

2013/8054B

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 23～25 年度 総合研究報告書

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 23～25 年度 総合研究報告書

研究代表者 田代真人

平成 26 年(2014)3 月

目 次

平成 23～25 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. 国内外の流行株の収集と性状解析 P.49

研究分担者 小田切孝人

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

2. 血清学的調査による季節性インフルエンザワクチン効果の評価 P.59

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.63

研究分担者 藤崎誠一郎

研究協力者 高下恵美、今井正樹

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.69

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.75

研究分担者 高橋 仁

6. 細胞培養ワクチン製造用母体ウイルスの開発 P.81

研究分担者 信澤枝里

研究協力者 原田勇一、川口晶、鈴木康司

7. 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.85

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.97
	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.113
	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.121
	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.129
IV	添付資料	
➤	細胞培養インフルエンザワクチンの安全性に関する Points to Consider (案) 2011	P1- P54
➤	細胞培養法による新型インフルエンザワクチン製造におけるバイオセーフティ対策	P1- P33
➤	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	P1- P21
➤	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 (弱毒株) に対する Haemagglutination Inhibition 及び中和抗体価測定試験	P1- P11
➤	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	P1- P19
➤	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	P1- P21

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、2011/12シーズンのワクチン株には A/California/7/2009 (H1N1)pdm09 (X-179A)、A/Victoria/210/2009 (H3N2)(X-187)および B/Brisbane/60/2008 (Victoria 系統)、2012/13シーズンのワクチン株には A/California/7/2009 (H1N1)pdm09 (X-179A)、A/Victoria/361/2011 (H3N2) (IVR-165)および B/Wisconsin/01/2010 (BX-41A) (Yamagata 系統)、2013/14シーズンのワクチン株には A/California/7/2009 (H1N1)pdm09 (X-179A)、A/Texas/50/2012 (H3N2)(X-223)および B/Massachusetts/02/2012 (BX-51B) (Yamagata 系統)を選定するよう提言した。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。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。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、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

(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

インフルエンザウイルスは頻繁に遺伝子変異し、それにもなつて抗原性が変化するため、ワクチン株は毎年見直す必要がある。本研究では、国内外の分離株の抗原性解析および遺伝子の進化系統樹解析の情報にもとづいて、適切な季節性インフルエンザワクチン株の選定を行うことを目的とする。

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交叉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

遺伝子情報を利用した解析と共に抗原性試験、薬剤感受性試験を実施することで、特定のアミノ酸置換が抗原性や薬剤耐性に与える影響を解析し流行株の予測に活用する。

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する。

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) 細胞培養ワクチン製造施設におけるバイオセーフティー対策についての検討と提言
「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次交付事業に連動し、安全性の高いワクチン製造施設建設に資することを目的として、細胞培養ワクチン製造施設におけるバイオセーフティー対策についての検討と提言を行った。

8) 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。

9)細胞培養法によるウイルス分離効率の解析

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、GMP 準拠での使用を目的に品質検証が行われた細胞株のうち、浮遊培養系 MDCK 細胞 (MDCK_N)、浮遊培養系 Per.C6 細胞 (Per.C6) および MDCK 細胞 (MDCK-NIID) の3種の細胞について、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) それぞれの患者臨床検体からのウイルス分離効率、分離ウイルスの増殖性を検討し、各種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。

10)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。

11)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

シードウイルスを分離するための培養細胞は高ウイルス分離効率、高ウイルス増殖性を兼ね備えていなければならないが、その培養細胞から分離されるウイルスについても長期に渡る継代に対して、遺伝的・抗原的に安定であることが要求される。そこで本研究では、MDCK_N 細胞で分離・継代した B 型及び A(H1N1)pdm09 型ウイルスを用いてその抗原的安定性を解析し、MDCK_N 細胞のワクチンシードウイルス分離用培養細胞としての更なる適性の評価を行った。また、MDCK_N 細胞から過去に分離した B/Victoria 系統ウイルスの中でその 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について、フェレット感染抗血清を作製して別途抗原解析を行った。

12)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

本研究では、細胞培養ワクチンと鶏卵培養ワクチンについて比較することを目的として、2009-2011 シーズンにインフルエンザに罹患した患者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、ワクチン効果の比較検討を行った。

13)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、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。

これらの利点のうち、特に第二の利点を最大限に生かすためには、シードウイルスの作製を、鶏卵培養段階を含まずに行う必要がある。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。

