

201420008A

厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業

WHO 世界インフルエンザ監視対応ネットワークを駆使したわが国の
インフルエンザ株サーベイランスシステムの強化と基盤整備、
ワクチン株の検索および国際協力に関する研究

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小田切孝人

平成27年(2015)3月

目 次

I. 総括研究報告書

- WHO 世界インフルエンザ監視対応ネットワークを駆使したわが国のインフルエンザ株
サーベイランスシステムの強化と基盤整備、ワクチン株の検索および国際協力に関する研究
研究代表者： 小田切孝人 _____ P1

II. 分担研究報告書

1. 抗インフルエンザ薬耐性株発生状況の迅速な把握および情報提供および地方衛生研究所
ならびに海外インフルエンザセンターとの連携強化に関する研究
渡邊真治 _____ P9
研究協力者：高下恵美
 2. ワクチン候補株の免疫原性、適正の検討
浅沼秀樹 _____ P13
 3. インフルエンザ株サーベイランスにおける H3N2 亜型株の抗原性解析法の改良と導入
中村一哉 _____ P21
 4. インフルエンザウイルス分離株についての遺伝子解析
藤崎誠一郎 _____ P25
研究協力者：白倉雅之
 5. ワクチン製造用 MDCK 細胞でのウイルス分離効率、適性の解析
原田勇一 _____ P27
 6. MDCK (NIID-MDCK) 細胞で分離したワクチン候補種ウイルスの遺伝的および
抗原的安定性の評価
高橋仁 _____ P31
- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 _____ P35

I. 総括研究報告書

WHO 世界インフルエンザ監視対応ネットワークを駆使したわが国の インフルエンザ株サーベイランスシステムの強化と基盤整備、 ワクチン株の検索および国際協力に関する研究

研究代表者 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・センター長

研究要旨 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（感染研インフルセンター）は、WHO 世界インフルエンザ監視対応ネットワーク（WHO-GISRS）の中核メンバーであるインフルエンザ協力センター（WHO Collaborating Center, WHO-CC）に指定されており、北京の WHO-CC とともに東アジア地域のインフルエンザ対策および株サーベイランスを牽引し、当該地域で起こる季節性および動物由来インフルエンザウイルスへのヒト感染の発生と動向監視およびウイルスリスク評価、さらには流行株の収集と性状解析を担当している。周辺諸国のインフルエンザセンターへのサーベイランスキットの無償供与、PCR 検査および株サーベイランス技術支援等の国際貢献を遂行することにより、WHO が進める世界インフルエンザ施策に直接的に参画し議決権を確保している。新型インフルエンザ発生時には WHO-CC として原因ウイルスの情報や分離ウイルスが優先的に供与され、これにより、わが国の新型インフルエンザ対策を迅速に進めることが可能となっている。また、季節性インフルエンザワクチン施策においても、海外からワクチン製造株を無償で供与される権利を確保していることから、わが国のインフルエンザワクチン株選択において、WHO の指針や諸外国の動向を適宜取り入れることができ、諸外国の動向から取り残されずにすみ、わが国のインフルエンザ対策へ直接的な貢献となっている。また、WHO-CC 機能を維持することにより、WHO の政策策定の際にはわが国や東アジア諸国にとって不利益な決定がなされないように監視と提言をし続けることができる。一方、国内のインフルエンザ対策においては、国内インフルエンザセンターとして全国地方衛生研究所（地衛研）と連携して全国各地から流行株を収集し、それらの性状を分析し、週単位で情報還元を行い、さらに、次シーズン向けのワクチン株の検索と選定を行った。さらに、鳥インフルエンザ A(H5N8)の国内侵入および養鶏場でのアウトブレイクにおいては、現行の PCR 検査系の再確認と地衛研への情報提供を適宜行い、新型インフルエンザ対策の初動対応にも迅速に対応した。さらに、次世代ワクチンである細胞培養インフルエンザワクチンの実用化に向けた開発研究への支援も行い、導入への基盤整備を行った。

A. 研究組織

研究代表者			エンザウイルス研究センター 室長
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 センター長	浅沼秀樹	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 室長
研究分担者		中村一哉	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
渡邊真治	国立感染症研究所インフル		

	主任研究官
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 研究員
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
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

B. 研究目的

WHO は、世界 143 か所の National Influenza Center (NIC) と 6 か所の WHO-CC との連携からなる世界インフルエンザ監視対応ネットワーク(GISRS)を構築している。感染研インフルセンターは、東アジア地域を担当する WHO-CC の一つとして、季節性及び新型インフルエンザウイルスの流行監視と当該地域から分離株の収集、分析および情報発信を担ってきた。毎年の WHO インフルエンザワクチン推奨株の選定においては、当センターは、わが国および東アジア地域の流行株情報がワクチン株選定に反映されるよう WHO へ情報提供してきた。

一方、2003 年から家禽やヒトでの感染が続いている H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルス対策においては、感染研インフルセンターは、GISRS をとおして適宜情報収集し、中東・エジプトおよび東南アジア諸国から最新の H5N1 分離株を入手し、ワクチン種株の開発や H5N1 備蓄ワクチンの更新など、わが国の新型インフルエンザ対策に貢献してきた。さらに、2013 年に中国で H7N9 鳥インフルエンザウイルスのヒト感染事例においては、中国 CDC からウイルス遺伝子情報をいち早く入手し、ウイルスリスク評価およびパンデミックリスク評価を行い、国内外の関係機関へ情報を提供した。この分析情報は、WHO の H7N9 ウイルスリスク評価ガイドライン作成の基盤情報となり、タ

