

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14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

2,3 または 2,6 結合した 2 種類の合成シアロ糖鎖ポリマー（Neu5Ac 2-3Gal 1-4GlcNAc 1-pAP- -PGA、Neu5Ac 2-6Gal 1-4GlcNAc 1-pAP- -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、2,3 または 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

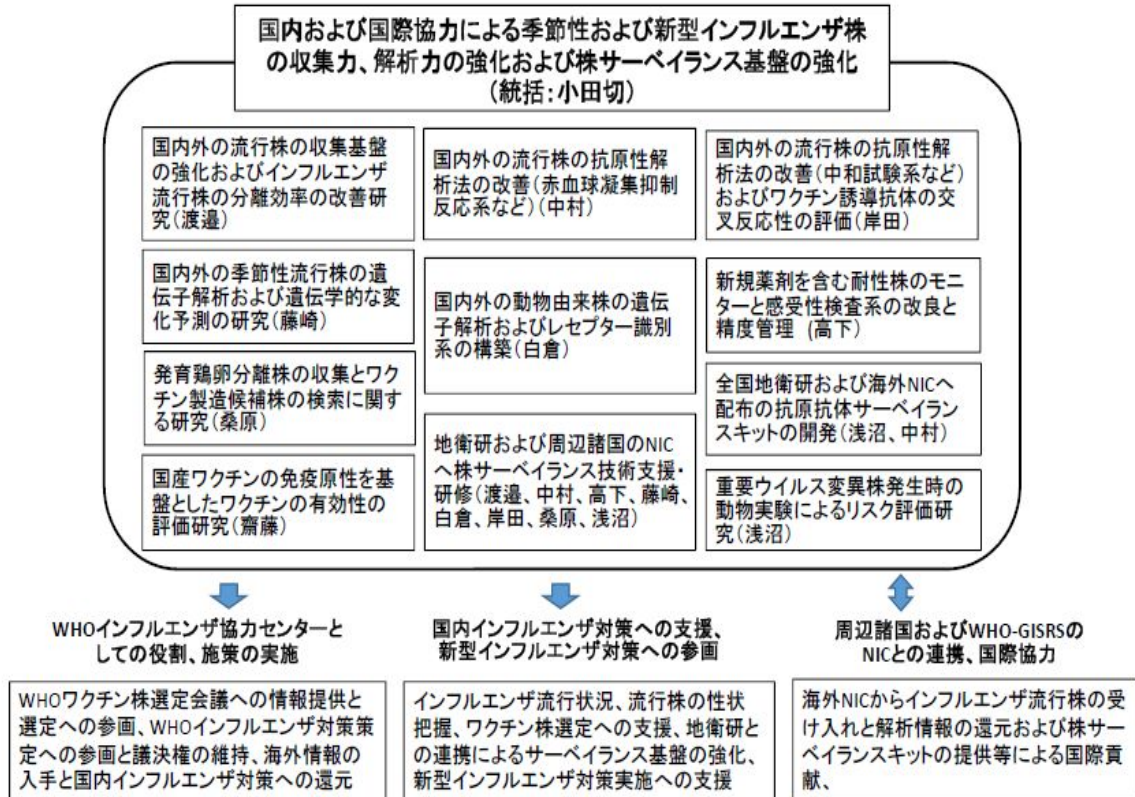
- 1) Tadaki Suzuki, Akira Kawaguchi, Akira Ainaia, Shin-ichi Tamura, Ryo Ito, Pretty Multihartina, Vivi Setiawaty, Krisna Nur Andriana Pangesti, Takato Odagiri, Masato Tashiro, and Hideki Hasegawa Relationship of the quaternary structure of human secretory IgA to neutralization of influenza virus. PNAS 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、田代真人、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



1. 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不是な印象があった。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 - 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 - 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、地方衛生研究所に伝えるためにも、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, Einfeld 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。

