

Viol. 84(2): 336-44 (2012)

Asanuma, H., Zamri, N. B., Sekine, S., Fukuyama, Y., Tokuhara, D., Gilbert, R. S., Fukuiwa, T., Sata, T., Tashiro, M., Fujihashi, K.

A novel combined adjuvant for nasal delivery elicits mucosal immunity to influenza in aging.

Vaccine 30: 803-812, 2012.

Ohnishi, K., Takahashi, Y., Kono, N., Nakajima, N., Mizukoshi, F., Misawa, S., Yamamoto, T., Mitsuki, Y. Fu, S., Hirayama, N., Ohshima, M., Ato, M., Kageyama, T., Odagiri, T., Tashiro, M., Kobayashi, K., Itamura, S., Tsunetsugu-Yokota, Y. Immunological detection of H5N1 influenza viruses by newly established monoclonal antibodies Jpn. J. Infect. Dis.: 65, 19-27, 2012

Members of the Western Pacific Region Global Influenza Surveillance and Response System (Cook, A. R., Barr, I., Hurt, E., Kelso, A., Reading, R., Ly, S., Seng, H., Buchy, p., Ung, S. A., Shu, Y., Xu, C., Xu, Z., Wang, D., Kama, M., Singh, P., Fujisaki, F., Odagiri, T., Tashiro, M., Archkhawongs, S., Khamphaphongphanh, B., Vongphrachanh, P., Kheong, C. C., Ismail, N., Burmaa, A., Darmaa B., Nymadawa, P., Grangeon, J.-P., Gourinat, A.-C., Huang, Q. S., Lopez, L. D., Juan M Lopez, J. M., Olveda, R. M., Roque, V., Jennings, L., Kang C., Lin, C., Lin, R., and Tee, W. S. N., Balish, A., Corwin, A., Kapella, B. K., Kitsutani, P., McFarland, J., Moen, A., Xu, X., Hoang, V.M.P., Long, N. L., Mai, L. Q., Hang, L. K. N., Nguyen, H. A., Nguyen, T. L., Nguyen, T. N., Asgari, N., Dawainavesi, A., Denehy, E. J., Dominguez, M. N., Jamsran, M., Kasai, T., Kool, J., Lewis, H., Luo, D., Olowokure, B., Partridge, J., Pavlin, B., Samaan, G., Singh, H., Tsuyuoka, R., Vakacegu

A., Zhang, Z.) Epidemiological and virological characteristics of influenza in the Western Pacific Region of the World Health Organization, 2006-2010. PLoS One. 2012;7(5):e37568.

都築智之, 岩瀬弘明, 島田昌明, 平嶋昇, 日比野祐介, 龍華庸光, 齋藤雅之, 玉置大, 神谷麻子, 横井美咲, 横幕能行, 藤崎誠一郎, 杉浦互, 後藤秀実 当院における HIV, HCV 重複感染症例に対するペグインターフェロン, リバビリン併用療法の治療成績 日本消化器病学会雑誌 109: 1186 -1196, 2012

細胞培養ワクチン開発に関する研究

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 (in press, 2013)

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
- Tomoko Date, Takanobu Kato, Junko Kato, Hitoshi Takahashi, Kenichi Morikawa, Daisuke Akazawa, Asako Murayama, Keiko Tanaka-Kaneko, Tetsutaro Satae, Yasuhito Tanaka, Masashi Mizokami, Takaji Wakita.
Novel cell culture-adapted genotype 2a hepatitis C virus infectious clone.
J Virol, 86(19):10805-20, 2012
- Ruth Harvey, Michelle Hamill, James S. Robertson, Philip D. Minor, Galina M. Vodeiko, Jerry P. Weir, Hitoshi Takahashi, Yuichi Harada, Shigeyuki Itamura, Pearl Bamford, Tania Dalla Pozza, Othmer G. Engelhard. Application of deglycosylation to SDS PAGE analysis improves calibration of influenza antigen standards.
Biologicals, 40(1):96-99, 2012
- Shirakura M, Kawaguchi A, Tashiro M, and Nobusawa E. Composition of hemagglutinin and neuraminidase affects the antigen yield of influenza A(H1N1)pdm09 candidate vaccine viruses. *JJID.* 66(2013) pp.65-68.
- Uchida Y, Suzuki Y, Shirakura M, Kawaguchi A, Nobusawa E, Tanikawa T, Hikono H, Takemae N, Mase M, Kanehira K, Hayashi T, Tagawa Y, Tashiro M, Saito T. Genetics and infectivity of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses isolated from chickens and wild birds in Japan during 2010-11. *Virus Res.* 170: 109-117, 2012.
- E. Nobusawa, K. Omagari, S. Nakajima, K. Nakajima. Reactivity of human convalescent sera with influenza virus HA protein mutants at antigenic site A. *Microbiology and Immunology.* 56 (2012. 99-106, 2012.
- Fouchier, R. A. M., Garcia-Sastre, A., Kawaoka, Y., Barclay, W. S., Bouvier, N. M., Brown, I. H., Capua, I., Chen, H., Compans, R. W., Couch, R. B., Cox. N. J., Doherty,, P. C., Donis, R. O., Feldmann, H., Guan, Y., Katz, J., Klenk, H.-D., Kobinger, G., Liu, J., Liu, X., Lowen, A., Mittenleiter, T. C., Osterhaus, A. D. M. E., Palese, P., Peiris, J. S. M., Perez, D. R., Richit, J. A., Schultz-Cherry, S., Steel, J. Subbarao, K., Swayne, D. E., Takimono, T., Tashiro, M., Taubenberger, J. K., Thomas, P. G., Tripp, R. A., Tumpey, T. M., Webby, R. J., Webster, R. G.
Pause on avian flu transmission research. *Science.* 335: 400-1, 2012.
- Fouchier, R. A. M., Garcia-Sastre, A., Kawaoka, Y., Barclay, W. S., Bouvier, N. M., Brown, I. H., Capua, I., Chen, H., Compans, R. W., Couch, R. B., Cox. N. J., Doherty,, P. C., Donis, R. O., Feldmann, H., Guan, Y., Katz, J., Klenk, H.-D., Kobinger, G., Liu, J., Liu, X., Lowen, A., Mittenleiter, T. C., Osterhaus, A. D. M. E., Palese, P., Peiris, J. S. M., Perez, D. R., Richit, J. A., Schultz-Cherry, S., Steel, J. Subbarao, K., Swayne, D. E., Takimono, T., Tashiro, M., Taubenberger, J. K., Thomas, P. G., Tripp, R. A.,

