

2015/7018A

厚生労働科学研究費補助金

新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業

新型及び季節性インフルエンザワクチン株の選定に資する
サーベイランスの強化とゲノム解析に関する研究

平成27年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小田切孝人

平成28年(2016)3月

目 次

I. 総括研究報告書

新型及び季節性インフルエンザワクチン株の選定に資するサーベイランスの強化とゲノム解析に関する研究

研究代表者： 小田切孝人 _____ P1

II. 分担研究報告書

1. 国内インフルエンザウイルスサーベイランスにおける感染研一地方衛生研究所の連携体制の基盤強化

渡邊真治 _____ P9

2. A(H1N1)pdm09 および B 型インフルエンザウイルスの赤血球凝集阻止試験をもちいた抗原性解析

中村一哉 _____ P13

3. A(H3N2)インフルエンザウイルスサーベイランスにおける抗原性解析への中和試験法の応用

岸田典子 _____ P17

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 _____ P21

5. インフルエンザウイルスワクチン株の鶏卵における分離

桑原朋子 _____ P25

6. フェレット抗血清作製とウイルスリスク評価に関する研究

浅沼秀樹 _____ P29

7. 抗インフルエンザ薬耐性ウイルスの性状解析およびリスク評価

高下恵美 _____ P35

8. 成人層および高齢者層に対する 2015・16 年季節性インフルエンザワクチン接種後の抗体価反応

齋藤玲子 _____ P39

研究協力者 小田切崇、菖蒲川由郷、日比野亮信、八神錬、近藤大貴、
尾ヶ井マサヨ、樋熊紀男

9. 動物由来インフルエンザウイルスのレセプター結合特異性に関する研究

白倉雅之 _____ P47

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 _____ P51

I. 総括研究報告書

新型及び季節性インフルエンザワクチン株の選定に資する サーベイランスの強化とゲノム解析に関する研究

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

世界保健機関(WHO)は季節性インフルエンザおよび動物由来の新型インフルエンザの地球規模での発生動向監視とインフルエンザ対策を実施するために、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、GISRS の中核を担うWHOインフルエンザ協力センター(WHO-CC)の一つとして、東アジア諸国のサーベイランス支援および当該地域からの情報をWHOへ提供し、WHOが推奨するワクチン株の選定へ東アジア地域代表として参画している。わが国の流行情報も反映されたワクチン株選定となるためには、国内でのインフルエンザサーベイランス体制が盤石であり、かつ精度の高い信頼性のある解析情報を発信する必要がある。また、それら解析情報は海外からの情報とともに国内のインフルエンザワクチン株選定にとって必須であり、本研究が担っている役割は重い。本研究では、国内および東南アジア諸国から収集した臨床検体および流行株の抗原性解析、遺伝子解析、および今季のワクチン接種前後のペア血清を用いたワクチンの有効性の評価から、来シーズン向けのワクチン株の検索と選定を支援した。また、ワクチン製造に使用可能な発育鶏卵分離株の回収を行い4株の分離に成功した。一方、最近のA(H3N2)ウイルスの性状変化により、抗原性解析に従来の赤血球凝集抑制試験が使えない状況になっており、それを打開するために中和試験法を新規に導入し、その適正を評価した。さらに、動物由来のインフルエンザウイルスの鳥型レセプターとヒト型レセプターへの親和性を簡便に短時間で鑑別できる検査系を構築し、新型インフルエンザウイルスの出現時にパンデミックリスク評価に迅速に対応できるように準備を進めた。

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

研究分担者

齋藤玲子 新潟大学大学院医歯学総合研
究科国際保健学教授

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

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

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

岸田典子 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

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

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

桑原朋子 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

B. 研究目的

本研究の目的は、国内インフルエンザ株サーベイランス体制の維持と強化を地方衛生研究所（地衛研）と連携して進め、インフルエンザワクチン株の検索と選定を適正に行うための基盤強化を行う。また、海外対応としては WHO のワクチン株選定への参画と選定法改良への支援を行う。目的達成の一環として、改正感染症法に基づいて国内における流行株の回収力の向上および新たに臨床検体も収集する協力体制を構築し、地衛研とより密な意思疎通を図るための方策を講じる。一方、近隣諸国および東南アジア諸国の現地スタッフを感染研に招聘して技術移転を行う等で積極的な国際協力を進め、当該地域からの流行株、臨床検体の収集力を強化し、収集ウイルスの解析情報を発信、ワクチン株選定に有効活用する。

ここ十年来、日本発の分離株を用いたワクチン株は選定されていない。これは、ワクチン製造株となりうる発育鶏卵（卵）分離株を国内では供給できなかったことから、海外で分離されたワクチン株の供給に依存せざるを得なかったためである。本研究では、感染研において臨床検体から卵分離株の回収を試み、ワクチン製造

に使用可能なウイルスの供給を目指す。

最近の A(H3N2)流行株は、従来の赤血球凝集抑制(HI)試験では、正確な抗原解析ができない性状に変化しており、現行の解析法の改善および追加処置として、中和試験法の新規導入が必須となっている。本研究では抗原性解析法の改善と適正評価を行う。

ワクチン株選定には、流行株の解析に加えてワクチン接種前後のヒトペア血清を用いたワクチンの有効性評価成績も重要な判断情報となる。本研究では血清学的な評価からもワクチン株選定を支援する。

新型インフルエンザの殆どは鳥やブタなどの動物由来インフルエンザに起因する。このことから、新型インフルエンザの発生の初動対応の一部として、パンデミックリスク評価を迅速にするために、ウイルスのレセプター親和性の迅速鑑別試験系の構築が必須である。本研究では、ヒト感染事例から分離した鳥インフルエンザウイルスが、鳥型レセプターとヒト型レセプターいずれに高い親和性をもつか、迅速に鑑別試験できる検査系を構築する。これにより、ヒト-ヒト間伝播、流行拡大リスク評価の一助となり、新型インフルエンザ対策に貢献できる。