14) 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大流行に対応するためには、ワクチンを迅速に大量生産することが要求される。そのため、時期によらず短期間に大量（半年間で全国民分）の製造が可能な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、I 型インターフェロン (IFN) 関連遺伝子群を標的とする siRNA ライブラリーと化合物ライブラリーのスクリーニングを行い、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して研究を行った。

15) 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

現在、季節性インフルエンザウイルスワクチンは鶏卵培養によって製造されているが、国のパンデミック対策の一環として細胞培養インフルエンザワクチンの開発・製造体制の確立が進められている。ワクチン製造においてはワクチン種株に高増殖性・高タンパク収量であることが求められている。現行の季節性、パンデミックワクチンの母体ウイルスには A/Puerto Rico/8/34(H1N1)(PR8) 株が確立されているが、細胞培養用母体ウイルスの確立はされていない。そこで、本課題では細胞培養用母体ウイルスの開発のため、鶏卵培養高増殖ウイルスの細胞での増殖性や細胞馴化、母体ウイルス候補株の細胞での増殖性や細胞馴化を行い、細胞培養用母体ウイルスベクター開発の検討を行った。

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
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
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
小松俊彦 : バイオメディカルサイエンス
研究会
木ノ本雅通 : 同上
高橋昌樹 : 同上
山口照英 : 国立医薬品食品衛生研究所生
物薬品部
佐藤征也 : 新潟バイオリサーチパーク株
式会社
北里英郎 : 北里大学医療衛生学部
矢野一好 : 北里環境科学センター微生物
部
村上 聖 : 株式会社日立プラントテクノ
ロジー
高橋 稔 : 同上
東尾邦彦 : 同上
渋谷啓介 : 株式会社日立製作所

[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
能美健彦 : 国立医薬品食品衛生研究所変
異遺伝部

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

2010/11、2011/12、2012/13シーズンにわ
たって、A(H1N1)pdm09、A(H3N2)、Bに
ついて、約2000株を国内および海外(中国、
台湾、韓国、ラオス、モンゴル、ミャンマ
ー、ネパール、ベトナム) から収集し、フ
ェレット感染血清をもちいた赤血球凝集抑
制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

2010/11、2011/12、2012/13、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: 24人、60歳以上の老人層:
24人)を用いて、ワクチン株と最近の代表
的な流行株との反応性を赤血球凝集抑制
(Hemagglutination inhibition: HI) 試験
により調べた。試験に用いたウイルスには、
ワクチン株およびMDCK細胞または孵化鶏
卵分離株を用いた。2010/11、2011/12、
2012/13シーズンのA(H3N2)および
2010/11、2011/12シーズンのBビクトリア
系統のワクチンについてはさらに中和試験
により反応性を調べた。HI抗体価および中
和抗体価からそれぞれ幾何平均値(GMT)
を求めて比較した。

* 2010/11シーズンワクチン:

A/California/7/2009 (H1N1)pdm09
(X-179A)、

A/Victoria/210/2009 (H3N2)(X-187)、
B/Brisbane/60/2008 (ビクトリア系統)

* 2011/12シーズンワクチン:

A/California/7/2009 (H1N1)pdm09
(X-179A)、

A/Victoria/210/2009 (H3N2)(X-187)、

B/Brisbane/60/2008 (ビクトリア系統)

*2012/13シーズンワクチン：

A/California/7/2009 (H1N1)pdm09
(X-179A)、

A/Victoria/361/2011 (H3N2) (IVR-165)、
B/Wisconsin/01/2010 (BX-41A) (山形系統)

* 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

①全国の地方衛生研究所にて分離された
インフルエンザウイルス株を無作為に選択
し、HA および NA 遺伝子配列を決定した。
決定した塩基配列と海外から報告された分
離株の塩基配列を用いて遺伝子系統樹解析
および、アミノ酸置換の解析を実施した。

NA 遺伝子解析では、薬剤耐性に関与し
得るアミノ酸置換の有無を解析した。NA
阻害薬感受性試験結果とアミノ酸置換の解
析から、薬剤耐性能を与えるアミノ酸置換
の推定を行った。薬剤耐性が疑われる新規
のアミノ酸置換を有する株については詳細
な解析を行った。具体的には、
plaque-purified virus および、reverse
genetics 法を用いた遺伝子組み換えウイル
スを作製し、薬剤感受性試験を実施して薬
剤耐性アミノ酸置換を同定した。また、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への影響を解析
した。

②データベース上に公開された
A(H7N9)ウイルス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、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 (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）、能美建彦（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。

