

201318054A

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 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 田代真人
平成 26 年(2014)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 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 田代真人
平成 26 年(2014)3 月

目 次

平成 25 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. 日本人の H7N9 ウイルスに対する HI 抗体保有状況の調査 P.27

研究分担者 小田切孝人

研究協力者 岸田典子、今井正樹、徐紅、藤崎誠一郎
高下恵美、菅原裕美、伊東玲子、佐藤 彩
土井輝子、江島美穂、三浦 舞

2. 中国でヒトから分離された H7N9 ウイルスのニワトリに対する病原性の解析 P.31

研究分担者 岸田典子

3. 血清学的調査による 2013/14 シーズンの季節性インフルエンザワクチン効果の
評価 P.33

研究分担者 岸田典子

4. 新規機能的遺伝子解析法の構築と流行株遺伝子解析 P.35

研究分担者 藤崎誠一郎

5. 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.39

研究分担者 原田勇一

6. 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.43

研究分担者 高橋 仁

7. 細胞培養ワクチン製造用種ウイルスの母体ウイルスベクターの検討 P.47

研究分担者 信澤枝里

研究協力者 鈴木康司

8.	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.51
	研究分担者 浅沼秀樹	
9.	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.57
	研究分担者 山本典生	
10.	細胞培養法によるウイルス分離効率の解析	P.65
	研究分担者 中村一哉	
11.	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.71
	研究分担者 浜本いつき	
	研究協力者 山本典生	
III	成果刊行物	P.75
IV	添付資料	
・	Information for WHO Annual Consultation on the Composition of Influenza Vaccine in the Southern Hemisphere	P.1~ P.66
・	Information for WHO Annual Consultation on the Composition of Influenza Vaccine in the Northern Hemisphere	P.1~ P.53

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

研究代表者 田代真人

国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター センター長

研究要旨 ①国およびWHOのインフルエンザ流行予測、ワクチン株選定、インフルエンザ対策関連の提言を行うため、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、抗ウイルス剤耐性解析等を行った。これらの結果をもとに、2013/14 シーズンワクチン株に A/California/7/2009(X-179A)(H1N1)pdm09、A/Texas/50/2012(X-223) (H3N2)、B/Massachusetts/2/2012(BX-51B) (山形系統) を選定するよう提言した。2013/14 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によって、ワクチンの効果が大きく低下していた。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し、細胞培養法への移行を検討する必要があると考えられた。また、中国で発生した A(H7N9)ウイルスについて、遺伝子解析、抗体保有状況の調査、ニワトリにおける病原性と増殖性の解析を行い、これらの結果に基づいてリスク評価を行った。

②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・実用化を推進した。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・実施の支援等を行い、その結果、平成 25 年度末までに細胞培養ワクチンの承認を得るという本研究プロジェクトの大きな目標が達成できる見込みとなった。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。今後、この実績に基づいて季節性インフルエンザワクチンについても細胞培養法による製造に切り替えて行く必要があり、早急に検討する必要がある。

A. 研究目的

適切なワクチン株の選定を行う。

(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

2)血清学的調査によるワクチンの有効性の評価

ワクチン接種者の血清と実際の流行株との反応性を調べることにより、ワクチン効果の評価を行い、次年度のワクチン選定に有用な情報提供を行う。

3)新規機能的遺伝子解析法の構築と流行株遺伝子解析

中国で発生しヒトへの感染が拡大している A(H7N9)ウイルスについて、遺伝子配列を用いて人に対する感染性および病原性について明らかにする。

4)日本人の H7N9 ウイルスに対する HI 抗体保有状況の調査

H7N9 ウイルスに対する HI 抗体レベルを事前に把握しておくことを目的とした。

5) 中国でヒトから分離された H7N9 ウイルスのニワトリに対する病原性の解析

H7N9ウイルス感染家禽の症状やウイルス排泄量を調べることにより、H7N9インフルエンザウイルスのリスク評価を行うことを目的とする。

(細胞培養ワクチン開発に関する研究)

6)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。

7)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。

8)細胞培養法によるウイルス分離効率の解析

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持せながら、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 GMP 準拠での使用に向けて品質保証された MDCK 細胞株「MDCK-NIID」を用いて、A/H1N1pdm09 亜型株 (H1pdm)、A/H3N2 亜型株 (H3)、B/Victoria 系統株 (B/Vic)、B/Yamagata 系統株 (B/Yam) 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、当該細胞株のウイルス分離用基材としての有用性を評価した。

9)細胞培養法による分離ウイルスの遺伝的安定性についての解析

ワクチンシード候補株を培養細胞または鶏卵で分離・継代する過程で、ウイルス遺伝子に変異が導入されると、ワクチンシード候補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、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。

