

改良中和試験法を用いた 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が、近年の A/H3N2 亜型野外流行株は赤血球凝集活性が極めて弱く、赤血球凝集阻止（HI）試験による抗原性解析が行えない状況にある。昨年度までに改良中和試験法であるウイルス感染細胞巢減数試験法（Microneutralizing/Focus Reduction Assay, MN/FRA）を HI 試験代替手法として樹立、A/H3N2 亜型分離株抗原性解析業務に実践導入した。本研究では、抗原性解析試験の精度向上ならびに野外流行株抗原性状の正確な捕捉に資することを目的に、今期間の A/H3N2 亜型分離株について、上述 MN/FRA による抗原性解析試験を実施し、当該抗原性解析手法の高い精度や信頼性を示した。

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

改良変法であるウイルス感染細胞巢減数試験法

（Microneutralizing/Focus Reduction Assay, MN/FRA）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。本研究は、今期 A/H3N2 亜型分離株抗原性解析において MN/FRA を実践実施し、MN/FRA での抗原性解析試験精度の維持・向上およびインフルエンザウイルス A/H3N2 亜型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

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およびその

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

2018/2019 および 2019/2020 シーズンに WHO 協力センターから分与された参照株、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

与提供された野外分離株を SIAT1 細胞で再増殖後、あるいは協力医療機関より提供された臨床検体から当センターで分離したウイルス株を用いた。

3) ウイルス分離・継代

SIAT1 細胞を 25 cm²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、あるいは臨床検体原液を 0.5ml 接種した。ウイルス接種後の培養維持には血清不含、3 μg/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) ウイルス感染力価測定 (Focus assay)

各供試株について、200nM 濃度オセルタミビルを添加した希釈用培地を用いて 10^{0.5} 倍階段希釈列を作製し、前日に SIAT1 細胞を 2.5×10⁴/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。1 時間の吸着反応後、半流動体ゲル Avicel®を各ウェルに添加した。34°C の CO₂ インキュベーター内で 18-20 時間静置培養後、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。各ウェルの focus 数およびそのウェルの希釈倍数に基づいてウイルス感染力価 (Focus forming unit, FFU) を算出した。

5) MN/FRA

200nM 濃度オセルタミビルを添加した希釈用培地を用いて参照血清の 2 倍階段希釈列を作製し、前日に SIAT1 細胞を 2.5×10⁴/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。34°C の CO₂ インキュベ

ター内 18-20 時間静置培養後、被験プレートを固定、細胞透過処理を行い、上述 4) の記載に準じて、酵素免疫抗体法で呈色させた形成 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ことに際し、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

MN/FRA による A/H3N2 亜型分離株の抗原性解析結果を例示する (表 1)。通常、参照抗血清と供試株の HA 遺伝子グループが一致している場合、高い反応性 (抗体価) を示す傾向にあり、両者の抗原性は類似していると判定される。例えば HA 遺伝子グループ 3C.2a1b+131K に属する A/Kanagawa/ZC1805/2019 細胞株に対する抗血清は相同力価 360 を示しており、同等の反応性 (2 倍差以内の抗体価) を示す供試株は A/Kanagawa/ZC1805/2019 細胞株と抗原性が類似しているものと確認できる。一方で由来を同一とするものの、分離増殖基材が異なる A/Kanagawa/ZC1805/2019 鶏卵株については、抗血清の相同力価 2560 に比し、A/Kanagawa/ZC1805/2019 細胞株に対する抗体価は 320 と 1/8 の価を示し、細胞株と鶏卵株での抗原性の相違が認められた。通常インフルエンザワクチンは孵化鶏卵をウイルス増殖基材として、鶏卵株を用いて作製されるため、鶏卵

株と野外分離供試株との抗原的類似性の評価はワクチン株選定作業においても意義が大きい。上述 A/Kanagawa/ZC1805/2019 細胞株と抗原的に類似していた野外分離供試株も A/Kanagawa/ZC1805/2019 鶏卵株との抗原性では相違を認めたため、A/Kanagawa/ZC1805/2019 鶏卵株と抗原的に類似した株でワクチンを製造した場合にはワクチン抗原と野外流行株と

