

って、MCBが由来する動物種はイヌと確認できた。

• DNA fingerprinting of cell lines

制限酵素処理した細胞DNAを電気泳動し、フィルターに転写してプローブをハイブリダイゼーションした。その後バンドパターンを比較したところ、MCBは標準となるMDCKと同様のパターンを示した。

• Karyology of non-human mammalian cell lines (50 metaphases)

核型分析を行ったところ、これまでに報告されているMDCKのパターンと一致した。他の細胞株が混入している所見やイヌ以外の種の細胞が混入している所見は認められなかった。

• Identification & Characterisation of Cultured Cells by Analysis of 4 Isoenzymes

Authentikitを用いてisoenzymeの電気泳動における移動度の解析を行った。昨年度にもIsoenzyme試験は行っており、MCBはイヌ由来の細胞からなることが確認されていたが、その時の試験にはコントロールとしての標準MDCK細胞が加えられていなかったため、今回これを加えて再試験を行った。4つのisoenzymeのうち3つについてはイヌ由来細胞のパターンを示し、NPについては標準MDCK細胞と同等の移動度を示した。従って、MCBはイヌ由来の細胞であり、標準MDCK細胞と同等であることが確認できた。

• Qualification of the Test Article for the Detection of Agar-Cultivable Mycoplasma in accordance with

USP/EP/PTC Requirements (Without Avian Controls)

細胞培養試料を用いて、マイコプラズマの増殖を抑制する活性があるかについて試験を行ったところ、増殖抑制活性は陰性であった。

• 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。

[WCB]

- Sterility Testing by Direct Inoculation Method

MCBと同様、TH10 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、MCBと同様陰性であった。

- Test for Mycobacterium spp Culture Medium Method

MCBと同様、結核菌は陰性であった。

- In vitro Assay for the Presence of Adventitious Viral Contaminants

WCBから調製したcell lysateを3種類のindicator cell line (MRC-5, Vero, MDCK)の培養系に加え、28日間培養を行ったが、細胞変性効果、赤血球凝集活性、赤血球吸着活性は検出されなかった。

- 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、4つのisoenzymeのうち3つについてはイヌ由来細胞のパターンを示したが、NPについてはその範囲から外れるという結果を得た。このアッセイ系においてイヌ由来と判定する基準を精査したところ、2つのイヌ由来細胞の電気泳動移動度の平均値が使用されていた。そこで再試験において標準となるMDCKの移動度とWCBの移動度を比較したところ、両者は同等の移動度を示した。従って、WCBはMDCKと同等であると確認できた。

- DNA fingerprinting of cell lines

MCBと同様、WCBも標準となるMDCKと同様のパターンを示した。

- Karyology of non-human mammalian cell lines (50 metaphases)

核型分析を行ったところ、MCBと同様、これまでに報告されているMDCKのパターンと一致した。他の細胞株が混入している所見やイヌ以外の種の細胞が混入している所見は認められなかった。

[EOPC]

• 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。

• In vitro Assay for the Presence of Adventitious Viral Contaminants

EOPCから調製したcell lysateを3種類のindicator cell line (MRC-5, Vero, MDCK)の培養系に加え、28日間培養を行ったが、細胞変性効果、赤血球凝集活性、赤血球吸着活性は検出されなかった。

• Transmission Electron Microscopic Examination of Cell Cultures (200 Cell profiles)

電子顕微鏡で観察したところ、ウイルス、ウイルス様粒子、マイコプラズマ、真菌、酵母、細菌は検出されなかった。

• Detection and Quantification of Reverse Transcriptase activity by QFPERT Assay

EOPC由来の検体からは、逆転写酵素活性は検出されなかった。

• In vitro Assay, Detection of porcine Viral Contaminants using PPK indicator Cells According to 9CFR

EOPC由来の検体をPPK indicator cellの培養系に加え、少なくとも21日間培養した後、CPEの有無、封入体形成等の異常

所見の有無、赤血球吸着活性の有無、抗Porcine parvovirus抗体に対する反応性の有無を確認したところ、全て陰性であった。

• Real Time PCR Detection of Bovine/Porcine Circovirus (PCV)

リアルタイムPCR法（検出感度20 copies/reaction）でPCV由来核酸の有無を調べたところ、陰性であった。

• Real time Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of Human viruses (FDA PTC and CPMP), Hepatitis A and B19 in biological samples

リアルタイムPCR法によって、HAV, HBV, HCV, HIV-1(provirus), HIV-2(provirus), HTLV-I/II(provirus), EBV, CMV, HHV-6, HHV-7, HHV-8, HHV-9, SV40, Parvovirus B19に由来する核酸の有無を調べた。その結果、全て陰性(検出限界以下)であった。

