

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。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

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 の範囲内であつ

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。

D. 考察

B/Victoria 系統ウイルス株の HA 遺伝子上に生じる糖鎖付加部位 (214T) への変異は、ウイルスを鶏卵で継代した場合にはその抗原性を著しく変化させることが知られており、HI 試験における鶏卵継代変異株に対するフェレット感染血清の野外株への反応性は、ホモウイルス抗原に対する反応性と比較すると 8 倍以上の低下となる場合が多い。筆者らのグループにおいて MDCK_N 細胞を用いて分離したウイルス株がその継代過程で HA 遺伝子上の 214T に変異を生じたことは、MDCK_N 細胞分離株の抗原的安定性について、ワクチンシードとしての適性が危惧された。しかしながら今回の解析において、HA 遺伝子上の 214T に変異を持つウイルス株に対するフェレット感染血清の反応性は、遺伝子変異の有無にかかわらず、全ての MDCK_N、MDCK_C 細胞分離株に対して HI 価として 4 倍以内の差異に止まっていた。また結果としては示さなかったが、今回の解析とは別の臨床検体を用いて MDCK_C 細胞より分離した B/Victoria 系統株では、HA の 214 番目のアミノ酸が 2 種類のアミノ酸の混合となる株が存在したが、このウイルス株に対するフェレット感染血清の反応性も、遺伝子変異の有無にかかわらず、全ての MDCK_N、MDCK_C 細胞分離株に対して HI 価として 4 倍以内の差異に止まっていた。これらの結果から、MDCK 細胞を用いて分離

した B/Victoria 系統株では、鶏卵分離株とは異なり、HA 遺伝子上の糖鎖付加部位に変異を生じてもその抗原性は変化しない可能性が示唆された。今後、変異ウイルス株に対するフェレット感染血清をさらに多ロット作製し、これらの抗血清が今回の解析と同様の反応性を示すのか、検証する必要がある。

E. 結論

HA 遺伝子上の 214T に変異を持つ MDCK_N 細胞由来 B/Victoria 系統株に対するフェレット抗血清は、抗原ウイルスの遺伝子変異の有無やウイルス分離に用いた細胞に関らず、解析したすべてのウイルス抗原に対して大きな乖離無く反応することが明らかとなった。今後更なる解析が必要であるが、MDCK_N 細胞分離 B/Victoria 系統ウイルス株の抗原的安定性は、HA 遺伝子上の 214T に生じる変異に左右されない可能性がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

(発表誌名巻号、頁、発行年等も記入)

なし

2. 学会発表

原田勇一、中村一哉、浜本いつき、浅沼秀樹、相内 章、田代真人、奥野良信、山本典生

マウスにおける細胞培養型インフルエンザワクチンの有効性の解析

第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月

相内 章、浅沼秀樹、鈴木忠樹、原田勇一、田村慎一、田代真人、長谷川秀樹
経鼻インフルエンザワクチンにおけるワクチンの組み合わせが抗体応答に与える影響

第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月

原田勇一、中村一哉、浜本いつき、榎本匡志、浅沼秀樹、相内 章、田代真人、山本典生

マウスモデルを用いた細胞培養型インフルエンザワクチンの有効性の解析

第 17 回日本ワクチン学会学術集会、三重、2013 年 11-12 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

細胞培養法による分離ウイルスの遺伝的安定性についての解析

研究分担者 高橋 仁

国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター 主任研究官

研究要旨

ワクチンシード候補株を培養細胞または鶏卵で分離・継代する過程で、ウイルス遺伝子に変異が導入されると、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関するデータの集積を行う。本年度は A 型インフルエンザウイルスの 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 系統株に関して解析を行った。無血清培地に馴化させた MDCK 細胞 (MDCK_Niid) を用いたウイルス分離・継代を行う過程において、各型・亜型ウイルス株の全てで HA 遺伝子に変異導入がみられた。以上の結果から、培養細胞を用いて分離・継代したウイルス株は遺伝的安定性が保持されにくいことが明らかとなり、今後これらの変異と抗原性変化の関連について調べていくことが重要であると考えられた。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

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。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

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。ウイルス株ごとで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。ウイルス株ごとで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。ウイルス株ごとで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。

