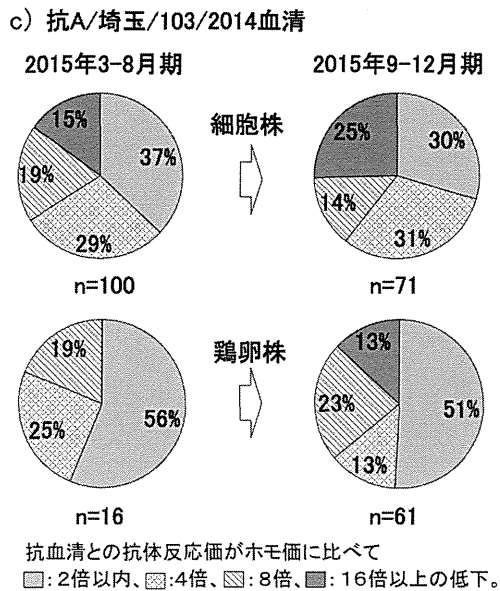


図1 続き



A/スイス/9715293/2013 (H3N2) は2015/2016シーズンの国内用H3ワクチン株である。このウイルスの細胞株をフェレットに感染させて得た抗血清と分離株との反応性を見た場合、スイス細胞株と同等(4倍差以内)の中和抗体価を示す分離株は2015年3-8月期には7割以上であったが、2015年9月以降には5割程度に減数していた。また、スイス鶏卵株およびワクチン製造用である高増殖性スイスNIB88株の場合では2015年9月以降、それぞれの抗血清との中和抗体価がホモ価に比べ4倍差以内の値を示した分離株は1割程度に留まっており、分離株の多くがワクチン株と異なる抗原性を示す傾向が認められた。A/香港/4801/2014についても、2015年9月以降は香港細胞株と同等の中和抗体価を示す分離株は5割程度であった。とくに香港鶏卵株ではこれが数%であり、分離株との抗原性差異が顕著に認められた。一方でA/埼玉/103/2014の細胞株および鶏卵株の抗血清とよく反応する分離株は6割以上あり、A/埼玉/103/2014株と分離株との抗原的類似性が確認された。中和試験によって観察された分離株の抗原性は遺伝子解

析結果から推察される挙動と相応に相関していた。これらの結果を有用な資料として国内外のワクチン株選定会議に提供した。

#### 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、従来の手法で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。このような事態によるウイルス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、代替え手段の検討や導入が速やかに実施出来るような情報の収集、実験技術面の修練が強く望まれる。本研究では、分離株の抗原性解析において従来標準手法として用いられてきたHI試験の代替手法として中和試験法を導入し、2015年3-12月に分離されたA(H3N2)分離株について抗原性解析を実施した。参照株と流行株の抗原的類似性や乖離が明確に示されたことから、分離株の抗原性解析試験における中和試験法の有用性が示唆される。

#### E. 結論

最近のA(H3N2)ウイルスは従来のHI試験では抗原性解析が行えない状況を踏まえて、分離株の抗原性解析に中和試験法を応用して実施した。この代替手法をもちいて2015年3-12月の流行株について抗原性解析を実施し、得られた結果を2016/17シーズンの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に提供した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

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(1) 83-6 2016

Li TC, Yang T, Yoshizaki S, Ami Y, Suzaki  
Y, Ishii K, Kishida N, Shirakura M,  
Asanuma H, Takeda N, Wakita T. Ferret  
Hepatitis E Virus Infection Induces Acute  
Hepatitis and Persistent Infection in  
Ferrets. Vet. Microbiol. 183 30-36 2016

## 2. 学会発表

Shinji Watanabe, Kazuya Nakamura,  
Seichiro 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

## 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

### 研究要旨

2014/15, 2015/16 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 が主流であったが、サブクレード 6B.1, 6B.2 が出現した。A(H3N2)ウイルスは 2014/15 シーズンにはクレード 3C.2a が流行したが、2015/16 シーズンには 3C.2a 内に 3つのサブクレードが派生した。B型は昨シーズンに引き続き、Yamagata 系統ではクレード 3 が、Victoria 系統ではクレード 1A が主流であった。2015/16 シーズンでは A(H1N1)pdm09, A(H3N2)ウイルス共に遺伝子の多様化が進み新たな集団が流行したことから、今後のウイルス伝播の動向に注意を払う必要がある。

### 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

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。具体的には、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。

（倫理面への配慮）  
該当なし

### C. 研究結果

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 に細分されている。2014/15 シーズンの分離株は全てサブクレード 6B に属していた。2015/2016 シーズンには 6B 内に 6B.1（アミノ酸置換：S84N, S162N, I216T）および 6B.2（V152T, V173I, E491G, D501E）が出現し 6B.1(67%) が主流となった。これらの株は、遺伝子的には明確に異なるサブクレードに属するがフェレット抗血清を用いた HI 試験結果に依ると、抗原性に違いはなく全てワクチン株 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 を有する株は稀に検出されたが、流行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（N145S, D489N）, 3C.3（T128A, R142G, N145S、代表株：A/New York/39/201）に分かれており、さらに 3C.2a（L3I, N144S, K160T,

N255D, Q311H, F159Y) と 3C.3a (A138S, F159Y, N225D)、および 3C.3b (E62K, K83R, M347K) に細分化している。2014/2015 シーズンの主流は 3C.2a であった。2015/2016 シーズンには 3C.2a 内に複数のクレードが形成されており、「N171K, I406V, G484E」(21%)、「R142K, Q197R」(31%)、「S114T」(10%)を有する集団が流行している。これらウイルスについては、フェレット抗血清を用いた中和試験にて明確な抗原性の違いは認められていない。B 型ウイルス：Yamagata 系統では、分離株は HA タンパク質に S150I, N165Y, N202S, S229D を持つクレード 3 (代表株：B/Wisconsin/1/2010、B/Phuket/3073/2013) が主流であった。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 株を代表とするサブクレード 1A に属した。

#### D. 考察

2015/16 シーズン 2 月時点で流行の中心である A(H1N1)pdm09 ウイルスは、2009 年に出現して以降、遺伝子変異を重ねアミノ酸置換が蓄積されているものの、抗原性に大きな変化を与えるアミノ酸置換は認められていない。A(H3N2)ウイルスは 2014/15 シーズンに主流であったサブクレード 3C.2a からさらにアミノ酸置換を有する集団が発生しており、抗原性への影響が懸念された。B 型 Yamagata 系統ウイルスについてはクレード 3 の流行が続いており抗原性変異に関与するアミノ酸置換は検出されなかった。B 型 Victoria 系統ウイルス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

2014/15 シーズンに検出された A(H1N1)pdm09 ウイルスにはアミノ酸置換の蓄積があり今後のウイルス伝播、更なる遺伝子の変化による抗原性への影響が懸念された。

A(H3N2)ウイルスは 3C.2a 内に出現した集団の今後の流行状況を注視したい。B 型は Yamagata, Victoria 両系統が混合流行しており今後の流行を監視する必要がある。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

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).