• DNA fingerprinting of cell lines

制限酵素処理した細胞由来DNAを電気泳動し、フィルターに転写してプローブをハイブリダイゼーションした。その後バンドパターンを比較したところ、MCBは標準となるMDCKと同様のパターンを示した。

• Test for Mycobacterium spp Culture Medium Method

結核菌培養用の培地にて56日間培養を行ったが、菌の増殖を認めなかった。結核菌は陰性であった。

• In vitro assay for the detection of canine viruses

MDCK細胞培養試料を、ウイルス感受性

細胞 (Primary Canine kidney cells, MDCK cells, BT cells, Crandell Ferine Kidney cells, A72 cells および Vero cells) の培養系に加えた。4週間培養を行い、CPE等について観察したところ、試料を加えた群では陰性であった。本試験においては、イヌウイルスの混入を示す所見は認められなかった。

- Test for the presence of inapparent viruses including guinea pigs (CBER Guidance 2006)

細胞培養試料を adult mice, suckling mice, guinea pigs, embryonated eggs に接種し、生存率の比較を行ったところ、陰性コントロールと比べて有意な違いを認めなかった。また、adult mice, suckling mice, guinea pigs については試料接種後に解剖を行い、臓器の状態も含めて確認したが、試料接種群と陰性コントロール群のいずれにも異常は見られなかった。embryonated eggs については、試料接種後に allantoic fluid を回収し、赤血球凝集活性を調べたが、全て陰性であった。以上より、本試験で使用した動物モデルで検出可能な範囲のウイルスについては、MDCK 細胞には混入していないと考えられた。

- Retrovirus 293 Co-cultivation assay (5 Passages, FPERT End-point)

MDCK細胞(EOPC)を293細胞と共培養し2代以上継代した後、培養上清を293細胞培養系に加えて3代継代を行った。培養上清を回収し、RT活性の有無をFRERT法によって調べた。その結果、MDCK細胞(EOPC)と293細胞の共培養を行ったものについては、RT活性は陰性であった。本試験からは、MDCK細胞(EOPC)から感染性のレトロウイルス

が産生されているという所見は認められなかった。

- Karyology of non-human mammalian cell lines (50 metaphases)

核型分析を行ったところ、これまでに報告されているMDCKのパターンと一致した。他の細胞株が混入している所見やイヌ以外の種の細胞が混入している所見は認められなかった。

- Detection of Viral Contaminants in Bovine Serum According to CPMP & US 9CFR Requirements, Also meets EP requirements as per the Tech Spec.

試験細胞の培養液と細胞破砕物を混合し、これを試験試料としてBT cellおよびVero cell培養系に加えた。その後、CPEの有無、封入体等の有無、赤血球(chicken, guinea pig, human)吸着の有無、代表的なウシ血清混入ウイルス(bovine adenovirus, bovine parvovirus, bovine respiratory syncytial virus, bluetongue virus, bovine diarrhoea virus, reovirus, rabies virus)に対する抗血清への反応性の有無について調べたところ、いずれも陰性であった。本試験で検出できる範囲においては、ウシ血清に由来する迷入ウイルスの存在は認めなかった。

- MAP Test with LCMV Challenge

MDCK細胞溶解物をマウスに接種し、その後16種類の murine viruses に対する抗体が産生されているかをELISA法によって解析した。その結果、いずれのウイルスに対する抗体も産生されていなかった。この結果は、EOPCには16種類の murine viruses

のいずれもが含まれていないことを示唆している。

・Oncogenicity in newborn nude mice

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

Primerdesign社のpathogen detection kitを用いてまずパラインフルエンザウイルス1型の検出を行い、感度についての検討を行った。そのためにパラインフルエンザウイルス1型をLLC-MK2細胞にて増殖させ、感染力価を測定し、力価既知のウイルスストックを調製した。検出感度を確認したところ、本キットは0.1 TCID₅₀/reactionのウイルスを検出することが出来たことから、十分高い感度を持っていると考えられた。同様にパラインフルエンザウイルス2型についてもウイルスストックを調製し、検出感度を確認したところ、1型のキットに比べると低い検出感度であった（10 TCID₅₀/reaction）。スタンダードの核酸は十分に高い感度で検出できていたことから、試験に使用したウイルスの配列とプライマー・プローブの配列にミスマッチがあり、それによって検出感度が低下していると考え

えられた。

ウイルスの配列は多様性に富むため、ウイルスの配列とプライマー・プローブの配列にミスマッチが生じることは十分あり得ることである。感度の低下をさけるために、このようなミスマッチは極力避けなくてはならない。そこでウイルス遺伝子の中で保存性の高い部分を特定し、そこにプライマー・プローブを設定することとした。

