

## 血清学的調査による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

2010/11、2011/12、2012/13、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、4シーズンの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 については2010/11 から3シーズンにわたってワクチン効果を期待できたが、2013/14 シーズンについてはワクチン効果の減弱が懸念された。A(H3N2)ワクチンについては、2010/11 シーズンワクチンについては比較的效果を期待できたが、2011/12、2012/13、2013/14 シーズンワクチンについてはワクチン効果の減弱が懸念された。B型については、2012/13 シーズンについては比較的ワクチン効果を期待できたが、2010/11、2011/12、2013/14 シーズンは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

2010/11、2011/12、2012/13、2013/14 シーズンワクチン接種前後のペア血清（6歳未満の成人層：24人、60歳以上の老人層：24人）を用いて、ワクチン株と最近の代表的な流行株との反応性を赤血球凝集抑制（Hemagglutination inhibition: HI）試験により調べた。試験に用いたウイルスには、ワクチン株およびMDCK細胞または孵化鶏卵分離株を用いた。2010/11、2011/12、2012/13 シーズンのA(H3N2)および2010/11、2011/12 シーズンのBビクトリア系統のワクチンに

ついてはさらに中和試験により反応性を調べた。HI抗体価および中和抗体価からそれぞれ幾何平均値（GMT）を求めて比較した。

#### \*2010/11シーズンワクチン：

A/California/7/2009 (H1N1)pdm09 (X-179A)、

A/Victoria/210/2009 (H3N2) (X-187)、

B/Brisbane/60/2008 (ビクトリア系統)

#### \*2011/12シーズンワクチン：

A/California/7/2009 (H1N1)pdm09 (X-179A)、

A/Victoria/210/2009 (H3N2) (X-187)、

B/Brisbane/60/2008 (ビクトリア系統)

#### \*2012/13シーズンワクチン：

A/California/7/2009 (H1N1)pdm09 (X-179A)、

A/Victoria/361/2011 (H3N2) (IVR-165)、

B/Wisconsin/01/2010 (BX-41A) (山形系統)

\*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：2010/11、2011/12、  
2012/13シーズン分のX-179Aワクチン接種  
者血清は、HI試験において、A(H1N1)pdm09  
流行株と比較的よく反応していたが、  
2013/14シーズンのX-179Aワクチン接種者  
血清は、流行株との反応性が低かった。

A(H3N2)ワクチン：HI試験による解析にお  
いては、4シーズンにわたって、流行株との  
反応性が低かった。そこで2010/11、2011/12、  
2012/13シーズンについて、中和試験により  
反応性を調べたところ、2010/11シーズンの  
X-187ワクチンについては、試験にもちいた  
2010/11シーズンのA(H3N2)流行株の半数以  
上は、ワクチン株のGMTを100%とすると約  
70%以上の高いGMTを示した。しかし、  
2011/12シーズンのX-187ワクチンでは、試  
験にもちいたいずれの流行株のGMTも低か  
った。2012/13シーズンのIVR-165ワクチン  
についても中和試験において2012/13シー  
ズン流行株のGMTは低かった。

Bビクトリア系統ワクチン：2010/11、  
2011/12シーズンのBrisbane/60ワクチン接  
種者血清は、HI試験解析から2010/11と  
2011/12シーズンのビクトリア系統流行株  
との反応性が低いうえに、ホモであるワク

チン株に対しても反応性が低いことがわか  
った。しかし、中和試験解析においては、  
ワクチン株に対して2010/11シーズンH3N2  
ワクチン株 (X-187) で示したGMTと同程度  
のGMTを示すことがわかった。しかし、孵化  
鶏卵で分離した流行株はワクチン株と同程  
度の高いGMTを示したが、細胞で分離した流  
行株はワクチン株の約50%程度のGMTしか示  
さなかった。

