

に亜型は H9N2、ワクチン株は NIBRG-91、攻撃用ウイルス株（野生株）は A/chicken/Hong Kong/G9/1997 が良いということになったが、中国で A(H7N9) ウイルスの人への感染が報告されたことを受けて、A(H7N9) も考慮するという結論となった。どちらの亜型の場合でも、実験設備やウイルス株の保有状況を考慮して、感染研においてワクチンによるマウスの免疫、野生株による感染実験、野生株を用いた中和試験・HI 試験を行い、ワクチンメーカーにおいてワクチン株を用いた中和試験・HI 試験を行う方向性が示された。

一方 H7N9 ワクチンについては、人に対する免疫原性が H5N1 に比較して更に低いことが示唆されており、H5N1 ワクチンに基づくモックアップ製造への妥協性に疑問が生じた。従ってプロトタイプワクチンの考え方を再検討する必要がある。

(2)の細胞培養ワクチン用シードウイルスについては、シードウイルスを分離するための増殖基材についての議論と、迷入ウイルスの混入を否定するための試験について議論がなされた。鶏卵馴化による抗原変異を避け、有効性の高いワクチンを製造するためには、細胞培養法によりシードウイルスを分離する必要がある。ヒトでの増殖に適応したウイルスほど、細胞培養法により製造されたシードウイルスの必要性は高まると考えられ、季節性インフルエンザウイルスと新型インフルエンザウイルスについて細胞由来シードウイルスの製造を検討する必要がある。

(3)の SRD 試験法および SRD 代替法については、鶏卵培養系を基にした SRD 試薬で細胞培養ワクチンの力価を測定するには困難を伴う点が議論された。ワクチンメーカーごとに細胞培養系や剤形も異なることから、

それぞれの培養系でメーカーが作製した標準品とそれに対する参照抗血清を用いて、メーカーと感染研の両方で力価を測定することについても意見の交換がなされた。SRD 代替法については、SDS-PAGE を中心に検討が進められている。

(4)のプレパンデミックワクチンの細胞培養法での製造については、細胞培養ワクチンの製造施設、製造体制（試薬の備蓄を含む）および製造技術の維持のために、毎年 1 回程度はワクチン製造を実施する必要があり、そのためには、現在の発育鶏卵によるプレパンデミックワクチンの製造・備蓄を、細胞培養ワクチンによるものに変更して行くことが必要との議論がなされた。一方で、鶏卵培養法と細胞培養法の共存についても意見が出された。

(5)の季節性インフルエンザワクチンの細胞培養法での製造については、細胞培養法への切り替えに関して議論がなされた。鶏卵培養法では、特に A(H3N2)や B 型において鶏卵馴化に伴う抗原変異によってワクチンの有効性が低下するという問題点が指摘されている。この問題を解決するための手段として、細胞培養ワクチンの導入がある。細胞培養法によりシードウイルスを作製し、それを基に細胞培養ワクチンを製造することで、有効性の高いワクチンを供給することが可能となる。また、(4)でも出た論点であるが、細胞培養ワクチンの製造施設、製造体制（試薬の備蓄を含む）および製造技術の維持のためには、ある程度のペースでワクチン製造を実施する必要があり、その点からも季節性インフルエンザワクチンの細胞培養法での製造を推進すべきと考えられる。

また、細胞培養ワクチンの実用化には、

ワクチンメーカー側の体制を整備するだけでなく、国立感染症研究所における細胞培養ワクチンシードウイルス製造・供給体制の構築が不可欠である。

海外に依存せず国内だけで細胞培養ワクチン用のシードウイルス製造を行うための基盤を構築するため、GMP 基準に適合した MDCK セルバンクの構築 (MDCK-NIID) を行い、ウイルス分離試験と分離ウイルスの性状解析を行った。この細胞のウイルス分離効率を調べたところ、従来の付着系 MDCK 細胞(MDCK_C)と比較して同程度のウイルス分離効率であった (両細胞とも A(H1N1)pdm09, A(H3N2), B/Vic, B/Yam で 100%の分離効率)。さらに詳細にウイルス分離効率を解析するため、ウイルス量が少ない検体も含めて追加試験を行ったところ、MDCK-NIID は MDCK_C に比べて、ウイルス量が少ない検体からのウイルス分離効率が低くなる傾向が見られた。遺伝的安定性については、細胞ごとに異なるパターンが見られた。A(H1N1)pdm09 に関しては、MDCK-NIID 分離株の方が MDCK_C 分離株より変異率が低かったが、A(H3N2) や B 型では MDCK_C 分離株の方が MDCK-NIID 分離株より変異率が低かった。これらの変異が観察される時期は株によって異なるが、変異が導入される前のウイルスをシードウイルスとして使用することも可能と思われる。これらの変異が抗原性の変化につながるかについては、今後解析する必要がある。また MDCK-NIID について、特性試験と安全性試験を行った。今年度は残りの 6 試験を実施し、必要な一通りの試験を完了した。これまでに実施した全ての試験において、特に問題となる点を認めなかったことから、MDCK-NIID は臨床検体からのシードウイルスの分離、リバーシジ

エネティクスによるシードウイルス作製、及び海外からのリファレンス株の増殖などに使用することが出来ると考えられた。安全性が確認された GMP グレードの MDCK セルバンクは、鶏卵培養によらない細胞培養ワクチンシードウイルス製造の基盤確立へ大きく貢献するものになると言っても良いであろう。鶏卵培養を経ずにシードウイルスを製造することによって、鶏卵馴化に伴う抗原性変異を持たない、より有効性の高いワクチンをより速やかに製造することが可能になると期待される。

E. 結論

(サーベイランスに関する研究)

・2013/14 シーズンの季節性インフルエンザワクチン接種前後のペア血清を用いて、ワクチンにより誘導された抗体の交叉反応性を解析し、2013/14 シーズンワクチンの効果について評価を行なった。その結果、A(H1N1)pdm09、A(H3N2) および B 型いずれにおいても、ワクチン効果の減弱が懸念された。