C. 研究方法

1) 地衛研との連携

6つの地方ブロックのうち、4つのブロック（北海道・東北・新潟地区、関東・甲・信・静地区、東海・北陸地区、九州地区）で開催された会議へ赴き、サーベイランス担当者と協議した。

2) 流行ウイルスの抗原性解析法の改善と中和試験法の導入

2-1) フェレット感染血清をもちいた HI 試験による抗原性解析を行った。また、H3N2 ウイルスについては、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。

2-2) 中和試験法は、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 に記載の方法に準じて行った。

3) 遺伝子系統樹解析

2014/15, 2015/2016 シーズンに国内および海外（ラオス、台湾、モンゴル、インド、ネパール、ミャンマー、ベトナム）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。

4) フェレット感染血清の作製

抗原性解析に用いるフェレット感染血清を作製した。

5) 卵分離株の収集

2014/15 および 2015/16 シーズンに採取した臨床検体の一部を地衛研から分与され、それらから卵を用いたウイルス分離・増殖を試みた。

6) 薬剤感受性試験

国内外から収集した分離株について、MUNANA 基質を用いた蛍光法または NA-XTD 基質を用いた化学発光法により、オセルタミビル、ペラミビル、ザナ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 NA 遺伝子のシークエンス解析により、既知の薬剤耐性マーカーの有無を検索した。

7) ヒト血清抗体の測定によるワクチンの有効性の評価

インフォームドコンセントを得た新潟市内の高齢者施設のスタッフと入所者から 2015/16 シーズン用ワクチン接種前後のペア血清を採取した。HI 試験法にて抗体価測定を行った。

8) レセプター特異性鑑別診断系の構築

α 2,3 または α 2,6 結合した 2 種類の合成シアロ糖鎖ポリマー（Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-pAP- α -PGA、Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-pAP- α -PGA）を用いた Solid-phase binding assay を行った。

（倫理面への配慮）

該当するものについては、該当機関の倫理審査委員会の審査を受け承認された。

D. 結果

1. 国内インフルエンザ株サーベイランス体制の連携強化および近隣諸国との連携

6 つのブロックのうち、4 つのブロック（北海道・東北・新潟地区、関東・甲・信・静地区、東海・北陸地区、九州地区）で開催された会議へ赴き、サーベイランス担当者と協議した。株サーベイランスにはウイルス分離が必須であること、また、ワクチン候補株には卵分離株が必須であるため、感染研に臨床検体を供与することの理解を得た。

一方、近隣諸国、とくに東南アジアとの交流を深めるために WHO 西太平洋事務局が主催する各国のナショナルインフルエンザセンター（NIC）が招聘される NIC 会議にコアメンバーとして参加し、日本および東アジア地域から収集した流行株情報を含む北半球でのインフルエンザの流行株情報の総括を行った。

2. WHO インフルエンザワクチン株選定への貢献

国内およびアジア地域の流行株の解析情報を年 2 回（2 月北半球用、9 月南半球用）開催される WHO のワクチン株選定会議へ提出し、それらの情報が反映されたワクチン株の選定に参画した。2015 年 9 月の選定会議においては議長として 2016 年シーズン南半球用のワクチン株選定を行った。また、2016 年 2 月には 2016/17 シーズン北半球向けのワクチン選定を行い、B 型ワクチンの決定経緯の発表を担当した。

3. 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、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。また、本選定会議の議長として 2016/17 シーズン用ワクチン株の選定を行った。

4. 2015/16 シーズンの国内外流行株の抗原性解析

国内外から収集した A(H1N1)pdm09、A(H3N2)、B 型流行株について、HI 試験法にて抗原性解析を行い、ワクチン株との抗原性の乖離度を評価した。A(H1N1)pdm09 および B 型ワクチンは流行株と抗原性がよくマッチしていたが、A(H3N2)ワクチンについては、製造過程で起こる卵馴化による抗原変異によって、流行株とは大きく抗原性が乖離していたことを示した。

また、A(H3N2)ウイルスについては、HI 試験法の変法として 20nM オセルタミビル添加条件での試験を実施した。また、HI 試験に供することのできないウイルスについては、マイクロ中和法を採用して実施した。成績の信頼性についても検証を行い、導入したマイクロ中和法は適正であり、今後も継続して採用できることを確認した。

5. 流行株の遺伝子系統樹解析

2014/15 シーズンには A(H1N1)pdm09 を 112 株、A(H3N2) を 442 株、B 型を 240 株、2015/16 シーズン（2015 年 2 月時点）には A(H1N1)pdm09 を 66 株、A(H3N2) を 83 株、B 型を 56 株、解析を行った。

A(H1N1)pdm09 ウイルスでは 2 つの新たなサブクレード（6B.1 および 6B.2）が形成され、国内外ともに 6B.1 が主流となっていることを確認した。A(H3N2)および B 型は前シーズンから変化はなかった。

6. 卵分離株の収集の試み

ワクチン株は、卵分離株を使うことになっている。このため、株サーベイランスで検索した流行株の中から、ワクチンとして選定される可能性の高いウイルスについては、臨床検体から卵を用いて再分離する必要がある。本研究では、2014/15 および 2015/16 シーズンに採取した臨床検体から卵分離株の回収を試みて、A(H1N1)pdm09 亜型 2 株、A(H3N2)亜型 1 株、B/ビクトリア系統から 1 株の回収に成功した。

A(H1N1)pdm09 亜型 2 株は海外の高増殖株製造ラボに送って、製造候補株の作製が進められた。一方、A(H3N2)亜型 1 株（A/Saitama/105/2015）は、諸外国で準備されたもののワクチン候補株よりも、これに対する抗血清が流行株をよく抑えるために、ワクチン株として有望であり、次期ワクチンとして採用できるか検討されている。

