

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

研究分担者 信澤枝里 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・室長
研究協力者 川口 晶 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 リバースジェネティクス (RG)法を用いて、細胞培養インフルエンザワクチン製造用種株を作製する際の母体ウイルスの検討は、まだなされていない。また、細胞培養ワクチンの生産性を考慮した、高増殖性、高タンパク収量を示す種株開発は、急務の課題である。そこで細胞培養でワクチンを製造する際の母体ウイルスとして、鶏卵培養で用いられている A/Puerto Rico/8/34(H1N1)株に相当するものの作製を試みた。A/Puerto Rico/8/34(H1N1)と A/Udorn/371/72(H3N2)について、MDCK 細胞における増殖性を検討した結果、いずれの株も感染価にして、 10^8 - 10^9 pfu/ml と高い増殖性を示すことが明らかになった。

A. 研究目的

インフルエンザウイルスワクチンの製造は鶏卵培養によってなされている。しかし、ワクチン製造にかかる時間の短縮の観点などから、細胞培養製造への移行の準備が進んでいる。新型インフルエンザワクチンの種株には、基本的にリバースジェネティクス (RG)法を用いて、インフルエンザウイルスが持つ 8つの遺伝子の内、2つ (HA, NA)を目的ウイルス由来、残りの 6つ (PA, PB1, PB2, M, NP, NS)を母体ウイルスである A/Puerto Rico/8/34(H1N1)(PR8)株由来としたウイルスを作製して使用している。生産効率の良さが求められるワクチン製造においては、この種株の増殖性が高く、タンパク収量が多いことが重要となる。これまで、増殖性の点から見て、PR8 株が鶏卵培養ワクチンの母体ウイルスとして優れている

ことが知られている。しかし、細胞培養ワクチンの母体ウイルスとしての適性は不明である。細胞培養ワクチンの早期実現化を目指すためにも、高増殖性、高タンパク収量を示す種株作製に適した母体ウイルスの開発は急務の課題である。そこで、本研究では細胞培養ワクチン製造用母体ウイルスの開発を試みた。

B. 研究方法

1. 細胞とウイルス

細胞は ATCC-MDCK(ATCC Cat.No. CCL-34)に由来し、ワクチン製造用に品質管理が行われている株を使用した。母体ウイルス候補としては、A/Udorn/371/72 (H3N2)の低温馴化株 (Udorn-Ts)と A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)(PR8) は、由来の異なる実験室維持ウイルス PR8-N, PR8-41 の 2 株を使用した。

ウイルスの継代

MOI 0.0001 で各ウイルスを細胞へ感染させ継代を繰り返した。

細胞を PBS で洗浄後、ウイルスを 35°C で 1 時間吸着させた後に、OPTI-PRO SFM (+ L-Glutamine) に 1 µg/ml の Trypzean (Sigma) を加えた培地を添加し培養をおこなった。A/Udorn 株は約 48 時間、A/PR8 株は約 72 時間で培養上清を回収し、ウイルス力価の測定を行った。回収した培養上清は 5000 rpm、5 分で遠心して、細胞断片などを除いた後に、一時的には 4°C、長期には -80°C で保管した。

プラーク形成

回収したウイルスは、TC-6 プレートを用いてプラーク形成能の測定を行った

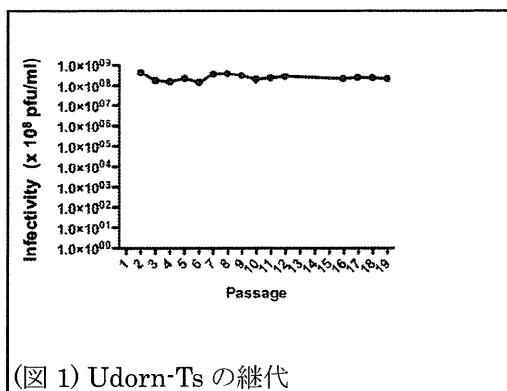
OPTI-PRO で適宜希釈したウイルスを細胞に感染させ、35°C で 2 日間培養した後、プラーク数を計測した。