・新たに発生した A(H7N9)ウイルスは、HA、PB2 タンパク質にヒトへの感染および増殖に関与するアミノ酸置換を持つことが明らかになった。一方、ニワトリにおいてはウイルス排泄量は多くなく、病原性も低かった。日本人は A(H7N9)ウイルスに対する HI 抗体を持たないこと、および A(H7N9)ウイルスがヒトへの感染能力を獲得していると考えられることから、高いリスクがあると言える。今後も A(H7N9)ウイルスの動向を監視していく必要がある。

(細胞培養ワクチン開発に関する研究)

・本研究によって、ワクチンメーカーによ

る細胞培養ワクチン実用化を強力に支援し、その結果、平成 25 年度末までに細胞培養ワクチンの承認を得るという本研究プロジェクトの大きな目標が達成できる見込みとなった。

・ウイルス株・ウイルス亜型によってヒトに対する免疫原性が異なることが示された。従って、プロトタイプワクチンの考え方については、当初の目的通りのモックアップ対応が必ずしも適当でないことが懸念される。

・本研究によって、GMP グレードの MDCK 細胞 (MDCK-NIID) 等の評価と細胞培養ワクチン製造用種ウイルスの母体ウイルスベクターの検討を行い、国立感染症研究所におけるシードウイルス製造体制の構築を進めることができた。MDCK-NIID はがん原性試験を始め、全ての安全性試験・特性試験で問題となる点を認めなかったことから、臨床検体からのシードウイルスの分離、リバーシジェネティクスによるシードウイルス作製、及び海外からのワクチン株の増殖などに使用することが出来ると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

(サーベイランスに関する研究)

Watanabe T, Kiso M, Fukuyama S, Nakajima N, Imai M, Yamada S, Murakami S, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Sakoda Y, Takashita E, McBride R, Noda T, Hatta M, Imai H, Zhao D, Kishida N, Shirakura M, de Vries RP, Shichinohe S, Okamatsu M, Tamura T, Tomita Y, Fujimoto N, Goto K, Katsura H, Kawakami E, Ishikawa I, Watanabe S, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Sugita Y, Uraki R, Yamaji R, Eisfeld AJ, Zhong G, Fan S, Ping J, Maher EA, Hanson A,

Uchida Y, Saito T, Ozawa M, Neumann G, Kida H, Odagiri T, Paulson JC, Hasegawa H, Tashiro M, Kawaoka Y.

Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans.

Nature 26;501(7468) 551-555 2013

Kishida N, Imai M, Xu H, Taya K, Fujisaki S, Takashita E, Tashiro M, Odagiri T.

Seroprevalence of a novel influenza A (H3N2) variant virus in the Japanese population.

Jpn J Infect Dis. 66(6) 549-551 2013

Takashita E, Fujisaki S, Kishida N, Xu H, Imai M, Tashiro M, Odagiri T; Influenza Virus Surveillance Group of Japan.

Characterization of neuraminidase inhibitor-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated in four seasons during pandemic and post-pandemic periods in Japan.

Influenza and other respiratory viruses 7(6) 1390-1399 2013

Kageyama T, Fujisaki S, Takashita E, Xu H, Yamada S, Uchida Y, Neumann G, Saito T, Kawaoka Y, Tashiro M.

Genetic analysis of novel avian A(H7N9) influenza viruses isolated from patients in China, February to April 2013.

Euro Surveillance 18(15) 20453-20468 2013

Kobayashi, M., Takayama, I., Kageyama, T., Tsukagoshi, H., Saitoh, M., Ishioka, T., Yokota, Y., Kimura, H., Tashiro, M., Kozawa, M.

- Novel reassortant influenza A (H1N2) virus derived from A(H1N1)pdm09 virus isolated from swine, Japan, 2012. *Emerg. Infect. Dis.* 19 1972-1974 2013
- McKimm-Breschkin, J.L., Williams, J., Barrett, S., Jachno, K., McDonald, M., Mohr, P., Saiito, T., Tashiro, M. Reduced susceptibility to all neuraminidase inhibitors of influenza H1N1 viruses with haemagglutinin mutations and mutations in non-conserved residues of the neuraminidase *J. Antimicrobial Chemotherapy.* 68(10) 2210-2221 2013
- Fujisaki, S., Imai, M., Takashita, E., Taniwaki, T., Xu, H., Kishida, N., Yokoyama, M., Sato, H., Tashiro, M., Odagiri, T. Mutations at the monomer-monomer interface far from the active site of influenza B virus neuraminidase cause reduced susceptibilities to neuraminidase-inhibitor drugs *J. Infect. Chemother* 19(5) 891-895 2013
- Kuroda M., Niwa, S., Sekizuka, T., Tsukagoshi, H., Yokoyama, M., Ryo, A., Sato, H., Kiyota, N., Noda, M., Kozawa, K., Shirabe, K., Kusaka, T., Shimojo, N., Hasegawa, S., Sugai, K., Tashiro, M., Oishi, M., Ishii, H., Kimura, H., Molecular evolution of the VP1 and VP3 genes in human rhinovirus species C *J. Virol.* Submitted 2013
- Kageyama, T., Nakauchi, M., Takayama, I., Takahashi, H., Tashiro, M. Development of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid diagnosis of avian influenza A (H7N9) virus infection. *J. Virol. Methods* submitted 2013
- Sriwilaijaroen, N., Magesh, S., Ando, H., Ishida, H., Sakai, M., Ishitsubo, E., Hori, T., Moriya, S., Ishikawa, T., Kuwata, K., Odagiri, T., Tashiro, M., Hiramatsu, H., Tsukamoto, K., Miyagi, T., Tokiwa, H., Kiso, M., Suzuki, Y. A novel potent and highly specific inhibitor against influenza viral N1-N9 neuraminidases. *Nature Chem. Biol.* Submitted 2013
- 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., Kiselev, O., 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. Avian flu transmission research resumes. *Science* 339(6119) 520-521 2013
- Dwyer D, Barr I, Hurt A, Kelso A, Reading P, Sullivan S, Buchy P, Hongjie YuH,

Zheng J, Shu Y, Wang D, Lam, Aguon A, Oliva RQ, Odagiri T, Tashiro M, Verasahib K, Yusof MA, Nymadawa P, Alexander B, Gourinat AC, Grangeon JP, Jennings L, Huang S, Horwood, Lucero PM, Roque V Jr, Suy LL, Cardon P, Tandoc III A, Olveda RM, Kang C, Park YJ, Cutter J, Lin R, Low C, Mai LTQ, Balish A, Kile J, Mei S, McFarland J, Moen A, Olsen S, Samaan G, Xu X, Chea N, Diorditsa S, Feldon K, Fox K, Jamsran M, Konings F, Lewis HC, McPherson M, Nilles E, Olowokure B, Partridge J

Seasonal influenza vaccine policies, recommendations and use in the World Health Organization's Western Pacific Region.

