

201225047A

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 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 田代真人

平成 25 年(2013)3 月

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 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 田代真人

平成 25 年(2013)3 月

目 次

平成 24 年度

I 総括研究報告書

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 P. 1
研究代表者 田代真人

II 分担研究報告書

1. 国内外のインフルエンザ流行株の性状解析に基づいた流行予測およびワクチン株の選定 P. 22
研究分担者 小田切孝人
2. 血清学的調査によるワクチンの交叉反応性の評価 P. 26
研究分担者 岸田典子
3. 新規機能的遺伝子解析法の構築と流行株遺伝子解析 P. 28
研究分担者 藤崎誠一郎
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 P. 31
研究分担者 原田勇一
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 P. 34
研究分担者 高橋 仁
6. 細胞培養ワクチン製造用種ウイルスの母体ウイルスの開発 P. 37
研究分担者 信澤枝里
7. 細細胞培養法により分離されたウイルスの増殖能、免疫原性の解析と品質管理試験への影響 P. 41
研究分担者 浅沼秀樹
8. シードウイルス製造用セルバンクの評価と迷入ウイルス検出系の構築 P. 52
研究分担者 山本典生
9. 細胞培養法によるウイルス分離効率の解析 P. 59
研究分担者 中村一哉
10. 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 P. 63
研究分担者 浜本いつき

III 成果刊行物

P. 67

- iv 添付資料1. • Information for WHO Annual Consultation on the Composition of Influenza Vaccine in the Southern Hemisphere P. 1-6
• Information for WHO Annual Consultation on the Composition of Influenza Vaccine in the Northern Hemisphere P. 7-11

添付資料 2.

試験計画書：HB-01 を免疫したマウスに対するインフルエンザウイルスインドネシア株
(A/Indonesia/5/2005 (H5N1) 強毒型野生株) 攻撃試験 P. 1-15

試験報告書：同上 P. 1-24

試験計画書：HB-01 を免疫したマウスのインフルエンザウイルスインドネシア株 (弱毒株)
に対する Haemagglutination Inhibition 及び中和抗体価測定試験 P. 1-11

試験報告書：同上 P. 1-14

試験計画書：KIB-PCI を免疫したマウスに対するインフルエンザウイルスインドネシア株
(A/Indonesia/5/2005 (H5N1) 強毒型野生株) 攻撃試験 P. 1-15

試験報告書：同上 P. 1-22

試験計画書：KIB-PCI を免疫したマウスの A/Indonesia/05/2005/PR8-IBCDC-RG2 (H5N1)
に対する Single radial haemolysis、Haemagglutination Inhibition 及び
中和抗体価測定試験 P. 1-20

試験報告書：同上 P. 1-25

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国内外のインフルエンザの流行予測、ワクチン株選定、政策提言を行うため、地方衛生研究所を始めとする国内サーベイランス体制および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行った。これらの結果をもとに、2012/13 シーズンワクチン株に A/California/07/2009、A/Victoria/361/2011、B/Wisconsin/1/2010（山形系統）を選定するよう提言した。2012/13 シーズンの A(H3N2)ワクチンは孵化鶏卵(卵)を用いた製造過程で起こる抗原変異が障害となり、ワクチンの効果を大きく低下させていた。このことから、インフルエンザワクチンを卵で製造するというこれまでの手法を見直す時期に来ている。一方、抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランスから、ノイラミニダーゼ (NA)阻害薬結合部位から離れた全く新しい変異をもつ B 型インフルエンザ耐性株を検出した。新しい耐性株モニターのマーカーとして国内外に情報発信した。

②細胞培養ワクチンには、(1)ワクチンを短期間に製造できる、(2)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、という 2 つの大きな利点がある。本研究では、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、プロトタイプワクチン開発に関するウイルス株の検討、動物モデルによるワクチンの有効性の評価、臨床試験の計画・実施および製造設備の設計・建設の支援を行い、また感染研の役割として、国際的なハーモナイゼーションの下に細胞培養ワクチン用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に関する研究を実施した。本研究により、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

(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

国内外から流行株を可能な限り収集して、それらの抗原性解析および遺伝子の進化系統樹解析、さらには抗インフルエンザ薬に対する感受性試験を行い、それらの情報にもとづいて、次シーズンの流行予測および適切なワクチン株の選定を行う。

2)血清学的調査によるワクチンの有効性の評価

選定されたワクチン株を用いて製造されたワクチンの有効性をワクチン接種後のヒト血清抗体で評価する。

3) 株サーベイランスで検出された変異株のリスク評価

株サーベイランスで検出された変異株のリスク評価を薬剤感受性試験やバイオインフォマティクス的手法を導入して調べる。

これらの情報は、適宜、関係諸機関およびWHO 世界インフルエンザ監視対応ネットワークと情報共有し、インフルエンザ対策に貢献する。

(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の整理、および解決策の検討
細胞培養ワクチンの実用化を着実に進めることを目的として、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の整理、および解決策の検討を行った。

5)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。

6)細胞培養ワクチンの品質管理体制の確立の準備

ワクチンの品質管理を適切に行うことは、有効なワクチンを供給する上で非常に重要である。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。