7)細胞培養ワクチン製造施設におけるバイオセーフティー対策についての検討と提言
特定非営利活動法人バイオメディカルサイエンス研究会に設置された「新型インフルエンザワクチン短期製造装置等の確立に関する調査研究班」において、細胞培養ワクチン製造施設におけるバイオセーフティー対策についての検討を行い、それを提言としてまとめた。

8)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。

9)細胞培養法によるウイルス分離効率の解析

Novartis 社（ドイツ）で樹立された浮遊培養系 MDCK 細胞 MDCK33016PF 株 (MDCK_N)、感染研において構築した GMP グレードの無血清培地馴化付着系 MDCK 細胞である MDCK-NIID、および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。また比較の対照として当研究所

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。

10)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

使用するワクチンシード分離用候補培養細胞としては、ノバルティス社から分与された浮遊型 MDCK 細胞(MDCK_N)や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。

11)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。07/08、08/09

シーズン中に採取された臨床検体を用いて両細胞から分離・継代した B 型インフルエンザウイルス及び 10/11 シーズン中に採取された臨床検体を用いて両細胞から分離・継代した A(H1N1)pdm09 ウイルスについて、HI 試験による抗原性解析を行った。B/Victoria 系統ウイルス株については、過去の解析において MKCK_N 細胞から分離したウイルスのうち、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の抗原解析も行った。抗血清は、フェレットのウイルス感染血清を使用した。フェレットの感染には臨床検体採取当時の市中流行株を代表する基準ウイルスのうち、MDCK_C 細胞分離株を使用した。B/Victoria 系統ウイルスの HA 遺伝子変異株の解析には、遺伝子変異ウイルスに対するフェレット感染血清を作製し、試験に供した。また、赤血球は 0.75%モルモット赤血球を使用した。

12)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、抗体価の測定とチャレンジ試験によって検討した。

13)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。

MCB、WCB、EOPC についてその安全性と特性を確認するために、GMP 基準に適合する条件で以下の試験を行った。

[MCB]

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

- 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

[WCB]

- Sterility Testing by Direct Inoculation Method
- Test for the presence of Agar-cultivable and Non Agar-cultivable Mycoplasma
- Test for Mycobacterium spp Culture

Medium Method

- In vitro Assay for the Presence of Adventitious Viral Contaminants
- Identification & Characterisation of Cultured Cells by Analysis of 4 Isoenzymes
- DNA fingerprinting of cell lines
- Karyology of non-human mammalian cell lines (50 metaphases)

[EOPC]

- Sterility Testing by Direct Inoculation Method
- In vitro Assay for the Presence of Adventitious Viral Contaminants
- Transmission Electron Microscopic Examination of Cell Cultures (200 Cell profiles)
- Detection and Quantification of Reverse Transcriptase activity by QFPERT Assay
- In vitro Assay, Detection of porcine Viral Contaminants using PPK indicator Cells According to 9CFR
- Real Time PCR Detection of Bovine/Porcine Circovirus (PCV)
- Real time Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of Human

viruses (FDA PTC and CPMP), Hepatitis A and B19 in biological samples

- 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

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

また、ウイルスの配列は多様性を持つが、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に検出感度が大幅に低下してしまうことがあることを考慮し、ウイルスごとに保存性の高い領域を抽出し、上記のキットとは別にプライマー・プローブのデザインを行った。

14) 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

ヒト I 型 IFN 関連遺伝子群（主に RIG-I/IPS-1 経路、TLR7 経路及び TLR3 経路）を標的とする siRNA ライブラリーを作成し、ノックダウンによってウイルス産生量が増加する I 型 IFN 関連遺伝子群のスクリーニングと同定を行った。

続いて、同定されたヒト遺伝子に相当するイヌ遺伝子のクローニングと塩基配列の決定、siRNA の設計合成、shRNA 安定発現 MDCK 細胞株の樹立とウイルス産生量の評価を行った。

また、小規模な化合物ライブラリーをスクリーニングし、ウイルス増殖効率を変化させる化合物の同定と、その標的分子のウイルス増殖機構における機能の解析を行った。

15) 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]鶏卵培養高増殖ウイルスの増殖性と細胞馴化

リバースジェネティクス (RG) 法を用いてリアソータントウイルス (RG ウイルス) を作製した。作製したワクチン種株は HA、NA 遺伝子を H1N1pdm09 ワクチンの推奨株である A/California/7/2009 (Cal7) 株に、内部遺伝子を A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)(PR8) にした。RG ウイルスを MDCK 細胞で 10 継代した。継代による細胞での増殖性の変化は HA 力価を測定して判定した。また、全セグメントの遺伝子配列をダイレクトシーケンス法により解析した。