Western Pacific Global Influenza Surveillance and Response System 4(3) doi: 10.5365/wpsar.2013.4.1.009 2013

Members of the Western Pacific Region Global Influenza Surveillance Response System, Dwyer D, Barr I, Hurt A, Kelso A, Reading P, Sullivan S, Buchy P, Yu H, Zheng J, Shu Y, Wang D, Lam, Aguon A, Oliva RQ, Odagiri T, Tashiro M, Verasahib K, Yusof MA, Nymadawa P, Alexander B, Gourinat AC, Grangeon JP, Jennings L, Huang S, Horwood P, Lucero M, Roque V Jr, Lee Suy L, Cardon P, Tandoc A 3rd, Olveda RM, Kang C, Young-Joon P, Cutter J, Lin R, Low C, Maile TQ, Balish A, Kile J, Mei S, McFarland J, Moen A, Olsen S, Samaan G, Xiyang X, Chea N, Diorditsa S, Feldon K, Fox K, Jamsran M, Konings F, Lewis HC, McPherson M, Nilles E, Olowokure B,

Partridge J.

Seasonal influenza vaccine policies, recommendations and use in the World Health Organization's Western Pacific Region.

Western Pac Surveill Response J 4(3) 51-59 2013

E Takashita, M Ejima, R Itoh, M Miura, A Ohnishi, H Nishimura, T Odagiri, M Tashiro

A community cluster of influenza a(h1n1)pdm09 virus exhibiting cross-resistance to oseltamivir and peramivir in Japan, November to December 2013

Euro surveillance 19(1) 20666 2014

Shaw, I., Ciblak, M., Gabriel, G., Guthmann, J.-P., Heinz, F., Kunze, M., Kunze, U., Kyncl, J., Lina, B., Monto, A., Openshaw, P., Osterhaus, A., Prymula, R., Tashiro, M., Essen, T.V., Vanlangendonck, C., Ranst, M.V., Van-Tam, J.N.; Wagner, R.

Pandemic Influenza Preparedness: Key findings from a European survey.

Health Policy Submitted 2014

World Health Organization /World Organisation for Animal Health/Food and Agriculture Organization (WHO/OIE/FAO) H5N1 Evolution Working Group: Bahl, J., Besselaar, T., Brown, I.H., Capua, I., Chen, H., Cox, N., Claes, F., Davis, C.T., Donis, R.O., Fouchier, R.A.M., Guan, Y., Hamilton, K., Jang, Y., Kawaoka, Y., Kelso, A., McCauley, J., Mumford, E.,

- Prajitno, T., Russell, C.A., Smith, D., Smith, G.J.D., Shu, Y., Tashiro, M., Shepard, S., Vijaykrishna, D., Webby, R., Webster, R., Wong, F.
Revised and updated nomenclature for highly pathogenic avian influenza A (H5N1) viruses.
Influenza and other respiratory viruses doi: 10.1111/irv.12230 2014
- Tsunetsugu-Yokota, Y., KengoNishimura, K., Misawa, S., Kobayashi-Ishihara, M., Takahashi, H., Takayama, I., Ohnishi, K., Itamura, S., Nguyen, H.L.K., MaiT.Q.Le, Dang, G.T., LongT.Nguyen, Tashiro, M., Kageyama, T.
Development of a sensitive novel diagnostic kit for the highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus.
J. Clin. Microbiol. Submitted 2014
- Barr, I.G., Besselaar, T.G., Cox, N.J., Daniels, R.S., Donis, R., Engelhardt, O.G., Grohmann, G., Itamura, S., Kelso, A., McCauley, J., Odagiri, T., Russell, C., Schultz-Cherry, S., Shu, Y., Smith, D., Tashiro, M., Wang, D., Webby, R., Xu, X., Ye, Z., Zhang, W. (Writing Committee of the World Health Organization Consultation on Northern Hemisphere Influenza Vaccine Composition for 2013-4)
WHO recommendations for the viruses to be used in the 2013-14 Northern Hemisphere Influenza Vaccine: Epidemiology, antigenic and genetic characteristics of influenza A(H1N1)pdm09, A(H3N2) and B influenza viruses collected from October 2012 to January 2013.
Vaccine in press 2014
- WHO writing group of consultation on global influenza surveillance, Geneva, 10-12 July 2013
Consultation on global influenza surveillance, Geneva, 10-12 July 2013
WER 89 29-34 2014
- WHO writing group of WHO external quality assessment programme (EQAP) for influenza viruses by polymerase chain reaction (PCR)
Detection of influenza virus subtype A by polymerase chain reaction: WHO external quality assessment programme summary analysis, 2013
WER 89 37-44 2014
- (細胞培養ワクチン開発に関する研究)
Ainai A, Tamura SI, Suzuki T, van Riet E, Ito R, Odagiri T, Tashiro M, Kurata T, Hasegawa H.
Intranasal vaccination with an inactivated whole influenza virus vaccine induces strong antibody responses in serum and nasal mucus of healthy adults
Hum Vaccin Immunother. 9(9) 1962-1970 2013
- Hamamoto I, Harazaki K, Inase N, Takaku H, Tashiro M, Yamamoto N.
Cyclosporin A inhibits the propagation of influenza virus by interfering with a late event in the virus life cycle.
Jpn J Infect Dis. 66(4) 276-283 2013

Kushibuchi I, Kobayashi M, Kusaka T, Tsukagoshi H, Ryo A, Yoshida A, Ishii H, Saraya T, Kurai D, Yamamoto N, Kanou K, Saitoh M, Noda M, Kuroda M, Morita Y, Kozawa K, Oishi K, Tashiro M, Kimura H. Molecular evolution of attachment glycoprotein (G) gene in human respiratory syncytial virus detected in Japan 2008-2011.

