

よりも増殖性の高いリアソータントと用いることが多い。しかし MDCK 細胞を用いた場合、分離効率ならびに増殖効率も高いため、リアソータントを作製する必要性がなくなることも考えられる。そこで細胞分離株で作製したワクチンの効果を比較するためには、同じ検体由来で鶏卵における高い増殖性を獲得した株が必要になる。鶏卵で分離された株を継代し、高増殖性を獲得した株のうち、抗原性や蛋白量を比較した結果、TK14 株が最もワクチンに適していた。そのため鶏卵もしくは細胞分離 TK14 株でワクチンを作製し、マウスに接種し免疫誘導能ならびに防御効果を検討した。その結果、免疫誘導能、防御効果ともに同等であった。このことは現行の鶏卵培養ワクチンから細胞培養ワクチンに移行した場合でも、同等の効果が期待できることが示唆される。しかも分離効率や生産性は細胞培養ワクチンの方が優れているため、より安全性が高く、有効なワクチンが提供できる。しかしその一方、現行の HA 力価測定に SRD 試験が採用されているが、細胞培養株は鶏卵株で作製されたヒツジ抗体を使用した本試験に対する反応性が低下していた。このことは、今後の HA 力価の評価方法を検討する必要があることも示唆している。

## E. 結論

今回の研究で、臨床検体からのウイルス分離および増殖は、培養細胞を用いた場合の方が、現行の鶏卵培養よりも有意に高い結果が得られた。また免疫誘導能および防御効果も鶏卵培養と同等であった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし。

### 2. 学会発表

2011 年国際ウイルス学会（2011 年 9 月、札幌）

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

## 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。

表 1 ウイルスの分離効率と増殖性

	細胞	発育鶏卵
分離ウイルス株数	25/33 (76%)	13/33 (39%)
高増殖株数	17/25 (68%)	5/13 (38%)
高増殖株数/全検体数	17/33 (52%)	5/33 (15%)

表2 患者検体から細胞もしくは発育鶏卵でウイルス分離・継代した株の HA 価

検体 ID	鶏卵(E)		継代歴								
	細胞(C)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
TK1	E	< 2	16	128	256	128	256	128	128	128	128
	C	32	32	32	512	256	512	256	512	256	512
TK2	E	< 2	< 2	N.D.*							
	C	64	32	32	512	256	128	64	512	256	256
TK5	E	< 2	8	4	32	8	8	64	128	64	16
	C	32	8	128	512	256	256	32	512	256	256
TK6	E	< 2	< 2	N.D.							
	C	32	32	128	256	256	256	128	256	256	256
TK7	E	32	64	128	64	64	128	128	64	256	256
	C	32	32	256	512	128	256	32	256	128	512
TK8	E	2	32	16	32	32	16	32	32	128	128
	C	8	256	128	256	512	128	64	256	256	256
TK10	E	< 2	< 2	N.D.							
	C	64	32	64	128	128	32	16	64	64	128
TK11	E	< 2	< 2	N.D.							
	C	128	32	32	128	256	64	64	256	256	256
TK12	E	< 2	2	64	128	64	128	128	256	256	512
	C	8	16	256	512	256	256	128	256	256	256
TK13	E	< 2	< 2	N.D.							
	C	128	64	32	256	128	64	32	512	256	256
TK14	E	< 2	128	256	512	512	512	512	512	256	128
	C	32	32	64	512	512	256	128	256	256	256
TK16	E	< 2	< 2	N.D.							
	C	32	8	128	256	256	128	128	256	128	256
TK17	E	< 2	< 2	N.D.							
	C	64	16	128	256	512	256	256	512	256	256
TK18	E	< 2	64	128	128	64	64	64	64	128	64
	C	16	128	256	512	256	128	16	256	128	256
TK19	E	< 2	< 2	N.D.							
	C	16	4	256	256	512	256	128	512	128	256
TK20	E	< 2	< 2	N.D.							
	C	4	32	32	512	256	256	64	512	256	256
TK21	E	< 2	32	32	128	128	16	64	64	64	32
	C	8	32	128	256	512	64	32	256	128	256
TK22	E	< 2	64	256	256	256	256	512	256	256	512
	C	64	128	512	128	64	16	16	64	128	256
TK24	E	2	16	8	32	32	64	32	16	64	64
	C	64	8	32	32	128	512	256	128	256	256
TK26	E	< 2	< 2	N.D.							
	C	128	N.D.								
TK27	E	< 2	2	128	256	64	64	32	128	128	256
	C	32	8	8	128	512	256	256	256	256	256
TK28	E	< 2	< 2	N.D.							
	C	32	N.D.								
TK29	E	16	32	32	32	64	512	128	256	512	512
	C	8	16	128	128	512	256	256	256	256	256
TK31	E	2	32	128	128	128	128	256	512	512	512

TK33	C	128	8	32	16	256	128	512	256	256	256
	E	< 2	< 2	N.D.							
	C	16	N.D.								