10)細胞培養法による分離ウイルスの抗原的安定性についての解析

ワクチンシードウイルス分離用培養細胞に求められる条件のひとつとして、当該細胞から分離されるウイルスは長期の継代にわたって抗原的安定性を維持する必要がある。しかしながら、MDCK_N 細胞から分離した B 型ウイルスの中にはその HA 遺伝子上に鶏卵継代株では抗原性に大きな変化がもたらされることが知られている糖鎖付加部位への変異と同様の変異を生ずる株が存在した。そこで本研究では、MDCK_N 細胞分離株のうち HA 遺伝子上の糖鎖付加部位に変異を起こしたウイルスに対する抗血清を作製し、遺伝子変異株の抗原性について解析を行った。

11)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

本研究は、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する。今年度は、臨床検体から H3N2 亜型の鶏卵と細胞培養での分離、ならびに継代による増殖性、抗原性ならびに免疫原性の変化について検討した。

12)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。

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

新型インフルエンザの発生に対応するため細胞培養ワクチンの開発が進められているが、製造コストがかかるという短所を克服し、より迅速なワクチン製造を可能とするためには、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、ウイルスの増殖性に関与する遺伝子を同定し、それを強制発現、ノックダウン、ゲノム上から削除する等の改変を加えることによって、ウイルスの増殖性が高まった新規細胞を開発することを目的とする。今年度は、ウイルスの増殖性を変化させる化合物を手がかりに、ウイルスの増殖性に関与する宿主因子を同定し、それに改変を加えることによってウイルスの増殖性を向上させることを試みた。

14)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

ワクチン製造においてはウイルスタンパク収量が多いことが重要であり、種株には高増殖性・高タンパク収量であることが求

められている。細胞培養によるワクチン製造は従来の鶏卵培養よりも時間が短縮されることから、細胞培養への移行が進められているが、細胞培養ワクチンの母体ウイルスは確立されておらず、その開発は重要な課題である。そこで本研究では細胞培養ワクチンの種株作製に適した母体ウイルスベクター開発のため、母体ウイルス候補株の継代馴化後における遺伝子変異を検討した。

[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

中村一哉 同上

高橋 仁 同上

原田勇一 同上

浅沼秀樹 同上

山本典生 同上

浜本いつき 同上

信澤枝里 同上

研究協力者

奥野良信：阪大微生物病研究会

成瀬毅志：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

今川昌之：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

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

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

2013/14シーズンワクチン接種前後のペア血清（60歳未満の成人層：30人、60歳以上の老人層：30人）を用いて、ワクチン株、2013/14シーズンの代表的な流行株との反応性を赤血球凝集抑制（HI）試験により調べた。HI抗体価から幾何平均値（GMT）を求めて比較した。

*2013/14シーズンワクチン：

A/California/7/2009 (H1N1)pdm09 (X-179A)、A/Texas/50/2012 (H3N2)(X-223)、B/Massachusetts/02/2012 (BX-51B) (山形系統)

3) 新規機能的遺伝子解析法の構築と流行株遺伝子解析

データベース上に公開された A(H7N9)ウイルス A/Shanghai/1/2013 株， A/Shanghai/2/2013 株， A/Anhui/1/2013 株， A/Hangzhou/1/2013 株， A/pigeon/Shanghai/S1069/2013 株， A/chicken/Shanghai/S1053/2013 株， A/environment/Shanghai/S1088/2013 株)

の遺伝子配列を用いてアミノ酸配列および置換部位の同定を行った。またアミノ酸置換に基づき予測される病原性および感染性を評価した。また、neighbor-joining法を用いて遺伝子系統樹解析を行い、ウイルスの近縁性について解析を行った。

4)日本人の H7N9 ウイルスに対する HI 抗体保有状況の調査

2010年と2011年にかけて採取された1-87歳の300人分の日本人血清(国立感染症研究所血清バンクより提供を受けた)を使用し、シチメンチョウ血球を用いた赤血球凝集抑制(Hemagglutination inhibition: HI)試験を行った。ウイルス抗原には A/Anhui/01/2013 (H7N9)を用い、各血清の HI 抗体価を測定した。

5) 中国でヒトから分離された H7N9 ウイルスのニワトリに対する病原性の解析

中国でヒトから分離された A/Anhui/1/2013 (H7N9)と日本でカモから分離された A/duck/Gunma/466/2011 (H7N9)ウイルスについて、4週齢SPFメスのニワトリ6羽に 2×10^6 p.f.u.のウイルス液を経鼻接種し、気管と総排泄腔の拭い液を6日間毎日採取して、ウイルス感染価を測定した。また感染3日目と6日目に主要臓器を採取した。ウイルス感染価は、MDCK細胞を用いたブラック法により測定された。