Infect Genet Evol. 18 168-173 2013

山本典生、田代真人

新型インフルエンザ

予防接種 Q&A, 小児内科 45 増刊号
549-551 2013

Shirakura, M., Kawaguchi, A., Tashiro, M., Nobusawa, E.

The composition of hemagglutinin and neuraminidase affects antigen yield of A(H1N1)pdm09 candidate vaccine viruses.

Jpn. J. Infect. Dis. 66 65-68 2013

Miyazaki M, Nishihara H, Hasegawa H, Tashiro M, Wang L, Kimura T, Tanino M, Tsuda M, Tanaka S.

NS1-binding protein abrogates the elevation of cell viability by the influenza A virus NS1 protein in association with CRKL.

Biochem Biophys @Res Commun 441(4)
953-957 2013

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-like gene.

PLoS ONE 10 1371 2013

K. Sakai, Y. Ami, M. Tahara, T. Kubota, M. Anraku, M. Abe, N. Nakajima, T. Sekizuka, K. Shirato, Y. Suzaki, A. Aina, Y. Nakatsu, K. Kanou, K. Nakamura, T. Suzuki, K. Komase, E. Nobusawa, K. Maenaka, M. Kuroda, H. Hasegawa, Y. Kawaoka, M. Tashiro and M. Takeda.

The host protease TMPRSS2 plays a major role for in vivo replication of emerging H7N9 and seasonal influenza viruses.

Journal of Virology in press, 2014

Sakai, K., Ami, Y., Tahara, M., Kubota, T., Anraku, M., Abe, M., Nakajima, N., Sekizuka, T., Shirato, K., Suzaki, Y., Aina, A., Nakatsu, Y., Nagata, N., Kanou, K., Komase, K., Nobusawa, E., Maenaka, K., Kuroda, M., Hasegawa, H., Kawaokaj, Y., Tashiro, M., Takeda, M.

The host serine protease TMPRSS2 is essential for pathogenicity of influenza A virus

J. Virol. doi:10.1128/jvi.03677-13 2014

2. 学会発表

(サーベイランスに関する研究)

小田切孝人、岸田典子、徐紅、藤崎誠一郎、佐藤彩、菅原裕美、土井輝子、伊東玲子、金南希、江島美穂、高下恵美、今井正樹、田代真人、菖蒲川由郷、齋藤玲子 卵馴化によるインフルエンザワクチン株の抗原変異と 2012/13 シーズンのワクチン効果の評価 第 54 回日本臨床ウイルス学会 倉敷、2013 年 6 月

岸田典子、渡辺登喜子、今井正樹、山田晋弥、今井博貴、富田有里子、白倉雅之、小田切孝人、田代真人、河岡義裕 2013年に中国で分離された A(H7N9)鳥インフルエンザウイルスの家禽に対する病原性の解析 第61回日本ウイルス学会 神戸、2013年11月

高下恵美、徐紅、江島美穂、藤崎誠一郎、岸田典子、今井正樹、伊東玲子、菅原裕美、土井輝子、佐藤彩、三浦舞、田代真人、小田切孝人 ノイラミニダーゼ阻害薬耐性変異をもつ A(H7N9)および A(H3N2)インフルエンザウイルス 第61回日本ウイルス学会 神戸、2013年11月

藤崎誠一郎、岸田典子、徐紅、今井正樹、高下恵美、菅原裕美、土井輝子、佐藤彩、伊東玲子、三浦舞、江島美穂、小口晃央、花巻朝子、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 2012/13シーズンのインフルエンザ流行株と2013/14シーズンのワクチン株 第61回日本ウイルス学会 神戸、2013年11月

E Takashita, S Fujisaki, N Kishida, H Xu, M Imai, M Tashiro, T Odagiri. Detection of antiviral-resistant influenza viruses in Japan during pandemic and post-pandemic periods. Options for the Control of Influenza VIII, Cape Town, South Africa, 2013

(細胞培養ワクチン開発に関する研究)

K Nakamura, M Shirakura, A Muto, T Naito, S Fujisaki, M Tashiro, E Nobusawa. Development of candidate vaccine of A/Anhui/1/2013(H7N9) strain by reverse

genetics system. Options for the Control of Influenza VIII, Cape Town, South Africa, 2013

H Takahashi, K Ohnishi, K Nishimura, I Takayama, M Nakauchi, S Nagata, Y Tsunetsugu-Yokota, M Tashiro, T Kageyama Development of monoclonal antibodies specific for H5 HA and their application to rapid detection of influenza A/H5N1 virus.

Options for the Control of Influenza VIII, Cape Town-South Africa, September 2013

中村一哉、白倉雅之、武藤亜紀子、内藤忠相、藤崎誠一郎、田代真人、信澤枝里 鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルスのワクチン製造候補株の開発 第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013

原田勇一、中村一哉、浜本いつき、浅沼秀樹、相内 章、田代真人、奥野良信、山本典生

マウスにおける細胞培養型インフルエンザワクチンの有効性の解析

第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013年11月

原田勇一、中村一哉、浜本いつき、榎本匡志、浅沼秀樹、相内 章、田代真人、山本典生

マウスモデルを用いた細胞培養型インフルエンザワクチンの有効性の解析

第17回日本ワクチン学会学術集会、三重、2013年11-12月

相内 章、浅沼秀樹、鈴木忠樹、原田勇一、田村慎一、田代真人、長谷川秀樹

経鼻インフルエンザワクチンにおけるワクチンの組み合わせが抗体応答に与える影響
第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、
2013年11月