\*N.D: not determined

表3 分離・継代株の抗原性試験(HI)

検体 ID	継代歴	HA 価	Ferret serum
			A/California/07/2009
TK1	E4	256	> 10240
	E10	128	> 10240
	C3	32	> 10240
TK7	E4	64	10240
	E10	256	> 10240
	C3	256	1280
TK8	C3	128	1280
TK12	E4	128	2560
	C4	256	2560
TK14	E4	512	5120
	E10	512	5120
	C3	64	10240
TK17	C3	128	1280
TK18	E4	128	5120
	E10	64	2560
	C4	512	640
TK19	C3	256	1280
TK22	E4	256	5120
	E10	512	10240
TK27	E4	256	2560
	E10	256	640
TK29	E4	32	640
TK31	E4	128	2560
A/C07	E4	64	10240

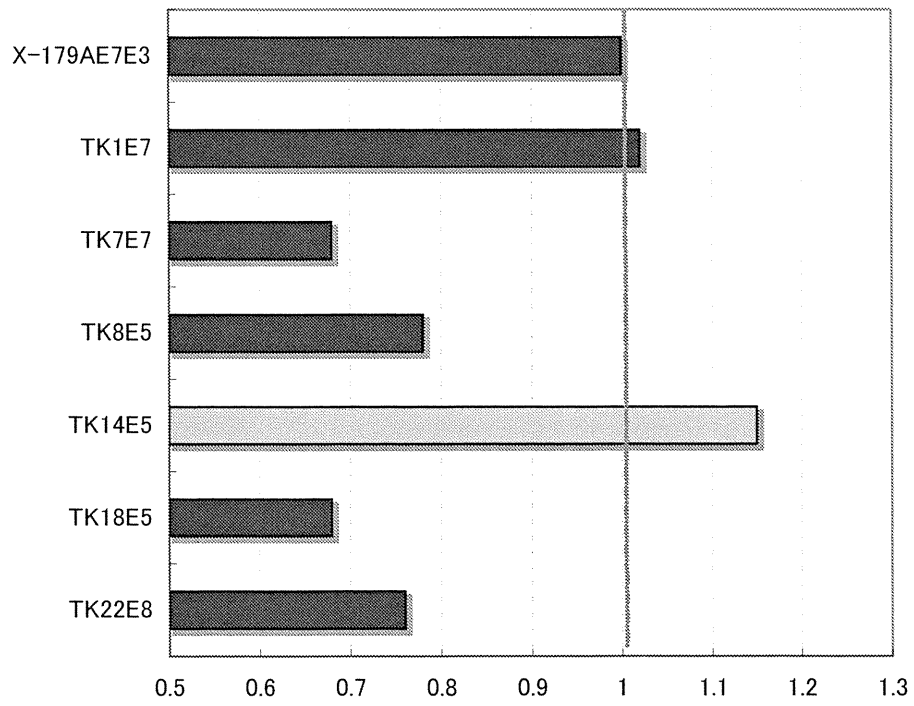


図1 鶏卵分離株のタンパク量の比較

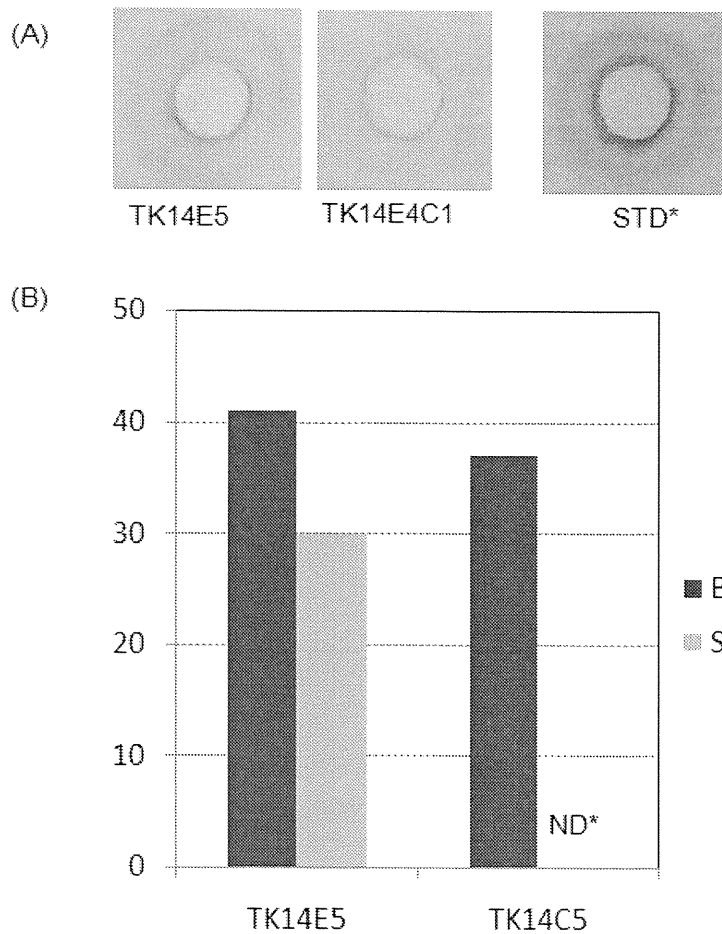


図2 細胞もしくは鶏卵で分離した不活化 TK14 株の SRD 試験  
 (A) TK14 検体を MDCK 細胞もしくは発育鶏卵で分離し、それぞれで増殖させ不活化した抗原の SRD 試験  
 (B) SRD 試験によって算出された HA 量と BCA 法と SDS-PAGE により算出された HA 量の比較図

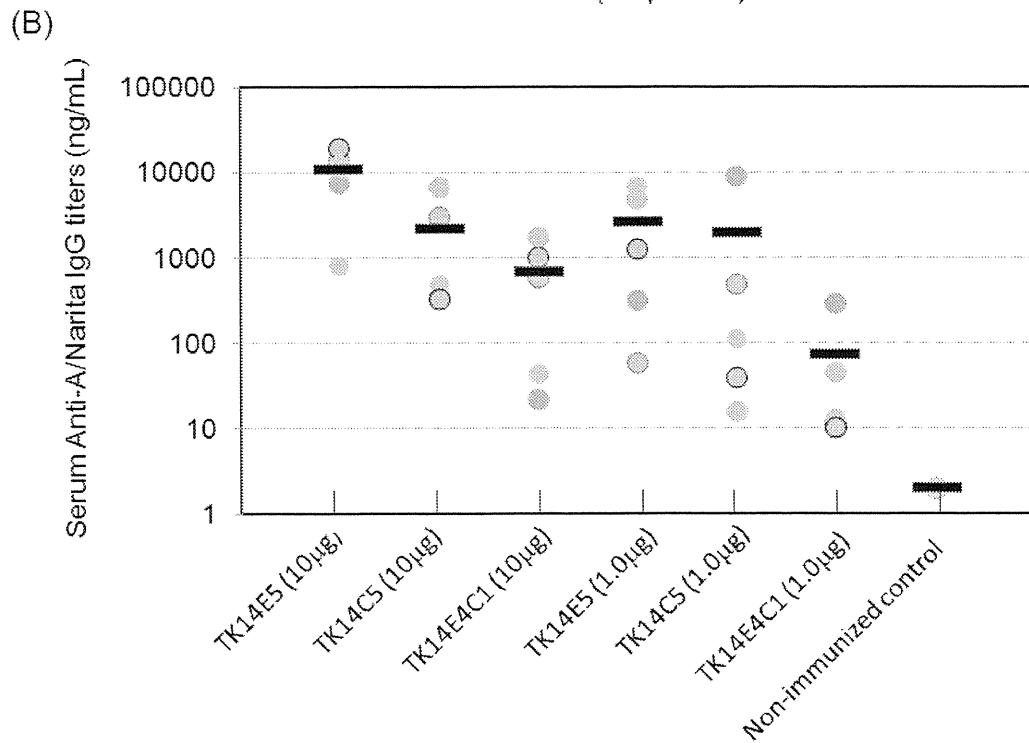
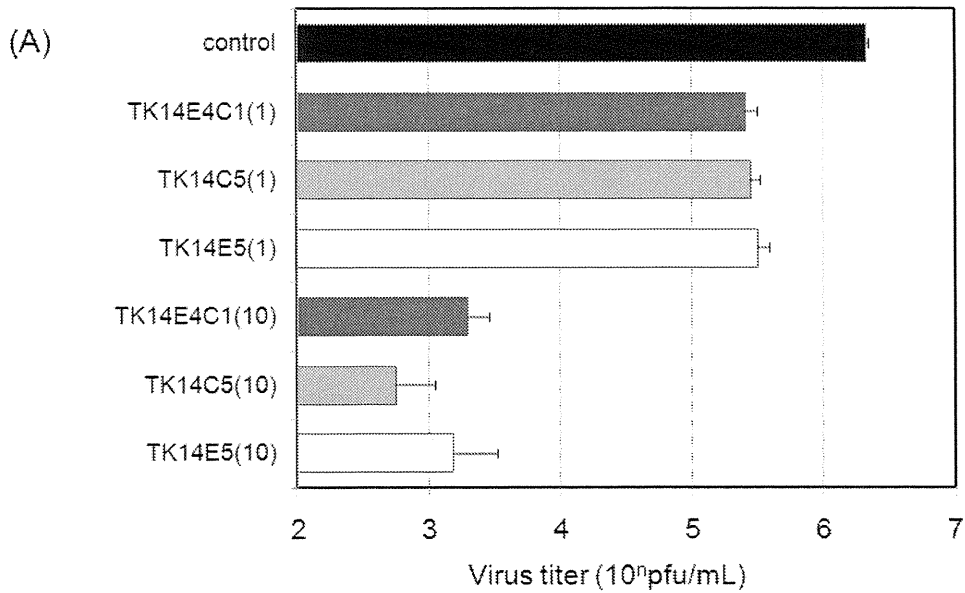