(細胞培養ワクチン開発に関する研究)

6)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(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))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。

7)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にて定期的で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。

8)細胞培養法によるウイルス分離効率の解析

細胞株については、ATCCから購入した細胞株(CCL-34)を無血清培地に馴化させた後、マスターセルバンクおよびワーキングセルバンクを作製した。このセルバンクについて、細胞特性評価、迷入病原体否定試験を実施し、GMP準拠使用に能う品質が保証されたもの(MDCK-NIID)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従来用いられている MDCK 細胞(MDCK_C)を用いた。

臨床検体については、2011/2012 および 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、H3、B/Vic、B/Yam のそれぞれが陽性と判定された検体をウイルス分離用試料に供した。

ウイルス分離・継代については、MDCK-NIID、MDCK_C それぞれをφ60mm ディッシュに 1.5x10⁶ 個/枚で播種、静置培養三日目に臨床検体 50ml と OPTI-PRO SFM 培地 (GIBCO 社) 150ml 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°C、5%CO₂ 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、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、およそ 1 HA 価分のウイルス液に希釈調製したものをを用いた。

9)細胞培養法による分離ウイルスの遺伝的安定性についての解析

今回使用するワクチンシード分離用候補培養細胞としては、無血清培地に馴化させた MDCK 細胞(MDCK-NIID)を用いた。比較対照として、ウイルス分離等にも用いられる付着型 MDCK 細胞(MDCK_C)を使用した。

A(H1N1)pdm09 株と H3N2 株、B 型インフルエンザウイルスの B/Victoria 系統株と B/Yamagata 系統株のウイルスゲノムの存在が確認されている臨床検体(各 5 検体)から、各細胞を用いて分離したウイルスを 1 代目として、その後 10 代目までウイルス継代を行った。臨床検体および継代 1 代目から 10 代目のウイルスを用いて、ウイルス HA 及び NA 遺伝子の解析を行った。

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、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。

10)細胞培養法による分離ウイルスの抗原的安定性についての解析

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付着型 MDCK 細胞 (MDCK_C 細胞) を使用した。これまでの解析において MDCK_N 細胞から分離した B 型ウイルス (Victoria 系統株) のうち、HA 遺伝子上の糖鎖付加部位 (214T: アミノ酸番号はホルミルメチオニンから起算した番号) に変異を生じたウイルスをフェレットに感染させ、2 週間後に全採血を行って血清を分離した。HI 試験の抗原ウイルスには感染血清作製に使用したウイルス株と同時期に MDCK_N、MDCK_C 細胞から分離した B/Victoria 系統株を使用した。また、赤血球は 0.75%モルモット赤血球を使用した。

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

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。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、マウスの皮下に抗原を接種し、その後抗体価を測定することにより検討した。

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

[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。

H24 年度にまでに実施した試験の結果を踏まえ、さらに MCB、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]

• Quantitative Transmission Electron Microscopy of Sections for the Detection of Viruses, Fungi, Yeasts, Bacteria and Mycoplasmas (200 cell profiles)

• Real time Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of Bovine polyomavirus(BPyV) in Biological Samples

• Real time Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of Swine Vesicular Disease Virus (SVDV) in

Biological Samples

• Real time Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of Canine Papillomaviruses (COPV, CPV2 and CPV3) and Feline Papillomavirus (FPV) in Biological Samples

• Real time Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of Hepatitis type E virus genotypes 3 and 4 in Biological Samples

[EOPC]

• Oncogenicity in newborn nude mice

[2] 迷入ウイルス検出系の構築について

これ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り、それによって感度が大きく低下することが明らかとなった。そこで今年度は、昨年度に引き続き、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。

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

小規模な化合物ライブラリーをスクリーニングし、PR8 ウイルスの増殖を変化させる化合物を同定した。次に、同定した化合物の標的となる宿主因子が明らかである場合には、その宿主因子を siRNA でノックダウンしてウイルスの増殖に与える影響を調べた。siRNA のトランスフェクションは 10 nM で行い、siRNA 導入後 48 時間の時点で

PR8 ウイルスを MOI=0.01 で感染させた。感染後 24 時間の時点でサンプルを回収し、ウイルス量の定量、遺伝子発現の解析等を行った。

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

[1]細胞とウイルス

細胞は ATCC が保有する 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 (MDCK-NIID)を使用した。細胞の継代は動物由来成分を含まない(OPTI-PRO SFM(+L-Glutamine))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)と由来の異なる実験室維持ウイルスの A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)(PR8)の PR8-N と PR8-41 の 2 株を使用した。