プラーク純化

Udorn-Ts および PR8 株は、継代を繰り返した後、プラーク純化を行った。プラーク形成後、マイクロピペットチップを用いてプラークを回収し、300 µl の MEM (0.1% BSA) に懸濁した。37°C で 1 時間反応後、4°C で一晩静置し、純化ウイルスとした。

C. 研究結果

Udorn-Ts と PR8 株は、ATCC-MDCK 細胞に、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(図 1)。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(表 1)。



(図 1) Udorn-Ts の継代

virus	Passage 1	Passage 2
PR8-N	1×10^8	2.2×10^9
PR8-41	1.6×10^8	3.2×10^9

pfu/ml

(表 1) PR8 の継代

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

2 株の PR8 と、Udorn-Ts の計 3 種の株について、今後ワクチン製造に使用される可能性のある細胞(ATCC-MDCK 細胞)を用いて増殖性の検討を行った。その結果、今回用いた PR8 株は、いずれも 1×10^9 pfu/ml と細胞培養においても高い増殖性を示すことが分かった。また Udorn-Ts 株についても、 1×10^8 pfu/ml 以上の高い増殖性を維持することが明らかとなった。現行の季節性インフルエンザワクチン製造株には H1N1 と H3N2 の両亜型ウイルスが含まれているが、必ずしも、同じ母体ウイルスが両ウイルスの増殖に適するとは限らない。今回、開発した、2 種類のウイルスを用いれば、それぞれの亜型で、高増殖性のワクチン製造株の作製が可能になることが、期待さ

れる。H5N1 ウイルスワクチンは鶏卵培養ワクチンではPR8株を母体ウイルスとして作製されており、細胞培養ワクチンにおいても、PR8株の使用で高増殖ウイルスの作製が可能と考える。しかし、現時点では、まだタンパク収量の検討は行っていない。今後は、2種類の母体ウイルスを用いて、流行株、H5N1 ウイルス等の HA および NA 遺伝子を導入したリアソータンとウイルスを作製し、増殖性やタンパク収量を検討していく必要がある。

E. 結論

H1N1 亜型の株である A/Puerto Rico/8/34 と H3N2 亜型の株である A/Udorn/371/72 の低温馴化株を用いて、細胞培養系における増殖性を検討した。ATCC-MDCK 細胞においては、いずれの株も高い増殖性を示す事が分かり、今後、細胞培養用の母体ウイルスとしての使用が可能であることを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Shirakura M, Kawaguchi A, Tashiro M, and Nobusawa E. Composition of hemagglutinin and neuraminidase affects the antigen yield of influenza A(H1N1)pdm09 candidate vaccine viruses. *JJID*. 66(2013) pp.65-68.
2. Uchida Y, Suzuki Y, Shirakura M, Kawaguchi A, Nobusawa E, Tanikawa T, Hikono H, Takemae N, Mase M, Kanehira K, Hayashi T, Tagawa Y, Tashiro M, Saito T. Genetics and infectivity of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses isolated from chickens and

wild birds in Japan during 2010-11. *Virus Res*. 170(2012) pp.109-117.

3. Eri Nobusawa, K. Omagari, S. Nakajima, K. Nakajima. Reactivity of human convalescent sera with influenza virus HA protein mutants at antigenic site A. *Microbiology and Immunology*. 56 (2012) pp. 99-106

2. 学会発表

1. 信澤枝里、中内美名、松寄葉子、菅原勘悦、有田知子、廣津伸夫、田代真人、西村秀一：A/H1N1pdm09 ワクチン被接種者血清抗体が認識する HA 上の抗原領域の解析。第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月
2. 松寄葉子、菅原勘悦、下平義隆、本郷誠治、信澤枝里：パンデミックインフルエンザ A/H1N1pdm09 の HA 分子の抗原構造の解析。第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月
3. 嶋崎典子、白倉雅之、信澤枝里、矢野茂生、板村繁之、田代真人：インフルエンザワクチン製造株のアミノ酸変異による抗原蛋白経時安定性への影響。第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月
4. 川口晶、鈴木忠樹、相内章、佐藤由子、信澤枝里、田代真人、長谷川秀樹：喘息発作誘発モデルを用いたインフルエンザウイルス感染症の病態解析。第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月

