれの型、亜型でも、2010/11 シーズンのワクチン株に類似した株が、国内、海外ともに流行の主流であったことから、2011/12 シーズンワクチン株は、2010/11 シーズンワクチン株から変更の必要は無いと判断された。

E. 結論

2011/12 シーズンのワクチン株には、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)が選ばれた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Makoto Ujike, Miho Ejima, Akane Anraku, Kozue Shimabukuro, Masatsugu Obuchi, Noriko Kishida, Xu Hong, Emi Takashita, Seiichiro Fujisaki, Kazuyo Yamashita, Hiroshi Horikawa, Yumiko Kato, Akio Oguchi, Nobuyuki Fujita, Masato Tashiro, Takato Odagiri, 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.

2. 学会発表

Hong Xu, Noriko Kishida, Emi Takashita, Seiichiro Fujisaki, Reiko Ito, Teruko Doi, Hiromi Sugawara, Miho Ejima, Namhee Kim, Masato Tashiro, Takato Odagiri. 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

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

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 インフルエンザウイルス研究センター 研究員

研究要旨 ワクチンの交叉反応性を評価するため、2010/11 シーズンのワクチン接種前後のペア血清を用いて、ワクチン株、流行株およびその抗原変異株との反応性を赤血球凝集抑制試験により調べた。その結果、ワクチン接種者の血清は A(H1N1)pdm09 流行株と比較的よく反応したが、A(H3N2) および B 型の流行株との反応性が低かった。B 型については、ワクチン株に対しても反応性が低かった。さらに、A(H3N2) および B ワクチンについては中和試験によりその反応性を調べた。その結果から、試験に用いた A(H3N2) 流行株の半数以上は比較的高い交叉反応性を示した。しかし、B 型ワクチンでは、細胞で分離した B 型流行株との交叉反応性が低かった。よって、2010/11 シーズンワクチンについて、A(H1N1)pdm09 および A(H3N2) はワクチンの効果を比較的期待できたが、B 型はワクチン効果の減弱が懸念された。

A. 研究目的

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、ワクチンの交叉反応性を評価し、次年度のワクチン選定に有用な情報提供を行う。

B. 研究方法

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）試験により調べた。試験に用いたウイルスには、ワクチン株、その原株、および MDCK 細胞または孵化鶏卵分離株を用いた。A(H3N2) および B についてはさらに中和試験により反応性を調べた。HI 抗体価および中和抗体価からそれぞれ幾何平均値（GMT）を求めて比較した。

（倫理面への配慮）

ワクチン接種前後のヒト血清検体の採取にあたっては、インフォームドコンセントを取り、倫理委員会の了承を得た。

C. 研究結果

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)pdm(X-179A)、A/Victoria/210/2009 (H3N2) (X-187)とB/Brisbane/60/2008（ビクトリア系統）である。ワクチン接種者のペア血清を用いたHI試験において、ワクチン接種者の血清はA(H1N1)pdm09流行株と比較的よく反応したが、A(H3N2)およびB型の流行株との反応性が低かった。B型については、流行株だけでなく、ワクチン株に対しても反応性が低かった。よってワクチン効果の減弱が懸念されるA(H3N2)とBについては、中和試験によってもワクチン接種者の血清と流行

株との反応性を調べた。その結果、試験にもちいたA(H3N2)流行株の半数以上は、ワクチン株のGMTを100%とすると約70%以上の高いGMTを示した。Bについては、中和試験ではワクチン株に対してA(H3N2)ワクチン株が示したGMTと同程度のGMTを示すことがわかった。しかし、孵化鶏卵で分離した流行株はワクチン株と同程度の高いGMTを示したが、細胞で分離したB型の流行株はワクチン株の約50%程度のGMTしか示さなかった。

D. 考察

A(H3N2) ワクチン: HI 試験では、ワクチン接種後のヒト血清抗体は MDCK 細胞分離株と交叉反応性が低かった。ワクチン製造株の HA レセプター結合付近の 228 番目のアミノ酸に置換 (S→T) があり、この置換による抗原性の変化が原因であると推測される。しかし、中和試験では同一の被検血清と MDCK 細胞分離株は比較的良好に交叉反応性を示したことから、この 1 箇所の置換はワクチン効果の低下に影響は小さいと推測された。