[2]ウイルスの継代

ウイルスは限界希釈法で細胞に感染させ継代した。細胞を PBS で洗浄し、感染用培地で 10 倍階段希釈したウイルスを 34°C で 45 分吸着させた。吸着後に Acetyl Trypsin を終濃度 2.5µg/ml になるよう添加したウイルス感染用培地を加え、34°C で 72~96 時間観察を行った。高希釈で細胞変性効果 (CPE)と HA 力価が確認された培養上清を使い 10 代まで継代を繰り返した。

回収した培養上清は 2000 rpm、10 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。

[3]遺伝子解析

回収した培養上清からウイルス RNA を精製し、各セグメント (PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M, NS) に特異的なプラ

イマーを用いて RT-PCR を行った。各セグメントの増幅が確認された PCR 産物を用いてダイレクトシーケンスを行った。

C. 研究結果

(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

A(H1N1)pdm09ワクチン：X-179A ワクチン接種者の血清は、HI試験において、ワクチン株にはよく反応したが、流行株との反応性は低かった。

A(H3N2)ワクチン：X-223 ワクチン接種者の血清は、ワクチン株にはよく反応したが、いずれの流行株とも反応性は低かった。

B 山形系統ワクチン：BX-51B ワクチン接種者の血清は HI 試験解析において、ワクチン株と流行株のともに反応性は低かった。

3)新規機能的遺伝子解析法の構築と流行株遺伝子解析

中国で分離された A(H7N9)ウイルスの 8 つのセグメント遺伝子 (PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M, NS) 配列と、今までに公開されている各亜型の遺伝子配列と相同性を解析したところ、HA 遺伝子は H7 ウイルス、NA 遺伝子は N9 ウイルスであり、残りの 6 つの遺伝子は A(H9N2)ウイルス由来であ

る可能性が強く示唆された。A/Shanghai/2/2013 株, A/Anhui/1/2013 株, A/Hangzhou/1/2013 株の遺伝子配列は 99%以上同一であった。トリおよび環境由来ウイルスの遺伝子配列はヒト由来の A/H7N9 ウイルスとほぼ同一であり遺伝子系統樹上でも同じ集団に属した。しかし PB1 遺伝子では、A/pigeon/Shanghai/S1069/2013 株は異なる集団に属した。また A/Shanghai/1/2013 株は他の A/H7N9 ウイルスと高い相同性を有しているものの、遺伝子系統樹では異なる集団に属した。

病原性については、HA タンパク質の開裂部位のアミノ酸配列から、トリに対して低病原性であることが示唆された。また、A/Shanghai/1/2013 株は A138S を持っており、A/Shanghai/2/2013 株, A/Anhui/1/2013 株, トリおよび環境由来ウイルスは G186V, Q226L を持っていたことから、ヒト型レセプターに対する結合能が増強されている可能性が示唆された。さらに、糖鎖付加部位における置換 T160A を有しておりヒト型レセプターへの結合能増強が示唆された。PB2 タンパク質では、ヒト A(H7N9) は 627K を有しており哺乳類でのウイルス増殖能向上に寄与している可能性が考えられた。いずれの A(H7N9) ウイルスにおいても M2 タンパク質は S31N を有しており、アマタジン耐性であることが示された。NA タンパク質では、A/Shanghai/1/2013 株のみ R294K を有しておりノイラミニダーゼ阻害薬に対する感受性の低下が示唆されたが、他の A(H7N9) ウイルスはノイラミニダーゼ阻害薬の感受性に関するアミノ酸置換を有してはいなかった。また NA タンパク質の 69-73 アミノ酸領域が欠損しており、哺乳類に対する病原性を高めている可能性

が考えられた。PB1 遺伝子は病原性に関与するタンパク質 PB1-F2 の全長をコードしていたが、N66S を有していなかった。NS1 タンパク質では、マウスで病原性の減弱に関与する C 末端の PDZ ドメインを欠損していたがこの影響は不明と考えられる。

4) 日本人の H7N9 ウイルスに対する HI 抗体保有状況の調査

1-87 歳の 300 人分の日本人血清全てにおいて HI 抗体は検出限界以下 (<10HI) であった。

5) 中国でヒトから分離された H7N9 ウイルスのニワトリに対する病原性の解析

中国のヒトから分離された A/Anhui/1/2013 (H7N9) 株を接種したニワトリは、いずれの個体も 6 日間の観察期間中に明瞭な臨床症状を示さなかった。また、限られた臓器からしかウイルスは検出されなかった。気管拭い液からは全ての個体でウイルスが検出されたが、総排泄腔拭い液からは検出されなかった。以上の成績は、H7N9 ウイルスがニワトリに対して低病原性であることを示し、ウイルス排泄量も多くないことがわかった。

