

ウイルス中和試験改良変法を用いた A/H3N2 亜型野外流行株の抗原性解析

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

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株をワクチン製造用株として選定することが肝要である。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、赤血球凝集活性が極めて弱く HI 試験に供試できない A/H3N2 亜型株の流行が拡大している。これに対応すべく、前年度までに HI 試験の代替法として中和試験法を用いた A/H3N2 亜型株抗原性解析法およびその改良変法であるウイルス感染細胞単減数試験法（Focus reduction assay, FRA）を確立した。本年度は FRA の試験精度や試験結果の再現性の評価を行うとともに、FRA を用いた A/H3N2 亜型株抗原性解析を駆使して、インフルエンザ野外流行株の抗原性状の正確な捕捉に寄与した。

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感染制御戦略において基本的かつ肝要な事項である。特に流行株の抗原性を解析し、これに合致したウイルス株をワクチン製造に供することを目的にウイルス株サーベイランスが国内外の連携の下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 試験を用いた抗原性解析に供試できない H3N2 亜型株が急速に分布を広げたことを受け、近年では中和試験法を代替手法として H3N2 亜型分離株の抗原性解析を実施している。しかしながら、中和試験法による抗原性解析では試験ごとの結果安定性に疑義が生じたため、試験結果再現性をよ

り高めるために手法の改良を進めてきた。本研究では中和試験法による分離株抗原性解析の問題点改善を目的に、前年度に確立したウイルス感染細胞単減数試験法（Focus reduction assay, FRA）について、試験精度や試験結果の再現性の評価を行うとともに、FRA を用いた A/H3N2 亜型株抗原性解析を駆使して、インフルエンザウイルス野外流行株の抗原性状の正確な捕捉に寄与することを目的とする。

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) 供試ウイルス株

2016/2017 および 2017/2018 シーズンに全国地方衛生研究所（地衛研）においてインフルエンザ患者の検体から分離された後、当センターに分与提供されたウイルス株を SIAT1 細胞で再増殖後、抗原性解析に供した。

3) ウイルス分離・継代

SIAT1 細胞を 25cm² 細胞培養用フラスコに播種し、単層形成後に分与ウイルス株を 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有、3μg/ml アセチル化トリプシン添加の D-MEM 培地を使用し、34°C、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) 中和試験従来法

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°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存否を判定した。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。

5) FRA

参照血清の 2 倍階段希釈列を作製し、前日に SIAT1 細胞を 2.5x10⁴/ウェル播種、一晚培養した 96 穴プレートの各ウェルに添加した。これに一定量のウイルス液を加え、1 時間の中和反応後、半流動体ゲル Avicel を各ウェルに添加した。18-20 時間、34°C の CO₂ インキュベーター内で培養後、被験プレートを固定、細胞透過処理後、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法により、ウイルス感染細胞巣 (focus) を呈色させ、形成 focus を ImmunoSpot アナライザー (CTL 社) を用いて自動計数した。中和抗体価は focus 形成数の有意な減数が観察された血清希釈倍数に基づいて算定した。

(倫理面への配慮)

本研究においては、鼻腔スワブ等の臨床検体を用いるに際し、国立感染症研究所倫理審査委員会の審査を経て承認を受けた。供試検体は匿名処理を行い、検体提供者特定および個人情報流出の防止に配慮している。また、フェレット血清作製にかかる動物実験倫理に関しては、国立感染症研究所動物実験委員会の審査を経て承認を受けた。

C. 研究結果

各種被験抗血清と供試ウイルス株との反応性 (中和抗体価) は、図 1 に例示する FRA 試験プレートから算定された。2017 年 9 月以降に分離された野外流行株の抗原性解析を行った結果、2017/18 シーズンの国内用ワクチン株である A/香港/4801/2014 株をフェレットに感染して得た抗血清と野外分離株との反応性を見た場合、抗細胞分離株血清の場合、5 割程度の野外分離株が抗血清作製に用いたウイルスとの中和抗体反応価 (ホモ価) と比べて同等 (4 倍差以内) の中和抗体価を示していた。しかし、