7. 抗インフルエンザ薬耐性株の検出

薬剤投与患者からの選択圧で発生した A(H3N2)および B 型から 2 株の耐性株が検出された。

8. ワクチン接種前後のペア血清の抗体価測定によるワクチンの有効性の評価

使用したワクチン株に対する抗体価を測定し、ワクチンの免疫原性をもとに 2 社の国産ワクチンの有効性を評価した。

A(H1N1)pdm09、A(H3N2)ワクチンでは国際基準を満たす抗体価上昇が認められ、有効性が期待できたが、B 型ワクチンでは 2 系統（山形系統、ビクトリア系統）いずれに対しても低い抗体価しか検出されなかった。

海外で供給されるワクチンに比べて国産ワクチンの免疫原性の低さが際立つため、特に B 型ワクチンについては、免疫原性の向上に向けた改善の必要性が明確になった。

9. レセプター特異性鑑別診断系の構築

新型インフルエンザが発生した際に、初動対応として、ヒト社会で流行拡大するかパンデミックリスク評価を迅速に行う必要がある。そのため、鳥由来ウイルスの場合は、レセプター特異性を識別する迅速診断系が強力なツールとなる。本研究では、 $\alpha 2,3$ または $\alpha 2,6$ 結合した 2 種類の合成シアロ糖鎖ポリマーを用いた Solid-phase binding assay 法を確立し、鳥インフルエンザウイルス A(H7N9) について検討した。本亜型ウイルスは両方のレセプターを認識でき、ヒト型レセプターをさらに効率よく認識する変異の追加でパンデミックポテンシャルが上がる可能性を確認した。

E. 考察

国内サーベイランス体制については、地衛研との連携と意思疎通の向上を図ることで、円滑にサーベイランスを運用できている。また、改正感染症法の H28 年度の施行により、流行ウイルスや臨床検体をよりスムーズに収集できる協力体制が堅固になる。今後は、海外諸国からの検体収集力の改善が課題となる。

ワクチン製造に採用できる卵分離株の回収システムが定着したことから、今後は、日本発の分離株を用いた世界標準ワクチンの供給も可能となる。さらに、卵分離が極めて困難な A(H3N2) ウイルスの回収を効率よく行うために、細胞培養ワクチン製造の種ウイルスを分離する安全性が検証された細胞 (NIID-MDCK) を用いて初期分離、その後卵で継代したワクチン候補株の供給を世界に先駆けて行った。わが国では、このような経歴のウイルスもワクチン製造に採用できることを厚労省審査管理課および医薬品医療機器総合機構から確認されており、今後の細胞分離と卵継代を組み合わせたワクチン製造用種ウイルスの収集法を検討する契機となった。

A(H3N2) ウイルスの変化により抗原性解析に中和試験法を採用せざるを得ない事態になっている。中和試験にはマイクロ中和法（感染

研採用）、プラーク減少法およびフォーカ減少法（アトランタ CC、ロンドン CC 採用）と、各 WHO 協力センター間でも手法が異なり、結果もそれに依りて異なる場合がある。流行株の抗原変異を適正に判断するためには、センター間で手法の統一を検討する必要があり、WG を作って進められている。感染研もメンバーとして参画し、海外から遅れをとらないようにする必要はある。

本年度から日本も 4 価のインフルエンザワクチンを採用した。一番の懸念事項は、2 種類の B 型ワクチンが互いに干渉し合い双方の抗体が十分に誘導されなくなることである。本研究でワクチン接種前後のペア血清の抗体価を測定し、少なくとも検討した 2 社のワクチンでは、B 型には効果が期待できないレベルでしか免疫原性が無いことを確認した。海外の 4 価ワクチンではこのようなことは報告されていないことから、今後も本研究班で国内ワクチンの免疫原性について追及していく必要がある。国内ワクチンが恒常的に低い免疫原性である場合は、現行のワクチンの力価や剤形について見直しが必要になる。

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。
- ・WHO ワクチン選定および国内ワクチン選定へのタイムリーな情報提供、支援。
- ・ワクチン製造に採用可能な卵分離株の供給体制ができた。
- ・A(H3N2) ウイルスの抗原性解析のための中和試験法の導入と評価を行った。
- ・4 価インフルエンザワクチンの抗体誘導能を評価した。国産ワクチンは B 型ウイルスに対して、低免疫原性であった。
- ・鳥型およびヒト型レセプター親和性評価系の構築が完了した。