(細胞培養ワクチン開発に関する研究)

6) 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

これまでに、研究協力者である各メーカーから承認申請に必要な試験の進捗状況に関する情報の収集と、試験実施における問題点の整理を行ってきた。その解決のために、外部専門家からなる評価委員、厚労省結核感染症課の担当者の同席のもとに、本研究班として WG の会議を行い、研究推進

を図ってきた。その結果、平成 25 年度末までに細胞培養ワクチンの承認を得るという本研究プロジェクトの大きな目標が達成できる見込みとなった。

細胞培養インフルエンザワクチンの実用化は、新型インフルエンザから季節性インフルエンザにも範囲を広げつつあり、その状況を踏まえて、細胞培養ワクチン実用化に関するディスカッションを行った。具体的に浮かび上がってきたポイントは以下の通りであった。

- [1]プロトタイプ申請に必要となる、異なる亜型のウイルスを用いた動物攻撃試験の実施について
- [2]細胞培養ワクチン用シードウイルスについて
- [3]SRD 試験法および SRD 代替法について
- [4]プレパンデミックワクチンの細胞培養法での製造について
- [5]季節性インフルエンザワクチンの細胞培養法での製造について

7)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。

8)細胞培養法によるウイルス分離効率の解析

MDCK-NIID および比較対照として MDCK_C を用いて、臨床検体からのウイルス分離効率を調べたところ、H1pdm 患者臨床検体からのウイルス分離においては、どちらの細胞への接種においても、接種後培養上精中の HA 活性確認には盲継代を要した。MDCK-NIID を用いた場合は、5 検体中 3 検体が 1 回の盲継代で分離を確認できたが、MDCK_C を用いての分離には 5 検体中 4 検体が複数回の盲継代を必要とした。分離後のウイルス HA 価は継代を通じて 32-64 であり両細胞での差異は認められなかった。

H3 分離については、MDCK-NIID への接種では全ての検体からの分離に盲継代を要した。MDCK_C を用いた場合には分離に盲継代を必要とした検体は 5 株中 3 株であった。分離したウイルスの HA 価は 32-64 を推移し細胞間での差は認められなかった。

B/Vic と B/Yam 系統株は両細胞への初回接種でウイルス分離を確認でき、分離ウイルスの HA 価は 256 以上と比較的高値を示した。

上記で供試した検体に加えて H1pdm 陽性検体からの分離率の追加検討を別途行ったところ、MDCK-NIID への検体接種ではウイルス分離が確認できたのは 5 検体中 2 検体のみであり、いずれも複数回の盲継代を要した。リアルタイム PCR 法でのウイルスゲノム定量の結果から分離できなかった検体中のウイルス含量が微量であることが原因と推定されたが、同一供試検体全てか

らウイルス分離ができた MDCK_C に比して低い分離率が示された。

9)細胞培養法による分離ウイルスの遺伝的安定性についての解析

MDCK-NIID 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-NIID 細胞で分離・継代された各型・亜型ウイルス株の全てで HA 遺伝子への変異導入が確認された。ウイルス株ごとの変異導入検体数は A(H1N1)pdm09 株で 3/5 検体、A/H3N2 株で 5/5 検体、B/Victoria 系統株で 4/5 検体、B/Yamagata 系統株で 5/5 検体であった。一方、MDCK_C 細胞で分離・継代されたウイルス株では A(H1N1)pdm09 株、H3N2 株で HA 遺伝子への変異導入が確認された。ウイルス株ごとの変異導入検体数は A(H1N1)pdm09 株で 5/5 検体、A/H3N2 株で 2/5 検体であった。また、NA 遺伝子への変異導入としては、MDCK-NIID 細胞で分離・継代された A(H1N1)pdm09 株、H3N2 株で変異導入が確認された。ウイルス株ごとの変異導入検体数は A(H1N1)pdm09 株で 1/5 検体、A/H3N2 株で 5/5 検体であった。一方、MDCK_C 細胞で分離・継代されたウイルス株では H3N2 株でのみ NA 遺伝子への変異導入が確認され、変異導入検体数は 4/5 検体であった。

MDCK-NIID 細胞で分離・継代されたウイルス株の HA 遺伝子変異導入箇所としては、A(H1N1)pdm09 株では開始コドン部位から数えて 125、143、155 番目でアミノ酸置換を生じさせる変異があり、これらの部位は抗原性に影響するとされる部位であった。H3N2 株では開始コドン部位から数え