図3 細胞もしくは鶏卵で分離したウイルス由来のワクチンを接種したマウスにおける防御効果(A)および抗体応答(B)

マウスに鶏卵培養株由来、細胞培養株由来ならびに鶏卵分離・培養株を細胞で増殖させた株由来のワクチンをマウスに2回皮下接種し、A/Narita株を感染させ、肺洗浄液中のウイルス価を測定した(A)。接種したワクチンの蛋白量は10もしくは1µg/100µLで、それぞれ群で5匹のマウスを使用した。このとき回収された血清の抗A/Narita株IgGをELISAによって測定した(B)。

## 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 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5室 室長

**研究要旨** 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に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。その結果、これまで実施した試験においては特に問題となる点を認めなかった。今後の試験結果を待たなければならぬが、実際に使用できる可能性が明らかとなった。

迷入ウイルス検出系については、選定したキットにおいて感度が非常に高い場合とそうでない場合があり、今後範囲を広げて解析を進める必要がある。

ワクチンシードウイルスの分離・増殖に使用するGMPグレードのセルバンクを構築すること及びワクチンシードウイルスに混入する可能性のある迷入ウイルスの検出系を構築することにより、安全性の高いワクチンシードウイルスを国内で製造するための基盤を確立することが出来ると期待される。

### A. 研究目的

細胞培養法は新しいワクチン製造法として注目されているが、この方法では以下の通り2つの利点があると考えられている。

1つ目の利点はウイルスの基質となる培養細胞を容易にかつ安定的に短期間の内に調製できるため、新型インフルエンザ発生時でも、ワクチンを短期間に製造できることである。

2つ目の利点は、細胞培養ワクチンでは発育鶏卵への馴化過程が不要なため、これに伴う遺伝子変異が起こらず、抗原性が維持されて有効性が高いと考えられる点である。

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にワクチンシードウイルスを作製する必要がある。すなわち細胞培養法によるワクチンシードウイルス作製システムを確立することが必須である。

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、MDCK細胞のセルバンクの構築とセルバンクの評価を行った。また、シードウイルスに混入する可能性のある迷入ウイルスの検出系についても検討を行った。

### B. 研究方法

1)セルバンクの評価について

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) を構築した。さらに、シードウイルス作製のために必要な細胞継代数を想定し、GMP基準に準拠した方法でその時点まで継代を重ねた細胞 (End of Production Cell, EOPC) の細胞ストックを作製した。

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以下の試験を行った。

[MCB]

- Sterility Testing by Direct Inoculation Method
- Test for the presence of Agar-cultivable and Non Agar-cultivable Mycoplasma
- Test for Mycobacterium spp Culture Medium Method
- Identification & Characterisation of Cultured Cells by Analysis of 4 Isoenzymes
- DNA fingerprinting of cell lines
- Karyology of non-human mammalian cell lines (50 metaphases)

[WCB]

- Sterility Testing by Direct Inoculation Method
- Test for the presence of Agar-cultivable and Non Agar-cultivable Mycoplasma
- Test for Mycobacterium spp Culture Medium Method
- In vitro Assay for the Presence of Adventitious Viral Contaminants
- Identification & Characterisation of Cultured Cells by Analysis of 4 Isoenzymes
- DNA fingerprinting of cell lines
- Karyology of non-human mammalian cell lines (50 metaphases)

[EOPC]

• Sterility Testing by Direct Inoculation Method

• In vitro Assay for the Presence of Adventitious Viral Contaminants

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

• Detection and Quantification of Reverse Transcriptase activity by QFPERT Assay

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

• Real Time PCR Detection of Bovine/Porcine Circovirus (PCV)