Nakamura K, Shirakura M, Suzuki Y, Naito T, Fujisaki S, Tashiro M, Nobusawa E. Development of a high-yield reassortant influenza vaccine virus derived from the A/Anhui/1/2013 (H7N9) strain. *Vaccine.* 2015 Dec 1. pii: S0264-410X(15)01700-4.

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.* 2015 Nov 13.

Takashita E, Kiso M, Fujisaki S, Yokoyama M, Nakamura K, Shirakura M, Sato H, Odagiri T, Kawaoka Y, Tashiro M. Characterization of a large cluster of influenza A(H1N1)pdm09 viruses cross-resistant to oseltamivir and peramivir during the 2013-2014 influenza season in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 May;59(5):2607-17

##### 2. 学会発表

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

S Watanabe, K Nakamura, S Fujisaki, M Shirakura, E Takashita, N Kishida, T Kuwahara, A Sato, R Ogawa, H Sugawara, M Akimoto, H Miura, T Odagiri, The Influenza Surveillance Group of Japan. Characterizations of circulating influenza viruses in the 2014/2015 season and vaccine viruses selected for the 2015/2016 season. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、福岡、2015

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

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

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

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

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 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

研究分担者 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

### 研究要旨

現行のインフルエンザワクチンは、臨床検体を発育鶏卵（鶏卵）に接種し、分離されたウイルスを用いて作製されなければならない。より有効性の高いワクチン株の選定に貢献することを目的として、全国の地方衛生研究所から分与された臨床検体を鶏卵に接種し、ワクチン候補株の分離を試みた。その結果、4 株のウイルスをワクチン候補株として鶏卵で分離することに成功した。そのうちの 3 株に対してはフェレット感染血清を作製し流行株との反応性を調べた。その結果、どの血清も流行株とよく反応することが明らかとなり、ワクチン候補株となり得ることが分かった。特に、A/H3N2 に関しては、現行のワクチン株よりも流行株と高い反応性を示すことから、より有力なワクチン候補株となることが期待される。

### A. 研究目的

季節性インフルエンザワクチン推奨株は、世界の 5 つの WHO Collaborating Centre (WHOCC) によって卵で分離されたウイルスの中から選定される。我々、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も WHOCC の一つであり、より有効性の高いワクチン株の選定に貢献するために、全国の地方衛生研究所から分与された臨床検体を発育鶏卵に接種し、ワクチン候補株の分離を試みた。

### B. 研究方法

臨床検体は、2014/15 シーズンと 2015/16 シーズンに全国の地方衛生研究所で集められたものを用いた。ウイルスの分離は、臨床検体を発育鶏卵（鶏卵）（10 日齢）に直接接種するか、臨床検体を当研究所において細胞培養ワクチンの種株分離用に品質管理されている MDCK 細胞（NIID-CK 細胞）に接種し、分離されたウイルスを鶏卵の羊膜腔および漿尿膜腔で継代することにより行った。分離したウイルスは

遺伝子解析を行い、また、それらのウイルスに対するフェレット抗血清を作製し流行株との反応性を調べた。

（倫理面への配慮）

該当なし

### C. 研究結果

臨床検体または NIID-CK 細胞で分離したウイルスを発育鶏卵に接種し分離を試みた結果、A(H1N1)pdm09 ウイルスを 2 株、A(H3N2) ウイルスを 1 株、B 型ビクトリア系統ウイルスを 1 株、分離した。

鶏卵分離 A(H1N1)pdm09 ウイルスでは、分離した 2 株のうちの A/Yokohama/50/2015 に関しては、細胞分離株と比較して表面糖蛋白質ヘマグルチニン（HA）に 4 箇所およびノイラミニダーゼ（NA）に 2 箇所の変異が認められた。さらに、このウイルスに対するフェレット感染血清を作製し、流行株との反応性を調べたところ、現行のワクチン株と同様に流行株とよく反

応した。したがって、鶏卵分離 A/Yokohama/50/2015 は、HA と NA にいくつかの変異は認められたものの、それらの変異による抗原的な変化は認められないと考えられた。同様に、もう一株の A(H1N1)pdm09 ウイルスの A/Yokohama/94/2015 に関して、このウイルスに対するフェレット感染血清は流行株とよく反応した。同ウイルスの遺伝子解析を現在行っている。

鶏卵分離 B 型ビクトリア系統ウイルス B/Mie/3/2015 では、遺伝子解析の結果、細胞分離株と比較して、HA では 3 箇所に変異が認められたが、NA に変異は認められなかった。現在、このウイルスのフェレット抗血清を作製しており、これから流行株との反応性を検討する。

鶏卵分離 A(H3N2)ウイルス A/Saitama/ 103 /2014 株 (H3N2) については、鶏卵で 8 代継代することで安定して増殖するようになった。ウイルスの遺伝子解析を行ったところ、細胞分離株と比較して NA に 10 ヶ所変異が入っていた。一方で、HA には抗原部位ではない場所に 1 ヶ所しか変異が入っていなかった。またこのウイルスのフェレット感染血清を作製し、流行株との反応性を調べた。その結果、現行のワクチン株である A/Switzerland/9715293/2013 の鶏卵分離株と南半球の次シーズンワクチン株である A/Hong Kong/4801/2014 の鶏卵分離株に対する感染血清では、両者ともに流行株の約 10% としかよく反応しなかったのに対し、A/Saitama/103/2014 鶏卵分離株のフェレット感染血清は、流行株の約 70% とよく反応した。