て 221、225、355 番目でアミノ酸置換を生じさせる変異があり、225 番目はレセプター結合に影響するとされる部位であった。

B/Victoria 系統株では開始コドン部位から数えて 166、197、199 番目でアミノ酸置換を生じさせる変異があり、これらの部位は抗原性や糖鎖付加に影響するとされる部位であった。B/Yamagata 系統株では開始コドン部位から数えて 167、196 番目でアミノ酸置換を生じさせる変異があり、これらの部位は抗原性や糖鎖付加に影響するとされる部位であった。また、NA 遺伝子変異導入箇所としては、A(H1N1)pdm09 株では開始コドン部位から数えて 415 番目で、H3N2 株では 148 番目でアミノ酸置換を生じさせる変異が確認された、H3N2 株の 148 番目は糖鎖付加に影響するとされる部位であった。

MDCK_C 細胞で分離・継代されたウイルス株の HA 遺伝子変異導入箇所としては、A(H1N1)pdm09 株では開始コドン部位から数えて 153、154、155 番目でアミノ酸置換を生じさせる変異があり、これらの部位は抗原性に影響するとされる部位であった。H3N2 株では開始コドン部位から数えて 221 番目でアミノ酸置換を生じさせる変異があり、こ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。また、NA 遺伝子変異導入箇所としては、H3N2 株では 77 番目、148 番目でアミノ酸置換を生じさせる変異が確認された、H3N2 株の 148 番目は糖鎖付加に影響するとされる部位であった。

変異導入時期としては、同じ株でも検体によって異なっており、MDCK-NIID 細胞で分離・継代を行った場合、HA 遺伝子について A(H1N1)pdm09 株では 2 から 3 継代目で、H3N2 株では 3 から 9 継代目、

B/Victoria 系統株では 6 から 10 継代目、B/Yamagata 系統株では 5 から 8 継代目であった。また、NA 遺伝子について A(H1N1)pdm09 株では 3 継代目で、H3N2 株では 4 から 5 継代目であった。一方、MDCK_C 細胞で分離・継代を行った場合、HA 遺伝子について A(H1N1)pdm09 株では 2 から 3 継代目で、H3N2 株では 5 から 10 継代目であった。また、NA 遺伝子について H3N2 株では 5 から 10 継代目であった。

10)細胞培養法による分離ウイルスの抗原的安定性についての解析

フェレット感染抗血清作製に使用したウイルス株を抗原とした場合の HI 価を基準として解析検体の HI 価を比較したところ、フェレット感染抗血清作製に使用したウイルス株で、HA 遺伝子の 214T に変異が生じる前の継代歴の株の HI 価は 1/2 であった。

同じ MDCK_N 細胞を用いて基準ウイルスと同時期に臨床検体から分離・継代したその他の B/Victoria 系統株は、いずれも HA 遺伝子の 214T に変異を持たなかったが、その HI 価の差異は 1/2～1/4 の範囲内であった。他方、MDCK_N 細胞に用いたものと同一の臨床検体から MDCK_C 細胞を用いて分離・継代した B/Victoria 系統のウイルス株は、すべてのウイルスが HA 遺伝子の 214T に変異を持たなかったが、HI 価の差異は 1/2～1/4 の範囲内であった。

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

[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、かつ定量 PCR によって H3 型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、鶏卵では 1 例も分離できなかったのに対し、MDCK 細胞では 16/16 例、分離率 100%であった。分離されたウイルスを細胞で継代した結果、3 例で 2 代目ないしは 3 代目にウイルス価が認められなくなったが、他の 13 株は 8 代の継代に成功した。分離株の HA 価は様々であったが、継代に成功した 13 株の継代毎の HA 価に顕著な増加を示した株は認められなかった。このことは、H3N2 株は MDCK で連続継代することによる増殖性の変化は乏しいことが示唆された。

[2] 分離・継代株の性状解析

今回分離継代した 16 株のうち、継代中、比較的高い HA 価で推移した株と、低い HA 価で推移した株それぞれ 1 株ずつを培養し、回収されたウイルスのタンパク量および HA 含有量と継代前後の増加比率を測定した。その結果、細胞で 3 代継代した株と 9 代継代した株の蛋白量にはほとんど違いは認められなかった。またこのとき HA 含有量と継代前後の比率にも、ほとんど違いは認められなかった。また今回検討した 2 株は、HA が比較的高く推移した株と低く推移した株であったにも関わらず、HA 含有量に顕著な差が認められなかった。このことは、H3N2 株では株間や継代の違いによる増殖能や蛋白収量には違いが乏しいことが示唆された。