対象とする22種類のウイルスのうち17種類のウイルス (Parainfluenza viruses, Herpes simplex viruses, Human adenoviruses, Polyomaviruses, Human enteroviruses, Human metapneumoviruses, Human rhinoviruses, 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3200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。これらについて今後、評価試験を進めていく必要がある。

D. 考察

流行株により近い抗原性を持ったワクチンを製造できるという細胞培養ワクチンの持つ長所を最大限に生かすためには、ワクチンシードウイルスの製造を、鶏卵を用いずに培養細胞のみで行う必要がある。さらに、危機管理上の観点から、海外に依存せず国内でワクチンシードウイルスを製造で

きる体制を整備しておくことは非常に重要である。

そこで本研究では、ワクチンシードウイルス作製システムの基盤を形成するために、GMP基準に適合したMDCK細胞のセルバンクの構築と評価を行った。ワクチンシードウイルスの作製に使用する細胞は、安全性に問題がないことを信頼性の高い方法で十分検討する必要がある。そこで、MDCK細胞(MCB、WCB、EOPC)について、迷入因子否定試験・特性試験をGMP基準に準拠した方法で行った。

迷入因子の存在を否定するため、無菌試験、マイコプラズマ検出試験、マイコバクテリウム検出試験、イヌウイルス検出のためのin vitro試験、迷入ウイルス検出のためのin vitro試験、迷入ウイルス検出のためのin vivo試験、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、逆転写酵素活性試験、感染性レトロウイルス検出試験、ブタウイルス検出試験、ヒトウイルス検出試験、イヌ・ネコパピローマウイルス検出試験、ウシウイルスの検出試験、E型肝炎ウイルス検出試験、ウイルスに対する抗体産生試験を行ったところ、いずれも陰性であった。よって、これまでの試験結果からは迷入因子は存在しない(検出限界以下)と考えられた。

また特性試験としてはKaryology、Isoenzyme analysis、DNA fingerprinting analysisを行ったが、いずれの結果も構築したセルバンクの特性が従来のMDCK細胞の特性と一致していることを示しており、問題はないと考えられた。

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。

また細胞培養ワクチンシードウイルス開発方法の確立に関しては、国際的ハーモナイゼーションが重要である。そのため、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、WHO協力センター、IFPMAによる国際会議に参加し、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。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細胞など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準拠条件下で構築したMDCK細胞バンクも選択肢の1つとなりうる。MDCK細胞が企業から提供される場合、毎年数本程度が供給されることになるが、企業の方針転換や突発的な事態によって細胞の供給がストップしてしまう危険性は常

に存在する。従って、危機管理の観点からも、細胞培養ワクチンシードウイルス開発の基盤を感染研に構築することには非常に大きな意義がある。このMDCKセルバンクは、国内の細胞培養ワクチンシードウイルス開発の基盤となるばかりではなく、海外の機関でも使用される可能性があり、国際的な細胞培養ワクチンシードウイルス開発において大きく貢献するものとなり得る。

E. 結論

感染研で構築したMDCKセルバンクは、これまで実施した安全性試験、特性試験、Oncogenicity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

Yanagita H, Yamamoto N, Fuji H, Liu X, Ogata M, Yokota M, Takaku H, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Hoshino T.

Mechanism of Drug Resistance of Hemagglutinin of Influenza Virus and Potent Scaffolds Inhibiting Its Function.

ACS Chem Biol. 7(3):552-62, 2012

Yoshida A, Kiyota N, Kobayashi M, Nishimura K, Tsutsui R, Tsukagoshi H, Hirano E, Yamamoto N, Ryo A, Saitoh M, Harada S, Inoue O, Kozawa K, Tanaka R, Noda M, Okabe N, Tashiro M, Mizuta K, Kimura H.

Molecular epidemiology of the attachment glycoprotein (G) gene in respiratory syncytial virus in children with acute respiratory infection in Japan in 2009/2010.

J Med Microbiol. 61(Pt 6):820-9, 2012

Chang MO, Suzuki T, Yamamoto N, Watanabe M, Takaku H.

HIV-1 Gag-virus-like particles inhibit HIV-1 replication in dendritic cells and T cells through IFN- α -dependent upregulation of APOBEC3G and 3F.

J Innate Immun. 4(5-6):579-90, 2012

Noguchi K, Ishibashi K, Miyokawa K, Hokari M, Kanno T, Hirano T, Yamamoto N, Takaku H.

HIV-1 Suppressive Sequences Are Modulated by Rev Transport of Unspliced RNA and Are Required for Efficient HIV-1 Production.

