

インフルエンザ株サーベイランスにおける分離株抗原性解析 および新規解析手法の確立と改良

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、近年の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 亜型株流行拡大を受け、中和試験法による A/H3N2 亜型株抗原性解析を確立した。さらにこの中和試験法を改良し、試験精度や結果の再現性により優れたウイルス感染細胞巢減数試験法（Focus reduction assay, FRA）を確立、実際のサーベイランス業務へ導入することで A/H3N2 亜型分離株抗原性解析業務のさらなる推進に寄与した。

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。本研究では国内外のインフルエンザウイルス野外流行株の抗原性解析業務を時期に即して遅滞なく実施する。また、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 A/H3N2 亜型株が急速に分布を広げてきたことを受け、これに対応すべく H3N2 亜型分離株の抗原性解析代替手法の模索検討し、中和試験法

による抗原性解析法、さらには試験精度、結果再現性の向上が見込める改良変法であるウイルス感染細胞巢減数試験法（Focus reduction assay, FRA）を確立し、実際のウイルス株サーベイランス分離株抗原性解析業務に実用導入することで、将来のワクチン製造用株選定に際しての正確かつ有用な検討資料を提供していくことを目的とする。

B. 研究方法

1) 細胞株

インフルエンザウイルス分離増殖に広く用いられる MDCK 細胞は 10%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、継代維持を行った。

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

2014/15、2015/2016、2016/2017 および 2017/18 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 MDCK 細胞あるいは SIAT1 細胞で増殖後、抗原性解析に供した。

3) ウイルス分離・継代

MDCK 細胞または 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 10-1000 倍に適宜希釈したものを 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°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) 赤血球凝集 (HA) 試験

常法 HA 試験については、検体ウイルスの 2 倍階段希釈列を PBS で作製し、これにウイルス液と等量の 0.5%ニワトリあるいは 0.5%七面鳥赤血球液を加え、45 分間反応後、赤血球の完全凝集像を示すものを HA 陽性と判定した。

5) 赤血球凝集阻止 (HI) 試験

参照血清は時期代表的なウイルス株をフェレットに感染させ、2 週間後に採取した血液から分離回収した。常法 HI 試験では、参照血清の 2 倍階段希釈列を PBS で作製し、これに 4 HA 価含有に調製したウイルス液を等量混合後 60 分間反応させた。この血清/ウイルス混合液に 0.5%ニワトリあるいは 0.5%七面鳥赤血球液を加え、45 分間反応後、赤血球凝集の完全阻止像を示すものを HI 陽性と判定し

た。

6) 中和試験法

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。

7) ウイルス感染細胞単減数試験法

(Focus reduction assay, 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、Avicel ないしカルボキシメチルセルロース (CMC) 半流動体ゲル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、ウイルス感染細胞単 (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

1) 2015/16 シーズン A/H1N1pdm09 亜型およびB型ウイルス野外流行株のHI 試験による抗原性解析

2015/16 シーズンの A/H1N1pdm 亜型野外分離株は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、抗血清のホモ HI 価 (抗血清と当該抗血清作製に用いたウイルスとの反応価) から 4 倍の低下を示す分離株の割合が増加していた (図 1) が、4 倍の低下は抗原性類似の範疇に入るため、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。

B 山形系統の野外分離株はほぼ全てが 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 (図 2)。

B ビクトリア系統の野外分離株は B/Texas/02/2013 鶏卵分離株のフェレット感染血清との反応性低下を示す割合が増加していた (図 3) が、4 倍の低下は抗原性類似の範疇に入るため、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。