5. 有田知子、白倉雅之、信澤枝里、田代眞人：H5N1 インフルエンザワクチン種株候補の抗原収量の検討。第16回日本ワクチン学会学術集会、横浜、2012年11月

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当無し。

2. 実用新案登録

該当無し。

3. その他

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

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 第六室長

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。2010-2011 シーズンに B 型インフルエンザに罹患した患者 16 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 16 例全てが、発育鶏卵で 4 例の分離に成功した。その後、各分離株の継代を行い、増殖性を検討した結果、ともに継代早期で高い HA 価を示した。このうち 1 株を選び、培養細胞および鶏卵で増殖させたウイルスの不活化抗原を作製、マウスに接種し、防御効果ならびに免疫応答を検討した。その結果、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、ウイルス分離効率は細胞培養法が有意に高く、防御効果もこれまでの鶏卵培養で製造したワクチン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することを目的としている。昨年度の本研究では、2009-2010 シーズンに A/H1N1pdm09 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

ルス分離を行い、分離効率、増殖性、抗原性、さらにはワクチン効果を比較検討した。その結果、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した。今回、2010-2011 シーズンにB型インフルエンザに罹患した患者16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い、分離効率、増殖性、さらにはワクチン効果について検討した。

B. 研究方法

1. ウイルス分離・継代

ウイルスの分離には、2010-2011 シーズンにインフルエンザに罹患した患者 16 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. 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 5 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、同 B 型株でチャレンジし、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。

5. ウイルス価測定

ウイルス価の測定は、従来行われているブランク法を用いた。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 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(表 1)、発育鶏卵では 4/16 例、分離率 25%であった(表 2)。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(表 2)。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(図 1)。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(表 3)。

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(図 2)。また接種用量依存的な抗体応答が認められた(図 3A)。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。

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、安全性等を検討している。昨年度、2009-2010 シーズンに A/H1N1pdm09 型インフルエンザに罹患した患者 33 例から採取された患者検体を用いて MDCK 細胞ならびに発育鶏卵でウイルス分離を行い、分離効率、増殖性、抗原性、さらにはワクチン効果を比較検討した。その結果、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した。しかし、HA 力価測定に用いられている SRD 抗体との結合性を検討した結果では、細胞培養株との結合性が顕著な低下が認められた。そこで本研究では今年度、発育鶏卵および培養細胞で分離・継代した B 型株の性状解析ならびに免疫原性等について検討した。その結果、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 B 型の感染を示し、遺伝子検査より B/Victoria 株陽性の臨床検体 16 例について分離を試み、16 例全てにおいて培養細胞での分離に成功したが、鶏卵では 4 例であった。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 4 例は全て初代培養 (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継代早期に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、2010~2011 シーズンの B 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。しかし、細胞での継代を進めた場合、増殖性の指標となる HA 価にはほとんど変化が認められなかった一方、蛋白量はおよそ半減していた。この原因については今後検討が必要である。

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、N179 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 N179 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 SRD 試験に用いる SRD 抗体 (B/Victoria 系統) との結合性が低下しており、この結果は昨年度に報告した A/H1N1pdm09 株で認められた現象と同じであった。このことは、細胞培養で製造されたワクチンの HA 力価は、抗原毎に SRD 用抗体を準備する、ないしは現行の SRD 法以外の評価方法を検討する必要があることを示唆している。

E. 結論

細胞培養ワクチンの種株の選定には、増殖性、安定性、免疫原性などの性状解析データが必須となる。これまで検討した A/H1N1pdm09 株および B 型株では培養細胞を用いた分離効率・増殖性は発育鶏卵を用いた場合より優位であり、免疫原性や防御効果も現行の鶏卵で製造したワクチンと同等であったが、SRD 抗体との反応性の低下など、現行の試験を改善する必要性も示唆された。また B 型株では細胞で継代した場合に蛋白量の低下も認められたことから、増殖に用いる細胞も含め、さらなる検討が必要となった。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし。

2. 学会発表

原田 勇一、高橋 仁、中村 一哉、浜本 いつき、Roth Bernhard、Trusheim Heidi、許斐 奈美、浅沼 秀樹、板村 繁之、田代 真人、山本 典生：インフルエンザワクチンシードウイルス分離用細胞の評価 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月