G. 研究発表

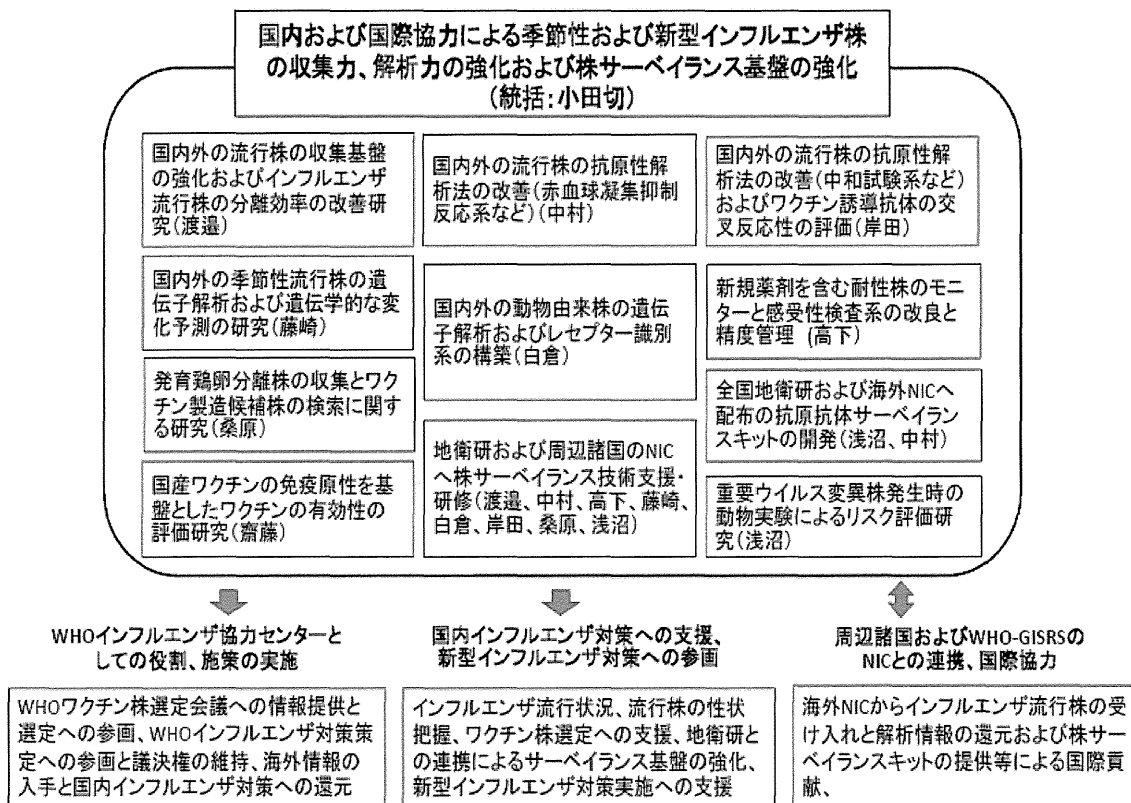
- 1) Tadaki Suzuki, Akira Kawaguchi, Akira Ainaia, Shin-ichi Tamura, Ryo Ito, Pretty Multihartina, Vivi Setiawaty, Krisna Nur Andriana Pangesti, Takato Odagiri, Masato Tashiro, and Hideki Hasegawa Relationship of the quaternary structure of human secretory IgA to neutralization of influenza virus. PNAS 112(25) (2015 May) www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1503885112
 - 2) Takashita E, Kiso M, Fujisaki S, Yokoyama M, Nakamura K, Shirakura M, Sato H, Odagiri T, Kawaoka Y, Tashiro M, and the Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Characterization of a large outbreak of influenza A(H1N1)pdm09 virus cross-resistant to oseltamivir and peramivir in the 2103-14 influenza season in Japan. Antimicrob Agents Chemother. 2015 May;59(5):2607-17. doi: 10.1128/AAC.04836-14. Epub 2015 Feb 17.
 - 3) Sakai K, Sekizuka T, Ami Y, Nakajima N, Kitazawa M, Sato Y, Nakajima K, Anraku M, Kubota T, Komase K, Takehara K, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Kuroda M, Takeda M. A Mutant H3N2 Influenza Virus Uses an Alternative Activation Mechanism in TMPRSS2 Knockout Mice by Loss of an Oligosaccharide in the Hemagglutinin Stalk Region. J Virol. 2015 May 1;89(9):5154-8. doi: 10.1128/JVI.00124-15. Epub 2015 Feb 11.
 - 4) Bedford T, Riley S, Barr IG, Broor S, Chadha M, Cox NJ, Daniels RS, Gunasekaran CP, Hurt AC, Kelso A, Klimov A, Lewis NS, Li X, McCauley JW, Odagiri T, Potdar V, Rambaut A, Shu Y, Skepner E, Smith DJ, Suchard MA, Tashiro M, Wang D, Xu X, Lemey P, Russell CA Global circulation patterns of seasonal influenza viruses vary with antigenic drift Nature. 2015 Jul 9;523(7559):217-20. doi: 10.1038/nature14460
 - 5) Aina A, Hasegawa H, Obuchi M, Odagiri T, Ujike M, Shirakura M, Nobusawa E, Tashiro M, Asanuma H Host Adaptation and the Alteration of Viral Properties of the First Influenza A/H1N1pdm09 Virus Isolated in Japan PLoS One. 2015 Jun 16;10(6):e0130208. doi: 10.1371/journal.pone.0130208.
 - 6) Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Ohmiya S, Sato K, Ito H, Chiba F, Nishimura H, Shindo S, Watanabe S, Odagiri T; Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Characterization of an A(H1N1)pdm09 virus imported from India, March 2015. Jpn J Infect Dis. 2016 Jan 21;69(1):83-6. doi: 10.7883/yoken.JJID.2015.460
 - 7) Fudo S, Yamamoto N, Nukaga M, Odagiri T, Tashiro M, Neya S, Hoshino T Structural and computational study on inhibitory compounds for endonuclease activity of influenza virus polymerase. Bioorg Med Chem. 2015 Sep 1;23(17):5466-75. doi: 10.1016/j.bmc.2015.07.0
 - 8) Takayama I, Hieu NT, Shirakura M, Nakauchi M, Fujisaki S, Takahashi H, Nagata S, Long NT, Odagiri T, Tashiro M, Kageyama T. Novel Reassortant Avian Influenza A(H5N1) Virus in Human, Southern Vietnam, 2014. Emerg Infect Dis. 2016 Mar;22(3). doi: 10.3201/eid2203.151360
- ## 2. 学会発表
- 1) Shinji Watanabe, Kazuya Nakamura, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Emi Takashita, Noriko Kishida, Tomoko Kuwahara, Aya Sato, Ogawa Rie, Hiromi Sugawara, Miki Akimoto, Hideka Miura, Takato Odagiri, The Influenza