イムリーな国際貢献として高く評価されている。

本研究では、季節性および新型インフルエンザ株サーベイランス体制の維持、強化のため国内においては地方衛生研究所、海外においては周辺諸国よび GISRS の NIC と連携し、流行株の収集と解析力を補強し、より適切なワクチン株選定に貢献する。また、薬剤耐性株サーベイランスを技術的に支援する。これらの活動をとおして、WHO のインフルエンザ対策に直接的に参画し、わが国のインフルエンザ対策にもそれらの政策を反映させ、国際的な施策から遅れを取らないようにする。また、細胞培養インフルエンザワクチンの実用化に向けて、本研究では、わが国の細胞培養季節性ワクチン導入への基礎的な研究により、実用化への基盤整備の支援を行う。

C. 研究方法

- 1) 株サーベイランスに用いるウイルス分離用細胞株
MDCK 細胞およびヒト型レセプターを過剰発現させた MDCK-SIAT1 細胞(SIAT1)を用いた。
- 2) 供試ウイルス株
2013/2014 および 2014/2015 シーズンに全国地方衛生研究所(地衛研)においてインフルエンザ患者の検体から分離され、感染症サーベイランスシステム NESID に登録された分離株の約 10% について収集。また、周辺諸国(モンゴル、ミャンマー、台湾、ラオス等)からも流行株を収集。
- 3) ウイルス分離の抗原性、遺伝子解析
ワクチン株に対する流行株の抗原性の乖離度合いをフェレット感染血清を用いて、赤血球凝集抑制(HAI)試験で実施。また、H3N2 ウイルスについては、適宜、反応液に最終濃度 20nM のオセルタミビルを添加し、正確な HAI 試験を実施。また、被験ウイルスによっては、マイクロ中和試験

を用いた。

- 4) 流行株の進化系統樹解析により、前シーズンからの遺伝子分別トレンドを把握した。また、抗ウイルス薬への感受性試験は、オセルタミビル、ザナミビル、ペラミビルおよびラニナミビルに対する感受性試験を実施し、IC50 値を算出した。さらにウイルスの NA 遺伝子解析により、既知の薬剤耐性マーカーの有無を検索した。

5) 感染防御実験

2011/12 シーズンの H3N2 亜型 A/Victoria/361/2011 ワクチン類似株から、不活化抗原を作製し、フェレットに2回接種し、免疫原性、抗体応答および感染防御を検討した。

- 6) 品質管理された MDCK 細胞 (NIID-MDCK) を用いた細胞培養ワクチン開発用種ウイルスの回収。2010/11、2012/13、2013/14 シーズンにインフルエンザ様疾患を呈した患者より採取された臨床検体から、NIID-MDCK 細胞を用いてウイルス分離回収を行った。それらを同細胞で3代目から5代目まで継代し、ウイルスの遺伝子および抗原性の解析を既報に従って実施した。

D. 結果

1. インフルエンザ株サーベイランス体制の連携強化と WHO ワクチン株選定への直接的な参画

国内流行株の収集と解析は、地衛研との連携により、毎年 5000~7000 株が国内では分離検出される。そのうちの約 10% に相当する分離株について、地域的な偏りが生じないようにランダムに選定して、感染研インフルセンターでフェレット感染抗血清を用いて詳細な抗原解析、遺伝子進化系統樹解析、薬剤感受性試験を実施した。これにより、国内流行株の性状、ワクチン株と抗原性の違い等について評価を行い、次期ワクチン候補株の検索と選定のための科

学的な成績を提供した。

一方、海外の流行株については、WHO-CC として、日本周辺諸国の NIC (韓国、モンゴル、ミャンマー、ラオス、ネパール、台湾) へ抗原抗体サーベイランスキットを配布し、株サーベイランスの技術支援を行った。この国際貢献を背景に、海外 NIC (今シーズンはモンゴル、ミャンマー、台湾、ラオス等) から分離株の供与を依頼し、入手できたウイルスについては国内分離株と同様な解析を実施し、成績はウイルス供与国へ還元した。

感染研インフルセンターで得られた国内外の流行株の解析成績は、WHO ワクチン株選定会議へ提供し、日本および東アジア地域の情報が反映されたワクチン株の選定となるよう、WHO のワクチン株選定に直接的に参画した。

2. 国内インフルエンザワクチン株選定への支援

WHO ワクチン株選定会議へ WHO-CC 東京センター長として参加していることから、世界中のインフルエンザ流行株の解析情報が入手できる。また、適切なワクチン候補株を適時に優先供与される。この利点を基盤にして、国内流行株の解析状況、ワクチン候補株の準備状況、WHO ワクチン推奨株の情報など、入手できる全ての成績と情報を国内ワクチン株の選定会議に提供した。これによって、次シーズン向けの国内ワクチン株選定に貢献した。

3. 国内インフルエンザ株サーベイランス体制の見直しと連携強化

最近の A(H3N2) 流行株は、ウイルス分離に用いている通常の MDCK 細胞で培養すると NA 遺伝子に変異が入り、NA 蛋白にも赤血球凝集活性が備わり、これによって正確な抗原解析ができない状況になっている。このため、遺伝子変異が起こらない特殊な MDCK 細胞で臨床検体からウイルス分離する必要性が出てきた。このため、地衛研がサーベイランスで収集した臨床検体を感染研にも分与できる仕組みを厚労省結核感染症課の支援のもとに整備し

た。すなわち、株サーベイランスは感染症法第 15 条および予防接種法第 23 条第 4 項に基づく国の事業として実施していることから、感染研への臨床検体の分与には倫理審査は不要で、インフォームドコンセントも不要である。この確認と地衛研との情報共有により、地衛研からの分与協力も得られることになり、分離株と臨床検体の供与基盤が国内サーベイランスで整備された。

4. 株サーベイランスの実施を円滑にするため、地衛研担当者への情報提供、技術的問題点、改善への相談、支援を行った。また、海外からの研修生への技術指導、共同研究の協議等を実施した。

