

平成28年度医療研究開発推進事業費補助金

(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業) 成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases

補助事業課題名： (日本語) 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
(英語) Study on the development in the seed virus production methods of cell cultured vaccines against pandemic and seasonal influenza, and the development in the evaluation methods of safety, efficacy and quality of these vaccines.

補助事業担当者 (日本語) 国立感染症研究所・室長・信澤枝里
所属 役職 氏名： (英語) National Institute of Infectious Diseases・Laboratory chief・
Eri Nobusawa

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究課題名： (日本語)
・細胞培養ワクチン株開発法とワクチン評価系確立のためのネットワーク構築
・シードウイルス製造法の確立(I)

(英語)
・ Establishment of the network for developing the cell based vaccine strains and evaluation system of the resultant vaccine.
・ The strategy for developing seed viruses (I)

補助事業分担者 (日本語) 国立感染症研究所・室長・信澤枝里
所属 役職 氏名： (英語) National Institute of Infectious Diseases・Laboratory chief・
Eri Nobusawa

成果の概要（総括研究報告）

（和文）

ワクチン製造用シードウイルスを作製する方法を確立するために、効率的ウイルス（元株）分離法の確立とシードウイルスの作製を行った。今年度は抗原性が流行の主流であるウイルス（元株）を含む臨床検体を選択するために、次世代シーケンサーを用いて臨床検体中のウイルスゲノム（HA、NA 遺伝子）の解析を行った。その結果、多くの臨床検体中のウイルスゲノム配列は、比較的混合塩基の存在しない単一なゲノム配列となっていることが確認され、目的とする臨床検体の選択は、比較的容易であることが示唆された。また、2015/2016 シーズンのプロトタイプ株と同等の抗原性を示す種株候補を、ワクチン製造所の協力を得て作製することに成功した。（信澤枝里）

さらに、季節性インフルエンザウイルスの細胞での継代中に生じる細胞馴化による抗原変異を防ぐ目的で、高増殖母体ウイルス（hg-PR8 株）と季節性ウイルスとの 6:2 リアソータントウイルスを作製した。hg-PR8 を母体ウイルスとして、季節性 H3N2 亜型の HA と NA 遺伝子を持つリアソータントウイルス（TA232/HG、TA233/HG）をリバーシジェネティクス（RG）法で作製した。作製したウイルスをワクチン製造用に品質管理された細胞（NIID-MDCK 細胞）で 6 代連続継代後、HA 遺伝子と NA 遺伝子の塩基配列を調べた。その結果、TA232/HG では、NA に HA 活性を賦与する細胞馴化変異（T148K）が確認された。一方、TA233/HG では HA にアミノ酸変異（P221L）が生じていたが、レセプター結合領域や抗原部位には、変異が確認されなかった。以上の結果から、hg-PR8 株を母体としたリアソータントワクチン株を作製することで、細胞培養ワクチン株の細胞馴化変異を抑制できる可能性が示唆された。（鈴木康司）

元株分離の際に臨床検体から持ち込まれる可能性のある迷入ウイルス検出系の確立を試みた。そのため、マルチプレックスリアルタイム RT-PCR 法を用いて、ヒトに対して病原性を示す呼吸器系以外の（呼吸器系は確立済み）迷入ウイルス検出系を構築した。各ウイルスによって検出感度は異なるが、1 反応系あたり 1~100 コピー以上のウイルスが存在すると検出が可能であることが示された。

さらに、元株分離用の NIID-MDCK 細胞がインフルエンザウイルス以外のウイルスに対する排除能を有するののかについて検討した。そのため、インフルエンザウイルスと重複感染する可能性の高い呼吸器系ウイルスを選択し、マルチプレックスリアルタイム RT-PCR 法を用いて NIID-MDCK 細胞におけるウイルス排除能について検討を行った。その結果、RS ウイルス（RSVA）、ヒトメタニューモウイルス（hMPVA）、ライノウイルス 16 型（HRVA）、コロナウイルス（HCoV-OC43）、アデノウイルス（HAdV4）、単純ヘルペスウイルス I 型（HSV1）、エンテロウイルス D68（EV-D68）は、NIID-MDCK 細胞で継代を重ねるとウイルスは排除された。一方、パラインフルエンザウイルス（PIV3）は、NIID-MDCK 細胞で高い増殖性を示し、継代を重ねてもウイルスは排除されなかった。従って、NIID-MDCK 細胞は、PIV3 以外の多くの呼吸器系ウイルスに対して感受性が低く、これらのウイルス排除能を有することが示唆された。（浜本いつき）