#### D. 考察

今回、鶏卵で 4 株のワクチン候補株を分離した。そのうちの 3 株について、フェレット感染血清を作製し、流行株との反応性を調べた。

A(H1N1)pdm09 ウイルスでは、今回鶏卵で分離した 2 株のウイルスに対するフェレット感染血清は、流行株に対してよく反応した。流行株は、現行のワクチン株である

A/California/7/2009 のフェレット感染血清ともよく反応しているが、今後変異株の出現に備えて、最近の流行株から新しいワクチン候補株を準備しておくことは重要である。

B 型ウイルスについても同様に、より流行株に近いワクチン候補株を作製し選択肢を増やしておくことは重要だと思われる。

近年、H3N2 ウイルスを鶏卵で分離すると、HA の抗原部位に変異が入り抗原性が変化するため、流行株とワクチン株の抗原性が乖離する現象が起き、ワクチン株を選定する際の大きな問題となっている。しかし、今回鶏卵で分離した A/Saitama/103/2014 株の HA の抗原部位には変異が入っていなかった。これが、このウイルスに対するフェレット感染血清が、現在あるいは次シーズン南半球用のワクチン株に対するフェレット感染血清よりも、流行株との反応性がよかった理由だと考えられる。流行株との反応性がよいことから A/Saitama/103/2014 株は有力なワクチン候補株となることが期待される。従来季節性インフルエンザウイルスが鶏卵で効率よく増殖するためには HA に変異が入ることが一般的であったが、A/Saitama/103/2014 株に関しては NA に変異が蓄積しており、NA が HA の役割の一部を担ったと考えられる。

#### E. 結論

インフルエンザウイルスは変異を起こしやすく、シーズンごとにワクチン推奨株を決めなければならない。そのためには、流行株の遺伝子の変化や抗原性の変化を常にモニタリングし、新しいウイルスの出現をいち早く捉える必要がある。そして、常に流行しているウイルスを鶏卵で分離し、ワクチン株として使用できる状態にしておくことは、有効なワクチン株を選定する上で不可欠である。特に、A/H3N2 ウイルスでは、鶏卵で分離した際にウイルスの抗原性が変化してしまう鶏卵馴化による影響が大きく、ワクチン候補株として使用可能なウイル

ス自体がほとんど存在しない。そのため、少しでも多くの A/H3N2 ウイルスを鶏卵で分離し、ワクチン候補株を分離することは、最優先に行うべきことのひとつである。

## **F. 研究発表**

### 1. 論文発表

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. 69(1) 83-6 2016

### 2. 学会発表

桑原朋子. 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. 5th Negative Strand Virus-Japan. 2016年1月. 沖縄.

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

## **G. 知的財産権の出願・登録状況**

なし



## 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

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・第六室長

### 研究要旨

インフルエンザワクチン候補株および市中流行株の抗原性を試験するためのフェレット抗血清の作製を行った。また鶏卵や細胞培養を用いた継代によって生じる変異による病原性の変化ならびに防御抗体の誘導能に関する検討を行った。一方、鶏卵を用いた継代によって変異した H1N1pdm (A/Narita 株) ならびに臨床分離株の感染抗血清を作製し、抗原性試験を行った結果、分離株の抗血清は継代株の抗原性の違いを評価できたが、鶏卵継代株に対する抗血清は原株および分離株の抗原性の違いは評価できなかった。

### A. 研究目的

各国で流行するインフルエンザウイルスは、世界保健機構（WHO）の世界インフルエンザ監視対応ネットワーク（GISRS）が中心となり、発生動向監視（サベイランス）や流行予測が行われており、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このネットワークに参加し、日本国内を中心としたサベイランスを行っている。このサベイランスは定点医療機関より各地方衛生研究所に報告されたインフルエンザの遺伝子および抗原情報等を基に、国際間の流行の違いや過去の流行との相違を比較し次年度のワクチン選定やワクチンの有効性を評価している。このような流行株の抗原性解析には、フェレットの感染血清が用いられている。そのため本研究では、流行株およびワクチン株の抗原性解析のためのフェレット抗血清の作製およびその評価を行った。

また、近年のインフルエンザワクチンは鶏卵で増殖を高めるための遺伝子改変が行われているが、この過程で抗原性が変化し、ワクチンの有効性を著しく減弱させることが指摘されている。そのため本研究では鶏卵で馴化された

ウイルス株を用いたフェレット抗血清を作製し、鶏卵馴化による変異がもたらす影響について検討した。

### B. 研究方法

#### ・フェレット

日本 SLC より購入した 6~12 ヶ月齢のフェレット（メスおよびオス）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による審査を受け、同研究所が定める実験動物管理規定を遵守して行われた。

#### ・抗血清採取

A/Saitama/103/2014(A/Saitama;H3N2)、A/Hong Kong/4801/2014(X-263B;H3N2)、A/Yokohama/50/2015(A/Yokohama;H1N1pdm)、A/Ibaraki/N12014/2009(N14;H1N1pdm) および A/Narita/1/2009(A/NCK;H1N1pdm) と鶏卵馴化株 (A/NE15)、それぞれの株を経鼻接種 (100 もしくは 500  $\mu$  L) した。接種 2 週後、部分ないしは全採血を行い、血清を分離し抗血清として使用した。

#### ・感染防御実験

A/NE15株を投与したフェレットは野外株である N14 株をチャレンジし経時的に鼻腔洗浄液を回収し、ウイルス価を測定した。ウイルス価の測定には単層培養した 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) および中和試験 (Neutralization test; NT)

HI および NT は WHO Global Influenza Surveillance Network の “Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza” に記載された手法に則って行った。

HI は RDE 処理した血清の 2 倍階段希釈列を 96 穴プレート上で作製後、4HA 価に調整したウイルス抗原を今後し、0.5%七面鳥もしくは 1%モルモット血球を混合し、血球凝集阻害能を観察した。NT は HI 同様、2 倍階段希釈列を 96 穴プレート上で作製後、100TCID<sub>50</sub>/50  $\mu$ l 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 CO<sub>2</sub> 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)