2) 迷入ウイルス検出系の評価について

注意すべき重要な迷入ウイルスとして呼吸器系ウイルスを想定し、まずパラインフルエンザウイルスについてウイルス検出系の評価を行うこととした。検出系としては、幅広いウイルス種がカバーされていることから、Primerdesign社製のReal-time PCR pathogen detection kitを用いた。力価が既知のウイルス液を用いて、Real-time PCRでどの程度のウイルス量まで検出できるかを検討した。

(倫理面への配慮)

本研究の研究対象は既に樹立されている細胞を出発材料としており、倫理面の問題はないと判断した。

## C. 研究結果

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

TH10 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、TH10 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。

[EOPC]

・ Sterility Testing by Direct Inoculation Method

TH10 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。

以上をまとめると表1のようになる。

## 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

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。

## D. 考察

細胞培養ワクチンの持つ長所を最大限に引き出すためには、ワクチンシードウイルスを鶏卵培養のステップを経ずに作製することが必要である。危機管理上の観点からも、海外に依存せず国内でワクチンシードウイルスを製造できる体制を整備しておくことは重要と思われる。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を形成するために、GMP基準に適合したMDCK細胞のセルバンクの構築と評価を行った。ワクチンシードウイルスの作製に使用する細胞は、安全性に問題がないことを信頼性の高い方法で十分検討する必要がある。そこで、MDCK細胞 (MCB、WCB、EOPC) について迷入因子否定試験、特性試験をGMP基準に準拠した方法で行った。

迷入因子の存在を否定するため、無菌試験、マイコプラズマ検出試験、マイコバクテリウム検出試験、迷入ウイルス検出のためのin vitro試験、電子顕微鏡による観察試験、逆転写酵素活性試験、ブタウイルス検出試験を行ったところ、いずれも陰性であった。よって、これまでの試験結果からは迷入因子は存在しない（検出限界以下）と考えられた。

また特性試験としてはKaryology、Isoenzyme analysis、DNA fingerprinting analysisを行った

が、いずれの結果も構築したセルバンクの特性が従来のMDCK細胞の特性と一致していることを示していた。よって、これまでの特性試験の結果については問題がないと判断した。

まだ全ての試験が終了した訳ではないが、全体として構築したセルバンクについて特に問題となる点は認めなかった。

感染研で構築したMDCKセルバンクは、全ての試験で問題がないという結果が得られれば、臨床検体からのシードウイルスの分離、リバーシ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。迷入ウイルス検出系の整備も合わせて進めることで、より安全性の高い細胞培養ワクチンシードウイルスの製造・供給が可能になると期待される。

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。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。このMDCKセルバンクは、国内の細胞培養ワクチンシードウイルス開発の基盤となるばかりではなく、海外の機

関でも使用される可能性があり、国際的な細胞培養ワクチンシードウイルス開発において大きく貢献するものとなり得る。

## E. 結論

感染研で構築したMDCKセルバンクは、これまでの安全性試験・特性試験において特に問題となる点を認めなかった。今後の試験結果を待たなければならないが、実際に使用できる可能性が明らかとなった。迷入ウイルス検出系については、選定したキットにおいて感度が非常に高い場合とそうでない場合があり、今後範囲を広げて解析を進める必要がある。ワクチンシードウイルスの分離・増殖に使用するGMPグレードのセルバンクを構築すること及びワクチンシードウイルスに混入する可能性のある迷入ウイルスの検出系を構築することにより、安全性の高いワクチンシードウイルスを国内で製造するための基盤を確立することが出来ると期待される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

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]

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」, クリネス, 313:8-9, 2011

### 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.

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)

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

Kazuya Nakamura, Yuichi Harada, Hitoshi Takahashi, Itsuki Hamamoto, Masato Tashiro, Norio 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)

Itsuki Hamamoto, Nobumasa Yamaguchi, Soichi Ogishima, Ken Miyaguchi, Yuichi Harada, Hitoshi Takahashi, Masato Tashiro, and Norio Yamamoto. Analysis of influenza virus infection in human nasopharyngeal and oropharyngeal cells.