5. 2013/14 および 2014/15 シーズンに国内で分離されたインフルエンザウイルスについて遺伝子解析を行った。A(H1N1)pdm09、A(H3N2)、B 型山形系統、ヴィクトリア系統ウイルスについて抗原性および薬剤耐性に関与するアミノ酸の変化を解析した。

6. ワクチン接種前後のペア血清を入手し、ワクチンの有効性に関する評価を実施。この成績は WHO および国内ワクチン株選定の参考資料として活用された。

7. 株サーベイランスで検出された変異株等の重点解析株について、フェレット抗血清を作製し、そのリスク評価を行った。また、細胞培養系で製造した季節性インフルエンザワクチンの免疫誘導能および防御効果を検討するため、臨床検体から MDCK 細胞で分離し増殖させた H3N2 株の不活化抗原を作製し、フェレットに接種後、免疫応答および防御効果を検討した。

8. 細胞培養季節性インフルエンザワクチンの開発を見据えて、過去 2 シーズン中に採取された臨床検体を確保する基盤を整備し、臨床検体からのウイルスの回収とその性状について検討した。

9. ワクチン製造向けに安全性の検証された細胞 (NIID-MDCK 細胞) で分離したウイルスについて、増殖性、ウイルス抗原性の安定性等の

検証を行い、本細胞の有用性を検討した。

10. NIID-MDCK 細胞から臨床検体を用いて分離継代した各型・亜型ウイルス株は、多くの株が流行の主流となっている株と抗原的および遺伝的に同等であり、ワクチン製造用ウイルス株として使用可能であることを確認した。

E. 考察

改正感染症法が平成 28 年度から施行され、これによって法的にサーベイランス体制の強化が図られる。現行の国内株サーベイランス体制を維持しつつ、流行株の性状変化に応じた改善をし、地衛研との連携をより強固なものにしなければならない。また、海外の NIC への情報提供、技術支援を継続し、周辺諸国での流行状況も正確に把握し、WHO へ情報提供を継続する。これによって、新型ウイルスとなる可能性を秘めたウイルス発生の際にはワクチン製造候補株を優先的に確保でき、また、WHO インフルエンザ施策の実施において発言権を維持できる。これは、国内インフルエンザ対策の推進とワクチン施策の実施にとって、直接的に影響するので、今後も現行の役割を維持し、国際貢献を継続する。

細胞培養季節性インフルエンザワクチンが 5 年以内を目途に実用化され、本格導入の方針で準備が進められている。本研究でその基礎研究部分を支援した。感染研で開発したワクチン製造用種ウイルス分離用の細胞が使用可能であることが確認されたことから、今後は細胞培養ワクチン研究班で、実用化まで開発研究が進められることを期待する。

F. 結論

- ・国内地衛研および周辺諸国の NIC と連携して、インフルエンザ株サーベイランスを実施。
- ・サーベイランス事業で収集した臨床検体を感染研へ供与する枠組みができた。
- ・細胞培養季節性インフルエンザワクチンの導入に向けての基盤整備、初期研究開発の支援を

実施。感染研開発の精度管理された MDCK 細胞は、ワクチン製造用種ウイルスの供給に有効であることを確認した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Barr IG, Russell C, Besselaar TG, Cox NJ, Daniels RS, Donis R, Engelhardt OG, Grohmann G, Itamura S, Kelso A, McCauley J, Odagiri T, 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 WHO recommendations for the viruses used in the 2013-2014 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*. 2014 Aug 20;32(37):4713-25
- 2) Yamanaka A, Iwakiri A, Yoshikawa T, Sakai K, Singh H, Himeji D, Kikuchi I, Ueda A, Yamamoto S, Miura M, Shioyama Y, Kawano K, Nagaishi T, Saito M, Minomo M, Iwamoto N, Hidaka Y, Sohma H, Kobayashi T, Kanai Y, Kawagishi T, Nagata N, Fukushi S, Mizutani T, Tani H, Taniguchi S, Fukuma A, Shimojima M, Kurane I, Kageyama T, Odagiri T, Saijo M, Morikawa S: Imported case of acute respiratory tract infection associated with a member of species nelson bay orthoreovirus. *PLoS One*. 2014 Mar 25;9(3):e92777

- 3) Adam Meijer, Helena Rebelo-de-Andrade, Vanessa Correia, Terry Besselaar, Renu Drager Dayal, Alicia Fry, Vicky Gregory, Larisa Gubareva, Tsutomu Kageyama, Angie Lackenby, Janice Lo, Takato Odagiri, Dmitriy Pereyaslov, Marilda M. Siqueira, Emi Takashita, Masato Tashiro, Dayan Wang, Sun Wong, Wenqing Zhang, Rod S. Daniels, Aeron C. Hurt: Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2012-2013 *Antiviral Research*. 2014, Oct;110:31-41

- 4) Takashita E, Ejima M, Itoh R, Miura M, Ohnishi A, Nishimura H, Odagiri T, Tashiro M.: A community cluster of influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting cross-resistance to oseltamivir and peramivir in Japan, November to December 2013. *Euro Surveill*. 2014 Jan 9;19(1)

- 5) Yasuko Tsunetsugu-Yokota, Kengo Nishimura, Shuhei Misawa, Mie Kobayashi-Ishihara, Hitoshi Takahashi, Ikuyo Takayama, Kazuo Ohnishi, Shigeyuki Itamura, Hang L. K. Nguyen, Mai T. Q. Le, Giang T. Dang, Long T. Nguyen, Masato Tashiro, Tsutomu Kageyama.: Development of a sensitive novel diagnostic kit for the highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus. *BMC Infect Dis*. 3;14(1):362-, 2014