PLoS One. 7(12):e51393, 2012

Hamamoto, I., Takaku, H., Tashiro, M., Yamamoto, N. High yield production of influenza virus in Madin Darby canine kidney (MDCK) cells with stable knockdown of IRF7. PLoS One. 8(3):e59892, 2013

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
細胞培養インフルエンザワクチンの開発, 化学療法の領域, 27(12):78-84, 2011

山本典生
新型インフルエンザ, クリネス, 313:8-9, 2011

山本典生
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とGMP クリーンテクノロジー, 22(7):1-5, 2012

山本典生、田代真人
細胞培養インフルエンザワクチン Bio Clinica, 28(4):41-45, 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

Hitoshi Takahashi, Yuichi Harada, Noriko Shimasaki, Kazuya Nakamura, Itsuki Hamamoto, Norio Yamamoto, Takato Odagiri, Shigeyuki Itamura, Masato Tashiro : Inefficient ability of LLC-MK2 cells in supporting the growth of influenza viruses isolated from clinical specimens: Analysis of adaptation of viruses to LLC-MK2 cells and underlying mechanism. 8th International Congress of Virology, Sapporo, September 2011 (第59回日本ウイルス学会学術集会併催)

Yuichi Harada, Hitoshi Takahashi, Masayuki Shirakura, Eri Nobusawa, Norio Yamamoto, Kazuya Nakamura, Itsuki Hamamoto, Hideki Asanuma, Takato Odagiri, Masato Tashiro and Shigeyuki Itamura : Growth ability of reverse genetically generated influenza A/H1N1pdm09 viruses in MDCK and LLCMK2 cell lines. 8th International Congress of Virology, Sapporo, September 2011 (第59回日本ウイルス学会学術集会併催)

Kazuya Nakamura, Yuichi Harada, Hitoshi Takahashi, Itsuki Hamamoto, Masato Tashiro, Norio Yamamoto: Applicability of plaque-cloning method to a prevention against genetic alteration of influenza vaccine-seed.

8th International Congress of Virology, Sapporo, September 2011 (第59回日本ウイルス学会学術集会併催)

Itsuki Hamamoto, Nobumasa Yamaguchi, Soichi Ogishima, Ken Miyaguchi, Yuichi Harada, Hitoshi Takahashi, Masato Tashiro, and Norio Yamamoto. Analysis of influenza virus infection in human nasopharyngeal and oropharyngeal cells. The Fourth ESWI Influenza Conference. 11 September 2011, Malta

Itsuki Hamamoto, Nobumasa Yamaguchi, Soichi Ogishima, Ken Miyaguchi, Yuichi Harada, Hitoshi Takahashi, Masato Tashiro, and Norio Yamamoto. Analysis of influenza virus infection in human nasopharyngeal and oropharyngeal cells.

第34回日本分子生物学会、横浜、2011年12月

Development of the anti-viral agents blocking the function of hemagglutinin of influenza virus: Tyuji Hoshino, Hiroshi Yanagita, Hideyoshi Fuji, Xinli Liu, Norio Yamamoto

8th International Congress of Virology, Sapporo, September 2011 (第59回日本ウイルス学会学術集会併催)

インフルエンザエンドヌクレアーゼ活性部位の計算機解析と阻害化合物の探索

不動 聡志, 石井 和彦, 小川 博史, 松浦 崇晃, 柳田 浩, 額賀 路嘉, 山本 典生, 鈴木 優章, 根矢 三郎, 星野 忠次

日本薬学会第132年会、札幌、2012年3月

Itsuki Hamamoto, Hiroshi Takaku, Masato Tashiro, Norio Yamamoto

High Yield Production of Influenza A Virus in Madin Darby Canine Kidney (MDCK) Cells with Stable Knockdown of IRF7.

4th Influenza Vaccines for the World - IVW 2012, Valencia, 9 Oct. 2012 - 12 Oct. 2012

高橋 仁、原田 勇一、中村 一哉、浜本 いつき、Bernhard Roth、Heidi Trusheim、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に求められる遺伝的安定性の検討

第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11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 眞人、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 眞人、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

山本典生、浅沼秀樹、佐藤佳代子、中内美奈、高橋 仁、許斐奈美、相内 章、長谷川秀樹、田代眞人

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

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、三重、2013年11-12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

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特願2012-093016号

「細胞培養組成物、インフルエンザウイルスの生産方法、及び、インフルエンザウイルス」

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1 MDCK細胞 (MCB, WCB, EOPC) に対する試験結果