ワクチン製造に供される同鶏卵株、高増殖性株の場合では2017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

倍差以内に収まっている野外分離株は1割未満であり、分離株の多くがワクチン株と抗原性が異なっていた(図2)。

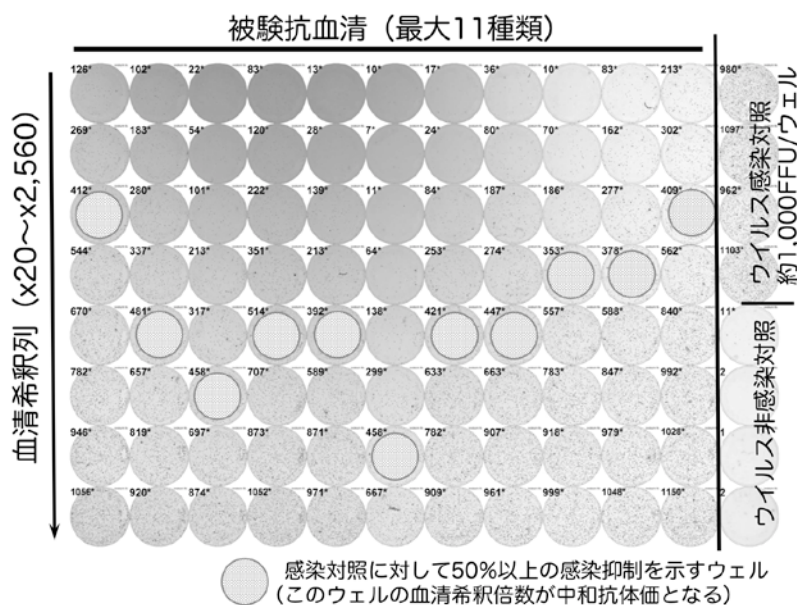


図1 FRA 試験プレートの一例

一方で、A/シンガポール/INFIMH-16-0019/2016株は細胞分離株に対する抗血清とは8割以上、抗鶏卵分離株血清とは5割程度の野外分離株がホモ価との反応性差異が4倍以内であり、現在の野外分離株とA/シンガポール/INFIMH-16-0019/2016株の抗原的類似性が確認された(図2)。

これら結果は国内外で実施された2018/19シーズン用ワクチン株選定会議に際しての有用な資料として活用され、次期2018/19シーズンワクチン推奨株は前シーズンのA/香港/4801/2014株からA/シンガポール/INFIMH-16-0019/2016株に変更された。

今回分離株抗原性解析に用いたFRAは試験結果の対照評価に用いる参照抗原と抗血清との反応で得られる中和抗体価が従来行っていた試験法よりも複数回の試験を通じて、安定して観察されることを確認した。

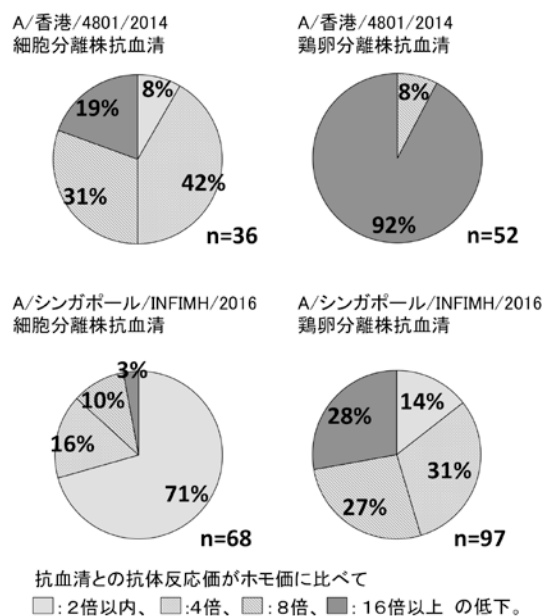


図2 各種フェレット抗血清とA/H3N2型型分離株との反応性

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分離株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、有事に際しての代替え手段の検討、導入が速やかに実施出来るような情報の収集、実験技術面の修練は強く望まれるものである。本研究で確立したウイルス感染細胞巢減数試験法 (Focus reduction assay, FRA) は、従来実施していた中和試験法よりも試験精度や結果再現性に優れるものと考えられた。また、実際の業務における FRA の抗原性解析改良手法としての有用性も併せて示されたことで、当該業務の今後の成果拡大も見込まれる。

