

表1 H3N2国内分離株のフェレット血清ロットチェック

株名	型・亜型	A/Osaka-C	A/Osaka-C	A/Osaka-C	A/Niigata/	A/Niigata/	A/Niigata/	A/Tokyo/	A/Tokyo/	A/Texas/50/
		/2003/2014 NIIDNo.5	/2003/2014 NIIDNo.6	/2003/2014 NIIDNo.7	296 /2014 NIIDNo.2	296 /2014 NIIDNo.3	296 /2014 NIIDNo.4	31512/20 13 No.1	31512/20 13 No.2	2012 (H3N2) Cell No.2
A/Osaka-C/2003/2014	A/H3N2	320	160	320	160	160	160	40	80	80
A/Niigata/296/2014	A/H3N2	320	160	320	320	160	160	40	80	80
A/Tokyo/31512/2013	A/H3N2	160	80	160	160	80	160	160	160	160
A/New York/39/2012	A/H3N2	160	80	80	160	80	80	80	80	80
A/Texas/50/2012	A/H3N2	320	160	160	320	160	160	80	160	160
A/California/07/2009	A/H1N1pdm09	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
B/Massachusetts/02/2012	B (Yamagata)	20	20	20	20	20	20	20	20	10
B/Brisbane/60/2008	B (Victoria)	80	80	80	80	160	80	80	80	40

表2 不活化抗原で免疫したフェレットの感染後のウイルス価

免疫株 ¹⁾	フェレット 番号	ウイルス価 (pfu/mL) ²⁾	
		1日目	3日目
非免疫群	1	6.3	5.7
	2	6.5	4.9
	3	6.3	5.0
	4	6.0	6.0
N273	1	6.0	5.3
	2	6.6	2.1
	3	6.5	4.1
N316	1	6.4	4.8
	2	6.6	4.1
	3	5.3	< 1.0
N337	1	6.3	1.3
	2	6.0	1.8
	3	6.1	2.7

¹⁾ 各株の不活化抗原を3週間隔で2回筋肉内接種し、最終免疫2週後、
 1×10^6 pfu/mLのウイルスを経鼻感染(1mL)させた。

²⁾ 感染1もしくは2週後、0.1%BSA加PBS(2mL)で鼻腔を洗浄し、回収された
 洗浄液のウイルス価をプラーク法で測定した。

表3 リファランス株と抗原性が類似した株の感染抗血清を用いた抗原性試験

抗原	抗血清 ¹⁾								
	N273			N316			N337		
	1 ²⁾	2	3	1	2	3	1	2	3
N273	< 20	640	80	20	40	2560	640	640	160
N316	< 20	160	40	< 20	< 20	640	320	160	80
N337	< 20	640	40	< 20	< 20	1280	640	640	160

¹⁾ 各株を3頭のフェレットに感染させ2週後に抗血清を採取した。

²⁾ フェレット番号

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

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・主任研究官

研究要旨 有効性の高いインフルエンザワクチンの製造、供給には、流行株の性状を正確に捉え、流行株の抗原性に一致したウイルス株をワクチン製造用株として選定することが肝要である。近年ウイルス NA タンパク質が赤血球凝集活性を示し、通常の赤血球凝集阻止（HI）試験によって正確に抗原性を評価できない、あるいは HA タンパク質による赤血球凝集活性が極めて低いために HI 試験に供試できない H3N2 亜型株の存在が明らかにされてきた。本研究では当該亜型株の抗原性をより正確に解析することを目的に赤血球凝集阻止試験の改良や中和試験法の手技的検討を行い、同手法をインフルエンザ株サーベイランス抗原性解析試験に導入することで業務遂行に大きく貢献した。

A. 研究目的

インフルエンザウイルスはその性状を変化させ続け、毎時期のワクチン戦略に常に懸案をもたらす。インフルエンザ流行株の性状を時期に即して正確に捕捉することはインフルエンザ感染制御戦略において基本的かつ肝要な事項である。特に流行株の抗原性を解析し、これに合致したウイルス株をワクチン製造に供することを目的にウイルス株サーベイランスが国内外の連携の下精力的に行われている。近年の H3N2 亜型株は MDCK 細胞で分離することでノイラミニダーゼタンパク質（NA）のアミノ酸に特徴的な置換が生じ、NA が赤血球凝集活性を示すようになる。この NA による赤血球凝集活性が赤血球凝集阻止（HI）試験によるヘマグルチニンタンパク質（HA）の抗原性評価の正確の実施の妨げになっていることが明らかになってきた。また 2014 年春季以降急速に分布を広げた H3N2 亜型株については、HA による赤血球凝集活性が極めて低く、HI 試験を用いた抗原性解析に供試できない状況が出てきた。本研究では 2015 年度接種用ワクチン製