7)細胞培養法によるウイルス分離効率の解析
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、本年度はヒト胎児網膜芽細胞由来の細胞株 Per.C6 を用いて、A/H3N2 亜型株 (H3)、B/Victoria 系統株 (B/Vic) および近年出現した 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。

8)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。そこで本研究では、ワクチンシードウイルス分離用候補細胞から分離・継代した A/H1N1pdm09 株に関して遺伝的安定性の解析を行った。

9)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、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 A/H1N1pdm09 ウイルスについて抗原的安定性を評価した。

10)細胞培養法により分離されたウイルスの増殖能、免疫原性の解析と品質管理試験への影響

細胞培養法で分離されたウイルス株の増殖性、免疫原性と、品質管理試験への影響について、鶏卵培養法により分離されたウイルス株との比較検討を目的として本研究を行った。

11)シードウイルス製造用セルバンクの評価と迷入ウイルス検出系の構築

細胞培養ワクチンには、(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等の利点があるが、これらの利点を最大限に生かすためには、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安全性試験・特性試験と迷入ウイルス検出系の検討を行った。

12)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

より短期間に十分量のワクチンを生産するためには、分離効率、増殖性が高いと言われる MDCK 細胞よりも、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、これまでに樹立した shRNA 安定発現 MDCK 細胞において、PR8 以外のウイルス株でも PR8 と同様に増殖効率が增大するかについて解析を行った。

13)細胞培養ワクチン製造用種ウイルスの母体ウイルスの開発

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を使用する必要がある。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、高増殖性の細胞培養ワクチン製造用母体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長

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

山本典生 同上

中村一哉 同上

浜本いつき 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

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

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

2011/12 シーズンに国内および海外（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 は 29 株、A(H3N2)は 401 株、B は 404 株、2012/13 シーズン前半（2013 年 1 月）までに収集した A(H1N1)pdm09 は 21 株、A(H3N2)は 143 株、B は 48 株について、赤血球凝集抑制（HI）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有効性の評価

2012/13 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）と 2012/13 シーズン流行株との反応性を HI 試験により調べた。

3) 株サーベイランスで検出された変異株のリスク評価

国内で使用されている 4 種類の NA 阻害薬に対する感受性試験を実施。耐性を示した変異株の遺伝子解析し、コンピュータシミュレーションによる薬剤耐性アミノ酸置換の立体構造を解析した。

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の整理、および解決策の検討

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）、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) 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。

6) 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。

7) 細胞培養法によるウイルス分離効率の解析

ヒト胎児網膜芽細胞由来の細胞株 Per.C6 を用いて、A/H1N1pdm09 株、A/H3N2 株、B/Victoria 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のウイルス分離効率を検討した。

8) 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

A/H1N1pdm09 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、1 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。

9) 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 (MDCKNVD) と付着培養系 MDCK 細胞 (MDCK_Conv) を用いて、2010/11 シーズン中に採取された臨床検体から A/H1N1pdm09 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。

10) 細胞培養法により分離されたウイルスの増殖能、免疫原性の解析と品質管理試験への影響

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。

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、B/Victoria 系統の N179 株のマウスへのチャレンジ試験によって検討した。

11) シードウイルス製造用セルバンクの評価と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。

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、今年度はウイルスごとに保存性の高い領域を抽出し、プライマー・プローブのデザインを行った。

12) 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

コントロール MDCK 細胞と新規 MDCK 細胞に A/PuertoRico/8/34(H1N1)、A/Narita/1/2009(H1N1pdm09)、B/Florida/04/2006(山形系統)、A/Victoria/361/2010(H3N2) を感染させ、48~96 時間後に培養上清の HA 価を測定した。

13) 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) 2011/12 シーズンおよび 2012/13 シーズンの流行株の解析

当該 2 シーズンの国内外のインフルエンザウイルスの流行パターンは、国ごと地域ごとに大きく異なっていた。特に、B 型インフルエンザでは、B/Victoria 系統と B/山形系統が世界的に混合流行しており、その比率は、国ごとに異なっていた。国内外から収集した流行株の解析では、A(H1N1)pdm09 亜型ウイルスの抗原性は殆ど変化しておらず、ワクチン株 A/California/7/2009 類似株が大半であった。一方、A(H3N2)亜型ウイルスは、2011/12 シーズンの主流であった A/Victoria/210/2009 類似株から 2012/13 シーズンは A/Victoria/361/2011 類似株に変化した。B 型ウイルスの Victoria 系統株は B/Brisbane/60/2008 類似株が 2 シーズンをとおして主流であり、山形系統は最近の代表株 B/Wisconsin/1/2010 類似株が主流であった。これらの解析結果および WHO ワク

チン株選定会議で議論された情報をもとに、わが国の 2012/13 シーズンワクチン株は以下の 3 株が選定された。A/California/07/2009、A/Victoria/361/2011、B/Wisconsin/1/2010（山形系統）。

