

1. 總括研究報告書

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

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

エンザウイルス研究センター
室長

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

渡邊真治

国立感染症研究所インフル

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
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10-12日 横浜.
 - 4) 内藤忠相、齋藤峰輝、信澤枝里、小田切孝人、田代真人 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. 2014年11月10-12日 横浜.
 - 7) A Yoppy R Candra, Anna L Poetranto, Aldise M Nastri, 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 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. 2014年11月 横浜
 - 9) 齊藤慎二、Elly van Riet、相内章、鈴木忠樹、池田千將、伊藤良、泉池恭輔、高橋宣聖、浅沼秀樹、小田切孝人、田代真人、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、田代真人、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、池田千將、伊藤良、泉池恭輔、高橋宣聖、浅沼秀樹、小田切孝人、田代真人、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、田代真人、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）

国内外の流行株の収集と抗原変異株のモニター（中村）

薬剤耐性株の網羅的スクリーニングおよび薬剤感受性試験、新規薬剤感受性試験系の構築（渡邊）

国内外の流行株の遺伝子解析、変異遺伝子、薬剤耐性遺伝子の同定・ヒト型レセプター、鳥型レセプター識別系の構築（藤崎）

ワクチン接種前後のペア血清を用いたワクチン免疫原性および流行株との交叉反応性をもとにしたワクチンの有効性の評価研究（中村、藤崎、浅沼）

地衛研および周辺諸国のNICへ株サーベイランス技術支援・研修（中村、渡邊、藤崎、原田、高橋、浅沼）

全国地衛研および海外NICへの抗原抗体サーベイランスキットの開発と国内外のサーベイランス実施機関への供与（中村、渡邊、浅沼）

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

国内外から収集した分離株からワクチン候補株の検索と特定

WHOワクチン株選定会議および国内ワクチン株選定会議への情報提供とワクチン株選定への貢献

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

GMP準拠施設で品質管理基準を満たしたMDCK細胞（MDCK-NIID細胞）で流行株からワクチン候補種ウイルスの分離、培養および増殖性の評価（原田）

MDCK-NIID細胞分離のワクチン候補種ウイルスの遺伝的安定性、抗原的安定性の評価（高橋）

動物モデル（フェレット）を用いたワクチン候補種ウイルスの免疫原性の評価研究（浅沼）

細胞培養季節性インフルエンザワクチン株の選定プロセスの整備と戦略策定（小田切）