

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：新型及び季節性インフルエンザに対する細胞培養ワクチンのシードウイルス製造法及び安全性・有効性・品質の評価法の開発に関する研究
2. 研究開発代表者： 信澤枝里（国立感染症研究所）
3. 研究開発の成果

本研究課題では、日本における細胞培養ワクチンの実用化の基盤を作ることを目的とし、今年度は、主に季節性インフルエンザワクチンシードウイルス（種株）の開発及びその評価系の確立、さらに細胞培養ワクチンの免疫原性を評価するため、ヒト化マウスを用いた評価技術基盤の確立を行った。[シードウイルス製造法の確立]では、ワクチン製造用細胞としての品質評価を受けたNIID-MDCK細胞を用いて、臨床検体から効率的にウイルス（元株）を分離するため、検体中のウイルスゲノム量を基準としたウイルス分離条件を確立した。その結果、元株の分離を効率的に行うことができた。この条件に従い、種株作製のため4型/亜型（A/H1pdm, A/H3, B/Yam, B/Vic）に属する各元株を分離し、ワクチン製造所での種株開発に供した。各ワクチン製造所が細胞培養ワクチン製造に用いる細胞は異なるが、各社細胞での元株の増殖性に大きな差異は認められなかった。次に、各ウイルスの抗原性を当該シーズンのプロトタイプ株と比較した結果、各社で検討対象とした株に違いはあるものの、種株候補の大半で、その抗原性はプロトタイプ株と一致した。具体的にはワクチン株の抗原性を評価する際のHI試験（two-way）で、プロトタイプ株とHI価で2倍以内の差に収まった。この結果から、NIID-MDCKで分離した元株を用いて、ワクチン製造所所有の細胞で、プロトタイプ株と同等の抗原性を示す細胞培養ワクチン株の作製が可能であることが示された。[ワクチンの品質評価系の確立]では、当研究開発課題内で作製された種株候補のうち、今年度はA/H1N1pdm09亜型の種株を対象にHA抗原量測定試薬（SRD試験用の標準抗原および参照抗血清）の作製をおこなった。参照抗血清の作製は、免疫に用いる抗原量、アジュバントの種類、免疫間隔に関して条件検討を行ったが、いずれの条件で作製した血清も標準抗原とは良好に反応し、SRD試験に供することが可能であることを確認した。[安全性評価系の確立]では、ヒトに感染性や病原性を示す24種類の呼吸器系ウイルスを対象とし、リアルタイムRT-PCR法を用いた迷入ウイルス検出系を確立した。各呼吸器系ウイルス株でリアルタイムRT-PCR用の陽性コントロール核酸（検出限界値1~100コピー以上で検出可）を作製し、本課題内で臨床検体からNIID-MDCK細胞を用いて分離した元株中の迷入ウイルスの検出を試みた。その結果、ワクチン製造所の種株作製に用いたいずれの元株中にも検出可能なウイルスゲノムの存在は認められなかった。[シードウイルス製造用細胞の確立とその評価]では、主に、高ウイルス収量を得るための培養法の開発を行った。具体的には、NIID-MDCK細胞の培養法を単層培養から震盪培養に変え、細胞の浮遊状態を維持したままウイルス感染を行えることを確認した。さらに、ウイルス感染、培養を行う際の細胞の密度をある程度上げることで、高ウイルス収量を得ることを確認した。この条件下では、培養液当たりのウイルス収量は約10 μ g/mLと高いウイルス収量を示し、鶏卵での収量（10-20 μ g/mL）に匹敵する収量であることが確認された。[ワクチンの有効性の評価]では、細胞培養ワクチンの評価系の確立のため、HAタンパクプローブを利用したフローサイトメトリ技術により、ヒトB細胞中のHA結合細胞集団を特定する手法を確立し、これをヒト化マウスを用いた、細胞培養インフルエンザワクチンの免疫原性評価系に応用する条件の最適化を行った。