Cell	Test	Results
MCB	Sterility Testing by Direct Inoculation Method (EP, USP and JP)	Negative
MCB	Test for the presence of Agar-cultivable and Non Agar-cultivable Mycoplasma (USP, EP, 1993 PTC)	Negative
MCB	Test for Mycobacterium spp Culture Medium Method	Negative
MCB	Identification & Characterisation of Cultured Cells by Analysis of 4 Isoenzymes	Canine
MCB	DNA fingerprinting of cell lines	Identical pattern to MDCK standard
MCB	Karyology of non-human mammalian cell lines (50 metaphases)	Consistent with a cell line of Canine origin
MCB	Identification & Characterisation of Cultured Cells by Analysis of 4 Isoenzymes (with control MDCK cell line)	Canine-equivalent to MDCK cell line
MCB	Qualification of the Test Article for the Detection of Agar-Cultivable Mycoplasma in accordance with USP/EP/PTC Requirements (Without Avian Controls)	Negative
MCB	Quantitative Transmission Electron Microscopy of Sections for the Detection of Viruses, Fungi, Yeasts, Bacteria and Mycoplasmas (200 cell profiles)	No viruses, virus-like particles, mycoplasmas, fungi, yeast, or bacteria
MCB	Real time Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of Bovine polyomavirus(BPyV) in Biological Samples	Negative
MCB	Real time Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of Swine Vesicular Disease Virus (SVDV) in Biological Samples	Negative
MCB	Real time Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of Canine Papillomaviruses (COPV, CPV2 and CPV3) and Feline Papillomavirus (FPV) in Biological Samples	No COPV, CPV2, CPV3 or FPV
MCB	Real time Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of Hepatitis type E virus genotypes 3 and 4 in Biological Samples	Negative
WCB	Sterility Testing by Direct Inoculation Method (EP, USP and JP)	Negative
WCB	Test for the presence of Agar-cultivable and Non Agar-cultivable Mycoplasma (USP, EP, 1993 PTC)	Negative
WCB	Test for Mycobacterium spp Culture Medium Method	Negative
WCB	In vitro Assay for the Presence of Adventitious Viral Contaminants	Negative

WCB	Identification & Characterisation of Cultured Cells by Analysis of 4 Isoenzymes (with control MDCK cell line)	Canine-equivalent to MDCK cell line
WCB	DNA fingerprinting of cell lines	Identical pattern to MDCK standard
WCB	Karyology of non-human mammalian cell lines (50 metaphases)	Consistent with a cell line of Canine origin
EOPC	Sterility Testing by Direct Inoculation Method (EP, USP and JP)	Negative
EOPC	In vitro Assay for the Presence of Adventitious Viral Contaminants	Negative
EOPC	Transmission Electron Microscopic Examination of Cell Cultures (200 Cell profiles)	No virus, virus-like particles, mycoplasmas, fungi, yeasts, or bacteria were observed.
EOPC	Detection and Quantification of Reverse Transcriptase activity by QFPERT Assay	Negative
EOPC	In vitro Assay, Detection of porcine Viral Contaminants using PPK indicator Cells According to 9CFR	Negative
EOPC	Real Time PCR Detection of Bovine/Porcine Circovirus (PCV)	Negative
EOPC	Real time Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of Human viruses (FDA PTC and CPMP), Hepatitis A and B19 in biological samples	Negative
EOPC	DNA fingerprinting of cell lines	Identical pattern to MDCK standard
EOPC	Test for Mycobacterium spp Culture Medium Method	Negative
EOPC	In vitro assay for the detection of canine viruses	Negative
EOPC	Test for the presence of inapparent viruses including guinea pigs (CBER Guidance 2006)	Negative
EOPC	Retrovirus 293 Co-cultivation assay (5 Passages, FPERT End-point)	Negative
EOPC	Karyology of non-human mammalian cell lines (50 metaphases)	Consistent with a cell line of Canine origin
EOPC	Detection of Viral Contaminants in Bovine Serum According to CPMP & US 9CFR Requirements, Also meets EP requirements as per the Tech Spec.	Negative
EOPC	MAP Test with LCMV Challenge	Negative
EOPC	Oncogenicity in newborn nude mice	Negative

細胞培養法によるウイルス分離効率の解析

研究分担者 中村一哉

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

細胞培養インフルエンザワクチン実用化に関する研究の一端として、シードウイルス分離調製用基材の探索と有用性評価を行った。GMP 準拠使用を目的に品質検証された3種類の細胞株、浮遊培養系 MDCK 細胞 (MDCK_NVD)、浮遊培養系 Per. C6 細胞 (Per. C6) および附着培養系 MDCK 細胞 (MDCK_NIID) を対象に、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について検討し、各種細胞株を用いてウイルス分離を行った場合のそれぞれの利点、潜在的問題点を明らかにした。

A. 研究目的

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たせながら、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、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_NVD)、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。

B. 研究方法

1) 細胞株

MDCK_NVD は Novartis 社 (ドイツ) で樹立された浮遊培養系 MDCK 細胞 MDCK33016PF 株の分与を受けた。細胞の維持は標準手順書に記載の手法に従い、至適化 CDM 培地 (Lonza 社) を用いた震盪培養にて行った。