2) 2012/13 シーズンワクチンの有効性の評価
当該シーズンのワクチン接種前後のヒトペ
ア血清を用いて、A(H3N2)亜型およびB型和
ワクチン抗体と代表的な流行株との交叉反
応性を測定してワクチンの有効性を調べた。
その結果、A(H3N2)ワクチンで誘導される抗
体は、流行株とは殆ど反応せず、ワクチンの
有効性が大きく低下している可能性がしま
された。一方、B型ワクチンは、調べた限り
の流行株とはよく反応し、期待どおりの有効
性が得られると思われた。

3) 新規の変異を持つ B 型薬剤耐性株の検出
460 株の A 型および B 型分離株それぞれにつ
いて、NA 遺伝子の塩基配列を決定し、4 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）に対する感受性試験を実
施した。その結果、B 型インフルエンザウイ
ルスから全く新しい変異を持つ薬剤耐性株を
検出した。この変異株は、薬剤結合部位から
離れた位置に変異があり、NA 蛋白の四量体
構造形成に影響を与える変異であることを
バイオインフォマティクスの手法で解明し
た。この研究から、薬剤耐性株のモニタリ
ングにおける新たな検出マーカー情報を国内
外に発信することができた。

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
問題点の整理、および解決策の検討

現在、細胞培養ワクチンの実用化を目的と

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
事業でワクチン実生産施設の整備等が進め
られている。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
施における問題点の整理、および解決策の検
討を行った。以下に、議論されたポイントに
ついて示す。

[1]「パンデミックインフルエンザに備えたプ
ロトタイプワクチンの開発等に関するガイ
ドライン」（以下、「プロトタイプワクチン
ガイドライン」）には、「パンデミック時には、
ワクチン株の亜型がプロトタイプワクチン
と異なる場合も想定し、異なる亜型を用いて
製造したワクチンについて、あらかじめ攻撃
試験による発症予防効果を評価しておくこ
と」と記載されている。そこで、具体的にど
の亜型のどのワクチン株・攻撃用ウイルス株
が適切かという問題が浮かび上がった。SRD
試験に使用する標準抗原と参照抗血清の準
備状況や、ワクチン株・攻撃用ウイルス株の
入手可能性等を総合的に評価し、ワーキング
グループでディスカッションしたところ、亜
型は H9N2、ワクチン株は NIBRG-91、攻撃用
ウイルス株（野生株）は A/chicken/Hong
Kong/G9/1997 が良いとの結論に至った。使用
するウイルス株についての方向性が決まっ
たことを受けて、ワクチン株・攻撃用ウイ
ルス株の分与が円滑に行われるよう、感染研は
NIBSC との間で調整を行った。これによっ
て、平成 25 年度中には H9N2 ウイルス増殖性等
の基礎的検討や動物モデルを使用した攻撃
試験等を行うことが可能となる見込みであ
る。

[2] 細胞培養インフルエンザワクチンは、発
育鶏卵ではなく、培養細胞という新規のウイ
ルス増殖用基材を使用して製造される。した

がって、細胞培養ワクチンが鶏卵培養ワクチンの同等以上の有効性を持つかどうか、動物モデル等を使用して確認しておくことは重要である。プロトタイプワクチンのガイドラインに「プロトタイプワクチン及びプロトタイプワクチン製造株を適切な動物モデル（フェレット等）に接種し、免疫応答を検査するとともに、攻撃試験により、発症予防効果を評価すること。」等と記載されていることから、動物モデルによる確認の重要性は明らかである。そこで研究班では、強毒型の H5N1 野生株を用いたマウス攻撃試験によって細胞培養ワクチンの有効性の評価を行うこととした。実験設備やウイルス株の保有状況を考慮して、感染研においてワクチンによるマウスの免疫、H5N1 野生株の感染実験、野生株を用いた中和試験・HI 試験を行い、ワクチンメーカー（北里第一三共ワクチン株式会社、阪大微生物病研究会）においてワクチン株を用いた中和試験・HI 試験を行った。その結果、2社のワクチンはマウスにおいて高い中和抗体価、HI 抗体価を示し、野生株による攻撃に対して高い発症予防効果を示した。各試験の詳細については、本報告書に添付の試験計画書と試験報告書に記載した。

5) 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。

6) 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。

7) 細胞培養法によるウイルス分離効率の検討

Per.C6 および比較対照としての MDCK_Conv を用いた臨床検体からのウイルス分離を行った。H1pdm 患者臨床検体の Per.C6 への接種においては、供試検体のいずれからもウイルスの分離を確認出来なかった。MDCK_Conv を用いた場合は、6 検体がウイルス分離に盲継代を必要としたものの、全ての検体からウイルスを分離できた。

H3 分離については、Per.C6 への接種により 12 検体から 9 株、MDCK_Conv への接種により 12 検体全てからの分離を確認できた。Per.C6 接種においては 6 検体が盲継代を経ずともウイルス分離を確認でき、その後のウイルス継代で観察される HA 価は 64-256HAU と比較的高い値を示していた。MDCK_Conv を用いた場合、分離総数は多かったものの、分離ウイルスの HA 価は継代初期（～4 継代）で 16HAU 程度、さらに継代を重ねた場合でも、32-64HAU と低値を推移する傾向があった。