- Surveillance Group of Japan Characterizations of circulating influenza viruses in the 2014/2015 season and vaccine viruses selected for the 2015/16 season 第 63 回日本ウイルス学会 2015 年 11 月 福岡
- 2) E Takashita, S Fujisaki, N Gabriele, Y Furuta, Y Kawaoka, M Tashiro, T Odagiri. Antiviral susceptibility of influenza viruses isolated from patients pre- and post-administration of favipiravir. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、福岡、2015
 - 3) C Kawakami, E Takashita, S Fujisaki, M Saikusa, S Usuku, T Odagiri, K Mitamura. Genetic analysis of influenza B viruses isolated during the five seasons in Yokohama. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、福岡、2015
 - 4) 高下恵美、小川理恵、藤崎誠一郎、中村一哉、白倉雅之、岸田典子、桑原朋子、菅原裕美、佐藤彩、三浦秀佳、秋元未来、渡邊真治、小田切孝人 2014/15 シーズンにおける日本国内の抗インフルエンザ薬耐性ウイルス検出状況 第 47 回日本小児感染症学会、福島、2015
 - 5) C Kawakami, K Shimizu, S Usuku, K Mitamura, E Takashita, S Fujisaki, T Odagiri. Gene Analysis of Influenza B Viruses in Yokohama during the Past 5 Seasons. The 4th isirv Antiviral Group Conference, Texas, USA, 2015
 - 6) E Takashita, M Kiso, S Fujisaki, M Yokoyama, K Nakamura, M Shirakura, H Sato, T Odagiri, Y Kawaoka and M Tashiro. Characterization of a Large Cluster of Influenza A(H1N1)pdm09 Virus Cross-Resistant to Oseltamivir and Peramivir during the 2013/2014 Influenza Season in Japan. The 4th isirv Antiviral Group Conference, Texas, USA, 2015
 - 7) 高下恵美, 小川理恵, 藤崎誠一郎, 中村一哉, 白倉雅之, 岸田典子, 桑原朋子, 菅原裕美, 佐藤彩, 三浦秀佳, 秋元未来, 渡邊真治, 小田切孝人. 2014/15 シーズンにおける日本国内の抗インフルエンザ薬耐性ウイルス検出状況. 第 47 回日本小児感染症学会. 2015 年 10 月. 福島.
 - 8) Yasushi Suzuki, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Eri Nobusawa Development of a high-growth PR8 master virus for influenza vaccine production in cell culture systems. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、福岡、2015
 - 9) Akira Ainai, Shinji Saito, Tadaki Suzuki, Norihiro Harada, Shin-ichi Tamura, Yoshikazu Yuki, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Haruko Takeyama, Hideo Tsukada, Hiroshi Kiyono, Hideki Hasegawa Impact of a nasal mucoadhesive excipient on enhancement of immune responses induced by intranasal vaccination against influenza. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、福岡、2015
 - 10) 相内章、鈴木忠樹、池田千将、寺内芳彦、齊藤慎二、田村慎一、小田切孝人、田代眞人、長谷川秀樹 経鼻インフルエンザワクチン接種直前の鼻腔洗浄が誘導される抗体応答に与える影響 第 19 回日本ワクチン学会、犬山、2015
 - 11) 島崎典子、原田勇一、落合雅樹、板村繁之、小田切孝人 4 価インフルエンザ HA ワクチン B 型 2 系統 HA 抗原量を適正に測定するための一元放射免疫拡散試験法の評価及び実施手順の確立 第 19 回日本ワクチン学会、犬山、2015

H. 知的財産権の出願・登録状況

無し

新型及び季節性インフルエンザワクチン株の選定に資するサーベイランスの強化とゲノム解析に関する研究



II. 分担研究報告書

国内インフルエンザウイルスサーベイランスにおける感染研－地方衛生 研究所の連携体制の基盤強化

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 第一室長

研究要旨

季節性インフルエンザウイルスの変異株出現だけでなく、新型インフルエンザウイルスの出現の監視には、継続的な国内外のウイルスサーベイランスが必須である。さらに、このサーベイランスからワクチン候補となるウイルスが選別されるため、臨床検体の収集・ウイルス分離・情報共有など国内外のサーベイランス協力体制は非常に重要である。そこで、国内におけるサーベイランスの重要性の再認識と強化を目的に、地方衛生研究所のサーベイランス担当者と協議し、サーベイランスに関する情報交換・技術支援を行い、時宜にかなった検体およびウイルス分離株の収集を図った。サーベイランスの重要性の認識が高いが故に、研修や情報共有を含むウイルス分離・同定に関する技術面での支援に関する声が聞かれた。ウイルス分離・同定はサーベイランスの根幹であるため、早急な対応が必要である。

A. 研究目的

新型インフルエンザウイルスの出現や季節性インフルエンザウイルス変異株の出現を監視するために、ウイルスサーベイランスは必須である。さらに、それらウイルスに対するワクチン作製のためのウイルス株確保のためにもウイルスサーベイランスは重要である。そのため本研究では、国内におけるインフルエンザウイルスサーベイランスの重要性の再認識とさらなる強化を目的とし、地方衛生研究所のサーベイランス担当者と協議し、サーベイランスに関する情報交換を行い、時宜にかなった検体およびウイルス分離株の収集を図った。

B. 研究方法

現在、国内の地方衛生研究所は都道府県単位で6つのブロック（北海道・東北・新潟地区、関東・甲・信・静地区、東海・北陸地区、近畿地区、中国・四国地区、九州地区）に分けられ

ており、ブロック単位で研究所間の連携を図るため、各種会議が開催されている。6つのブロックのうち、4つのブロック（北海道・東北・新潟地区、関東・甲・信・静地区、東海・北陸地区、九州地区）で開催された会議へ赴き、サーベイランス担当者と協議した。

（倫理面への配慮）

該当なし

C. 研究結果および考察

国内におけるインフルエンザウイルスサーベイランスの重要性の再認識とさらなる強化のために、感染研と地方衛生研究所の連携体制が重要であるとの観点に立ち、2014-15 シーズン（昨シーズン）の流行状況および分離されたウイルスの性状について還元報告を行った。この報告では、実際のサーベイランスの成績が WHO を中心とした世界インフルエンザ監視シ

