

## 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

本研究班は、国内および東アジア地域でのインフルエンザ株サーベイランス体制を支援し、当該地域から得られる株サーベイランス情報を WHO 世界インフルエンザ監視対応ネットワーク (GISRS) へ提供し、国内情報が WHO の施策およびワクチン株選定に確実に反映されるよう、また、国内対応としては、本年度のワクチン株選定を支援する。本研究による国際貢献を維持することにより、新型インフルエンザウイルスの海外発生の継続的な監視および病原体の迅速な入手と解析が可能となる。これにより、わが国の新型インフルエンザ対策を遅滞なく進めることができる。また、地方衛生研究所（地衛研）への技術支援を継続することにより、国内流行株から適切なワクチン候補株を収集する基盤強化に貢献できる。さらに、インフルエンザワクチンの血清学的な評価研究をおこない、ワクチンの有効性やワクチン株の適正な選定に貢献する。

### A. 研究目的

- (1) 季節性および新型インフルエンザ株サーベイランス体制の維持・強化。国内においては地衛研、海外においては周辺諸国および GISRS と連携し、流行株の収集力と解析系の改良と国際標準化を促進する。
- (2) 地衛研から臨床検体と分離株を収集できる連携基盤が強固になったことから、国内発の世界標準ワクチン株の開発と供給力を強化する。また、他の研究事業で実施している国家プロジェクトの細胞培養ワクチン開発研究と連携し、その実用化に貢献する。
- (3) WHO インフルエンザ協力センターとしての国際貢献およびわが国のワクチン株選定への貢献をすべく研究を行い、国内および世界のインフルエンザ対策に直接的に参画し、研究から得られた成果、情報を適宜提供し、国内外のインフルエンザ対策に貢献する。

### B. 研究方法

- A/H3N2 亜型ウイルスの分離・増殖効率を改善する細胞株として、上気道咽頭由来の Detroit 562 細胞について検討した。
- A(H3N2) 流行株の抗原性解析系を見直し、従来法として中和試験法、改良法として Focus Reduction Assay (FRA) の導入と標準化を行った。
- 2016/17, 2017/18 シーズンに国内および海外（ラオス、台湾、モンゴル、韓国、ミャンマー）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。
- 11 箇所のコア・サポート地衛研に合成した RNA 陽性コントロールを配布し、「A/H1N1pdm09 H275Y 耐性株検出法実験プロトコール ver.2」に従って TaqMan RT-PCR 法の精度管理試験を実施した。
- 国内の提携医療機関から臨床検体の提供

を受け、鶏卵の羊膜腔に接種してウイルスの分離・回収を行った。

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、2017年11月に国内2社のワクチン接種を実施した。接種前と接種3-4週間後の2回、血清を採血した

(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

- ① サーベイランスに用いてきた MDCK 細胞の代替えとなる細胞を検索し、咽頭由来株化細胞の Detroit 562 細胞について検討した。本細胞は、長期間培養 (2 週間) ではトリプシン非存在下でウイルス増殖を確認できた。
- ② 2017/18 シーズンの国内用ワクチン株について、FRA 試験にて抗原性解析を実施した。ワクチン製造に供される鶏卵分離株、高増殖株に対する抗血清に対しては、流行株の 9 割は反応性が低く、抗原性がミスマッチしていることが示された。一方で、細胞分離株の A/シンガポール/INFIMH-16-0019/2016 株に対する抗血清とは 8 割以上、抗鶏卵分離 A/シンガポール/INFIMH-16-0019/2016 株血清とは 5 割程度の野外分離株が抗原的に類似性していた。
- ③ 入手できた国内外の流行株の HA 遺伝子について進化系統樹解析を行った。A(H1N1)pdm09 ウイルスは全てクレード 6B.1、A(H3N2) ウイルスは 2016/17、2017/18 シーズンは全ての株が 3C.2a に属

した。3C.2a 内には複数のサブクレードが形成され、2017/18 シーズンには 3C.2a1a, 3C.2a1b, 3C.2a2, 3C.2a3, 3C.2a4 に細分化された。B 型ウイルス Yamagata 系統は、クレード 3 に全て属した。Victoria 系統の分離株は全て、サブクレード 1A に属した。海外で報告されている抗原性変異株群のうち、2 アミノ酸欠損株 (162, 163 位)、3 アミノ酸欠損株 (162-164 位)、および 2 アミノ酸置換株 (K165N, T221I) は散発的に検出されているが現在のところ広い流行は確認されていない。