Per. C6 は Crucell 社 (オランダ) で樹立された浮遊培養系 Per. C6 細胞株 (Per. C6) の分与を受けた。細胞の維持は標準手順書に記載の手法に従い、4mM L-Glutamine 添加 AEM 培地 (GIBCO 社) を用いた震盪培養に

て行った。

MDCK_NIID 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 (本報告書別項参照)。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を本実験に使用した。細胞の維持は、4mM L-Glutamine 添加 OPTI-Pro SFM 培地 (GIBCO 社) を用いた静置培養にて、標準手順書に記載の手法に従って行った。

各細胞の分離効率の検討に際して、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_Conv) を用いた。細胞の維持には 10%FCS 添加 MEM 培地を用いた静置培養にて、標準手順書に記載の手法に従って行った。

2) 臨床検体

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。

3) ウイルス分離・継代

MDCK_NVD を用いた分離では 50ml 規格のプラスチック遠沈管に細胞浮遊液を 5×10^6 個/5ml で分注調製し、供試検体 50 μ l を接種後、34°C、5%CO₂ の恒温条件下で 72 時間震盪培養した。

Per. C6 を用いた分離では 125ml 規格の細胞培養用三角フラスコに細胞浮遊液を 1.0×10^7 個/5ml で分注調製し、供試検体 50 μ l を接種した。A 型インフルエンザウイルス

分離の際は 34°C、B 型ウイルス分離においては 35°C の恒温条件、5%CO₂ 存在下で 72 時間震盪培養した。

MDCK_NIID を用いた分離には ϕ 60mm ディッシュに細胞を 1.5×10^6 個/枚で播種、静置培養三日目に臨床検体 50 μ l と OPTI-PRO SFM 培地 (GIBCO 社) 150 μ l 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。

比較対照の MDCK_Conv を用いた分離は ϕ 60mm ディッシュに細胞を 1.5×10^6 個/枚で播種、静置培養三日目に臨床検体 50 μ l を OPTI-PRO SFM 培地 (GIBCO 社) 150 μ l と混合した試料を接種することにより行った。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。

それぞれの細胞株への検体接種後 72 時間後で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。

4) HA 試験

HA 試験は定法に従って行った。検体ウイルスの 2 倍階段希釈列を作製し、これにウイルス液と等量の 0.75%モルモット赤血球液を加え、90 分間反応後、赤血球の完全凝集像を示すものを HA 陽性と判定した。

(倫理面への配慮)

本研究においては、鼻腔スワブ等の臨床検体を用いるに際し、国立感染症研究所倫理審査委員会の審査を経て承認を受けた。供試検体は匿名処理を行い、検体提供者特定および個人情報流出の防止に配慮している。

C. 研究結果

MDCK_NVD および比較対象としての MDCK_Conv を用いての臨床検体からのウイルス分離結果を表 1 に示した。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_NVD 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_Conv 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_Conv での継代を経た方が MDCK_NVD で継代した場合よりも高い HA 価を示す傾向があった。

表 1 MDCK_NVD への臨床検体接種によるウイルス分離効率

A/H1N1pdm (2010/2011)					
細胞株	供試検体数	分離数		分離総数	分離率
		初回接種	盲継代後 ^{注1)}		
MDCK_NVD	10	9	1	10	100%
MDCK_Conv		4	6	10	100%

^{注1)}初回接種で分離できた数を含めない。

Per. C6 および比較対照として MDCK_Conv を用いた臨床検体からのウイルス分離結果を表 2 に示した。H1pdm 患者臨床検体の Per. C6 への接種においては、供試検体のいずれからでもウイルスの分離を確認出来なかった。MDCK_Conv を用いた場合は、6 検体がウイルス分離に盲継代を必要としたものの、全ての検体からウイルスを分離できた。

H3 分離については、Per. C6 への接種により 12 検体から 9 株、MDCK_Conv への接種により 12 検体全てからの分離を確認できた。Per. C6 接種においては 6 検体が盲継代を経ずともウイルス分離を確認でき、その後のウイルス継代で観察される HA 価は 64-256 と比較的高い値を示していた。MDCK_Conv を用いた場合、分離総数は多か

ったものの、分離ウイルスの継代時に観察される HA 価は低値を推移する傾向があった。

B/Vic は Per. C6 への接種により 12 検体から 9 株、MDCK_Conv への接種により 12 検体全てからウイルスを分離でき、Per. C6 への接種で分離されたうちの 1 株を除き、分離確認に盲継代を要しなかった。分離株の HA 価は継代を通じて高値を示し、用いた細胞による差異は認められなかった。

MDCK_NIID および比較対照として MDCK_Conv を用いた臨床検体からのウイルス分離結果を表 3 に示した。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_Conv 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 32-64 であり両細胞での差異は認められなかった。