の抗原性が合致しない状況が予想された。別の遺伝子グループである 3C.2a1b+135K+137F に属する A/Kanagawa/ZC1841/2019 株の抗原性解析結果からは、細胞株と鶏卵株とで抗原性の相違度は大きくなく、細胞株、鶏卵株ともに遺伝子グループが同じ野外分離株とは抗原的に類似していると考えられた。

表 1 MN/FRA による A/H3N2 亜型分離株抗原性解析結果の一例

株名	継代歴	検体採取日	参照抗血清								HA 遺伝子グループ	HA アミノ酸置換	備考
			Kansas/14 Cell	Kansas/14 Egg	Singapore/ INFIMH Cell	Kanagawa/ ZC1805 Cell	Kanagawa/ ZC1805 Egg	Kanagawa/ ZC1841 Cell	Kanagawa/ ZC1841 Egg	S.Austr/34 Egg			
参照株													
A/Kansas/14/2017	S3 +SIAT1		80		<20	<20	<20	<20	40	<20	3C.3a	I478M	2019/20 シーズン後半ワクチン株
A/Kansas/14/2017	E7 +1		40	1280	<20	<20	<20	<20	80	20	3C.3a		2019/20 シーズン後半ワクチン株
A/SINGAPORE/9891/16	0019/22/16	HEC03/S013-08AT2	<20	<20	320	80	20	20	<20	20	3C.2a1	R142G*, G479E	
A/KANAGAWA/ZC1805/2019	SIAT 0+2	2019/01/07	<20	<20	160	320	320	40	<20	80	3C.2a1b+131K	V347M, S219F*, Q197R*, E484G	
A/KANAGAWA/ZC1805/2019	EO +6 (Am2A4)	2019/01/07	<20	80	640	1280	2560	80	40	640	3C.2a1b+131K		
A/KANAGAWA/ZC1841/2019	SIAT 0 +2	2019/02/05	<20	<20	80	80	<20	160	320	<20	3C.2a1b+135K+137F	-	
A/KANAGAWA/ZC1841/2019	EO +7 (Am2A5)	2019/02/05	40	20	<20	40	<20	160	640	20	3C.2a1b+135K+137F	G186V*	
A/South Australia/34/2019	ES +1		<20	80	80	160	160	<20	40	640	3C.2a1b+131K	V347M, S219F*	2020 シーズン前半ワクチン株
供試株													
A/HROSHIMA-C/20/2018	MDCK 2 +SIAT2	2018/11/13	<20	<20	320	320	320	20	<20	40			
A/Laos/F2610/2019	MDCK 1 +SIAT1	2019/09/16	<20	<20	160	320	160	20	<20	80	3C.2a1b+131K+197R		
A/YAMANASHI/19162/2019	MDCK 2 +SIAT1	2019/11/08	<20	<20	160	160	160	20	<20	80	3C.2a1b+131K+197R		
A/NIGATA/1050/2019	MDCK 1 +SIAT1	2019/11/25	<20	<20	160	80	160	<20	<20	40	3C.2a1b+131K	V347M	
A/Busan/1236/2019	MDCK SATTI 2 -SATTI	2019/09/23	<20	<20	80	320	160	<20	<20	80	3C.2a1b+131K+197R	R229R>>>G*	
A/Laos/F2595/2019	MDCK 1 +SIAT1	2019/09/16	<20	<20	80	320	160	20	<20	80	3C.2a1b+131K+197R	D53N*, K207R	
A/SAPPORO/58/2019	MDCK 2 +SIAT1	2019/10/24	<20	<20	80	320	160	20	<20	80	3C.2a1b+131K+197R	K207R*, G240G>>>R*	