システムに提供され、季節性ワクチン株選定の大切な資料となっていることも説明した。さらに、実際のワクチンの作製には臨床検体から卵あるいは品質管理された細胞を用いて分離されたウイルスを用いなければならないことを述べ、分離株のみならず、臨床検体の重要性についても説明した。サーベイランス担当者との協議の中で、サーベイランスの重要性については、どのブロックにおいても共通して理解されていた。ただし、非流行期におけるサーベイランスの意義については考え方が統一的ではない印象があった。変異株の出現を捉えるという意味では、非流行期・流行期間問わず年間を通して、かつタイムリーな監視が重要であり、その視点での連携体制をお願いした。サーベイランスへの高い理解故に、ウイルス分離やウイルス性状を利用した亜型・系統同定などの技術に関する質問や意見が出た。実際、季節性 H3N2 亜型ウイルスの同定は国際的にも問題となっているため、国際的な協力を経ながら対応する必要がある。

D. 結論

サーベイランス担当者と実際に意見交換を持つことは、生の現場の声を聴き、かつこちらの思いも伝えることが出来るため、感染研一地方衛生研究所の連携体制にとって大変意義のあるものと実感した。その中で、国内のインフルエンザウイルスサーベイランスについて、非流行期・流行期を問わず年間を通して、かつ時宜にかなった検体採取・ウイルス分離をお願いし、感染研一地方衛生研究所の連携体制の重要性を再認識した。技術面については、地方衛生研究所に応えるためにも、早急な対応が必要である。

E. 研究発表

1. 論文発表

Katsura H, Fukuyama S, Watanabe S, Ozawa M, Neumann G, Kawaoka Y. Amino acid changes in

PB2 and HA affect the growth of a recombinant influenza virus expressing a fluorescent reporter protein. *Sci Rep* 6:19933, 2016.

Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Ohmiya S, Sato K, Ito H, Chiba F, Nishimura H, Shindo S, Watanabe S, Odagiri T; Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Characterization of an A(H1N1)pdm09 virus imported from India in March 2015. *Jpn J Infect Dis* 69:83-86, 2016.

Zhao D, Fukuyama S, Yamada S, Lopes TJ, Maemura T, Katsura H, Ozawa M, Watanabe S, Neumann G, Kawaoka Y. Molecular determinants of virulence and stability of a reporter-expressing H5N1 Influenza A virus. *J Virol* 89:11337-11346, 2015.

Shoemaker JE, Fukuyama S, Eisfeld AJ, Zhao D, Kawakami E, Sakabe S, Maemura T, Gorai T, Katsura H, Muramoto Y, Watanabe S, Watanabe T, Fuji K, Matsuoka Y, Kitano H, Kawaoka Y. An ultrasensitive mechanism regulates influenza virus-induced inflammation. *PLoS Pathog* 11:e1004856, 2015.

2. 学会発表

渡邊真治. 2014/15 シーズンのインフルエンザ流行株と平成 27 年度ワクチン株について. 5th Negative Strand Virus-Japan Symposium、沖縄、2016

Watanabe S, Nakamura K, Fujisaki S, Shirakura M, Takashita M, Kishida N, Kuwahara T, Sato A, Ogawa R, Sugawara H, Akimoto M, Miura H, Odagiri T, The Influenza Surveillance Group of Japan

Characterizations of circulating influenza viruses in the 2014/2015 season and vaccine viruses selected for the 2015/16 season. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、博多、2015

Ando T, Yamayoshi S, Watanabe S, Watanabe T, Kawaoka T. A novel host factor plays a key role in the nuclear export of influenza viral ribonucleoprotein complexes. 第63回日本ウイルス学会学術集会、博多、2015

Zhao D, Fukuyama S, Yamada S, Tiago L, Maemura T, Katsura H, Ozawa M, Watanabe S, Neumann G, Kawaoka Y. In vitro and in vivo characterization of an H5N1 influenza A virus expressing a reporter gene. 第63回日本ウイルス学会学術集会、博多、2015

渡邊真治. 日本でのヒトに対する動物インフルエンザ対応. 第29回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム、東京、2015

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

A(H1N1)pdm09 および B 型インフルエンザウイルスの 赤血球凝集阻止試験をもちいた抗原性解析

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

A(H1N1)pdm09、B 山形系統および B ビクトリア系統の 2016/17 シーズンインフルエンザワクチン株の選定に資することを目的とし、2014/15 シーズン 3 - 8 月期、2015/16 シーズン 9 - 2 月期に国内および海外（台湾、ラオス、モンゴル、ミャンマー、ネパール、ベトナム）から収集した A(H1N1)pdm09、B 山形系統および B ビクトリア系統分離株の抗原性解析を赤血球凝集阻止試験により実施した。解析結果から A(H1N1)pdm09、B 山形系統および B ビクトリア系統のいずれの分離株も 2015/16 シーズンワクチン株に抗原性が類似していた。得られた結果をワクチン株選定のための資料として国内外の株選定会議に提供した。

A. 研究目的

インフルエンザウイルスは頻繁に遺伝子変異し、それにともなって抗原性が変化するため、ワクチン株は毎年見直す必要がある。本研究課題では、適切な季節性インフルエンザワクチン株の選定に資することを目的として、国内外の A(H1N1)pdm09 および B 型の分離株について、赤血球凝集阻止(HI)試験を用いた抗原性解析を行った。

B. 研究方法

2014/2015 シーズン 3 - 8 月期および 2015/2016 シーズン 9 - 2 月期の A(H1N1)pdm09 と B 型の分離株について、国内および海外（台湾、ラオス、モンゴル、ミャンマー、ネパール、ベトナム）から収集し、フェレット感染血清をもちいた HI 試験による抗原性解析を行った。国内株については、全国の地方衛生研究所から分離株の提供をうけた。