表2 Per.C6 への臨床検体接種によるウイルス分離効率

A/H1N1pdm (2010/11)					
使用細胞株	供試検体数	分離数		分離総数	分離率
		初回接種	盲継代後 ¹⁾		
Per.C6	10	0	0	0	0%
MDCK_Conv		4	6	10	100%
A/H3N2 (2010/11)					
使用細胞株	供試検体数	分離数		分離総数	分離率
		初回接種	盲継代後		
Per.C6	12	6	3	9	75%
MDCK_Conv		2	10	12	100%
B/Victoria (2010/11)					
使用細胞株	供試検体数	分離数		分離総数	分離率
		初回接種	盲継代後		
Per.C6	12	8	1	9	75%
MDCK_Conv		12	-	12	100%

¹⁾ 初回接種で分離確認出来た株を含めない。

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_Conv 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 と細胞間での差は認められなかった。

B/Vic と B/Yam 系統株は両細胞から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 (表 4)。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_Conv に比して低い分離率が示された。

D. 考察

本研究で、臨床検体から直接のウイルス分離において、MDCK_NVD、Per. C6、MDCK_NIID を分離用基材として用いた場合に観察される細胞株それぞれの特徴が明らかにされた。

MDCK_NVD 細胞は、臨床検体から直接のウイルス分離において、従来使用されてきた

MDCK_Conv よりも高い分離率を示しており、H1pdm 分離に有用な細胞であると考えられる。しかしながら、分離ウイルスの HA 価は

低く、分離後に継代を繰り返しても 8~32HA 価程度に留まっていた点に留意を要する。

表3 MDCK_NIID への臨床検体接種によるウイルス分離効率

A/H1N1pdm (2011/2012)

細胞株	検体数	分離数			分離総数	分離率(%)
		初回接種	盲継代後 ^{注1)}	盲継代 2回以上 ^{注2)}		
MDCK_NIID	5	0	3	2	5	100
MDCK_Conv		0	1	4	5	100

A/H3N2 (2011/2012)

細胞株	検体数	分離数			分離総数	分離率(%)
		初回接種	盲継代後	盲継代 2回以上		
MDCK_NIID	5	0	4	1	5	100
MDCK_Conv		2	3	---	5	100

B/Victoria (2011/2012)

細胞株	検体数	分離数			分離総数	分離率(%)
		初回接種	盲継代後	盲継代 2回以上		
MDCK_NIID	5	5	---	---	5	100
MDCK_Conv		5	---	---	5	100

B/Yamagata (2011/2012)

細胞株	検体数	分離数			分離総数	分離率(%)
		初回接種	盲継代後	盲継代 2回以上		
MDCK_NIID	5	5	---	---	5	100
MDCK_Conv		5	---	---	5	100

注1) 初回接種で分離できた数を含めない。

注2) 1回の盲継代で分離できた数を含めない。

表4 MDCK_NIID を用いての A/H1N1pdm ウイルス分離効率についての追試験

細胞株	検体数	分離数			総分離数	分離率
		初回接種	盲継代後 ^{注1)}	盲継代 2回以上 ^{注2)}		
MDCK_NIID	5	0	0	2	2	40
MDCK_Conv		3	1	1	5	100

^{注1)}初回接種で分離できた数を含めない。

^{注2)}1回の盲継代で分離できた数を含めない。

Per. C6 を分離用基材として用いた場合、H1pdm は供試検体のいずれからもウイルス分離を確認することが出来なかったため、Per. C6 は H1pdm に対する感受性が極めて低いものと考えられた。同じ亜型である A ソ連型 H1N1 の陽性検体を用いて予備的に実施した試験においても MDCK_Conv に比べ大きく劣る分離成績であった（本報告書未記載）。これらのことから、Per. C6 は A/H1N1 亜型のウイルス分離における有用性は低いものと考えられた。一方、H3 分離に際しては、実用に値する分離率を示し、上清中の HA 価は MDCK_Conv を用いた場合よりも高い値が安定して観察されたことから、Per. C6 の H3 ウイルスの分離、増殖用基材としての有用性が示唆された。最近の H3 分離株は MDCK で分離継代した場合に低めの HA 価を示す傾向もあり、MDCK 細胞での H3 分離に困難が生じた場合の代替え基材候補になり得るものである。

B/Vic 分離については、Per. C6 を用いての分離率は MDCK_Conv を用いた場合よりも低かったが、実用には能うものと考えられた。分離株継代によって得られる HA 価も MDCK_Conv を用いた試験で観察された HA 価に比肩するものであったため、B/Vic 分離増殖用基材としての有用性も期待される。