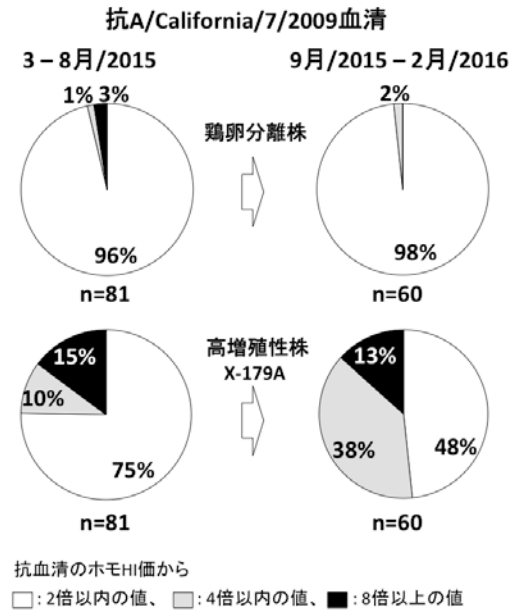


図 1 各種フェレット感染血清と A(H1N1)pdm09 分離株との反応性

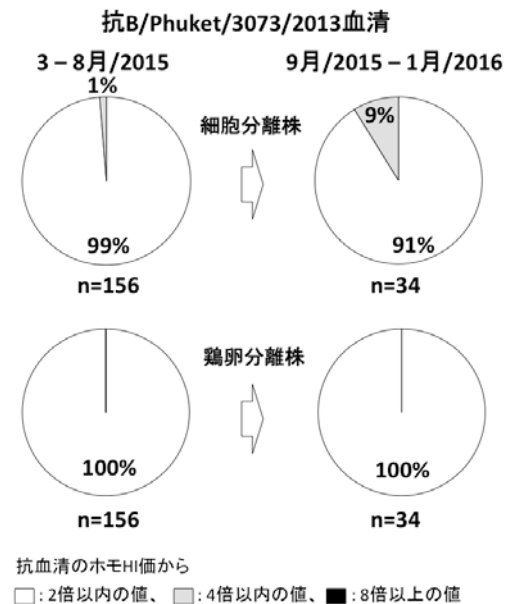


図 2 各種フェレット感染血清と B 山形系統分離株との反応性

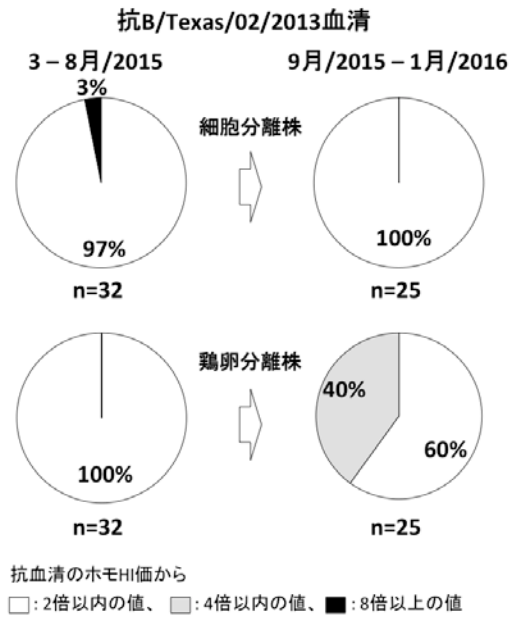


図3 各種フェレット感染血清とBビクトリア系統分離株との反応性

2) 2016/17 シーズン A/H3N2 亜型ウイルス 野外流行株の中和試験法による抗原性解析

2015/16 および 2016/17 シーズンの A/H3N2 亜型野外分離株の抗原性解析は中和試験法を用いて行った。A/香港/4801/2014 株は 2016/17 シーズンの国内用ワクチン株である。この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、2016年3-8月期には7割以上、2016年9月以降7割程度の野外分離株がホモ中和抗体価と比べて同等（4倍差以内）の交代価を示していた。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2016年3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製造株と抗原性が異なっている傾向が認められた（図4）。

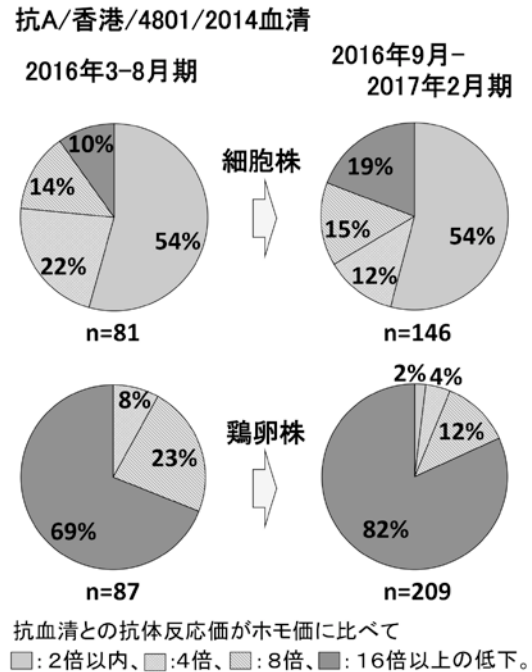


図4 各種フェレット抗血清とA/H3N2亜型分離株との反応性

3) A/H3N2 亜型分離株抗原性解析における 中和試験改良変法の確立

上述中和試験法による野外分離株の抗原性解析では算定される抗体価の結果の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た。結果として、ウイルス感染細胞巢減数試験法 (Focus reduction assay, FRA) を各種使用試薬や試験条件の検討を経て、実際の野外分離株抗原性解析業務に導入可能な抗原性解析改良変法として確立した（図5）。

