

インフルエンザウイルスワクチン株の鶏卵における分離

研究分担者：桑原 朋子 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・研究官

研究協力者：高下 恵美 同上・主任研究官

研究要旨

現行の季節性インフルエンザワクチンには、発育鶏卵（鶏卵）で分離されたウイルスが用いられる。当研究所でも、より有効性の高いワクチン株の選定に貢献することを目的として、全国の地方衛生研究所や提携医療機関から分与された臨床検体を用いてワクチン候補株の分離を行っている。近年、A(H3N2)ウイルスはトリ型レセプターとの親和性が低く、鶏卵で増殖させることは非常に困難である。当研究所においても、従来の方法では全く A(H3N2)ウイルスを鶏卵で分離できなくなってしまうため、分離条件の再検討を行った。その結果、A(H3N2)ウイルスの分離率を上昇させることに成功した。また、我々が鶏卵で分離した A/Saitama/103/2014(H3N2)株は、鶏卵で分離しても流行株と類似の抗原性を保持していたため、A/Saitama/103/2014(CEXP-002)株は、2017 年に WHO ワクチン株選定会議においてワクチン候補株として承認された。

A. 研究目的

WHO の季節性インフルエンザワクチン推奨株は、WHO Collaborating Centre (WHOC)により鶏卵で分離されたウイルスの中から選定される。我々、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も WHOC の一つであり、より有効性の高いワクチン株の選定に貢献するため、全国の地方衛生研究所や提携医療機関から分与された臨床検体を鶏卵に接種し、ワクチン候補株の分離を行っている。しかしながら、近年の A(H3N2)ウイルスは、鶏卵で増殖しづらく、さらに鶏卵で増殖しても主要抗原である HA に変異が入り、ウイルスの抗原性が変化する現象が起こっている。ワクチン候補株の抗原性の変化は、ワクチン株と流行株の抗原性の乖離を意味しており、これによりワクチンの有効性も低下することが報告されている。このような背景のもと、我々は、特に A(H3N2)ワクチン候補株の鶏卵での分離率の改善と、これまでに鶏卵で分離した A/Saitama/103/2014 (H3N2)(埼玉株)の性状解析を試みた。

B. 研究方法

27 年度は、2014/15 シーズンと 2015/16 シーズンに全国の地方衛生研究所で集められた臨床検体を用いた。28 年度以降は、4 箇所の提携医療機関から分与された臨床検体を用いた。ウイルスの分離は、27 年度は臨床検体を鶏卵（9-10 日齢）に直接接種するか、臨床検体を当研究所において細胞培養ワクチンの種株分離用に品質管理されている MDCK 細胞 (NIID-CK 細胞) に接種し、分離されたウイルスを鶏卵の羊膜腔および漿尿膜腔で継代することにより行った。

28 年度には、臨床検体到着後、まず RT-LAMP 法により検体中のウイルス量の測定と亜型同定を行い、ウイルス量が低いものを除外した。ウイルスは、鶏卵の羊膜腔に臨床検体を原液で接種した。羊膜腔でウイルスが増殖したかどうかは、HA アッセイまたは、RT-LAMP 法により判定した。29 年度は、28 年度とほぼ同様の手法を用いたが、鶏卵は従来の 9-10 日齢の白

玉鶏ジュリアに加え、14日齢の赤玉鶏ボリスブラウンも用いた。また、ウイルス接種の際に漿尿膜に接している卵殻膜を取り除かずに、PBSを添加して膜の透過性を高めて接種する方法も用いた。羊膜腔で増殖が確認されたウイルスは、ワクチン候補株として十分な量を確保するため、漿尿膜腔でさらに継代した。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

27年度は、臨床検体またはNIID-CK細胞で分離したウイルスを発育鶏卵に接種し分離を試みた。その結果、A(H1N1)pdm09ウイルスを4株、A(H3N2)ウイルスを1株、B型ビクトリア系統ウイルスを2株分離した。近年のA(H3N2)ウイルスは、ほぼ例外なく、鶏卵で増殖するようになると、主要抗原であるHAの抗原部位に変異を獲得し、ウイルスの抗原性が変化してしまう。ところが、我々が鶏卵で分離したA(H3N2)ウイルスのA/Saitama/103/2014株(埼玉株)は、臨床検体と比較してHAには抗原部位ではない場所の1ヶ所にしか変異が入っておらず、HAとともにウイルス粒子上に膜タンパクとして存在するNAに10ヶ所の変異が入っていた。またこのウイルスのフェレット感染血清を作製し、流行株との反応性を調べたところ、流行株と類似の抗原性を保持していることが明らかになった。埼玉株は、鶏卵で分離しても流行株と類似の抗原性を保持した非常に珍しいウイルスであり、2017年にはWHOの季節性ワクチン株推奨リストに掲載された。さらに、29年度には、埼玉株についてまとめた論文が科学雑誌Japan Journal of Infectious Diseasesに受理された。