B 型ワクチン: HI 試験では、ワクチン接種後の血清抗体は、ホモのウイルスを含む全ての株に対して極めて低い GMT しか示さなかったが、中和試験では、A(H3N2)と同程度の GMT を示したことから、B 型ワクチンは H3 ワクチンと同等に中和抗体を誘導できることがわかった。B 型ワクチンは HI 抗体価を誘導しにくいと考えられるため、中和試験による評価を行う必要がある。しかし中和試験でも MDCK 細胞分離株には低い交叉反応性しか示さなかった。MDCK 細胞分離株の HA の 197 番目のアミノ酸配列は糖鎖付加が起こる配列であるが、孵化鶏卵馴化のワクチン株は糖鎖が欠損する配列を持つ。この糖鎖の欠損が抗原性だけでなく、中和抗体との反応性にも影響を与えていることが示唆された。

A(H3N2)および B 型ワクチンの製造過程にお

ける HA 蛋白の変化は、孵化鶏卵を使用する上で必ず生じる問題点であり、これを解決するには培養細胞ワクチンの導入が必要である。

E. 結論

2010/11 シーズンワクチンについて、A(H1N1)pdm09 および A(H3N2)についてはワクチン効果が比較的期待できたが、B 型についてはワクチン効果の減弱が懸念された。

F. 研究発表

1. 論文発表

無し

2. 学会発表

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

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

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

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 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 第一室
研究協力者：高下恵美 同上
研究協力者：今井正樹 同上

研究要旨 2010/11 シーズンのインフルエンザ分離株について HA および NA 遺伝子解析を行った。同時に NA 阻害剤感受性試験を実施し、既知の薬剤耐性アミノ酸置換を有していないにもかかわらず、薬剤耐性を示す分離株を検出した。NA 遺伝子解析の結果、105 番アミノ酸の置換が薬剤耐性能獲得に関与する可能性が示唆された。plaque-purification 法および、reverse genetics 法により作製したウイルスを用いて NA 阻害剤感受性試験を実施し、E105K が薬剤耐性アミノ酸置換であることを同定した。

A. 研究目的

遺伝子情報を利用した解析と共に抗原性試験、薬剤感受性試験を実施することで、特定のアミノ酸置換が抗原性や薬剤耐性に与える影響を解析し流行株の予測に活用する。

B. 研究方法

各地方衛生研究所にて分離されたインフルエンザウイルス株を無作為に選択し、HA および NA 遺伝子配列を決定した。決定した塩基配列と海外から報告された分離株の塩基配列を用いてアミノ酸置換の解析および、遺伝子系統樹解析を実施した。

NA 遺伝子解析では、薬剤耐性に関与するアミノ酸置換の有無を解析した。NA 阻害剤感受性試験結果とアミノ酸置換の解析から、薬剤耐性能を与えるアミノ酸の推定を行った。過去に報告されていない、新規の薬剤耐性アミノ酸置換の可能性を有する株につ

いてはさらなる解析を実施した。具体的には、plaque-purified virus の作製、reverse genetics 法を用いた遺伝子組み換えウイルスを作製し、薬剤感受性試験を実施して薬剤耐性アミノ酸置換の同定を行った。また、コンピュータシミュレーションによるアミノ酸置換の立体構造への影響および、薬剤との結合強度への変化についても解析を進めている。

C. 研究結果

HA 遺伝子については 652 株、NA 遺伝子については 502 株の塩基配列を決定し、遺伝子解析を行った。

このうち、NA アミノ酸配列に既知の薬剤耐性アミノ酸置換が認められないにも関わらず、NA 阻害剤感受性試験で薬剤耐性を示す株（B/KOCHI/61/2011 株、抗ウイルス薬未投与例より分離）が見つかった。この株は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 IC50 値の上昇を示し、特にペラミビルに対し強い耐性が認められた。

他の流行株と共にアミノ酸解析を行ったところ、NA の 105 番アミノ酸が E (グルタミン酸) から K (リジン) へ変化していることが明らかとなった。そこで、このアミノ酸置換が薬剤耐性に関与していることを確認するため、plaque-purification 法および reverse genetics 法により E105K を有する純化ウイルスを作製し NA 阻害剤感受性試験を実施した。その結果、E105K がウイルスに薬剤耐性能を与えることが明らかとなった。またコンピューターを用いた解析により、E105K は NA 上で薬剤結合部位とは異なる部位に位置することが示唆された。

D. 考察

B 型インフルエンザから薬剤耐性株を検出した例は少ない。さらに今回検出した分離株は抗ウイルス薬未投与例からの株であり、耐性獲得機序が興味深い。臨床検体からも耐性アミノ酸置換を有するウイルスが検出されるか解析する必要がある。また、今までに報告されている NA 阻害剤耐性アミノ酸置換は全て NA の薬剤結合部位およびその近傍に集中している。一方 105 番アミノ酸は薬剤結合部位とは大きく離れており、今までにはない薬剤耐性アミノ酸置換例である。

E. 結論

分離株から新規の薬剤耐性アミノ酸置換 E105K を同定した。この置換がウイルス増殖へ与える影響を解析する必要がある。また、同時期・同地域に採取されたウイルス分離株を入手し、他に薬剤耐性株が存在しているか調べる必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

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.

