

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母体ウイルスの開発

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 原田勇一 インフルエンザウイルス研究センター・主任研究官
研究協力者 川口晶 インフルエンザウイルス研究センター・研究員
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

現行のインフルエンザワクチンの製造には鶏卵培養ワクチンが用いられているが、パンデミック発生時など、迅速なワクチン製造のために細胞培養ワクチンへの移行が検討されている。鶏卵培養用の母体ウイルスはすでに確立されているが、細胞培養用の母体ウイルスの開発されておらず、細胞培養ワクチンの製造にあたっては高増殖・高タンパク収量を示すワクチン種株を産生する必要がある。本研究では細胞培養用ワクチン母体ウイルスの開発を行うため、リバースジェネティクス（RG）法を用いて作製した鶏卵高増殖性のワクチン種株、A/Udorn/371/72(H3N2) (Udorn-Ts)と A/Puerto Rico/8/34(H1N1) (PR8)について、細胞での増殖性と継代による細胞馴化を行った。RG法で作製したウイルスはMDCK細胞で継代することで増殖性が高くなり、継代の過程でウイルス遺伝子に変異が生じた。Udorn-TsとPR8株はMDCK細胞で継代しても高増殖性は維持されており、さらにウイルス遺伝子に変異が生じていた。これらの変異は細胞馴化による変異と考えられ、細胞培養用母体ウイルスベクター開発の検討に利用できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

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。

B. 研究方法

(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 (図 1)。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。

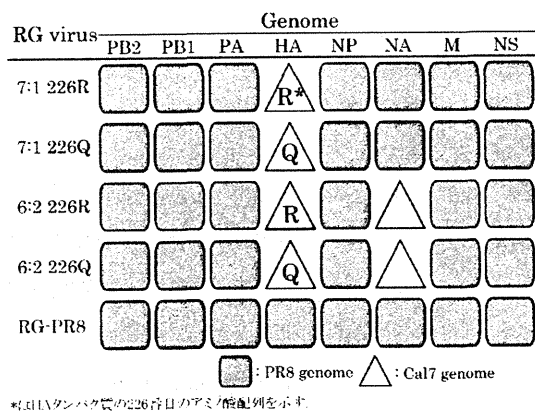


図1. RGウイルスのゲノム構成

(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 ATCC-MDCK (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

(1) RG ウイルスを MDCK 細胞で継代することで、細胞での増殖性が増加した (図 2)。また継代によりウイルスの HA、NA、PB1、NS1 遺伝子変異が生じた。HA 遺伝子に観察

された変異は、MDCK 細胞で継代することによって特異的に発生することが知られている変異であり、アミノ酸配列上宿主受容体との親和性に関与しない部分であった。PB1 と NS1 遺伝子上の変異は継代 10 代目においても 2 種類の塩基の混合状態であった。

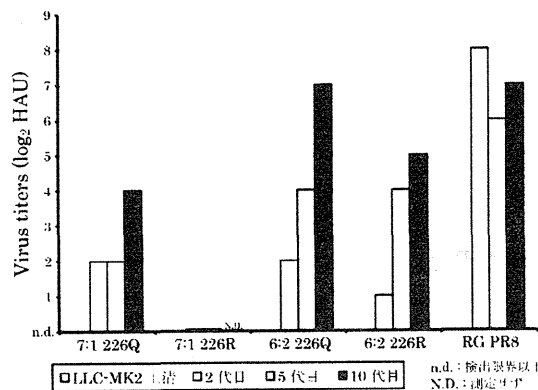
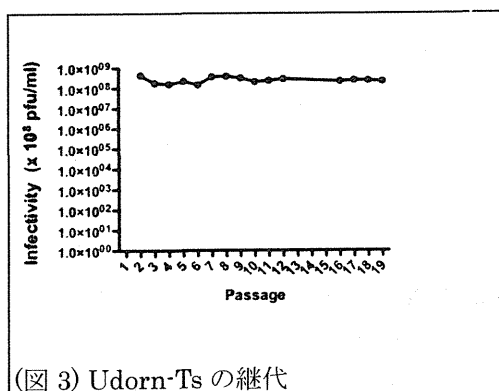