Tumpey, T. M., Webby, R. J., Webster, R. G. Pause on avian flu transmission studies *Nature* 481: 443, 2012. doi:10.1038/481443a (2012)

Fouchier, R. A. M., Garcia-Sastre, A., Kawaoka, Y., Barclay, W. S., Bouvier, N. M., Brown, I. H., Capua, I., Chen, H., Compans, R. W., Couch, R. B., Cox, N. J., Doherty, P. C., Donis, R. O., Feldmann, H., Guan, Y., Katz, J., O. Kiselev, Klenk, H.-D., Kobinger, G., Liu, J., Liu, X., Lowen, A., Mittenleiter, T. C., Osterhaus, A. D. M. E., Palese, P., Peiris, J. S. M., Perez, D. R., Richit, J. A., Schultz-Cherry, S., Steel, J. Subbarao, K., Swayne, D. E., Takimono, T., Tashiro, M., Taubenberger, J. K., Thomas, P. G., Tripp, R. A., Tumpey, T. M., Webby, R. J., Webster, R. G. H5N1 virus: Transmission studies resume for avian flu. *Nature* 493: 460, 2013. doi:10.1038/nature11858 (2013)

Ato, M., Takahashi, Y., Fujii, H., Hashimoto, S., Kaji, T., Yamamoto, K., Itamura, S., Horiuchi, Y., Arakawa, Y., Tashiro, M., Takemori, T. Influenza A whole virion vaccine induces a rapid reduction of peripheral blood leukocytes via interferon- α -dependent apoptosis. *Vaccine* (2013 in press)

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*, in press

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

学会発表

サーベイランスに関する研究

・ T. Odagiri Influenza activity in the northern

hemisphere. Sixth Meeting of National Influenza Centres in the Western Pacific and South-East Asia Regions. Hanoi, Viet Nam May 2012

・ Emi Takashita, Miho Ejima, Seiichiro Fujisaki, Noriko Kishida, Hong Xu, Masaki Imai, Namhee Kim, Aya Sato, Hiromi Sugawara, Reiko Itoh, Teruko Doi, Masato Tashiro, Takato Odagiri Detection of antiviral-resistant influenza A(HN)pdm09 viruses in Japan by a combination of chemiluminescent and fluorescent neuraminidase inhibitor susceptibility assays. 3rd International Influenza Meeting, Muenster, Germany, 2012.

・ 藤崎誠一郎、今井正樹、高下恵美、谷脇妙、徐紅、岸田典子、横山勝、佐藤裕徳、江島美穂、金南希、佐藤彩、土井輝子、伊東玲子、菅原裕美、田代真人、小田切孝人「新しい薬剤耐性変異を持つ B 型インフルエンザウイルスの性状」第 60 回日本ウイルス学会 大阪、2012 年 11 月

・ 高下恵美、江島美穂、藤崎誠一郎、岸田典子、徐紅、今井正樹、金南希、佐藤彩、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、田代真人、小田切孝人、全国地方衛生研究所 「3 シーズンにわたる日本国内の抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス」 第 60 回日本ウイルス学会 大阪、2012 年 11 月

・ 岸田典子、徐紅、今井正樹、藤崎誠一郎、高下恵美、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、金南希、佐藤彩、江島美穂、小口晃央、山崎秀司、藤田信之、田代真人、小田切孝人、全国地方衛生研究所 「2011/12 シーズンのインフルエンザ流行株と平成 24 年度のワクチン株」第 60 回日本ウイルス学会 大阪、2012 年 11 月

・ 川上千春、高下恵美、七種美和子、宇宿秀三、小田切孝人、田代真人 「免疫抑制患者において薬剤投与後長期間排泄された

A(H3N2)インフルエンザウイルスの解析」第 60 回日本ウイルス学会 大阪、2012 年 11 月
・小田切孝人、岸田典子、徐紅、藤崎誠一郎、今井正樹、高下恵美、田代真人「孵化鶏卵分離、馴化に伴うインフルエンザワクチン株の抗原性変異と問題点」第 16 回日本ワクチン学会 横浜、2012 年 11 月

・鈴木忠樹、川口晶、相内章、田村慎一、伊藤良、小田切孝人、田代真人、長谷川秀樹「インフルエンザワクチン経鼻接種により鼻腔内に誘導される分泌型 IgA 抗体の性状解析」第 16 回日本ワクチン学会 横浜、2012 年 11 月

・小田切孝人、岸田典子、徐紅、今井正樹、藤崎誠一郎、高下恵美、田代真人 インフルエンザワクチン株の卵馴化による 2012/13 シーズンワクチンの効果におよぼす影響およびブタ由来 A/H3N2 variant(v)ウイルスに対する邦人の抗体保有状況 Second Negative Strand Virus-Japan Symposium 沖縄、2013 年 1 月

細胞培養ワクチン開発に関する研究

・ 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 真人、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 真人、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、田代真人 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

・ Kayoko Sato, Hideki Asanuma, Michiyo Kataoka, Hitoshi Takahashi, Kiyohiko Matsui, Noriyo Nagata, Masato Tashiro, Shigeyuki Itamura Characterization of A/H1N1pdm09 viruses isolated in egg from clinical specimens. 6th Orthomyxovirus Research Conference, Bromont-Canada, September 2012

・信澤枝里、中内美名、松寄葉子、菅原勘悦、有田知子、廣津伸夫、田代真人、西村秀一：A/H1N1pdm09 ワクチン被接種者血清抗体が認識する HA 上の抗原領域の解析。第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月

・松寄葉子、菅原勘悦、下平義隆、本郷誠治、信澤枝里：パンデミックインフルエンザ A/H1N1pdm09 の HA 分子の抗原構造の解析。第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月

・嶋崎典子、白倉雅之、信澤枝里、矢野茂生、板村繁之、田代真人：インフルエンザワクチン製造株のアミノ酸変異による抗原蛋白経時安定性への影響。第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月

・川口晶、鈴木忠樹、相内章、佐藤由子、信澤枝里、田代真人、長谷川秀樹：喘息発作誘

発モデルを用いたインフルエンザウイルス感染症の病態解析。第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月

・有田知子、白倉雅之、信澤枝里、田代真人：
H5N1 インフルエンザワクチン種株候補の抗原収量の検討。第 16 回日本ワクチン学会学術集会、横浜、2012 年 11 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

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

無し

3. その他

無し

国内外のインフルエンザ流行株の性状解析に基づいた流行予測およびワクチン株の選定

研究分担者 小田切孝人 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1室長

研究協力者 岸田典子、徐行、藤崎誠一郎、高下恵美、今井正樹、伊東玲子、
土井輝子、菅原裕美、金南希、佐藤彩、江島美穂（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1室）