本研究ではヒト臨床検体由来のウイルスを用いた。ヒト臨床検体の採材ならびに使用に関しては、国立感染症研究所・倫理委員会の審査を受け行われた。

### C. 研究結果

1) A/Saitama、X-263B および A/Yokohama の

#### 抗血清作製

・A/Saitama 株: 3 頭のフェレットに A/Saitama 株を経鼻的に投与し 2 週に血清を回収した。

HI 価を測定した結果、ホモ値は 320、640、320 と高い HI 価が認められた (表 1)。埼玉株はクレード 3C.2a に分類されるが、同じクレードの Hong Kong/4801 に対しても高い HI 価を示した。このことから今回作製した抗血清が抗原性の評価に使用可能であることが示唆された。

・X-263B 株: 4 頭のフェレットを用い、X-263B 株の感染 2 週目の抗血清を作製した。これら抗血清を用いた HI 試験を行った結果、4 頭すべてに 2560 以上の高いホモ値を示した (表 2)。同じクレードの Saitama 株に対する反応性はホモ値よりも 2 冠以上低い、X-263B は HGR 株であるため、HA に変異を伴っていることがこのような反応性の低下につながったことが示唆される。今後、他の株との反応性を精査し試験血清としての適否を評価する。

・A/Yokohama 株: 4 頭のフェレットを用いて抗血清を作製した。これら抗血清を用いた HI 試験を行った結果、4 頭すべて 5120 の高いホモ値が認められた (表 3)。他の H1N1pdm 株である A/California および A/Narita に対しても 1280~5120 と一律に高い HI 価が認められたことから、試験血清として高い有用性があることが示唆される。

#### 2) 鶏卵馴化 A/Narita 感染フェレットにおける野外株に対する感染阻止能および抗血清の反応性の検討

鶏卵馴化 A/Narita 株 (A/NE15) もしくは原株 (A/NCK) をそれぞれ 3 頭のフェレットに経鼻投与後 2 週間後に部分採血により抗血清を採取した、その 2 週後、野外株である N14 株を感染し、経時的に鼻腔洗浄液を回収し、ウイルス価を測定した。N14 株は 2009 年に国内で流行し、リファランス株の A/California/7/2009 株の類似株であることが明らかとなっている株である (結果非表示)。その結果、原株を感

染させた 1/3 頭で、感染 1 日目に僅かなウイルスが検出されたのみで、他の全ての鼻腔洗浄液でウイルスの完全な防御が認められた (図 1)。これら感染血清を用いて抗原性試験を行ったところ、馴化株および原株で免疫したすべてのフェレットで感染株の N14 に対する高い HI 抗体価が確認された。しかしその一方、N14 の抗血清で抗原性試験を行った場合には、鶏卵馴化株との抗原性の著しい乖離が認められた (表 4)。以上の結果は、A/Narita 株の場合、鶏卵で馴化した株を感染させたフェレットでは原株および原株との類似株の抗原性を高く認識できることが示唆された。

#### D. 考察

近年の H3N2 株は鶏卵での分離および増殖が困難になっており、また鶏卵で分離できた株でも変異を伴っていることが多い。一方、インフルエンザワクチンは鶏卵を用いて製造するため、遺伝子を改変し、鶏卵での増殖性を高める必要があるが、この過程で生じた変異により、ワクチンの抗原性が流行株と乖離し、効果が著しく減弱する。それに加え野外株も毎年変異を繰り返しているため、適切に流行株を評価するサバイランスの重要性が一段と増している。

現在流行株やワクチン種株の抗原性の評価にはフェレット感染血清が用いられている。しかしウイルス株や個体間で抗血清の反応性が異なるため、適切な抗血清の作製はウイルス株の抗原性を適切に評価するためには重要である。

今回評価血清として 3 株の抗血清を作製した。それぞれ 3 ないし 4 頭のフェレットを用いたが、個体間での大きな差異は認められなかった。しかし、X-263B および A/Yokohama 株の抗血清は全てのフェレットで 2560 以上の高いホモ値を示したが、A/Saitama 株の抗血清は 320~640 のホモ値であった。A/Saitama と X-263B は同じ H3N2 株の同クレードに分類されている株であり、それぞれの株に対する反応性を確

認したが、A/Saitama の抗血清では X-263B の抗原性との差異は認められなかったが、X-263B の抗血清では A/Saitama との抗原性の違いに有意性が認められた。他の NIC では CDC で 1280 のホモ値が示されているため、今後、本血清を用いた抗原性の評価が他の NIC の評価との相違に繋がることも考えられる。

このような現象は鶏卵で馴化した Narita 株を用いた検討でも認められている。A/NCK 株の抗血清で馴化株の抗原性を検討した場合、1/3 頭で 2 冠、2/3 頭で 1 冠の違いを示した。しかしながら A/NE15 株の抗血清では A/NCK 株の抗原性に相違が認められなかった。さらにこのような現象は分離株である N14 株でより顕著であった。N14 株の抗血清を用いて A/NE15 の抗原性を評価した場合には、3/3 頭全ての抗血清で 4 冠の低下を示したのに対し、A/NE15 の抗血清は 3/3 頭全ての血清が N14 との抗原性の違いを示さなかった。すでに A/NE15 株は HA の 155 および 223 番目のアミノ酸の変異が明らかとなっているため、このような変異が免疫血清の反応性に影響を与えていることが示唆される。その一方で、今回鶏卵で馴化した株の抗血清が原株や流行株と高い反応性を示したことは、必ずしも鶏卵を介することで生じる変異が流行株の感染を阻止できない訳ではないことを示唆している。実際に A/NE15 株で免疫したフェレットでは N14 株の感染を完全に阻止している。

#### E. 結論

今回作製した A/Saitama、X-263B および A/Yokohama 株に対する抗血清は、流行株およびワクチン株の抗原性の評価に高い有用性がある。また鶏卵を介した変異株は、原株に対する抗血清の反応性は低いですが、変異株に対する抗血清は原株との反応性が高かった。これがワクチンの効果にどのように反映されるかが今後の検討課題となった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Ainai A, Hasegawa H, Obuchi M, Odagiri T, Ujike M, Shirakura M, Nobusawa E, Tashiro T, Asanuma H. Host adaptation and the alteration of viral properties of the first influenza A/H1N1pdm09 virus isolated in Japan. PLoS ONE, 2015; 10(6): e0130208.

2) Asanuma H, Ohori J, McGhee JR, Fujihashi K. Past Efforts and Future Prospects for a Nasal Influenza Vaccine. Clinical Immunology, Endocrine & Metabolic Drugs, 2015; VOL. 2 ISSUE:1, 13-26.