[2]細胞培養用母体ウイルス候補株の増殖性と細胞馴化

候補株として、H3N2 亜型は A/Udorn/371/72 (H3N2) の低温馴化株 (Udorn-Ts) を、H1N1 亜型は由来の異なる実験室維持ウイルスの PR8 (PR8-N、PR8-41) の 2 株を使用した。これらの候補株をワクチン製造用に品質管理が行われている MDCK-NIID(ATCC Cat.No. CCL-34)株を用いて継代を行った。ウイルスの増殖能はプラーク形性能から判定した。また、全セグメントの遺伝子配列はダイレクトシーケンス法により解析した。

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

2010/11 シーズンの国内外分離株サーベイランス:A(H1N1)pdm09 パンデミック発生から 2 シーズン目であり、流行パターンは国内外ともに通常の季節性インフルエンザシーズン並みに戻った。国内外ともに

A(H1N1)pdm09 亜型の流行が主流であったが、A(H3N2)、B 型が混合流行していた。A(H1N1)pdm09 分離株は抗原的、遺伝的に 2010/11 シーズンワクチン株である A/California/7/2009 類似株であった。A(H3N2)分離株についても、ワクチン株である A/Victoria/210/2009 類似株であった。B 型では Victoria 系統株が 9 割以上を占めた。Victoria 系統分離株はワクチン株の B/Brisbane/60/2008 と類似した株が大勢を占めた。

2011/12 シーズンの国内外分離株サーベイランス:A(H1N1)pdm09 亜型による流行は、

メキシコ、グアテマラおよびアルゼンチンなど中南米諸国でみられたのみで、多くの国では流行が極めて小さいという状況であった。分離株は 2011/12 シーズンのワクチン株 A/California/7/2009 類似株で、遺伝的にも抗原的にも 2010/11 シーズンからほとんど変化していなかった。A(H3N2)亜型が 2011/12 シーズンの流行の主流であった。海外諸国でもわが国と同様に、A(H3N2) 亜型が流行の主流となった国が多かった。HA 遺伝子の進化系統樹においては、A/Perth/16/2009 株やワクチン株 A/Victoria/210/2009 で代表される A/Perth/16 クレードと、A/Victoria/208/2009 株で代表される A/Victoria/208 クレードとに大別された。2011/12 シーズンの分離株の大半は後者のクレードに入ったが、これらのクレード間で抗原性に大きな差は認められなかった。B 型については、Victoria 系統と Yamagata 系統の混合流行で、その比率は、2:1 であった。周辺諸国での状況は、中国北部、韓国は Victoria 系統が主流、香港や台湾、中国南部は Yamagata 系統が主流と、国・地域ごとに流行パターンが異なっていた。世界

全体では両系統ウイルスの分離比は2:1でVictoria系統がやや優位ではあったが、Yamagata系統も増える傾向が多くの中でみられた。各系統とも抗原性の変化した株は認められなかった。

2012/13シーズンの国内外分離株サーベイランス：欧州や中国ではA(H1N1)pdm09亜型による流行が大きかった。流行が小さかった地域も含めて世界中で分離されたA(H1N1)pdm09ウイルスのほとんどは、2012/13シーズンのワクチン株A/California/7/2009類似株であった。A(H3N2)亜型は北米、カナダ、豪州で流行が大きく、わが国でも流行の主流であった。国内外の分離株の大半は、ワクチン株A/Victoria/361/2011と抗原性が類似していた。国内におけるB型インフルエンザの流行は、シーズンを通してYamagata系統とVictoria系統との混合流行で、その比率はおよそ7:3であった。諸外国での流行状況も同様で、Yamagata系統の流行が多くの中で優位であった。Yamagata系統の流行株は、ワクチン株B/Wisconsin/01/2010が属するグループ3と、2012/13シーズンの流行株を代表するB/Massachusetts/2/2012が属するグループ2に区別された。国内外の流行株の大半はグループ2に分類された。ただし、これらのグループ間での抗原性には大きな差はなかった。

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：2010/11、2011/12、2012/13シーズン分のX-179Aワクチン接種者血清は、HI試験において、A(H1N1)pdm09流行株と比較的よく反応していたが、2013/14シーズンのX-179Aワ