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.

M. Ujike, M. Ejima, A. Anraku, K. Shimabukuro, M. Obuchi, N. Kishida, X. Hong, E. Takashita, S. Fujisaki, K. Yamashita, H. Horikawa, Y. Kato, A. Oguchi, N. Fujita, M. Tashiro, T. Odagiri and Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Monitoring and characterization of oseltamivir-resistant pandemic (H1N1) 2009 virus, Japan, 2009-2010. *Emerging infectious diseases.* 17: 470-479, 2011

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.

2. 学会発表

Hong Xu, Noriko Kishida, Emi Takashita, Seiichiro Fujisaki, Reiko Ito, Teruko Doi, Hiromi Sugawara, Miho Ejima, Namhee

Kim, Masato Tashiro, Takato Odagiri, The influenza virus surveillance group of Japan. Antigenic and genetic characterizations of influenza viruses isolated in 2010/11 season in Japan. International Union of Microbiological Societies, Sapporo, 2011 September.

Noriko Kishida, Hong Xu, Hiromi Sugawara, Reiko Ito, Teruko Doi, Emi Takashita, Seiichiro Fujisaki, Miho Ejima, Namhee Kim, Reiko Saito, Hideyuki Ikematsu, Masato Tashiro, Takato 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. International Union of Microbiological Societies, Sapporo, 2011 September.

Chiharu Kawakami, Emi Takashita, Miho Ejima, Seiichiro Fujisaki, Namhee Kim, Shuzo Usuku, Eishi Kurata, Mami Iwata, Takahiro Toyozawa, Takato Odagiri, Masato Tashiro. Neuraminidase inhibitor-resistant influenza a viruses detected in the 2010/11 season in Yokohama, Japan. International Union of Microbiological Societies, Sapporo, 2011 September.

Emi Takashita, Miho Ejima, Ikuyo Takayama, Mina Nakauchi, Seiichiro Fujisaki, Namhee Kim, Noriko Kishida, Hong Xu, Hiromi Sugawara, Reiko Itoh, Teruko Doi, Tsutomu Kageyama, Masato Tashiro, Takato Odagiri. 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.

G. 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

3. その他

なし

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 インフルエンザウイルス研究センター 研究員

研究要旨

培養細胞インフルエンザワクチンの製造にはワクチンシードウイルスを分離するための適切な培養細胞が必要である。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。筆者はワクチンシードウイルス分離用候補細胞（MDCK_N 細胞）から分離・継代した B 型インフルエンザウイルスについて、その抗原的安定性を評価した。抗原性解析に細胞由来ウイルスを感染させたフェレット抗血清を用いた場合、解析に供したウイルス株はいずれも継代過程において大きく抗原性が変化することは無かった。一方、鶏卵由来ウイルスを感染させたフェレット抗血清を用いた場合、ウイルスの系統に関係なくほとんど全てのウイルスは継代初期には低反応性であったが、B/Victoria 系統株については長期継代すると著しく反応性が增大した。以上の結果から、MDCK_N 細胞から分離された B 型インフルエンザウイルスは、長期継代によって細胞由来ウイルスとしての抗原性が変化することは無く、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有用性が示唆された。

A. 研究目的

培養細胞インフルエンザワクチンを製造するためにはワクチンシードウイルスを分離するための適切な培養細胞が必要である。候補となる培養細胞は高ウイルス分離効率、高ウイルス増殖性を兼ね備えていなければならないが、その培養細胞から分離されるウイルスについても長期に渡る継代に対して、遺伝的・抗原的に安定であることが要求される。筆者のグループではこれまでにいくつかの候補培養細胞を用いて評価を行い、MDCK_N 細胞がウイルス分離効率やウイルス増殖性の点において有用であることを見いだした。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った。

B. 研究方法

候補培養細胞として用いた MDCK_N 細胞は、ノバルティス社が開発した品質保証済のイヌ腎由来浮遊型 MDCK 細胞である。対照として、市中流行ウイルスの分離等にも用いられる附着型 MDCK 細胞（MDCK_C 細胞）を使用した。07/08、08/09 シーズン中に採取された臨床検体を用いて両細胞から分離・継代した B 型インフルエンザウイルスについて、HI 試験による抗原性