2. 学会発表

- 1) 小田切孝人 A(H7N9)インフルエンザとワクチン開発 第 55 回臨床ウイルス学会

- 2014年6月 札幌
- 2) 高下恵美、江島美穂、藤崎誠一郎、横山勝、中村一哉、白倉雅之、菅原裕美、佐藤彩、佐藤裕徳、小田切孝人、全国地方衛生研究所. 2013/14シーズンにおけるNA阻害剤耐性A(H1N1)pdm09ウイルスの地域流行. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月10-12日 横浜.
 - 3) 酒井宏治、網康至、田原舞乃、久保田耐、安楽正輝、中島典子、高下恵美、関塚剛史、駒瀬勝啓、信澤枝里、小田切孝人、前中勝実、黒田誠、長谷川秀樹、河岡義裕、田代眞人、竹田誠 II型膜貫通型セリンプロテアーゼ TMPRSS2 は HA 開裂部位に mono-basic なアミノ酸配列をもつ A型インフルエンザウイルスに対する肺内必須活性化酵素である 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月10-12日 横浜.
 - 4) 内藤忠相、齋藤峰輝、信澤枝里、小田切孝人、田代眞人 インフルエンザウイルスのゲノム変異導入率を生業する RNA ポリメラーゼの機能領域 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月10-12日 横浜.
 - 5) 川上千春、高下恵美、藤崎誠一郎、江島美穂、七種美和子、宇宿秀三、小田切孝人 過去3シーズンに混合流行した B型インフルエンザウイルスの遺伝子解析 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月10-12日 横浜.
 - 6) 浅沼秀樹、相内章、許斐奈美、佐藤佳代子、田代眞人、小田切孝人 フェレットに対する免疫原性を基盤とした細胞培養ワクチン用種株選定法の確立 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月10-12日 横浜.
 - 7) A Yoppy R Candra, Anna L Poetranto, Aldise M Nastro, Edith F Puruhito, 横田(恒次)恭子, 西村 研吾, 影山 努, 高原 悠佑, 堀田 博, 清水 一史. Comparative analysis for the detection of avian influenza H5N1 virus by using a novel luminescence analyzer(POCube) and real-time RT-PCR. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月 横浜
 - 8) 高山 郁代, Nguyen Trung Hieu, 中内 美名, 高橋 仁, Nguyen Thanh Long, 小田切 孝人, 田代 眞人, 影山 努. 2014年にベトナムでヒト感染が確認された高病原性鳥インフルエンザ A(H5N1)ウイルスの遺伝子解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月 横浜
 - 9) 齊藤慎二、Elly van Riet、相内章、鈴木忠樹、池田千将、伊藤良、泉池恭輔、高橋宣聖、浅沼秀樹、小田切孝人、田代眞人、田村慎一、竹山春子、長谷川秀樹 高病原性鳥インフルエンザ A(H5N1)ウイルスの経鼻不活化全粒子ワクチンにより誘導されたヒトモノクローナル抗体の特異性 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月 横浜
 - 10) 長谷川秀樹、相内章、鈴木忠樹、川口晶、田村慎一、小田切孝人、田代眞人、倉田毅 経鼻不活化全粒子インフルエンザワクチンと現行皮下接種ワクチンの抗体応答の比較 第18回日本ワクチン学会学術集会. 2014年12月 福岡
 - 11) 齊藤慎二、Elly van Riet、相内章、鈴木忠樹、大原有樹、池田千将、伊藤良、泉池恭輔、高橋宣聖、浅沼秀樹、小田切孝人、田代眞人、田村慎一、竹山春子、長谷川秀樹 経鼻不活化全粒子インフルエンザワクチンにより誘導されたヒトモノクローナル抗体の特性解析 第18回日本ワクチン学会学術集会. 2014年12月 福岡
 - 12) 相内章、鈴木忠樹、齊藤慎二、田村慎一、幸義和、小田切孝人、田代眞人、清野宏、長谷川秀樹 経鼻インフルエンザワクチンの動態と抗体応答 第18回日本ワクチン学会学術集会. 2014年12月 福岡

- チン学会学術集会. 2014年12月 福岡
- 13) 佐藤佳代子、浅沼秀樹、高橋宣聖、阿戸学、小田切孝人、板村繁之 剤形の異なるインフルエンザワクチンにより誘導される抗体の性状に対するTLRアゴニストの影響 第18回日本ワクチン学会学術集会. 2014年12月 福岡

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

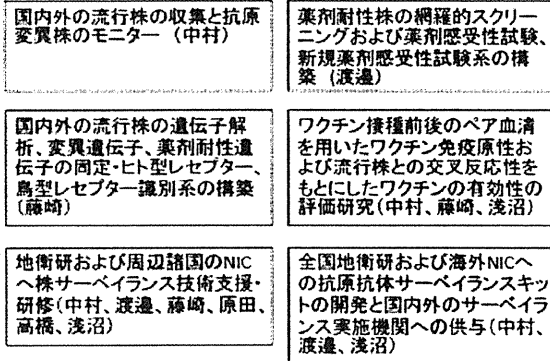
無し

3. その他

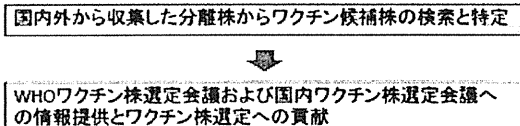
無し

WHO世界インフルエンザ監視対応ネットワークを駆使したわが国のインフルエンザ株サーベイランスシステムの強化と基盤整備、ワクチン株の検索および国際協力に関する研究

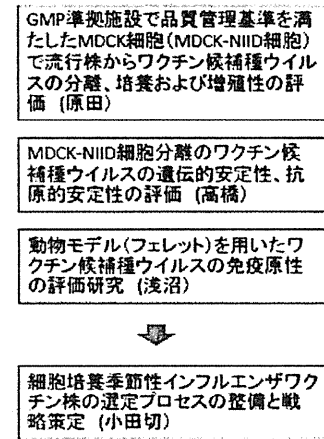
季節性および新型インフルエンザ株サーベイランスおよび薬剤耐性株サーベイランス、ワクチン候補株の検索、流行株のリスク評価に関する研究（統括:小田切）