B山形系統ワクチン：HI試験解析において、  
2012/13シーズンのB山形系統ワクチン

(BX-41A) 接種者血清はワクチン株に対  
して反応性が低かったが、2012/13シーズンの  
それぞれの野外株とは比較的交差反応性を  
示した。2013/14シーズンのワクチン

(BX-51B) 接種者血清はワクチン株、流行  
株ともに反応性が低かった。

### D. 考察

A(H1N1)pdm09 ワクチン：H3、Bと比較す  
ると、流行株の GMT 値は高い値を示したが、  
感染防御に有効とされる値 40 HI を GMT 値  
はわずかに下回っていた。またその他の欧  
州医薬品庁 (EMA) の基準値も下回っていた。  
よって、これまで効果が期待されてきた  
H1N1pdm09 についてもワクチン効果の減弱  
が懸念された。4 シーズンの間に H1N1pdm09  
は大きな抗原性の変化は認められていない  
が、抗原性の変化がおこりつつあることが  
考えられる。

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-187 ワクチ  
ン製造株の HA レセプター結合付近の 228 番  
目のアミノ酸に置換 (S→T) 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。しかし、中和試験では同一の被

検血清と 2010/11 シーズンに流行した分離株とは比較的良好な交叉反応性を示したことから、この 1 箇所の変換はワクチン効果の低下に影響は小さいと推測された。しかしながら、2011/12 シーズン流行株との反応性は中和試験においても低く、これは、2010/11 シーズンから 2011/12 シーズンには H3N2 流行株の抗原性が変化したことが原因であると考えられた。すなわち、2010/11 シーズンには比較的良好な効果が期待できた X-187 ワクチンは、2011/12 シーズンには効果の減弱が懸念された。2012/13 シーズンの IVR-165 ワクチン株についても、HA のアミノ酸置換が確認され、HI、中和どちらにおいても実際の流行株との反応性は低く、ワクチンの効果が減弱していると考えられた。

**B ビクトリア系統ワクチン:** HI 試験では、2010/11 と 2011/12 シーズンワクチン接種後の血清抗体は、ホモのウイルスを含む全ての株に対して極めて低い GMT しか示さなかったが、中和試験では、H3N2 と同程度の GMT を示したことから、B ビクトリア系統ワクチン Brisbane/60 は H3 ワクチン(X-187) と同等に中和抗体を誘導できることがわかった。B ビクトリア系統ワクチンは HI 抗体価を誘導しにくいと考えられるため、中和試験による評価を行う必要がある。しかし中和試験でも MDCK 細胞分離株には低い交叉反応性しか示さなかった。MDCK 細胞分離株の HA の 197 番目のアミノ酸配列は糖鎖付加が起こる配列であるが、孵化鶏卵馴化のワクチン株の HA の 197 番目には糖鎖が欠損する配列を持つ。この糖鎖の欠損が抗原性だけでなく、中和抗体との反応性にも影響を与えていることが示唆された。

**B 山形系統ワクチン:** HI 試験で、2012/13 シーズンワクチン (BX-41A) 接種後の血清

抗体は、ホモであるワクチン株 (BX-41A) に対して反応性は低かったが、比較的良好な流行株に対しては交叉反応性を示したことから流行株に対してはある程度効果が期待された。2013/14 シーズンワクチン (BX-51B) 接種者の血清抗体価は、ワクチン株 (BX-51B) と流行株のいずれに対しても極めて低い値を示したことから、ワクチン効果の減弱が懸念された。

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必ず生じる問題点であり、これを解決するには、広い交叉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、または比較的良好な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 については 2010/11 から 3 シーズンにわたってワクチン効果が期待できていたが、2013/14 シーズンワクチンについてはワクチン効果の減弱が懸念された。A (H3N2) については、2010/11 シーズンワクチンについては比較的良好な効果を期待できたが、2011/12、2012/13、2013/14 シーズンワクチンについては効果の減弱が懸念された。B 型については、2012/13 シーズンについては比較的良好なワクチン効果を期待できたが、2010/11、2011/12、2013/14 シーズンのワクチンについては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