B/Vic は Per.C6 への接種により 12 検体か

ら 9 株、MDCK_Conv への接種により 12 検体全てからウイルスを分離でき、Per.C6 への接種で分離されたうちの 1 株を除き、分離確認に盲継代を要しなかった。分離株の HA 価は継代を通じて 256HAU 以上の高値を示し、用いた細胞による差異は認められなかった。

8) 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

MDCK_N および MDCK_C 細胞を用いての分離後、10 代目まで継代を行ったウイルスの遺伝子解析を行い、臨床検体中のウイルスの遺伝子配列と比較した。その結果、MDCK_N、MDCK_C 細胞で分離・継代された全てのウイルス株で HA 遺伝子への変異導入が確認された。また MDCK_C で分離された 1 代目のウイルス株において、1 株に HA 遺伝子への変異導入が確認された。初期継代ウイルス (2 代目から 4 代目) においても、既に変異導入が確認されるウイルス株も存在した。NA 遺伝子については MDCK_N 細胞で分離・継代された 2 株について変異導入が確認された。

MDCK_C 細胞で分離・継代された全てのウイルス株では、ウイルスの抗原性に影響する、開始コドン部位から数えて 153 番目から 156 番目のアミノ酸置換を生じさせる変異が集中していた。MDCK_N 細胞で分離・継代されたウイルス株の多くは、MDCK_C 細胞分離・継代ウイルス株で認められた変異部位より 30 アミノ酸ほど下流の 2 カ所の部位で変異導入が確認された。これらのアミノ酸は抗原性やレセプター結合に影響する部位であった。また、少数だが MDCK_C 細胞分離・継代ウイルス株で特徴的に観察された変異を持つウイルス株も確認された。NA 遺伝子については MDCK_N 細胞で分離・継代された 2 株について変異導入が確認されたが、これらの変異箇所は機能的なアミノ酸部位に相当する箇所ではなかった。

9) 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 細胞から分離したウイルス株は継代 3~4 代目においては、抗細胞由来ウイルス抗血清に対しても抗鶏卵由来ウイルス抗血清に対しても、それぞれの基準ウイルスと同等の反応性を示した。これら MDCK_N 細胞分離株は、その後の継代過程においても多くの場合抗血清に対する反応性に変化は観察されなかったが、いくつかの株では継代 10 代目に抗血清への反応性が基準ウイルスの 1/4~1/16 となった。反応性の低下は用いる抗血清の種類には依存しなかったが、継代 3~4 代目における各ウイルスの反応性と比較した場合、1/8 以下となるものも存在した。

MDCK_C 細胞分離ウイルスの抗細胞由来ウイルス抗血清、抗鶏卵由来ウイルス抗血清に対する反応性は MDCK_N 細胞分離ウイルス同様、それぞれの基準ウイルス株の反応性と類似していたが、継代 2~3 代目においても基準ウイルスの反応性と比較した場合、1/8 以下となる株が存在した。また、MDCK_C 細胞分離ウイルスは継代 10 代目になると、ほとんど全ての株で抗細胞由来ウイルス、抗鶏卵由来ウイルス両抗血清に対して、それぞれの基準ウイルスに対する反応性と比較すると、1/8 以下となる著しい反応性の低下が観察された。

10) 細胞培養法により分離されたウイルスの増殖能、免疫原性の解析と品質管理試験への影響

[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 B 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 16 例について、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 16/16 例、分離率 100%であったが、発育鶏卵では 4/16 例、分離率 25%

であった。発育鶏卵で HA 価が認められた 4 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 3 例に 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 16/16 株、すべての株で 5 代の継代までに 256 以上の高い HA 価が認められたが、鶏卵分離株では 2/4 株、50%であった。そのため患者検体よりウイルスを分離した場合、鶏卵よりも細胞での分離効率が高く、増殖性も鶏卵より細胞で継代した場合に早期に高値に達することが示唆された。

[2] 鶏卵もしくは細胞で分離・増殖した株の品質管理試験

鶏卵で分離・継代した株で HA 価が 256 以上を示したのは 2 株だけであった。このうちの 1 株 (N179 株) とその株と同じ検体由来で、細胞で分離・継代した株について、蛋白量と SRD 抗体との反応性について検討した。なお本実験では最近の B 型のワクチン (Victoria 系統) と反応性を有する SRD 抗体を用いた。その結果、SRD 抗体は鶏卵で分離・継代した株には高い反応性を示したが、細胞で分離・継代した株とは全く反応性を示さなかった。また細胞で 3 代継代した株と 9 代継代した株の蛋白量を比較した結果、3 代継代した株の方が、9 代継代した株の約 2 倍の蛋白量であった。そのため、同じ Victoria 系統の分離株 3 株 (N180、BV2、BV11) について、同様に継代による蛋白量の比較を行ったところ、それら 3 株においても継代によって顕著な蛋白量の低下が認められた。