WHOインフルエンザ協力センターとしての役割、施策の実施



オリジナル臨床検体からのワクチン株の確保および戦略検討



II. 分担研究報告書

抗インフルエンザ薬耐性株発生状況の迅速な把握および情報提供 および地方衛生研究所ならびに海外インフルエンザセンターとの 連携強化に関する研究

研究分担者 渡邊 真治

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・室長

研究協力者 高下 恵美

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 抗インフルエンザ薬耐性株の発生とその流行状況を迅速に把握し、その情報を発信することは、薬剤の種類を考慮するなどの対策を早急に行えるため、公衆衛生上非常に重要であり、本研究により遂行することができた。また、国内外のインフルエンザ株サーベイランスを円滑に実行することは、インフルエンザウイルスの流行状況を把握するために不可欠である。本研究により地方衛生研究所、海外インフルエンザセンターとのサーベイランスについての情報交換、情報共有を行うことができた。今後もこれらを継続していくことが重要である。

A. 研究目的

インフルエンザの治療には主に、インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ（NA）蛋白質を標的とする NA 阻害剤（オセルタミビル、ペラミビル、ザナミビル、ラニナミビル）が使用されている。世界各国で分離されるインフルエンザウイルスのほとんどは上記の抗インフルエンザ薬に対して感受性であるが、散発的に、NA 蛋白質に特徴的なアミノ酸変異（H275Y）をもつオセルタミビル・ペラミビル耐性ウイルスが検出されている。日本を含む東アジア地域における薬剤耐性ウイルスの発生状況の迅速な把握および速やかな情報提供が本研究の目的である。

また、WHO 世界インフルエンザ監視対応ネットワークを通して得られた技術的な問題点やその改善方法等を含む情報を株サーベイランスに役立てるために、速やかに地方衛生研究所（地衛研）へ提供し共有することが目的である。さらに、海外（東および東南アジアなど）との株サーベイランスの強化を図るために、技

術支援や情報共有することが目的である。

B. 研究方法

日本、ラオス、ネパール、モンゴル、台湾およびベトナムの分離株について、MUNANA 基質を用いた蛍光法により、オセルタミビル、ザナミビル、ペラミビルおよびラニナミビルに対する感受性試験を実施し、IC₅₀ 値を算出した。さらにウイルスの NA 遺伝子解析により、既知の薬剤耐性マーカーの有無を検索した。また、国内の A(H1N1)pdm09 株については、地衛研において、NA 遺伝子解析による H275Y 耐性変異のスクリーニングを行った。

地方衛生研究所とのやり取りは、E メールあるいは電話で行った。海外とのやり取りは、E メールをはじめ、研修で国立感染症研究所（感染研）を訪問中の研究者と直接協議を行った。

（倫理面への配慮）

該当無し

C. 研究結果

国内株はA(H1N1)pdm09ウイルス2,531株、A(H3N2)ウイルス326株およびB型ウイルス317株、また、海外株はA(H1N1)pdm09ウイルス74株、A(H3N2)ウイルス46株およびB型ウイルス36株について解析を行った。その結果、国内では北海道を中心にオセルタミビル・ペラミビル耐性A(H1N1)pdm09ウイルスが105株検出され、検出率は4.1%であった。A(H3N2)ウイルスおよびB型ウイルスでは耐性株は検出されなかった。また海外株はすべて感受性株で耐性株は検出されなかった。解析結果は感染研ウェブサイト上で毎週公表し、自治体や医療機関に情報提供を行った。また、各国のナショナルインフルエンザセンターに対して随時結果を報告した。

地衛研への情報提供に関しては、例えばサーベイランスで使用されているキットの保存方法の改善策を提案したり、A(H3N2)ウイルスの性状がこれまでと違ってきている実情を鑑みウイルス分離における情報共有を図り、地衛研での現状を把握したりした。海外との連携として、感染研を訪問中の研修生とは、日本と現地とのサーベイランスの情報交換を行い、技術的な問題点の改善策を提案した。また、WHO協力センターとして参照ウイルスやキットの提供を行い、相手国のサーベイランスの支援を行った。

D. 考察

国内におけるオセルタミビル・ペラミビル耐性ウイルスの検出率は、過去5シーズンにわたって0.5-2%前後であったが、2013/14シーズンには4.1%に達した。北海道内における耐性ウイルスの検出率は28%、北海道外では2.8%となり、北海道内で耐性ウイルスが地域流行したと考えられる。2013/14シーズンにおける耐性ウイルスの検出率の上昇は、米国および中国でも報告されており、今後の動向に注意が必要である。

地衛研との情報共有により、日本でのサーベイランスが円滑に進められていると思われる。また海外との情報交換、支援を通して、近隣諸国との信頼関係が構築され、インフルエンザ株サーベイランスにおける国際協力がなされていると考えられる。

E. 結論

北海道を中心にオセルタミビル・ペラミビル耐性A(H1N1)pdm09ウイルスの地域流行が起こった。耐性ウイルスの検出は同時期に海外でも増加しており、今後も耐性ウイルスの監視を継続する必要がある。