A/Jeonbuk/1259/2019	MDCK SATTI 2 -SATTI	2019/10/22	<20	<20	80	160	160	<20	<20	80	3C.2a1b+131K+197R	K207R*	
A/YOKOHAMA/210/2019	hCK 1 +SIAT1	2019/11/07	<20	<20	80	160	160	20	<20	40	3C.2a1b+131K+197R		
A/NAGANO/2599/2019	AX-4 +SIAT1	2019/09/12	<20	<20	80	160	160	20	<20	80	3C.2a1b+131K+197R	K207R*	
A/TOKYO/19301/2019	MDCK 3 +SIAT1	2019/10/16	<20	<20	80	80	160	<20	<20	40	3C.2a1b+131K+83E	S143P*	
A/Daejeon/1248/2019	MDCK SATTI 2 -SATTI	2019/10/14	<20	<20	80	80	160	<20	<20	40	3C.2a1b+131K+83E	K83E*, Y94N*, I522M	
A/Daegu/1266/2019	MDCK SATTI 2 -SATTI	2019/10/28	<20	<20	80	80	<20	320	320	<20	3C.2a1b+135K+137F	E50K*	
A/KANAGAWA/AC1526/2019	MDCK SATTI 0 +1	2019/12/15	<20	<20	80	80	<20	160	320	<20	3C.2a1b+135K+137F	E50K*, S9G	
A/Myanmar/1971/2019	SIAT0+1	2019/11/19	<20	<20	80	80	<20	160	320	<20	3C.2a1b+135K+137F		
A/KANAGAWA/AC1827/2019	MDCK SATTI 0 +1	2019/12/23	<20	<20	80	40	<20	160	320	<20	3C.2a1b+135K+137F	E50K*, S9G	
A/Laos/F2602/2019	MDCK 1 +SIAT1	2019/09/16	<20	<20	40	80	<20	320	320	<20	3C.2a1b+135K+137F		
A/HROSHIMA/113/2019	MDCK 2 +SIAT1	2019/11/12	<20	<20	40	80	<20	160	320	<20	3C.2a1b+135K+137F		
A/Myanmar/1644/2019	SIAT0+1	2019/09/09	<20	<20	40	80	<20	160	320	<20	3C.2a1b+135K+137F		
A/SAITAMA/203/2019	MDCK 1 +SIAT1	2019/11/01	<20	<20	40	40	<20	160	320	<20	3C.2a1b+135K+137F	E50K*	
A/YOKOHAMA/237/2019	hCK 2 +SIAT1	2019/11/25	<20	<20	40	40	<20	160	320	<20	3C.2a1b+135K+137F	E50K*, S9G	
A/Gangwon/1256/2019	MDCK SATTI 2 -SATTI	2019/10/22	<20	<20	40	40	<20	160	320	<20	3C.2a1b+135K+137F	E50K*	
A/NIGATA-C/48/2019	ChCn-2 +SIAT1	2019/11/17	<20	<20	40	40	<20	80	20	<20			
A/WAKAYAMA/111/2019	MDCK 1 +SIAT1	2019/12/09	<20	<20	40	<20	<20	40	<20	<20	3C.2a1b+135K+137F		
A/NAGANO/2820/2019	AX-4 +SIAT1	2019/12/05	<20	<20	20	40	<20	80	20	<20	3C.2a1b+135K		
A/WAKAYAMA/98/2019	MDCK 1 +SIAT1	2019/11/23	<20	<20	20	<20	<20	40	20	<20			