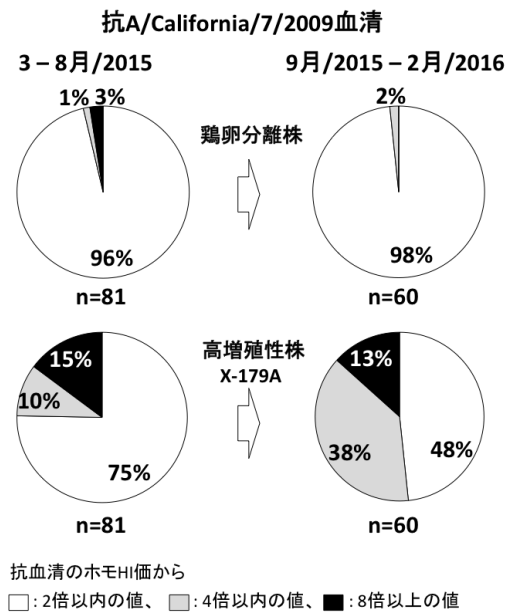
C . 研究結果

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

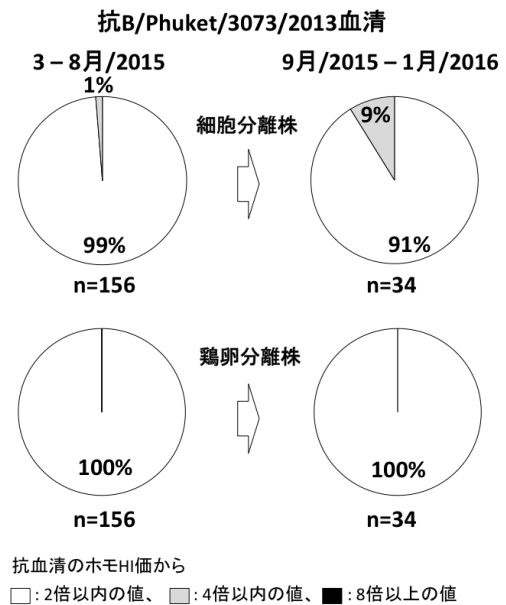
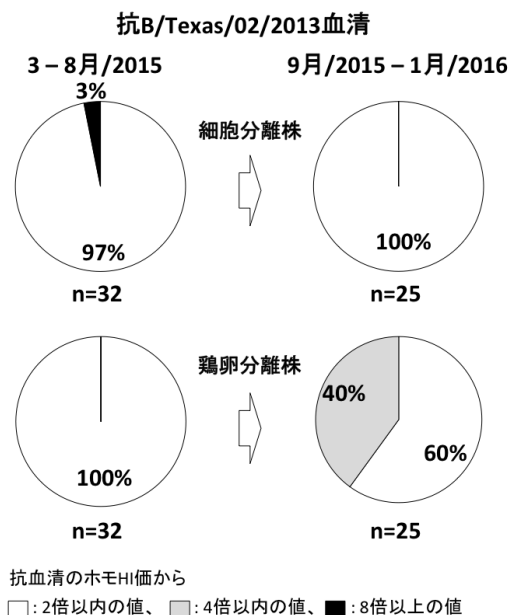


図 3 各種フェレット感染血清と B ビクトリア系統分離株との反応性



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℃、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℃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

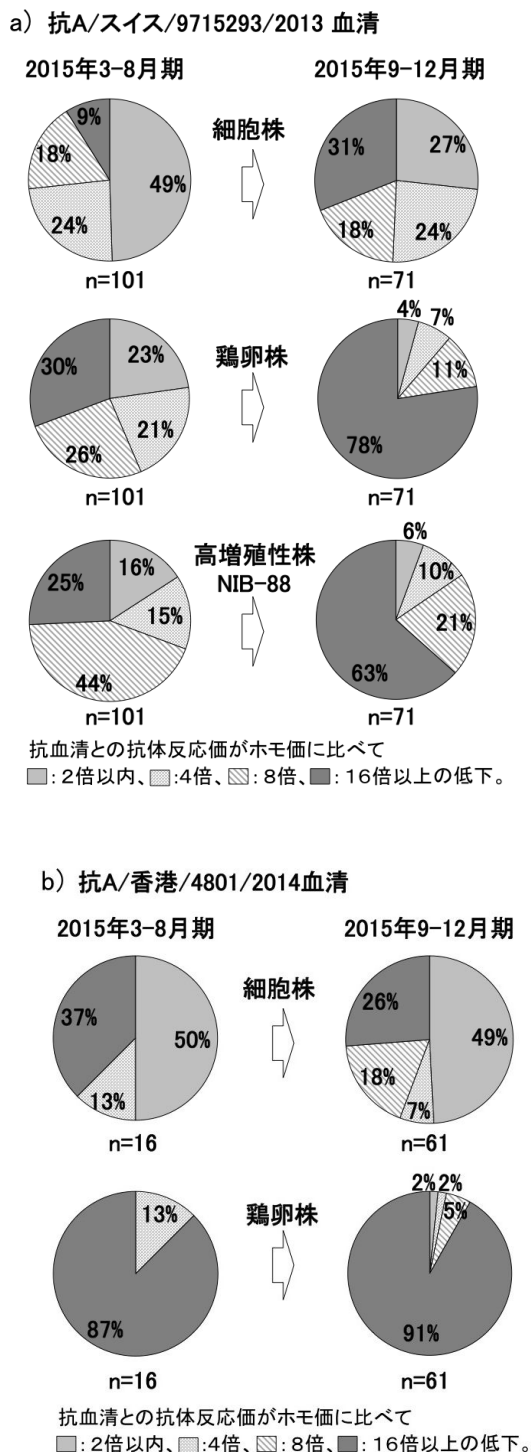
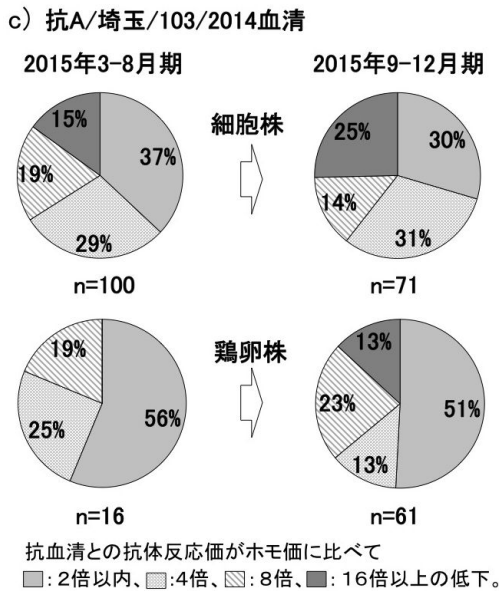