研究要旨 インフルエンザウイルス流行株を国内および海外（中国、台湾、韓国、ラオス、モンゴル、ミャンマー）から収集し、それらの抗原性解析および遺伝子解析を行い、2011/12 シーズンおよび 2012/13 シーズンワクチンと流行株との抗原性のマッチングを評価した。また、その評価をもとに、次シーズンの流行株の予測とワクチン株の変更の必要性の検討と適切なワクチン候補株の検索を行った。これらの成績は WHO ワクチン株（北半球向けおよび南半球向け）選定会議および国内ワクチン株選定会議に提出され、ワクチン株選定の基礎資料として活用された。

A. 研究目的

インフルエンザウイルスは頻繁に遺伝子変異し、それによってもって抗原性が変化するため、ワクチン株は毎年見直す必要がある。本研究では、国内外から流行株を可能な限り収集して、それらの抗原性解析および遺伝子の進化系統樹解析、さらには抗インフルエンザ薬に対する感受性試験を行い、それらの情報にもとづいて、次シーズンの流行予測および適切なワクチン株の選定を行うことを目的とする。

B. 研究方法

2011/12 シーズンに国内および海外（中国、台湾、韓国、ラオス、モンゴル、ミャンマー）から収集した A(H1N1)pdm09 は 29 株、A(H3N2) は 401 株、B は 404 株、2012/13 シーズン前半

（2013 年 1 月）までに収集した A(H1N1)pdm09 は 21 株、A(H3N2) は 143 株、B は 48 株である。これらについて、赤血球凝集抑制（HI）試験による抗原性解析、および遺伝子の進化系統樹解析を行った。

C. 研究結果

2011/12 シーズンの流行株の解析（別添資料参照）：このシーズンは A(H1N1)pdm09 の流行が無く、ウイルスは散发例からのみ検出された。海外でも流行規模が小さい国が殆どであった。分離株の大半がワクチン株 A/California/7/2009 類似株であり、変異株は国内外ともに散発的にしか検出されなかった。それら変異株は赤血球凝集素（HA）蛋白の 152-158 番目のアミノ酸領域に置換を持っていた。当該シーズンの A(H3N2) 亜型ワクチン

ン株は、A/Victoria/210/2009 であるが、分離株の 34～44%はワクチン株から抗原性が変化した変異株であった。一方、調べた流行株の 100%はこのシーズンの代表株

A/Victoria/361/2011 類似株であり、このことから流行株の抗原性は

A/Victoria/210/2009 から

A/Victoria/361/2011 類似株に変化していることが示された。B 型ウイルスは Victoria 系統株と山形系統が 2:1 の比率で流行し、

Victoria 系統の流行株の 99%はワクチン株

B/Brisbane/60/2008 類似株であった。一方、山形系統の流行株は、代表株

B/Wisconsin/1/2010 類似株が大半を占めた。

2012/13 シーズンの流行株の解析 (別添資料参照):

このシーズン前半までの解析結果から、2012/13 シーズンは、A (H1N1) pdm09 亜型の流行は国内外ともに認められ、欧州、中国では流行の主流を占めた。一方、米国や日本など多くの国では A (H3N2) が流行の主流で、地域、国ごとに A 型インフルエンザの流行パターンは異なっていた。さらに、B 型の流行も同様で、欧米諸国では山形系統の流行が主流であったが、豪州では Victoria 系統の流行が主流で、日本は、両系統が同等の比率で混合流行していた。流行株の抗原性解析の結果、A (H1N1) pdm09、A (H3N2) および B 型ウイルスとも 2012/13 シーズンのワクチン株

A/California/07/2009、A/Victoria/361/2011、B/Wisconsin/1/2010 (山形系統) 類似株が殆どで、流行株とワクチン株の抗原性はよく一致していた。

D. 考察

2011/12 シーズンから 2012/13 シーズンにかけて、A (H1N1) pdm09 亜型の流行株は、殆ど変化が無くワクチン類似株が大半を占めたため、A/California/07/2009 ワクチン株は当面変更

の必要はないと判断された。一方、A (H3N2) 亜型は、A/Victoria/210/2009 から A/Victoria/361/2011 類似株に変化したので、ワクチン株の変更が必要であった。B 型は、Victoria 系統と山形系統が国内外で混合流行し、いずれの系統が優勢になるのか流行予測は難しかったが、3 シーズン流行が無かった山形系統が増加傾向にあったことと、国民の抗体保有調査で、山形系統に対する抗体レベルが低いことから、山形系統が流行の主流になった際は、健康被害が Victoria 系統の流行の場合より大きくなると予想されたことから、ワクチン株は、山形系統から代表株である B/Wisconsin/1/2010 が選定された。現時点での A 型および B 型の流行株とも、それぞれのワクチン株と抗原性が類似していることから、流行予測、ワクチン株選定は適切であった。

これらの成績は WHO ワクチン株 (北半球向けおよび南半球向け) 選定会議および国内ワクチン株選定会議に提出され、ワクチン株選定の基礎資料として活用された。

E. 結論

・2011/12 シーズンの流行株は、A (H1N1) pdm09 は流行が無かったことから評価できなかった。A (H3N2) ワクチンに対しては変異株が 34～44% 出現したことから、ワクチンと流行株との抗原性はあまり一致していなかった。一方、B 型は両方で抗原性がよく一致していた。

・2012/13 シーズン前半までの解析結果からは、当該シーズンのワクチン株と国内外の流行株の抗原性は、どの亜型、型ともピッタリ一致していた。

F. 研究発表

1. 論文発表

・Kishida N, Fujisaki S, Yokoyama M, Sato H, Saito R, Ikematsu H, Xu H, Takashita E, Tashiro M, Takao S, Yano T, Suga T, Kawakami C,

Yamamoto M, Kajiyama K, Saito H, Shimada S, Watanabe S, Aoki S, Taira K, Kon M, Lin JH, Odagiri T Evaluation of influenza virus A/H3N2 and B vaccines on the basis of cross-reactivity of postvaccination human serum antibodies against influenza viruses A/H3N2 and B isolated in MDCK cells and embryonated hen eggs. *Clin Vaccine Immunol.* 19(6):897-908 (2012)

• Seiichiro Fujisaki, Emi Takashita, Masaru Yokoyama, Tae Taniwaki, Hong Xu, Noriko Kishida, Hironori Sato, Masato Tashiro, Masaki Imai, Takato Odagiri. A single E105K mutation far from the active site of influenza B virus neuraminidase contributes to reduced susceptibility to multiple neuraminidase-inhibitor drugs *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 429: 51-56 (2012)