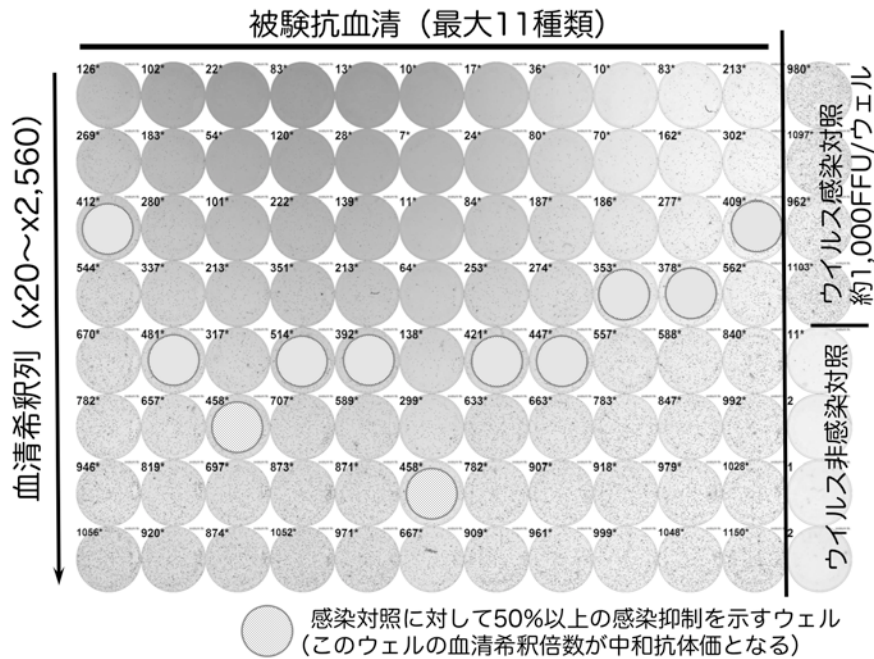


図5 FRA 試験プレートの一例

FRAにより算出された参照ウイルス株間の中和抗体価

参照ウイルス株	抗血清			
	香港/4801 細胞株	香港/7127 細胞株	埼玉/103 細胞株	埼玉/103 鶏卵株
A/香港/4801/13 細胞株	<u>640</u>	640	640	160
A/香港/7127/13 細胞株	160	<u>320</u>	160	160
A/埼玉/103/14 細胞株	320	320	<u>1280</u>	320
A/埼玉/103/14 鶏卵株	<20	40	40	<u>160</u>

4) 2017/18 シーズン A/H3N2 亜型ウイルス
野外流行株の FRA による抗原性解析

2017年9月以降に分離された野外流行株について、FRA による抗原性解析を行った結果、2017/18 シーズンの国内ワクチン株である 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、5割程度の野外分離株が抗細胞分離株血清とホモ価と同等(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6)。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6)。

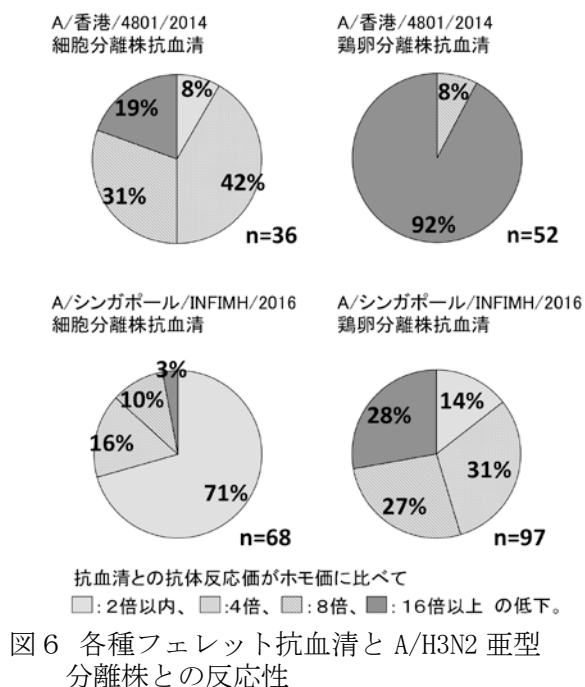


図6 各種フェレット抗血清と A/H3N2 亜型分離株との反応性

これら結果は国内外で毎年度実施された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、次期ワクチン推奨株の決定に大きく寄与した。