**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.* 2012 Jun;19(6):897-908.

### 2. 学会発表

**N. Kishida**, H. Xu, H. Sugawara, R. Ito, T. Doi, E. Takashita, S. Fujisaki, M. Ejima, N. Kim, R. Saito, H. Ikematsu, M. Tashiro, and T. Odagiri Cross-reactivity of human serum antibodies elicited by trivalent influenza vaccine for 2010/11 season against influenza A/H3N2 and B viruses isolated in embryonated eggs and MDCK cells.' The IUMS 2011 Sapporo Congress, Sapporo, September, 2011

岸田典子、藤崎誠一郎、横山勝、佐藤裕徳、齋藤玲子、池松秀之、徐紅、高下恵美、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、江島美穂、金南希、佐藤彩、田代真人、小田切孝人「インフルエンザワクチン接種後のヒト血清抗体の交叉反応性をもとに評価した 2010/11 シーズン A(H3N2)および B 型ワクチンの効果」2011 年 12 月東京、第 15 回日本ワクチ

ン学会

## 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

研究協力者：高下恵美

国立感染症研究所 同 第一室

研究協力者：今井正樹

岩手大学農学部共同獣医学科

### 研究要旨

①2011/12, 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 阻害薬感受性試験により薬剤耐性を示す B 型インフルエンザウイルス分離株を検出した。NA 遺伝子解析により特徴的なアミノ酸置換 E105K, Q138R, P139S, G140R を検出した。plaque-purification 法、reverse genetics 法により作製したウイルスを用いて NA 阻害薬感受性試験を行い、これらのアミノ酸置換が薬剤に対する感受性を低下させることを同定した。

②2013 年に中国でヒトから検出された A(H7N9) ウイルスについて、遺伝子解析により病原性およびヒトに対する感染能を推測した。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を獲得していることが明らかになった。またノイラミニダーゼ阻害薬に対し感受性型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

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

①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た。

②データベース上に公開された A(H7N9) ウイルス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、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

①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 873 株について HA および NA 遺伝子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 4 株 (B/KOCHI/41/2011、B/KOCHI/59/2011、B/KOCHI/60/2011、A/KOCHI/61/2011) が検出された。これらの株は抗インフルエンザ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。

他の流行株と NA タンパク質のアミノ酸配列を比較したところ、これら 4 株はそれぞれ 1 つずつ特徴的なアミノ酸置換を有することが明らかになった。具体的には、B/KOCHI/41/2011 株は P139S (139 番アミノ酸が P(プロリン) から S(セリン) に変化)、B/KOCHI/59/2011 株は G140R、B/KOCHI/60/2011 株は Q138R、

B/KOCHI/61/2011 株は E105K を持っていた。そこで、これら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、G140R、Q138R、E105K を 1 つずつ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、これら 4 つのアミノ酸置換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、105、138、139、140 番アミノ酸は NA タンパク質の薬剤結合部位ではなく、NA タンパク質が四量体構造を形成した際に NA タンパク質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、アミノ酸置換に該当する遺伝子はいずれも検出限度以下であった。

②A(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、各亜型の遺伝子配列との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。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 を持つてお

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に対し感受性を保持していることが示唆された。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。

#### D. 考察

①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 タンパク質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, 133, 139, 140 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分離株中に検出した場合には、臨床検体中に存在しているのかどうか解析すべきと考える。

②A(H7N9) ウイルスは、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 と PB2 タンパク質に有することが明らかになった。NA 遺伝子の解析の結果、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であることを示した。

#### E. 結論

①B 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, Q138R, P139S, G140R 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。

②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。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.

Takayama I, Nakauchi M, Fujisaki S, Odagiri T, Tashiro M, Kageyama T. Rapid detection of the S247N neuraminidase mutation in influenza A(H1N1)pdm09 virus by one-step duplex RT-PCR assay. *J Virol Methods.* 2013 Mar;188(1-2):73-5.

