



変異が入ることなく季節性インフルエンザウイルスを 効率よく分離培養できる培養細胞株の開発に成功 — 細胞培養ワクチンへの応用 —

1. 発表者：

河岡 義裕（東京大学医科学研究所 感染・免疫部門ウイルス感染分野 教授）

2. 発表のポイント：

- ◆インフルエンザウイルスの分離に広く利用されている MDCK 細胞（注 1）を用いて季節性インフルエンザウイルス（注 2）を分離培養すると、変異が入り、その性状が変化するという問題があった。
- ◆変異が入ることなく季節性インフルエンザウイルスを効率よく分離培養できる培養細胞株 hCK の開発に成功した。
- ◆hCK 細胞で分離培養した季節性インフルエンザウイルスを分析することで、ヒトの間で流行しているウイルスの性状変化を高い精度で監視することが可能になる。さらに、同細胞をワクチン製造に利用することで、培養細胞ワクチンを効率よく生産することが可能になる。

3. 発表概要：

東京大学医科学研究所ウイルス感染分野の河岡教授らは、変異が入ることなく季節性インフルエンザウイルスを効率よく分離培養できる培養細胞株の開発に成功しました。

季節性ウイルスは性状が頻繁に変わります。性状解析には臨床検体からのウイルス分離が不可欠ですが、インフルエンザウイルスの分離に広く利用されている MDCK 細胞を用いて季節性ウイルスを分離培養すると、変異が入り性状が変化してしまうという問題がありました。

本研究グループは、MDCK 細胞の遺伝子を改変することで、変異が入ることなく季節性ウイルスを効率よく分離培養できる培養細胞株 hCK を開発しました。季節性ウイルスの一つである A/H3N2 流行株の hCK 細胞における分離と増殖効率は、MDCK と AX4（注 3）細胞に比べて顕著に高いことがわかりました。hCK 細胞で分離した A/H3N2 流行株の遺伝子には変異がほぼ認められなかったのに対し、MDCK と AX4 細胞で分離した流行株には高い頻度で変異が見つかりました。さらに、A/H3N2 流行株を hCK 細胞で長期間継代しても変異が入らないこともわかりました。

本研究の成果によって、ヒトの間で流行している季節性インフルエンザウイルスの性状変化をより高い精度で監視することが可能になります。さらに、hCK 細胞をワクチン製造に利用することで、従来の鶏卵ワクチンに比べ高い有効性が期待できる培養細胞ワクチン（注 4）をより迅速に製造供給することが可能になります。

本研究成果は、2019 年 4 月 29 日（米国東部夏時間 午前 11 時）、英国科学雑誌「Nature Microbiology」のオンライン速報版で公開されました。



なお本研究は、東京大学、横浜市衛生研究所、米国ウィスコンシン大学が共同で行ったものです。本研究成果は、日本医療研究開発機構（AMED）（平成 27 年度以降）革新的先端研究

開発支援事業「インフルエンザ制圧を目指した革新的治療・予防法の研究・開発」、文部科学省新学術領域研究などの一環として得られました。

4. 発表内容：



① 研究の背景・先行研究における問題点

冬季にヒトの間で流行する季節性インフルエンザウイルスは、その性状が頻繁に変わります。中でも季節性 A/H3N2 ウイルスは、A/H1N1pdm や B 型ウイルスに比べて抗原性が変化しやすいため流行頻度が高く、時に大規模な流行を引き起こすことがあります。また、A/H3N2 ウイルス感染は、入院やインフルエンザに関連した死亡の原因となることがあります。世界各国のサーベイランス機関は、毎冬流行する季節性ウイルスの抗原性状や抗インフルエンザ薬に対する感受性を把握し、その性状変化を監視するために、毎年膨大な数のウイルス株を分析しています。