[3] 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 (N179 株) を 2 回接種後、分離株と同じ N179 株をチャレンジし、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・増殖株で同等の防御効果が認められた。また接種用量依存的な抗体応答が認められた。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。しかし、細胞で分離・継代した株で作製されたワクチンを接種したマウスでは、鶏卵株と細胞株の両方に高い反応性が認められたが、鶏卵で分離・継代した株で作製されたワクチンを接種したマウスでは、鶏卵株に対する反応性は高いが、細胞株に対する反応性の低下が認められた。このことは鶏卵で分離・継代した株をワクチンの種ウイルスとして用いた場合には、細胞で分離・増殖した株に対する反応性が低下する可能性があることが示唆される。

11) 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、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]

・ 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の解析を行った。昨年度にも Isoenzyme 試験は行っており、MCB はイヌ由来の細胞からなることが確認されていたが、その時の試験にはコントロールとしての標

準 MDCK 細胞が加えられていなかったため、今回これを加えて再試験を行った。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、NP については標準 MDCK 細胞と同等の移動度を示した。従って、MCB はイヌ由来の細胞であり、標準 MDCK 細胞と同等であることが確認できた。

・ Qualification of the Test Article for the Detection of Agar-Cultivable Mycoplasma in accordance with USP/EP/PTC Requirements (Without Avian Controls)

細胞培養試料を用いて、マイコプラズマの増殖を抑制する活性があるかについて試験を行ったところ、増殖抑制活性は陰性であった。

[EOPC]

・ DNA fingerprinting of cell lines

制限酵素処理した細胞由来 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。

・ 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。

・ In vitro assay for the detection of canine viruses

MDCK 細胞培養試料を、ウイルス感受性細胞 (Primary Canine kidney cells, MDCK cells, BT cells, Crandell Ferine Kidney cells, A72 cells および Vero cells) の培養系に加えた。4 週間培養を行い、CPE 等について観察したところ、試料を加えた群では陰性であった。本試験においては、イヌウイルスの混入を示す所見は

認められなかった。

・ Test for the presence of inapparent viruses including guinea pigs (CBER Guidance 2006)

細胞培養試料を adult mice, suckling mice, guinea pigs, embryonated eggs に接種し、生存率の比較を行ったところ、陰性コントロールと比べて有意な違いを認めなかった。また、adult mice, suckling mice, guinea pigs については試料接種後に解剖を行い、臓器の状態も含めて確認したが、試料接種群と陰性コントロール群のいずれにも異常は見られなかった。embryonated eggs については、試料接種後に allantoic fluid を回収し、赤血球凝集活性を調べたが、全て陰性であった。以上より、本試験で使用した動物モデルで検出可能な範囲のウイルスについては、MDCK 細胞には混入していないと考えられた。

・ Retrovirus 293 Co-cultivation assay (5 Passages, FPERT End-point)

MDCK 細胞(EOPC)を 293 細胞と共培養し 2 代以上継代した後、培養上清を 293 細胞培養系に加えて 3 代継代を行った。培養上清を回収し、RT 活性の有無を FRERT 法によって調べた。その結果、MDCK 細胞(EOPC)と 293 細胞の共培養を行ったものについては、RT 活性は陰性であった。本試験からは、MDCK 細胞(EOPC)から感染性のレトロウイルスが産生されているという所見は認められなかった。

・ 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。

・ Detection of Viral Contaminants in Bovine Serum According to CPMP & US 9CFR Requirements, Also meets EP requirements as per the Tech Spec.

試験細胞の培養液と細胞破砕物を混合し、これを試験試料として BT cell および Vero cell 培養系に加えた。その後、CPE の有無、封入体等の有無、赤血球(chicken, guinea pig, human)吸着の有無、代表的なウシ血清混入ウイルス(bovine adenovirus, bovine parvovirus, bovine respiratory syncytial virus, bluetongue virus, bovine diarrhoea virus, reovirus, rabies virus)に対する抗血清への反応性の有無について調べたところ、いずれも陰性であった。本試験で検出できる範囲においては、ウシ血清に由来する迷入ウイルスの存在は認めなかった。

・ MAP Test with LCMV Challenge

MDCK 細胞溶解物をマウスに接種し、その後 16 種類の murine viruses に対する抗体が産生されているかを ELISA 法によって解析した。その結果、いずれのウイルスに対する抗体も産生されていなかった。この結果は、EOPC には 16 種類の murine viruses のいずれもが含まれていないことを示唆している。

・ Oncogenicity in newborn nude mice

本試験は、EOPC の細胞融解物および DNA を newborn nude mice に接種し、これらにマウス細胞を腫瘍化させる活性があるか否かを確認する試験である。本試験はその性質上、終了までに長い時間を要するため、報告書作成の現時点においてもまだ試験が完了していない(終了予定は 3 月中旬)。これまでの観察では、明らかな Oncogenicity は見られていない。最終的な成績は来年度の報告書において示す予定である。

[2] 迷入ウイルス検出系の構築について

対象とする 22 種類のウイルスのうち 8 種類のウイルス(Parainfluenza viruses, Herpes simplex viruses, Human adenoviruses, Polyomaviruses, Human enteroviruses, Human metapneumoviruses, Human rhinoviruses)について、出来るだけ多数の配列情報(総計 1200 以上の配列)をデータベースから取得し、アライメントを取って保存性の高い領域の絞り込みを行った。その結果、実際にそのような領域を特定することが出来た。次いでその領域に対してプライマー・プローブのデザインを行い、第 1 段階のプライマー・プローブ候補配列群とした。今後、候補配列群の中からいくつかのプライマー・プローブセットを選択し、評価試験を進めていく予定である。