• Klimov AI, Garten R, Russell C, Barr IG, Besselaar TG, Daniels R, Engelhardt OG, Grohmann G, Itamura S, Kelso A, McCauley J, Odagiri T, Smith D, Tashiro M, Xu X, Webby R, Wang D, Ye Z, Yuelong S, Zhang W, Cox N; Writing Committee of the World Health Organization Consultation on Southern Hemisphere Influenza Vaccine Composition for 2012. WHO recommendations for the viruses to be used in the 2012 Southern Hemisphere Influenza Vaccine: Epidemiology, antigenic and genetic characteristics of influenza A(H1N1)pdm09, A(H3N2) and B influenza viruses collected from February to September 2011 *Vaccine.* 30(45):6461-71 (2012)

• Kazuo Ohnishi, Yoshimasa Takahashi, Naoko Kono, Noriko Nakajima, Fuminori Mizukoshi, Shuhei Misawa, Takuya Yamamoto, Yu-ya Mitsuki, Shu-ichi Fu, Nakami Hirayama, Masamichi Ohshima, Manabu Ato, Tsutomu Kageyama, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Kazuo Kobayashi, Shigeyuki Itamura, and Yasuko Tsunetsugu-Yokot. Newly Established Monoclonal Antibodies for Immunological Detection of H5N1 Influenza Virus.

Jpn.J.Infect.Dis. 65: 19-27 (2012)

• Sriwilajaroen N, Fukumoto S, Kumagai K, Hiramatsu H, Odagiri T, Tashiro M, Suzuki Y. Antiviral effects of *Psidium guajava* Linn. (guava) tea on the growth of clinical isolated H1N1 viruses: Its role in viral hemagglutination and neuraminidase inhibition. *Antiviral Res.* 94(2):139-46 (2012)

• 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.* 16;7(3): 552-62 (2012)

• Ainai A, Tamura S, Suzuki T, Ito R, Asanuma H, Tanimoto T, Gomi Y, Manabe S, Ishikawa T, Okuno Y, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Kurata T, Hasegawa H. Characterization of neutralizing antibodies in adults after intranasal vaccination with an inactivated influenza vaccine. *J Med Virol.* 84(2): 336-44 (2012)

2. 学会発表

• T. Odagiri Influenza activity in the northern hemisphere. Sixth Meeting of National Influenza Centres in the Western Pacific and South-East Asia Regions. Hanoi, Viet Nam May 2012

• 藤崎誠一郎、今井正樹、高下恵美、谷脇妙、徐紅、岸田典子、横山勝、佐藤裕徳、江島美穂、金南希、佐藤彩、土井輝子、伊東玲子、菅原裕美、田代真人、小田切孝人「新しい薬剤耐性変異を持つB型インフルエンザウイルスの性状」第60回日本ウイルス学会 大阪、2012年11月

• 高下恵美、江島美穂、藤崎誠一郎、岸田典子、徐紅、今井正樹、金南希、佐藤彩、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、田代真人、小田切孝人、全国地方衛生研究所「3シーズンにわたる日本国内の抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス」第60回日本ウイルス学会 大阪、2012年11月

・岸田典子、徐紅、今井正樹、藤崎誠一郎、高下恵美、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、金南希、佐藤彩、江島美穂、小口晃央、山崎秀司、藤田信之、田代真人、小田切孝人、全国地方衛生研究所

「2011/12シーズンのインフルエンザ流行株と平成24年度のワクチン株」第60回日本ウイルス学会 大阪、2012年11月

・川上千春、高下恵美、七種美和子、宇宿秀三、小田切孝人、田代真人 「免疫抑制患者において薬剤投与後長期間排泄された

A(H3N2)インフルエンザウイルスの解析」第60回日本ウイルス学会 大阪、2012年11月

・小田切孝人、岸田典子、徐紅、藤崎誠一郎、今井正樹、高下恵美、田代真人「孵化鶏卵分離、馴化に伴うインフルエンザワクチン株の抗原性変異と問題点」第16回日本ワクチン学会 横浜、2012年11月

・鈴木忠樹、川口晶、相内章、田村慎一、伊藤良、小田切孝人、田代真人、長谷川秀樹「インフルエンザワクチン経鼻接種により鼻腔内に誘導される分泌型IgA抗体の性状解析 第16回日本ワクチン学会 横浜、2012年11月

・小田切孝人、岸田典子、徐紅、今井正樹、藤崎誠一郎、高下恵美、田代真人 インフルエンザワクチン株の卵馴化による2012/13シーズンワクチンの効果におよぼす影響およびブタ由来A/H3N2 variant(v)ウイルスに対する邦人の抗体保有状況 Second Negative Strand Virus-Japan Symposium 沖縄、2013年1月

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

血清学的調査によるワクチンの交叉反応性の評価

研究分担者 岸田典子

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 主任研究官

研究要旨 2012/13 シーズンのワクチンについて A(H3N2) 亜型と B 型にワクチン株の変更があった。これらのワクチン効果を評価するため、2012/13 シーズン A(H3N2) ワクチン A/Victoria/361/2011 (IVR-165) と B 型山形系統ワクチン B/Wisconsin/1/2010 (BX-41A) で誘導されたヒト血清抗体と野外流行株 A/Sapporo/125/2012 (H3N2)、A/Yamaguchi/30/2012 (H3N2)、B/Massachusetts/02/2012 (山形系統)、B/Hyogo/4002/2012 (山形系統) との交叉反応性を赤血球凝集抑制 (HI) 試験により調べた。その結果、A(H3N2) の 2 株に対してはいずれも低い幾何平均値を示し、ワクチンで誘導された抗体と A(H3N2) 流行株との交叉反応性は低いことが示された。B 型については、B/Massachusetts/02/2012、B/Hyogo/4002/2012 いずれの山形系統株に対しても 40HI 以上の抗体を有するヒトの割合が 70% 前後であることがわかった。すなわち B 型山形系統ワクチンで誘導された HI 抗体は B 型山形系統の流行株に対して高い交叉反応性を示した。以上のことから、2012/13 シーズンの A(H3N2) ワクチンは効果の減弱が懸念されたが、B 型山形系統ワクチンについては山形系統の流行株に対して効果が期待できた。

A. 研究目的

ワクチン接種者の血清と実際の流行株との反応性を調べることにより、ワクチンの交叉反応性を評価し、次年度のワクチン選定に有用な情報提供を行う。

A/Yamaguchi/30/2012 (H3N2)、B/Massachusetts/02/2012 (山形系統)、B/Hyogo/4002/2012 (山形系統) との反応性を赤血球凝集抑制 (HI) 試験により調べた。HI 抗体価からそれぞれ幾何平均値 (GMT) を求めて比較した。