The Fourth ESWI Influenza Conference. 11 September 2011, Malta

Itsuki Hamamoto, Nobumasa Yamaguchi, Soichi Ogishima, Ken Miyaguchi, Yuichi Harada, Hitoshi Takahashi, Masato Tashiro, and Norio 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

Development of the anti-viral agents blocking the function of hemagglutinin of influenza virus: Tyuji Hoshino, Hiroshi Yanagita, Hideyoshi Fuji, Xinli Liu, Norio Yamamoto 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)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

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

Cell	Test	Results
MCB	Sterility Testing by Direct Inoculation Method (EP, USP and JP)	Negative
MCB	Test for the presence of Agar-cultivable and Non Agar-cultivable	Negative
MCB	Test for Mycobacterium spp Culture Medium Method	Negative
MCB	Identification & Characterisation of Cultured Cells by Analysis of	Canine
MCB	DNA fingerprinting of cell lines	Identical pattern to MDCK
MCB	Karyology of non-human mammalian cell lines (50 metaphases)	Consistent with a cell line of
WCB	Sterility Testing by Direct Inoculation Method (EP, USP and JP)	Negative
WCB	Test for the presence of Agar-cultivable and Non Agar-cultivable	Negative
WCB	Test for Mycobacterium spp Culture Medium Method	Negative
WCB	In vitro Assay for the Presence of Adventitious Viral	Negative
WCB	Identification & Characterisation of Cultured Cells by Analysis of	Canine-equivalent to MDCK cell
WCB	DNA fingerprinting of cell lines	Identical pattern to MDCK
WCB	Karyology of non-human mammalian cell lines (50 metaphases)	Consistent with a cell line of
EOPC	Sterility Testing by Direct Inoculation Method (EP, USP and JP)	Negative
EOPC	In vitro Assay for the Presence of Adventitious Viral	Negative
EOPC	Transmission Electron Microscopic Examination of Cell Cultures	No virus, virus-like particles,
EOPC	Detection and Quantification of Reverse Transcriptase activity by	Negative
EOPC	In vitro Assay, Detection of porcine Viral Contaminants using	Negative
EOPC	Real Time PCR Detection of Bovine/Porcine Circovirus (PCV)	Negative (assay sensitivity: 20

表1 MDCK細胞 (MCB, WCB, EOPC) に対する試験結果

## 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 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** 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。患者臨床検体の供試細胞への接種により全検体からウイルスが分離され、分離用細胞としての有用性を示す一方、分離ウイルスの HA 価が低いといった今後克服していくべき留意事柄を明らかにした。

### A. 研究目的

従来の鶏卵を用いたインフルエンザウイルス分離法は、最近の野外株の分離効率低下や分離株の性状変化など懸念すべき点が多い。インフルエンザウイルス野外株をその性状を保たせながら、効率よく分離する手法の確立は、流行株の正確な性状把握や流行株に即したワクチン製造に必須であり、培養細胞を用いたウイルス分離法が、鶏卵分離法で生じる問題点の克服において有望視されている。

本研究では、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、将来のサーベイランス業務、ワクチンシード調製に資することを目的とし、本年度は MDCK 系統の 2 種類の細胞を用いて、近年出現し、インフルエンザ流行の主因となっている A/H1N1pdm09 亜型株 (H1pdm) について、患者臨床検体からのウイルス分離効率を検討し、野外株分離における有用性を評価した。

### B. 研究方法

#### 1) 細胞株

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) を本実験に使用した。分離効率の比較評価用に当研究所でインフルエンザウイルス分離に用いられている付着培養系 MDCK 細胞 (MDCK\_Conv) を用いた。MDCK\_NVD の維持は、至適化 CDM 培地 (Lonza 社) を用いた震盪培養にて、MDCK\_Conv の維持には 10%FCS 添加 MEM 培地を用いた静置培養にて、標準手順書に記載の手法に従って行った。

#### 2) 臨床検体

2010/2011 シーズンに医療機関を受診したインフルエンザ患者から採取した鼻腔ないし咽頭拭い検体のうち、特異的プローブ・プライマーセットを用いたリアルタイム RT-PCR 法にて H1pdm 陽性と判定された検体をウイルス分離用試料に供した。

#### 3) ウイルス分離・継代

50ml 規格のプラスチック遠沈管に  $5 \times 10^6$  個/5ml で分注調製された MDCK\_NVD 細胞に供試検体 50 $\mu$ l を接種し、34°C、5%CO<sub>2</sub>

の恒温条件下で72時間震盪培養した。MDCK\_Convはφ60mmディッシュに1.5x10<sup>6</sup>個/枚で播種、静置培養三日目に臨床検体50μlとOPTI-PRO SFM培地（GIBCO社）150μlを混合したものを接種した。ウイルス接種後の培養維持には血清不含のOPTI-PRO SFM培地を使用し、34℃、5%CO<sub>2</sub>の恒温条件下で72時間静置培養した。

接種72時間後に培養液を回収遠心し、得られた上清中の赤血球凝集（HA）活性の有無によりウイルス分離の成否を判定した。HA活性が確認されなかった場合には、1回盲継代を行った後の成績をもって、分離成否の判定とした。