解析を行った。抗血清は、フェレットのウイルス感染血清を使用した。フェレットの感染には臨床検体採取当時の市中流行株を代表する基準ウイルスのうち、MDCK_C 細胞分離株と鶏卵分離株を使用した。また、赤血球は 0.75%モルモット赤血球を使用した。

(倫理面への配慮)

本研究において使用したウイルスはいずれも臨床検体より分離したものであるが、当該臨床検体についてはあらかじめ国立感染症研究所ヒトを対象とした医学研究倫理審査委員会より承認を受けた後、実験に供した。

C. 研究結果

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。

D. 考察

今回の解析により、ワクチンシードウイルス分離用候補細胞である MDCK_N 細胞と、対照である MDCK_C 細胞から分離された B 型インフルエンザウイルスは、B/Victoria 系統株でも B/Yamagata 系統株でも類似した抗原性を示すことが明らかとなった。分離された B/Victoria 系統株において抗細胞由来ウイルス抗血清への反応性が弱い傾向が観察されたが、これらのウイルス株の HA 遺伝子配列を解析したところ、その配列は今回解析に供した基準ウイルスの HA 遺伝子配列よりも、それ以前のシーズンに使用されていた基準ウイルス株の HA 遺伝子配列とより近縁であることが明らかとなった。それ故、今後最も遺伝的に近縁な HA を持つ基準ウイルスの抗血清を用いた解析を行わなければならない。また、分離された B/Victoria 系統株は両細胞での継代によって、抗鶏卵由来ウイルス抗血清に対して著しい HI 価の上昇が観察されたが、これらのウイルスの HA 遺伝子を解析する限り、鶏卵分離ウイルスに高率に観察され、ウイルスの抗原性変化に関与することが知られている、HA タンパクの糖鎖付加部位に相当する箇所への遺伝子変異との関連性は低いと考えられた。さらに、これらのウイルス株の抗細胞由来ウイルス抗血清に対する反応性は両細胞による継代によってほとんど変化しなかったことから、今回観察された抗鶏卵由来ウイルス抗血清への反応性の増大は、継代ウイルスの単純な鶏卵馴化様変化ではなさそうである。

MDCK_N 細胞分離ウイルス株については、これまでの筆者の研究グループによる解析も併

せると、A型、B型ウイルスともに対照であるMDCK_C細胞分離株と類似した抗原性を有することが明らかとなった。しかしながら、09/10シーズンより市中流行の主流となったA/H1N1pdm09ウイルスについては未解析であり、今後A/H1N1pdm09ウイルス及びそれ以降の季節性A/H1N1型ウイルスについてMDCK_N細胞による分離を試み、その抗原的安定性を評価しなければならない。

E. 結論

ワクチンシードウイルス分離用培養細胞候補であるMDCK_N細胞を用いて分離・継代したB型インフルエンザウイルスの抗原性は、対照となるMDCK_C細胞分離株のそれと類似し、長期に渡る継代においても細胞由来基準ウイルスに対する抗原性に関してほとんど変化することは無かった。それ故、MDCK_N細胞がワクチンシードウイルス分離用培養細胞として有用であることが、分離ウイルスの抗原的安定性の面からも示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

(発表誌名巻号、頁、発行年等も記入)

Yuichi Harada, Ai Ninomiya-Mori, Yoshimasa Takahashi, Masayuki Shirakura, Noriko Kishida, Tsutomu Kageyama, Yoshikazu Tada, Masato Tashiro, Takato Odagiri

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

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

Yuichi Harada, Hitoshi Takahashi, Masayuki Shirakura, Eri Nobusawa, Norio Yamamoto, Kazuya Nakamura, Itsuki Hamamoto, Hideki Asanuma, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Shigeyuki Itamura
Growth ability of reverse genetically generated influenza A/H1N1pdm09 viruses in MDCK and LLC-MK2 cell lines. XV International Congress of Virology, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, September 2011

G. 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

3. その他

なし

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 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 研究員

研究要旨

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。これを回避するために分離ウイルスの遺伝的安定性について解析を行い、抗原性維持に関するデータの集積を行った。本年度は B 型インフルエンザウイルスの B/Victoria 系統株と B/Yamagata 系統株に関して解析を行い、その結果、培養細胞を用いたウイルス分離・継代を行う過程において、系統株の種類により遺伝的安定性の保持に違いがあることが考えられた。また、培養細胞で継代されたこれらのウイルス株を鶏卵継代した場合、系統株の種類に関係なく遺伝的安定性が保持されにくいことが考えられた。