浜本 いつき、原田 勇一、中村 一哉、高橋 仁、許斐 奈美、浅沼 秀樹、田代 真人、山本 典生：無血清培地に馴化させた MDCK 細胞のインフルエンザワクチンシードウイルス分離用細胞としての検討 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月

浅沼 秀樹、山本 典生、佐藤 佳代子、中内 美名、高橋 仁、許斐 奈美、相内 章、長谷川 秀樹、田代 真人：細胞培養もしくは鶏卵で製造されたインフルエンザワクチンの品質管理試験および免疫応答への影響 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月

Kayoko Sato, Hideki Asanuma, Michiyo Kataoka, Hitoshi Takahashi, Kiyohiko Matsui, Noriyo Nagata, Masato Tashiro, Shigeyuki Itamura
Characterization of A/H1N1pdm09 viruses isolated in egg from clinical specimens. 6th Orthomyxovirus Research Conference, Bromont-Canada, September 2012

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 |

表1 検体スワブの Type B Real-Time PCR と MDCK を用いたウイルス分離

Type B	Type	Cp	C1	
			TRBC	GRBC
N-173	B	21.33	128	ND*
N-174	B	20.63	128	ND
N-175	B	23.86	<2	128
N-176	B	22.92	128	ND
N-177	B	20.89	128	ND
N-178	B	22.84	256	ND
N-179	B	19.6	256	ND
N-180	B	22.7	256	ND
N-181	B	23.35	256	ND
N-182	B	19.18	128	ND
N-183	B	21.2	128	ND
N-184	B	23.28	128	ND
N-185	B	19.07	128	ND
N-186	B	21.01	128	ND
N-187	B	25.12	128	ND
N-188	B	20.29	128	ND

ND* : not determined

表2 検体スワブの発育鶏卵を用いたウイルス分離と継代に伴うウイルス価の推移

Sample No.	HA titration (2 ⁿ)				
	E1	E2	E3	E4	E5
N173	<2	<2	<2	<2	<2
N174	<2	<2	<2	<2	<2
N175	<2	<2	<2	<2	<2
N176	<2	<2	<2	4	32
N177	<2	<2	<2	<2	<2
N178	<2	<2	<2	<2	<2
N179	<2	256	128	2	128
N180	<2	256	128	8	16
N181	<2	<2	<2	<2	<2
N182	<2	<2	128	128	128
N183	<2	<2	<2	<2	<2
N184	<2	<2	<2	4	16
N185	<2	128	64	4	16
N186	<2	<2	<2	<2	<2
N187	<2	<2	<2	<2	<2
N188	<2	<2	<2	<2	<2

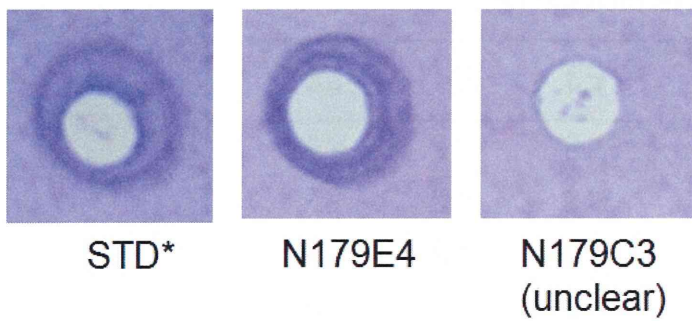


図1 細胞および発育鶏卵で分離・継代したB型株のSRD抗体に対する反応性

表3 鶏卵もしくは培養細胞で分離・継代したB型株の蛋白量

Strain	HA価(2 ⁿ)		蛋白量(μg/mL)		増加率 (%)
	C3	C9	C3	C9	
N179	9	8	305	188	61.64
N180	10	7	295	109	36.95
BV2	9	9	311	127	40.84
BV11	9	9	125	82	65.60