Per. C6 を用いた分離試験全体の成績からは H3 の増殖性においては Per. C6 が

MDCK_Conv に比べ優位に思われたが、汎用性という点も併せて考慮した場合、インフルエンザワクチンシードの分離調製には MDCK_Conv あるいは他の MDCK 系統の細胞株が Per. C6 よりも有用であると考えられる。

MDCK_NIID を分離用基材として用いた場合には、急性期患者から採取される検体のように相応量のウイルス量を含む臨床検体からの分離については、従来使用されてきた MDCK_Conv に比較して同等の効率が確認できた。一方でウイルス含量の乏しい検体からのウイルス分離に際しては分離率の顕著な低下が観察され、ウイルス分離に供する検体の選定の必要性が示唆された。

H1pdm と H3 両亜型の分離に際しては、ウイルスの分離確認に至るまでに盲継代を必要とする例が多く存在した。また分離ウイルスの HA 価が 32 程度と低めであり、分離後に追継代を実施した場合でも上昇は認められなかった。この傾向は MDCK_NIID と MDCK_Conv でほぼ同様であることからこれら亜型の分離に際し留意すべき事項としてあげられる。

B/Vic と B/Yam 系統については、MDCK_NIID への臨床検体接種により盲継代を要することなく高い効率で分離でき、分離ウイルスの HA 価も高値を示していた。MDCK_Conv を用いた場合に比べと遜色ない結果であり、B 型ウイルスの分離用基材と

しての有用性が確認された。

H1pdm や H3 を MDCK 系統の細胞で増殖させた場合に HA 価が低値を示す傾向はワクチン製造に際し不利益となり得ることも想定される。高い HA 価を得るための培養条件の検討、改善は今後の課題である。低 HA 価を示す要因を細胞、ウイルスの両面から探索、解明していくことが将来のワクチンシード調製に求められる。

E. 結論

GMP 準拠使用に向けて品質検証された MDCK_NVD、Per. C6、MDCK_NIID について、これらをシードウイルス分離用基材として用いた場合の有用性と留意点を明らかにした。包括的には MDCK 系統の 2 種の細胞株が実用性での優位を示すと考えられるが A/H1N1pdm や A/H3N2 亜型ウイルス分離増殖において観察される低 HA 価の克服が今後の課題と言える。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) K. Sakai, Y. Ami, M. Tahara, T. Kubota, M. Anraku, M. Abe, N. Nakajima, T. Sekizuka, K. Shirato, Y. Suzaki, A. Aina, Y. Nakatsu, K. Kanou, K. Nakamura, T. Suzuki, K. Komase, E. Nobusawa, K. Maenaka, M. Kuroda, H. Hasegawa, Y. Kawaoka, M. Tashiro and M. Takeda.
“The host protease TMPRSS2 plays a major role for *in vivo* replication of emerging H7N9 and seasonal influenza viruses.”
Journal of Virology, in press, 2014

2. 学会発表

- 1) Kazuya Nakamura, Yuichi Harada, Hitoshi Takahashi, Itsuki Hamamoto,

Masato Tashiro, Norio Yamamoto

“Applicability of plaque-cloning method to a prevention against genetic alteration of influenza vaccine-seed.”
XV International Congress of Virology (Sapporo, Japan) (第 59 回日本ウイルス学会学術集会併催), Sep/2011

- 2) Kazuya Nakamura, Masayuki Shirakura, Akiko Muto, Tadasuke Naito, Seiichiro Fujisaki, Masato Tashiro, Eri Nobusawa
“Development of candidate vaccine virus derived from A/Anhui/1/2013 (H7N9) strain.” Options for the Control of Influenza VIII (Cape Town, South Africa), Sep/2013

- 3) 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

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

特になし

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

研究分担者 浜本いつき

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 研究員

研究協力者 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 細胞培養ワクチンは、鶏卵の供給に左右されずワクチンを大量製造可能であることから、パンデミック対策の大きな柱として期待されている。しかし、細胞培養ワクチンの高い製造コスト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、ウイルスの増殖性に関与する遺伝子を同定し、それを制御または改変することによって、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。本研究によって、IRF7、シクロフィリン、P 糖タンパク質がウイルスの増殖を負に制御する因子であり、これらをノックダウンすることによってウイルスの増殖効率が向上することが明らかとなった。詳細なメカニズムの解明は今後の課題であるが、IRF7、シクロフィリン、P 糖タンパク質を制御または改変することにより、ウイルスの増殖性が向上した新規の細胞を開発できる可能性がある。このような細胞は、細胞培養ワクチン製造の期間短縮とコスト低減に貢献するものとなるであろう。

A. 研究目的

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。鶏卵培養法では、全国民分のワクチンを製造するために1年半を要するため、新型インフルエンザへの迅速対応は不可能である。

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。