12) 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

IRF7 の発現を恒常的に抑制する MDCK 細胞にウイルスを感染させて、48~96 時間後の培養上清中に放出されるウイルス液の HA 価を調べた結果、コントロール細胞と比較して 2~8 倍の上昇が認められた。さらに、ウイルス増殖性改善のメカニズムを調べるために PR8 を両細胞に感染させて 24 時間後に培養上清中に放出されるウイルス RNA 量をリアルタイム RT-PCR 法にて定量した結果、IRF7 をノックダウンした細胞ではコントロールと比較してウイルス産生量が有意に増加した。一方、ウイルス増殖による細胞内の IFN- α/β 産生量への影響は認められなかった。

13) 細胞培養ワクチン製造用種ウイルスの母体ウイルスの開発

Udorn-Ts と PR8 株は、ATCC-MDCK 細胞(MDCK-NIID バンク由来)に、MOI 0.0001 で感染させ、回収後のウイルスは、プラーク形

成能を測定し、さらに継代を繰り返した。Udorn-Ts に関しては19代の継代を行ったが、安定して 10^8 pfu/ml 程度の感染価が得られた。PR8 は検討を行った2株は、いずれも3代の継代での感染価は 10^9 pfu/ml 以上を示した。そこで3株に関して、plaque purify によるクローニングを試みた。いずれも2代のクローニングを繰り返した後に、クローニング後のウイルスについて更に2代継代を繰り返して、感染価を測定した。Udorn-Ts は 6×10^8 pfu/ml、PR8 は 2×10^9 pfu/ml (PR8-N) および、 2.4×10^9 pfu/ml (PR8-41) となり、クローニング前後で感染価は大きく変わらない結果であった。

D. 考察

サーベイランスに関する研究

WHO 世界インフルエンザ監視対応システム (GISRS) で世界中から収集した流行株について、WHO インフルエンザ協力センター (感染研インフルエンザウイルス研究センター、米国 CDC、英国立医学研究センター、メルボルンセンター、中国 CDC) が役割分担して、抗原性解析、遺伝子解析、薬剤耐性株の検出などを行い、次シーズンの流行予測とそれに基づいて適切なワクチン株の選定を行う。近年は、流行株とワクチン株の抗原性がよく一致し、ワクチン株の選定は適切に行われている。一方、インフルエンザワクチンは、卵で製造されるため、最近の A (H3N2) および B 型ワクチン株は製造過程で抗原性が原株から大きく変化する。このような変異株で製造されるワクチンで誘導されるヒト血清抗体は、流行株との交叉反応性は低下しており、ワクチン効果が大きく減弱している可能性が本研究から示された。この問題は、卵でワクチンを製造する限り毎年起こり、A (H3N2) および B 型ワクチン製造を卵で行うことは、もはや限界にきていることを明確に示している。製造法を細胞培養ワクチンへ切り換えるこ

とで、この問題は解決できると期待している。一方、薬剤耐性サーベイランスにおける耐性株のモニタリングは、NA 遺伝子解析による耐性マーカー変異の同定と感受性試験で行う。耐性マーカー変異は、多くの場合は、薬剤結合部位近傍またはその周辺に位置する。このため、その部位から大きく離れた部位にある変異は多くは見逃される。本研究では、薬剤結合部位から離れた部位にある新たな変異が耐性化に関係していることを NA 蛋白の機能的立体構造解析から明らかにした。この発見は、インフルエンザ薬剤耐性株サーベイランスでの注意マーカーになる。

細胞培養ワクチン開発に関する研究

細胞培養ワクチンは、ウイルスを増殖させる基材として発育鶏卵の代わりに株化培養細胞を用いる次世代のワクチンである。鶏卵培養法によるワクチン製造の問題点を解決できる技術として、注目を集めている。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れば、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る。したがって細胞培養ワクチンは、新型インフルエンザに対応するためのワクチンとして非常に有用と考えられている。

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する情報収集、試験実施における問題点の整理、および解決策の検討を行った。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との同席の下に行った。今年度は(1)プロトタイプワクチンガイドラインに記載の「異なる亜型を用いて製造したワクチンの攻撃試験による発症予防効果の評価」をどの亜型のどの株で行うか (2)細胞培養ワクチンの有効性を評価するための強毒型H5N1野生株を用いた攻撃試験の実施等についてディスカッションを行った。その結果、(1)については、SRD試験に使用する標準抗原と参照抗血清の準備状況やワクチン株・攻撃用ウイルス株の入手可能性等を総合的に評価し、亜型はH9N2、ワクチン株はNIBRG-91、攻撃用ウイルス株(野生株)はA/chicken/Hong Kong/G9/1997が良いとの結論に至った。さらに感染研は、使用するウイルス株についての方向性が決まったことを受けて、ワクチン株・攻撃用ウイルス株の分与が円滑に行われるよう、ウイルス保有機関であるNIBSCとの間で調整を行った。これによって、平成25年度中にはH9N2ウイルス増殖性等の基礎的検討や動物モデルを使用した攻撃試験等を行うことが可能となる見込みである。(2)については、実験設備やウイルス株の保有状況を考慮して、感染研においてワクチンによるマウスの免疫、H5N1野生株の感染実験、野生株を用いた中和試験・HI試験を行い、ワクチンメーカー(北里第一三共ワクチン株式会社、阪大微生物病研究会)においてワクチン株を用いた中和試