造に供するワクチン製造用株選定に際しての正確かつ有用な検討資料を提供することを目的に、上述した H3N2 亜型株抗原性解析における問題点を明確にし、これを解決するための解析手法の改良や新規手法の検討、導入を行った。

B. 研究方法

1) 細胞株

インフルエンザウイルス分離増殖に広く用いられる MDCK 細胞は 10%FCS と抗生物質を添加した D-MEM 培地を用いた静置培養にて、継代維持を行った。

インフルエンザウイルスの受容体を人為的に強発現させた細胞株である MDCK-SIAT1 細胞（SIAT1）はロンドン WHO 協力センターから提供を受けた。SIAT1 の維持は、5%FCS と抗生物質を添加した D-MEM 培地を用いた静置培養にて、標準手順書に記載の手法に従って行った。

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た後、当センターに分与提供されたウイルス株を SIAT1 細胞で再増殖後、抗原性解析、遺伝子解析に供した。

3) ウイルス分離・継代

SIAT1 細胞を 25cm² 細胞培養用フラスコに播種し、単層形成後に分与ウイルス株を D-MEM 培地で 1000 倍に希釈したものを 0.5ml 接種した。ウイルス接種後の培養維持には血清不含、3μg/ml アセチル化トリプシン添加の D-MEM 培地を使用し、34°C、5%CO₂ の恒温条件下で 72 時間静置培養した。接種 72 時間後に培養液を回収遠心し、得られたウイルス液を供試材料とした。

4) 赤血球凝集 (HA) 試験

常法 HA 試験については、検体ウイルスの 2 倍階段希釈列を PBS で作製し、これにウイルス液と等量の 1%モルモット赤血球液を加え、60 分間反応後、赤血球の完全凝集像を示すものを HA 陽性と判定した。HA 試験改良法では、NA による血球凝集活性を排除するために、反応液に終濃度 20nM のオセルタミビルを添加した。

5) HI 試験

参照血清は時期代表的なウイルス株をフェレットに感染させ、2 週間後に採取した血液から分離回収した。

常法 HI 試験では、参照血清の 2 倍階段希釈列を PBS で作製し、これに 4HA 価含有に調製したウイルス液を等量混合後 60 分間反応させた。この血清/ウイルス混合液に 1%モルモット赤血球液を加え、60 分間反応後、赤血球凝集の完全阻止像を示すものを HI 陽性と判定した。HI 試験改良法では、NA による血球凝集活性を排除するために、反応液に終濃度 20nM のオセルタミビルを添加した。HI 反応時の各種溶液量については後述結果項に記載する。

6) 中和試験

WHO Global Influenza Surveillance Network 刊行の “Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza” 内 Part 2.G Serological diagnosis

of influenza by microneutralization assay に記載の方法準じて行った。参照血清の 2 倍階段希釈列を 96 穴プレート上で作製後、100TCID₅₀/50μl に調製したウイルス液と混合、1 時間反応後、細胞懸濁液を添加し、18-20 時間、34°C の CO₂ インキュベーター内で培養した。培養後の細胞プレートをアセトン固定後、抗インフルエンザウイルス NP 抗体とペロキシダーゼ標識 2 次抗体を用いた酵素免疫抗体法によりウイルス感染細胞を検出し、ウイルス感染の阻止が認められた血清希釈倍数に基づいて中和抗体価を判定した。

(倫理面への配慮)

本研究においては、鼻腔スワブ等の臨床検体を用いるに際し、国立感染症研究所倫理審査委員会の審査を経て承認を受けた。供試検体は匿名処理を行い、検体提供者特定および個人情報流出の防止に配慮している。また、フェレット血清作製にかかる動物実験倫理に関しては、国立感染症研究所動物実験委員会の審査を経て承認を受けた。

C. 研究結果

近年の H3N2 亜型株は MDCK 細胞で分離培養すると NA アミノ酸 151 番目のアスパラギン酸にグリシンやアスパラギンへの置換が高頻度に生じ、これが NA に赤血球凝集活性を付与させることが明らかになっている。また、この NA の赤血球凝集活性はオセルタミビル存在下で阻止されることも報告されている。地衛研から入手した国内分離株について当該アミノ酸置換の出現状況やオセルタミビル存在下での NA による赤血球凝集活性が除去された本来の HA による赤血球凝集活性の程度を試験検討した。結果、国内分離株のほぼ全てで NA に D151G or N のアミノ酸置換が生じており、MDCK 細胞で再増殖させたこれらの株は終濃度 20nM のオセルタミビル存在下で HA 活性が消失してしまうことから、観察される赤血球凝