- ④ 最近の A(H3N2) ウイルスはワクチン製造用として鶏卵で分離することが困難な性質になっているため、WHOCC ロンドンセンター法を参考にして、鶏卵分離条件の検討を行った。変更可能は技法の修正を行った結果、分離率が 20%にまでに上昇し、これまでの 0%から大きな改善を達成できた。他の亜型のウイルスに関しては、A(H1N1)pdm09 ウイルス 37 株、A(H3N2) ウイルス 23 株、B 型ビクトリア系統ウイルス 20 株、B 型山形系統ウイルス 17 株を分離することができた。
- ⑤ A(H1N1)pdm09 ウイルスは国内株 371 株および海外株 64 株、A(H3N2) ウイルスは国内株 268 株および海外株 131 株、B 型ウイルスは国内株 451 株および海外株 105 株について薬剤耐性モニタリングを実施した。その結果、日本国内において、NA 蛋白質に H275Y 耐性変異をもつオセルタミビル・ペラミビル耐性の A(H1N1)pdm09 ウイルスが 10 株検出された。A(H3N2) ウイルスおよび B 型ウイルスでは、国内外ともに耐性株は検出されなかった。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。
- ⑥ 薬剤耐性検査の外部精度管理に向けた実態調査を 11 箇所すべてのコア・サポート地衛

研において実施し、達成目標の2項目について良好な成績を得た。

- ⑦ 成人層 (41.7±10.1 歳) のペア血清は 94 件、高齢者層 (83.5±11.3 歳) のペア血清 57 件を採取した。EMEA が定めるワクチンの有効性の国際基準に沿って、国産ワクチンの免疫原性を評価した。その結果、今年度の国産ワクチンは全体的に低い免疫原性であることが明らかになった。一方、ワクチン接種後の副反応について、昨シーズンと比較したところ、今シーズンのワクチン接種者の方が若干、副反応症状を申告した者の割合が減少した。また、全身的な重度の副反応は認められなかった。
- ⑧ Multi-segment RT-PCR による増幅後、ウイルス株 A/Guangdong/17SF003/2016 (H7N9) 及び A/Taiwan/1/2017 (H7N9) の全ゲノム解析を行った結果、迅速かつ正確にウイルス株の全ゲノムを解析することが出来た。

#### D. 考察

国内およびWHOのインフルエンザ株サーベイランスおよびワクチン候補株の検索と選定を支援するための研究を進め、これらの基盤強化への貢献を目標とした。

本研究班では、ウイルス分離効率を高める試み、H3N2 ウイルスの鶏卵分離効率の改善および薬剤耐性株検出検査のEQA実施への試行的な調査を行い、本研究の目標達成に前進が見られた。また、収集した流行株の解析法の改良と諸外国のWHO-CCとの技術統一のための国際標準化を進め、センター間での解析データのバラツキの改善に貢献した。さらに、各年度の国産ワクチンの有効性評価の一環として、免疫原性を国際基準に照らし合わせて評価した。海外ワクチンの情報(非公開)と比べて、国産ワクチンは良好とは言えない現状を国のワクチン対策に適切に助言し、今後の検討に貢献したい。

#### E. 結論

- ウイルス分離・増殖効率を改善する細胞株の探索を継続した。
- A/H3N2 亜型分離株抗原性解析法に感染細胞巢減数試験法 (Focus reduction assay, FRA) を確立。次期 2018/19 シーズンワクチン推奨株選定に大きく貢献した。
- 2009 年以降、(H1N1)pdm09 の抗原性は変化していることを、ワクチン接種者のヒト血清で捉えた。
- B 型ビクトリア系統に出現した 2 アミノ酸欠損変異株の国内流行に注視が必要。
- ワクチン候補株の鶏卵分離法の改訂に成功した。
- コア・サポート地衛研においては、薬剤耐性株検出系の検査精度が昨年度より上昇していることを確認した。
- 2017-2018 年シーズンのワクチンは接種後の抗体価上昇が低く、免疫原性の低いワクチンであった。次のシーズンのワクチン株の選定のために、今後も調査を継続する。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Wada Y, Nithichanon A, Nobusawa E, Moise L, Martin WD, Yamamoto N, Terahara K, Hagiwara H, Odagiri T, Tashiro M, Lertmemongkolchai G, Takeyama H, Groot AS, Ato M, Takahashi Y. A humanized mouse model identifies key amino acids for low immunogenicity of H7N9 vaccines. *Sci Rep.* 2017 Apr 28;7(1):1283
- 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.* 2017 Apr 10;8:584.