国内外のインフルエンザ株サーベイランスを継続して円滑に進めるために、情報提供・情報共有は大変重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Watanabe T, Kawakami E, Shoemaker JE, Lopes TJ, Matsuoka Y, Tomita Y, Kozuka-Hata H, Gorai T, Kuwahara T, Takeda E, Nagata A, Takano R, Kiso M, Yamashita M, Sakai-Tagawa Y, Katsura H, Nonaka N, Fujii H, Fujii K, Sugita Y, Noda T, Goto H, Fukuyama S, Watanabe S, Neumann G, Oyama M, Kitano H, Kawaoka Y. Influenza virus-host interactome screen as a platform for antiviral drug development. *Cell Host Microbe* 16:795-805, 2014.
- 2) Watanabe T, Zhong G, Russell CA, Nakajima N, Hatta M, Hanson A, McBride R, Burke DF, Takahashi K, Fukuyama S, Tomita Y, Maher EA, Watanabe S, Imai M, Neumann G, Hasegawa H, Paulson JC, Smith DJ, Kawaoka Y. Circulating avian influenza viruses closely related to the 1918 virus

- have pandemic potential. *Cell Host Microbe* 15:692-705, 2014.
- 3) Katsura H, Piao Z, Iwatsuki-Horimoto K, Akeda Y, Watanabe S, Horimoto T, Oishi K, Kawaoka Y. A bivalent vaccine based on a replication-incompetent influenza virus protects against *Streptococcus pneumoniae* and influenza virus infection. *J Virol* 88:13410-13417, 2014.
 - 4) Watanabe T, Watanabe S, Maher EA, Neumann G, Kawaoka Y. Pandemic potential of avian influenza A (H7N9) viruses. *Trends Microbiol* 22:623-631, 2014.
 - 5) Meijer A, Rebelo-de-Andrade H, Correia V, Besselaar T, Drager-Dayal R, Fry A, Gregory V, Gubareva L, Kageyama T, Lackenby A, Lo J, Odagiri T, Pereyaslov D, Siqueira MM, Takashita E, Tashiro M, Wang D, Wong S, Zhang W, Daniels RS, Hurt AC. Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2012-2013. *Antiviral Res.* 2014 Oct;110:31-41.
 - 6) Takashita E, Meijer A, Lackenby A, Gubareva L, Rebelo-de-Andrade H, Besselaar T, Fry A, Gregory V, Leang SK, Huang W, Lo J, Pereyaslov D, Siqueira MM, Wang D, Mak GC, Zhang W, Daniels RS, Hurt AC, Tashiro M. Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2013-2014. *Antiviral Res.* in press.
2. 学会発表
 - 1) Takashita E, Ejima M, Fujisaki S, Kishida N, Xu H, Imai M, Kim N, Sato A, Sugawara H, Itoh R, Doi T, Tashiro M, Odagiri T. A community cluster of influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting cross-resistance to oseltamivir and peramivir in Japan. 3rd isirv-AVG Conference; Influenza and other Respiratory Virus Infections: Advances in Clinical Management. June 2014
 - 2) Kawakami C, Takeuchi M, Mitamura K, Takashita E, Odagiri T. Analysis of influenza virus responsible for persistent infection after drug administration in immunosuppressed patients. 3rd isirv-AVG Conference; Influenza and other Respiratory Virus Infections: Advances in Clinical Management. June 2014
 - 3) 高下恵美、江島美穂、藤崎誠一郎、中村一哉、白倉雅之、菅原裕美、佐藤彩、小田切孝人 札幌市を中心とした抗インフルエンザ薬耐性ウイルスの地域流行 第28回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム 2014年7月
 - 4) Takashita E, Ejima M, Fujisaki S, Yokoyama M, Nakamura K, Shirakura M, Sugawara H, Sato A, Sato H, Tashiro M, Odagiri T. A community cluster of influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting cross-resistance to oseltamivir and peramivir in Japan, November 2013 to February 2014. 5th ESWI Influenza Conference, September 2014
 - 5) 高下恵美、江島美穂、藤崎誠一郎、中村一哉、白倉雅之、菅原裕美、佐藤彩、小田切孝人 2013/14 シーズンにおける抗インフ

ルエンザ薬耐性ウイルスの地域流行と高度耐性ウイルスの検出について 第 46 回日本小児感染症学会学術集会 2014 年 10 月

- 6) 川上千春、七種美和子、豊澤隆弘、高下恵美 入院・重症例における AH1pdm09 インフルエンザウイルスの解析 第 46 回日本小児感染症学会学術集会 2014 年 10 月
- 7) 高下恵美、江島美穂、藤崎誠一郎、横山勝、中村一哉、白倉雅之、菅原裕美、佐藤彩、佐藤裕徳、小田切孝人、全国地方衛生研究所 2013/14 シーズンにおける NA 阻害剤耐性 A(H1N1)pdm09 ウイルスの地域流行 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 2014 年 11 月
- 8) Takashita E. Global update on the antiviral susceptibility of influenza viruses. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 2014 年 11 月
- 9) 酒井宏治、網康至、田原舞乃、久保田耐、安楽正輝、中島典子、高下恵美、関塚剛史、駒瀬勝啓、信澤枝里、小田切孝人、前仲勝実、黒田誠、長谷川秀樹、河岡義裕、田代真人、竹田誠 II 型膜貫通型セリンプロテアーゼ TMPRSS2 は、HA 開裂部位に mono-basic なアミノ酸配列をもつ A 型インフルエンザウイルスに対する肺内必須活性化酵素である 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 2014 年 11 月
- 10) 川上千春、高下恵美、藤崎誠一郎、江島美穂、七種美和子、宇宿秀三、小田切孝人 過去 3 シーズンに混合流行した B 型インフルエンザウイルスの遺伝子解析 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月
- 11) 高下恵美 オセルタミビル・ペラミビル耐性 A(H1N1)pdm09 インフルエンザウイルスの地域流行 4th Negative Strand Virus-Japan 2015 年 1 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