図1 続き



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, Suzuki
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,
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

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 つに区別されており、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 型ピ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 型ピ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 μ 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 細胞を用いた寒天ブラン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、100TCID₅₀/50 μl 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)

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ベ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) Aina 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- 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 ¹⁾	160	160	160	320
A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2)	E6(Am1A)/E1+ 1 ²⁾	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) ³⁾	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

¹⁾ SIAT: Canine cocker spaniel kidney sialic acid over expression

²⁾ Am: amniotic cavity

³⁾ 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
A/Texas/50/2012 (H3N2)	MDCK1/MDCK2 +SIAT1*	<10	<10	<10	<10	<10
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

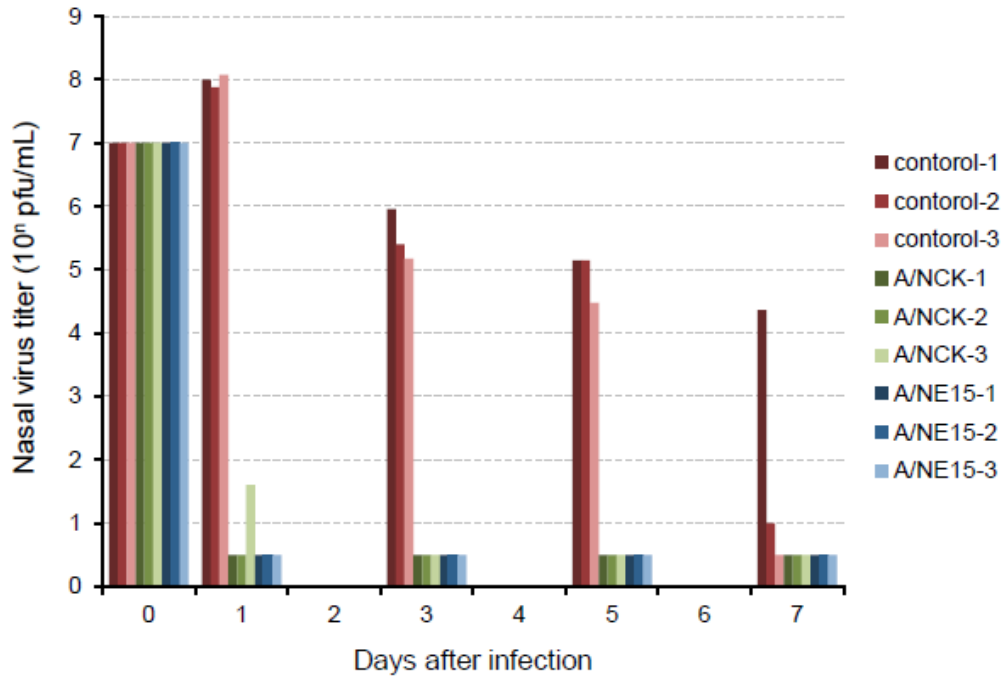


図1 鶏卵馴化株で免疫したフェレットにおける野外株に対する防御効果
 鶏卵で馴化したA/Narita (A/NE15) もしくは原株 (A/NCK) を感染後、経時的に
 鼻腔洗浄液を回収し、ウイルス価を測定した。

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、IC₅₀ 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 IC₅₀ 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。

成人層で 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 型は成人層、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、成人層、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%を超していたが、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、/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、/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結果となった。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。

D. 考察

成人群では、A(H1N1)pdm09、A(H3N2)においてワクチン接種後に40倍以上のHI抗体保有率は70-90%を超え、インフルエンザの罹患が予防できる可能性が高いと考えられるが、A(H1N1)pdm09では接種前後での4倍以上の抗体価の上昇を認めたものの割合では国際基準の40%を下回っており数値上では有効性が低い結果となった。しかし該当施設ではほとんどのスタッフが昨シーズンもワクチンを接種しており、接種前から抗体を保有していたことがこの結果の1つの要因と考えられる。一方でB/山形系統ならびにB/ビクトリア系統ではワクチン接種前の40倍以上の抗体保有率は2-9%と低く、接種後も14-20%程度にとどまる結果となった。この結果と昨年の結果を比較すると、昨シーズンの山形系B/Massachusetts/2/2012では、接種前の40倍以上の抗体保有率は74.8%、接種後78.6%(接種前 GMT = 43.7、接種後 GMT = 51.3)と高く、今シーズンのワクチンはB型の防御には若干の不安を残す結果となったが、このように低い結果となった原因は不明である。