験・HI試験を行った。その結果、2社のワクチンはマウスにおいて高い中和抗体価、HI抗体価を示し、野生株による攻撃に対して高い発症予防効果を示した。

これらによって、細胞培養ワクチンの実用化に必要なプロセスを大きく進めることが出来たと考える。

阪大微研については、「細胞培養法ワクチン実生産施設整備等推進事業」として国から補助金を受けていたが、(1)HA抗原量を増加させた剤形の場合、本事業の目標である「半年以内に2500万人分を供給する」ことは困難であること、(2)HA抗原量を増加させた製剤について追加の第I/II相臨床試験を実施する必要があるため、本事業の実施期限である平成24年度末までに製造販売承認申請を行うことは不可能であること等を理由として、補助金の全額返還と開発方針の変更を発表した。しかし阪大微研は細胞培養ワクチンの開発を中止する訳ではなく、阪大微研独自の負担で細胞培養ワクチン製造施設の建設を行い、別の剤形での新型インフルエンザワクチンの開発を進める。

阪大微研の方針変更はあったものの、本研究による開発方向への助言と技術支援により、承認申請に必要な試験の実施やワクチン製造施設の建設は、全体としては順調に進捗している。

また、細胞培養ワクチンの実用化には、ワクチンメーカー側の体制を整備するだけでなく、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不可欠である。

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(MDCK_N)、付着系MDCK細胞(MDCK_C)、およびクルーセル社の浮遊

系 Per.C6 細胞の評価を行った。これまで試験結果からは、浮遊系・付着系の MDCK 細胞については両者ともウイルス分離効率に大きな問題はないと考えられた。遺伝的安定性と抗原的安定性については、今年度解析を行った A/H1N1pdm09 に関して言えば、抗原性変化を伴う特徴的な変異が観察された。この変異が導入される頻度は、MDCK_C よりも MDCK_N の方が低く、MDCK_N の方が有用である可能性が示唆された。どちらの MDCK 細胞を使用する場合にも、この HA 遺伝子上の点変異を回避し、ウイルスの抗原的安定性を確保することが必要と思われる。Per.C6 については、A/H3N2 ウイルスの増殖性において MDCK_C よりも良好な成績を示したが、A/H1N1pdm09 ウイルスの分離効率が著しく低く、ワクチンシード分離調製用基材として汎用的に使用するには大きな課題を残していると考えられた。

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 (MDCK-NIID) を行い、その特性試験と安全性試験を行った。今年度は、昨年度までに実施できなかったもののうち、11 試験を実施した。その結果、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も良いであろう。鶏卵培養を経ずにシード

ウイルスを製造することによって、鶏卵馴化に伴う抗原性変異を持たない、より有効性の高いワクチンをより速やかに製造することが可能になると期待される。

また、インフルエンザがグローバルな感染症であることから、細胞培養ワクチン品質管理法と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 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。事実、今年度行った実験の結果によれば、B 型 (ビクトリア系統) ウイルス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。

細胞培養ワクチンシードウイルス開発方法の確立については、WHO、WHO 協力センター、IFPMA による国際会議に参加し、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。シードウイルス分離用細胞の候補としてはノバルティス社の浮遊系 MDCK 細胞があるが、これに加えて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 (MDCK-NIID) も、国際会議において選択肢の 1 つと認識されている。国立感染症研究所の保有する GMP グレードのセルバンクは、国内で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、WHO 協力センターにおける基盤ともなり得るものであり、国際的にも大きな貢献が期待される。

E. 結論

サーベイランスに関する研究

- ・2011/12 シーズンの流行株は、A (H1N1) pdm09 は流行が無かったことから評価できなかった。A (H3N2) ワクチンに対しては変異株が 34 ~44%出現したことから、ワクチンと流行株との抗原性はあまり一致していなかった。一方、B 型は両者で抗原性がよく一致していた。
- ・2012/13 シーズン前半までの解析結果からは、当該シーズンのワクチン株と国内外の流行株の抗原性は、どの亜型、型とも一致していた。
- ・2012/13 シーズンの A (H3N2) ワクチンは効果の減弱が懸念された。B 型山形系統ワクチンは山形系統の流行株に対して効果が期待できた。
- ・B 型インフルエンザウイルスから新規の薬剤耐性アミノ酸置換 E105K, P139S を同定した。薬剤耐性株サーベイランスにおいて留意すべき新たな耐性マーカーを国内外へ発信できた。

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た。
- ・シードウイルス製造用細胞としては、国立感染症研究所が独自に構築した GMP グレー