E. 結論

A/H3N2 亜型分離株抗原性解析は従来の HI 試験では行えない近年の状況を踏まえて、中和試験法が用いられている。抗原性解析試験のさらなる精度向上を目的に確立したウイルス感染細胞巢減数試験法 (Focus reduction assay, FRA) を用いて 2017/18 シーズンの分離株抗原解析を実施した。次期 2018/19 シーズンワクチン推奨株 A/シンガポール/INFIMH-16-0019/2016 株の選定に大きく寄与した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Kazuya Nakamura, Masayuki Shirakura, Seiichiro Fujisaki, Noriko Kishida, David F Burke, Derek J Smith, Tomoko Kuwahara, Emi Takashita, Ikuyo Takayama, Mina Nakauchi, Mandeep Chadha, Varsha Potdar, Arvind

Bhushan, Bishnu Prasad Upadhyay, Geeta Shakya, Takato Odagiri, Tsutomu Kageyama, Shinji Watanabe. Characterization of influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated from Nepalese and Indian outbreak patients in early 2015.

Influenza and Other Respiratory Viruses 11, 399-403, 2017

- Tomoko Kuwahara, Emi Takashita, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Kazuya Nakamura, Noriko Kishida, Hitoshi Takahashi, Noriko Suzuki, Yoshihiro Kawaoka, Shinji Watanabe, Takato Odagiri. Isolation of egg-adapted influenza A(H3N2) virus without amino acid substitutions in the antigenic sites of its hemagglutinin. Japanese Journal of Infectious Diseases (in press), 2018

2. 学会発表

- Shinji Watanabe, Kazuya Nakamura, Noriko Kishida, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Emi Takashita, Tomoko Kuwahara, Aya Sato, Rie Ogawa, Hiromi Sugawara, Miki Akimoto, Hideka Miura, Kayo Watanabe, Keiko Mitamura, Takashi Abe, Masataka Ichikawa, Masahiko Yamazaki, Takato Odagiri, The Influenza Surveillance Group of Japan. Characterizations of circulating influenza viruses in the 2016/2017 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

- Emi Takashita, Masayuki Shirakura,

Seiichiro Fujisaki, Kazuya Nakamura, Tomoko Kuwahara, Noriko Kishida, Shinji Watanabe, Takato Odagiri. 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

- Tomoko Kuwahara, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Kazuya Nakamura, Emi Takashita, Hitoshi Takahashi, Noriko Kishida, Aya Sato, Rie Ogawa, Hideka Miura, Miki Akimoto, Hiromi Sugawara, Noriko Suzuki, Shinji Watanabe, Takato Odagiri. 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
- Chiharu Kawakami, Shigeo Sugita, Seiichiro Fujisaki, Kazuya Nakamura, Miwako Saikusa, Shuzo Usuku. 2016/17 シーズンに流行した AH3 型インフルエンザウイルスの遺伝子多様性 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017 年 10 月
- Emi Takashita, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Kazuya Nakamura, Noriko Kishida, Tomoko Kuwahara, Masaru Yokoyama, Hironori Sato, Shinji Watanabe, Takato Odagiri. Growth capabilities of influenza A(H1N1)pdm09 viruses exhibiting

enhanced cross-resistance to oseltamivir and peramivir.

The 6th ESWI Influenza Conference Riga, Latvia, Sep/2017

- Emi Takashita, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Kazuya Nakamura, Noriko Kishida, Tomoko Kuwahara, Shinji Watanabe, Takato Odagiri, The Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Detection of influenza A(H1N1)pdm09 viruses exhibiting enhanced cross-resistance to oseltamivir and peramivir in Japan. The 5th ISIRV-AVG Conference Shanghai, China, June/2017

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