高齢者群においては、A/H1N1pdm09、A/H3N2に対して、40倍以上のHI抗体価保有率を認めたものの割合は接種後63-71%でこちらも国際基準の60%を上回っており防御の効果が期待できるが、成人群同様B型の両系統は接種後20%程度とかなり低めであり防御効果に不安を残す結果となった。昨シーズンは、高齢者層でB型の接種後抗体価保有率は52.2%と成人より低かったが、今シーズンは20%程度とそれよりさらに低い結果となった。一方で、接種前の抗体価保有率をみると、今シーズンの山形系では0-2%と、接種前の値も極端に低い。昨シーズンは39.1%であったことを考えると、昨年から今年にかけてワク

チン株が変更(B/Massachusetts/2/2012(クレード2)→B/プーケット/3073/2013(クレード3))になったことを加味してもこの前値は低すぎるため、我々の用いた測定系に何らかの問題がある可能性も否めない。

またワクチン接種後少なからず抗体価の上昇が認められたのは高齢者群で成人群と比較して大きな差こそ見られなかったものの、数値上では高齢者の方が反応性は良かったと考えられる。(表1・Mean fold increase)

副反応については成人群、高齢者群ともに局所の発赤・腫れを申告したものの割合が増加し、特に接種者の半数以上が発赤を申告していた。その他の副反応でも昨シーズンより申告をした割合が上昇していた。今シーズンからは抗原が1種類増え、4価のワクチンになったことが何かしら影響しているとも考えられるが、実際のところは不明である。しかし昨シーズン同様重篤な副反応はみとめられなかったため、今シーズンのインフルエンザワクチンも安全に接種できると考えられる。

E. 結論

2015-2016年シーズンのワクチン接種後、成人、高齢者共にA型ではおおむね良好なワクチン効果が得られたが、B型では接種後も40倍以上の抗体価を示したものの割合は低く、若干の不安を残す結果が得られた。また副反応も昨シーズンより局所の発赤・腫れを申告する割合が上昇したが、重篤な副反応はみられなかった。インフルエンザは毎年流行株が異なるため、今後もワクチン接種が必要である。調査を行った情報は、次のシーズンのワクチン株の選定のために有益であるため、今後も調査の継続が必要である。

謝辞：調査にご協力いただいた女池南風苑・看護介護科長の尾ヶ井マサヨ様ならび

にスタッフの方々に感謝いたします。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 2014-2015年インフルエンザワクチン接種前後の抗体価の評価

A/カリフォルニア/7/2009

施設	ワクチン種類	対象者	人数	年齢	GMT		Mean fold increase	抗体価		接種前後 4倍以上上昇
					Pre	Post		>40倍以上保有	Pre	
女池南風苑	全体	スタッフ	100	42.0 ± 12.0	34.8	54.3	2.1	58.0%	76.0%	13.0%
		入所者	46	87.2 ± 7.6	20.3	37.1	2.7	37.0%	63.0%	19.6%
	デンカ生研ワクチン	スタッフ	50	42.3 ± 11.6	33.4	53.5	2.3	54.0%	70.0%	18.0%
		入所者	23	85.7 ± 7.2	13.5	24.7	3.0	26.1%	43.5%	21.7%
	阪大微研ワクチン	スタッフ	50	41.6 ± 12.5	36.3	55.0	1.8	62.0%	82.0%	8.0%
		入所者	23	88.7 ± 7.8	30.5	55.7	2.5	47.8%	82.6%	17.4%

A/スズ/9715293/2013

施設	ワクチン種類	対象者	人数	年齢	GMT		Mean fold increase	抗体価		接種前後 4倍以上上昇
					Pre	Post		>40倍以上保有	Pre	
女池南風苑	全体	スタッフ	100	42.0 ± 12.0	32.8	97.1	4.9	59.0%	91.0%	43.0%
		入所者	46	87.2 ± 7.6	11.8	47.9	7.9	8.7%	71.7%	60.9%
	デンカ生研ワクチン	スタッフ	50	42.3 ± 11.6	31.6	104.1	5.4	62.0%	90.0%	50.0%
		入所者	23	85.7 ± 7.2	10.9	28.7	4.6	8.7%	56.5%	43.5%
	阪大微研ワクチン	スタッフ	50	41.6 ± 12.5	32.0	86.9	4.5	56.0%	92.0%	36.0%
		入所者	23	88.7 ± 7.8	12.7	80.0	11.2	8.7%	87.0%	78.3%