D. 考察

MDCK_Niid 細胞で 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 系統株を分離・継代する過程で、HA および NA 遺伝子に変異が導入されるかについて検討を行ったところ、HA 遺伝子には各型・亜型株で変異出現が観察され、遺伝的安定性が保持されにくいことが示された。導入された変異の多くは抗原性やレセプター結合、糖鎖付加に影響を与えるとされる箇所であったことから、これらの変異が実際のウイルス抗原性にどのような影響を与えるかの検討が必要である。比較対照として用いた MDCK_C 細胞においても A(H1N1)pdm09 株と H3N2 株で HA 遺伝子に変異出現が観察されたが、B/Victoria 系統株と B/Yamagata 系統株では変異出現が観察されなかった。また、観察された変異導入箇所は同一検体の分離・継代にも関わらず、使用した細胞に

より異なっている場合が多く、変異導入の原因はウイルス株だけに依存するのではなく培養細胞の種類にも依存することが示唆された。以上の結果から、培養細胞を用いて分離・継代したウイルス株は遺伝的安定性が保持されにくいことが明らかとなった。今後これらの変異が抗原性維持に不利益となるものであるかを調べるために、抗原性変化との関連について検討していくことが重要であると考えられた。

E. 結論

無血清培地に馴化させた MDCK 細胞 (MDCK_Niid) を用いてウイルス株の分離・継代を行う過程において、そのウイルス株の遺伝的安定性は保持されにくいことが示された。今後これらの観察された変異と抗原性変化の関連について調べていくことが重要であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表

H Takahashi, K Ohnishi, K Nishimura, I Takayama, M Nakauchi, S Nagata, Y Tsunetsugu-Yokota, M Tashiro, T Kageyama

Development of monoclonal antibodies specific for H5 HA and their application to rapid detection of influenza A/H5N1 virus.

Options for the Control of Influenza VIII,

Cape Town-South Africa, September 2013

高橋 仁、田中 仁喜、西村 研吾、高山 郁代、
中内 美名、永田 志保、小林 美栄、藤 博幸、
大西 和夫、横田(恒次) 恭子、田代 真人、
影山 努

H5 HA 特異的なモノクローナル抗体の
作製と H5N1 インフルエンザ迅速診断法
構築の検討
第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、
2013 年 11 月

影山 努、高橋 仁、高山 郁代、中内 美名、
田代 真人、大場 邦弘、改田 厚、久保 英幸
Direct RT-LAMP 法によるマイクロ流路チップを用いたインフルエンザおよび呼吸器感染症ウイルス同定について
第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、
2013 年 11 月

小林(石原) 美栄、高橋 仁、西村 研吾、
高山 郁代、大西 和夫、板村 繁之、影山 努、
横田(恒次) 恭子
H5N1 インフルエンザウイルス高感度検出系開発に向けた H5HA 特異的抗体のエピトープ解析
第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、
2013 年 11 月

杉村 哲、高橋 仁、城内 健太、大塩 木乃実、
金山 雅也、田墨 恭子、谷畑 葉子、三浦 裕、
藤原 大介、山本 典生

L. lactis JCM5805 株摂取によるプラズマサイトイド樹状細胞活性化を介したウイルス性呼吸器感染症抑制効果の検証
第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、
2013 年 11 月

中内 美名、高山 郁代、高橋 仁、大場 邦弘、
田代 真人、影山 努
B 型インフルエンザウイルス Victoria 系統・Yamagata 系統の real-time RT-PCR 法を用いた識別検出法の構築
第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、
2013 年 11 月

高山 郁代、中内 美名、高橋 仁、田代 真人、
影山 努
鳥インフルエンザ A(H7N9) ウイルス検出系の構築および喀痰検体の前処理についての検討
第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、
2013 年 11 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|--------|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | 特記事項なし |

細胞培養ワクチン製造用種ウイルスの母体ウイルスベクターの検討

研究分担者 信澤枝里 インフルエンザウイルス研究センター・室長

研究協力者 鈴木康司 インフルエンザウイルス研究センター・研究員

研究要旨

鶏卵培養ワクチン種株となる母体ウイルスは開発されているが、細胞培養ワクチン種株の母体ウイルスの開発はされていない。迅速性が求められる細胞培養ワクチン種株の作製にはリバーシジェネティクス法を用いるのが適しており、その母体ウイルスの検討が必要である。そこで細胞培養ワクチン製造用母体ウイルス候補として A/Udorn/371/72(H3N2) と二種の A/Puerto Rico/8/34(H1N1) について、MDCK 細胞での 10 継代前後における遺伝子変異を同定した。MDCK 細胞で 10 継代後、3 株の候補株全てで内部遺伝子に遺伝子変異が見られた。これらの変異により生じるアミノ酸置換は細胞馴化に関与していると考えられ、母体ウイルスベクター開発に利用できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