クチン接種者血清は、流行株との反応性が低かった。

A(H3N2)ワクチン：HI試験による解析においては、4シーズンにわたって、流行株との反応性が低かった。そこで2010/11、2011/12、2012/13シーズンについて、中和試験により反応性を調べたところ、2010/11シーズンのX-187ワクチンについては、試験にもちいた2010/11シーズンのA(H3N2)流行株の半数以上は、ワクチン株のGMTを100%とすると約70%以上の高いGMTを示した。しかし、2011/12シーズンのX-187ワクチンでは、試験にもちいたいずれの流行株のGMTも低かった。2012/13シーズンのIVR-165ワクチンについても中和試験において2012/13シーズン流行株のGMTは低かった。

Bビクトリア系統ワクチン：2010/11、2011/12シーズンのBrisbane/60ワクチン接種者血清は、HI試験解析から2010/11と2011/12シーズンのビクトリア系統流行株との反応性が低いうえに、ホモであるワクチン株に対しても反応性が低いことがわかった。しかし、中和試験解析においては、ワクチン株に対して2010/11シーズンH3N2ワクチン株(X-187)で示したGMTと同程度のGMTを示すことがわかった。しかし、孵化鶏卵で分離した流行株はワクチン株と同程度の高いGMTを示したが、細胞で分離した流行株はワクチン株の約50%程度のGMTしか示さなかった。

B山形系統ワクチン：HI試験解析において、2012/13シーズンのB山形系統ワクチン(BX-41A)接種者血清はワクチン株に対して反応性が低かったが、2012/13シーズンのそれぞれの野外株とは比較的交差反応性を示した。2013/14シーズンのワクチン

(BX-51B) 接種者血清はワクチン株、流行株ともに反応性が低かった。

3)新規機能的遺伝子解析法の構築と流行株遺伝子解析

①全国の地方衛生研究所にて分離されたインフルエンザウイルス 873 株について HA および NA 遺伝子の塩基配列を決定し、遺伝子解析を行った。

このうち、NA アミノ酸配列に既知の薬剤耐性アミノ酸置換が検出されないにも関わらず、NA 阻害薬感受性試験で薬剤耐性を示す 4 株 (B/KOCHI/41/2011、B/KOCHI/59/2011、B/KOCHI/60/2011、A/KOCHI/61/2011) が検出された。これらの株は抗インフルエンザウイルス薬が未投与の症例から分離されたが、分離株は現在国内で使用されている 4 つの薬剤 (オセルタミビル、ペラミビル、ラニナミビル、ザナミビル) 全てに対し感受性の低下を示し、特にペラミビルに対し強い耐性を示した。

他の流行株と NA タンパク質のアミノ酸配列を比較したところ、これら 4 株はそれぞれ 1 つずつ特徴的なアミノ酸置換を有することが明らかになった。具体的には、B/KOCHI/41/2011 株は P139S (139 番アミノ酸が P (プロリン) から S (セリン) に変化)、B/KOCHI/59/2011 株は G140R、B/KOCHI/60/2011 株は Q138R、B/KOCHI/61/2011 株は E105K を持っていた。そこで、これらのアミノ酸置換が薬剤耐性に関与していることを確認するため、plaque-purification 法および reverse genetics 法により P139S、G140R、Q138R、E105K を 1 つずつ有する純化ウイルスを作製し NA 阻害薬感受性試験を実施した。その結果、これら 4 つのアミノ酸置換がウイルスに薬剤耐性能を与えることが明らか

となった。またコンピューターを用いた解析により、105, 138, 139, 140 番アミノ酸は NA タンパク質の薬剤結合部位ではなく、NA タンパク質が四量体構造を形成した際に NA タンパク質分子同士が隣接する部位に位置することが明らかになった。また、これらの変異を持つウイルスが臨床検体中にも存在しているかを確認するため、pyrosequence 法を用いて臨床検体中のウイルスについて遺伝子解析を実施したが、アミノ酸置換に該当する遺伝子はいずれも検出限度以下であった。

②A(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、各亜型の遺伝子配列との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。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、アマン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に対し感受性を保持していることが示唆された。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。

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「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きたが、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。また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。本研究による開発方向への助言と技術支援により、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。

以下には、ワクチンメーカーに共通する問題として提起され議論されたポイントについて、要点を示す。

[1] 細胞培養ワクチンの安全性に関する考慮点について

最新情報を元にしてさらに議論を深め、細胞培養法に関する考慮点を「細胞培養インフルエンザワクチンの安全性に関する Points to Consider (案) 2011」としてまとめた。本報告書にこれを添付する。