季節性ウイルス流行株の性状解析には、臨床検体からのウイルス分離が不可欠です。インフルエンザウイルスの分離培養にはイヌの腎臓由来である MDCK 細胞が広く使用されていますが、最近の季節性 A/H3N2 ウイルスは MDCK 細胞ではよく増えないこと、さらに、同細胞で A/H3N2 ウイルスを分離培養すると、ウイルスの主要抗原であるヘマグルチニン (HA、) や抗インフルエンザ薬の標的タンパク質であるノイラミニダーゼ (NA、) に変異が生じることが明らかにされています。したがって、このような MDCK 細胞への馴化に関わる変異をもったウイルスでは、正確に性状を分析することはできません。そのため、変異が入ることなく季節性ウイルス流行株を効率よく分離培養できる培養細胞株の開発が望まれています。

② 研究内容

インフルエンザウイルスは、宿主細胞表面上のウイルス受容体 (レセプター) に結合することで感染を開始します。ヒトの季節性インフルエンザウイルスはヒト型レセプターに、鳥のインフルエンザウイルスは鳥型レセプターにそれぞれ結合します。MDCK 細胞はヒト型レセプターと鳥型レセプターの両方を発現しています。しかし、季節性ウイルスが感染増殖するヒト上気道では、ヒト型レセプターが主に発現していることがわかっています。そこで本研究グループは MDCK 細胞における季節性ウイルスの増殖性を向上させるため、MDCK 細胞の鳥型レセプター関連遺伝子に変異を導入し、さらにヒト型レセプター関連遺伝子を発現するプラスミド (注 5) を導入したヒト化 MDCK (hCK) 細胞を作成しました。

はじめに、このヒト上気道のレセプター発現パターンを模範した hCK 細胞におけるレセプター発現量を解析しました。その結果、hCK 細胞は鳥型レセプターの発現量は元の MDCK 細胞よりも顕著に低いですが、ヒト型レセプターの発現量は高いことがわかりました ()。次に、hCK 細胞の季節性ウイルス (A/H1N1pdm、A/H3N2、B 型) 感染に対する感受性を MDCK 並びに AX4 細胞と比較しました。hCK 細胞における A/H1N1pdm と B 型流行株の分離と増殖効率は、MDCK 及び AX4 細胞とほぼ同程度でした。しかし、A/H3N2 流行株の分離と増殖効率は、MDCK と AX4 細胞に比べて顕著に高いことがわかりました。hCK 細胞で分離した A/H3N2 流行株の HA と NA 遺伝子には、変異がほぼ認められなかったのに対し、MDCK あるいは AX4 細胞で分離した流行株には高い頻度で変異が見つかりました ()。また、A/H3N2 流行株を hCK 細胞で長期間継代しても変異が入らないこともわかりました。

③ 社会的意義・今後の予定 など

本研究で開発した hCK 細胞で分離培養した季節性ウイルスを用いることによって、その抗原性状や抗インフルエンザ薬に対する感受性を正確に分析することが可能になります。すなわち、ヒトの間で流行しているウイルスの性状変化をより高い精度で監視することが可能になります。この成果は、季節性インフルエンザの流行拡大阻止や発症・重症化予防に貢献すると期待されます。

本研究グループは、臨床検体からの季節性ウイルス分離用細胞として、国立感染症研究所に hCK 細胞を分与しました。本活動は、我が国のインフルエンザ対策の根幹をなすウイルス株サーベイランスに大きく貢献することが期待されます。

国内のワクチン製造会社は、培養細胞ワクチンの実用化に向けて準備を進めていますが、現状では MDCK 細胞におけるウイルスの増殖能の低さが原因で十分な供給量を確保できず苦慮しています。今回開発した hCK 細胞を用いてワクチンを製造することで、十分な量の季節性インフルエンザワクチンを、より安価に供給することが可能になると期待されます。

5. 発表雑誌：

雑誌名：「*Nature Microbiology*」 4月29日オンライン版

論文タイトル：A humanized MDCK cell line for the efficient isolation and propagation of human influenza viruses

著者：河岡義裕

DOI 番号：10.1038/s41564-019-0433-6

6. 用語解説：

(注1) MDCK 細胞

イヌ腎臓上皮細胞株 Madin-Darby canine kidney cell の略称。

(注2) 季節性インフルエンザウイルス

2009年に出現したブタ由来ウイルス (A/H1N1pdm) の大流行に伴い、それまで流行していたソ連型ウイルス (A/H1N1) が消滅した。2019年4月現在、A/H1N1pdm、香港型 A/H3N2、B型の3種類が季節性ウイルスとして流行している。