2013年11月

高橋 仁、田中 仁喜、西村 研吾、高山 郁代、中内 美名、永田 志保、小林 美栄、藤博幸、大西 和夫、横田(恒次) 恭子、田代 真人、影山 努

H5 HA 特異的なモノクローナル抗体の作製と H5N1 インフルエンザ迅速診断法構築の検討

第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、
2013年11月

影山 努、高橋 仁、高山 郁代、中内 美名、田代 真人、大場 邦弘、改田 厚、久保 英幸

Direct RT-LAMP 法によるマイクロ流路チップを用いたインフルエンザおよび呼吸器感染症ウイルス同定について

第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、
2013年11月

中内 美名、高山 郁代、高橋 仁、大場 邦弘、田代 真人、影山 努

B 型インフルエンザウイルス Victoria 系統・Yamagata 系統の real-time RT-PCR 法を用いた識別検出法の構築

第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、
2013年11月

高山 郁代、中内 美名、高橋 仁、田代 真人、影山 努

鳥インフルエンザ A(H7N9) ウイルス検出系の構築および喀痰検体の前処理についての検討

第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、

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

日本人の H7N9 ウイルスに対する HI 抗体保有状況の調査

研究分担者 小田切孝人 インフルエンザウイルス研究センター 第一室室長

研究協力者 岸田典子、今井正樹、徐紅、藤崎誠一郎、高下恵美、菅原裕美、
伊東玲子、佐藤彩、土井輝子、江島美穂、三浦舞
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

研究要旨

2013年に中国でヒトから分離された H7N9 インフルエンザウイルスに対する日本人の抗体保有状況について赤血球凝集抑制（HI）試験により調査した結果、日本人 300 人分の血清いずれも H7N9 ウイルスに対する HI 抗体は陰性であった。全ての年齢層で日本人は H7N9 インフルエンザウイルスに対する HI 抗体を持たないことから、いずれの年齢層でも高い感染リスクがある。H7N9 インフルエンザウイルスがヒトへの高い伝播能を獲得し、日本国内に入ってきた場合に備えて、治療薬の備蓄、H7N9 ワクチンの準備が必要である。

A. 研究目的

H7N9 ウイルスに対する HI 抗体レベルを事前に把握しておくことを目的とした。

フォームドコンセントを取り、倫理委員会の了承を得た。

B. 研究方法

2010年と2011年にかけて採取された1-87歳の300人分の日本人血清（国立感染症研究所血清バンクより提供を受けた）を使用し、シチメンチョウ血球を用いた赤血球凝集抑制（Hemagglutination inhibition : HI）試験を行った。ウイルス抗原には A/Anhui/01/2013（H7N9）を用い、各血清の HI 抗体価を測定した。

C. 研究結果

1-87歳の300人分の日本人血清全てにおいて HI 抗体は検出限界以下（<10HI）であった。

D. 考察

調べた 300 人全てのヒトで HI 抗体が陰性であった。HI 抗体を持たないのは日本人が H7 ウイルスに暴露されたことがないためと考えられる。現時点では、効率的なヒト-ヒト感染は確認されていないが、H7N9 インフルエンザウイルスがヒトへの感染能を高

（倫理面への配慮）

ヒト血清検体の採取にあたっては、イン

めた場合、H7N9 インフルエンザウイルスに対して、日本人はH7N9 インフルエンザウイルスに対する HI 抗体を持たないことから、全ての年齢層で高い感染リスクがある。

E. 結論

全ての年齢層で高い感染リスクがあるため、H7N9 インフルエンザウイルスがヒトへの高い伝播能を獲得し、日本国内に入ってきた場合に備えて、治療薬の備蓄、H7N9 ワクチンの準備が必要である。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Watanabe T, Kiso M, Fukuyama S, Nakajima N, Imai M, Yamada S, Murakami S, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Sakoda Y, Takashita E, McBride R, Noda T, Hatta M, Imai H, Zhao D, Kishida N, Shirakura M, de Vries RP, Shichinohe S, Okamatsu M, Tamura T, Tomita Y, Fujimoto N, Goto K, Katsura H, Kawakami E, Ishikawa I, Watanabe S, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Sugita Y, Uraki R, Yamaji R, Einfeld AJ, Zhong G, Fan S, Ping J, Maher EA, Hanson A, Uchida Y, Saito T, Ozawa M, Neumann G, Kida H, Odagiri T, Paulson JC, Hasegawa H, Tashiro M, Kawaoka Y. Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. *Nature*. 2013 Jul 10. doi: 10.1038/nature12392. [Epub ahead of print]

Takashita E, Fujisaki S, Kishida N, Xu H, Imai M, Tashiro M, Odagiri T Characterization

of neuraminidase inhibitor-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated in four seasons during pandemic and post-pandemic periods in Japan *Influenza Other Respi Viruses*. (2013) Jun 8. doi: 10.1111/irv.12132
Ainai A, Tamura SI, Suzuki T, van Riet E, Ito R, Odagiri T, Tashiro M, Kurata T, Hasegawa H. Intranasal vaccination with an inactivated whole influenza virus vaccine induces strong antibody responses in serum and nasal mucus of healthy adults. *Hum Vaccin Immunother*. 9(9): Jun 27 (2013)

Dwyer D, Barr I, Hurt A, Kelso A, Reading P, Sullivan S, Buchy P, Hongjie YuH, Zheng J, Shu Y, Wang D, Lam, Aguon A, Oliva RQ, Odagiri T, Tashiro M, Verasahib K, Yusof MA, Nymadawa P, Alexander B, Gourinat AC, Grangeon JP, Jennings L, Huang S, Horwood, Lucero PM, Roque V Jr, Suy LL, Cardon P, Tandoc III A, Olveda RM, Kang C, Park YJ, Cutter J, Lin R, Low C, Mai LTQ, Balish A, Kile J, Mei S, Mcfarland J, Moen A, Olsen S, Samaan G, Xu X, Chea N, Diorditsa S, Feldon K, Fox K, Jamsran M, Konings F, Lewis HC, McPherson M, Nilles E, Olowokure B, Partridge J Seasonal influenza vaccine policies, recommendations and use in the World Health Organization's Western Pacific Region. *Western Pacific Global Influenza Surveillance and Response System Vol 4 (3)*, (2013) doi: 10.5365/wpsar.2013.4.1.009