細胞培養ワクチンの HA 抗原量測定のための一元放射免疫拡散（SRD）試験用試薬を作製し、その試薬を用いてワクチン中の HA 抗原量の測定を行った。細胞分離ウイルスに由来する A/H1N1pdm09 ウイルスを用いて SRD 試薬（標準抗原および参照抗血清）の作製を行い、この試薬が細胞培養ワクチンの HA 抗原量測定に資するものであることを確認した。さらに、効率的で的確に HA 抗原量を測定することのできる参照抗血清作製系の確立を試みている。（高橋仁）

昨年度までの研究で開発したフローサイトメトリとヒト化マウスの技術を応用し、細胞培養インフルエンザワクチンの免疫原性評価に必要な実験システムの最適化を完了して、対照となる鶏卵

培養インフルエンザワクチンの免疫原性解析に着手した。(高橋宜聖)

(英文)

Establishment of method for seed virus production

In order to establish a method for preparing a seed virus for vaccine production, we have developed the efficient strategy for pre-seed-virus isolation, and have prepared seed viruses for vaccine production. To find a clinical specimen including the viruses, which showed dominant antigenicity among the circulating viruses in the corresponding season, we have established the analytical method of viral genome (HA, NA) using a next generation sequencer. As a result, it was confirmed that the viral genome sequences in many clinical specimens were homogeneous instead of heterogeneous. In addition, we have succeeded in preparing seed viruses showing antigenicity similar to prototype virus of the 2015/2016 influenza season with the cooperation of the vaccine manufacturers. (信澤枝里)

To prevent the seasonal influenza vaccine viruses from the “antigenic change by cultured cell-adaptation” during passages in cultured cells, we have generated 6:2 reassortant viruses between high-growth master virus (hg-PR8) and seasonal influenza viruses. We have generated reassortant viruses, TA232/HG and TA233/HG, possessing the HA and NA segments of seasonal H3N2 viruses and the remaining segments from hg-PR8. After six times serial passages in NIID-MDCK cells, which are qualified cells for vaccine production, we have determined the nucleotide sequences of HA and NA genes of the reassortant viruses. As a result, amino acid substitution, T148K, in NA, which is known to confer hemagglutination activity to NA, was found in TA232/HG. On the other hand, amino acid substitution, P221L, in HA was found but no mutation was found in the receptor binding domain and the antigenic sites. These results suggested that by generating reassortant viruses based on hg-PR8, the antigenic change by cell-adaptation in cell-cultured vaccine viruses might be suppressed.

(鈴木康司)

We developed a multiplex real-time RT-PCR assay to detect human pathogenic viruses other than respiratory viruses. The detection limit of the assay was found to be 1 to 100 copies of the viral genome per reaction mixture.

We have evaluated the viral clearance capacity of NIID-MDCK cells.

One of the major concerns in isolating vaccine pre-seed viruses in NIID-MDCK cells is the contamination of adventitious agent that might be derived from clinical specimens. To evaluate the viral clearance capacity of NIID-MDCK cells against several respiratory viruses, which are likely to be co-infected with influenza virus, we have established a multiplex real-time RT-PCR assay. In result, viral genomes of RSVA, hMPVA, HRVA, HCoV-OC43, HAdV4, HSV1 and EV-D68 except for PIV3 were not detected after several passages in NIID-MDCK cells. These results suggested that NIID-MDCK cells are less susceptible to many respiratory viruses other than PIV3 and have filtration function against these viruses. (浜本いつき)

We have determined the amount of HA antigen of cell cultured vaccines, which were developed in this study, by Single Radial Immunodiffusion (SRD) test using the reagents. The reagents for SRD test (reference antigen and sheep antiserum) were prepared using cell

culture-derived A/H1N1pdm09 virus, and it was confirmed that these reagents were useful to measure the HA antigen amount of cell cultured vaccine. We also tried to develop the production system of reference antisera which can efficiently and accurately measure the amount of HA antigen in cell cultured vaccines. (高橋仁)

We have optimized the experimental conditions for assessing the immunogenicity of influenza vaccines. By using this experimental conditions, the immunogenicity of several egg-grown influenza vaccines was evaluated as controls for cell-based influenza vaccines. (高橋宜聖)

II. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 2件、国際誌 1件)