ドの MDCK 細胞 (MDCK-NIID)、ノバルティス社の浮遊系 MDCK 細胞、IRF7 をノックダウンした MDCK 細胞などの有用性が示された。

- ・本研究によって、ワクチンメーカーによる実生産施設の建設、プロトタイプワクチン開発に必要なウイルス株の検討と入手、強毒型 H5N1 野生株を用いた攻撃試験によるワクチンの有効性の評価を行うことが出来、承認申請までのプロセスを促進することができた。

以上によって、細胞培養ワクチンの実用化を大きく推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

Kishida N, Fujisaki S, Yokoyama M, Sato H, Saito R, Ikematsu H, Xu H, Takashita E, Tashiro M, Takao S, Yano T, Suga T, Kawakami C, Yamamoto M, Kajiyama K, Saito H, Shimada S, Watanabe S, Aoki S, Taira K, Kon M, Lin JH, Odagiri T Evaluation of influenza virus A/H3N2 and B vaccines on the basis of cross-reactivity of postvaccination human serum antibodies against influenza viruses A/H3N2 and B isolated in MDCK cells and embryonated hen eggs. *Clin Vaccine Immunol.* 19(6):897-908 (2012)

Seiichiro Fujisaki, Emi Takashita, Masaru Yokoyama, Tae Taniwaki, Hong Xu, Noriko Kishida, Hironori Sato, Masato Tashiro, Masaki Imai, Takato Odagiri. A single E105K mutation far from the active site of influenza B virus neuraminidase contributes to reduced susceptibility to multiple neuraminidase-inhibitor drugs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 429: 51-56 (2012)

- Klimov AI, Garten R, Russell C, Barr IG, Besselaar TG, Daniels R, Engelhardt OG, Grohmann G, Itamura S, Kelso A, McCauley J, Odagiri T, Smith D, Tashiro M, Xu X, Webby R, Wang D, Ye Z, Yuelong S, Zhang W, Cox N; Writing Committee of the World Health Organization Consultation on Southern Hemisphere Influenza Vaccine Composition for 2012. WHO recommendations for the viruses to be used in the 2012 Southern Hemisphere Influenza Vaccine: Epidemiology, antigenic and genetic characteristics of influenza A(H1N1)pdm09, A(H3N2) and B influenza viruses collected from February to September 2011. *Vaccine*. 30(45):6461-71, 2012.
- Kazuo Ohnishi, Yoshimasa Takahashi, Naoko Kono, Noriko Nakajima, Fuminori Mizukoshi, Shuhei Misawa, Takuya Yamamoto, Yu-ya Mitsuki, Shu-ichi Fu, Nakami Hirayama, Masamichi Ohshima, Manabu Ato, Tsutomu Kageyama, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Kazuo Kobayashi, Shigeyuki Itamura, and Yasuko Tsunetsugu-Yokot. Newly Established Monoclonal Antibodies for Immunological Detection of H5N1 Influenza Virus. *Jpn.J.Infect.Dis.* 65: 19-27 (2012)
- Sriwilaijaroen N, Fukumoto S, Kumagai K, Hiramatsu H, Odagiri T, Tashiro M, Suzuki Y. Antiviral effects of *Psidium guajava* Linn. (guava) tea on the growth of clinical isolated H1N1 viruses: Its role in viral hemagglutination and neuraminidase inhibition. *Antiviral Res.* 94(2):139-46, 2012.
- Obuchi, M., Toda, S., Tsukagoshi, H., Oogane, T., Abiko, C., Funatogawa, K., Mizuta, K., Shirabe, K., Kunihisa, K., Noda, M., Kimura, H., Tashiro, M. Molecular analysis of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus genome associated with fatal infection in Gunma, Tochigi, Yamagata, and Yamaguchi Prefectures, Japan during the first pandemic wave. *Jpn. J. Infect. Dis.* 65:363-367, 2012.
- Takayama, I., Nakauchi, M., Fujisaki, S., Odagiri, T., Tashiro, M., Kageyama, T. Rapid detection of the S247N neuraminidase mutation in influenza A/H1N1pdm09 virus by one-step duplex RT-PCR assay. *J. Virol. Methods* 12/2012; DOI:10.1016/j.jviromet.2012.12.005 (2012)
- WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group (Brown, I. H., Capua, I., Cattoli, G., Chen, H., Cox, N., Davis, T., Donis, R. O., Fouchier, R. A. M., Garten, R., Guan, Y., Kawaoka, Y., Mackenzie, J., McCauley, J., Mumford, E., Olsen, C., Perdue, M., Russell, C. A., Smith, C., Smith, D., Smith, G. J. D., Shu, Y., Tashiro, M., Vijaykrishna, D., Webster, R. G.) Continued evolution of highly pathogenic avian influenza A (H5N1): updated nomenclature. *J. Influenza. Other Resp. Virus.* 6:1-5, 2012.
- 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.* 16;7(3): 552-62 (2012)
- Ainai A, Tamura S, Suzuki T, Ito R, Asanuma H, Tanimoto T, Gomi Y, Manabe S, Ishikawa T, Okuno Y, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Kurata T, Hasegawa H. Characterization of neutralizing antibodies in adults after intranasal vaccination with an inactivated influenza vaccine. *J Med*