

I. 総括研究報告書

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

研究代表者 小田切 孝人

国立感染症研究所・インフルエンザウイルス研究センター・センター長

研究要旨

インフルエンザ株サーベイランスを強化し、流行株分離用検体および分離株の収集力の向上、さらに分離株の解析法の改良、特に最近の A(H3N2)亜型株の解析は、困難を極めていることから国際標準化された抗原解析手法の導入と安定的な実施基盤の構築が急務となっている。また、薬剤耐性株の検出精度を向上させるために、コア・サポート地衛研と連携し外部制度管理試験（EQA）の試行を行い、今後予定されている全国規模での実施に向けた準備が開始された。一方、卵馴化による抗原変異の影響の極めて少ない A(H3N2)ワクチン製造用株（A/埼玉/103/2014-CEXP002）の開発に成功し、WHO から次シーズンのワクチン候補株として認定された。本ワクチン株は、細胞培養ワクチン用に開発した品質管理された細胞(NIID-MDCK)で分離後に、卵で高継代馴化した株で、流行株からの抗原性の乖離が小さい。この手法は、卵馴化で抗原変異し難いワクチン株の収集法にとって、新たな一頁を開くマイルストーンとなった。一方、国産インフルエンザワクチンの免疫原性を国際基準に照らし合わせて評価した結果、B 型ワクチンの免疫原性の改善の必要性が示された。

A. 研究目的

本研究班の実働母体は、東アジア地域を担当する WHO インフルエンザ協力センター（WHO-CC）であるため、WHO 世界インフルエンザ監視対応システム（WHO-GISRS）から海外の季節性および動物由来インフルエンザ発生・動向情報、原因ウイルスを迅速に入手できるという利点を持っている。この利点を活かし、毎年見直しと更新が行われる季節性インフルエンザワクチン株の国内外からの検索と適正株の選定のための試験および試験法の改良、その国際標準化を目指す。

本研究では、H28 年度から施行される改正感染症法により地衛研からウイルス分離用の臨床検体を広範囲に入手できるようになったことから、ワクチン製造に採用可能な卵分離株の確保を本格的に行う。これにより、諸外国に日本発のワクチン株の提供が可能となり、国際貢

献を果たせるばかりか、国内ワクチン選定会議およびWHO ワクチン選定会議を支援することが可能となる。

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、その代替え法として中和試験法の導入が必須となっている。初年度にこれら改善策を実施し、軌道に乗ったことから、本年度は、海外の WHO-CC が採用している技術も取り入れて、流行株の抗原解析法の国際標準化を図る。

全国地衛研における薬剤耐性株のサーベイランス精度を向上させるために、外部制度管理試験（EQA）の試行をコア・サポート地衛研と共同で行い、これを足掛かりとして将来的には全国規模での EQA 実施を目指す。

一方、H27 年度に新規に導入された 4 価ワクチンの有効性の評価の一環として、ワクチンの

免疫原性を調べ、改良が必要であれば、成績に基づいた提言をする。

B. 研究方法

- ウイルス分離効率の高い培養細胞の検索：ウイルス増殖効率を改善するため6種類の細胞について検討した。
- 中和試験法によるウイルス抗原性解析系の改善：本研究班で実施してきた中和試験法を改善するため、諸外国のWHO-CCで採用しているウイルス感染細胞巢減数試験（Focus reduction assay; FRA）の導入と標準化を行った。
- A(H3N2)感染患者の臨床検体から、卵分離株の回収法の改良を行った。また、細胞分離—卵高継代によるワクチン製造株の開発を行った。
- 地衛研と共同で薬剤耐性株のモニターと試験法のEQA予備試験を実施した。
- 新型インフルエンザとしてヒト社会で流行する可能性を秘めたウイルスによるヒト感染事例が発生した際に、速やかにリスク評価できるように、ウイルスレセプター特異性を簡便に鑑別できる系の構築と、改良を行った。
- 4価インフルエンザワクチンの免疫原性を評価するために、成人層および老人層のワクチン接種前後の抗体価を赤血球凝集抑制（HI）試験で測定した。

（倫理面への配慮）

ワクチン接種前後の成人層および老人層の血清抗体の採取においては、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

①A/H3N2 亜型ウイルスの分離・増殖効率を改善するため、細胞株の探索・樹立を目的に A549

細胞、MRC5 細胞および Mv1-Lu 細胞について増殖性を検討した。期待に反して、これらの細胞は現行使用の MDCK-SIAT1 (SIAT1) 細胞より、増殖効率が劣っており、サーベイランスには不適であることが分かった。さらに、別の細胞で検討を継続する。