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

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

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 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 B 型及び A(H1N1)pdm09 型インフルエンザウイルスについて、その抗原的安定性を評価した。B 型ウイルスの抗原性解析に細胞由来ウイルスを感染させたフェレット抗血清を用いた場合、解析に供したウイルス株はいずれも継代過程において大きく抗原性が変化することは無かった。また、上記解析株の他に MDCK\_N 細胞から分離・継代した B/Victoria 系統ウイルス株の中にはその 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が、そ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がなかった。MDCK\_N 細胞より分離した A(H1N1)pdm09 型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 A(H1N1)pdm09 型ウイルスはほぼ全ての株で長期継代後に抗原性が変化していた。以上の結果から、MDCK\_N 細胞から分離された B 型インフルエンザウイルスは、長期継代や HA 遺伝子変異によって細胞由来ウイルスとしての抗原性が変化することは無く、A(H1N1)pdm09 ウイルス株の抗原性についても比較的安定であり、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有用性が示唆された。

### 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。そこで本研究では、MDCK\_N細胞で分離・継代したB型及びA(H1N1)pdm09型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。また、MDCK\_N細胞から過去に分離したB/Victoria系統ウイルスの中でその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について、フェレット感染抗血清を作製して別途抗原解析を行った。

## 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。07/08、08/09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B型インフルエンザウイルス及び10/11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(H1N1)pdm09ウイルスについて、HI試験による抗原性解析を行った。B/Victoria系統ウイルス株については、過去の解析においてMDCK\_N細胞から分離したウイルスのうち、HA遺伝子上の糖鎖付加部位(214T:アミノ酸番号はホルミルメチオニンから起算した番号)に変異を生じたウイルスの抗原解析も行った。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細胞分離株を使用した。B/Victoria系統ウイル

スのHA遺伝子変異株の解析には、遺伝子変異ウイルスに対するフェレット感染血清を作製し、試験に供した。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。動物実験については国立感染症研究所動物実験実施規定に則り実施した。

## C. 研究結果

### 1. B型インフルエンザウイルスの解析

MDCK\_N、MDCK\_C両細胞から分離されたB/Victoria系統株の抗細胞由来ウイルス抗血清への反応性を解析したところ、継代2代目のウイルスのHI値は両細胞分離株とも基準ウイルスの反応性と比較して1/4程度低い値であった。このHI値は、両細胞分離株とも継代10代目においてもほとんど変化しなかった。

MDCK\_N、MDCK\_C両細胞より分離されたB/Yamagata系統株を用いた解析では、抗細胞由来ウイルス抗血清に対する反応性は基準ウイルスのそれと同等であり、継代2代目と10代目のウイルス間のHI値にも大きな変化は観察されなかった。

### 2. B/Victoria系統ウイルスHA遺伝子変異株の解析

HA遺伝子上の214Tに変異を生じたウイルスに対するフェレット感染抗血清を用い、ホモウイルス抗原のHI値を基準として解析検体のHI値を比較したところ、フェレッ

ト感染抗血清作製に使用したウイルス株で、HA 遺伝子の 214T に変異が生じる前の継代歴の株の HI 価は 1/2 であった。

同じ MDCK\_N 細胞を用いて基準ウイルスと同時期に臨床検体から分離・継代したその他の B/Victoria 系統株は、いずれも HA 遺伝子の 214T に変異を持たなかったが、その HI 価の差異は 1/2~1/4 の範囲内であった。他方、MDCK\_N 細胞に用いたもの同一の臨床検体から MDCK\_C 細胞を用いて分離・継代した B/Victoria 系統のウイルス株は、すべてのウイルスが HA 遺伝子の 214T に変異を持たなかったが、HI 価の差異は 1/2~1/4 の範囲内であった。

