

A(H1N1)pdm09 および B 型インフルエンザウイルスの 赤血球凝集阻止試験をもちいた抗原性解析

研究分担者 岸田典子

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

A(H1N1)pdm09、B 山形系統および B ビクトリア系統の 2016/17 及び 2017/18 シーズンインフルエンザワクチン株の選定を行うことを目的とし、2015/16 及び 2016/17 シーズンの国内およびアジア諸国から収集した A(H1N1)pdm09、B 山形系統および B ビクトリア系統分離株の抗原性解析を、フェレット感染血清をもちいた赤血球凝集阻止試験により実施した。B 型は両系統の分離株とも調べた各シーズンのワクチン株とそれぞれ抗原性は類似していた。A(H1N1)pdm09 については、フェレット感染血清では、ワクチン製造株の製造過程やウイルスの細胞培養途中で起こる抗原性の変化はとらえることはできたが、それ以外の抗原性の変化はとらえることができないことがわかった。ワクチン接種者の血清を用いて、ワクチン製造株および 2009 年から 2016 年までの分離株との反応性を赤血球凝集阻止試験により比較解析した結果、A(H1N1)pdm09 ではクレード 6B に属するウイルスが出現した際に明らかな抗原性の変化が起こっていることがわかった。得られた結果をワクチン株選定のための資料として国内外の株選定会議に提供した。

A. 研究目的

インフルエンザウイルスは頻繁に遺伝子変異し、それにともなって抗原性が変化するため、ワクチン株は毎年見直す必要がある。本研究課題では、国内外の A(H1N1)pdm09 および B 型の分離株について、赤血球凝集阻止 (HI) 試験を用いた抗原性解析を行い、その情報にもとづいて適切な季節性インフルエンザワクチン株の選定を行うことを目的とする。

B. 研究方法

2015/16 及び 2016/17 シーズンの国内およびアジア諸国から収集した A(H1N1)pdm09、B 山形系統および B ビクトリア系統分離株の抗原性解析を、フェレット感染血清を用いた赤血球凝集阻止試験により実施した。2016/17 シーズンの A(H1N1)pdm09 分離株解析については A/California/7/2009 (X-179A) が含まれるワクチン接種者血清も HI 試験に用いた。このワクチン接種者血清は、72 検体から、HA の抗原部位に存在する K163Q のアミノ酸置換をもつクレード 6B 以降の流行株と反応性が低い血清 9 検体を選び、それらを混合して試験に用いた。さらに、A(H1N1)pdm09 については、2009 年以降の抗原性の変化を明らかにすることを目的とし、2009 年から 2016 年までの分離株についてワクチン接種者血清を用いた HI 試験により比較解析した。ヒト血清は、2010/11、2012/13、2015/16 シーズンのワクチン接種後血清 (20 歳以上 60 歳未満) 各シーズン 24 人ずつを使用した。使用ウイルスは、ワクチン製造株 California/7/09 (X-179A)、2009 年分離株 3 株、クレード 6 (A185T, S203T のアミノ酸置換) に属する 2010 から 2012 年分離株 3 株、クレード 6B (K163Q のアミノ酸置換) に属する 2013 から 2015 年の分離株 3 株、クレード 6B1 (K163Q + S162N のアミノ酸置換) に属する 2015 年の分

チン接種者血清は、72 検体から、HA の抗原部位に存在する K163Q のアミノ酸置換をもつクレード 6B 以降の流行株と反応性が低い血清 9 検体を選び、それらを混合して試験に用いた。さらに、A(H1N1)pdm09 については、2009 年以降の抗原性の変化を明らかにすることを目的とし、2009 年から 2016 年までの分離株についてワクチン接種者血清を用いた HI 試験により比較解析した。ヒト血清は、2010/11、2012/13、2015/16 シーズンのワクチン接種後血清 (20 歳以上 60 歳未満) 各シーズン 24 人ずつを使用した。使用ウイルスは、ワクチン製造株 California/7/09 (X-179A)、2009 年分離株 3 株、クレード 6 (A185T, S203T のアミノ酸置換) に属する 2010 から 2012 年分離株 3 株、クレード 6B (K163Q のアミノ酸置換) に属する 2013 から 2015 年の分離株 3 株、クレード 6B1 (K163Q + S162N のアミノ酸置換) に属する 2015 年の分

分離株 2 株、クレード 6B2 (K163Q + V152T のアミノ酸置換) に属する 2015 と 2016 年の分離株 2 株、反応性低下株のコントロールとしてクレード 7 に属する札幌/163/11 株、以上 15 株を使用した。札幌/163/11 株は細胞培養途中で怒った HA の 190 番目のアミノ酸置換 (S→R) を持ちフェレット感染血清でも反応性が大きく低下する株である。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

2015/16 シーズン :

A(H1N1)pdm09 : 2015/16 シーズンの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から、分離株はいずれも A/California/7/2009 に抗原性が類似した株であると判定された。

B 型インフルエンザの流行は、2015/16 シーズンは山形系統とビクトリア系統の混合流行であった。その割合は山形系統が 56%、ビクトリア系統が 44%であった。

B 山形系統 : 2015/16 シーズン分離株はいずれも 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。

B ビクトリア系統 : B/Texas/02/2013 鶏卵分離株のフェレット感染血清との反応性から、分離株はいずれも 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。

2016/17 シーズン :