②A/H3N2 亜型株の抗原性解析に中和試験法を用いているが、精度面と国際標準化を目指すために、FRA 法の確立、実際のサーベイランスへの導入に向けた検討を行い、実施可能であることが確認された。

③2016/17 シーズンの国内外から収集した A(H1N1)pdm09 および B 型流行株について、抗原性解析を行った。その結果、A(H1N1)pdm09 はワクチン株と流行株の抗原性が異なっていたため、次シーズンはワクチン株の変更が必要と判断された。一方、B 型についてはビクトリア系統、山形系統とも変化しておらず、ワクチン株の変更は不要と考えられた。

④2015/16, 2016/17 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 ウイルスはサブクレード 6B.1 が主流であった。A(H3N2) ウイルスはほぼ全てがクレード 3C.2a であり、2016/17 シーズンには 3C.2a1 が派生した。B 型では、Yamagata 系統はクレード 3 が、Victoria 系統はクレード 1A が継続して流行した。

⑤近年の A(H3N2) ウイルスは、トリ型レセプターとの親和性が低く、ワクチン製造に用いる鶏卵分離株を確保することは非常に困難である。これを改善するために、1) 凍結融解をせずにウイルスタイターが高い状態で羊膜腔に接種する方法と、2) 細胞で増殖させたウイルスを羊膜腔に接種する二通りの方法により、ウイルスの鶏卵における増殖効率が改善させるかどうかを検証した。1)の手法では B 型ウイルスは回収できたが、A(H3N2)は実施した 94 検体いずれからも回収されなかった。一方、2)の手法では、A/埼玉/103/2014 が分離され、ワクチン候補株となった。このことから、2)の手法が

A(H3N2)ワクチン候補株の回収には有効であることが示された。

⑥既報に従って、国内外から収集した流行株について薬剤感受性試験を実施し、A(H1N1)pdm09型から2株の耐性株を検出した。また、耐性株サーベイランス精度を向上させるために、検出系のEQAを試験的に実施した。その結果、コア・サポート地衛研では、検査精度が十分に保持されていることが確認された。

⑦一般的に、国産のインフルエンザワクチンは海外のものに比べて免疫原性が低いといわれている。平成27年度からわが国では4価ワクチンが導入されたこともあり、国産ワクチンの免疫原性について再評価する必要がある。成人層99名(平均年齢42歳)と、高齢者層49名(平均年齢85歳)のワクチン接種前後の抗体価をHI試験法で評価した。その結果、A型ワクチンは国際基準を満たしていたが、B型ワクチンはそれを満たしておらず、改良の必要性が示唆された。

⑧新型インフルエンザとなりうる鳥インフルエンザウイルスのヒト感染事例が発生した場合には、迅速かつ的確にウイルスの詳細な性状解析を実施し、ヒト社会での拡散いわゆるパンデミックリスク評価が必要になる。その評価手法の一つを確立するために、レセプター結合特異性実験系の改良を行い、さらに次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析を行った。その結果、新規に合成したシアロ糖鎖ポリマーを用いたより信頼性の高いレセプター結合実験系を構築できた。

D. 考察

インフルエンザ株サーベイランス基盤を強固にし、ウイルス分離用臨床検体およびウイルス分離株の収集力を高めることは、精度の高いサーベイランスとワクチン株の検索、選定幅を広げるために必要な対応である。

本研究班では、ウイルス分離効率を高める試

みとして、現行のウイルス分離に使用している培養細胞より効率の高い細胞がないか検索しているが、まだ見つかっておらず今後も精力的に適切な細胞の特定を続けたい。

最近のA(H3N2)亜型ウイルスは、分離効率が低く、赤血球凝集活性も低く、従来の手法を用ではウイルスの確保および抗原性解析に困難を極めている。諸外国のWHO-CCおよび本研究班では、分離用細胞の変更の検討および中和試験法の採用でそれを克服しようとしているが、まだ途中段階で諸外国のWHO-CCと技術的なすり合わせをしつつ、同一の手法の導入と国際標準化を進めていきたい。次シーズンから改訂したシステムを実稼働させる予定である。

現在国内外で使用されているA(H3N2)ワクチンは、卵馴化による抗原変異が甚だしく、流行株からの抗原性の乖離が大きく、ワクチンの有効性を低下させている。国内外のワクチン対策に影響を与えているこの問題を克服できるワクチン株A/埼玉/103/2014の開発に、本研究班が成功した。このワクチン株は、卵馴化しても流行株に近い抗原性を維持しており、この株を採用した場合は、有効性の期待できるA(H3N2)ワクチンを供給できる。このため、A/埼玉/103/2014株はWHOからもワクチン候補株として認定され、世界標準ワクチン株として本研究班から供給可能となっている。本研究班の国際貢献の典型例となった。今後も、このような利点を持った日本発の世界標準ワクチン株をどんどん供給していきたい。