斜体数字：参照抗血清相対力価

*抗原部位内アミノ酸

A/Kansas/14/2017 株は遺伝子グループ 3C.3a に属する株であり、2019/20 シーズンワクチン株として選定されたものである。しかし、2019/20 シーズンの国内では遺伝子グループ 3C.3a に属する株の流行はほとんど確認されず、A/Kansas/14/2017 株の細胞株、鶏卵株共に抗血清と野外分離供試株との反応性は非常に乏しかつ

た。野外流行株の抗原性状の趨勢や変遷を捕捉する一助とするために、2018/19 シーズン後半および 2019/20 シーズン前半に流行した野外分離株の抗原性解析を実施し、各参照株との抗原的類似性を評価、集計を行なった (表 2 の 1、2 の 2)。

表2の1 2018/19 シーズン後半に分離された A/H3N2 亜型株の抗原性評価集計結果

2019年2月～8月期分離株の抗原性解析結果

HA遺伝子グループ	参照株との抗原性比較	地域別供試株数				総計	%
		国内	ラオス	ネパール	台湾		
3C.3a	A/Kansas/14/2017 鶏卵株-抗原性類似	0	0	0	0	0	0.0
	A/Kansas/14/2017 鶏卵株-抗原性類似*	0	0	0	0	0	0.0
	A/Kansas/14/2017 鶏卵株-抗原性相違**	0	2	0	0	2	1.6
	A/Kansas/14/2017 鶏卵株-抗原性相違***	107	6	3	4	120	98.4
	計	107	8	3	4	122	100.0
3C.2a1	A/Singapore/INF1MH-16-0019/2016 細胞株-抗原性類似	97	3	3	1	104	75.9
	A/Singapore/INF1MH-16-0019/2016 細胞株-抗原性類似*	19	3	0	2	24	17.5
	A/Singapore/INF1MH-16-0019/2016 細胞株-抗原性相違**	4	2	0	1	7	5.1
	A/Singapore/INF1MH-16-0019/2016 細胞株-抗原性相違***	2	0	0	0	2	1.5
	計	122	8	3	4	137	100.0
3C.2a1b+135N	A/Nagano/2731/2017 細胞株-抗原性類似	87	6	3	1	97	74.0
	A/Nagano/2731/2017 細胞株-抗原性類似*	16	1	0	2	19	14.5
	A/Nagano/2731/2017 細胞株-抗原性相違**	6	1	0	0	7	5.3
	A/Nagano/2731/2017 細胞株-抗原性相違***	7	0	0	1	8	6.1
	計	116	8	3	4	131	100.0
3C.2a1b+135K	A/Myanmar/18M139/2018 細胞株-抗原性類似	79	7	3	2	91	73.4
	A/Myanmar/18M139/2018 細胞株-抗原性類似*	24	1	0	1	26	21.0
	A/Myanmar/18M139/2018 細胞株-抗原性相違**	4	0	0	1	5	4.0
	A/Myanmar/18M139/2018 細胞株-抗原性相違***	2	0	0	0	2	1.6
	計	109	8	3	4	124	100.0
	A/Kanagawa/IC1713/2017 鶏卵株-抗原性類似	1	0	0	0	1	0.8
	A/Kanagawa/IC1713/2017 鶏卵株-抗原性類似*	1	2	2	0	5	4.2
	A/Kanagawa/IC1713/2017 鶏卵株-抗原性相違**	2	0	0	0	2	1.7
	A/Kanagawa/IC1713/2017 鶏卵株-抗原性相違***	102	3	1	4	110	93.2
	計	106	5	3	4	118	100.0

* 相同力価に比べ反応性が4倍低下（1/4抗体価）を示した株
 ** 相同力価に比べ反応性が8倍低下（1/8抗体価）を示した株
 *** 相同力価に比べ反応性が16倍以上低下（1/16以下の抗体価）を示した株

2019年初頭以降、遺伝子グループ3C.3aに属する株はほとんど検出されず、野外流行株のほぼ全ては抗 A/Kansas/14/2017 株血清と極めて乏しい反応性を示した。ワクチン抗原と流行期野外株との抗原性合致度という点においては、2019/20 シーズンワクチン株としての至適性が懸念された。2018/19 シーズン後半では、7割程度の野外分離株が遺伝子グループ3C.2a1 (3C.2a1b+135N、3C.2a1b+135K 等を含む) に属する各参照株抗血清とよく反応性しており、抗原的にこれら3C.2a1参照株と類似しているものと考えられた。2019/20 シーズン前半には遺伝子グループ3C.2a1b+131Kあるいは3C.2a1b+135K+137F に属する株が同程度の割合で野外流行株の主流を占めていた。遺伝子グループ3C.2a1b+131K に属する参照株 A/Kanagawa/ZC1805/2019 と3C.2a1b+135K+137F に属する参照株

A/Kanagawa/ZC1841/2019 とは互いに抗原性が相違しており、それぞれの参照抗血清と高い反応性を示す野外分離株の割合も各遺伝子グループの流行分布割合と関連していた。また、A/Kanagawa/ZC1805/2019 鶏卵株に対する抗血清は多くの野外分離株との乏しい反応性が示された。A/Kanagawa/ZC1841/2019 株では細胞株と鶏卵株で参照抗血清と野外分離株との反応性に大きな差は認められなかった。