B. 研究方法

2012/13 シーズンワクチン接種前後のペア血清 (60 歳以下の成人層 : 24 人、61 歳以上の老人層 : 24 人) と 2012/13 シーズン流行株 A/Sapporo/125/2012 (H3N2)、

(倫理面への配慮)

ワクチン接種前後のヒト血清検体の採取にあたっては、インフォームドコンセントを取り、倫理委員会の了承を得た。

C. 研究結果

A(H3N2) : A/Sapporo/125/2012(H3N2)と A/Yamaguchi/30/2012 (H3N2)いずれに対しても、ワクチンの有効性と相関する値である40HIGMTをしたまわり、交叉反応性は低いと判定された。

B : B/Massachusetts/02/2012と

B/Hyogo/4002/2012に対して、40HI以上の抗体を有するヒトの割合が70%前後であることがわかった。すなわちB型ワクチンで誘導されたHI抗体は流行株に対して高い交叉反応性を示すことがわかった。

D. 考察

2012/13 シーズンの A(H3N2) ワクチン製造株である A/Victoria/361/2011 (H3N2) (IVR-165) で誘導された抗体は、2012/13 シーズンの流行株には交叉反応性が低いことがわかった。2012/13 シーズンの流行株は A/Victoria/361/2011 に類似した抗原性をもつ株が主流であるので、交叉反応性の低下はワクチンを製造する過程の卵馴化により、IVR-165 株の抗原性が変化してしまったことに起因すると考えられる。2012/13 シーズン B 型山形系統ワクチン製造株 B/Wisconsin/1/2011 (BX-41A) についても同様に製造過程で卵馴化されているが、それにより誘導された抗体は野外株と交叉反応性を示すことから、卵馴化による影響は少ないと考えられる。

E. 結論

2012/13 シーズンの A(H3N2) ワクチンは効果の減弱が懸念された。B 型山形系統ワクチンは山形系統の流行株に対して効果が期待できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Noriko Kishida, Seiichiro Fujisaki, Masaru Yokoyama, Hironori Sato, Reiko Saito, Hideyuki Ikematsu, Hong Xu, Emi Takashita, Masato Tashiro, Shinichi Takao, Takuya Yano, Tomoko Suga, Chiharu Kawakami, Miwako Yamamoto, Keiko Kajiyama, Hiroyuki Saito, Shin'ichi Shimada, Sumi Watanabe, Satomi Aoki, Katsuya Taira, Miyako Kon, Jih-Hui Lin, and Takato Odagiri

Evaluation of Influenza Virus A/H3N2 and B Vaccines on the Basis of Cross-Reactivity of Postvaccination Human Serum Antibodies against Influenza Viruses A/H3N2 and B Isolated in MDCK Cells and Embryonated Hen Eggs. Clin Vaccine Immunol. 19(6):897-908 (2012)

2. 学会発表

岸田典子、徐紅、今井正樹、藤崎誠一郎、高下恵美、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、金南希、佐藤彩、江島美穂、小口晃央、山崎秀司、藤田信之、田代真人、小田切孝人、全国地方衛生研究所「2011/12 シーズンのインフルエンザ流行株と平成 24 年度のワクチン株」2012 年 11 月大阪、第 60 回日本ウイルス学会

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

新規機能的遺伝子解析法の構築と流行株遺伝子解析

研究分担者：藤崎誠一郎 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 第一室

研究協力者：高下恵美 国立感染症研究所 同上

今井正樹 国立感染症研究所 同上

研究要旨 2011/12, 2012/13 シーズンのインフルエンザ分離株について HA および NA 遺伝子解析を行った。NA 阻害薬感受性試験を実施したところ、昨年度に引き続き既知の薬剤耐性変異を有していないにもかかわらず、薬剤耐性を示す B 型インフルエンザウイルス分離株を検出した。NA 遺伝子解析の結果、他の流行株には見られない 139 番アミノ酸の置換 (P139S) を検出した。plaque-purification 法および、reverse genetics 法を用いて作製したウイルスに対し NA 阻害薬感受性試験を実施することにより、P139S が薬剤耐性アミノ酸置換であることを同定した。

A. 研究目的

遺伝子情報を利用した解析と共に抗原性試験、薬剤感受性試験を実施することで、特定のアミノ酸置換が抗原性や薬剤耐性に与える影響を解析し流行株の予測に活用する。

B. 研究方法

全国の地方衛生研究所にて分離されたインフルエンザウイルス株を無作為に選択し、HA および NA 遺伝子配列を決定した。決定した塩基配列と海外から報告された分離株の塩基配列を用いて遺伝子系統樹解析および、アミノ酸置換の解析を実施した。

NA 遺伝子解析では、薬剤耐性に関与し得るアミノ酸置換の有無を解析した。NA 阻害薬感受性試験結果とアミノ酸置換の解析から、薬剤耐性能を与えるアミノ酸置換の推定を行った。薬剤耐性が疑われる新規のアミノ酸置換を有する株については詳細な解析を行った。具体的には、plaque-purified virus お

よび、reverse genetics 法を用いた遺伝子組み換えウイルスを作製し、薬剤感受性試験を実施して薬剤耐性アミノ酸置換を同定した。また、コンピュータシミュレーションによる薬剤耐性アミノ酸置換の立体構造への影響を解析しており、現在、薬剤との結合強度への変化についても解析を進めている。

C. 研究結果

HA 遺伝子については 498 株、NA 遺伝子については 460 株の塩基配列を決定し、遺伝子解析を行った。

このうち、NA アミノ酸配列に既知の薬剤耐性アミノ酸置換が検出されないにも関わらず、NA 阻害薬感受性試験で薬剤耐性を示す株 (B/KOCHI/41/2011 株) が見つかった。この株は抗ウイルス薬が未投与の症例から分離されたが、分離株は現在国内で使用されている 4 つの薬剤 (オセルタミビル、ペラミビル、ラニナミビル、ザナミビル) 全てに対し感受