集活性が変異NAによるものであることが明らかとなった(図1)。これら分離株をオセルタミビル存在条件下 HI 試験により HA の抗原性評価を行うことが困難であることも示された。

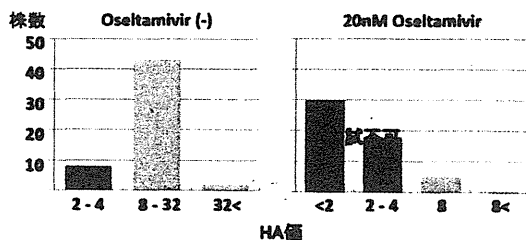


図1 国内分離株のオセルタミビル添加・非添加による HA 価の変化

当該 NA アミノ酸置換回避の方策として SIAT1 による分離株の再増殖の有用性を検討した。地衛研からの入手株を SIAT1 で継代することで供試株の 70~80%は NA の 151 番目アミノ酸がアスパラギン酸に戻り、終濃度 20nM オセルタミビル存在下でも相応の HA 価を示した(図2)。

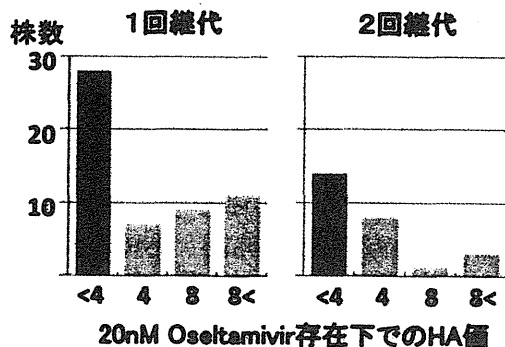


図2 国内分離株 SIAT1 継代後のオセルタミビル存在下での HA 価

上述により SIAT1 で再増殖させた株を用いて、オセルタミビル添加により NA による赤血球凝集活性を排除した HI 試験改良法を確立し(図3)、HA の抗原性評価を正確に行うことができたようになった。

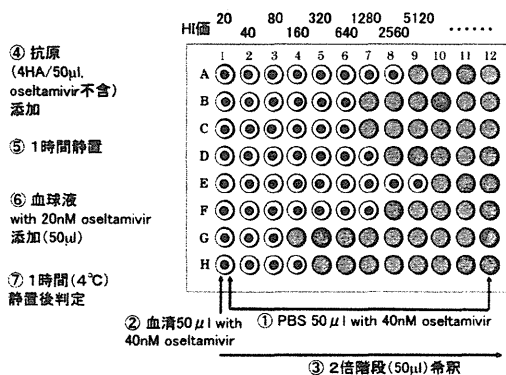


図3 HI 試験オセルタミビル添加変法手順概略

しかしながら、SIAT1 での再増殖を経てもオセルタミビル存在下で HA 活性が全く消失してしまう分離株が一定の割合で存在しており、遺伝学的解析の結果から、これら分離株は 2014 年初頭に出現した新規遺伝学的クレード 3C.2a に属する一群であることが明らかになった。これらの株はウイルスの性状として極めて弱い赤血球凝集活性を示しているため、HI 試験での抗原性解析を実施することができない状況であった。そこで HI 試験に替えて中和試験によって 3C.2a 群分離株の抗原性解析ができるかどうかを検討した。種々の試験条件の検討を経て中和試験による分離株抗原性解析を行った結果、参照ウイルス、被検ウイルスの抗原的類似性や乖離を中和試験法によっても明確に区別されることが確認でき、3C.2a 分離株の抗原性解析における有用性を示した。

上記 HI 試験改良法と中和試験法を併用し、2014/15 シーズンの H3N2 亜型国内分離株について抗原性解析を実施した結果、2014/15 シーズンの流行株は昨年までのワクチン製造用推奨株である A/Texas/50/2012 と抗原性に大きく異なっていることを明確に示した。次期ワクチン製造用株には最近の流行株の抗原的に類似している株の推奨を提議するために、国内外のワクチン株選定会議に際しての有用な資料として提供した。

D. 考察

常に変異を続けその性状を変化させるイン

フルエンザウイルスは、今回のように常法によってはその性状を解析出来ない事態が生じることも推定される。不測の事態による分離株サーベイランスの破綻は極力回避しなければならないものであり、有事に際しての代替え手段の検討、導入が速やかに実施出来るような情報の収集、実験技術面の修練は強く望まれるものである。今回海外のWHO協力センターから提供、共有された情報が事態の改善に大きく寄与した。このことから国内外の関係各機関連携のもと、情報発信、取得に努めることもサーベイランス業務遂行に重要だと思われる。