D. 考察

本研究では、MN/FRA を用いて2019年から2020年初頭に分離されたインフルエンザ A/H3N2 亜型野外分離株の抗原性解析を実施した。近年の A/H3N2 亜型野外株は遺伝的にも抗原的に多様化が著明であり、至適なワクチン株選定に向けては野外流行株の抗原性状の迅速かつ正確な捕捉が求められている。本期間を通

じて実施された抗原性解析試験からは、分離株の遺伝学的情報から推定される抗原性の変遷

を感度良く捉えられており、本手法を用いた抗原性解析の精度の高さが確認できた。

表2の2 2019/20 シーズン前半に分離された A/H3N2 亜型株の抗原性評価集計結果

2019年9月～2020年1月期分離株の抗原性解析結果

HA遺伝子グループ	参照株との抗原性比較	地域別供試株数				総計	%
		国内	ラオス	ミャンマー	韓国		
3C. 3a	A/Kansas/14/2017 細胞株-抗原性類似	0	0	0	0	0	0.0
	A/Kansas/14/2017 細胞株-抗原性類似*	0	0	0	0	0	0.0
	A/Kansas/14/2017 細胞株-抗原性相違**	0	0	0	0	0	0.0
	A/Kansas/14/2017 細胞株-抗原性相違***	27	7	2	5	41	100.0
	計	27	7	2	5	41	100.0
	A/Kansas/14/2017 鶏卵株-抗原性類似	0	0	0	0	0	0.0
	A/Kansas/14/2017 鶏卵株-抗原性類似*	0	0	0	0	0	0.0
	A/Kansas/14/2017 鶏卵株-抗原性相違**	0	0	0	0	0	0.0
	A/Kansas/14/2017 鶏卵株-抗原性相違***	27	7	2	5	41	100.0
	計	27	7	2	5	41	100.0
3C. 2a1	A/Singapore/INF1MH-16-0019/2016 細胞株-抗原性類似	7	2	0	0	9	22.0
	A/Singapore/INF1MH-16-0019/2016 細胞株-抗原性類似*	9	4	1	4	18	43.9
	A/Singapore/INF1MH-16-0019/2016 細胞株-抗原性相違**	7	1	1	1	10	24.4
	A/Singapore/INF1MH-16-0019/2016 細胞株-抗原性相違***	4	0	0	0	4	9.8
	計	27	7	2	5	41	100.0
3C. 2a1b+135K	A/Myanmar/18M139/2018 細胞株-抗原性類似	10	3			13	86.7
	A/Myanmar/18M139/2018 細胞株-抗原性類似*	1	1			2	13.3
	A/Myanmar/18M139/2018 細胞株-抗原性相違**	0	0			0	0.0
	A/Myanmar/18M139/2018 細胞株-抗原性相違***	0	0			0	0.0
	計	11	4			15	100.0
3C. 2a1b +131K	A/Kanagawa/ZC1805/2019 細胞株-抗原性類似	9	5	0	2	16	39.0
	A/Kanagawa/ZC1805/2019 細胞株-抗原性類似*	7	2	2	2	13	31.7
	A/Kanagawa/ZC1805/2019 細胞株-抗原性相違**	9	0	0	1	10	24.4
	A/Kanagawa/ZC1805/2019 細胞株-抗原性相違***	2	0	0	0	2	4.9
	計	27	7	2	5	41	100.0
	A/Kanagawa/ZC1805/2019 鶏卵株-抗原性類似	0	0	0	0	0	0.0
	A/Kanagawa/ZC1805/2019 鶏卵株-抗原性類似*	0	0	0	0	0	0.0
	A/Kanagawa/ZC1805/2019 鶏卵株-抗原性相違**	4	3	0	0	7	17.1
	A/Kanagawa/ZC1805/2019 鶏卵株-抗原性相違***	23	4	2	5	34	82.9
	計	27	7	2	5	41	100.0
3C. 2a1b +135K +137F	A/Kanagawa/ZC1841/2019 細胞株-抗原性類似	11	2	2	2	17	44.7
	A/Kanagawa/ZC1841/2019 細胞株-抗原性類似*	2	0	0	0	2	5.3
	A/Kanagawa/ZC1841/2019 細胞株-抗原性相違**	5	3	0	0	8	21.1
	A/Kanagawa/ZC1841/2019 細胞株-抗原性相違***	6	2	0	3	11	28.9
	計	24	7	2	5	38	100.0
	A/Kanagawa/ZC1841/2019 鶏卵株-抗原性類似	5	1	2	2	10	38.5
	A/Kanagawa/ZC1841/2019 鶏卵株-抗原性類似*	0	0	0	0	0	0.0
	A/Kanagawa/ZC1841/2019 鶏卵株-抗原性相違**	0	0	0	0	0	0.0
	A/Kanagawa/ZC1841/2019 鶏卵株-抗原性相違***	11	2	0	3	16	61.5
	計	16	3	2	5	26	100.0