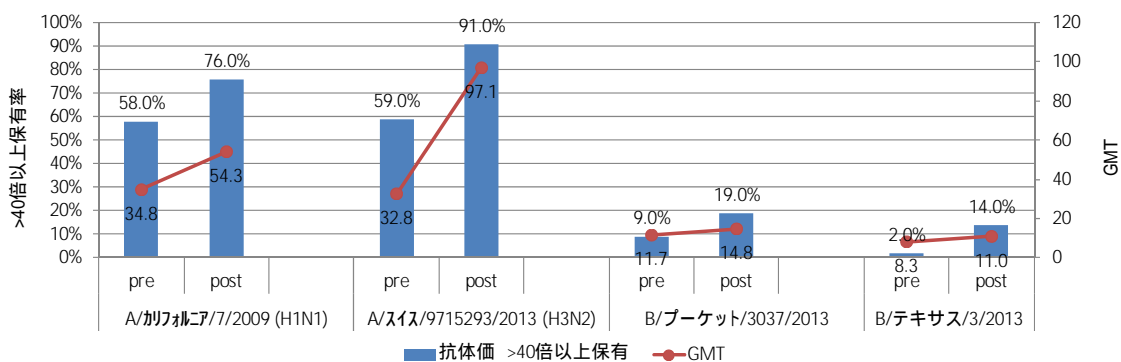
B/ブーケット/3037/2013

施設	ワクチン種類	対象者	人数	年齢	GMT		Mean fold increase	抗体価		接種前後 4倍以上上昇
					Pre	Post		>40倍以上保有	Pre	
女池南風苑	全体	スタッフ	100	42.0 ± 12.0	11.7	14.8	1.5	9.0%	19.0%	6.0%
		入所者	46	87.2 ± 7.6	5.9	11.3	2.4	2.2%	15.2%	26.1%
	デンカ生研ワクチン	スタッフ	50	42.3 ± 11.6	11.8	14.7	1.4	10.0%	20.0%	4.0%
		入所者	23	85.7 ± 7.2	5.8	9.7	2.1	4.3%	13.0%	8.7%
	阪大微研ワクチン	スタッフ	50	41.6 ± 12.5	10.6	14.7	1.6	8.0%	18.0%	8.0%
		入所者	23	88.7 ± 7.8	6.0	13.1	2.7	0.0%	17.4%	43.5%

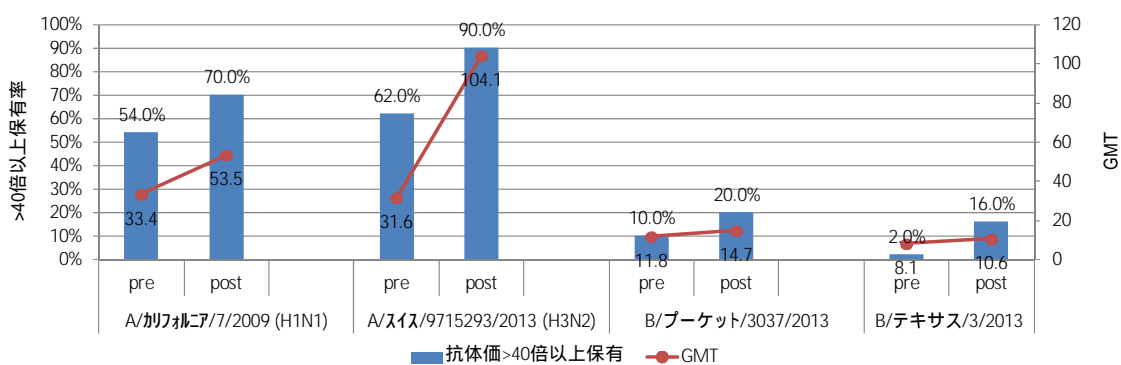
B/テキサス/3/2013

施設	ワクチン種類	対象者	人数	年齢	GMT		Mean fold increase	抗体価		接種前後 4倍以上上昇
					Pre	Post		>40倍以上保有	Pre	
女池南風苑	全体	スタッフ	100	42.0 ± 12.0	8.3	11.0	1.7	2.0%	14.0%	12.0%
		入所者	46	87.2 ± 7.6	7.9	12.3	2.0	8.7%	21.7%	10.9%
	デンカ生研ワクチン	スタッフ	50	42.3 ± 11.6	8.1	10.6	1.5	2.0%	16.0%	6.0%
		入所者	23	85.7 ± 7.2	7.4	10.9	2.1	8.7%	26.1%	8.7%
	阪大微研ワクチン	スタッフ	50	41.6 ± 12.5	7.6	11.3	1.8	2.0%	12.0%	18.0%
		入所者	23	88.7 ± 7.8	8.3	13.9	1.9	8.7%	17.4%	13.0%