[2] 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について

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について検討した。その結果、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 が良いということになった。しかしこの議論の結果に従って準備を進めている中で、中国において A(H7N9)ウイルスの人への感染が報告されたため、亜型としては H7N9 も考慮するという結論となった。

現時点では H7N9 ワクチンの結果は得られていないが、H7N9 ワクチンについてはヒト HLA 分子に対する helper T 細胞エピトープのシグナルが欠如しており、動物実験では免疫原性が認められても、ヒトにおける免疫原性が極めて低いことが示された。従って H5N1 のワクチンに基づく H7N9 ワクチンの剤型、容量についてはプロトタイプの考え方では対処できない可能性がある。

[3] 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について

承認申請に必要となる、強毒型 H5N1 野生株を用いた攻撃試験の実施についてディスカッションを行った。その結果、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 試験を行うこととなった。免疫原性試験と攻撃試験の結果、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。本報告書にその結果を添付する。

[4] 細胞培養ワクチン用シードウイルスについて

シードウイルスを分離するための増殖基材についての議論と、迷入ウイルスの混入を否定するための試験について議論がなされた。鶏卵馴化による抗原変異を避け、有効性の高いワクチンを製造するためには、細胞培養法によりシードウイルスを製造する必要がある。ヒトでの増殖に適応したウイルスほど、細胞培養法により製造されたシードウイルスの必要性は高まると考えられ、季節性インフルエンザウイルスと新型インフルエンザウイルスについて細胞由来シードウイルスの製造を検討する必要がある。

[5] SRD 試験法および SRD 代替法について

鶏卵培養系を基にした SRD 試薬で細胞培養ワクチンの力価を測定するには困難を伴う点が議論された。ワクチンメーカーごとに細胞培養系や剤形も異なることから、それぞれの培養系でメーカーが作製した標準品とそれに対する参照抗血清を用いて、メーカーと感染研の両方で力価を測定することについても意見の交換がなされた。SRD 代替法については、SDS-PAGE を中心に検討が進められている。

[6] 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

細胞培養ワクチンの製造施設、製造体制（試薬の備蓄を含む）および製造技術の維持のために、毎年 1 回程度はワクチン製造を実施する必要があり、そのためには、現

在の発育鶏卵によるプレパンデミックワクチンの製造・備蓄を、細胞培養ワクチンによるものに変更して行くことが必要との議論がなされた。一方で、鶏卵培養法と細胞培養法の共存についても意見が出された。

[7] 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

季節性インフルエンザワクチンの細胞培養法への切り替えに関して議論がなされた。鶏卵培養法では、特に A(H3N2)や B 型において鶏卵馴化に伴う抗原変異によってワクチンの有効性が低下するという問題点が指摘されている。この問題を解決するための手段として、細胞培養ワクチンの導入がある。細胞培養法によりシードウイルスを作製し、それを基に細胞培養ワクチンを製造することで、有効性の高いワクチンを供給することが可能となる。また、[6]でも出た論点であるが、細胞培養ワクチンの製造施設、製造体制（試薬の備蓄を含む）および製造技術の維持のためには、ある程度のペースでワクチン製造を実施する必要があり、その点からも季節性インフルエンザワクチンの細胞培養法での製造を推進すべきとの意見が出された。

7)細胞培養ワクチン製造施設におけるバイオセーフティー対策についての検討と提言

「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 次交付事業によるワクチン実生産設備の建設計画に連動し、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、細胞培養ワクチン製造施設におけるバイオセーフティー対策についての検討を行い、それを「細胞培養法による新型インフルエンザワクチン製造

におけるバイオセーフティー対策」としてまとめた。本報告書にこれを添付する。

8)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。

9)細胞培養法によるウイルス分離効率の解析

MDCK_N および比較対象としての MDCK_C を用いて臨床検体からのウイルス分離を行った。両細胞種共に、患者臨床検体の接種により全検体からウイルスが分離され、高い分離効率を確認した。MDCK_N 細胞においては、10 検体中 9 検体で臨床検体から直接の分離が可能であったが、MDCK_C を用いた場合にはウイルス分離に盲継代を必要とした例が 6 検体存在した。一方、分離ウイルスを継代した場合、MDCK_C での継代を経た方が MDCK_N で継代した場合よりも高い HA 価を示す傾向があった。