一方で、A(H3N2)ウイルスの分離率は年々低下傾向にあり、28年度には1株も分離することができなかった。そこで、我々は28年度から、凍結する前のウイルスタイターが高い状態の

臨床検体を羊膜腔に接種すれば分離率が改善するのではないかと考え、東京都と神奈川県の実験医療機関から凍結前の臨床検体を分与してもらい、鶏卵に接種した。ところが、これらの臨床検体を用いても、B型ウイルスでは分離率が92%程度であるのに対し、A(H3N2)ウイルスの分離率は0%であった。29年度には、WHOCC ロンドンセンターで採用されているプロトコルを共有してもらい、このプロトコルをもとに、分離条件を再検討した。その結果、使用する鶏卵の種類を14日齢の赤玉鶏ボリスブラウンに変更し、漿尿膜と接している卵殻膜を取り除く方法を用いると、A(H3N2)ウイルスの分離率が0%から20%にまで上昇し、他の亜型のウイルスにおいても高い分離率を保っていた。この方法により、28年度には1株も分離できなかったA(H3N2)ウイルスを23株分離することに成功した。その他の亜型では、A(H1N1)pdm09ウイルス37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株を分離した。

D. 考察

A(H3N2)ウイルスは、目まぐるしく変化しており、ワクチン株の鶏卵での分離は大きな課題である。本研究課題で我々は、初年度にA(H3N2)ワクチン候補株の埼玉株を分離し、この株は2017年にWHOからワクチン株として承認された。このウイルスはHAではなくNAに変異を獲得し、抗原性変異を起こさなかった特殊なウイルスであるため、今後このウイルスの更なる性状解析を行うことにより、HAの抗原部位に変異を獲得しないワクチン候補株の開発に寄与することが期待される。また、29年度に鶏卵分離の手法を再検討したことにより、これまで分離することが困難であったA(H3N2)ウイルスの分離に成功した。今回改良した手法を用いることにより、今後さらに多くのワクチン候補株を分離し、より有効性の高いワクチン株が分離できると期待される。

E. 結論

インフルエンザウイルスは、変異を起こしやすく、流行するウイルスも日々変化する。今後とも有効性の高いワクチン株の分離を目指し、新たな分離手法の開発や、既存の手法を改良していくことは、公衆衛生上非常に重要である。

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
- 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, 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

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

2. 学会発表

- Watanabe S, Nakamura K, Fujisaki S, Shirakura M, Takashita M, Kishida N, Kuwahara T, Sato A, Ogawa R, Sugawara H, Akimoto M, Miura H, Odagiri T, 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、博多市、2015
- 桑原朋子、高下恵美、藤崎誠一郎、白倉雅之、中村一哉、岸田典子、高橋仁、佐藤彩、小川理恵、三浦秀佳 1、秋元未来、菅原裕美、鈴木典子、渡邊真治、小田切孝人
- インフルエンザウイルスワクチン株の鶏卵における分離。 5th Negative Strand Virus-Japan、恩納村、2016
- Watanabe S, Nakamura K, Fujisaki S, Shirakura M, Takashita M, Kishida N, 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、札幌市、2016

- ・ 桑原朋子、高下恵美、藤崎誠一郎、白倉雅之、中村一哉、岸田典子、高橋仁、佐藤彩、小川理恵、三浦秀佳 1、秋元未来、菅原裕美、鈴木典子、渡邊真治、小田切孝人
- ・ 鶏卵分離埼玉株 NA で特徴的に認められたアミノ酸置換
- ・ 6th Negative Strand Virus-Japan、宜野湾市、2017

- ・ 桑原朋子、高下恵美、藤崎誠一郎、白倉雅之、中村一哉、岸田典子、高橋仁、佐藤彩、小川理恵、三浦秀佳 1、秋元未来、菅原裕美、鈴木典子、渡邊真治、小田切孝人
- ・ 鶏卵で継代培養した埼玉株の NA に特徴的に認められたアミノ酸置換
- ・ 第 31 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム、静岡市、2017

- ・ Watanabe S, Nakamura K, Fujisaki S, Shirakura M, Takashita M, Kishida N, 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 2016/2017 season and vaccine viruses selected for the 2016/17 season. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪市、2017

- ・ Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Takahashi H, Kishida N, Sato A, Ogawa R, Miura H, Akimoto M, Sugawara H, Suzuki N, Watanabe S, Odagiri T
- ・ Characterizations of cell-derived and egg-passaged A/Saitama/103/2014 virus.

第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪市、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