分離されたウイルス株について、同様の継代操作を10代まで繰り返し、ウイルスの増殖性の変遷を観察した。継代用接種には分離ウイルスのHA価に基づき、1HA価分のウイルスを希釈調整したものをを用いた。

#### 4) HA 試験

HA試験は定法に従い行った。検体ウイルスの2倍階段希釈列を作製し、これにウイルス液と等量の0.75%モルモット赤血球液を加え、90分間反応後、赤血球の完全凝集像を示すものをHA陽性と判定した。

（倫理面への配慮）

本研究においては、鼻腔スワブ等の臨床検体を用いるに際し、国立感染症研究所倫理審査委員会の審査を経て承認を受けた。供試検体は匿名処理を行い、検体提供者特定および個人情報流出の防止に配慮している。

### C. 研究結果

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 臨床検体接種によるウイルス分離効率

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



## D. 考察

今回試験に供した MDCK\_NVD 細胞は、臨床検体から直接のウイルス分離において、従来使用されてきた MDCK\_Conv よりも高い分離率を示しており、H1pdm 分離に有用な細胞であると考えられる。しかしながら、分離ウイルスの HA 価は低く、継代を繰り返しても 8-32 HA 価程度に留まっていた。HA 価が低いことはワクチン製造に際し、大きな不利益となり得るものであり、高い HA 価を得るための培養条件の検討、改善が今後必要とされる。MDCK\_Conv で継代を繰り返した場合には、HA 価は 32-128 まで上昇し、MDCK\_NVD での継代下で観察される HA 価よりも高い値を示していたが、過去のインフルエンザウイルスに比べ依然低値であることから、H1pdm の低 HA 価はこの亜型ウイルスの特性であると推察される。今後は H1pdm が低 HA 価を示す要因を細胞、ウイルスの両面から探索、解明していくことが良質なワクチンシード作製に求められることである。

## E. 結論

MDCK\_NVD は近年のインフルエンザ流行の要因をなす H1pdm 亜型ウイルスの分離用細胞として有用である。本細胞を用いて良質なワクチンシードを調整するためには、分離ウイルスが示す低 HA 価の克服が必要であり、低 HA 価を生じさせる要因の解明、培養条件の検討、改善が求められる。

## F. 研究発表

1. 論文発表  
なし

2. 学会発表

Kazuya Nakamura, Yuichi Harada, Hitoshi Takahashi, Itsuki Hamamoto, Masato Tashiro, Norio Yamamoto: Applicability of plaque-cloning method to a prevention against genetic alteration of influenza vaccine-seed.  
8th International Congress of Virology, Sapporo, Sep. 2011 (第59回日本ウイルス学会学術集会併催)

## 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  
特になし

## 「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」

研究分担者 浜本いつき

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 5 室 研究員

**研究要旨** 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。その結果、改変 MDCK 細胞では従来の MDCK 細胞よりもウイルス産生量が有意に増大した。本研究により、より効率的なワクチンシードウイルスの分離及び増殖が可能となり、より短期間に大量のワクチンを供給できる体制の確立に繋がると考えられる。

### A. 研究目的

新型インフルエンザの大流行に対応するには、安全性や有効性とともにより迅速に大量生産することが要求される。

欧州では細胞培養技術を用いたワクチンがすでに実用化されている。国内においても従来の発育鶏卵に代わり、細胞培養を基材とするワクチン製造への移行を進めているが、より短期間に十分量のワクチンを生産するためには、従来の細胞よりさらにウイルスの増殖性が高まった細胞を使用することが望ましい。そこで本研究では、I) A549 細胞における I 型インターフェロン (IFN) 誘導性遺伝子群を標的とする siRNA を用いたノックダウン解析によりウイルスの増殖性に関与する因子を同定し、II) 同

定した遺伝子に対する shRNA 安定発現 MDCK 細胞を樹立することとした。最終目標は、ウイルス高増殖性細胞株を樹立し、シードウイルス分離・増殖に応用することである。従来の細胞に比べてウイルスの増殖性が高まった細胞は、低増殖性ウイルスの分離・増殖に有用と思われる。また、期間を短縮してワクチンの製造を行うことにも応用が可能であろう。

## B. 研究方法

本研究の流れを Fig. 1 に示す。

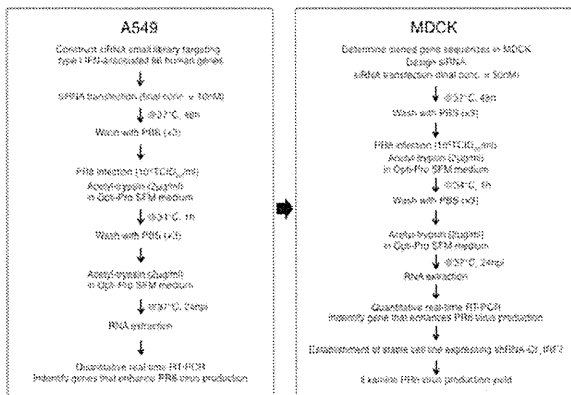


Fig. 1 Overview of the study design for the establishment of modified MDCK cells for the high yield production of PR8 influenza virus.