Kishida N, Imai M, Xu H, Taya K, Fujisaki S, Takashita E, Tashiro M and Odagiri T Seroprevalence of a novel influenza A (H3N2) variant virus in the Japanese population *Jpn.J.Infect.Dis*.66: 549-551, 2013

E Takashita, M Ejima, R Itoh, M Miura, A Ohnishi, H Nishimura, T Odagiri, M Tashiro A community cluster of influenza a(h1n1)pdm09 virus exhibiting cross-resistance to oseltamivir and peramivir in japan, november to december 2013. Eurosurveillance, Volume 19, Issue 1, 09 January 2014

2. 学会発表

小田切孝人、岸田典子、徐紅、藤崎誠一郎、佐藤彩、菅原裕美、土井輝子、伊東玲子、金南希、江島美穂、高下恵美、今井正樹、田代真人、葛蒲川由郷、齋藤玲子 卵馴化によるインフルエンザワクチン株の抗原変異と2012/13シーズンのワクチン効果の評価 第54回日本臨床ウイルス学会 倉敷、2013年6月

小田切孝人 動物由来インフルエンザウイルス (A/H3N2 variant、A/H7N9) のヒト感染例とワクチン開発 第13回人と動物の共通感染症研究会学術集会 東京、2013年11月

岸田典子、渡辺登喜子、今井正樹、山田晋弥、今井博貴、富田有里子、白倉雅之、小田切孝人、田代真人、河岡義裕 2013年に中国で分離されたA(H7N9)鳥インフルエンザウイルスの家禽に対する病原性の解析 第61回日本ウイルス学会 神戸、2013年11月

高下恵美、徐紅、江島美穂、藤崎誠一郎、岸田典子、今井正樹、伊東玲子、菅原裕美、土井輝子、佐藤彩、三浦舞、田代真人、小田切孝人 ノイラミニダーゼ阻害薬耐性変異をもつA(H7N9)およびA(H3N2)インフルエンザウイルス 第61回日本ウイルス学会 神戸、2013年11月

藤崎誠一郎、岸田典子、徐紅、今井正樹、高下恵美、菅原裕美、土井輝子、佐藤彩、伊東玲子、三浦舞、江島美穂、小口晃央、花巻朝子、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 2012/13シーズンのインフルエンザ流行株と2013/14シーズンのワクチン株 第61回日本ウイルス学会 神戸、2013年11月

H. 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

中国でヒトから分離された H7N9 ウイルスのニワトリに対する 病原性の解析

研究分担者 岸田典子 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

2013 年に中国で発生した H7N9 インフルエンザ患者の多くは鳥類と接触していたことから、家禽や野鳥がヒトへの感染源として疑われていたため、ニワトリにおけるウイルスの増殖性や病原性を解析した。その結果、H7N9 ウイルスを感染させたニワトリは明瞭な臨床症状を示さないことがわかった。また、限られた臓器からしかウイルスは検出されなかった。気管拭い液からはウイルスが検出されたが、総排泄腔拭い液からは検出されなかった。以上の成績は、H7N9 ウイルスがニワトリに対して低病原性であることを示し、感染鶏からのウイルス排泄量も多くないことがわかった。

A. 研究目的

H7N9 ウイルス感染家禽の症状やウイルス排泄量を調べることにより、H7N9 インフルエンザウイルスのリスク評価を行うことを目的とする。

B. 研究方法

中国でヒトから分離された A/Anhui/1/2013 (H7N9) と日本でカモから分離された A/duck/Gunma/466/2011 (H7N9) ウイルスについて、4 週齢 SPF メスのニワトリ 6 羽に 2×10^6 p. f. u. のウイルス液を経鼻接種し、気管と総排泄腔の拭い液を 6 日間毎日採取して、ウイルス感染価を測定した。また感染 3 日目と 6 日目に主要臓器を採取した。ウイルス感染価は、MDCK 細胞を用いたブラック法により測定された。

C. 研究結果

中国のヒトから分離された A/Anhui/1/2013 (H7N9) 株を接種したニワトリは、いずれの個体も 6 日間の観察期間中に明瞭な臨床症状を示さなかった。また、限られた臓器からしかウイルスは検出されなかった。気管拭い液からは全ての個体でウイルスが検出されたが、総排泄腔拭い液からは検出されなかった。以上の成績は、H7N9 ウイルスがニワトリに対して低病原性であることを示し、ウイルス排泄量も多くないことがわかった。

D. 考察

感染鶏からのウイルス排泄量が多くないため、ヒトが H7N9 ウイルスに感染する際の感染源がニワトリである可能性が低いことが示唆された。

E. 結論

H7N9 ウイルスはニワトリに対して低病原性を示し、排泄されるウイルス量も少ないことがわかった。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Watanabe T, Kiso M, Fukuyama S, Nakajima N, Imai M, Yamada S, Murakami S, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Sakoda Y, Takashita E, McBride R, Noda T, Hatta M, Imai H, Zhao D, **Kishida N**, Shirakura M, de Vries RP, Shichinohe S, Okamatsu M, Tamura T, Tomita Y, Fujimoto N, Goto K, Katsura H, Kawakami E, Ishikawa I, Watanabe S, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Sugita Y, Uraki R, Yamaji R, Eisfeld AJ, Zhong G, Fan S, Ping J, Maher EA, Hanson A, Uchida Y, Saito T, Ozawa M, Neumann G, Kida H, Odagiri T, Paulson JC, Hasegawa H, Tashiro M, Kawaoka Y. Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. *Nature*. 2013 Jul 10. doi: 10.1038/nature12392. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

岸田典子、渡辺登喜子、今井正樹、山田晋弥、今井博貴、富田有里子、白倉雅之、小田切孝人、田代真人、河岡義裕 2013年に中国で分離された A(H7N9)鳥インフルエンザウイルスの家禽に対する病原性の解析 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2013 年 11 月神戸