3) Li TC, Yang T, Ami Y, Suzaki Y, Shirakura M, Kishida N, Asanuma H, Takeda N, Wakita T. Ferret Hepatitis E Virus Infection Induces Acute Hepatitis and Persistent Infection in Ferrets. Vet Microbiol, 2016 Feb 1;183:30-6.

### 2. 学会発表

1) 原田勇一、高橋 仁、浜本いつき、浅沼秀樹、許斐奈美、小田切孝人、信澤枝里  
季節性培養細胞インフルエンザワクチン製造開発への取り組み（製造株作製用ウイルスの分離）

第 63 回日本ウイルス学会、福岡、2015

2) Ohori J, Asanuma H, Aso K, Ikeda Y, Sugita G, Fujihashi K, McGhee JR, Fujihashi K. Nasal Delivery Of Plasmid Flt3 Ligand And CpG ODN Restore Influenza Virus-Specific Secretory IgA Ab Responses

第 44 回日本免疫学会学術集会、札幌、2015

3) Kayoko Sato, Hideki Asanuma, Manabu Ato. NF- $\kappa$ B activation by influenza vaccines mediates through TLR3, TLR7, and RIG-I

第 44 回日本免疫学会学術集会、札幌、2015

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 A/Saitama株の抗血清による抗原性試験

Test Antigen	Passage history	Saitama/103/2014			Switzerland/9715293/2013
		Egg No. NIID1	Egg No. NIID2	Egg No. NIID3	Cell No.3
A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	SIAT1/SIAT2 +SIAT1 <sup>1)</sup>	160	160	160	320
A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2)	E6(Am1A)/E1+ J <sup>2)</sup>	320	320	640	80
A/Hong Kong/7127/2014 (H3N2)	E6/E1+1	160	320	640	160
A/Hong Kong/7127/2014 (H3N2)	MDCK1+SIAT1	80	80	80	80
A/Saitama/103/2014 (H3N2)	NC0+3+E8 (Am4A14) <sup>3)</sup>	320	640	320	80
A/Narita/1/2009 (H1N1)pdm09	MDCK1 +2	<10	<10	<10	<10
B/PHUKET/3037/2013 Byam	MDCK2 +1	<10	<10	<10	<10
B/Texas/02/2013 Bvic	MDCK1/MDCK2+1	<10	<10	<10	<10

<sup>1)</sup> SIAT: Canine cocker spaniel kidney sialic acid over expression

<sup>2)</sup> Am: amniotic cavity

<sup>3)</sup> NC: NIID-MDCK

表2 X-263B株の抗血清による抗原性試験

Test Antigen	Passage history	Switzerland/ 9715293/13 (NIB-88)	Saitama/103 /14	HK/4801/14 (X-263B)			
		Egg No.2	SIAT No.1	Egg No.1	Egg No.2	Egg No.3	Egg No.4
	SIAT1/SIAT						
A/Switzerland/9715293/2013	2 +SIAT1*	80	80	40	80	80	40
A/Switzerland/9715293/2013	E4 +1	1280	160	160	80	160	80
A/Switzerland/9715293/2013 (NIB-88)	E5 +1	640	80	20	20	40	20
	MDCK 1						
A/Saitama/103/2014	+SIAT1	320	1280	640	320	640	640
	MDCK 1						
A/Hong Kong/4801/2014(X-263B)	+SIAT1	20	1280	2560<	2560<	2560<	2560<

\* SIAT: Canine cocker spaniel kidney sialic acid over expression

表3 A/Yokohama株の抗血清による抗原性試験

Test Antigen	Passage history	A/Yokohama/50/2015 MDCK2 +1				A/California/07/2009
		NIID No.1	NIID No.2	NIID No.3	NIID No.4	NIID No.2
A/Yokohama/50/2015	MDCK2 +1	5120	5120	5120	5120	5120
A/California/07/2009pdm	E2 +2	2560	1280	1280	1280	2560
A/California/07/2009pdm (X-179A)	Ex/E1 +2	5120	5120	5120	5120	5120
A/Narita/1/2009 (H1N1)pdm09	MDCK1 +2	5120	2560	2560	2560	5120
A/Sapporo/163/2011 (H1N1)pdm09	MDCK2 +2	80	40	40	40	80
	MDCK1/MDCK2					
A/Texas/50/2012 (H3N2)	+SIAT1*	<10	<10	<10	<10	<10
	MDCK1/MDCK2+1					
B/Texas/02/2013	MDCK1/MDCK2+1	40	20	40	80	40
B/PHUKET/3037/2013	MDCK2 +1	20	20	40	80	40

\* SIAT: Canine cocker spaniel kidney sialic acid over expression

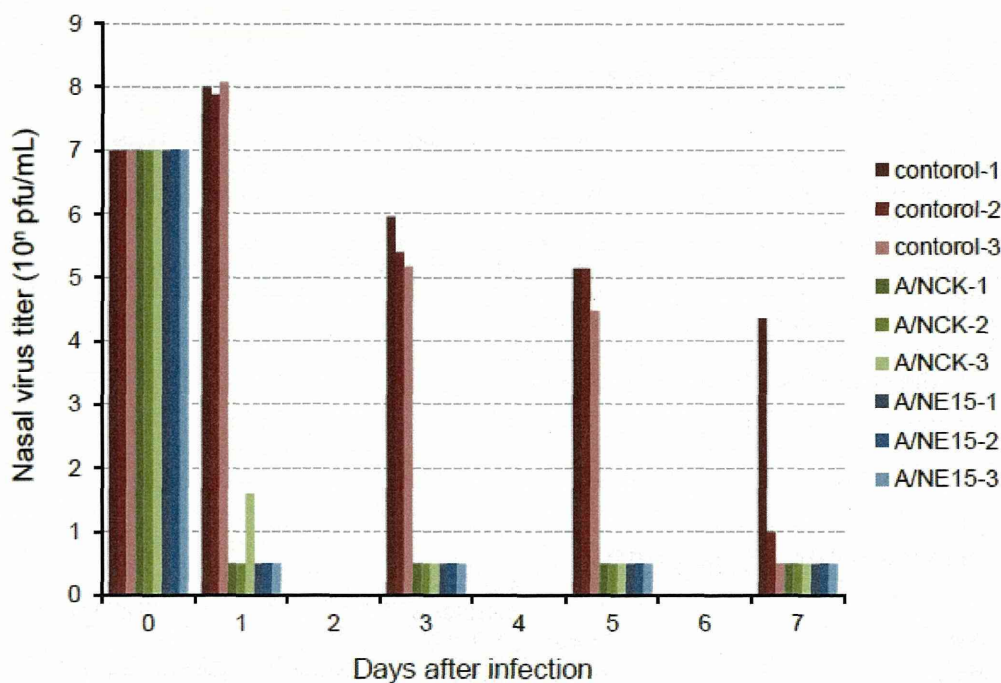


図1 鶏卵馴化株で免疫したフェレットにおける野外株に対する防御効果  
 鶏卵で馴化したA/Narita(A/NE15)もしくは原株(A/NCK)を感染後、経時的に  
 鼻腔洗浄液を回収し、ウイルス価を測定した。