図2. MDCK細胞で継代したRGウイルスのウイルス力価

(2) Udorn-Ts と 2 種の PR8 株における ATCC-MDCK 細胞での増殖性は継代に関わらず高く、継代を繰り返して行ってもその増殖性が安定して高い値を示した。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 3)。2 種の PR8 株については、どちらも 3 代の継代での感染価は 10^9 pfu/ml 以上を示した (表 1)。



(図 3) 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

Udorn-Ts と 2 種の PR8 株は ATCC-MDCK 細胞で 10 代継代したことで遺伝子変異が生じた。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 遺伝子に観察された変異はアミノ酸配列上宿主受容体との親和性に関与しない変異であった。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。

D. 考察

細胞培養用母体ウイルスの候補株としたる Udorn-Ts と 2 種の PR8 株はどちらも細胞で高い増殖性を示した。これらの株は細胞培養用母体ウイルス候補株として利用できる可能性が示唆された。

鶏卵培養ワクチン用の母体ウイルスを持つ RG ウイルスを MDCK 細胞で継代したことで遺伝子変異が生じ、細胞培養用母体ウイルス候補株の Udorn-Ts と 2 種の PR8 株についても 10 継代後に遺伝子変異が生じた。これらの変異は RG ウイルスの増殖性を高め、Udorn-Ts と 2 種の PR8 株については継代後もウイルスの増殖能を維持したまま遺伝子変異を起こしていた。由来が異なる全ての株で共通の遺伝子変異は見られなかったが、継代による遺伝子変異が内部遺伝子に起きており、細胞馴化により変異が起きたと示唆された。継代で獲得した遺伝子変異がタンパク収量など他に影響を与えている可能性も考えられるため、更なる解析が必要である。

今後、本研究で確認された遺伝子変異を導入した母体ウイルスベクターを開発し、HA および NA 遺伝子を流行株や H5N1、H7N9 などパンデミックの可能性のあるウイルス

にした RG 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

細胞馴化に必要な遺伝子変異を導入することで細胞培養ワクチン用の母体ウイルスベクター開発に応用できる可能性が示唆された。細胞馴化に必要な遺伝子変異は更に解析することで、細胞で高増殖性を示す母体ウイルスベクター開発に利用できる。

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) Yuichi Harada, Hitoshi Takahashi,

Masayuki Shirakura, Eri Nobusawa, Norio Yamamoto, Kazuya Nakamura, Itsuki Hamamoto, Hideki Asanuma, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Shigeyuki Itamura. Growth ability of reverse genetically generated influenza A/H1N1pdm09 viruses in MDCK and LLC-MK2 cell lines. XV International Congress of Virology, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, September 2011

(2) 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

(3) 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

(4) 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

(5) 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

(6) 有田知子、白倉雅之、信澤枝里、田代真人：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

(7) 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

(8) 鈴木康司、谷川太一郎、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

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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。2009-2011 シーズンまでに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発育鶏卵もしくは MDCK 細胞でウイルス分離・継代を行ない、ウイルスの性状解析を行った。その結果、すべての型・亜型で細胞での分離効率が高かった一方、H1N1pdm では継代による変異は顕著で、B 型では継代で蛋白収量の低下が認められた。しかし免疫原性については H1N1pdm および B 型で鶏卵培養法と細胞培養法で製造されたワクチンに差が認められなかった。また H3N2 型は鶏卵での分離ができず、細胞培養法で製造されたワクチンでのみ免疫原性を検討したが、株間や継代に関わらず、高い応答が誘導され、細胞培養法によって製造されたワクチンの有用性が示唆された。

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。そこ

で本研究では、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、さらにはワクチン効果を比較検討した。

B. 研究方法

1. ウイルス分離・継代

ウイルスの分離には、2010-2012 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。H1N1pdm 株は引き続きジエチルエーテル、ホルムアルデヒドを加え、遠心後に抗原分画を回収した。B 型および H3 型は精製ウイルスに β プロピオラクトンを加えて不活化した。抗原の不活化確認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により確認した。