### 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

最初に、ヒトI型IFN誘導性遺伝子群（主にRIG-I/IPS-1経路、TLR7経路及びTLR3経路）を標的とするsiRNAライブラリーを作成し、1遺伝子に対して標的部位の異なる3種類のsiRNAを設計合成した。A549細胞にsiRNAを導入し、48時間後にインフルエンザウイルスPR8[A/PR/8/34(H1N1)株]を $1 \times 10^3$ TCID<sub>50</sub>/mlで感染させた。感染後24時間の培養上清中に放出されるウイルスRNAを抽出し、リアルタイムPCR法にてウイルス量を定量した。標的遺伝子をsiRNAでノックダウンした結果、コントロールと比較してウイルス産生量が2倍以上増加した遺伝子に関してIngenuity Pathway Analysis (IPA)を用いてパスウェイ解析を行い、ウイルス産生に重要なシグナル経路を明らかにした。さらに高感度で再現性よくウイルス産生量を有意に増加させる遺伝子を同定した。

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細胞においても再現性を確認するために、同定した遺伝子をATCC社由来のMDCK細胞からRT-PCR法でクローニングし、翻訳領域の塩基配列を解析し、データベースの塩基配列と比較した。今回決定した塩基配列を基に各遺伝子につき3種類のsiRNAを設計合成した。

### 3) MDCK

### 細胞へのsiRNA導入及びウイルス産生量への影響

MDCK細胞にsiRNAを導入し、48時間後に $1 \times 10^3$ TCID<sub>50</sub>/mlでPR8を感染させた。感染後24時間の培養上清中のウイルスRNAを抽出し、リアルタイムPCR法にてウイルス産生量を定量し、比較検討した。

### 4) shRNA安定発現MDCK細胞株樹立

今回同定した遺伝子のノックダウンによってウイルス産生量が増加することを再確認するために、レンチウイルスベースのshRNA発現ベクター(U6 promoterによりshRNAを発現し、EF1 $\alpha$  promoterによってblasticidin S耐性遺伝子を発現する)をMDCK細胞に導入し、shRNAを恒常的に発現する細胞を樹立した。

### 5) 細胞間におけるウイルス産生量の比較検討

従来のMDCK細胞と本研究で樹立した細胞株に様々なウイルス株を感染させて、培養上清中に放出されるウイルス産生量をリアルタイムPCR法にて定量し、比較検討した。

## C. 研究結果

### 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 (Fig. 2)。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 (Fig. 3)。

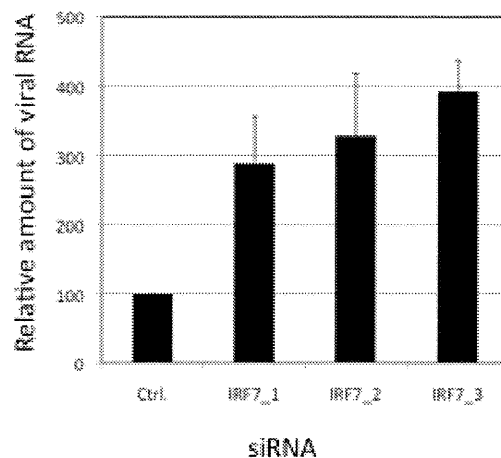
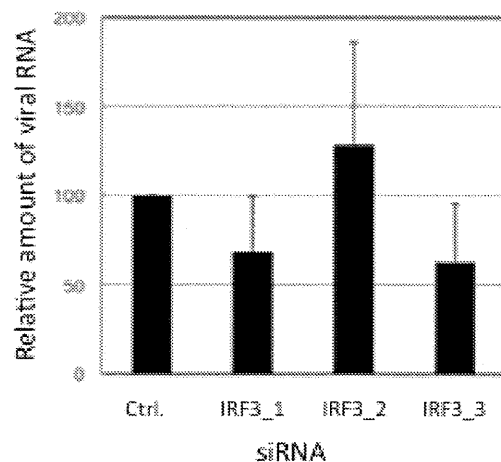


Fig. 2 Knockdown of IRF7 increases the



production of PR8 virus in MDCK cells.

Fig. 3 Knockdown of IRF3 does not affect the production of PR8 virus in MDCK cells.

## 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 (Fig. 4)。