表4 鶏卵馴化フェレット抗血清による抗原性試験

Test Serum	Test antigen		
	A/NCK	A/NE15	N14
A/NCK-1	2560	640	2560
A/NCK-2	1280	640	2560
A/NCK-3	2560	1280	2560
A/NE15-1	640	640	1280
A/NE15-2	640	640	1280
A/NE15-3	1280	640	1280
N14C3-1	2560	320	5120
N14C3-2	2560	320	5120
N14C3-3	640	160	2560

## 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

研究分担者 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

日本を含む東アジア地域における抗インフルエンザ薬耐性ウイルスの監視を目的として、日本、ベトナム、台湾、モンゴル、ミャンマー、ラオス、ネパールおよびインドの分離株について、ノイラミニダーゼ（NA）阻害薬、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を調べた。その結果、日本国内において、A(H3N2)ウイルスおよび B 型ウイルスに関して、オセルタミビル・ペラミビル耐性株が 2 株、オセルタミビル・ペラミビル感受性低下株が 1 株、オセルタミビル感受性低下株が 4 株、またザナミビル感受性低下株が 4 株検出された。耐性株に関しては薬剤選択圧によって出現したと考えられるが、感受性低下株については、限局的な感染伝播が起こった可能性があり、今後も引き続き耐性ウイルスの監視を行う必要がある。

### 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 阻害薬、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 NA 阻害薬に対して感受性であるが、日本国内では 2013/2014 シーズンに札幌市を中心とする北海道内で 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 A(H1N1)pdm09 ウイルスの地域流行があった。本研究では、抗インフルエンザ薬耐性ウイルスの監視を目的として、日本を含む東アジア地域において、NA 阻害薬耐性ウイルスのスクリーニングを実施し、その性状解析およびリスク評価を行った。

### B. 研究方法

日本、ベトナム、台湾、モンゴル、ミャンマー、ラオス、ネパールおよびインドの分離株について、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、IC<sub>50</sub> 値を算出した。さらに NA 遺伝子のシーケンス解析により、既知の薬剤耐性マーカーの有無を検索した。

薬剤耐性の判定は WHO の判定基準に準じ、感受性参照株と比較して IC<sub>50</sub> 値が A 型ウイルスでは 10～100 倍上昇した株、B 型ウイルスでは 5～50 倍上昇した株を感受性低下株とし、A 型ウイルスでは 100 倍以上、B 型ウイルスでは 50 倍以上上昇した株を耐性株と判定した。

（倫理面への配慮）

該当なし

### C. 研究結果

A(H1N1)pdm09 ウイルスは国内株 76 株および海外株 94 株、A(H3N2)ウイルスは国内株 208 株および海外株 92 株、B 型ウイルスは国内株 305 株および海外株 63 株について解析を行った。その結果、A(H1N1)pdm09 ウイルスでは、国内外ともに感受性低下株および耐性株は検出されなかった。A(H3N2)ウイルスでは日本国内において、NA 蛋白質に D151A あるいは D151N 変異をもつザナミビル感受性低下株が 2 株、NA 蛋白質に I222T および S331R 変異をもつオセルタミビル感受性低下株が 4 株、また NA 蛋白質に R292K 変異をもつオセルタミビル・ペラミビル耐性株が 2 株検出された。B 型ウイルスでは日本国内において、NA 蛋白質に I114M 変異をもつザナミビル感受性低下株が 1 株、NA 蛋白質に N151T 変異をもつザナミビル感受性低下株が 1 株、NA 蛋白質に I221T 変異をもつオセルタミビル・ペラミビル感受性低下株が 1 株検出された。

国内株の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広く情報提供を行った。また、海外株の解析結果は、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報告した。

### D. 考察

オセルタミビル・ペラミビル耐性 A(H3N2) ウイルスが検出された患者は、オセルタミビルおよびペラミビルの投与を受けており、薬剤選択圧によって患者の体内で耐性ウイルスが選択的に増殖したと考えられる。一方、I222T・S331R 変異をもつオセルタミビル感受性低下 A(H3N2)ウイルス、I114M 変異をもつザナミビル感受性低下 B 型ウイルスおよび I221T 変異をもつオセルタミビル・ペラミビル感受性低下 B 型ウイルスが検出された患者はいずれも検体採取時に薬剤の投与を受けておらず、感受

性低下ウイルスの感染伝播が起こった可能性がある。幸いなことにこれらの感受性低下ウイルスの伝播は限局的で、その後感染が広がった様子はないが、今後の動向に注意が必要である。

### E. 結論

日本国内において、抗インフルエンザ薬に耐性あるいは感受性低下を示す A(H3N2)ウイルスおよび B 型ウイルスが検出された。感受性低下ウイルスについては、限局的な感染伝播が起こった可能性があり、今後も引き続き耐性ウイルスの監視を行う必要がある。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

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.* 2016 Jan 21;69(1):83-6.

Zhao D, Fukuyama S, Sakai-Tagawa Y, Takashita E, Shoemaker JE, Kawaoka Y. C646, a novel p300/CREB-binding protein-specific inhibitor of histone acetyltransferase, attenuates influenza A virus infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Dec 28. pii: AAC.02055-15.

Sriwilaijaroen N, Suzuki K, Takashita E, Hiramatsu H, Kanie O, Suzuki Y. 6SLN-lipo PGA specifically catches (coats) human influenza virus and synergizes neuraminidase-targeting drugs for human influenza therapeutic potential. *J Antimicrob Chemother.* 2015 Oct;70(10):2797-809.