A. 研究目的

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。これを回避するために分離ウイルスの遺伝的安定性について検討しておくことが求められる。そこで、本研究では分離・継代ウイルスの遺伝子解析を行い、継代前後でワクチンシードに遺伝的変化がないかを確認する。変異導入が確認された場合、変異導入部位と抗原性変化との関係を調べることで得られる、抗原性維持に不利益な遺伝子変異のデータを集積することで、将来のワクチン品質管理に結びつける。

B. 研究方法

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分離したウイルスを 1 代目として、その後、同じ細胞を用いて 10 代目までウイルス継代を行った。ウイルスの遺伝子解析は、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 遺伝子について検討した。

また、各候補細胞を用いて 10 代継代したウイルスを鶏卵に接種し、分離したウイルスを 1 代目として、その後、鶏卵を用いて 8 代目までウイルス継代を行った。ウイルスの遺伝子解析は、最長継代 (8 代目) ウイルスを用いて、ウイルス HA および NA 遺伝子について検討した。鶏卵による継代でウイルスの遺伝子配列に変化が観察された場合、各継代数におけるウイルスの遺伝子解析を行って、その変異が導入された継代数を特定した。

ウイルスの遺伝子解析を行うための方法として、継代ウイルスからウイルス RNA を抽出し、

RT-PCR 法を用いて HA および NA 遺伝子の全長を増幅させた。この PCR 産物を鋳型としてシーケンス解析を行い、その塩基配列を決定した。HA、NA タンパクのアミノ酸配列は、遺伝子配列から推定した。

(倫理面への配慮)

本研究では、鼻腔スワブ等の臨床検体を用いるため、倫理委員会の承認を得た。試料は匿名処理を行うため個人情報が出ることはない。

C. 研究結果

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。

D. 考察

B/Victoria 系統株およびB/Yamagata 系統株について培養細胞で分離・継代する過程で、ウイルス遺伝子に変異が導入されるかについて検討を行ったところ、B/Victoria 系統株では高い変異出現が観察され、これらの変異は抗原部位および糖鎖付加に影響を与える部位であった。しかしながら、B/Yamagata 系統株については変異出現が観察されず、細胞継代においてはB/Yamagata 系統株の遺伝的安定性が保た

れていると考えられた。

培養細胞を用いて10代継代したB/Victoria 系統株およびB/Yamagata 系統株について鶏卵継代を行い、ウイルス遺伝子に変異が導入されるかについて検討を行ったところ、どちらの系統株でも 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。このことから、鶏卵継代では、培養細胞を用いた継代で遺伝的安定性が保たれていたウイルス株でも変異導入が起こり、遺伝的安定性が保たれにくいことが考えられた。

E. 結論

B 型インフルエンザウイルスに関しては、培養細胞を用いたウイルス分離・継代を行う過程において、系統株の種類により遺伝的安定性の保持に違いがあることが考えられた。また、培養細胞で継代されたウイルスを鶏卵継代した場合、系統株の種類に関係なく遺伝的安定性が保持されにくいことが考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表

Hitoshi Takahashi, Yuichi Harada, Noriko Shimasaki, Kazuya Nakamura, Itsuki Hamamoto, Norio Yamamoto, Takato Odagiri, Shigeyuki Itamura, Masato 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.

International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, September 2011

G. 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

3. その他

特記事項なし

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 インフルエンザウイルス研究センター 室長

研究協力者 原田勇一 インフルエンザウイルス研究センター 研究員

研究要旨 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。本研究では、リバーシジェネティクス法（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。そのため鶏卵培養用インフルエンザワクチンに利用されている高増殖性のウイルスを培養細胞に馴化させる試みを行った。方法は、RG 法で作成された H1N1pdm09 ワクチンシードウイルス（RG ウイルス）を MDCK 細胞に感染・継代し、その増殖性を評価した。その結果、MDCK 細胞で 10 代継代した RG ウイルスは高増殖性を示すようになった。一方、MDCK 細胞による継代過程で生じたウイルスゲノム上の変異は少数に限られていた。以上の結果から、RG ウイルス細胞馴化株と同様の遺伝子変異を有するウイルスを、細胞培養用インフルエンザワクチンシードウイルスとして利用できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

現在、国のパンデミック対策の一環として細胞培養インフルエンザワクチンの開発・製造体制の確立が進められている。ワクチン製造にあたっては、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の開発が必要である。RG 法は安定した高増殖性ウイルスを作製できるだけでなく、ウイルスの弱毒化も行うことができるため、パンデミックウイルスに対するワクチン開発においても、有用である。本研究では、現行の鶏卵培養インフルエンザワクチンに使用されている、母体ウイルスを用いて作製された RG ウイルスを、培養細胞で継代して、ウイルスの増殖性と遺伝的変異を解析することで、現行の RG 系母体ウイルスが培