3. 品質管理

a) 蛋白定量：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。

b) SRD 試験：H1N1pdm および B 型株については一元放射免疫拡散試験 (SRD 試験) を行った。SRD 用抗体には X-179A もしくは B/Brisbane/60/2008 に対する羊抗血清を用いた。

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を皮下接種 (100 μ L) した。H1N1pdm 株および B 型株は初回免疫から 4 週後に追加接種を行い、その 2 週後にウイルスをチャレンジし、3 日後に肺洗浄液および血清を回収した。H3N2 株で初回免疫の 4 週後に血清を回収した。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。

5. ウイルス価測定

ウイルス価の測定は、従来行われているプラーク法を用いた。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

簡易診断キットでインフルエンザ陽性が認めら、かつ定量 PCR によって H1N1pdm、H3 型ないしは B 型陽性が認められた鼻腔スワブについて、MDCK 細胞および発育鶏卵を用いてウイルス分離を行った(表 1)。その結果、H1N1pdm 株では MDCK 細胞では 25/33 例、分離率 76%であったが、発育鶏卵では 13/33 例、分離率 39%であった。H3 型では 16/16 例、分離率 100%であったが、発育鶏卵では 1 例も分離ができなかった。B 型では MDCK 細胞では 16/16 例、分離率 100%であったが、発育鶏卵では 4/16

例、分離率 25%であった。続いて分離株を継代し、増殖能の変化を検討した。その結果、H1N1pdm を 10 代継代した場合に HA 価 512 以上を示した株は、細胞分離株では 17/25 株 (68%) だったのに対し、鶏卵分離株では 5/13 株、38%であった。H3 型では鶏卵で分離できなかったため、細胞培養でのみ継代を行った結果、全ての株で顕著な HA の増加は認められなかった。また B 型では、全ての検体で発育鶏卵の 1 代目には HA 価が認められず、継続的な継代が必要であったのに対し、細胞培養では 1 代目から全ての検体で高い HA 価 (128 以上) が認められた。

2. 分離・継代株の性状解析

分離継代した H1N1pdm 株で、高い HA 価を示した延べ 11 検体について、抗原性試験を行った。その結果、試験に用いた抗血清 (X-179A : A/California/07/2009 株由来) に対し、3 検体については 4 環以上の顕著な抗原性の変異が認められた。その一方では、発育鶏卵による繰り返しの継代に関わらず、抗原性の変異を示さなかった株も数株認められた(結果非表示)。H3N2 株では細胞で 8 代継代に成功した 13 株について抗原性を検討したところ、2 環以上の抗原性の変異が認められた株はなく、継代による抗原性への影響が乏しいことが示唆される(結果非表示)。なお B 型株の継代による抗原性の変化に関しては、現在検討中である。続いてそれぞれの型・亜型の 2 株ずつピックアップし、細胞培養系での継代による蛋白収量の変化について検討した。その結果、H1N1pdm では継代によっておよそ 1.5 倍程度の蛋白収量の増加が認められたが、H3 株ではほとんど蛋白収量に変化は認められず、B 型に至ってはおよそ 1/2 に減少した

(表2)。また鶏卵と細胞培養の両方で分離・継代に成功した H1N1pdm および B 型から 1 株ずつ選択し、SRD 試験を行った。その結果、H1N1pdm、B 型ともに、鶏卵で増殖させた抗原に対しては良好な反応性が認められたが、細胞培養系で増殖させた抗原に対しては、顕著な反応性の低下が認められた(結果非表示)。このことから細胞培養系で増殖させて製造したワクチンの HA 含有量を SRD 法で測定する場合には、各細胞株および各ワクチン株毎に SRD 抗体を作製する必要があることが示唆される。