1. WADA Y, NITHICHANON A, NOBUSAWA E, MOUISE L, MARTIN WD, TERAHARA T, HAGIWARA H, TAKEYAMA H, DE GROOT AS, ATO M, TAKAHASHI Y. A humanized mouse model identifies key amino acids in H7 hemagglutinin that lower the immunogenicity of H7N9 influenza vaccines. Scientific Rep. in press
2. 高橋宜聖 インフルエンザウイルスの免疫回避術と B 細胞免疫の適応戦略 感染炎症免疫 2016, 46, 2-9.
3. 高橋宜聖 感染免疫における胚中心依存的な B 細胞記憶応答 臨床免疫・アレルギー科 2016, 66, 283-288.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Development and characterizations of cell culture candidate vaccine viruses for production of cell culture-based seasonal influenza vaccines: Feasibility studies in Japan., ポスター, Hitoshi Takahashi, Itsuki Hamamoto, Takao Fujimoto, Fumiaki Horikoshi, Susumu Ochiai, Yasuyuki Gomi, Kengo Uemura, Tetsuro Tanabe, Takeshi Naruse, Kenji Minari, Takato Odagiri, Eri Nobusawa., Options IX for the Control of Influenza., 2016/8/26, 国外.
2. 細胞培養インフルエンザワクチンの HA 抗原量測定法の確立, 口頭, 高橋仁, 藤本貴男, 堀越史朗, 落合晋, 五味康行, 浜本いつき, 小田切孝人, 信澤枝里, 第 30 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム, 2016/6/23, 国内.
3. Different accessibility of strain-specific versus cross-reactive BCRs to virus particles regulates site-specific germinal center selection. 口頭 Yu Adachi, Manabu Ato, Yoshimasa Takahashi 第 45 回日本免疫学会総会 2016/12/7, 国内.
4. Follicular helper NKT cells induce protective effect of a protein-based pneumococcal vaccine through stimulation of IgG production by B cells. 口頭 Makiko Nakahara, Shogo Takatsuka, Keigo Ueno, Taishi Onodera, Yoshimasa Takahashi, Kazuyoshi Kawakami, Masato Kubo, Yuki Kinjo 第 45 回日本免疫学会総会 2016/12/7, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当無し

(4) 特許出願
該当無し

平成28年度医療研究開発推進事業費補助金

(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業) 成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases

補助事業課題名： (日本語) 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
(英語) Study on the development in the seed virus production methods of cell cultured vaccines against pandemic and seasonal influenza, and the development in the evaluation methods of safety, efficacy and quality of these vaccines.

補助事業担当者 (日本語) 信澤 枝里
所属 役職 氏名： (英語) Eri Nobusawa

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究課題名： (日本語) 細胞培養インフルエンザワクチンの免疫原性と中和抗体誘導能の解析
(英語) Immunogenicity and virus-neutralizing antibody responses of cell-based influenza vaccines

補助事業分担者 (日本語) 高橋 宜聖
所属 役職 氏名： (英語) Yoshimasa Takahashi

II. 成果の概要（総括研究報告）

補助事業代表者：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・信澤枝里 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 3件、国際誌 2件）

- 1) WADA Y, NITHICHANON A, NOBUSAWA E, MOUISE L, MARTIN WD, TERAHARA T, HAGIWARA H, TAKEYAMA H, DE GROOT AS, ATO M, TAKAHASHI Y. A humanized mouse model identifies key amino acids in H7 hemagglutinin that lower the immunogenicity of H7N9 influenza vaccines. Scientific Rep. in press
- 2) 高橋宜聖 インフルエンザウイルスの免疫回避術と B 細胞免疫の適応戦略 感染炎症免疫 2016, 46, 2-9.
- 3) 高橋宜聖 感染免疫における胚中心依存的な B 細胞記憶応答 臨床免疫・アレルギー科 2016, 66, 283-288.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Different accessibility of strain-specific versus cross-reactive BCRs to virus particles regulates site-specific germinal center selection. 口頭 Yu Adachi, Manabu Ato, Yoshimasa Takahashi 第45回日本免疫学会総会 2016/12/7, 国内.
2. Follicular helper NKT cells induce protective effect of a protein-based pneumococcal vaccine through stimulation of IgG production by B cells. 口頭 Makiko Nakahara, Shogo Takatsuka, Keigo Ueno, Taishi Onodera, Yoshimasa Takahashi, Kazuyoshi Kawakami, Masato Kubo, Yuki Kinjo 第45回日本免疫学会総会 2016/12/7, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願