* 相同力価に比べ反応性が4倍低下（1/4の抗体価）を示した株
 ** 相同力価に比べ反応性が8倍低下（1/8の抗体価）を示した株
 *** 相同力価に比べ反応性が16倍以上低下（1/16以下の抗体価）を示した株

2019/20 シーズンのワクチン株である A/Kansas/14/2017 の抗原性が同シーズンの野外流行株と相違していることが明らかとなった。しかしながらワクチン接種後ヒト血清を用いた抗体調査の結果からは、被験者群において2019/20 シーズンの野外流行株に対する抗体価

の維持・上昇が相応頻度に観察された。同シーズンにおいて A/H3N2 亜型の大規模流行には至らなかった理由の一つとして推察された。2019/20 シーズンは遺伝子グループならびに抗原性の異なる株が同程度の割合で混在流行していることが明らかになった。今後の流行状況

がどのようになるのかの予測は難しいものの、ワクチンの抗原性と直接に関連する鶏卵株の抗原性状を考慮した場合、遺伝子グループ 3C.2a1b+135K+137F に属する A/Kanagawa/ZC1841/2019 が一定数の野外分離株と抗原的類似性を示しており、当該株あるいは当該株に抗原的に類似した株がワクチン製造候補株に至適であるものと考えられた。

本研究によって実際の分離株抗原性解析業務における MN/FRA の有用性や高い信頼性が示された。当該業務の今後の成果拡大も見込まれる。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、既存の手法ではその性状解析が正確に行えない事態が生じることとも推定される。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今後も持続的に望まれるものである。

E. 結論

MN/FRA を用いた A/H3N2 亜型株抗原性解析試験の高い精度や信頼性を実際の 2018/19、2019/20 シーズンインフルエンザ分離株サーベイランス業務での実践を通じて示した。得られた抗原性解析結果は次期 2020/21 シーズンワクチン推奨株の選定に際しての検討資料として有効に活用された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) K. Nakamura, Y. Harada, H. Takahashi, H. Trusheim, R. Bernhard, I. Hamamoto, A. Hirata-Saito, T. Ogane, K. Mizuta, N. Konomi, Y. Konomi, H. Asanuma, T. Odagiri, M. Tashiro, N. Yamamoto. Systematic evaluation of suspension MDCK cells, adherent MDCK cells, and LLC-MK2 cells for

preparing influenza vaccine seed virus. *Vaccine*. 2019 Oct 8;37(43):6526-6534. doi:10.1016/j.vaccine.2019.08.064.

- 2) E. Takashita, M. Ichikawa, H. Morita, R. Ogawa, S. Fujisaki, M. Shirakura, H. Miura, K. Nakamura, N. Kishida, T. Kuwahara, H. Sugawara, A. Sato, M. Akimoto, K. Mitamura, T. Abe, M. Yamazaki, S. Watanabe, H. Hasegawa, T. Odagiri. Human-to-Human Transmission of Influenza A(H3N2) Virus with Reduced Susceptibility to Baloxavir, Japan, February 2019. *Emerging Infectious Diseases*. 2019 Nov;25(11):2108-2111. doi:10.3201/eid2511.190757.
- 3) 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 Oct;100(10):1345-1349. doi:10.1099/jgv.0.001314.

2. 学会発表

- 1) Kazuya Nakamura, Miki Akimoto, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Hideka Miura, Noriko Kishida, Aya Sato, Tomoko Kuwahara, Emi Takashita, Hideki Hasegawa, Takato Odagiri and Shinji Watanabe. 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
- 2) Shinji Watanabe, Kazuya Nakamura, Noriko Kishida, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Emi Takashita, Tomoko Kuwahara, Aya Sato, Miki Akimoto, Hideka Miura, Rie Ogawa, Hiroko Morita, Hiromi Sugawara, Takato Odagiri, Hideki Hasegawa, 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
- 3) Emi Takashita, Hiroko Morita, Rie Ogawa, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Hideka Miura, Kazuya Nakamura, Noriko Kishida, Tomoko Kuwahara, Hiromi Sugawara, Aya Sato, Miki Akimoto, Keiko Mitamura, Takashi Abe, Masataka Ichikawa, Masahiko Yamazaki, Shinji Watanabe, Takato Odagiri, Hideki Hasegawa, The Influenza Virus 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
- 4) 高下恵美、藤崎誠一郎、白倉雅之、中村一哉、岸田典子、桑原朋子、三田村敬子、安倍隆、市川正孝、山崎雅彦、渡邊真治、小田切孝人、長谷川秀樹：2018/2019 シーズンにおける新規抗インフルエンザ薬バロキサビル耐性変異ウイルスの検出状況 第 51 回日本小児感染症学会学術集会 2019 年 10 月
- 5) Kazuya Nakamura, Miki Akimoto, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Hideka Miura, Noriko Kishida, Aya Sato, Tomoko Kuwahara, Emi Takashita, Hideki Hasegawa, Takato Odagiri and Shinji Watanabe. Improved accuracy of antigenic characterization of recent influenza A/H3N2 isolates by modified focus reduction assay. Options for the Control of Influenza X (Singapore), Aug/2019
- 6) Michiko Ujie, Masaki Imai, Kazuya Nakamura, Shinji Watanabe, Yoshihiro Kawaoka. Long-term Cultured Human Lung Adenocarcinoma A549 Cells Show Enhanced Susceptibility to Human Influenza A Viruses. Options for the Control of Influenza X (Singapore), Aug/2019
- 7) Tomoko Kuwahara, Emi Takashita, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Kazuya Nakamura, Noriko Kishida^a, Hitoshi Takahashi^a, Kayoko Sato^a, Shinji Watanabe^a and Takato Odagiri^a Biological significance of neuraminidase of egg-adapted influenza A(H3N2) virus without amino acid substitutions in the antigenic sites of its hemagglutinin. Options for the Control of Influenza X (Singapore), Aug/2019
- 8) Noriko Kishida, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Hitoshi Takahashi, Hideki Asanuma, Kazuya Nakamura, Reiko Saito, Takato Odagiri, Shinji Watanabe. Characterization of influenza A(H1N1)pdm09 variants selected with human antisera collected in the 2017/18 season. Options for the Control of Influenza X (Singapore), Aug/2019
- 9) Chiharu Kawakami, Seiya Yamayoshi, Miki Akimoto, Kazuya Nakamura, Hideka Miura, Seiichiro Fujisaki, David J. Pattinson, Kohei Shimizu, Hiroki Ozawa, Tomoko Momoki, Miwako Saikusa, Atsuhiko Yasuhara, Shuzo Usuku, Ichiro Okubo, Takahiro Toyozawa, Shigeo Sugita, Derek J. Smith, Shinji Watanabe, Yoshihiro Kawaoka. Genetic and antigenic characterisation of influenza A(H3N2) viruses isolated in yokohama during the 2016/17 and 2017/18 influenza seasons. Options for the Control of Influenza X (Singapore), Aug/2019
- 10) Emi Takashita, Rie Ogawa, Hiroko Morita,

Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura,
Hideka Miura, Kazuya Nakamura, Noriko
Kishida, Tomoko Kuwahara, Hiromi Sugawara,
Aya Sato, Miki Akimoto, Keiko Mitamura,
Takashi Abe, Masataka Ichikawa, Masahiko
Yamazaki, Shinji Watanabe, Takato Odagiri,
The Influenza Virus 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. Options
for the Control of Influenza X (Singapore),
Aug/2019