E. 結論

最近の H3N2 亜型分離株は従来の手法によっては抗原性解析が行えない状況を踏まえて、分離株の再増殖用細胞基材の変更、抗原性解析手法の改良を行った。これら知見を駆使して 2014/15 シーズンに流行の主流を占めるウイルス株の抗原性解析を遂行し、得られた結果を至適なワクチン製造用株の選定に結びつく有用な資料として国内外の株選定会議での検討に提供した。

F. 研究発表

1. 論文発表

K. Sakai, Y. Ami, M. Tahara, T. Kubota, M. Anraku, M. Abe, N. Nakajima, T. Sekizuka, K. Shirato, Y. Suzaki, A. Ainai, 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*,88,5608-5616, 2014

2. 学会発表

1) Emi Takashita, Miho Ejima, Seiichiro

Fujisaki, Masaru Yokoyama, Kazuya Nakamura, Masayuki Shirakura, Hiromi Sugawara, Aya Sato, Hironori Sato, Masato Tashiro, Takato Odagiri
“ 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 (Riga, Latvia), Sep/2014

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

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

インフルエンザウイルス分離株についての遺伝子解析

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 白倉雅之

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 2013/14, 2014/15 シーズンのインフルエンザウイルス分離株について遺伝子解析を実施した。A(H1N1)pdm09 ウイルスは両シーズンを通してクレード 6B が主流であった。A(H3N2) ウイルスは 2013/14 シーズンにはクレード 3C.2, 3C.3 が混合流行していたが、2014/15 シーズンには新たに出現したクレード 3C.2a, 3C.3a の 2 集団が主流となった。3C.2a, 3C.3a に属するウイルスは抗原部位にアミノ酸置換を有していた。B 型 Yamagata 系統ウイルスはクレード 2, 3 が混合流行していた。B 型 Victoria 系統ウイルスはクレード 1A が主流であった。2014/15 シーズンは A(H3N2) ウイルスが流行の主流であることから、抗原性に変異が生じていたのか懸念された。

A. 研究目的

国内外から流行株を収集し、それらの遺伝子配列に基づいた進化系統樹解析、抗原性および薬剤耐性アミノ酸の検出を行う。これらの結果から、特定のアミノ酸が抗原性や薬剤耐性に与える影響を解析し次シーズンの流行予測および適切なワクチン株の選定に役立てる。

B. 研究方法

2013/14, 2014/15 シーズンに国内および海外（ラオス、台湾、モンゴル）から収集した分離株について遺伝子配列を決定し、アミノ酸解析、進化系統樹解析を実施した。具体的には、2013/14 シーズンには A(H1N1)pdm09 を 284 株、A(H3N2) を 202 株、B 型を 186 株、2014/15 シーズン（2015 年 1 月時点）には A(H1N1)pdm09 を 2 株、A(H3N2) を 115 株、B 型を 8 株、解析を行った。

（倫理面への配慮）
特になし

C. 研究結果

2013/14, 2014/15 シーズン流行株の遺伝子解析：

A(H1N1)pdm09 ウイルス：HA 遺伝子系統樹上でクレード 1～8 の 8 つに区分されており、クレード 6 は更にサブクレード 6A, 6B, 6C に細分された。2013/14 シーズンの国内分離株は全てサブクレード 6B または 6C に属しており、流行の主流はクレード 6B であった。これらの株は、遺伝子的には異なるサブクレードではあるが抗原性に違いはなく、すべてワクチン株 A/California/7/2009 類似株であった。NA タンパク質に薬剤耐性マーカーのアミノ酸置換 H275Y を有する株が、2013 年 11 月～2014 年 2 月にかけて札幌市を中心に地域流行したが、以降の流行は認められなかった。また同様の薬剤耐性株は北海道以外でも散発的に検出されたが、遺伝子系統樹内で特定の集団形成は認められなかった。

A(H3N2) ウイルス：HA 遺伝子系統樹においてクレード 3C はサブクレード 3C.1, 3C.2, 3C.3 に分かれた。国内分離株は、クレード 3C.2

(アミノ酸置換 : N145S, D489N) または 3C.3 (アミノ酸置換 : T128A, R142G, N145S、代表株 : A/New York/39/2012 株、A/Tokyo/31512/2013 株) に属した。さらにサブクレード 3C.2 内には 3C.2a (アミノ酸置換 : L3I, N144S, K160T, N255D, Q311H, F159Y) が、3C.3 内には 3C.3a (アミノ酸置換 : A138S, F159Y, N225D)、および 3C.3b (アミノ酸置換 : E62K, K83R, M347K) の新たな集団形成が認められ、2014/15 シーズンには 3C.2a および 3C.3a サブクレードが流行の主流となりそれぞれ 70%、30%の検出率であった (2015 年 1 月時点)。