ワクチン候補株の免疫原性、適正の検討

研究分担者 浅沼秀樹

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・室長

研究要旨 インフルエンザサーベイランスで迅速な作製が必要とされるフェレット抗血清を作製した。H3N2 亜型の新規株である A/Osaka-C/2003/2014 および A/Niigata/296/2014 株のフェレット感染抗血清を作製し評価した結果、新規抗血清としてリファレンスの用いることが可能であることが示唆された。また、抗原性が類似した 3 株の不活化抗原でフェレットに免疫後、感染防御効果も検討したところ、株間で防御効果に差異が認められた。この結果はワクチン株選定に各株の免疫原性が重要であることを示唆している。

A. 研究目的

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は世界保健機関（WHO）の世界インフルエンザ監視対応ネットワーク（GISRS）に参加し、新型を含むインフルエンザウイルスの発生動向監視（サーベイランス）および流行予測を行っている。このサーベイランスは国内の各地方衛生研究所で分離された株の性状解析情報（遺伝子、抗原性等）から、現在流行中の株における国際間の比較や過去の流行との比較を行い、現行のワクチンの有効性の評価につなげている。

インフルエンザウイルスの抗原性はフェレットの免疫抗血清を用いて行われている。過去の流行株に対する抗血清を現在流行中の株に反応させた場合に著しい低下を示した場合、抗原性が大きく変化したことが予測され、これは昨年のワクチン株では現行の流行株に対する防御効果が著しく減弱することを示唆している。ところが個々の株に対する反応性は株毎に大きく異なるため、過去の株に対する抗血清を用いた場合に現在の流行株の抗原性が類似株であると評価される場合であっても、現在流行している株に対する抗血清を過去の株と反応させた場合には必ずしも高い反応性は認めら

れない。それ故、現在流行している株の抗原性を適切に評価するためには、現行の流行株に対する抗血清の迅速な作製が必須となる。そこで本研究では 2013 年から 2014 年シーズンに分離された株の評価を行うための抗血清を作製した。また、過去の株に対する抗血清を用いた抗原性試験の結果、同じ抗原型と評価された新たな複数の分離株においても、各分離株に対する抗血清を用いた抗原性試験ではホモ値が大きく異なる場合もある。現在この差異はワクチン株の選定には考慮されていない。そこでこのような差異とワクチン効果との相関性を明らかにするために、同シーズンに分離され、抗原性が同類であると評価された数株の不活化抗原を作製してフェレットに免疫し、感染後の防御効果を検討した。

B. 研究方法

・フェレット

日本 SLC より購入した 6～12 ヶ月齢のメスのフェレットを用いた。

なお、本研究における動物実験については国立感染症研究所動物実験委員会による審査を受け、同研究所が定める実験動物管理運営規定を遵守して行われた。

・抗血清採取

2013～2014 シーズンに分離された H3N2 株、A/Osaka-C/2003/2014 株 (A/Osaka-C) および A/Niigata/296/2014 株 (A/Niigata) を MDCK (Madin Darby Canine Kidney) 細胞で増殖させた培養上清をフェレットに経鼻接種 (500 μ L) した。接種 2 週後、全採血を行い遠心した上清を回収し抗血清として使用した。

・感染防御実験

2011～2012 シーズンに分離され、参照株である A/Victoria/361/2011 株 (A/Vic) に対する抗血清を用いた抗原性試験で類似株と認められた H3N2 株、3 株 (N273、N316、N337 株) を β -プロピオラクトンで不活化した全粒子抗原を作製した。抗原 (100 μ g) を筋肉内接種し (500 μ L) 3 週後、追加免疫を行った。最終免疫の 2 週後、N337 株を経鼻感染させ (1 x 10⁶ TCID₅₀、1 mL)、1 日および 3 日後に鼻腔洗浄液を回収し、ウイルス価を測定した。感染 3 日後には血清も回収し、抗体価の測定に用いた。

・ウイルス価測定

ウイルス価の測定は単層培養した MDCK 細胞を用いた寒天プラーク法により測定した。

・血球凝集阻害試験 (Hemagglutinin inhibition test: HI 試験)

採取した血清を RDE 処理し、HI 試験に用いた。段階希釈した RDE 処理試験血清とウイルス抗原を混合し、1%モルモット血球を加え、赤血球凝集抑制像を観察するにより HI 抗体価を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究ではウイルスを分離するためにヒト臨床検体材料を使用した。そのため国立感染症研究所倫理委員会の審査の下に行われた。

C. 研究結果

1) A/Osaka-C および A/Niigata に対するフェレット抗血清作製

2013～2014 年シーズンの終盤に分離された H3N2 株に抗原性の変化が推察される株が認められたため、国内で出現した類似株である A/Osaka-C および A/Niigata を用い、フェレット感染抗血清を作製した。それぞれ 3 頭のフェレットを用い、感染 2 週間後の血清を採取し、リファランス抗原 6 株と同時に抗原性試験を行った (表 1)。その結果、全てのフェレット血清は Clade3C.3 の A/Tokyo/31512/2013 株および A/New York/39/2012 株、さらには Clade3C.1 の A/Texas/50/2012 と高い反応性を示し、HI 価はホモ値と同等であった。なお、H1N1pdm のリファランス株である A/California/07/2009 との反応性は認められなかった。このことから A/Osaka-C、A/Niigata とともに Clade3C 群と類似の抗原性であることが確認できたのと同時に、今回作製した抗血清がリファランス用の抗血清として有用であることも示唆された。