性の低下を示し、特にペラミビルに対し強い耐性を示した。この感受性低下の特徴は、昨年度に報告した A/KOCHI/61/2011 株と類似していた。

他の流行株とアミノ酸配列を比較したところ、NA の 139 番アミノ酸が P (プロリン) から S (セリン) へ変化していることが明らかとなった。A/KOCHI/61/2011 株が有していた薬剤耐性アミノ酸置換は E105K であったことから、異なるアミノ酸置換が薬剤耐性に関与する可能性が考えられた。そこで、このアミノ酸置換が薬剤耐性に関与していることを確認するため、plaque-purification 法および reverse genetics 法により P139S を有する純化ウイルスを作製し NA 阻害薬感受性試験を実施した。その結果、P139S がウイルスに薬剤耐性能を与えることが明らかとなった。またコンピューターを用いた解析により、E105K および P139S は NA の薬剤結合部位ではなく、NA が四量体構造を形成した際に NA 分子同士が隣接する部位に位置することが明らかになった。また、これらの変異を持つウイルスが臨床検体中にも存在しているかを確認するため、pyrosequence 法を用いて臨床検体中のウイルスについて遺伝子解析を実施したが、E105K, P139S のいずれも検出限度以下であった。

D. 考察

今までに報告されている NA 阻害薬耐性アミノ酸置換は全て NA の薬剤結合部位およびその近傍に集中している。しかし 105, 139 番アミノ酸は薬剤結合部位とは大きく離れており、NA 分子の隣接部位に位置していた。このことから、これらのアミノ酸置換が NA の四量体構造を不安定にさせ、その結果として薬剤耐性能を獲得させた可能性、また、アミノ酸置換が間接的に NA 活性部位の構造を変化させ薬剤耐性能を獲得させた可能性が

考えられる。また、臨床検体からは耐性アミノ酸置換を有するウイルスが検出されなかったことから、培養細胞を用いた分離過程で薬剤耐性ウイルスを増幅あるいは出現させた可能性がある。このことから、薬剤耐性ウイルスを検出した場合には臨床検体についても解析を実施すべきと考える。

E. 結論

B 型インフルエンザウイルスから新規の薬剤耐性アミノ酸置換 E105K, P139S を同定した。薬剤耐性株サーベイランスにおいて留意すべき新たな耐性マーカーを国内外へ発信できた。また、薬剤耐性ウイルスを検出した際には臨床検体についても薬剤耐性ウイルスの有無を解析する必要性を示すことができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Fujisaki S, Takashita E, Yokoyama M, Taniwaki T, Xu H, Kishida N, Sato H, Tashiro M, Imai M, Odagiri T. A single E105K mutation far from the active site of influenza B virus neuraminidase contributes to reduced susceptibility to multiple neuraminidase-inhibitor drugs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012;429(1-2):51-6.

Kishida N, Fujisaki S, Yokoyama M, Sato H, Saito R, Ikematsu H, Xu H, Takashita E, Tashiro M, Takao S, Yano T, Suga T, Kawakami C, Yamamoto M, Kajiyama K, Saito H, Shimada S, Watanabe S, Aoki S, Taira K, Kon M, Lin JH, Odagiri T. Evaluation of influenza virus A/H3N2 and B vaccines on the basis of cross-reactivity of postvaccination human serum antibodies

against influenza viruses A/H3N2 and B isolated in MDCK cells and embryonated hen eggs. Clin Vaccine Immunol. 2012;19(6):897-908.

Epidemiological and virological characteristics of influenza in the Western Pacific Region of the World Health Organization, 2006-2010.

Western Pacific Region Global Influenza Surveillance and Response System. PLoS One. 2012;7(5):e37568.

都築智之, 岩瀬弘明, 島田昌明, 平嶋昇, 日比野祐介, 龍華庸光, 齋藤雅之, 玉置大, 神谷麻子, 横井美咲, 横幕能行, 藤崎誠一郎, 杉浦互, 後藤秀実 当院における HIV, HCV 重複感染症例に対するペグインターフェロン, リバビリン併用療法の治療成績 日本消化器病学会雑誌 109: 1186 -1196, 2012

2. 学会発表

藤崎誠一郎, 今井正樹, 高下恵美, 谷脇妙, 徐紅, 岸田典子, 横山勝, 佐藤裕徳, 江島美穂, 金南希, 佐藤彩, 土井輝子, 伊東玲子, 菅原裕美, 田代真人, 小田切孝人. 新しい薬剤耐性変異を持つ B 型インフルエンザウイルスの性状. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2012

高下恵美, 江島美穂, 藤崎誠一郎, 岸田典子, 徐紅, 今井正樹, 金南希, 佐藤彩, 菅原裕美, 伊東玲子, 土井輝子, 田代真人, 小田切孝人, 全国地方衛生研究所. 3 シーズンにわたる日本国内の抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2012

岸田典子, 徐紅, 今井正樹, 藤崎誠一郎, 高下恵美, 菅原裕美, 伊東玲子, 土井輝子, 金南希, 佐藤彩, 江島美穂, 小口晃央, 山崎秀司, 藤田信之, 田代真人, 小田切孝人, 全国地方衛生研究所. 2011/12 シーズンのインフルエンザ流行株と平成 24 年度のワクチン株. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2012

Emi Takashita, Miho Ejima, Seiichiro Fujisaki, Noriko Kishida, Hong Xu, Masaki Imai, Namhee Kim, Aya Sato, Hiromi Sugawara, Reiko Itoh, Teruko Doi, Masato Tashiro, Takato Odagiri Detection of antiviral-resistant influenza A(HN)pdm09 viruses in Japan by a combination of chemiluminescent and fluorescent neuraminidase inhibitor susceptibility assays. 3rd International Influenza Meeting, Muenster, Germany, 2012.

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

なし

細胞培養法による分離ウイルスの抗原的安定性についての解析

研究分担者 原田勇一

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 培養細胞インフルエンザワクチンの製造にはワクチンシードウイルスを分離するための適切な培養細胞が必要である。ワクチンシードウイルス分離用培養細胞に求められる条件のひとつとして、当該細胞から分離されるウイルスは長期の継代にわたって抗原的安定性を維持する必要がある。筆者はワクチンシードウイルス分離用候補細胞（MDCK_N 細胞）から分離・継代した A/H1N1pdm09 ウイルスについて抗原的安定性を評価した。MDCK_N 細胞より分離したウイルスは多くの場合、その継代過程において抗原性を変化させることはなかったが、少数ではあるものの抗原性の変化が観察されるウイルス株も存在した。他方、MDCK_C 細胞より分離したウイルスはほぼ全ての株で長期継代後に抗原性が変化することが明らかとなった。両細胞由来ウイルス株共にその抗原性の変化はウイルス HA 遺伝子上の特定の点変異と強い相関があったことから、MDCK_N 細胞由来ウイルス株は抗原的には比較的安定であるものの、抗原性変化をもたらす HA 遺伝子変異の回避による抗原的安定性の確保が必要である。