4価ワクチンの免疫原性を本研究班で評価したところ、B型ワクチンは世界基準値を下回り、有効性の期待できない力価不足のワクチンとなっていることが判明した。ワクチンの抗原量を増加させる等の改善が必要であり、それに向けての対応を提言したい。

E. 結論

● より分離効率の良い培養細胞を検索し、株

サーベイランスにおけるウイルス回収力の向上を図った。まだ検討が継続中である。

- 2016/17 シーズンのインフルエンザ流行株の抗原性解析、遺伝子解析、薬剤耐性感受性試験を実施した。前シーズンから大きな変化はなかった。
- 薬剤耐性株検出検査のEQAの試験実施を行った。コア・サポート地衛研では、期待どおりの精度で、検査が実施されていた。
- A(H3N2)亜型ウイルスの抗原性解析手法の改良と国際標準化を完了し、次シーズンから本格的に導入ができる見通しができた。
- 卵に馴化させても抗原変異しないワクチン株 A/埼玉/103/2014 の開発に成功し、わが国発のWHO承認世界標準ワクチン株として、国内外のワクチンメーカーに供給できるようになった。
- 国産ワクチンの B 型ワクチンの免疫原性は低い。改良が必要。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ・ Takashita E, Ejima M, Ogawa R, 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., *Antiviral Res.*, 132, 170-7, 2016
- ・ Fudo S, Yamamoto N, Nukaga M, Odagiri T., Tashiro M, Hoshino T, Two Distinctive Binding Modes of Endonuclease Inhibitors to the N-Terminal Region of Influenza Virus Polymerase Acidic Subunit., *Biochemistry.*, 55(10), 2646-60, 2016
- ・ Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Shimazu Y, Shimomura T, Watanabe S, Odagiri T. Influenza Virus Surveillance Group of Japan., Influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting enhanced cross-resistance to oseltamivir and peramivir due to a dual H275Y/G147R substitution, Japan, March 2016., *Euro surveill.*, 21(24), 2016
- ・ Onodera T, Hosono A, Odagiri T., Tashiro M, Kaminogawa S, Okuno Y, Kurosaki T, Ato M, Kobayashi K, Takahashi Y., Whole-Virion Influenza Vaccine Recalls an Early Burst of High-Affinity Memory B Cell Response through TLR Signaling., *J Immunol.*, 196(10), 4172-84, 2016
- ・ Ishikane M, Kamiya H, Kawabata K, Higashihara M, Sugihara M, Tabuchi A, Kuwabara M, Yahata Y, Yamagishi T, Odagiri T., Sugiki Y, Ohmagari N, Matsui T, Oishi K, Seasonal influenza vaccine (A/New York/39/2012) effectiveness against influenza A virus of health care workers in a long term care facility attached with the hospital, Japan, 2014/15: A cohort study., *J Infect Chemother.*, 22(11), 777-9, 2016
- ・ Sriwilaijaroen N, Magesh S, Imamura A, Ando H, Ishida H, Sakai M, Ishitsubo E, Hori T, Moriya S, Ishikawa T, Kuwata K, Odagiri T., Tashiro M, Hiramatsu H, Tsukamoto K, Miyagi T, Tokiwa H, Kiso M, Suzuki Y., A Novel Potent and Highly Specific Inhibitor against Influenza Viral N1-N9 Neuraminidases: Insight into Neuraminidase-Inhibitor Interactions., *J Med Chem*, 59(10), 4563-77, 2016
- ・ Li C, Hatta M, Burke DF, Ping J, Zhang Y, Ozawa M, Taft AS, Das SC, Hanson AP, Song J, Imai M, Wilker PR, Watanabe T, Watanabe S, Ito M, Iwatsuki-Horimoto K, Russell CA, James SL, Skepner E, Maher