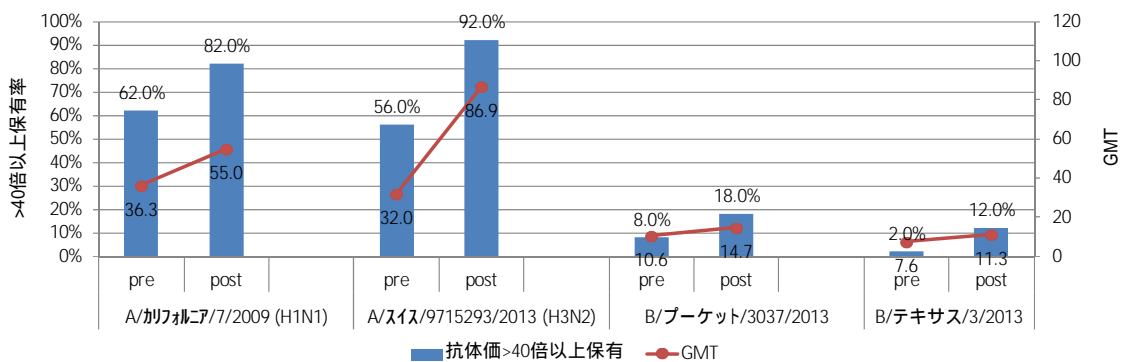
A. スタッフ全体



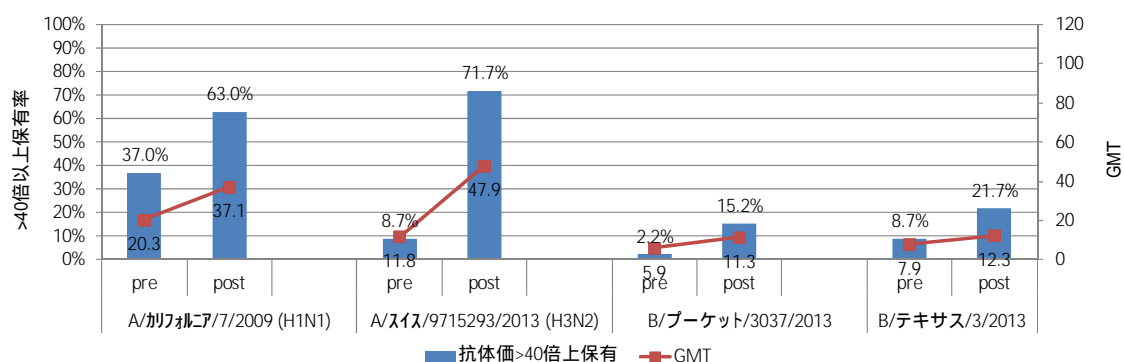
B. スタッフ(デンカ生研ワクチン)



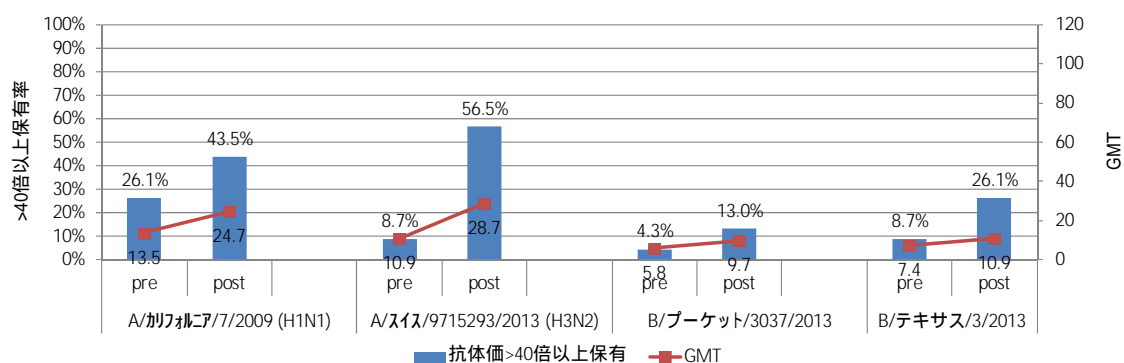
C. スタッフ(阪大微研ワクチン)