(注3) AX4 細胞

本研究グループが以前開発したヒト型レセプター関連遺伝子を発現するプラスミドを導入した MDCK 細胞。AX4 細胞はヒト型レセプターの発現量は MDCK 細胞よりも高いものの、鳥型レセプターは MDCK 細胞と同程度に発現している。

(注4) 細胞培養ワクチン

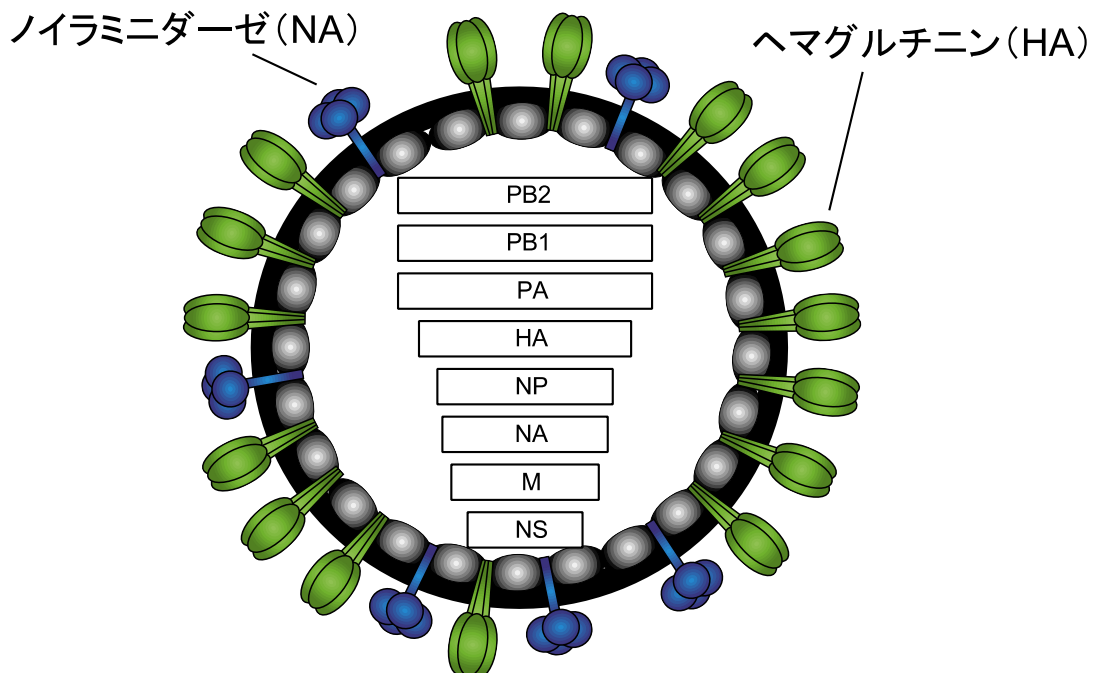
季節性インフルエンザワクチンは発育鶏卵で増やしたウイルスから製造されているが、鶏卵で季節性ウイルスを増やすと HA に変異が入り、その抗原性が大きく変化してしまう。ワクチン製造を培養細胞で行うことにより、卵馴化による抗原変異のリスクを軽減させることは可能であるが、季節性ウイルスは培養細胞での増殖能が低いことから、細胞培養ワクチンの生産性の低さが大きな問題となっている。

(注5) プラスミド

細菌や酵母がもつ染色体 DNA とは異なる独立した環状の DNA 分子。目的遺伝子の DNA 断片を組み込んだプラスミドを培養細胞に導入すると、目的遺伝子が細胞内で強制的に発現される。

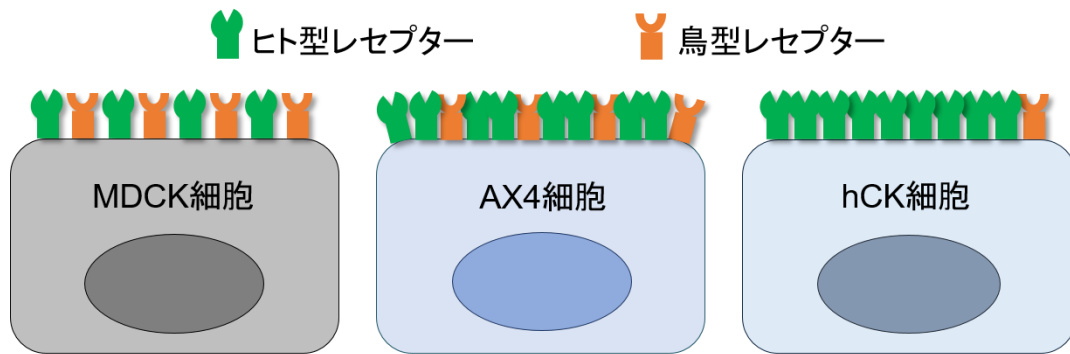
7. 添付資料：

図1 インフルエンザウイルスの模式図



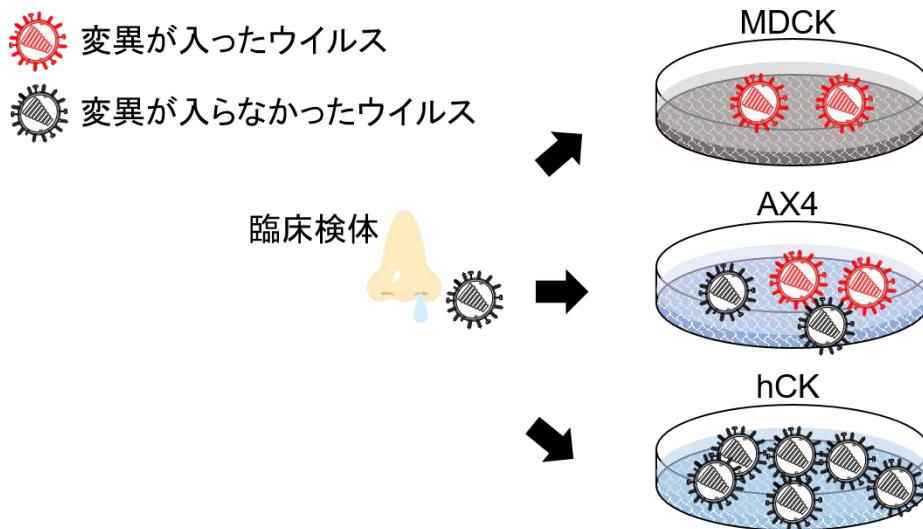
インフルエンザウイルスは8本の遺伝子を持ち、ウイルスの主要抗原であるヘマグルチニン(HA)と抗インフルエンザ薬の標的タンパク質であるノイラミニダーゼ(NA)に覆われている。

図2 hCK細胞のウイルスレセプター発現



ヒトの季節性インフルエンザウイルスはヒト型レセプターに結合し、鳥のインフルエンザウイルスは鳥型レセプターに結合する。MDCK細胞はヒト型レセプターと鳥型レセプターの両方を発現している。AX4細胞はヒト型レセプターがMDCK細胞よりも多く発現しているものの、鳥型レセプターはMDCK細胞と同程度に発現している。hCK細胞は鳥型レセプターの発現量はMDCK細胞よりも顕著に低いが、ヒト型レセプターは多く発現している。

図3 臨床検体からhCK細胞を用いて分離培養した季節性インフルエンザウイルスの性状



hCK細胞における季節性A/H3N2ウイルスの分離と増殖効率は、MDCKとAX4細胞に比べて顕著に高った。hCK細胞で分離した季節性A/H3N2ウイルスのHAとNA遺伝子には、変異がほぼ認められなかったのに対し、MDCKあるいはAX4細胞で分離したウイルスには高い頻度で変異が見つかった。