Takashita E, Kiso M, Fujisaki S, Yokoyama M, Nakamura K, Shirakura M, Sato H, Odagiri T,



Kawaoka Y, Tashiro M. Characterization of a large cluster of influenza A(H1N1)pdm09 viruses cross-resistant to oseltamivir and peramivir during the 2013-2014 influenza season in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 May;59(5):2607-17.

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.* 2015 May;117:27-38.

## 2. 学会発表

Takashita E, Kiso M, Fujisaki S, Yokoyama M, Nakamura K, Shirakura M, Sato H, Odagiri T, Kawaoka Y, Tashiro M. 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. 4th isirv-AVG Conference; Influenza and other Respiratory Virus Infections: Advances in Clinical Management. June 2015. Texas, USA.

Kawakami C, Momoki T, Saikusa M, Ozawa H, Shimizu K, Usuku S, Mitamura K, Takashita E, Fujisaki S, Odagiri T. Genetic Analysis of Influenza B Viruses Isolated During the Five Seasons in Yokohama, Japan. 4th isirv-AVG Conference; Influenza and other Respiratory Virus Infections: Advances in Clinical Management. June 2015. Texas, USA.

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. 川上千春, 七種美和子, 豊澤隆弘, 高下恵美. 横浜市における過去5シーズンのB型インフルエンザウイルスの遺伝子解析. 第47回日本小児感染症学会. 2015年10月. 福島.

Takashita E, Fujisaki S, Neumann G, Furuta Y, Kawaoka Y, Tashiro M, Odagiri T. 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. 2015年11月. 福岡.

Kawakami C, Takashita E, Fujisaki S, Saikusa M, Usuku S, Odagiri T, Mitamura K. Genetic Analysis of Influenza B Viruses isolated during the Five Seasons in Yokohama. 第63回日本ウイルス学会. 2015年11月. 福岡.

Watanabe S, Nakamura K, Fujisaki S, Shirakura M, Takashita E, 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. 2015年11月. 福岡. 高下恵美. 日本国内におけるNA阻害薬耐性インフルエンザウイルス検出状況. 5th Negative Strand Virus-Japan. 2016年1月. 沖縄.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 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

研究分担者 齋藤玲子 新潟大学大学院医歯学総合研究科・教授

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（新潟大学大学院医歯学総合研究科）、尾ヶ井マサヨ（女池南風苑・看護介護科長）、樋熊紀男（女池南風苑・施設長）

### 研究要旨

2015-2016 年シーズンの 4 価インフルエンザワクチン接種前後の成人・高齢者の A(H1N1)pdm09 抗原、A(H3N2)抗原、B/ビクトリア系統、B/山形系統の抗原に対する血清抗体価の調査を行った。スタッフ 100 名(平均年齢 42 歳)と、高齢入所者 46 名(平均年齢 87 歳)のワクチン接種前後の抗体価を赤血球凝集素阻害反応(HI 法)で測定し、ワクチン接種による変化を評価した。

成人群で A(H1N1)pdm, A(H3N2)で接種後には 70-90%を超える抗体価 40 倍以上の保有率を認め、GMT の値も上昇した。高齢者でも接種後に A(H1N1)pdm09 と A(H3N2)は、63-71%の H 抗体価 40 倍以上の保有率を認め、両群ともに 40 倍以上の抗体保有率割合の面からみた国際基準を満たしていた。一方で B 型は成人群、高齢者群ともに接種後の 40 倍以上の抗体保有率は 20%程度で国際基準を下回り、GMT の上昇も A 型に比べると低く反応性が低い傾向があった。接種後の副反応については、成人群、高齢者群ともに局所の発赤・腫れを申告した割合が増加し、特に接種者の半数以上が発赤を申告していた。その他の副反応症状申告数も若干の増加がみられたが、昨シーズンと大きな差はなく、重篤な全身反応は認められなかった。全体的にみると今シーズンのワクチンは、A 型は免疫原性の国際的な評価基準を満たしていたが、B 型は山形系、ビクトリア系統とも十分とは言えなかった。B 型では接種前値も低いことを考えると、測定を再検討する余地がある。

### A. 研究目的

流行するインフルエンザウイルスは、抗原性や型・亜型が年ごとに変化するため、インフルエンザワクチンと流行するインフルエンザの抗原性が一致しないことがしばしばある。このため、WHO が 1 年ごとに次のシーズンに流行するウイルス株を予測しその情報をもとに、次のシーズンのインフルエンザのワクチン株が決定される。

近年のインフルエンザの流行においては、A(H1N1)pdm09 および A(H3N2)に加えて B 型ウイルスは山形系統とビクトリア系統の混合流行が続いており、WHO も 2012/13 シーズンから 4 価用ワクチン向けには B 型 2 系統からそれぞれワクチン株を推奨している。また、米国においては 2013/14 シーズンから 4

価のインフルエンザワクチンが製造承認され、世界の動向は4価ワクチンの供給へと移行してきている。

わが国においても2015-2016年シーズンからA型2株に加えてB型2株を含めた4価のワクチンを導入することに決定した。2015-2016年シーズンのインフルエンザワクチンには、

\*A/カリフォルニア/7/2009(H1N1)pdm09

\*A/スイス/9715293/2013(H3N2)

\*B/プーケット/3073/2013(山形系統)

\*B/テキサス/3/2013(ビクトリア系統)

が使用されている。本調査では、高齢者施設のスタッフ(成人)、入所者(高齢者層)に対して、2014-2015シーズンにおけるワクチン接種前後の抗体価の変化を赤血球凝集素阻害試験(HI法)で測定し、ワクチン接種によるHI抗体価の変化を評価した。また、ワクチン接種後の副反応を検討した。

## B. 研究方法

新潟市内の高齢者施設のスタッフと入所者に対し、研究についてのインフォームドコンセントを得たうえで、年齢、前シーズンのワクチン接種歴、インフルエンザの罹患歴について聴取した。調査の参加者には、2014年11月にデンカ生研社製(デンカ)または阪大微研社製(微研)の2015-2016年シーズンHAインフルエンザワクチン(4価)を用法に基づき皮下接種した。接種前と接種3-4週間後の2回、血清を採血した。