D. 入所者全体



E. 入所者(デンカ生研ワクチン)



F. 入所者(阪大微研ワクチン)

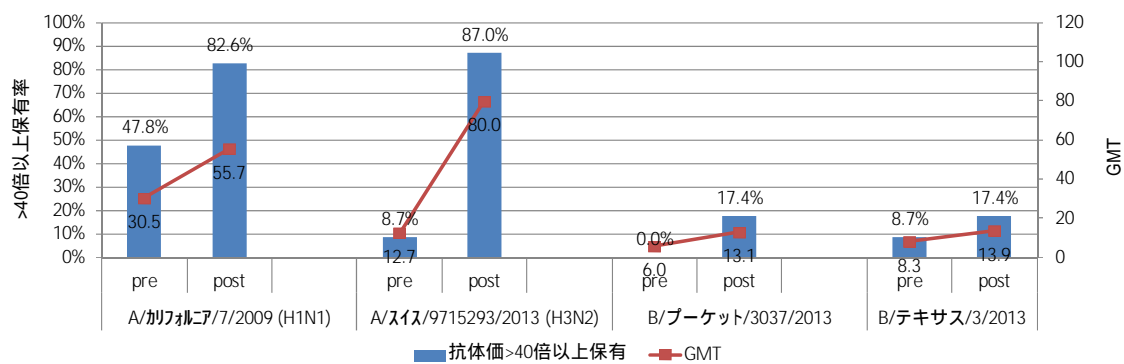


図1 成人層(スタッフ)と高齢者層(入所者)のワクチン接種前後の HI 抗体価の推移(40倍以上の抗体価保有率%と、抗体価幾何平均 GMT)

表2 インフルエンザワクチン接種後の副反応（複数回答）

副反応	発疹		発赤		腫れ		痛み		その他	
	2014/2015	2015/2016	2014/2015	2015/2016	2014/2015	2015/2016	2014/2015	2015/2016	2014/2015	2015/2016
スタッフ	3	4	51	53	36	42	32	37	7	14
(%)	2.9%	4.0%	49.5%	53.0%	35.0%	42.0%	31.1%	37.0%	6.8%	14.0%
入所者	0	0	13	40	2	11	0	0	0	0
(%)	0.0%	0.0%	28.3%	87.0%	4.3%	23.9%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
全体	3	4	64	93	38	53	32	37	7	14
(%)	2.0%	2.7%	43.0%	63.7%	25.5%	36.3%	21.5%	25.3%	4.7%	9.6%

2014/2015シーズン:スタッフ(n=103), 入所者(n=46)
 2015/2016シーズン:スタッフ(n=100), 入所者(n=46)

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

研究分担者 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・主任研究官

研究要旨

現在、主に東南アジアや中近東では高い致死率を伴う高病原性鳥インフルエンザ A(H5N1)ウイルスのヒト感染例が、未だ絶えず報告されている。さらに、2013 年に発生した鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルスは、季節に応じて発生と消失を繰り返している。このような背景から、迅速かつ的確にウイルスの詳細な性状解析を実施し、ヒトへの感染リスク評価を実施することは、重要な意義を持つと考えられる。本研究では、動物由来インフルエンザウイルスのリスク評価のため、レセプター結合特異性実験を試みた。その結果、ウイルスのレセプター特異性を簡便に判定することが可能となった。今後、ウイルスの遺伝子解析、抗原性解析に加え、レセプター結合特異性を含めた継続的な動物由来インフルエンザウイルスのサーベイランスを実施することが重要であると考えられる。

A. 研究目的

現在、主に東南アジアや中近東では高い致死率を伴う高病原性鳥インフルエンザ A(H5N1)ウイルスのヒト感染例が、未だ絶えず報告されている。世界保健機関（WHO）の報告によれば、2016 年 1 月 20 日現在、16 カ国で、846 例の感染者数が確認され、そのうち 449 名が死亡している。さらに、2013 年 3 月に中国で発生した鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルスは、中国さらに他の周辺諸国に拡大している。WHO の報告では、2016 年 1 月 19 日現在、693 例の感染者数が確認され、そのうち 277 名の死亡例が報告されている。また、現在のところ、ヒトへの感染例は報告されていないが、鳥インフルエンザ A(H5N8)ウイルスが、我が国をはじめ、中国、台湾、韓国などのアジア諸国、またヨーロッパ諸国、北米にまで拡大している。

これらのウイルスがヒトからヒトへ容易に伝播可能なウイルスに変異し、新型インフルエンザの出現が危惧されている。

インフルエンザウイルスは、HA 蛋白を使って宿主細胞表面のレセプターに結合して感染を開始する。HA 蛋白とレセプター分子との結合特異性は、ウイルスが分離された宿主動物によって異なる。ヒトの季節性インフルエンザウイルスの HA 蛋白はシアル酸がガラクトースに 2,6 結合した糖鎖（Neu5Ac_{2,6}Gal：ヒト型レセプター）を、鳥から分離されたインフルエンザウイルスの HA 蛋白はシアル酸がガラクトースに 2,3 結合した糖鎖（Neu5Ac_{2,3}Gal：鳥型レセプター）を、特異的に認識する。それらの HA 蛋白のレセプター認識特異性と一致して、ヒトの上気道ではヒト型レセプターが、鳥ウイルスの主な増殖部位である腸管で