現行の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行われている。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る。現在は A/Puerto Rico/8/34(H1N1)(PR8) 株が鶏卵培養ワクチンの母体ウイルスとして使用されている。また、新型インフルエンザワクチン種株の作製には、リバーシジェネティクス (RG) 法を用い、表面抗原であるヘマグルチニン (HA) とノイラミニダーゼ (NA) を目的ウイルス由来にし、ウイルス複製に必要な内部遺伝子 (PB2、PB1、PA、NP、M、NS) を母体ウイルスである PR8 株由来と

したウイルスを作製して使用している。新型インフルエンザ発生時も含め、より迅速にワクチン製造を行うことは公衆衛生上重要である。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、細胞培養への移行の準備が行われている。しかし、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。

B. 研究方法

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。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。

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。

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

Udorn-Ts と 2 株の PR8 を限界希釈法で ATCC-MDCK 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セグ

メント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

Udorn-Ts と 2 株の PR8 の計 3 種について、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)を用いて継代し、それぞれの株の細胞馴化による遺伝子変異を検討した。今回の結果では全ての株において 10 継代の前後に遺伝子変異が認められた。平成 24 年度の報告で Udorn-Ts 株、PR8 株は 1×10^8 pfu/ml 以上の高い増殖性を維持することを示しており、今回の結果で見られた遺伝子変異は増殖性を維持したまま生じた変異であったことが示唆された。遺伝子変異の多くが内部遺伝子に起きており、アミノ酸の置換が生じていた。表面の HA や NA 遺伝子に変異が少ないことからウイルスの複製過程において細胞馴化が進んだと考えられた。RG 法を用いてワクチン製造種株を作製する際は、表面の HA と NA を標的ウイルス、内部遺伝子を母体ウイルスで作製する。そのため内部遺伝子の細胞への馴化はワクチン製造種株として重要となる。

今後、本研究で確認された遺伝子変異を

獲得した母体ウイルスと、流行株や H5N1、H7N9 などパンデミックの可能性のある HA および NA 遺伝子を導入したリアソータンウイルスを作製し、増殖性やタンパク収量を検討していく必要がある。

2. 実用新案登録
該当無し。
3. その他

E. 結論

H3N2 亜型の株である A/Udorn/371/72 の低温馴化株と H1N1 亜型の株である A/Puerto Rico/8/34 を用いて、細胞培養系における遺伝的安定性を検討した。ATCC-MDCK 細胞においては、いずれの株も継代により内部遺伝子に変異が見られた。これらの遺伝子変異は細胞馴化に必要な可能性があり、今後、細胞培養用の母体ウイルスベクターの開発に利用できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当無し

2. 学会発表

(1) 中村一哉、白倉雅之、武藤亜紀子、内藤忠相、藤崎誠一郎、田代真人、信澤枝里：鳥インフルエンザ A (H7N9) ウイルスのワクチン製造候補株の開発。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月

(2) 鈴木康司、谷川太一朗、内田裕子、竹前喜洋、西藤岳彦：鳥インフルエンザウイルス PB1 蛋白のポリメラーゼ活性に関わるアミノ酸同定と鶏への病原性の影響。第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 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。

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 H3N2 型インフルエンザに罹患した患者例から採取された鼻腔拭い液を MDCK 細胞でウイルス分離を行い各分離株の継代を行った結果、継代による抗原性の変化は認められなかった。また、増殖性についても継代による増強もほとんど認められなかった。このうち 2 株を選び、ウイルスの不活化抗原を作製、マウスに接種し、免疫誘導能を検討した。その結果、株の違いや・継代による応答性にも違いが認められなかった。このことは、細胞培養法で分離増殖させた H3N2 ウイルス株は継代による抗原性や免疫原性には影響しないことが示唆された。

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。一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。昨年度は、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。その結果、継代によって蛋白量の低下が認められたものの、ワクチン効果、すなわち免疫原性は、鶏卵培養と同等の効果を示した。