A(H1N1)pdm09 : 2016/17 シーズンのワクチン製造株である高増殖性 A/California/7/2009 (X-179A) およびそのオリジナル株である A/California/7/2009 のフェレット感染血清との反応性をみると、2016/17 シーズンの分離株はいずれの血清とも 4 倍以内の範囲でよく反応し、98%以上がワクチン類似株であった。しか

しながら、ワクチン接種者のプール血清と流行株との反応性を調べると、ほとんどの流行株で 8 倍以上の反応性低下が認められた。

B 型インフルエンザの流行は、2016/17 シーズンはビクトリア系統と山形系統の混合流行であった。その比率はおおよそビクトリア系統 : 山形系統=3 : 2 であった。

B ビクトリア系統 : 2016/17 シーズンの流行株は、2016/17 シーズンのワクチン株 B/Texas/02/2013 の鶏卵分離株および細胞分離株いずれのフェレット感染血清とも 4 倍以内の値でよく反応し、98%がワクチン類似株であった。

B 山形系統 : 2016/17 シーズンの流行株は 2016/17 シーズンのワクチン株 B/Phuket/3073/2013 の鶏卵分離株および細胞分離株のフェレット感染血清と 4 倍以内の値でよく反応し、97%以上がワクチン類似株であった。

2009 年から 2016 年までの分離株についてワクチン接種者血清を用いた HI 試験による比較解析から、3 シーズンの血清全てにおいて、2009 年の (H1N1)pdm09 流行当初から野外株との反応性がワクチン製造株との反応性より大きく低下していることがわかった。2010/11 シーズン血清でみると、2010 年に分離され始めたクレード 6 のウイルスには比較的良好に反応 (80 - 142.5 GMT) したのに対して、2012 年に分離され始めたクレード 6B ウイルスとの反応性は大きく低下した (44.9 - 71.3 GMT)。またクレード 6B1 のウイルスに対してはさらに反応性が低下していた (26.7 - 28.3 GMT)。6B2 のウイルスに対しては 6B のウイルスとの反応性と同等であった (40.0 - 65.4 GMT)。反応性低下株のコントロールとして用いた札幌/163/11 株の GMT は 15.4 であった。この反応性のパターンは 3 シーズンとも共通していたが、シーズンを経るごとに野外株との反応性は上がり、20 HI 以下の検体数は減った。

得られた結果は国内外のワクチン株選定会

議に提供した。

D. 考察

2015/16 及び 2016/17 シーズンともフェレット感染血清を使用した HI 試験では A(H1N1)pdm09、B 山形系統および B ビクトリア系統のいずれにおいても、分離株の抗原性の変化はとらえられなかった。しかしながら、A(H1N1)pdm09 でワクチン接種者血清を用いた解析ではワクチン接種者血清がクレード 6B、6B1 に属する分離株と特に反応性が低かったことから、A(H1N1)pdm09 の抗原性が変化していることが明らかとなった。A(H1N1)pdm09 で見られたように、フェレット感染血清が B 型の抗原性の変化を見逃している可能性を否定できない。今後は、B 型についても解析に使用する血清の検討が必要であると考えられた。

ワクチン接種者血清を用いた HI 試験による A(H1N1)pdm09 分離株の比較解析から、3 シーズンの血清全てにおいて、2009 年の (H1N1)pdm09 流行当初から野外株との反応性がワクチン製造株との反応性より大きく低下したのは、ワクチン製造過程の発育鶏卵培養中に起こった HA の抗原部位のアミノ酸置換 (Q223R) による影響が大きいと考えられる。クレード 6B ウイルスとの反応性が大きく低下したのは、抗原部位にある 163 番目のアミノ酸置換 (K→Q) の影響が大きいと考えられる。またクレード 6B1 のウイルスとの反応性の低下は 162 番目のアミノ酸置換により付加される糖鎖が影響していることが考えられた。6B2 のウイルスが持つアミノ酸置換 (V152T) は 6B1 の糖鎖付加ほどは影響が小さくなかったと考えられた。

E. 結論

A(H1N1)pdm09 のワクチン接種者血清を用いた解析により、A(H1N1)pdm09 の抗原性の変化が明らかとなったことから、A(H1N1)pdm09 については、2017/18 シーズンのワクチン株を変更する必要がある。B 型についてはいずれの系統も

ワクチン株と流行株の抗原性が類似しており、めだった抗原性変異株の出現も認められないことから、ワクチン株の変更の必要性は低いと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 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
- Li TC, Yang T, Yoshizaki S, Ami Y, Suzaki Y, Ishii K, Kishida N, Shirakura M, Asanuma H, Takeda N, Wakita T., Ferret Hepatitis E Virus Infection Induces Acute Hepatitis and Persistent Infection in Ferrets., *Vet. Microbiol.*, 183, 30-36, 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
- Nao N, Yamagishi J, Miyamoto H, Igarashi M, Manzoor R, Ohnuma A, Tsuda Y, Furuyama W, Shigeno A, Kajihara M, Kishida N, Yoshida R, Takada A., Genetic Predisposition To Acquire a Polybasic Cleavage Site for Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Hemagglutinin., *MBio.*, 8(1), pii: e02298-16, 2017
- 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)

2. 学会発表

- Shinji Watanabe, Kazuya Nakamura, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Emi Takashita, Noriko Kishida, Tomoko Kuwahara, Aya Sato, Ogawa Rie, 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 2015年11月 福岡
- 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 IX for the control of influenza 24 - 28 August, 2016, Chicago

- 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 whole-virus A/Victoria/361/2011 (IVR-165) (H3N2) influenza vaccine in ferret The 第64回日本ウイルス学会 2016年10月 札幌

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