- Gubareva LV, Besselaar TG, Daniels RS, Fry A, Gregory V, Huang W, Hurt AC, Jorquera PA, Lackenby A, Leang SK, Lo J, Pereyaslov D, Rebelo-de-Andrade H, Siqueira MM, Takashita E, Odagiri T, Wang D, Zhang W, Meijer A Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2015–2016. *Antiviral Res.* 2017 Aug 10;146:12–20.
  - Nakamura K, Shirakura M, Fujisaki S, Kishida N, Burke DF, Smith DJ, Kuwahara T, Takashita E, Takayama I, Nakauchi M, Chadha M, Potdar V, Bhushan A, Upadhyay BP, Shakya G, Odagiri T, Kageyama T, Watanabe S Characterization of influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated from Nepalese and Indian outbreak patients in early 2015 *Influenza Other Respir Viruses.* 2017 Sep;11(5):399–403
  - Imai M, Watanabe T, Kiso M, Nakajima N, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Hatta M, Yamada S, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Shirakura M, Takashita E, Fujisaki S, McBride R, Thompson AJ, Takahashi K, Maemura T, Mitake H, Chiba S, Zhong G, Fan S, Oishi K, Yasuhara A, Takada K, Nakao T, Fukuyama S, Yamashita M, Lopes TJS, Neumann G, Odagiri T, Watanabe S, Shu Y, Paulson JC, Hasegawa H, Kawaoka Y. A Highly Pathogenic Avian H7N9 Influenza Virus Isolated from a Human Is Lethal in Some Ferrets Infected via Respiratory Droplets. *Cell Host Microbe.* 2017 Nov 8;22(5):615–626. e8.
  - Terauchi Y, Sano K, Ainai A, Saito S, Taga Y, Ogawa-Goto K, Tamura SI, Odagiri T, Tashiro M, Fujieda M, Suzuki T, Hasegawa H. IgA polymerization contributes to efficient virus neutralization on human upper respiratory mucosa after intranasal inactivated influenza vaccine administration. *Hum Vaccin Immunother.* 2018 Feb 9:1–11.
2. 学会発表
- Takashita E, Shirakura M, Fujisaki S, Nakamura K, Kuwahara T, Kishida N, Watanabe S, Odagiri T Antiviral susceptibility of avian influenza A(H7N9) viruses isolated from humans. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017 年 10 月.
  - Watanabe S, Nakamura K, Kishida N, Fujisaki S, Shirakura M, Takashita E, Kuwahara T, Sato A, Akimoto M, Miura H, Ogawa R, Sugawara H, Watanabe K, Miura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Odagiri T, The influenza surveillance group of Japan. Characterizations of circulating influenza viruses in the 2016/17 season and vaccine viruses for the 2017/18 season. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017 年 10 月.
  - Takahashi H, Fujimoto T, Horikoshi F, Uotani T, Okutani M, Hamamoto I, Odagiri T, Nobusawa E. Development of the cell-culture candidate vaccine viruses and quality evaluation method for production of cell-based influenza vaccines. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017 年 10 月.
  - Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Sato A, Ogawa R, Miura H, Akimoto M, Sugawara H,

Watanabe S, Odagiri T.  
Characterization of cell-derived and  
egg-passaged influenza  
A/Saitama/103/2014 (H3N2) strain. 第  
65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、  
2017 年 10 月

- ・ 小田切孝人 鳥インフルエンザの疫学  
について 新型インフルエンザの診療  
と対策に関する研修、東京、2017 年 11  
月
- ・ Odagiri T Avian influenza viruses  
and pandemic preparedness in Japan.  
The 11<sup>th</sup> Korea-Japan-China Forum for  
Communicable Diseases Control and  
Prevention. Seoul, 2017. November.
- ・ 小田切孝人、倉根一郎 2017/18 シーズ  
ンのインフルエンザ A(H3N2) ワクチン株  
について 第 21 回日本ワクチン学会、  
福岡、2017 年 12 月

#### **G. 知的財産権の出願・登録状況**

該当なし

#### **H. 健康危険情報**

該当なし