- EA, Neumann G, Klimov AI, Kelso A, McCauley J, Wang D, Shu Y, Odagiri T, Tashiro M, Xu X, Wentworth DE, Katz JM, Cox NJ, Smith DJ, Kawaoka Y., Selection of antigenically advanced variants of seasonal influenza viruses., *Nat. Microbiol.*, 1(6), 16058, 2016
- Sakai K, Ami Y, Nakajima N, Nakajima K, Kitazawa M, Anraku M, Takayama I, Sangsriratanakul N, Komura M, Sato Y, Asanuma H, Takashita E, Komase K, Takehara K, Tashiro M, Hasegawa H, Odagiri T, Takeda M., Tmprss2 Independency for Haemagglutinin Cleavage In Vivo Differentiates Influenza B Virus from Influenza A Virus., *Sci. Rep.*, 6, 29430, 2016
 - Yokoyama M, Fujisaki S, Shirakura M, Watanabe S, Odagiri T, Ito K, Sato H., Molecular Dynamics Simulation of the Influenza A(H3N2) Hemagglutinin Trimer Reveals the Structural Basis for Adaptive Evolution of the Recent Epidemic Clade 3C.2a., *Front Microbiol.*, 8, 584, 2017
 - Naito T, Mori K, Ushirogawa H, Takizawa N, Nobusawa E, Odagiri T, Tashiro M, Ohniwa RL, Nagata K, Saito M., Generation of a Genetically Stable High-Fidelity Influenza Vaccine Strain., *J Virol.*, 91(6), pii:e01073-16, 2017
2. 学会発表
- Takashita E, Ejima M, Ogawa R, 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. *Options IX for the Control of Influenza.* August 2016. Chicago, USA.
 - Kishida N, Imai M, Ainai A, Saito R, Nakamura K, Kuwahara T, Fujisaki S, Takashita E, Shirakura M, Kashiwagi Y, Tashiro M, Odagiri T, Watanabe S. Evaluation of efficacy of an inactivated high growth reassortant whole-virus seasonal influenza vaccine in ferret. *Options IX for the control of influenza,* Chicago, USA, 2016
 - Kishida N, Imai M, Ainai A, Saito R, Nakamura K, Kuwahara T, Fujisaki S, Takashita E, Shirakura M, Kashiwagi Y, Tashiro M, Odagiri T, Watanabe S. Evaluation of efficacy of an inactivated high growth reassortant whole-virus A(H3N2) influenza vaccine in ferret. *Options IX for the Control of Influenza.* August 2016. Chicago, USA.
 - Nakamura K, Shirakura M, Fujisaki S, Kishida N, Kuwahara T, Takashita E, Takayama I, Nakauchi M, Chadha M, Potdar V, Upadhyay BP, Shakya G, Odagiri T, Kageyama T, Watanabe S. Characterizations of influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated from patients including fatal or severe cases in Nepal and India, early 2015. *Options IX for the Control of Influenza.* August 2016. Chicago, USA.
 - Kawakami C, Fujisaki S, Takashita E, Sugawara H, Shimizu K, Ozawa H, Momoki T, Saikusa M, Usuku S, Sasao T, Watanabe S, Odagiri T. Characterization of influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated from hospitalized cases in the 2015/16 season. *Options IX for the Control of Influenza.* August 2016. Chicago, USA.
 - Kawakami C, Fujisaki S, Takashita E,

- Sugawara H, Shimizu K, Ozawa H, Momoki T, Saikusa M, Usuku S, Sasao T, Watababe S, Odagiri T. Gene analysis of influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated from hospitalized cases in the 2015/16 seasons. Options IX for the control of influenza, Chicago, USA, 2016
- ・ Watanabe S, Nakamura K, Kishida N, Fujisaki S, Shirakura M, Takashita E, Kuwahara T, Sato A, Ogawa R, Sugawara H, Akimoto M, Miura H, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Odagiri T, The Influenza Surveillance Group of Japan. Characterizations of circulating influenza viruses in the 2015/2016 season and vaccine viruses for the 2016/17 season. 第64回日本ウイルス学会. 2016年10月. 札幌.
 - ・ Kishida N, Imai M, Ainai A, Saito R, Nakamura K, Kuwahara T, Fujisaki S, Takashita E, Shirakura M, Kashiwagi Y, Tashiro M, Odagiri T, Watanabe S. Evaluation of efficacy of an inactivated whole-virus A/Victoria/361/2011 (IVR-165) (H3N2) influenza vaccine in ferret. 第64回日本ウイルス学会. 2016年10月. 札幌.
 - ・ Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Shimazu Y, Shimomura T, Doi I, Watanabe S, Odagiri T, The Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Detection of influenza A(H1N1)pdm09 viruses exhibiting enhanced cross-resistance to oseltamivir and peramivir in the 2015/16 season. 第64回日本ウイルス学会. 2016年10月. 札幌.
 - ・ 高下恵美, 小川理恵, 藤崎誠一郎, 白倉雅之, 三浦秀佳, 中村一哉, 岸田典子, 桑原朋子, 菅原裕美, 佐藤彩, 秋元未来, 渡邊真治, 小田切孝人. 2015/16 シーズンに検出されたオセルタミビル・ペラミビルに強い耐性を示すインフルエンザウイルス. 第48回日本小児感染症学会. 2016年11月. 岡山.

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

H. 健康危険情報

なし