H. 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

血清学的調査による 2013/14 シーズンの 季節性インフルエンザワクチン効果の評価

研究分担者：岸田典子 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

2013/14 シーズンの季節性インフルエンザワクチン接種前後のペア血清を用いて、ワクチンにより誘導された抗体の交叉反応性を評価することで、2013/14 シーズンワクチンの効果について評価を行なった。その結果、A(H1N1)pdm09、A(H3N2) および B 型いずれにおいても、ワクチン効果の減弱が懸念された。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

2013/14 シーズンワクチン接種前後のペア血清（60歳未満の成人層：30人、60歳以上の老人層：30人）を用いて、ワクチン株、2013/14 シーズンの代表的な流行株との反応性を赤血球凝集抑制（HI）試験により調べた。HI抗体価から幾何平均値（GMT）を求めて比較した。

*2013/14 シーズンワクチン：

A/California/7/2009 (H1N1)pdm09 (X-179A)、A/Texas/50/2012 (H3N2) (X-223)、B/Massachusetts/02/2012 (BX-51B) (山形系統)

(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(H1N1)pdm09 ワクチン：X-179A ワクチン接種者の血清は、HI試験において、ワクチン株にはよく反応したが、流行株との反応性は低かった。

A(H3N2) ワクチン：X-223 ワクチン接種者の血清は、ワクチン株にはよく反応したが、いずれの流行株とも反応性は低かった。

B山形系統ワクチン：BX-51B ワクチン接種者の血清はHI試験解析において、ワクチン株と流行株のともに反応性は低かった。

D. 考察

A(H1N1)pdm09 ワクチン：2013/14 シーズンの H1N1pdm09 ワクチンで誘導された血清の HI 抗体価は H3N2 および B と比較すると高く、流行株との反応性も高いが、流行株に対する値はいずれも EMA の基準値（抗体

陽転率)を下回っていることからワクチン効果の減弱が予想される。

A(H3N2)ワクチン：HI 試験では、ワクチン接種後のヒト血清抗体は MDCK 細胞分離株と交叉反応性が低かった。X-223 ワクチン製造株の HA の抗原性決定領域にある 186 番目のアミノ酸に置換 (G→V) があり、この置換による抗原性の変化が原因であると推測される。以上から、ワクチンの効果が減弱していると考えられた。

B 山形系統ワクチン：HI 試験で、ワクチン接種後の血清抗体は、ホモであるワクチン製造株 BX-51B に対して反応性は低かったが、比較的流行株に対しては交差反応性を示した。

A(H3N2)および B 型ワクチンの製造過程における HA 蛋白の抗原性変化は、孵化鶏卵を使用する上で、近年、必ず生じる問題点であり、これを解決するには、広い交差反応性を示す抗体を誘導できる全粒子不活化抗原ワクチン、抗原性の大きく異なる抗原にも効果を発揮する経鼻粘膜ワクチン、または比較的分離当初の抗原性を維持できると考えられている細胞培養ワクチン、いずれかの早期導入が必要である。

E. 結論

A(H1N1)pdm09、A(H3N2) および B 型いずれにおいても、ワクチン効果の減弱が懸念された。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

無し

2. 学会発表

無し

H. 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

研究要旨

2013 年 2 月に中国で新たに検出された A(H7N9) ウイルスについて、その病原性およびヒトに対する感染性を評価するため、遺伝子配列に基づいてアミノ酸配列および遺伝子系統樹の解析を行った。その結果、HA、PB2 タンパク質にヒトへの感染および増殖に関与するアミノ酸置換が獲得されていることが明らかになった。また NA 遺伝子の解析の結果、分離されたほとんどの A(H7N9) ウイルスはノイラミニダーゼ阻害薬に対し感受性型のアミノ酸を保持していることを示した。パンデミックを引き起こす可能性を有しているウイルスと考えられることから、ウイルスの拡散を注意深く監視する必要がある。

A. 研究目的

中国で発生しヒトへの感染が拡大している A(H7N9) ウイルスについて、遺伝子配列を用いて人に対する感染性および病原性について明らかにする。

B. 研究方法

データベース上に公開された A(H7N9) ウイルス A/Shanghai/1/2013 株, A/Shanghai/2/2013 株, A/Anhui/1/2013 株, A/Hangzhou/1/2013 株, A/pigeon/Shanghai/S1069/2013 株, A/chicken/Shanghai/S1053/2013 株, A/environment/Shanghai/S1088/2013 株) の遺伝子配列を用いてアミノ酸配列および置換部位の同定を行った。またアミノ酸置換に基づき予測される病原性および感染性を評価した。また、neighbor-joining 法を用いて遺伝子系統樹解析を行い、ウイルスの近縁性について解析を行った。

C. 研究結果

中国で分離された A(H7N9) ウイルスの 8 つのセグメント遺伝子 (PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M, NS) 配列と、今までに公開されている各亜型の遺伝子配列と相同性を解析したところ、HA 遺伝子は H7 ウイルス、NA 遺伝子は N9 ウイルスであり、残りの 6 つの遺伝子は A(H9N2) ウイルス由来である可能性が強く示唆された。A/Shanghai/2/2013 株, A/Anhui/1/2013 株, A/Hangzhou/1/2013 株の遺伝子配列は 99%以上同一であった。とりおよび環境由来ウイルスの遺伝子配列はヒト由来の A/H7N9 ウイルスとほぼ同一であり遺伝子系統樹上でも同じ集団に属した。しかし PB1 遺伝子では、A/pigeon/Shanghai/S1069/2013 株は異なる集団に属した。また A/Shanghai/1/2013 株は他の A/H7N9 ウイルスと高い相同性を有しているものの、遺伝子系統樹では異なる