養細胞ワクチンにも応用可能であるか、評価を行った。

B. 研究方法

現行の RG 系を用いて図 1 に示すウイルスゲノム構成を持った RG ウイルスを作製した。ワクチンシードウイルスの主体となる 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 (Ca17) 株のものを使用した。入手した Ca17 ウイルスは、HA 遺伝子の 226 番目のアミノ酸がアルギニン (R) とグルタミン (Q) のウイルスが、混在していたため、226R、226Q それぞれを有するウイルスを作製しており、本研究でも両ウイルスを使用した。鶏卵培

養では、226Rを有するウイルスは、226Qを有するウイルスに比べ、増殖性が高かった。各RGウイルス用のプラスミドをLLC-MK2細胞に導入し、その培養上清をウイルス原株として用いた。原株ウイルスをMDCK細胞に接種し、34°C、72時間培養した後その培養上清を回収した。この培養上清を新たなMDCK細胞に接種し、上清を回収する作業を繰り返し、RGウイルスを10代目まで継代した。継代したウイルスの力価はHA法、TCID₅₀法により測定した。RGウイルスの遺伝子配列はダイレクトシーケンス法により解析した。

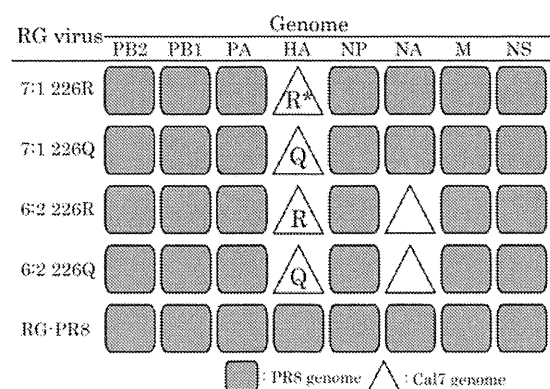


図1. RGウイルスのゲノム構成

(倫理面への配慮)

ヒト由来の実験材料を使用しないため、特になし。

C. 研究結果

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(図2)。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10⁷ TCID₅₀/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。

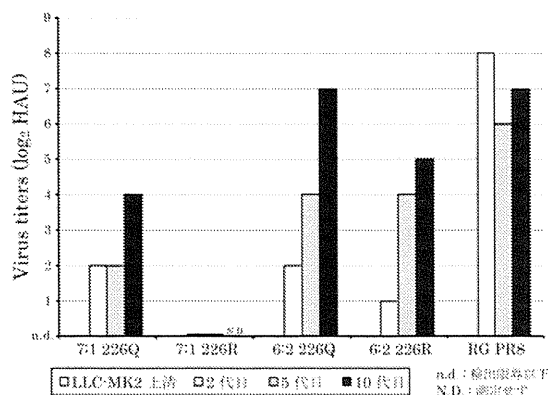


図2. MDCK細胞で継代したRGウイルスのウイルス力価

D. 考察

鶏卵培養ワクチン用の母体ウイルスを持つRGウイルスを、MDCK細胞で継代することで、増殖能を改善できることが明らかとなった。RGウイルスのMDCK細胞への感染には226Rを有するHAは、不利である事が示唆されたが、この性質はCal7株のHA、NA両遺伝子を有する6:2 226Rウイルスでは、改善された。また、PB1及びNS1遺伝子上に観察された変異は既に他のウイルス株において、ウイルスの増殖性に関わることが指摘されている箇所と同一であり、今回解析したいずれのウイルス株も宿主受容体への親和性を左右すると考えられるようなHA遺伝子上の変異は有さなかったこと

からも、PB1 や NS1 遺伝子の変異と高増殖性化との関連性が示唆された。今後、今回の解析で観察された遺伝子変異と、RG ウイルスの増殖性との関係を明らかにするとともに、MDCK 細胞で継代した RG ウイルスがワクチン株と同等の抗原性を保持しているのか、更なる解析を進めなければならない。

E. 結論

鶏卵型ワクチン用に開発された RG ウイルスは、細胞馴化可能であることが明らかとなった。さらに詳細な解析が必要ではあるものの、ごく限られた遺伝子変異を導入することによって、鶏卵型ワクチン用の RG 系を培養細胞ワクチン用へと応用できる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Yuichi Harada, Hitoshi Takahashi, Masayuki Shirakura, Eri Nobusawa, Norio Yamamoto, Kazuya Nakamura, Itsuki Hamamoto, Hideki Asanuma, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Shigeyuki Itamura