2) H3N2 分離株の不活化抗原による防御効果

2011～2012 年シーズンの臨床検体から分離した H3N2 株で、同シーズンのリファランス株である A/Vic と抗原性が類似であった 3 株 (N273、N316、N337) の不活化抗原を作製し、フェレットに免疫後、ウイルスチャレンジ (N337) に対する防御効果を検討した (表 2)。その結果、全てのフェレットにおいて、感染 1 日目はでは非免疫群と同等の高いウイルス価が認められたのに対し、感染 3 日目には N273 および N316 で免疫した群では 1/3 頭に、N337 で免疫下群では 3/3 頭に顕著なウイルス価の減少が認められた。また N273 で免疫した群の 1/3 頭と N316 で免疫した群の 2/3 頭においても部分的なウイルス価の減少が認められた。続いて血清中の HI 抗体応答を検討した (表 3)。その結果、感染 3 日目に顕著なウイルス価の減少が

認められたフェレットでは 640 以上の高い HI 価を示しており、防御が認められなかったフェレットにおいては HI 抗体の誘導も全く認められなかった。部分的な防御効果が認められた N273 の 1 頭は HI 価が 40 であり、同じく部分的な防御効果が認められた N316 で免疫した 2 頭のフェレットでは N337 に対する HI 価は認められなかったが、ホモ値が 20 ないしは 40 であったため、HI 価の検出限界以下ではあるものの、交叉的な部分防御が認められたことが示唆される。このことから、今回免疫に用いた 3 株は、抗原性がリファランスと同類であるが、免疫誘導能は株間で差が認められることが明らかとなった。

D. 考察

インフルエンザは常に変化し続けることで既存の免疫から逃避するため、ワクチンに用いる種株は、流行予測を基に選定されている。それゆえ、インフルエンザサーベイランスでは迅速な流行株の性状解析が求められる。サーベイランスでは主に遺伝子と抗原性の解析を中心に情報の収集が行われており、これらの情報から流行予測ならびにワクチン株が選定される。抗原性の解析にはフェレットの抗血清が必須であるため新規株の出現時には迅速に対応できる体制も必要とされる。本研究所の当センターではこの体制が構築されており、本研究においても新規株が疑われた A/Osaka-C および A/Niigata の抗血清を迅速に作製することができた。3 頭ずつのフェレットにそれぞれの株を感染させた抗血清の HI 試験を行った結果、全ての抗血清に高い HI 抗体が認められた。また同時にリファランス抗原との同様の試験から、Clade3C.3 および Clade3C.1 に分類させる抗原とホモ値が同等であった。また共同研究者の遺伝子解析の結果より、Clade3C.3a に分類されることが明らかになっていること、ならびに本血清を用いた Clade3C.3a のリファランス株である、A/Switzerland/9715293/13 株との HI

試験で同等の HI 価を示したことから、本研究で採取した抗血清は流行株を解析するため、ならびにワクチン候補株の評価に用いる抗血清として有用であることが示唆された。

続いて同類の抗原性を有するワクチンの免疫原性の違いと防御効果との相関性について検討した。現行のインフルエンザワクチンは鶏卵で製造するため、鶏卵で高い増殖性を獲得した種株が作製され候補株となっている。H3N2 亜型の場合、この製造過程において変異することが問題となっているが、ワクチン候補株数が限られているため、流行株の抗原性と部分的に相違する株を選択せざるを得ないのが現状である。そのため細胞培養系で製造するワクチンの実用化が検討されているが、候補株の選択基準が確立されていない。その一方で抗原性や遺伝子背景が類似の株でありながら、フェレットで抗血清を作製した場合のホモ値は様々であり、この差異についての詳細は検討されていない。そのため本研究ではリファランスと同類の抗原性と評価された H3N2 亜型 3 株を細胞培養系で不活化抗原を作製し、フェレットに免疫後、感染に対する防御効果と免疫応答を検討した。その結果、感染 1 日目の鼻腔ウイルス価は非免疫群との相違が認められなかったが、感染 3 日目の鼻腔では、HI 抗体価と相関したウイルス価の低下が認められた。このことから HI 抗体は感染阻止には直接貢献できないが、増殖の抑制には大きく貢献することが示唆される。また今回リファランスと同類の抗原 3 株用い、N337 を用いたフェレットの 3/3 頭に高い HI 抗体の誘導が認められたが、N273 および N316 では 1/3 のみ、高い HI 抗体の誘導が認められていた。他の研究でこれら 3 株の感染後の HI 抗体価を検討し、N337 株で非常に高い HI 抗体価が認められた結果が得られている。これらの結果から、感染させた後に誘導される HI 抗体価が高い株は、高い免疫原性を有する可能性が高いことが示唆される。

E. 結論

短時間で変化するインフルエンザウイルスの株サーベイランスでは、ウイルスの性状解析のための迅速なフェレット抗血清の作製は必須あり、今シーズンにおいてもめまぐるしく変化する H3N2 亜型に対する抗血清を迅速かつ的確に作製することができた。また、細胞培養ワクチンなどで候補株を選出するためには、各ウイルス株の遺伝子および抗原性の解析だけでなく、フェレットに感染させた後に誘導される HI 抗体価の誘導能を確認し、免疫原性を評価することも重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

- 1) Asanuma H, Ainai A, Nagata N, Tashiro M, Odagiri T. Relationship between innate immune responses and pathogenesis of influenza H7N9 virus that is adapted to mice. 4th International Influenza Meeting. Muenster, Germany 2014 年 9 月
- 2) 浅沼 秀樹、相内 章、許斐 奈美、佐藤佳代子、岸田典子、田代 真人、小田切孝人：フェレットに対する免疫原性を基盤とした細胞培養ワクチン用種株選定法の確立 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 3) Asanuma H, Ainai A Innate immune responses in mice lung given novel influenza H7N9 virus acquired increased mortality by prolonged passage in mice. 第 43 回日本免疫学会学術集会、京都、2014 年 12 月
- 4) Sato K, Asanuma H, Ato M, Itamura S, Odagiri T. Evaluations of influenza vaccine immunogenicity using human

cell lines. 第 43 回日本免疫学会学術集会、京都、2014 年 12 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし