

II. 分担研究報告書

検体からのウイルス分離・増殖効率を改善する細胞株の探索・性状解析

研究分担者 渡邊 真治

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・室長

研究要旨

ヒト咽頭由来株化細胞 Detroit562 細胞での季節性インフルエンザウイルス (A/H1N1pdm09 亜型、A/H3N2 亜型、B 型山形系統および B 型ビクトリア系統) の増殖性を調べた。その結果、いずれのウイルスも増殖することが明らかとなったが、その効率は従来使用されているイヌ腎由来株化細胞 [Madin-Darby Canin Kidney (MDCK) 細胞] (hCK 細胞) よりも低かった。

A. 研究目的

流行期ごとの季節性インフルエンザウイルスの性状 (抗原性や抗ウイルス薬感受性) を理解することは、適切なワクチン株を選定する、あるいは抗ウイルス薬耐性株の出現・拡がりに対する対策を施す上で、大変重要である。そのためには、流行期の患者臨床検体からのインフルエンザウイルス分離が必須となる。インフルエンザウイルスの分離にはイヌ腎由来株化細胞 [Madin-Darby Canin Kidney (MDCK) 細胞] が長く慣習的に使用されている。しかしながら近年、特に季節性ウイルスのひとつである A/H3N2 亜型ウイルスについて、MDCK 細胞を用いての分離・増殖効率の低下傾向が報告されてきており、野外流行株の分離捕捉率の低下、またこれによる流行株性状の正確な把握が妨げられることが懸念されている。そこで、季節性インフルエンザウイルス全般の分離・増殖効率の改善を見込める細胞株を探索・樹立し、その細胞株をインフルエンザ流行株分離用基材として地方衛生研究所に配布、活用してもらうことでインフルエンザウイルス株サーベイランスへ貢献することを目的とした。

B. 研究方法

現在感染研では、MDCK および MDCK-SIAT1

(SIAT1) 細胞あるいは hCK 細胞 (季節性インフルエンザウイルスのレセプターを多く発現している細胞) をウイルスの分離・増殖に使用しており、一定の効果を上げている。しかしながら、特に SIAT1 細胞および hCK 細胞は培養維持費が高額である点で、地衛研での恒常的な使用については難しい面がある。また 1 種類の細胞でウイルス分離出来る方が、地衛研での細胞の維持の点からも望ましい。そのため筆者はヒト呼吸器系由来株化細胞である上気道咽頭由来の Detroit 562 細胞に着目している。これまで A/H3N2 亜型ウイルスについて増殖性を検討したが、今回 A/H1N1pdm09 亜型および B 型ウイルスの増殖性について検討した。

(倫理面への配慮)
該当なし

C. 研究結果

A/H3N2 亜型ウイルスだけでなく、A/H1N1pdm09 亜型ウイルス、B 型山形系統ウイルスおよび B 型ビクトリア系統ウイルスも、同程度増殖することが明らかとなった。しかし残念ながら、MDCK 細胞由来の hCK 細胞と比較すると、増殖性は低いことが明らかとなった。

D. 考察

Detroit 562 細胞でも季節性インフルエンザウイルスは増殖することが明らかとなったが、従来使用されている hCK (MDCK 細胞由来) 細胞より増殖性は低かった。しかし、検体からの分離効率や分離されたウイルスの塩基配列への変異誘導効率などはまだ不明なため、今後検討する予定である。

E. 結論

ヒト咽頭由来株化細胞 Detroit562 細胞において、季節性インフルエンザウイルス (A/H1N1pdm09 亜型、A/H3N2 亜型、B 型山形系統および B 型ビクトリア系統) は増殖することが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- M. Ujie, K. Takada, M. Kiso, Y. Sakai-Tagawa, M. Ito, K. Nakamura, S. Watanabe, M. Imai, Y. Kawaoka Long-term culture of human lung adenocarcinoma A549 cells enhances the replication of human influenza A viruses. *Journal of General Virology*. 2019 10, 100(10), 1345-1349
- Takashita E, Ichikawa M, Morita H, Ogawa R, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Sugawara H, Sato A, Akimoto M, Mitamura K, Abe T, Yamazaki M, Watanabe S, Hasegawa H, Odagiri T. Human-to-Human Transmission of Influenza A(H3N2) Virus with Reduced Susceptibility to Baloxavir, Japan, February 2019. *Emerg Infect Dis*. 2019 11, 25(11), 2108-2111
- Nakauchi M, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Ogawa R, Morita H, Miura H, Saito S, Watanabe S, Odagiri T,

Kageyama T. Rapid detection of an I38T amino acid substitution in influenza polymerase acidic subunit associated with reduced susceptibility to baloxavir marboxil. *Influenza Other Respir Viruses*. 2020 2 doi: 10.1111/irv.12728

- Kyaw Win SM, Saito R, Win NC, Lasham DJ, Kyaw Y, Lin N, Thein KN, Chon I, Odagiri T, Thein W, Kyaw LL, Tin OS, Saitoh A, Tamura T, Hirokawa C, Uchida Y, Saito T, Watanabe S, Odagiri T, Kamata K, Osada H, Dapat C, Watanabe H, Tin HH. Epidemic of influenza A(H1N1) pdm09 analyzed by full genome sequences and the first case of oseltamivir-resistant strain in Myanmar 2017. *PLoS One*. 2020 3, 15(3), e0229601. doi: 10.1371/journal.pone.0229601

2. 学会発表

- Watanabe S, Nakamura K, Kishida N, Fujisaki S, Shirakura M, Takashita E, Kuwahara T, Sato A, Akimoto M, Miura H, Ogawa R, Morita H, Sugawara H, Odagiri T, Hasegawa H, The Influenza Surveillance Group of Japan. Characterizations of circulating influenza viruses in the 2018/19 season and selection of vaccine viruses for the 2019/20 season. 第 67 回日本ウイルス学会学術集会 2019 年 10 月
- Takashita E, Morita H, Ogawa R, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Sugawara H, Sato A, Akimoto M, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamasaki M, Watanabe S, Odagiri T,

Hasegawa H, The Influenza Surveillance Group of Japan. Human-to-human transmission of influenza A(H3N2) viruses exhibiting reduced susceptibility to baloxavir due to a PA I38T substitution in Japan. 第 67 回日本ウイルス学会学術集会 2019 年 10 月

- Nakamura K, Akimoto M, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Kishida N, Sato A, Kuwahara T, Takashita E, Hasegawa H, Odagiri T, Watanabe S. Improved accuracy of antigenic characterization of recent influenza A/H3N2 isolates by modified focus reduction assay. 第 67 回日本ウイルス学会学術集会 2019 年 10 月
- Nakauchi M, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Saito S, Takayama I, Watanabe S, Odagiri T, Kageyama T. Rapid detection of an I38T amino acid substitution in influenza polymerase acidic subunit associated with reduced susceptibility to baloxavir marboxil. 第 67 回日本ウイルス学会学術集会 2019 年 10 月