[3] 細胞培養法で製造されたワクチンの免疫原性

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。マウスに細胞培養系で分離・増殖させたワクチンを皮下接種し4週後、血中の抗体応答を検討した。その結果、株の違いおよび継代の違いによる応答性に有意な差は認められなかった。このことは、細胞培養系でH3N2株ワクチンを製造した場合には、継代による免疫原性の低下の可能性は低いことが示唆される。

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

[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]

- Quantitative Transmission Electron Microscopy of Sections for the Detection of Viruses, Fungi, Yeasts, Bacteria and Mycoplasmas (200 cell profiles)

透過型電子顕微鏡によって 200 細胞分の解析を行った。その結果、ウイルス、ウイルス様粒子、マイコプラズマ等の細菌、酵母等の真菌類のいずれも認められなかった。

- Real time Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of Bovine polyomavirus(BPyV) in Biological Samples

MCB から DNA を抽出し、BPyV に対する定量 PCR を行った。その結果、40 サイクルでもシグナルは立ち上がらず、

MCB は BPyV 陰性（検出感度 100 copies/reaction）であった。

- Real time Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of Swine Vesicular Disease Virus (SVDV) in Biological Samples

MCB から RNA を抽出し、SVDV に対する定量 RT-PCR を行った。その結果、40 サイクルでもシグナルは立ち上がらず、MCB は SVDV 陰性（検出感度 100 copies/reaction）であった。

- Real time Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of Canine Papillomaviruses (COPV, CPV2 and CPV3) and Feline Papillomavirus (FPV) in Biological Samples

MCB から DNA を抽出し、COPV、CPV2、CPV3、FPV に対する定量 PCR を行った。その結果、40 サイクルでもシグナルは立ち上がらず、MCB は COPV、CPV2、CPV3、FPV の全てについて陰性（検出感度は COPV、CPV2、CPV3、FPV のいずれも 100 copies/reaction）であった。

- Real time Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of Hepatitis type E virus genotypes 3 and 4 in Biological Samples

MCB から RNA を抽出し、Hepatitis type E virus (genotypes 3 and 4) に対する定量 RT-PCR を行った。その結果、40 サイクルでもシグナルは立ち上がらず、

MCB は Hepatitis type E virus (genotypes 3 and 4)陰性 (検出感度 500 copies/reaction) であった。

[EOPC]

・ Oncogenicity in newborn nude mice

生後4日以内のヌードマウスに EOPC の細胞融解物または DNA を接種し、これらにマウス細胞を腫瘍化させる活性があるかについて解析を行った。

その結果、EOPC の細胞融解物にも DNA にも、細胞を腫瘍化させる活性は認められなかった。炎症等の異常を示した個体もわずかに存在したが、バックグラウンドとして自然に発生する異常の範囲に収まるものと考えられた。

[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 9 種類のウイルス (Respiratory syncytial viruses, Human coronaviruses, Varicella zoster virus, Epstein-Barr virus, Cytomegalovirus, Measles virus, Rubella virus, Human hepatitis B virus, Human hepatitis C virus)について、出来るだけ多数の配列情報(総計 2000 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。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ったところ、混合塩基での対応が必要な部分もあったが、設定が可能であった。これらを 9 種類のウイルスに対する第1段階のプライマー・プローブ候補配列群とし、今後、評価試験を進めていく必要がある。

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

小規模な化合物ライブラリーをスクリーニングしたところ、PR8 ウイルスの増殖を抑制する化合物として、シクロスポリン A (CsA)を同定した。CsA の 50%抑制濃度は、ヒト由来 A549 細胞においても、イヌ由来 MDCK 細胞においても、ほぼ同程度であった (1~2 μ M)。一方、CsA と同じく免疫抑制活性と NFAT 阻害活性を持つ FK506 では、PR8 ウイルスの増殖は抑制されなかった。CsA の主要な分子標的として、シクロフィリン A (CypA)、シクロフィリン B (CypB)、P-糖タンパク質 (P-gp) が知られているので、それらに対する siRNA を細胞に導入し、ウイルスの増殖に与える影響を調べた。siRNA を導入した A549 細胞に PR8 を MOI=0.01 で感染させ、24 時間後に培養上清中のウイルス量を測定したところ、ウイルスの増殖効率が增大する傾向が見られた。詳しいメカニズムは不明であるが、これらの結果から、CypA、CypB、P-gp の制御または改変により、ウイルス増殖効率が向上した新規細胞を開発できる可能性が示唆された。