### 3. A(H1N1)pdm09 型インフルエンザウイルスの解析

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 1/4~1/16 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に対する反応性は MDCK\_N 細胞分離ウイルス同様、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

イルス抗血清に対して、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

ワクチンシードウイルス分離用候補細胞である MDCK\_N 細胞と、対照である MDCK\_C 細胞から分離された B 型インフルエンザウイルスは、B/Victoria 系統株でも B/Yamagata 系統株でも類似した抗原性を示すことが明らかとなった。

B/Victoria 系統ウイルス株の HA 遺伝子上に生じる糖鎖付加部位 (214T) への変異は、ウイルスを鶏卵で継代した場合にはその抗原性を著しく変化させることが知られており、HI 試験における鶏卵継代変異株に対するフェレット感染血清の野外株への反応性は、ホモウイルス抗原に対する反応性と比較すると 8 倍以上の低下となる場合が多い。筆者らのグループにおいて MDCK\_N 細胞を用いて分離したウイルス株がその継代過程で HA 遺伝子上の 214T に変異を生じたことは、MDCK\_N 細胞分離株の抗原的安定性について、ワクチンシードとしての適性が危惧された。しかしながら、HA 遺伝子上の 214T に変異を持つウイルス株に対するフェレット感染血清の反応性は、遺伝子変異の有無にかかわらず、全ての MDCK\_N、MDCK\_C 細胞分離株に対して HI 価として 4 倍以内の差異に止まっていた。従って今後更なる解析が必要であるが、MDCK\_N 細胞分離 B/Victoria 系統ウイルス株の抗原的安定性は、HA 遺伝子上の 214T に生じる変異に左右されない可能性が示唆された。

MDCK\_N 細胞より分離された A(H1N1)pdm09 型ウイルスは、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

かとなった。MDCK\_C 細胞分離 A(H1N1)pdm09 型ウイルスでは、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 A(H1N1)pdm09 型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。これら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 A(H1N1)pdm09 型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。

以上の結果から、分離ウイルスの抗原的安定性という側面において、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。しかしながら、MDCK\_N 細胞を A(H1N1)pdm09 型ウイルス分離や継代に用いる場合、ウイルスの抗原性変化と強い相関が観察された HA 遺伝子上の点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 B 型インフルエンザ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類似し、長期に渡る継代においても細胞由来基準ウイルスに対する抗原性に関してほとんど変化することは無かった。また、HA 遺伝子上の 214T に変異を持つ MDCK\_N 細胞由来 B/Victoria 系統株に対するフェレット抗血清は、抗原ウイルスの遺伝子変異の有無やウイルス分離に用いた細胞に関らず、解析したすべてのウイルス抗原に対する反応性に大きな乖離は観察されなかった。それ故、MDCK\_N 細胞がワクチンシードウイルス分離用培養細胞として有用であることが、分離ウイルスの抗原的安定性の面からも示唆された。

一方、MDCK\_N 細胞を用いて分離・継代した A(H1N1)pdm09 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ったが、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(H1N1)pdm09 ウイルス分離に用いる場合、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)

Yuichi Harada, Ai Ninomiya-Mori,  
Yoshimasa Takahashi, Masayuki  
Shirakura, Noriko Kishida, Tsutomu  
Kageyama, Yoshikazu Tada, Masato  
Tashiro, Takato Odagiri  
Inactivated and adjuvanted  
whole-virion clade 2.3.4 H5N1

pre-pandemic influenza vaccine possesses broad protective efficacy against infection by heterologous clades of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus in mice.