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。本研究を通じて

確立したウイルス感染細胞巢減数試験法 (Focus reduction assay, FRA) は、分離株抗原性解析に常法として用いられている HI 試験の代替手法として、A/H3N2 亜型分離株の抗原性解析に十分に利用でき、従来の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。これにより当該業務の今後の成果拡大も見込まれる。

E. 結論

本研究期間を通じて、毎年流行するインフルエンザの野外流行株の抗原性状を時期に即して遅滞なく解析を行った。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、この代替手法の確立、改良に努め、ウイルス感染細胞巢減数試験法 (Focus reduction assay, FRA) をインフルエンザウイルス株サーベイランス業務に導入し、成果をあげた。これら成果は国内外で毎年度実施されたワクチン株選定会議に提供され、次期ワクチン推奨株の決定に大きく寄与した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 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 cluster (outbreak) of influenza A(H1N1)pdm09 virus cross-resistant to oseltamivir and peramivir during(in) the 2013-14 influenza season in Japan., Antimicrob. Agents.

- Chemother., 59(5), 2607-17, 2015
- 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
 - 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, 34(3), 328-33, 2016
 - 渡邊真治, 藤崎誠一郎, 中村一哉, 香港型インフルエンザウイルスの最近の変異 (性状変化), インフルエンザ, Vol. 17 No. 3, 37-44, 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(1), 83-6, 2016
 - 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., 11(5), 399-403, 2017
 - Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Watanabe S, Odagiri T., Isolation of egg-adapted influenza A(H3N2) virus without amino acid substitutions in the antigenic sites of its hemagglutinin., Jpn J Infect Dis., (In press), 2018
- ## 2. 学会発表
- 1) 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 2017 年 10 月
 - 2) 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 2017年

- 10月
- 3) 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 2017年10月
- 4) 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 2017年10月
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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.
Earlier detection of an ancestral variant of influenza A(H1N1)pdm09 subclade 6B.1 virus from Nepalese and Indian outbreak patients.
The 6th China-Japan Bilateral Symposium on All Influenza virus (Beijing, China), Mar/2017
- 8) Kazuya Nakamura, Masayuki Shirakura, Seiichiro Fujisaki, Noriko Kishida, Tomoko Kuwahara, Emi Takashita, Ikuyo Takayama, Mina Nakauchi, Mandeep Chadha, Varsha Potdar, Bishnu Prasad Upadhyay, Geeta Shakya, Takato Odagiri, Tsutomu Kageyama, Shinji Watanabe.
Characterizations of influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated from patients including fatal or severe cases in Nepal and India, early 2015.
Options for the Control of Influenza IX (Chicago, USA), Aug/2016
- 9) Noriko Kishida, Masaki Imai, Akira Ainai, Reiko Saito, Kazuya Nakamura, Tomoko Kuwahara, Seiichiro Fujisaki, Emi Takashita, Masayuki Shirakura, Yoshiko Kashiwagi, Masato Tashiro, Takato Odagiri, Shinji Watanabe. Evaluation of efficacy of an inactivated high growth reassortant whole-virus A(H3N2) influenza vaccine in ferret.
Options for the Control of Influenza IX

(Chicago, USA), Aug/2016

10) Shinji Watanabe, Kazuya Nakamura, Noriko Kishida, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Emi Takashita, Tomoko Kuwahara, Aya Sato, Rie Ogawa, Hiromi Sugawara, Miki Akimoto, Hideka Miura, Takato Odagiri, 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 2016年10月

11) Noriko Kishida, Masaki Imai, Akira Aina, Reiko Saito, Kazuya Nakamura, Tomoko Kuwahara, Seiichiro Fujisaki, Emi Takashita, Masayuki Shirakura, Yoshiko Kashiwagi, Masato Tashiro, Takato Odagiri, Shinji Watanabe. 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 2016年10月

12) Emi Takashita, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Kazuya Nakamura, Noriko Kishida, Tokoko Kuwahara, Yukie Shimazu, Takeshi Shimomura, Ikuko Doi, Shinji Watanabe, Takato Odagiri, The Influenza 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学術集会 2016年10月

13) Shinji Watanabe, Kazuya Nakamura, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Emi Takashita, Noriko Kishida, Tomoko

Kuwahara, Aya Sato, Rie Ogawa, 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学術集会 2015年11月

14) 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学術集会 2015年10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