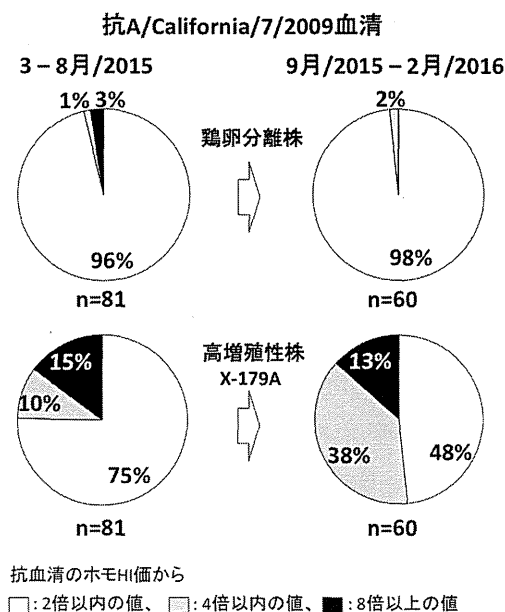
C. 研究結果

A(H1N1)pdm09（図 1）：2015/16 シーズンのワクチン製造株である高増殖性 A/California/7/2009 (X-179A) のフェレット感染血清との反応性をみると、2014/15 シーズン 3 - 8 月期に比べて、2015/16 シーズン 9 - 2 月期では抗血清のホモ HI 価から 4 倍の低下を示す分離株の割合が増加していた。しかしながら、4 倍の低下は抗原性類似の範疇に入るため、2014/15 シーズン 3 - 8 月期および 2015/16 シーズン 9 - 2 月期の分離株のほぼ全てが A/California/7/2009 に抗原性が類似した株であると判定された。

（倫理面への配慮）

該当なし

図 1 各種フェレット感染血清と A(H1N1)pdm09 分離株との反応性



B 型インフルエンザの流行は、2014/15 シーズンは山形系統が主流であったが、2015/16 シーズン 9・1 月期は山形系統とビクトリア系統の混合流行であった。その割合は山形系統が 56%、ビクトリア系統が 44%であった。

B 山形系統 (図 2) : 2014/15 シーズン 3 - 8 月期および 2015/16 シーズン 9・1 月期の分離株はいずれも 2015/16 シーズンのワクチン株 B/Phuket/3073/2013 の細胞分離株および鶏卵分離株のいずれにも抗原性が類似していた。

B ビクトリア系統 (図 3) : B/Texas/02/2013 鶏卵分離株のフェレット感染血清との反応性では、2014/15 シーズン 3 - 8 月期に比べると、2015/16 シーズン 9・1 月期では、抗血清のホモ HI 価から 4 倍の低下を示す分離株の割合が増加していた。しかしながら、前述のとおり、4 倍の低下は抗原性類似の範疇に入るため、2014/15 シーズン 3 - 8 月期および 2015/16 シーズン 9・1 月期の分離株はいずれも 2015/16 シーズンのワクチン株 B/Texas/02/2013 に抗原性が類似した株であると判定された。

得られた結果を国内外のワクチン株選定会議に提供し、株選定の議論に際しての有用な資

料とされた。

図 2 各種フェレット感染血清と B 山形系統分離株との反応性

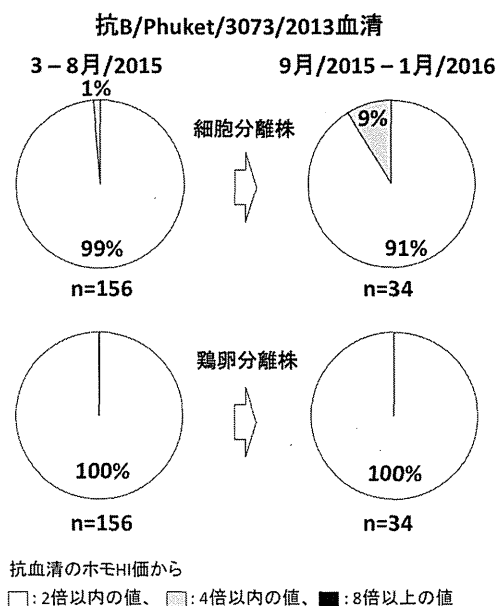
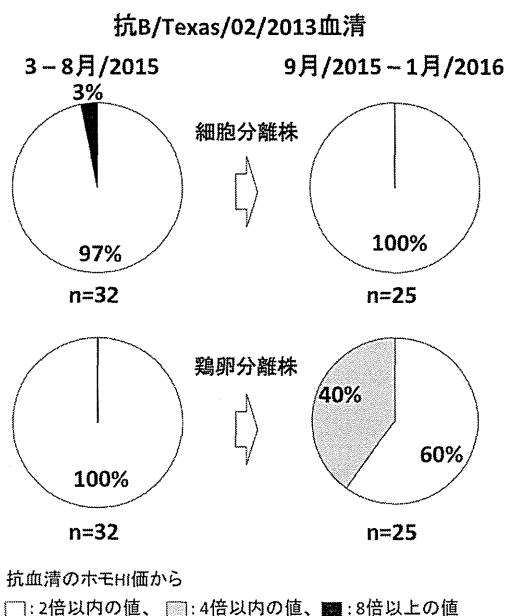


図 3 各種フェレット感染血清と B ビクトリア系統分離株との反応性



D. 考察

A(H1N1)pdm09、B 山形系統および B ビクトリア系統のいずれにおいても、2015/16 シー

ズンのワクチン株に類似した株が、国内外での流行の主流であったことから、A(H1N1)pdm09、B山形系統およびBビクトリア系統の2016/17シーズンワクチン株は、2015/16シーズンワクチン株からの変更の必要性は低いと考えられた。しかしながら、A(H1N1)pdm09とBビクトリア系統分離株については、ワクチン製造株で作製したフェレット感染血清に対して4倍低下の反応性を示した株の割合が増加していたことから、今後の流行株の抗原性変化に注意が必要である。

E. 結論

A(H1N1)pdm09、B山形系統およびBビクトリア系統のいずれにおいても、2015/16シーズンのワクチン株 A/California/7/2009 (H1N1)pdm09、B/Phuket/3073/2013 (山形系統)、B/Texas/02/2013 (ビクトリア系統)それぞれに抗原性の類似した株が流行の主流であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kazuya Nakamura, Masayuki Shirakura, Yasushi Suzuki, Tadasuke Naito, Seiichiro Fujisaki, Masato Tashiro and Eri Nobusawa. Development of a high-yield reassortant influenza vaccine virus derived from the A/Anhui/1/2013 (H7N9) strain. Vaccine 34: 328-333, 2016.