Vaccine. 29(46): 8330-8337, 2011

原田勇一、板村繁之

インフルエンザワクチン

日本臨牀, 日本臨牀社, 69 (9): 1567-1570, 2011

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

Yuichi Harada, Hitoshi Takahashi, Masayuki Shirakura, Eri Nobusawa, Norio Yamamoto, Kazuya Nakamura, Itsuki Hamamoto, Hideki Asanuma, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Shigeyuki Itamura

Growth ability of reverse genetically generated influenza A/H1N1pdm09 viruses in MDCK and LLC-MK2 cell lines. XV International Congress of Virology, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, September 2011

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

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

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

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

#### **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。本研究では A 型インフルエンザウイルスの A(H1N1)pdm09 株と H3N2 株、B 型インフルエンザウイルスの B/Victoria 系統株と B/Yamagata 系統株に関して解析を行った。様々な培養細胞を用いてウイルス分離・継代を行う過程において、多くのウイルス株で HA 遺伝子に変異導入がみられた。本研究で使用した培養細胞で分離・継代したウイルス株は遺伝的安定性が保持されにくいことが明らかとなり、今後これらの変異と抗原性変化の関連について調べていくことが重要であると考えられた。

### 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

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) や無血清培地に馴化させた MDCK 細胞 (MDCK\_Niid) 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 株と H3N2 株、B 型インフルエンザウイルスの B/Victoria 系統株と B/Yamagata 系統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 代目から 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。

ウイルスの遺伝子解析を行うための方法として、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流出することはない。

### C. 研究結果

MDCK\_N、MDCK\_Niid 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、各細胞で分離・継代されたウイルス株は 10 継代を経ても変異導入が確認されないものがあったが、多くのウイルス株には継代中に HA 遺伝子への変異導入が確認された。同一検体の分離・継代にも関わらず、使用した細胞により変異導入箇所に相違がみられた。また、この変異導入が確認された部位の多くは抗原性やレセプター結合、糖鎖付加に影響するとされる部位であった。一方、NA 遺伝子への変異導入は HA 遺伝子と比較して低頻度であり、変異導入が確認された部位の一つは糖鎖付加に影響するとされる部位であった。

### D. 考察

MDCK\_N、MDCK\_Niid および MDCK\_C 細胞で各型・亜型のインフルエンザウイルスを分

離・継代する過程で、HA および NA 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、HA 遺伝子には高頻度に変異出現が観察され、遺伝的安定性が保持されにくいことが示された。導入された変異の多くは抗原性やレセプター結合、糖鎖付加に影響を与えるとされ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、観察された変異導入箇所は同一検体の分離・継代にも関わらず、使用した細胞により異なっている場合が多く、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。以上の結果から、本研究で使用した培養細胞で分離・継代したウイルス株は遺伝的安定性が保持されにくいことが明らかとなった。今後これらの変異が抗原性維持に不利益となるものであるかを調べるために、抗原性変化との関連について検討していくことが重要であると考えられた。

### E. 結論

ウイルス株の分離・継代を行う過程において、今回使用した培養細胞ではウイルス株の遺伝的安定性は保持されにくいことが示された。今後これらの観察された変異と抗原性変化の関連について調べていくことが重要であると考えられた。

### 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

Hitoshi Takahashi, Yuichi Harada, Noriko Shimasaki, Kazuya Nakamura, Itsuki Hamamoto, Norio Yamamoto, Takato Odagiri, Shigeyuki Itamura, Masato Tashiro : Inefficient ability of LLC-MK2 cells in supporting the growth of influenza viruses isolated from clinical specimens: Analysis of adaptation of viruses to LLC-MK2 cells and underlying mechanism.

International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, September 2011

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

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

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

小林(石原) 美栄、高橋 仁、西村 研吾、

高山 郁代、大西 和夫、板村 繁之、影山 努、

横田(恒次) 恭子

H5N1 インフルエンザウイルス高感度検出系開発に向けた H5HA 特異的抗体のエピトープ解析

第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月

杉村 哲、高橋 仁、城内 健太、大塩 木乃実、

金山 雅也、田墨 恭子、谷畑 葉子、三浦 裕、

藤原 大介、山本 典生

L. lactis JCM5805 株摂取によるプラズマサイトイド樹状細胞活性化を介したウイルス性呼吸器感染症抑制効果の検証

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、2013 年 11 月