Growth ability of reverse genetically generated influenza A/H1N1pdm09 viruses in MDCK and LLC-MK2 cell lines. XV International Congress of Virology, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, September 2011

G. 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

3. その他

なし

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

研究分担者 浅沼秀樹 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主任研究官

研究要旨 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行った。2009-2010 シーズンに A 型インフルエンザに罹患した患者 33 例から採取された鼻腔拭い液を MDCK 細胞ならびに発育鶏卵でウイルス分離を行った結果、MDCK 細胞で 25 例、発育鶏卵で 13 例で分離に成功した。その後、各分離株の継代を行い、HA 価 512 以上までの高い増殖性を示し、抗原性の変異が認められなかった株の不活化抗原をマウスに接種し、防御効果ならびに免疫応答を検討した結果、細胞で分離・継代した株と、発育鶏卵で分離・継代した株では相違がないことが明らかとなった。このことはウイルス分離および増殖効率は細胞培養法が有意に高く、免疫原性および防御効果もこれまでの鶏卵培養と同等の効果が期待できることを示唆している。

A. 研究目的

現行のインフルエンザワクチンの種株には、発育鶏卵でウイルスを分離し、継代することで高い増殖能を獲得した株もしくは高増殖性を示す PR8 株とのリアソータン株が用いられている。しかし近年の流行株は発育鶏卵で分離することが困難になり、さらには増殖性も低下している。しかも、鶏卵を用いてウイルスの継代・増殖を行うことで、抗原性が変化し、流行株の抗原性との相違を生じ、防御効果が顕著に低下することも指摘されている。特に H3N2 株は漿尿膜腔内接種方ではほとんど分離できず、高い技術を要する羊膜腔内接種でのみ、わずかに分離できるのが現状である。一方、Madin Darby Canine Kidney (MDCK) 細胞株はインフルエンザの培養に非常に優れており、現存する大部のインフルエンザ株について

の増殖が認められている。この細胞をインフルエンザのワクチン作製に用いることで、多くの株を容易に分離することが可能となり、流行株との抗原性が一致したより適切な株を選択することが可能となる。また、煩雑な遺伝子操作技術を用いることなく高い増殖性を有する株の選択も容易となり、しかも、これまで発育鶏卵の数によって制約されていたワクチンの製造量の問題点も解決できる。しかし、一方では細胞を用いた継代による抗原性の変化や、免疫原性およびワクチン効果については不明な部分も多い。そのため本研究では、患者検体から MDCK 細胞および発育鶏卵でのウイルス分離効率、増殖性、抗原性ならびに免疫原性を検討した。

B. 研究方法

1. ウイルス分離・継代

ウイルスの分離には、2009-2010 シーズンにインフルエンザに罹患した患者 33 例から採取された鼻腔拭い液を用いた。検体の採取は、国立感染症研究所の倫理委員会の承認を受け、採材および研究での使用の承諾が得られた患者から提供いただいた。検体は個人情報特定できないように、また必要時には適切な情報提供ができるよう、情報の管理を行っている。

ウイルス分離には、MDCK細胞と 10 もしくは 11 日齢発育鶏卵を用いた。簡易診断キットでインフルエンザ陽性の患者より鼻腔スワブを採取し、24 穴培養プレートで単層に培養されたMDCK細胞に、1mLのアセチルトリプシン加Opti-MEMと鼻腔スワブ液 10 μ Lを添加し 37 $^{\circ}$ C、CO₂インキュベーターで 2-5 日間培養した。CPEが認められたサンプルを回収し、0.5%七面鳥赤血球を用いてHA価を測定して継代に用いた。継代は 6 穴培養プレートを用い、2mLのアセチルトリプシン加Opti-MEMにウイルス液を 2 μ L添加し継代した。一方、10 もしくは 11 日齢の発育鶏卵にPBSで 10 倍希釈した鼻腔スワブ液を 200 μ L接種し、加湿下 35 $^{\circ}$ Cで 2 日間培養した。低温下で安楽殺し、漿尿液を回収、HA価を測定して継代に用いた。HA価が認められた株は 100 倍希釈の漿尿液を用いて継代し、HA価が認められなかった株は 10 倍希釈の漿尿液を用いて継代した。

2. ウイルスの不活化

ウイルス培養液もしくは漿尿液を 20%スクロースに重層し、超遠心でウイルスを精製した。続いてジエチルエーテル、ホルムアルデヒドを加え、遠心後に抗原分画を回収した。抗原の不活化試験は発育鶏卵への