3. 細胞培養法で製造されたワクチンの免疫原性

a) H1N1pdm 亜型

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に 2 回接種後、分離株と同じ A/H1N1pdm 株である A/Narita/1/2009(A/N)株とチャレンジし、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・増殖株で接種用量依存的な抗体応答が認められた(図1A)。またここで誘導された抗体応答と相関して、防御効果が認められた(図1B)。

b) H3N2 亜型

細胞培養ワクチンの免疫誘導能を、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(図2)。

c) B 型

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を、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(BTK179 株)を 2 回接種後、分離株と同じ BTK179 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3)。また接種用量依存的な抗体応答が認められた(図4)。

以上の結果は、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。

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、安全性等の検討を行った。本研究でウイルスの分離に用いた MDCK 細胞は、インフルエンザに対する感受性が高く、各衛生試験場等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。

H1N1pdm 亜型に罹患し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。H3 亜型では発育鶏卵での分離は成功しなかった一方、細胞培養系では今回検討した 16 例全ての分離に成功した。また免疫原性についても株間

や継代による影響は認められなかった。また B 型でも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。

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。本研究で検討した季節性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

Asanuma et al. 'Comparison of influenza A/H1N1pdm09 vaccine productions in eggs versus cell cultures and the protective immune responses induce in mice' 2011 年国際ウイルス学会、札幌、2011 年 9 月

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

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 眞
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 眞人、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

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 患者スワブからMDCKもしくは発育鶏卵を用いた場合の分離効率

型・亜型	MDCK	分離率	発育鶏卵	分離率
H1N1 pdm	25/33	76%	13/33	39%
H3N2	16/16	100%	0/16	0%
B型	16/16	100%	4/16	25%

表2 細胞培養系で継代した場合の蛋白量の変化

型・亜型	ID	蛋白量 (μg/mL)		増加率 (%)
		CK3	CK9	
H1N1 pdm	H1TK1	85	117	138
	H1TK14	103	178	173
H3N2	H3TK4	213	217	102
	H3TK11	249	279	112
B型	BTK179	305	188	62
	BTK180	295	109	37