Emi Takashita, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Kazuya Nakamura, Noriko Kishida, Tomoko Kuwahara, Suguru Ohmiya, Ko Sato, Hiroko Ito, Fumiko Chiba, Hidekazu Nishimura, Shizuo Shindo, Shinji Watanabe, Takato Odagiri and The Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Characterization of an A(H1N1)pdm09 virus imported from India, March 2015. Jpn J

Infect Dis 69: 83-86, 2016.

2. 学会発表

Shinji Watanabe, Kazuya Nakamura, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Emi Takashita, Noriko Kishida, Tomoko Kuwahara, Aya Sato, Ogawa Rie, Hiromi Sugawara, Miki Akimoto, Hideka Miura, Takato Odagiri, The Influenza Surveillance Group of Japan Characterizations of circulating influenza viruses in the 2014/2015 season and vaccine viruses selected for the 2015/16 season 第63回日本ウイルス学会 2015年11月 福岡

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

A(H3N2)インフルエンザウイルスサーベイランスにおける 抗原性解析への中和試験法の応用

研究分担者 岸田典子

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をワクチン製造用株として選定する必要がある。従来流行株の抗原性解析は赤血球凝集阻止（HI）試験を用いて行われてきたが、近年 HA タンパク質の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 A(H3N2)ウイルスが流行を広げてきた。本研究では中和試験法の手技的検討ならびに分離株の抗原性解析への応用の可否についての検証を行い、同手法を赤血球凝集阻止試験の代替手法として 2015 年 3・12 月に分離された A(H3N2)株の抗原性解析にもちいた。

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ウイルス感染制御において基本的かつ重要な事項である。特に流行株の抗原性を解析し、これに合致したウイルスをワクチン製造に供することを目的としてインフルエンザウイルスサーベイランスが国内外の連携のもと精力的に行われている。2014 年春期以降 HA による赤血球凝集活性が極めて低く、HI 試験による抗原性解析が実施できない A(H3N2)ウイルスが急速に広がった。本研究では 2016/17 シーズンのワクチン製造用株選定に際して正確かつ有用な検討資料を提供するため、抗原性解析の HI 試験の代替手法として中和試験法の導入を試みた。

B. 研究方法

1) 細胞株

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

2015 年 3・12 月に全国の地方衛生研究所で分離されたウイルスを SIAT1 細胞で再増殖後、抗原性解析に供した。

3) ウイルス培養

25cm² 細胞培養用フラスコに単層形成した SIAT1 細胞にウイルスを 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) 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 に記載の方法に準じて行った。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(ELISA)法によるウェルの呈色反応をもってウイルス感染細胞の有無を判定した。中和抗体価は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算定した。

(倫理面への配慮)

該当なし

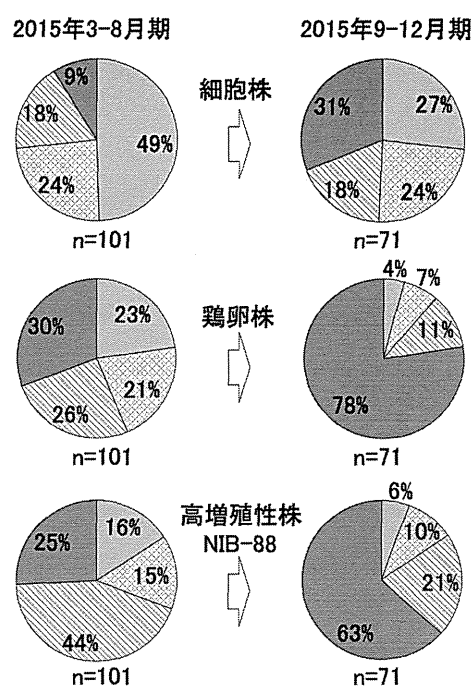
C. 研究結果

本研究に用いた中和試験法で得られる抗体価は、ELISA によるウイルス感染細胞の呈色効率に影響されると思われたため、ELISA に用いる抗体の至適濃度の検討を行った。プレートに播種した細胞に段階的に希釈したウイルスを接種し、ELISA による呈色の程度が接種ウイルス量と相関して観察できる条件を決定した。従来の手法である HI 試験による抗原性解析および遺伝子配列情報との比較によりウイルスの抗原性鑑別能を検証し、本手法を分離株の抗原性解析に応用した。

2015 年 3 - 12 月に国内外から収集された分離株の抗原性を中和試験により解析した結果を図 1 にまとめた。

図 1 各種フェレット抗血清と A(H3N2)分離株との反応性

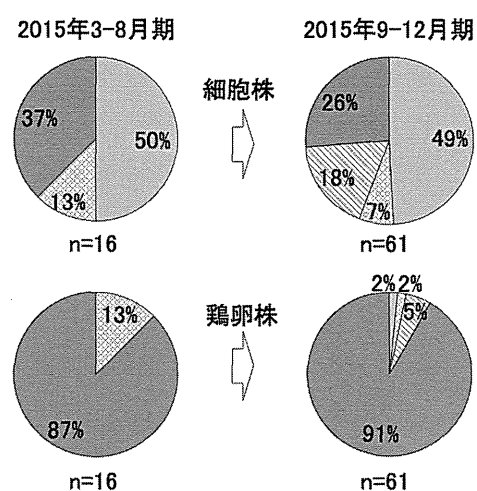
a) 抗A/スイス/9715293/2013 血清



抗血清との抗体反応価がホモ価に比べて

■: 2倍以内、▨: 4倍、▩: 8倍、■: 16倍以上の低下。

b) 抗A/香港/4801/2014血清



抗血清との抗体反応価がホモ価に比べて

■: 2倍以内、▨: 4倍、▩: 8倍、■: 16倍以上の低下。