そこで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 μ g)を皮下接種(100 μ L)し 4 週後、

全採血を行い、血清を回収した。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。

C. 研究結果

1. ウイルスの分離効率および増殖能の検討

簡易診断キットで A 型インフルエンザ陽性が認められ、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 (表 1)。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 (表 2)。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 (図)。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。

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。一昨年度、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。そこで昨年度、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。今年度は H3N2 株について、発育鶏卵および培養細胞で分離・継代を試み、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、H1N1pdm および B 型と同様、H3N2 株も細胞培養系で製造したワクチンの免疫原性には高い効果が認められた。これまでの研究で分離に用いた 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った。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。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 H3N2 株では発育鶏卵を用いた場合にはウイルスは分離できず、細胞で分離・増殖させた場合の方が、顕著に高い効率が示された。また、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ず、免疫原性にも影響は認められなかった。

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。本研究で細胞培

養系で分離・継代・製造したワクチン株にも高い免疫誘導効果があり、抗原性の顕著な変化もなかったことは、今後、細胞培養系でワクチンを製造するための基盤を構築できたといえる。

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、B 型ならびに H3N2 株では培養細胞を用いた分離効率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ている。このことからワクチン検定の在り方などが今後の検討課題と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

原田 勇一、中村 一哉、浜本 いつき、榎本 匡志、浅沼 秀樹、相内 章、田代 真人、山本 典生 マウスモデルを用いた細胞培養型インフルエンザワクチンの有効性の解析

第 17 回日本ワクチン学会学術集会、津、2013

原田 勇一、中村 一哉、浜本 いつき、浅沼 秀樹、相内 章、田代 真人、奥野良信、山本 典生

マウスにおける細胞培養型インフルエンザワクチンの有効性の解析

第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、

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 2010～2011年シーズンのヒト臨床検体から分離されたH3N2株の継代によるHA価の推移

ID	CK1	CK2	CK3	CK4	CK5	CK6	CK7	CK8
1	3	2	1	4	4	4	4	3
2	2	3	3	3	3	2	3	2
3	2	3	3	4	5	4	4	4
4	3	2	2	3	4	2	3	2
5	5	3	2	2	4	3	5	3
6	4	2	1	1	4	3	5	4
7	1	N.D.*						
8	4	3	3	3	4	4	5	3
9	5	4	N.D.					
10	4	3	2	3	4	4	5	3
11	6	5	4	5	6	5	5	3
12	5	2	3	4	5	5	6	5
13	5	N.D.						
14	4	2	2	4	6	5	5	4
15	5	2	2	1	4	3	4	3
16	4	3	1	3	5	4	5	3

N.D.*: not detected

表2 分離継代株のHA価、タンパク量およびHA含有量とその増加率

ID	HA価 (2 ⁿ)		蛋白量 (μg/mL)			HA含有量 (全蛋白中の%)			HA含有量 (μg/mL)		
	CK3	CK9	CK3	CK9	増加率	CK3	CK9	増加率	CK3	CK9	増加率
4	2	2	213	217	101.9	28.1	30.7	109.3	59.9	66.6	111.3
11	5	3	249	279	112	19.6	29	148	48.8	80.9	165.8

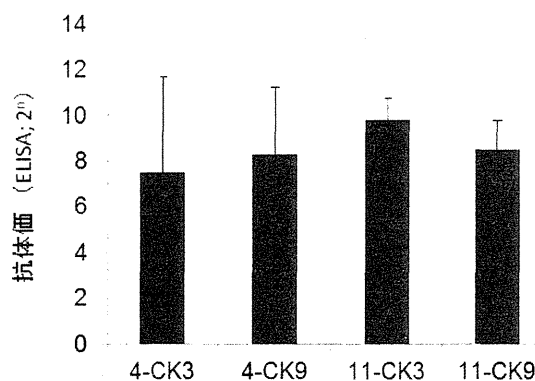


図 分離継代株の接種後の抗体応答
マウスに細胞培養で分離・継代した株を不活化した抗原を皮下接種し4週後、血清を回収し同じ抗原型のH3N2株に対する抗体価をELISAで測定した。エラーバーは標準偏差を示した。