は鳥型レセプターが、豊富に発現している。このように、HA 蛋白のレセプター認識特異性と宿主が発現するレセプターの種類との相関がインフルエンザウイルスの宿主域を規定していると考えられている。従って、鳥インフルエンザウイルスがヒト上気道細胞に効率良く感染するためには、その HA 蛋白のレセプター特異性が鳥型からヒト型へ変換する必要がある。このようなヒトへの適応変異を早期に検出することが、パンデミック対策の上でも非常に重要となる。

本研究では、動物由来インフルエンザウイルスのヒトへの感染リスク評価のため、レセプター結合特異性実験を試みた。また、次世代シーケンサーによるウイルス全ゲノム解析を実施した。

B . 研究方法

1) ウイルス：中国 CDC より分与された A/Anhui/1/2013 (H7N9)、台湾 CDC より分与された A/Taiwan/1/2014 (H7N9)を使用した。比較対照ウイルス株として、NIBRG-14 (A/Vietnam/1194/2004: H5N1) 、 A/California/4/2009 (H1N1pdm09) 、 A/Narita/1/2009 (H1N1pdm09)を使用した。これらのウイルスを発育鶏卵あるいは MDCK 細胞を用いて増殖させ、ニワトリ赤血球 (CRBC) を用いて赤血球凝集 (HA) 価を測定し、ストックした。

2) 遺伝子解析：ウイルス全ゲノム解析は、次世代シーケンサーを使用して行った。ウイルス培養液から QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA から NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs) を使用して DNA ライブラリーを調製後、MiSeq (Illumina) にて解析した。得られた塩基配列は、CLC Genomics Workbench を使用して、リファレンス配列との Assemble を行い、コンセンサス配列の作成と変異解析を行った。

3) レセプター結合特異性実験： 2,3 または 2,6 結合した 2 種類の合成シアロ糖鎖ポリマー (Neu5Ac 2-3Gal 1-4GlcNAc 1-pAP- -PGA、Neu5Ac 2-6Gal 1-4GlcNAc 1-pAP- -PGA：中部大学 生命健康科学部 鈴木康夫教授より分与) を用いた Solid-phase binding assay を行った。上記、合成シアロ糖鎖ポリマーを各々、96 well plate にコーティング後、ウイルス培養液 (HA 価 32-64) を吸着させ、抗インフルエンザウイルス NP 抗体を使用した ELISA 法により結合ウイルスを検出した。

(倫理面への配慮)
該当なし

C . 研究結果

比較対照ウイルスとして用いた A/California/4/2009 (H1N1pdm09) 、 A/Narita/1/2009 (H1N1pdm09)は、ヒト型レセプターである 2,6 結合した糖鎖のみに結合性を示した。一方、NIBRG-14 (A/Vietnam/1194/2004: H5N1)は、鳥型レセプターである 2,3 結合した糖鎖のみに結合性を示した。この結果は、既に論文等で報告されている結果と一致し、本実験の信頼性が示された。

次に、2013 年、2014 年にヒトから分離された A(H7N9)ウイルスを用いて実験を行った。A/Anhui/1/2013 (H7N9)、A/Taiwan/1/2014 (H7N9)の 2 つのウイルスは、鳥型レセプターである 2,3 結合した糖鎖のみならず、ヒト型レセプターである 2,6 結合した糖鎖にも結合性を示した。

D . 考察

今回、解析に用いた A(H7N9)ウイルスの 2 株は、遺伝子解析の結果、HA 遺伝子にヒト型レセプターに親和性を示すアミノ酸変異である Q226L(H3 numbering)を有していた。さらに、Q226L に加えてヒト型レセプターへの結

合能を高める別の変異 (G186V: H3 numbering)をも有していた。しかしながら、レセプター結合特異性実験の結果から、依然として、鳥型レセプターに対して強い結合性を示した。このことは、このウイルスがヒト型レセプターに優先的に結合するためには、これらのアミノ酸変異に加えて、レセプター結合特異性を変換させる別の変異が必要であることが示唆された。

E . 結論

本研究により、動物由来インフルエンザウイルスのヒトへの感染リスク評価のための方法の一つとして、ウイルスのレセプター結合特異性を簡便に調べることが可能となった。今後は、主に鳥インフルエンザウイルスを中心とした動物由来インフルエンザウイルスの遺伝子解析、抗原性解析に加え、レセプター結合特異性を加えた継続的なサーベイランスの実施が必要であると考えられる。

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): 557-559.

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.* 2016 Feb 1; 183: 30-36.

Nakamura K, Shirakura M, Suzuki Y, Naito T, Fujisaki S, Tashiro M, Nobusawa E. Development of a high-yield reassortant vaccine virus derived from the A/Anhui/1/2013 (H7N9) strain. *Vaccine.* 2016

Jan 12; 34(3): 328-333.

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): 83-86.

Ainai 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.

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): 2607-2617.

2 . 学会発表

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, 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.
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.

G . 知的財産権の出願・登録状況

なし