B 型ウイルス : Yamagata 系統では、分離株は HA タンパク質に S150I, N165Y, S229D アミノ酸置換を持つクレード 3 (代表株 : B/Wisconsin/1/2010 株、B/Sakai/36/2011 株) が主流であった (72%)。一部の株 (28%) は、R48K, P108A, T181A, S229G アミノ酸置換を持つクレード 2 (代表株 : B/Massachusetts/02/2012 株、B/Kanagawa/37/2011 株) に属した。クレード 3 に属する分離株には Yamagata 系統と Victoria 系統のリアソータント株 (HA: Yamagata 系統、NA: Victoria 系統) も散発的に検出された。Victoria 系統の分離株は全て、HA タンパク質に N75L, N165K, S172P アミノ酸置換を持ち、B/Brisbane/60/2008 株、B/Sakai/43/2008 株を代表とするサブクレード 1A に属した。

D. 考察

2013/14 シーズンに流行の中心であった A(H1N1)pdm09 亜型は、2009 年に出現して以降、遺伝子的に変化はしているものの抗原性に大きな影響を与え得るアミノ酸置換は認められない。A(H3N2)亜型は 2013/14 シーズンから 2014/15 シーズンにかけて流行の subclade が 3C.2 および 3C.3 から 3C.2a と 3C.3a へと変化し、抗原性に影響を与え得るアミノ酸置換が確

認されたことから、実際の抗原性の変異および同ウイルス流行の拡大が懸念された。B 型 Yamagata 系統については clade 2, 3 が混合流行する状況が続いており抗原性に変異するアミノ酸置換は認められなかった。B 型 Victoria 系統についても抗原性変異に関わるアミノ酸置換は確認されていない。

E. 結論

2013/14 シーズンに検出された A(H1N1)pdm09 には抗原性に影響を与える変異は見つからず 2009 年から大きな変化はなかった。A(H3N2)は抗原部位に変異を持つ 3C.2a, 3C.3a が出現、伝播し今後の流行が懸念された。B 型は Yamagata 系統が主流でありクレード 2, 3 の混合流行が確認された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 高下恵美、江島美徳、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、横浜、2014
- 2) 川上千春、七種美和子、宇宿秀三、高下恵美、藤崎誠一郎、江島美徳、小田切孝人 3 シーズンにわたって混合流行した 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、横浜、2014

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

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 細胞培養インフルエンザワクチン製造用種ウイルス株を分離するための培養細胞候補として自家樹立した NIID-MDCK 細胞を用いて、臨床検体からのウイルス分離効率並びに分離ウイルスの増殖性について解析を行った。NIID-MDCK 細胞からのウイルス分離効率は、分離するウイルスの型・亜型によって異なる傾向を示した。A(H3N2)型、B 型ウイルスの分離効率は 90%を超えていた。一方、A(H1N1)pdm09 型ウイルスの分離効率は約 50%であったが、使用する臨床検体を選択することにより、ウイルス分離効率は改善した。また、分離されたウイルスの増殖性にも型・亜型による特徴が観察され、A 型ウイルスが継代を経るごとに増殖性を増していくのに対し、B 型ウイルスは分離初期から高い増殖性を示した。いずれの分離ウイルスも増大した増殖性は継代を経ても維持されることが明らかとなった。以上の結果から、NIID-MDCK 細胞は、ワクチン製造用種ウイルス株の分離用細胞として、有用であることが示唆された。

A. 研究目的

現在、国のパンデミック対策として、細胞培養インフルエンザワクチン（H5N1 株、プロトタイプワクチン）の開発が進められている。一方で、細胞培養インフルエンザワクチンは、季節性インフルエンザワクチンとしても現行の鶏卵培養ワクチンが抱えるいくつかの問題点を克服できる可能性があることから、その応用が期待されている。しかしながら、季節性細胞培養インフルエンザワクチンの有益性を十分に発揮させるためには、ワクチン製造に用いる種ウイルス株を分離・増殖させるための培養細胞が必須である。我々はこれまでに、一定の品質が保証された、血清非依存性の細胞株（NIID-MDCK 細胞）を樹立した。本研究は、NIID-MDCK 細胞のワクチン製造用種ウイルス株分離用細胞としての適性を、細胞からのウイルス分離効率、分離されたウイルスの増殖性という観点から評価することを目的とする。