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 2 株の PR8 を限界希釈法で MDCK-NIID 細胞に感染させ、10 継代を繰り返した。10 継代後のウイルスの全ゲノムをダイレクトシーケンスし、継代の前後での遺伝子変異を確認した。Udorn-Ts は 10 継代の前後で PB1、PA、NP、M1、NS1 に計 5 カ所、HA に 1 カ所の計 6 カ所のアミノ酸置換が認められた。HA に生じた変異は宿主受容体と相互作用する部位で

はなかった。PR8-NはPB2、PB1、PAに計4カ所とNAに1カ所、PR8-41はPB1、PA、NS1に計4カ所、NAに1カ所アミノ酸置換が認められた。PR8-41の1カ所のアミノ酸置換はPR8-Nと同じアミノ酸になる置換であったが、他のアミノ酸置換はそれぞれの株で独自に生じており、共通したアミノ酸変異は見られなかった。

D. 考察

(サーベイランスに関する研究)

インフルエンザはグローバルに広がる感染症であり、その流行の動向を把握し適切なワクチン株を選定するには、全世界規模でのインフルエンザ監視体制が不可欠である。そこで、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た適切なワクチン株の選定を行っている。流行するウイルスの抗原性の把握と流行予測自体は適切に実施されているが、インフルエンザワクチンは卵で製造されるため、特に最近の 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が低下しており、ワクチン効果が大きく減弱している可能性が明らかとなった。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される。

また今年度は緊急対応として、中国で発生した A(H7N9)ウイルスのリスクを評価するための研究を行った。

A(H7N9)ウイルスの遺伝子解析を行った結果、ヒトに感染および増殖する能力を与えるアミノ酸置換を HA、PB2 タンパクに有することが明らかになった。NA 遺伝子については、分離されたほとんどの A(H7N9)ウイルスはノイラミニダーゼ阻害薬に対し感受性型のアミノ酸を保持していた。また、HA 遺伝子の解析結果からは、鳥に対しては低病原性である可能性が示唆された。

日本人の H7N9 ウイルスに対する HI 抗体保有状況について赤血球凝集抑制 (HI) 試験により調査した結果、調べた 300 人全てのヒトで HI 抗体が陰性であった。HI 抗体を持たないのは日本人が H7 ウイルスに暴露されたことがないためと考えられる。現時点では、効率的なヒト-ヒト感染は確認されていないが、H7N9 インフルエンザウイルスがヒトへの感染能を高めた場合、H7N9 インフルエンザウイルスに対して、日本人は H7N9 インフルエンザウイルスに対する HI 抗体を持たないことから、全ての年齢層で高い感染リスクがあると考えられる。

また H7N9 ウイルスのニワトリに対する病原性の解析を行ったところ、H7N9 ウイルスを感染させたニワトリは明瞭な臨床症状を示さないことがわかった。また、限られた臓器からしかウイルスは検出されなかった。気管拭い液からはウイルスが検出されたが、総排泄腔拭い液からは検出されなかった。以上の成績は、H7N9 ウイルスが

ニワトリに対して低病原性であることを示し、感染鶏からのウイルス排泄量も多くないことがわかった。感染鶏からのウイルス排泄量が多くないため、ヒトが H7N9 ウイルスに感染する際の感染源がニワトリである可能性が低いことが示唆された。

(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、製造に培養細胞を用い発育鶏卵に依存しないことから、(1)何時でも、短期間に大量のワクチン株を増殖させることができる。(2)ヒト分離株に由来するワクチン株は、鶏卵に比べて哺乳類細胞で効率よく増殖しやすい。(3)発育鶏卵への馴化に伴う遺伝子変異が起こらず、ヒト流行株の抗原性が維持されて有効性が高いことが期待できる(4)閉鎖密閉系での細胞培養系により、ワクチン製剤への細菌汚染のリスクと作業員への感染リスクを最小に出来る等の利点がある。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ているが、こうした動きに連動し、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の同席の下に行った。これまで行ってきた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等を効率よく進めることが出来、その結果、平成 25 年度末までに細胞培養ワクチンの承認を得るという本研究プロジェクトの大きな目標が達成できる見込みとなった。

今年度は、細胞培養インフルエンザワクチンの実用化が新型インフルエンザから季節性インフルエンザにも範囲を広げつつあるという状況を踏まえて、(1)プロトタイプ申請に必要となる、異なる亜型のウイルスを用いた動物攻撃試験の実施 (2)細胞培養ワクチン用シードウイルス (3)SRD 試験法および SRD 代替法 (4)プレパンデミックワクチンの細胞培養法での製造 (5)季節性インフルエンザワクチンの細胞培養法での製造 等についてのディスカッションを行った。

(1) のプロトタイプ申請に必要となる異なる亜型のウイルスを用いた動物攻撃試験の実施については、「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、「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、これまで