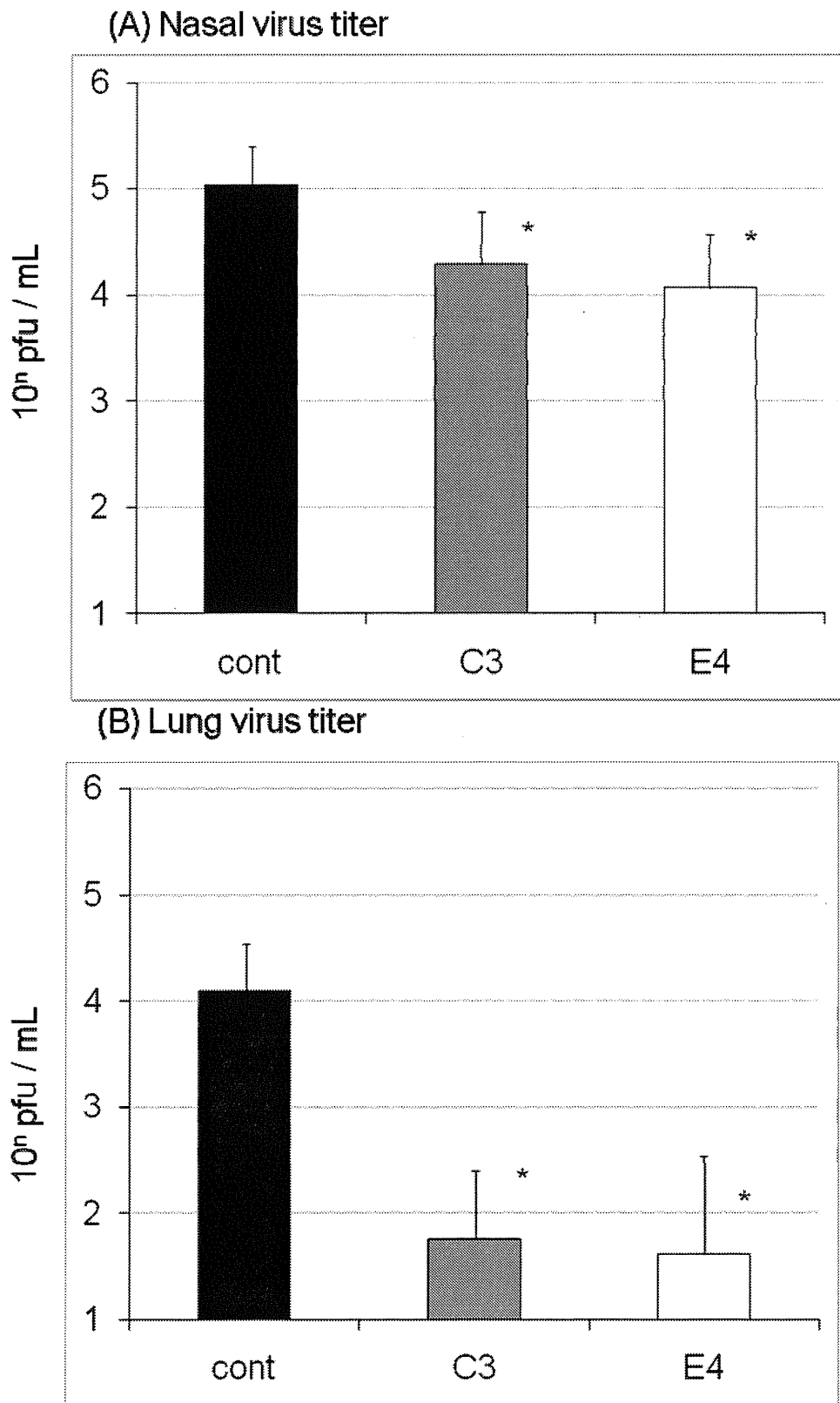


図2 細胞もしくは鶏卵で作製したB型ワクチンを接種したマウスにおける防御効果
 (A) 鼻腔洗浄液中のウイルス価
 (B) 肺洗浄液中のウイルス価

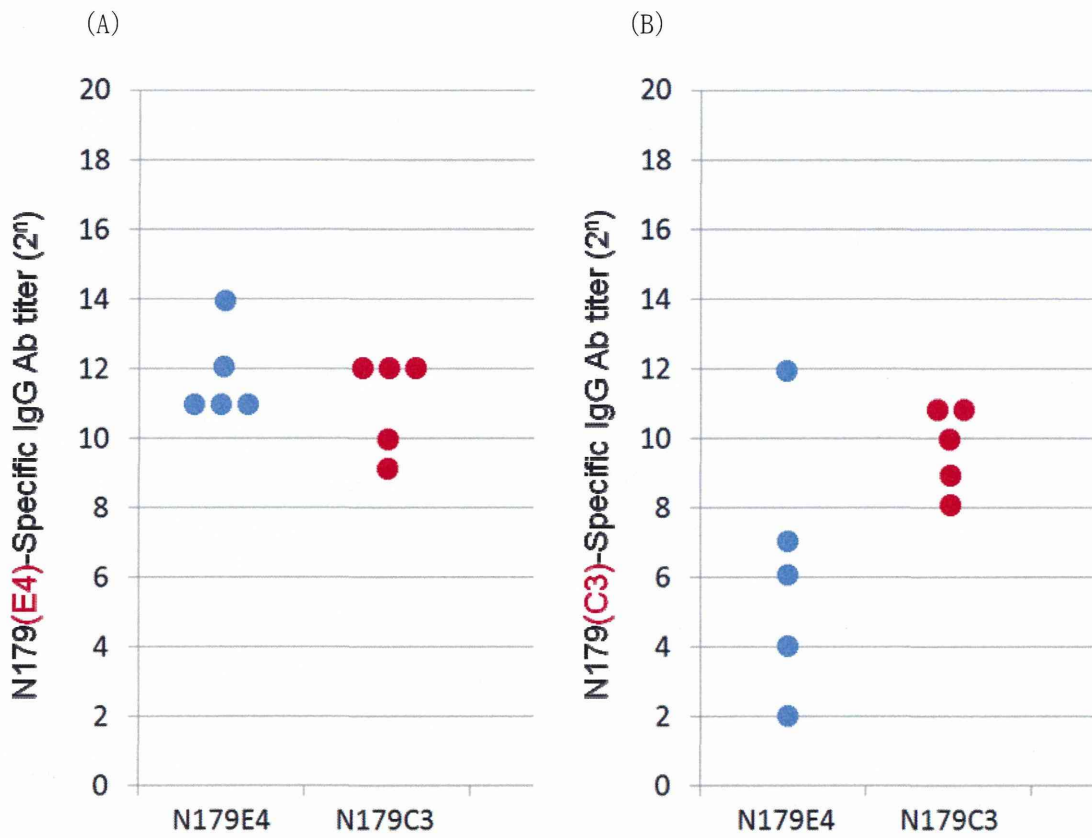


図3 細胞もしくは鶏卵で作製したB型ワクチンを接種したマウスにおける特異的抗体応答(血清中のIgG)

(A) N179(E4)に対するIgG抗体価

(B) N179(C3)に対するIgG抗体価

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

分担研究者 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 次世代のワクチン製造法として、細胞培養法が注目されている。この方法には、(1) 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で調製できるため、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、(2)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 という2つの大きな利点がある。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、これまでに構築したGMP基準に準拠したMDCK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。さらなる試験の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、原因がプライマー・プローブ配列とウイルス配列のミスマッチと考えられたため、各ウイルスで保存性の高い領域を特定し、その領域を標的とする検出系の構築を進めた。

ワクチンシードウイルスの分離・増殖に使用できるGMPグレードのセルバンクの構築と、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の構築によって、安全性・有効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が確立出来ると期待される。

A. 研究目的

次世代のワクチン製造法として、細胞培養法が注目されているが、この方法には、(1) 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で調製できるため、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、(2)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 という2つの大きな利点がある。

これらの利点のうち、特に後者の優位性を最大

限に引き出すためには、鶏卵馴化に伴う遺伝子変異を避けるため、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。そのためには、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、構築したMDCK細胞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

これまでに、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。

H23年度に実施した試験の結果を踏まえ、さらにMCB、WCB、EOPCの性状を確認するために、GMP基準に適合する条件で以下の試験を行った。

[MCB]

