

## II. 分担研究報告書

## 検体からのウイルス分離・増殖効率を改善する細胞株の探索・樹立

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

インフルエンザウイルスの分離にはイヌ腎由来株化細胞 [Madin-Darby Canin Kidney (MDCK) 細胞] が慣習的に使用されている。近年、季節性インフルエンザウイルスのひとつである A/H3N2 亜型ウイルスについて、MDCK 細胞を用いた分離・増殖の効率低下の傾向が報告されてきており、野外流行株の分離捕捉率の低下が懸念されている。そこで本研究では、A/H3N2 亜型ウイルスの分離・増殖効率を改善する細胞株の探索・樹立を目的に各種細胞株を用いた検討試験を進めた。

### A. 研究目的

流行期ごとの季節性インフルエンザウイルスの性状（抗原性や抗ウイルス薬感受性）を理解することは、適切なワクチン株を選定する、あるいは抗ウイルス薬耐性株の出現・拡がりに対する対策を施す上で、大変重要である。そのため、流行期の患者臨床検体からのインフルエンザウイルス分離が必須となる。インフルエンザウイルスの分離にはイヌ腎由来株化細胞 [Madin-Darby Canin Kidney (MDCK) 細胞] が長く慣習的に使用されてきた。しかしながら近年、季節性ウイルスのひとつである A/H3N2 亜型ウイルスについて、MDCK 細胞を用いての分離・増殖効率の低下傾向が報告されてきており、野外流行株の分離捕捉率の低下、またこれによる流行株性状の正確な把握が妨げられることが懸念されている。そこで、ウイルス分離・増殖効率の改善を見込める細胞株を探索・樹立し、この細胞株をインフルエンザ流行株分離用基材として地方衛生研究所に配布、活用してもらうことでイ

ンフルエンザウイルス株サーベイランスへ貢献することを目標に、各種細胞株を用いた検討試験を進めた。

### B. 研究方法

現在感染研では、MDCK-SIAT1 (SIAT1) 細胞と呼ばれる、季節性インフルエンザウイルスのレセプターを多く発現している細胞を A/H3N2 亜型ウイルスの分離・増殖に使用しており、ウイルスの分離・増殖効率改善に一定の効果を上げている。しかしながら、この SIAT1 細胞は培養維持費が高額であることと、海外研究機関で樹立された細胞である点で、地衛研での恒常的な使用については難しい面がある。そのため、SIAT1 細胞以外の以下の呼吸器系由来株化細胞およびインフルエンザウイルス分離に使用実績のある結腸由来株化細胞を用意し、インフルエンザウイルスの増殖効率を検討した。SIAT1 細胞は高いウイルス増殖を示す細胞株として比較対照に供した。

・ A549 細胞： ヒト肺由来株化細胞

- ・ Mv1-Lu 細胞： ミンク肺由来株化細胞
- ・ MRC5 細胞： ヒト胎児肺由来正常二倍体線維芽細胞
- ・ Detroit 562 細胞： ヒト咽頭由来株化細胞
- ・ Calu-3 細胞： ヒト気管支由来株化細胞
- ・ Caco-2 細胞： ヒト結腸由来株化細胞

(倫理面への配慮)

該当なし

### C. 研究結果および考察

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。A549 細胞においてはウイルスの増殖が認められたが、SIAT1 細胞との比較において増殖性は劣っていた。一方、MRC5 細胞および Mv1-Lu 細胞においては、ウイルス増殖がほとんど認められなかった。他の細胞株については現在検討中である。

### D. 結論

現時点ではインフルエンザウイルスの分離増殖効率改善が見込める細胞株を選定できていない。すでに検討を行った細胞株については、培養条件やウイルス増殖に必要なトリプシンの添加量などについて検討を重ねるとともに、これまでに候補として挙げた以外の細胞株も検討対象として模索していく予定である。高増殖性細胞を樹立したのちは当該細胞などのレセプター発現量といった増殖性に寄与する要因も解明し、最適な細胞株の探索・樹立を目指す。

### E. 研究発表

#### 1. 論文発表

- ・ 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.

- ・ 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., 1:16058, 2016.
- ・ Ando T, Yamayoshi S, Tomita Y, Watanabe S, Watanabe T, Kawaoka Y. The host protein CLUH participates in the subnuclear transport of influenza virus ribonucleoprotein complexes. Nat Microbiol., 1:16062, 2016.
- ・ Sarawar S, Hatta Y, Watanabe S, Dias P, Neumann G, Kawaoka Y, Bilsel P. M2SR, a novel live single replication influenza virus vaccine, provides effective heterosubtypic protection in mice. Vaccine, 34:5090-5098, 2016.

## 2. 学会発表

- ・ 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、岡山、2016
- ・ 宇田 和宏、古市 宗弘、小山 ちとせ、岩瀬 徳康、藤崎 誠一郎、渡邊 真治、庄司 健介、宮入 烈. 2015-16 年シーズンのインフルエンザ下気道炎の臨床的特徴. 第48回日本小児感染症学会、岡山、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 selected for the 2016/17 season. 第64回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2016
- ・ Takashita E, Fujisaki Y, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Shimazu Y, Shimomura T, Doi I, Watanabe S, Odagiri T. 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学術集会、札幌、2016
- ・ Ando T, Yamayoshi S, Tomita Y, Watanabe S, Watanabe T, Kawaoka T. Analysis of the regulatory mechanisms of the subnuclear transport of influenza progeny ribonucleoprotein complexes. 第64回日本ウイルス学会学術集会、札幌、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 whole-virus A/Victoria/361/2011 (IVR-165) (H3N2) influenza vaccine in ferret. 第64回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2016
- ・ Kawakami C, Fujisaki S, Takashita E, Saikusa M, Usuku S, Watanabe S. Characterization of influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated from hospitalized cases in the 2015/16 season. 第64回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2016
- ・ Ando T, Yamayoshi S, Watanabe S, Watanabe T, Kawaoka T. Involvement of CLUH in the subnuclear transport of influenza progeny ribonucleoprotein complexes. Options IX for the control of influenza, Chicago, USA, 2016
- ・ 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, 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 seasonal influenza vaccine in ferret. Options

IX for the control of influenza, Chicago, USA, 2016

- 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

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

なし