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を用い、検体中のインフルエンザウイルスの有無を、リアルタイム RT-PCR 法により確認した。インフルエンザウイルス陽性となった臨床検体を NIID-MDCK 細胞に接種し、ウイルス分離効率を培養上清中の HA 価の有無により評価した。HA 価陰性の検体については、盲継代を 4 代目まで行った。ウイルスが分離できた検体についてはその培養上清を新たな細胞に接種し、3-5 代連続継代を行った。ウイルスの増殖性は、培養上清の HA 価を測定することにより評価した。

（倫理面への配慮）

本研究において使用した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。

B. 研究方法

C. 研究結果

・A(H1N1)pdm09 型ウイルス

ランダムに選択したインフルエンザウイルス陽性臨床検体を NIID-MDCK 細胞に接種したところ、ウイルスの分離効率は 47%であった。ウイルス分離の成否は、臨床検体中に含まれるウイルス RNA の量と強く相関していた。そこで、ウイルス分離が可能と予測される量以上のウイルス RNA を含む臨床検体を用いてウイルス分離を試みたところ、ウイルス分離効率は 100%となった。この分離効率は、採取シーズンの異なる臨床検体を用いた場合も再現できた。分離されたウイルスの増殖性は継代とともに増大したが、もっとも良く増殖した株でもその力価は 64 HAU 程度にとどまった。

・A(H3N2)型ウイルス

臨床検体からのウイルス分離効率は、91%であった。継代 1 代目で HA 価陽性となる検体は少なく、継代 2-3 代目から陽性となるものが多かった。分離されたウイルス株は継代とともに増殖性を増し、128-256 HAU まで増殖した。2013/14 シーズンに採取された臨床検体の中には、細胞に強い毒性 (CPE) をもたらすものが存在したが、HA 価は継代を行っても陽性とならなかった。しかしながら、この培養上清をリアルタイム RT-PCR 試験に供したところ、強い A/H3 型のシグナルが検出された。

・B 型ウイルス

B 型ウイルスの分離効率は、Victoria 系統株についても Yamagata 系統株についても、いずれも 100%であった。また、分離されたウイルスの増殖性も、多くの株で継代初期から 256-512 HAU を示し、その増殖性は継代を経ても維持されていた。

D. 考察

NIID-MDCK 細胞を用いた臨床検体からのウイルス分離効率と、分離されたウイルス株の

増殖性は、ウイルスの型・亜型によって異なる特徴を示した。

A(H1N1)pdm09 型ウイルスの分離効率は解析した中では最も低かったが、臨床検体中のウイルス RNA 量を測定して、用いる臨床検体を選別することにより、克服できる可能性が強く示唆された。今回解析に供した A(H1N1)pdm09 型ウイルス陽性臨床検体のうち、ウイルス分離可能と予測できる臨床検体の数は全体の約 70%であり、この面からも NIID-MDCK 細胞を用いてワクチン製造用 A(H1N1)pdm09 型種ウイルス株を分離することは十分に可能であると考えられた。

B 型ウイルス、A(H3N2)型ウイルスの分離効率、分離されたウイルスの増殖性は概ね良好であったが、2013/14 シーズンに採取された臨床検体の中に、細胞に強い CPE を引き起こすが、HA 価が観察できない A(H3N2)型ウイルスを含むものが存在した。日本を含めた世界的なインフルエンザウイルス株サーベイランスにおいて、2013/14 シーズンに分離された A(H3N2)型ウイルスでは、その HA 遺伝子の分類上、Clade 3C.2a に属する株が出現し、この Clade 3C.2a ウイルスは赤血球凝集能が弱く、場合によっては HA 活性を示さないことが知られている。今回観察された現象は、臨床検体中に含まれるウイルスの HA 遺伝子が Clade 3C.2a に属するためであるかもしれず、このウイルス株の HA 遺伝子配列を解析する必要がある。また、Clade 3C.2a に属するウイルスの流行は増加傾向にあることから、A(H3N2)型ウイルスについては、分離効率や継代による増殖性の評価法についても見直す必要がある。

E. 結論

細胞培養季節性インフルエンザワクチン製造のための種ウイルス株分離用細胞として、NIID-MDCK 細胞は、ウイルスの分離効率、分離したウイルスの増殖性という観点から有用であることが示唆された。引き続き新たなシー

ズンの臨床検体を用い、NIID-MDCK 細胞の評価を行う必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

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 細胞培養季節性インフルエンザワクチンの実用化に向けた研究を行う。本研究では、安全性等の基準を満たした MDCK (NIID-MDCK) 細胞を用いて分離継代したウイルスの遺伝的および抗原的安定性の評価を行い、ワクチン製造の元株となるワクチン候補種ウイルスとして使用可能であるかの検討を行った。その結果、多くのウイルス株が流行の主流となっている株と遺伝的および抗原的に同等（安定）であり、ワクチン候補種ウイルスとして使用可能であることが確認された。