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

細胞培養ワクチンには、(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GMP準拠条件で構築したMDCKセルバンクについて、各種の試験を行った。今年度実施した迷入因子否定試験とOncogenicity試験においても特に問題となる点を認めなかった。昨年度までに実施した試験の結果と合わせて問題点がなかったことから、この細胞は、臨床検体からのシードウイルスの分離、リバースジェネティクスによるシードウイルス作製、及び海外で製造されたワクチン株の増殖などに実際に使用可能であると考えられた。迷入ウイルス検出系については、プライマー・プローブ配列とウイルス配列のミスマッチによる感度低下を避けるため、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

細胞培養ワクチンには、鶏卵培養ワクチンに比べて、(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。

特に第二の利点を最大限に生かすためには、シードウイルスを鶏卵培養を行わずに

作製する必要がある。そのためには、細胞培養法のみ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、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。

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。

(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]

- 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 (BPV) in Biological Samples

MCBからDNAを抽出し、BPV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BPV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。

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。

D. 考察

現在、ワクチンシードウイルスは鶏卵培養法によって製造されているが、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Oncogenicity試験(結果の解析)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。

今年度は、迷入因子の存在を否定するための試験として透過型電子顕微鏡による迷入因子(ウイルス、ウイルス様粒子、細菌、真菌等)の検出試験、ウシポリオーマウイルス検出試験、豚水疱病ウイルス検出試験、イヌパピローマウイルスおよびネコパピローマウイルス検出試験、E型肝炎ウイルス検出試験を行った。結果は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、Oncogenicity試験を行い、その結果を詳細に解析したところ、感染研が保有しているMDCK細胞は、細胞溶解物にも細胞DNAにもマウス細胞を腫瘍化させる活性はないこと(Oncogenicity 陰性)が明らかとなった。

感染研で構築したMDCKセルバンクは、迷入因子否定試験、特性試験、Oncogenicity試験等のこれまでに実施した全試験(今年度実施分以外も含めて)において問題がないという結果が得られた。したがって、この細胞は、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、及び海外で製造されたワクチン株の増殖などに使用可能な細胞であると判断した。このMDCKセルバンクは、安全性が確認されたGMPグレードのセルバンクであり、これによって鶏卵培養によらない細胞培養ワクチンシードウイルスの製造が可能となる。迷入ウイルス検出系の整備も合わせて進めることで、安全性・有効性の高い細胞培養ワクチンシードウイルスを製造・供給するための基盤が構築できると期待される。

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。したがってこの細胞は、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、及び海外で製造されたワクチン株の増殖などに使用可能であると判断した。

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hamamoto I, Harazaki K, Inase N, Takaku H, Tashiro M, Yamamoto N.

Cyclosporin A inhibits the propagation of influenza virus by interfering with a late event in the virus life cycle.

Jpn J Infect Dis. 66(4):276-83, 2013

Tsukagoshi H, Yokoi H, Kobayashi M, Kushibuchi I, Okamoto-Nakagawa R, Yoshida A, Morita Y, Noda M, Yamamoto N, Sugai K, Oishi K, Kozawa K, Kuroda M, Shirabe K, Kimura H.

Genetic analysis of attachment

glycoprotein (G) gene in new genotype ON1 of human respiratory syncytial virus detected in Japan.

Microbiol Immunol. 57(9):655-9, 2013

Kushibuchi I, Kobayashi M, Kusaka T, Tsukagoshi H, Ryo A, Yoshida A, Ishii H, Saraya T, Kurai D, Yamamoto N, Kanou K, Saitoh M, Noda M, Kuroda M, Morita Y, Kozawa K, Oishi K, Tashiro M, Kimura H. Molecular evolution of attachment glycoprotein (G) gene in human respiratory syncytial virus detected in Japan 2008-2011.

Infect Genet Evol. 18:168-73, 2013

山本典生、田代真人

新型インフルエンザ

予防接種 Q&A, 小児内科Vol.45増刊号, 549-551, 2013

2. 学会発表

原田勇一、中村一哉、浜本いつき、浅沼秀樹、相内 章、田代真人、奥野良信、山本典生

マウスにおける細胞培養型インフルエンザワクチンの有効性の解析

第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013年11月

原田勇一、中村一哉、浜本いつき、榎本匡志、浅沼秀樹、相内 章、田代真人、山本典生

マウスモデルを用いた細胞培養型インフルエンザワクチンの有効性の解析

第17回日本ワクチン学会学術集会、三重、2013年11-12月