A. 研究目的

培養細胞インフルエンザワクチンを製造するためにはワクチンシードウイルスを分離するための適切な培養細胞が必要である。候補となる培養細胞は高ウイルス分離効率、高ウイルス増殖性を兼ね備えていなければならないが、その培養細胞から分離されるウイルスについても長期に渡る継代に対して、遺伝的・抗原的に安定であることが要求される。筆者のグループではこれまでにいくつかの候補培養細胞を用いて評価を行い、MDCK_N 細胞がウイルス分離効率やウイルス増殖性の点において有用であることを見いだした。そこで本研究では、MDCK_N 細

胞で分離・継代したウイルスを用いてその抗原的安定性を解析し、MDCK_N 細胞のワクチンシードウイルス分離用培養細胞としての更なる適性の評価を行った。

B. 研究方法

候補培養細胞として用いた MDCK_N 細胞は、ノバルティス社が開発した品質保証済のイヌ腎由来浮遊型 MDCK 細胞である。対照として、市中流行ウイルスの分離等にも用いられる付着型 MDCK 細胞（MDCK_C 細胞）を使用した。2010/11 シーズン中に採取された臨床検体を用いて両細胞から分離・継

代した A/H1N1pdm09 ウイルスについて、HI 試験による抗原性解析を行った。抗血清は、フェレットのウイルス感染血清を使用した。フェレットの感染には臨床検体採取当時の市中流行株を代表する基準ウイルスのうち、MDCK_C 細胞分離株と鶏卵分離株を使用した。また、赤血球は 0.75%モルモット赤血球を使用した。

(倫理面への配慮)

本研究において使用したウイルスはいずれも臨床検体より分離したものであるが、当該臨床検体についてはあらかじめ国立感染症研究所ヒトを対象とした医学研究倫理審査委員会より承認を受けた後、実験に供した。

C. 研究結果

MDCK_N 細胞から分離したウイルス株は継代 3~4 代目においては、抗細胞由来ウイルス抗血清に対しても抗鶏卵由来ウイルス抗血清に対しても、それぞれの基準ウイルスと同等の反応性を示した。これら MDCK_N 細胞分離株は、その後の継代過程においても多くの場合抗血清に対する反応性に変化は観察されなかったが、いくつかの株では継代 10 代目に抗血清への反応性が基準ウイルスの $1/4 \sim 1/16$ となった。反応性の低下は用いる抗血清の種類には依存しなかったが、継代 3~4 代目における各ウイルスの反応性と比較した場合、 $1/8$ 以下となるものも存在した。

MDCK_C 細胞分離ウイルスの抗細胞由来ウイルス抗血清、抗鶏卵由来ウイルス抗血清に対する反応性は MDCK_N 細胞分離ウイルス同様、それぞれの基準ウイルス株の反応性と類似していたが、継代 2~3 代目におい

ても基準ウイルスの反応性と比較した場合、 $1/8$ 以下となる株が存在した。また、MDCK_C 細胞分離ウイルスは継代 10 代目になると、ほとんど全ての株で抗細胞由来ウイルス、抗鶏卵由来ウイルス両抗血清に対して、それぞれの基準ウイルスに対する反応性と比較すると、 $1/8$ 以下となる著しい反応性の低下が観察された。

D. 考察

今回の解析において、MDCK_N 細胞より分離された A/H1N1pdm09 ウイルスは、MDCK_C 細胞分離ウイルス株と比較して、長期に渡る継代過程で抗原性が安定に保たれることが明らかとなり、MDCK_N 細胞のワクチンシードウイルス分離用細胞としての有用性が示唆された。MDCK_C 細胞分離ウイルスでは、継代の早い時期から HI 価の低下が観察されるものがあり、10 代目にはほぼ全ての分離株で 8 倍以上の抗原性乖離が観察されたが、これらウイルスの HA 遺伝子配列を解析したところ、全てのウイルス株で MDCK_C 細胞を用いてウイルス継代を行った場合にのみ特徴的に変異が起こることが知られている領域に点変異が生じていた。また、この領域に点変異が生じる継代時期と、HI 価の著しい低下が観察される継代時期が非常に良く一致していた。さらに、MDCK_N 細胞分離ウイルス株においても、その継代過程で HI 価の著しい低下が観察されたウイルス株では、ウイルス HA 遺伝子上の同じ領域に点変異が観察され、変異の生じる継代時期と HI 価の低下が観察される継代時期は良く一致していた。以上の結果はウイルス分離に用いる細胞の種類に関わらず、候補細胞を用いて分離・継代したウイルス株にはその抗原性を変化させる HA 遺伝子変異が生じ

る可能性のあることが強く示唆される。それ故、MDCK_N 細胞を A/H1N1pdm09 ウイルス分離や継代に用いる場合であっても、この HA 遺伝子変異を回避することによる抗原的安定性の確保が必要である。

E. 結論

ワクチンシードウイルス分離用培養細胞候補である MDCK_N 細胞を用いて分離・継代した A/H1N1pdm09 ウイルスの抗原性は、対照となる MDCK_C 細胞分離株のそれと比較し、長期に渡る継代において比較的安定であることが明らかとなった。しかしながら、分離ウイルスの抗原性変化は用いる細胞の種類には依存しないウイルス HA 遺伝子上の点変異と強く相関していたため、MDCK_N 細胞を A/H1N1pdm09 ウイルス分離に用いる場合であっても、この HA 遺伝子上の点変異を回避することによるウイルスの抗原的安定性確保が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

(発表誌名巻号、頁、発行年等も記入)

Ruth Harvey, Michelle Hamill, James S. Robertson, Philip D. Minor, Galina M. Vodeiko, Jerry P. Weir, Hitoshi Takahashi, Yuichi Harada, Shigeyuki Itamura, Pearl Bamford, Tania DallaPozza, Othmer G. Engelhard
Application of deglycosylation to SDS PAGE analysis improves calibration of influenza antigen standards
Biologicals. 40(1): 96-99, 2012

2. 学会発表

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、田代真人、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、田代真人、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

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

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

なし

細胞培養法による分離ウイルスの遺伝的安定性についての解析

研究分担者 高橋 仁

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 ワクチンシード候補株を培養細胞または鶏卵で分離・継代する過程で、ウイルス遺伝子に変異が導入されると、ワクチンシード候補株の抗原性が維持されない可能性がある。これを回避するために分離ウイルスの遺伝的安定性に関するデータの集積を行う。本年度は A 型インフルエンザウイルスの A(H1N1)pdm09 株に関して解析を行った。浮遊型および付着型 MDCK 細胞を用いたウイルス分離・継代を行う過程において、全てのウイルス株の HA 遺伝子に変異導入がみられ、使用する培養細胞により導入される変異箇所の違いがあることが明らかとなった。以上の結果から、培養細胞を用いて分離・継代した A(H1N1)pdm09 株は遺伝的安定性が保たれにくいことが明らかとなり、これらの変異が抗原性にどのような影響を与えるかの検討が必要である。今後も、このような遺伝的安定性に関するデータの集積を行うとともに、変異導入を回避するための方法を模索していくことも必要と考えられた。

A. 研究目的

ワクチンシード候補株を培養細胞または鶏卵で分離・継代する過程で、ウイルス遺伝子に変異が導入されると、ワクチンシード候補株の抗原性が維持されない可能性がある。これを回避するために分離ウイルスの遺伝的安定性について検討しておくことが求められる。そこで、本研究では分離・継代ウイルスの遺伝子解析を行い、継代前後でワクチンシードに遺伝的変化がないかを確認する。変異導入が確認された場合、変異導入部位と抗原性変化との関係を調べ、抗原性維持に不利益な遺伝子変異のデータを集積することで、将来のワクチン品質管理に結びつける。

B. 研究方法

今回使用するワクチンシード分離用候補培養細胞としては、ノバルティス社から分与された浮遊型 MDCK 細胞 (MDCK_N) を用いた。比較対照として、ウイルス分離等にも用いられる付着型 MDCK 細胞 (MDCK_C) を使用した。

A(H1N1)pdm09 株のウイルスゲノムの存在が確認されている臨床検体から各細胞を用いて分離したウイルスを 1 代目として、その後 10 代目までウイルス継代を行った。臨床検体および継代 1 代目と 10 代目のウイルスを用いて、ウイルス HA 及び NA 遺伝子の解析を行った。また、抗原性解析に用いた初期継代ウイルス (2 代目から 4 代目) についても同様に HA 及び NA 遺伝子の解析を行った。

継代ウイルスからウイルス RNA を抽出し、

RT-PCR法を用いてHAおよびNA遺伝子の全長を増幅させた。このPCR産物を鋳型としてシーケンス解析を行い、塩基配列を決定した。HA、NAタンパクのアミノ酸配列は、遺伝子配列から推定した。

(倫理面への配慮)

本研究では、鼻腔スワブ等の臨床検体を用いるため、倫理委員会の承認を得た。試料は匿名処理を行うため個人情報が出ることはない。

C. 研究結果

MDCK_NおよびMDCK_C細胞を用いての分離後、10代目まで継代を行ったウイルスの遺伝子解析を行い、臨床検体中のウイルスの遺伝子配列と比較した。その結果、MDCK_N、MDCK_C細胞で分離・継代された全てのウイルス株でHA遺伝子への変異導入が確認された。またMDCK_Cで分離された1代目のウイルス株において、1株にHA遺伝子への変異導入が確認された。初期継代ウイルス(2代目から4代目)においても、既に変異導入が確認されるウイルス株も存在した。NA遺伝子についてはMDCK_N細胞で分離・継代された2株について変異導入が確認された。

MDCK_C細胞で分離・継代された全てのウイルス株では、ウイルスの抗原性に影響する、開始コドン部位から数えて153番目から156番目のアミノ酸置換を生じさせる変異が集中していた。MDCK_N細胞で分離・継代されたウイルス株の多くは、MDCK_C細胞分離・継代ウイルス株で認められた変異部位より30アミノ酸ほど下流の2カ所の部位で変異導入が確認された。これらのアミノ酸は抗原性やレセプター結合に影響する部位であった。また、少数だがMDCK_C細胞分離・継代ウイルス株で特徴的に観察された変異を持つウイルス

株も確認された。NA遺伝子についてはMDCK_N細胞で分離・継代された2株について変異導入が確認されたが、これらの変異箇所は機能的なアミノ酸部位に相当する箇所ではなかった。

D. 考察

A(H1N1)pdm09株についてMDCK_NおよびMDCK_C細胞で分離・継代する過程で、ウイルス遺伝子に変異が導入されるかについて検討を行ったところ、どちらの細胞でも高い頻度で変異出現が観察され、遺伝的安定性が保たれにくいことが示された。導入された変異は抗原性およびレセプター結合に影響を与える箇所であったことから、これらの変異が実際のウイルス抗原性にどのような影響を与えるかの検討が必要である。また、これらの変異導入箇所は同一のウイルス株の分離・継代にも関わらず、使用した細胞により異なっており、変異導入の原因はウイルス株だけに依存するのではなく培養細胞の種類にも依存することが示唆された。今後も、このようなウイルス株と分離用候補培養細胞の組み合わせにより生じる遺伝的安定性に関するデータの集積を行うとともに、変異導入を回避するための方法を模索していくことも必要と考えられた。

E. 結論

A型インフルエンザウイルスのA(H1N1)pdm09株に関しては、浮遊型および付着型MDCK細胞を用いたウイルス分離・継代を行う過程において、遺伝的安定性が保たれにくいことが示された。これらの変異が抗原性にどのような影響を与えるか検討するとともに、変異導入を回避するための方法を模索していくことも必要と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Tomoko Date, Takanobu Kato, Junko Kato, Hitoshi Takahashi, Kenichi Morikawa, Daisuke Akazawa, Asako Murayama, Keiko Tanaka-Kaneko, Tetsutaro Satae, Yasuhito Tanaka, Masashi Mizokami, Takaji Wakita.

Novel cell culture-adapted genotype 2a hepatitis C virus infectious clone.
J Virol, 86(19):10805-20, 2012

Ruth Harvey, Michelle Hamill, James S. Robertson, Philip D. Minor, Galina M. Vodeiko, Jerry P. Weir, Hitoshi Takahashi, Yuichi Harada, Shigeyuki Itamura, Pearl Bamford, Tania Dalla Pozza, Othmer G. Engelhard.

Application of deglycosylation to SDS PAGE analysis improves calibration of influenza antigen standards.
Biologicals, 40(1):96-99, 2012

2. 学会発表

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 真人、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 真人、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

浅沼 秀樹、山本 典生、佐藤 佳代子、中内 美名、高橋 仁、許斐 奈美、相内 章、長谷川 秀樹、田代 真人

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

Kayoko Sato, Hideki Asanuma, Michiyo Kataoka, Hitoshi Takahashi, Kiyohiko Matsui, Noriyo Nagata, Masato Tashiro, Shigeyuki Itamura

Characterization of A/H1N1pdm09 viruses isolated in egg from clinical specimens.
6th Orthomyxovirus Research Conference, Bromont-Canada, September 2012

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 特記事項なし