A. 研究目的

細胞培養季節性インフルエンザワクチンの実用化に向けて、ワクチン製造の元株となるワクチン候補種ウイルスの製造所への配布を考えたときに、配布する株が流行の主流となっている株と遺伝的および抗原的に同等（安定）であることを確認しておくことは重要である。

本研究では、安全性等の基準を満たした MDCK (NIID-MDCK) 細胞から臨床検体を用いて分離継代した各型・亜型ウイルス株の遺伝的および抗原的安定性の評価を行い、ワクチン候補種ウイルスとして使用可能であるかの検討を行う。

B. 研究方法

今回使用するワクチン候補種ウイルス分離用の培養細胞としては、安全性等の基準を満たし、無血清培地に馴化させた MDCK (NIID-MDCK) 細胞を用いた。

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複数の臨床検体から、MDCK (NIID-MDCK) 細胞を用いて分離したウイル

スを 1 代目として、分離状況により 3 代目から 5 代目までウイルス継代を行った。その後、最終継代数のウイルスを用いて、ウイルスの遺伝子および抗原性の解析を行った。

ウイルスの遺伝子解析を行うための方法として、臨床検体および最終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 タンパク質のアミノ酸配列は、遺伝子配列から推定した。

ウイルスの抗原性解析を行うための方法として、赤血球凝集阻止 (HI) 試験を行った。臨床検体採取時に流行の主流となっていた株の中で、代表となる基準ウイルス（細胞分離株）を参照抗原とし、これをフェレットに感染させて得た血清を使用した。また、赤血球は 1%モルモット赤血球または 0.5%ニワトリ赤血球を使用した。

（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、検体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 (NIID-MDCK) 細胞を用いて臨床検体からのウイルス分離を行い、複数の各型・亜型ウイルス株を得ることができた。これらのウイルス株について遺伝子および抗原性の解析を行った。

遺伝子解析については分離されたウイルス株の内、A(H1N1)pdm09 2株と H3N2 5株、B/Victoria 系統 2株と B/Yamagata 系統 2株について臨床検体との比較を行った。A(H1N1)pdm09 2株の内、1株で HA および NA の遺伝子変異が起りつつあり、HA については抗原性に影響を与える部位であった。H3N2 株では HA の遺伝子変異は確認されなかった。NA では 5株の内、4株で遺伝子変異が起りつつあり、これらの部位は HA 活性に影響を及ぼすとされる部位であった。B/Victoria 系統株では遺伝子変異は確認されなかった。B/Yamagata 系統 2株の内、1株で臨床検体中の NA で混合塩基となっていた部位が一つの塩基へ収束することが確認された。この部位は NA タンパク質の性質に影響を与える部位ではなかった。

抗原性解析については分離されたウイルス株の内、A(H1N1)pdm09 7株と H3N2 5株、B/Victoria 系統 5株と B/Yamagata 系統 5株について行った。A(H1N1)pdm09 株については、全ての分離株で参照抗原である A/Narita/1/2009 株と同等の抗原性を示した。H3N2 株については、5株中 3株で参照抗原である A/Victoria/361/2011 株と同等の抗原性を示したが、残り 2株で参照抗原との抗原性乖離がみられた。B/Victoria 系統株については、全ての分離株で参照抗原である B/Brisbane/60/2008 株と同等の抗原性を示した。B/Yamagata 系統株については、全ての分離株で参照抗原である B/Wisconsin/1/2012 株

と同等の抗原性を示した。

D. 考察

MDCK (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遺伝的および抗原的に同等であり、ワクチン候補種ウイルスとして使用可能であることが確認された。一部の H3N2 分離株では参照抗原との抗原性乖離がみられたが、これらの分離株での HA 遺伝子の変異は確認されていない。しかしながら、これらの分離株では NA 遺伝子で変異が起りつつあり、その部位は HA 活性に影響を及ぼすとされる部位として報告されている。この部位が抗原性の変化に影響を与えていることも考えられ、今後この部位と抗原性の変化について検証を行っていくことが必要と考える。

今回の結果は、インフルエンザ流行の 1つのシーズンの中で採取された臨床検体から分離継代を行ったウイルス株の評価であり、別のシーズンに採取された臨床検体を用いても遺伝的および抗原的安定性を保ったワクチン候補種ウイルスの作製が可能か、引き続き検討が必要である。