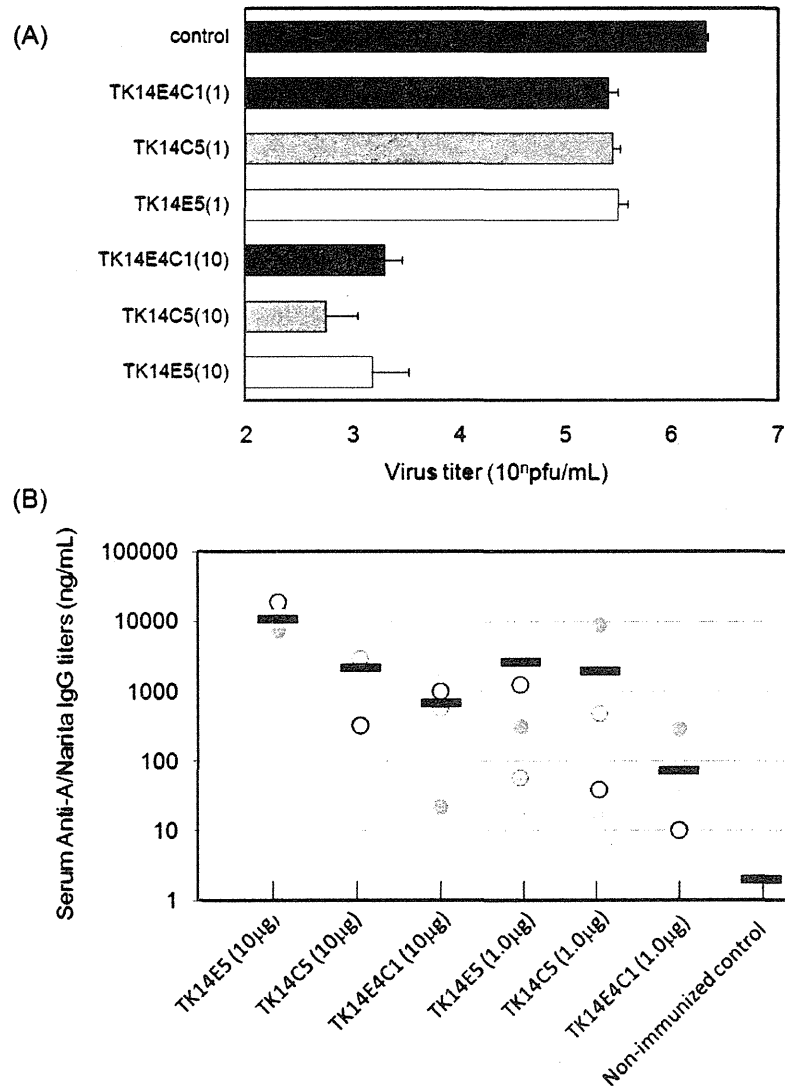


図1 細胞もしくは鶏卵で分離した H1N1pdm ウイルス由来のワクチンを接種したマウスにおける防御効果(A)および抗体応答(B)

マウスに鶏卵培養株由来、細胞培養株由来ならびに鶏卵分離・培養株を細胞で増殖させた株由来のワクチンをマウスに2回皮下接種し、A/Narita 株を感染させ、肺洗浄液中のウイルス価を測定した(A)。接種したワクチンの蛋白量は 10 もしくは 1 μ g/100 μ L で、それぞれ群で 5 匹のマウスを使用した。このとき回収された血清の抗 A/Narita 株 IgG を ELISA によって測定した(B)。エラーバーは標準偏差を示した。