血清は採取後すぐに血清分離し、抗体価検査を行うまで-20℃にて新潟大学で保管した。ワクチン接種前後の抗体価は、赤血球凝集抑制試験(HI)法にて定法にのっとり、モルモット赤血球と、デンカ生研社製のA/H1N1pdm抗原(A/カリフォルニア/7/2009)、H3N2抗原(A/スイス/9715293/2013)、B/山形

系統抗原(B/プーケット/3073/2013)、B/ビクトリア系統抗原(B/テキサス/3/2013)を用いて測定した。

抗体価の解析は高齢者施設のスタッフを“成人群”とし、高齢者施設の入所者を“高齢者群”として、大きく2群に分けて評価した。

接種後48時間以内の副反応について自己申告(入所者の場合はスタッフの観察による)にて、「発疹、発赤、腫れ、痛み、その他(全身症状)」の有無を報告してもらい、スタッフ群と入所者群で副反応症状を訴えたものの割合を検討した。

(倫理面への配慮)

患者・協力者には十分な説明を行い書式にて署名にて了解を得た。なお本調査は新潟大学医学部倫理委員会にて承認された。

## C. 研究結果

成人群のペア血清は100件、高齢者群のペア血清は46件採取された。成人群の平均年齢は42.0±12.0歳、高齢者群の平均年齢は87.2±7.6歳であった(表1)。

40倍以上の抗体価保有率は、成人群でA/カリフォルニア/7/2009接種前58.0%、接種後76.0%、A/スイス/9715293/2013接種前59.0%、接種後91.0%、B/プーケット/3073/2013(山形系統)接種前9.0%、接種後19.0%、B/テキサス/3/2013(ビクトリア系統)接種前2.0%、接種後14.0%であり、A型では接種後において国際基準の70%を超えていたが、B型では国際基準を大きく下回る結果となった。(表1、図1)。

一方、高齢者ではA/カリフォルニア/7/2009接種前37.0%、接種後63.0%、A/スイス/9715293/2013接種前8.7%、接種後71.1%、B/プーケット/3073/2013(山形系統)接種前

2.2%、接種後 15.2%、B/テキサス/3/2013(ビクトリア系統)接種前 8.7%、接種後 21.7%であり、こちらも B 型において国際基準の 60%を大きく下回る結果となった。

成人群のワクチン接種前後の HI 抗体価の幾何平均 (GMT) については、A/カリフォルニア/7/2009 接種前 34.8、接種後 54.3(接種前後での増加率 = 1.6 倍)、A/スイス/9715293/2013 接種前 32.1、接種後 97.1(接種前後での増加率 = 3.0 倍)、B/プーケット/3073/2013(山形系統)接種前 11.7、接種後 14.8(接種前後での増加率 = 1.3 倍)、B/テキサス/3/2013(ビクトリア系統)接種前 8.0、接種後 11.0(接種前後での増加率 = 1.4 倍)であり、GMT の増加率でみた場合 H3N2 以外は国際基準の >2.5 倍を下回る結果となった (表 1, 図 1)。この増加率の結果を製造会社別で比較してみると両社間に大きな差は見られなかった。Mean fold increase は、A/カリフォルニア/7/2009 = 2.1、A/スイス/9715293/2013 = 4.9、B/プーケット/3073/2013(山形系統) = 1.5、B/テキサス/3/2013(ビクトリア系統) = 1.7 であった。

一方、高齢者の HI 抗体価の GMT は、A/カリフォルニア/7/2009 接種前 20.3、接種後 37.1(接種前後での増加率 = 1.8 倍)、A/スイス/9715293/2013 接種前 11.8、接種後 47.9(接種前後での増加率 = 4.1 倍)、B/プーケット/3073/2013(山形系統)接種前 5.9、接種後 11.3(接種前後での増加率 = 1.9 倍)、B/テキサス/3/2013(ビクトリア系統)接種前 7.9、接種後 12.3(接種前後での増加率 = 1.6 倍)であり、こちらも GMT の増加率でみた場合 H3N2 以外は国際基準の >2.0 倍をわずかに下回る結果となった。製造会社別で比較すると H3N2 においてデンカ = 2.6 に対し微研 = 6.3 と微研の方で増加率が高い結果が得られたが、その他の抗原に関しては成人群同様大きな差は見ら

れなかった。Mean fold increase は、A/カリフォルニア/7/2009 = 2.7、A/スイス/9715293/2013 = 7.9、B/プーケット/3073/2013(山形系統) = 2.4、B/テキサス/3/2013(ビクトリア系統) = 2.0 であり、成人群よりも接種前後で抗体価の上昇が認められた者が若干多い結果が得られた。

接種後の反応を、抗体価応答率 (ワクチン接種前後での抗体価 4 倍以上の上昇率) で評価すると、成人群では、A/カリフォルニア/7/2009 で 13.0%、A/スイス/9715293/2013 で 43.0%、B/プーケット/3073/2013(山形系統) で 6.0%、B/テキサス/3/2013(ビクトリア系統) で 12.0%であった (表 1)。ワクチン製造会社別で比較してみると A 型ではデンカワクチン接種群で 4 倍以上の上昇を示したものが多かったが、B 型では微研ワクチン接種群で 4 倍以上の上昇を示したものが多く見られた。高齢者群では A/カリフォルニア/7/2009 で 19.6%、A/スイス/9715293/2013 で 60.9%、B/プーケット/3073/2013(山形系統) で 26.1%、B/テキサス/3/2013(ビクトリア系統) で 10.9% という結果を示し、製造会社別で比較すると A/H1N1 と B/ビクトリア系統では両社間に大きな差は見られなかったが、H3N2 と B/山形系統では微研ワクチン接種群で 4 倍以上の抗体価上昇を認めたものが多くみられた (表 1)。

ワクチン接種後の副反応について、成人 100 名と高齢者 46 名で比較したところ、最も多い副反応は成人群、高齢者群共に局所の発赤でそれぞれ 53.0%、87.0%であった (表 2)。次いで多いのが局所の腫れで、成人で 42.0%、高齢者で 23.9%であった。また副反応を申告した者の割合は昨シーズンと比較して、今シーズンのワクチン接種の方が全ての副反応症状で多い傾向がみられた。その他、全身的な重度の副反応は認められなかった。