

インフルエンザウイルスワクチン株の鶏卵における分離

研究分担者：桑原 朋子 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・研究官
研究協力者：高下 恵美 同上・主任研究官

研究要旨

現行の季節性インフルエンザワクチンには、発育鶏卵（鶏卵）で分離されたウイルスが用いられる。より有効性の高いワクチン株の選定に貢献することを目的として、当研究所でもワクチン候補株の分離を行っている。今年度は、鶏卵におけるウイルス分離率の改善を目指し、分離条件を再検討した。その結果、昨年度は A (H3N2) ウイルスが分離できていなかったが、今回分離条件を変更することにより、A (H3N2) ウイルスの分離に成功した。総合すると、97 株のウイルスをワクチン候補株として鶏卵で分離した。

A. 研究目的

WHO の季節性インフルエンザワクチン推奨株は、5 つの WHO Collaborating Centre (WHOCC) により、鶏卵で分離されたウイルスの中から選定される。我々、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も WHOCC の 1 つとして、より有効性の高いワクチン株の選定に貢献するため、発育鶏卵を用いたワクチン候補株の分離を行っている。近年の A (H3N2) ウイルスは、トリ型レセプターとの親和性が低く、鶏卵で増殖させることは非常に困難である。この現象により、現在 A (H3N2) ウイルスのワクチン候補株が世界的に不足するという事態が起こっている。

我々は、昨年度から A (H3N2) ウイルスの鶏卵での分離率の改善を目指し、4 箇所の提携医療機関から、凍結する前でウイルスタイターが高い状態にある臨床検体を提供してもらい、ウイルスの鶏卵分離を試みてきた。しかしながら、B 型ウイルスの分離率は 92%程度であるのに対し、A (H3N2) ウイルスの分離率は 0%であった。今年度、我々は、さらに分離条件を検討し、ワクチン候補株の分離効率の改善を試みた。

B. 研究方法

臨床検体は、国内の提携医療機関から、凍結せずに低温に保った状態で送付されてきたも

のをを用いた。臨床検体到着後、RT-LAMP 法により検体中のウイルス量の測定と亜型同定を行い、ウイルス量が低いものを除外した。ウイルスは、鶏卵の羊膜腔に臨床検体を原液で 200 μ l ずつ接種した。羊膜腔でウイルスが増殖したかどうかは、HA アッセイまたは、RT-LAMP 法により判定した。羊膜腔での増殖が確認されたウイルスは、ワクチン候補株として十分な量を確保するため、漿尿膜腔でさらに継代した。

（倫理面への配慮）

該当なし

C. 研究結果

我々の従来の方法では A (H3N2) ウイルスが分離できなかったため、WHOCC ロンドンセンターで採用されているプロトコルを共有してもらい、このプロトコルをもとに分離条件の検討を行った。具体的な検討項目は、鶏卵の種類では、これまで使用してきた 9-10 日齢の白玉鶏ジュリアとロンドンセンターで用いられている 14 日齢の赤玉鶏ボリスブラウンとの比較、接種方法では、従来行ってきた漿尿膜の上の卵殻膜を取り除いて鶏卵内を可視化し接種する方法と、卵殻膜を取り除かず上から PBS を添加するこ

とにより鶏卵内を可視化して接種する方法ではどちらの分離率が良いかを比較検討した。その結果、14日齢の赤玉鶏に、卵殻膜を取り除いた状態で接種した時に最も分離率が高いことが分かった。A(H3N2)ウイルスにおいては、分離率が0%から20%にまで上昇した。他の亜型のウイルスに関しては、どちらの方法でも高い分離率を示したため、引き続き新規の方法でウイルスの鶏卵分離を行った。その結果、A(H1N1)pdm09ウイルス37株、A(H3N2)ウイルス23株、B型ビクトリア系統ウイルス20株、B型山形系統ウイルス17株を分離することができた。

D. 考察

今回の結果から、14日齢の赤玉鶏に卵殻膜を取り除いてウイルスを接種する方法が最も効率のよい鶏卵分離法であることがわかった。これは、胎児が小さくて弱い9-10日齢の鶏卵では、卵殻膜を取り除くことで胎児に過度なストレスがかかり、胎児が死亡してしまうことがあるが、胎児も成長している14日齢の鶏卵では、胎児も強く、卵殻膜を取り除いても胎児へのストレスが少ないためではないかと考えられる。

E. 結論

今後、ワクチン候補株の鶏卵分離には、14日齢の赤玉鶏ボリスブラウンを用い、接種時には卵殻膜を取り除く方法を採用する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Nakamura K, Shirakura M, Fujisaki S, Kishida N, Burke DF, Smith DJ, Kuwahara T, Takashita E, Takayama I, Nakauchi M, Chadha M, Potdar V, Bhushan A, Upadhyay BP, Shakya G, Odagiri T, Kageyama T, Watanabe S. Characterization of influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated from Nepalese and Indian outbreak patients in early 2015. *Influenza Other Respir Viruses*. 11(5) 399-4032017

- Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Watanabe S, Odagiri T. Isolation of egg-adapted influenza A(H3N2) virus without amino acid substitutions in the antigenic sites of its hemagglutinin. *Jpn J Infect Dis*. (In press)

2. 学会発表

- Tomoko Kuwahara, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Kazuya Nakamura, Emi Takashita, Hitoshi Takahashi, Noriko Kishida, Aya Sato, Rie Ogawa, Hideka Miura, Miki Akimoto, Hiromi Sugawara, Noriko Suzuki, Shinji Watanabe, Takato Odagiri

Characterizations of cell-derived and egg-passaged A/Saitama/103/2014 virus. 第65回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017年10月

- 桑原朋子、高下恵美、藤崎誠一郎、白倉雅之、中村一哉、岸田典子、高橋仁、佐藤彩、小川理恵、三浦秀佳¹、秋元未来、菅原裕美、鈴木典子、渡邊真治、小田切孝人
鶏卵で継代培養した埼玉株のNAに特徴的に認められたアミノ酸置換
第31回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム、静岡、2017年6月

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

H. 健康危険情報

該当なし