接種実験により増殖性が認められないことを確認した。

3. 品質管理

不活化抗原のタンパク量は Micro-BCA 法を用い、HA含有量の定量は SDS-PAGE と SRD 法を用いた。Micro-BCA 法は、段階希釈した抗原蛋白と標準 BSA 蛋白に、BCA 試薬を加え、562nm の波長における吸光度を測定し、BSA の検量線を基準に抗原蛋白量を算出した。

4. 抗原性試験

細胞および発育鶏卵で分離・継代したウイルスの抗原性試験は 0.5%七面鳥赤血球 (TRBC)を用いて HA 価を測定し、8HA/50 μ L に調整後、あらかじめ段階希釈を行ったフェレット抗血清 (A/California/7/2009 株) と混合し、TRBC に対する凝集阻害能を測定した。

5. 免疫方法

日本 SLC より購入した BALB/c マウス (6-10 週齢、メス) に、PBS で希釈した不活化抗原 (1 もしくは 10 μ g) を皮下接種 (100 μ L) し 3 週後、同量を追加接種した。その 2 週後、A/Narita/1/2009 株をチャレンジし、3 日後に全採血を行い肺洗浄液を回収した。動物実験は国立感染症研究所・実験動物委員会の承認のもとで行われ、すべての免疫処置は麻酔下で行い、安楽殺は麻酔下における心臓からの全採血を行った。

6. ウイルス価測定

ウイルス価の測定は、従来行われているプラーク法を用いた。回収された肺洗浄液は 0.1%BSA 加 PBS で 10 倍段階希釈を行い、6 穴プレートに単層培養された MDCK 細胞に吸着させ、2%アガロース加 MEM を

加えた。2 日間培養し、アガロースを剥離し、乾燥後、クリスタルバイオレットで染色、プラーク数をカウントした。

7. 抗体価測定

抗体価の測定は、従来行われている酵素抗体測定法(ELISA)を用いた。抗原を吸着させ、ブロッキングを行った 96 穴プレートに、2 倍段階希釈したサンプル、ビオチンラベル抗マウス抗体、アビジン付加酵素(ALP)、基質(p-NPP)の順で添加した。十分な発色が認められた後、分光光度計で波長 415nm の吸光度を測定した。

C. 研究結果

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 (Table 1)。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 (表 3)。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、抗原性の変異を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、種ウイルスの選定からワクチン化、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 (図 1)。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 (図 2A)。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 (図 2B)。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 (図 3)。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。

D. 考察

本研究では、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のうち、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、安全性等に関する検討を行った。ウイルスの分離効率は、現行の発育鶏卵と MDCK 細胞を用いて同じ臨床検体から分離した場合の効率を比較した。今回分離に

用いた MDCK 細胞は、インフルエンザに対する感受性が高く、各衛生試験場でも分離に使用されている培養細胞である。また、この細胞は実際に細胞培養ワクチンが実用化された場合に使用される可能性も高いことからこの細胞を用いて解析を行った。医療機関で簡易診断キットによる A 型の感染を示し、遺伝子検査より A/H1N1pdm09 株陽性の臨床検体 33 例について分離を試み、25 例で培養細胞での分離に成功したが、鶏卵では 13 例にとどまった。しかも培養細胞で分離された株 (C1) ではすべてに HA 価が認められたのに対し、鶏卵で分離された 13 例中 5 例では初代培養 (E1) での HA 価が認められなかった。続いて分離されたウイルスをそれぞれ継代し、増殖効率について検討したところ、細胞培養法で分離・増殖させた場合の方が顕著に高い増殖性を示した。近年、インフルエンザウイルスは鶏卵における分離効率が低下していると指摘されているが、2008 年までの季節性株で認められていた現象であり、A/H1N1pdm09 株では流行初期に明確に示されていない。しかし本研究から、A/H1N1pdm09 株でも細胞で分離・増殖させた場合の方が、効率が良いことが明らかとなった。一方、抗原性の解析から、これまで培養細胞では抗原性の変異は少ないとされていたが、MDCK 細胞においても鶏卵と同様に継代を繰り返すことで変異することも認められた。遺伝子解析の結果においても細胞培養、発育鶏卵それぞれの継代による変異の傾向は認められており (結果非表示)、このことはより多くのワクチン候補株を準備し、継代による変異の検討を行う必要があることを示唆している。

鶏卵培養ワクチンの場合、生産される鶏卵数に限りがあることや卵あたりの増殖性が低い場合の生産費の増大を考慮し、原株