集団に属した。

病原性については、HA タンパク質の開裂部位のアミノ酸配列から、トリに対して低病原性であることが示唆された。また、A/Shanghai/1/2013 株は A138S を持っており、A/Shanghai/2/2013 株、A/Anhui/1/2013 株、トリおよび環境由来ウイルスは G186V、Q226L を持っていたことから、ヒト型レセプターに対する結合能が増強されている可能性が示唆された。さらに、糖鎖付加部位における置換 T160A を有しておりヒト型レセプターへの結合能増強が示唆された。PB2 タンパク質では、ヒト A(H7N9)は 627K を有しており哺乳類でのウイルス増殖能向上に寄与している可能性が考えられた。いずれの A(H7N9)ウイルスにおいても M2 タンパク質は S31N を有しており、アマンタジン耐性であることが示された。NA タンパク質では、A/Shanghai/1/2013 株のみ R294K を有しておりノイラミニダーゼ阻害薬に対する感受性の低下が示唆されたが、他の A(H7N9)ウイルスはノイラミニダーゼ阻害薬の感受性に関するアミノ酸置換を有してはいなかった。また NA タンパク質の 69-73 アミノ酸領域が欠損しており、哺乳類に対する病原性を高めている可能性が考えられた。PB1 遺伝子は病原性に関与するタンパク質 PB1-F2 の全長をコードしていたが、N66S を有していなかった。NS1 タンパク質では、マウスで病原性の減弱に関与する C 末端の PDZ ドメインが欠損していたがこの影響は不明と考えられる。

D. 考察

ヒトに感染および増殖する能力を与えるアミノ酸置換を HA、PB2 タンパクに有することが明らかになった。NA 遺伝子の解析の結果、分離されたほとんどの A(H7N9)ウイ

ルスはノイラミニダーゼ阻害薬に対し感受性型のアミノ酸を保持していることを示した。また、HA 遺伝子からは、鳥に対しては低病原性である可能性が示唆された。

E. 結論

新たに発生した A(H7N9)ウイルスは、ヒトへの感染能力を獲得していることが考えられ、パンデミックを引き起こす可能性を有していると言える。さらに、遺伝子データベース上には新たに遺伝子配列が公開され続けており、ヒト型レセプターに結合しやすくなる新たな置換 Q222P を HA タンパク質に持つウイルスも報告されている。今後も A(H7N9)ウイルスの拡散および遺伝子配列の変化を監視していく必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

Fujisaki S, Imai M, Takashita E, Taniwaki T, Xu H, Kishida N, Yokoyama M, Sato H, Tashiro M, Odagiri T. Mutations at the monomer-monomer interface away from the active site of influenza B virus neuraminidase reduces susceptibility to neuraminidase inhibitor drugs. *J Infect Chemother.* 2013 Oct;19(5):891-895.

Kishida N, Imai M, Xu H, Taya K, Fujisaki S, Takashita E, Tashiro M, Odagiri T. Seroprevalence of a novel influenza A (H3N2) variant virus in the Japanese population. *Jpn J Infect Dis.* 2013;66(6):549-51.

Takashita E, Fujisaki S, Kishida N, Xu H, Imai M, Tashiro M, Odagiri T; Influenza

Virus Surveillance Group of Japan. Characterization of neuraminidase inhibitor-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated in four seasons during pandemic and post-pandemic periods in Japan. *Influenza Other Respir Viruses*. 2013 Nov;7(6):1390-9.

Kageyama T, Fujisaki S, Takashita E, Xu H, Yamada S, Uchida Y, Neumann G, Saito T, Kawaoka Y, Tashiro M. Genetic analysis of novel avian A(H7N9) influenza viruses isolated from patients in China, February to April 2013. *Euro Surveill*. 2013 Apr 11;18(15):20453.

2. 学会発表

K Nakamura, M Shirakura, A Muto, T Naito, S Fujisaki, M Tashiro, E Nobusawa. Development of candidate vaccine of A/Anhui/1/2013(H7N9) strain by reverse genetics system. *Options for the Control of Influenza VIII*, Cape Town, South Africa, 2013

E Takashita, S Fujisaki, N Kishida, H Xu, M Imai, M Tashiro, T Odagiri. Detection of antiviral-resistant influenza viruses in Japan during pandemic and post-pandemic periods. *Options for the Control of Influenza VIII*, Cape Town, South Africa, 2013

藤崎誠一郎、岸田典子、徐紅、今井正樹、

高下恵美、菅原裕美、土井輝子、佐藤彩、伊東玲子、三浦舞、江島美穂、小口晃央、花巻朝子、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 2012/13シーズンのインフルエンザ流行株と2013/14シーズンのワクチン株 第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013

高下恵美、徐紅、江島美穂、藤崎誠一郎、岸田典子、今井正樹、伊東玲子、菅原裕美、土井輝子、佐藤彩、三浦舞、田代真人、小田切孝人 ノイラミニダーゼ阻害薬耐性変異をもつ A(H7N9)および A(H3N2)インフルエンザウイルス 第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013

中村一哉、白倉雅之、武藤亜紀子、内藤忠相、藤崎誠一郎、田代真人、信澤枝里 鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルスのワクチン製造候補株の開発 第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013

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 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。筆者のグループでこれまでに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 B 型ウイルスの中にはその HA 遺伝子上に鶏卵継代株では抗原性に大きな変化がもたらされることが知られている糖鎖付加部位への変異と同様の変異を生ずる株が有り、鶏卵馴化と類似した抗原変異が起こることが危惧された。筆者は遺伝子変異を起こしたウイルスに対する抗血清を作製し、分離ウイルスの抗原性を評価した。MDCK_N 細胞から分離され、継代途中で HA 遺伝子上の糖鎖付加部位に変異を生じたウイルス株の抗原性は、遺伝子変異を起こす前のウイルスの抗原性と大きな差は観察されなかった。作製した抗血清は、遺伝子変異を起こしていない他の B 型ウイルス分離株やコントロール細胞である MDCK_C 細胞分離株との反応性にも乖離は無く、この遺伝子変異は MDCK_N 細胞分離株の抗原性には大きな変化をもたらさない可能性が示唆された。

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。しかしながら、MDCK_N 細胞か

ら分離した B 型ウイルスの中にはその HA 遺伝子上に鶏卵継代株では抗原性に大きな変化がもたらされることが知られている糖鎖付加部位への変異と同様の変異を生ずる株が存在した。そこで本研究では、MDCK_N 細胞分離株のうち HA 遺伝子上の糖鎖付加部位に変異を起こしたウイルスに対する抗血清を作製し、遺伝子変異株の抗原性について解析を行った。

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