- Identification & Characterisation of Cultured Cells by Analysis of 4 Isoenzymes
- Qualification of the Test Article for the Detection of Agar-Cultivable Mycoplasma in accordance with USP/EP/PTC Requirements (Without Avian Controls)

[EOPC]

- DNA fingerprinting of cell lines
- Qualification of the Test Article for the Detection of Agar-Cultivable Mycoplasma in accordance with USP/EP/PTC Requirements (Without Avian Controls)
- Test for Mycobacterium spp Culture Medium Method
- In vitro assay for the detection of canine viruses
- Test for the Presence of inapparent Viruses Including Guinea Pigs (CBER Guidance 2006)
- Retrovirus 293 Co-cultivation assay (5 Passages, FPERT End-point)
- Karyology of non-human mammalian cell lines (50 metaphases)
- Detection of Viral Contaminants in Bovine

Serum According to CPMP & US 9CFR Requirements, Also meets EP requirements as per the Tech Spec.

- MAP Test with LCMV Challenge
- Oncogenicity in newborn nude mice

2) 迷入ウイルス検出系の構築について

昨年度までの研究結果から、選定したキットのプライマー・プローブ配列が検体中のウイルス配列と完全にマッチしない場合があることが推察されたため、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うこととした。

(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、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は見られていないが、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。

以上の結果をまとめると、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。

D. 考察

流行株により近い抗原性を持ったワクチンを製造できるという細胞培養ワクチンの持つ長所を最大限に生かすためには、ワクチンシードウイルスの製造を、鶏卵を用いずに培養細胞のみで行う必要がある。さらに、危機管理上の観点から、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非常に重要である。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構築を目的として、これまでに構築したGMP基準のMDCKセルバンクについて、未実施分の迷入因子否定試験と特性試験を行い、シードウイルス製造用細胞としての評価を進めた。なお、迷入因子否定試験、特性試験は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の試験として、マイコバクテリウム検出試験、イヌウイルス検出試験、迷入ウイルス検出のためのin vivo試験、感染性レトロウイルス検出試験、ウシ血清に混入し得るウイルスの検出試験、ウイルスに対する抗体産生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。

また、Oncogenicity試験を行い、現在まで陰性という結果を得ている。試験は3月中旬に終了する予定である。

全体として、これまで得られた試験の結果からは、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も良いであろう。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・有効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。

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。未完了の試験もあるため、最終的な結論はまだ出せないが、実際に使用可能であることが示されつつある。

迷入ウイルス検出系については、各ウイルスについて保存性の高い領域を特定し、広い範囲の株をカバーできる検出系の構築を進めていく予定である。

ワクチンシードウイルスの分離・増殖に使用できるGMPグレードのセルバンクの構築と、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の構築によって、安全性・有効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が確立出来ると期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hamamoto, I., Takaku, H., Tashiro, M., Yamamoto, N. High yield production of influenza virus in Madin Darby canine kidney (MDCK) cells with stable knockdown of IRF7. PLoS One, in press (2013)

Yoshida A, Kiyota N, Kobayashi M, Nishimura K, Tsutsui R, Tsukagoshi H, Hirano E, Yamamoto N, Ryo A, Saitoh M, Harada S, Inoue O, Kozawa K, Tanaka R, Noda M, Okabe N, Tashiro M, Mizuta K, Kimura H. :Molecular epidemiology of the attachment glycoprotein (G) gene in respiratory syncytial virus in children with acute respiratory infection in Japan in 2009/2010. J Med Microbiol. 61(Pt 6):820-9, 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. 7(3):552-62, 2012

Chang MO, Suzuki T, Yamamoto N, Watanabe M, Takaku H. :HIV-1 Gag-virus-like particles inhibit HIV-1 replication in dendritic cells and T cells through IFN- α -dependent upregulation of APOBEC3G and 3F. J Innate Immun. 4(5-6):579-90, 2012

Noguchi K, Ishibashi K, Miyokawa K, Hokari M, Kanno T, Hirano T, Yamamoto N, Takaku H. :HIV-1 Suppressive Sequences Are Modulated by Rev Transport of Unspliced RNA and Are Required for Efficient HIV-1 Production. PLoS One. 7(12):e51393, 2012

山本典生、田代真人 細胞培養インフルエンザワ