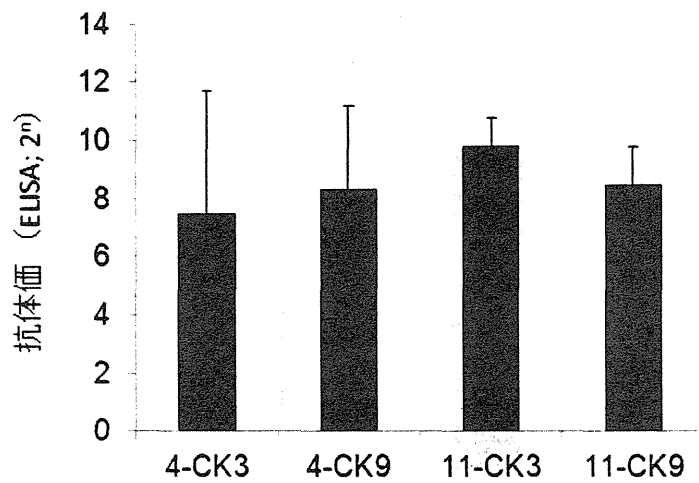


図2 分離継代株の接種後の抗体応答

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。

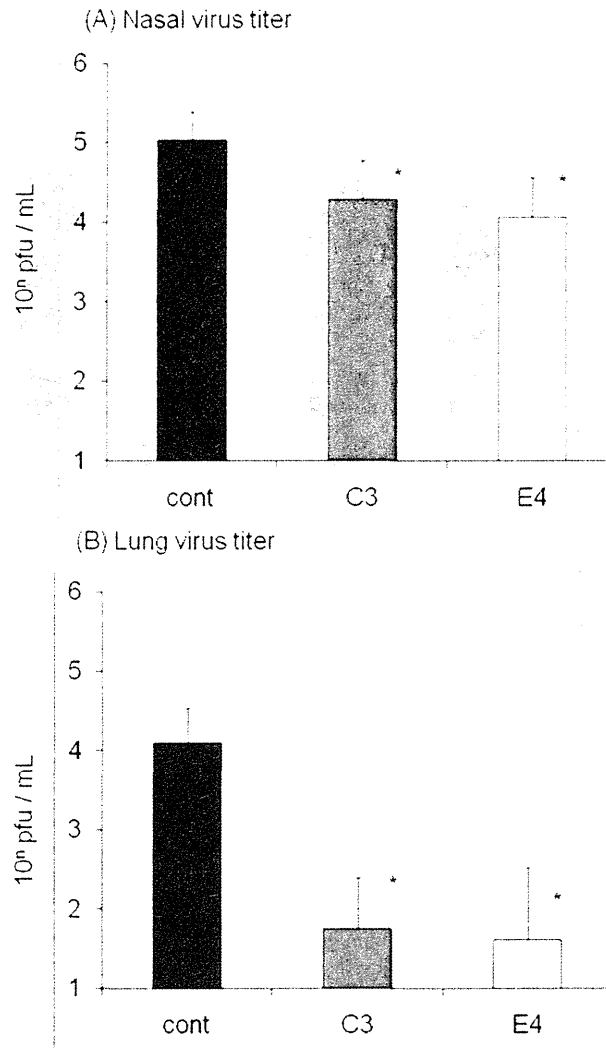


図3 細胞もしくは鶏卵で分離した B 型ウイルス由来のワクチンを接種したマウスにおける防御効果

マウスに鶏卵培養株由来ならびに細胞培養株由来のワクチンをマウスに2回皮下接種し、免疫株と同株の TK179 株を感染させ、鼻腔洗浄液(A)および肺洗浄液中(B)のウイルス価を測定した。接種したワクチンの蛋白量は1 μ g/100 μ Lで、それぞれ群で5匹のマウスを使用した。エラーバーは標準偏差を示した。

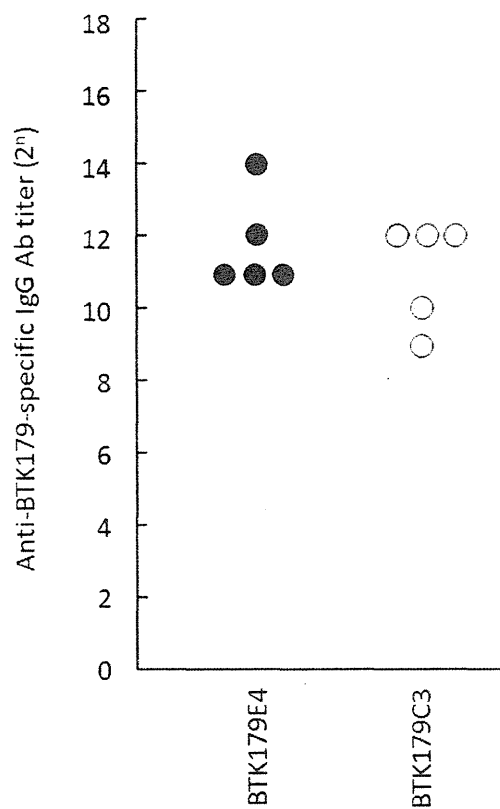


図4 細胞もしくは鶏卵で分離したB型ウイルス由来のワクチンを接種したマウスにおける抗体応答

マウスに鶏卵培養株由来(黒)ならびに細胞培養株由来(白)のワクチンをマウスに2回皮下接種し、血清中の特異的抗体価をELISAで測定した。接種したワクチンの蛋白量は1 μ g/100 μ Lで、それぞれ群で5匹のマウスを使用した。

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

細胞培養法は、次世代のワクチン製造法として非常に注目されている。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、これまでにGMP準拠条件下で構築したMDCKセルバンクの安全性試験および特性試験を行った。その結果、これまでに実施した特性試験、迷入因子否定試験、Oncogenicity試験等の全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実際に使用可能な細胞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

細胞培養法は、新しいワクチン製造法として大きな注目を集めている。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。

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。

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 (BPv) 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)
- 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

[EOPC]

- Sterility Testing by Direct Inoculation Method
- 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。

(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、実施した全ての試験について特に問題となる点は認めなかった。

[MCB]

• Sterility Testing by Direct Inoculation Method

THIO mediumおよびTSB mediumにおいて細菌・真菌の増殖を認めなかった。

• Test for the presence of Agar-cultivable and Non Agar-cultivable Mycoplasma

Agar Isolation assayとIndicator Cell assayを用いてマイコプラズマ (Agar-cultivable と Non Agar-cultivableの両タイプ) の存在を確認したところ、陰性であった。

• 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。

• 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を解析したところ、イヌ由来細胞と同様のパターンを示した。従