細胞培養季節性インフルエンザワクチン製造のためのワクチン製造用ウイルス株を遺伝的および抗原的に安定なものとして配布することで、流行に即した効果的な細胞培養季節性インフルエンザワクチンの供給が可能となり、わが国の健康行政への貢献となる。

E. 結論

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を行った。多くの株が流行の主流となっている株と遺伝的および抗原的に同等であり、ワクチン候補種ウイルスとして使用可能であることが確認された。

F. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) I Takayama, H Takahashi, M Nakauchi, S Nagata, M Tashiro, T Kageyama. Development of a diagnostic system for novel influenza A(H7N9) virus using real-time RT-PCR assay in Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2014 Nov 25. [Epub ahead of print]
 - 2) Y Tsunetsugu-Yokota, K Nishimura, S Misawa, M Kobayashi-Ishihara, H Takahashi, I Takayama, K Ohnishi, S Itamura, H LK Nguyen, M TQ Le, G T Dang, L T Nguyen, M Tashiro and T Kageyama. Development of a sensitive novel diagnostic kit for the highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus. *BMC Infect Dis.* 14:362, 2014.
 - 3) M Kobayashi-Ishihara, H Takahashi, K Ohnishi, K Nishimura, K Terahara, M Ato, S Itamura, T Kageyama, Y Tsunetsugu-Yokota. Broad cross-reactive epitopes of the H5N1 influenza virus identified by murine antibodies against the A/Vietnam/1194/2004 hemagglutinin. *PLoS One.* 9(6):e99201, 2014.
 - 4) M Nakauchi, I Takayama, H Takahashi, K Oba, H Kubo, A Kaida, M Tashiro, T Kageyama. Real-time RT-PCR assays for discriminating influenza B virus Yamagata and Victoria lineages. *J Virol Methods.* 205C:110-115, 2014
 - 5) M Nakauchi, I Takayama, H Takahashi, M Tashiro, T Kageyama. Development of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid diagnosis of avian influenza A (H7N9) virus infection. *J Virol Methods.* 204:101-104, 2014
2. 学会発表
 - 1) 高山 郁代、Nguyen Trung Hieu、中内 美名、高橋 仁、Nguyen Thanh Long、小田切 孝人、田代 真人、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、横浜、2014年11月
 - 2) 中内 美名、高山 郁代、大場 邦弘、高橋 仁、田代 真人、影山 努 RT-LAMP法を用いた A/H7N9 亜型鳥インフルエンザウイルス検出系の構築
第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍：該当なし

雑誌：

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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.	Oct.110	31-41	2014
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		
Y Tsunetsugu-Yokota, K Nishimura, S Misawa, M Kobayashi-Ishihara, H Takahashi, I Takayama, K Ohnishi, S Itamura, H LK Nguyen, M TQ Le, G T Dang, L T Nguyen, M Tashiro and T Kageyama.	Development of a sensitive novel diagnostic kit for the highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus.	BMC Infect Dis.	14	362	2014
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
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

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.	Jan 9;19(1)		2014
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
M Nakauchi, I Takayama, H Takahashi, K Oba, H Kubo, A Kaida, M Tashiro, T Kageyama.	Real-time RT-PCR assays for discriminating influenza B virus Yamagata and Victoria lineages.	J Virol Methods.	205C	110-115	2014
M Nakauchi, I Takayama, H Takahashi, M Tashiro, T Kageyama.	Development of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid diagnosis of avian influenza A (H7N9) virus infection.	J Virol Methods.	204	101-104	2014
K. Sakai, Y. Ami, M. Tahara, T. Kubota, M. Anraku, M. Abe, N. Nakajima, T. Sekizuka, K. Shirato, Y. Suzaki, A. Ainai, 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	88	5608-5616	2014
I Takayama, H Takahashi, M Nakauchi, S Nagata, M Tashiro, T Kageyama.	Development of a diagnostic system for novel influenza A(H7N9) virus using real-time RT-PCR assay in Japan.	Jpn J Infect Dis.	Epub ahead of print, Nov. 25		2014

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.	Mar. 25;9(3)	e92777	2014
M Kobayashi-Ishihara, H Takahashi, K Ohnishi, K Nishimura, K Terahara, M Ato, S Itamura, T Kageyama, Y Tsunetsugu-Yokota.	Broad cross-reactive epitopes of the H5N1 influenza virus identified by murine antibodies against the A/Vietnam/1194/2004 hemagglutinin.	PLoS One.	9(6)	e99201	2014
Watanabe T, Watanabe S, Maher EA, Neumann G, Kawaoka Y.	Pandemic potential of avian influenza A (H7N9) viruses.	Trends Microbiol	22	623-631	2014
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	Aug 20;32(37)	4713-25	2014

