

**厚生労働科学研究費補助金**

**新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業**

**WHO 世界インフルエンザ監視対応ネットワークを駆使したわが国の  
インフルエンザ株サーベイランスシステムの強化と基盤整備、  
ワクチン株の検索および国際協力に関する研究**

**平成 2 6 年度 総括・分担研究報告書**

**研究代表者 小田切孝人**

**平成 2 7 年 (2015) 3 月**



# 目 次

## I. 総括研究報告書

- WHO 世界インフルエンザ監視対応ネットワークを駆使したわが国のインフルエンザ株  
サーベイランスシステムの強化と基盤整備、ワクチン株の検索および国際協力に関する研究  
研究代表者： 小田切孝人 \_\_\_\_\_ P1

## II. 分担研究報告書

1. 抗インフルエンザ薬耐性株発生状況の迅速な把握および情報提供および地方衛生研究所  
ならびに海外インフルエンザセンターとの連携強化に関する研究  
渡邊真治 \_\_\_\_\_ P9  
研究協力者：高下恵美
  2. ワクチン候補株の免疫原性、適正の検討  
浅沼秀樹 \_\_\_\_\_ P13
  3. インフルエンザ株サーベイランスにおける H3N2 亜型株の抗原性解析法の改良と導入  
中村一哉 \_\_\_\_\_ P21
  4. インフルエンザウイルス分離株についての遺伝子解析  
藤崎誠一郎 \_\_\_\_\_ P25  
研究協力者：白倉雅之
  5. ワクチン製造用 MDCK 細胞でのウイルス分離効率、適性の解析  
原田勇一 \_\_\_\_\_ P27
  6. MDCK (NIID-MDCK) 細胞で分離したワクチン候補種ウイルスの遺伝的および  
抗原的安定性の評価  
高橋仁 \_\_\_\_\_ P31
- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 \_\_\_\_\_ P35

## 1. 總括研究報告書



## WHO 世界インフルエンザ監視対応ネットワークを駆使したわが国の インフルエンザ株サーベイランスシステムの強化と基盤整備、 ワクチン株の検索および国際協力に関する研究

研究代表者 小田切孝人

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・センター長

**研究要旨** 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( 感染研インフルセンター )は、WHO 世界インフルエンザ監視対応ネットワーク(WHO-GISRS)の中核メンバーであるインフルエンザ協力センター ( WHO Collaborating Center, WHO-CC ) に指定されており、北京の WHO-CC とともに東アジア地域のインフルエンザ対策および株サーベイランスを牽引し、当該地域で起こる季節性および動物由来インフルエンザウイルスへのヒト感染の発生と動向監視およびウイルスリスク評価、さらには流行株の収集と性状解析を担当している。周辺諸国のインフルエンザセンターへのサーベイランスキットの無償供与、PCR 検査および株サーベイランス技術支援等の国際貢献を遂行することにより、WHO が進める世界インフルエンザ施策に直接的に参画し議決権を確保している。新型インフルエンザ発生時には WHO-CC として原因ウイルスの情報や分離ウイルスが優先的に供与され、これにより、わが国の新型インフルエンザ対策を迅速に進めることが可能となっている。また、季節性インフルエンザワクチン施策においても、海外からワクチン製造株を無償で供与される権利を確保していることから、わが国のインフルエンザワクチン株選択において、WHO の指針や諸外国の動向を適宜取り入れることができ、諸外国の動向から取り残されずにすみ、わが国のインフルエンザ対策へ直接的な貢献となっている。また、WHO-CC 機能を維持することにより、WHO の政策策定の際にはわが国や東アジア諸国にとって不利益な決定がなされないように監視と提言をし続けることができる。一方、国内のインフルエンザ対策においては、国内インフルエンザセンターとして全国地方衛生研究所(地衛研)と連携して全国各地から流行株を収集し、それらの性状を分析し、週単位で情報還元を行い、さらに、次シーズン向けのワクチン株の検索と選定を行った。さらに、鳥インフルエンザ A(H5N8)の国内侵入および養鶏場でのアウトブレイクにおいては、現行の PCR 検査系の再確認と地衛研への情報提供を適宜行い、新型インフルエンザ対策の初動対応にも迅速に対応した。さらに、次世代ワクチンである細胞培養インフルエンザワクチンの実用化に向けた開発研究への支援も行い、導入への基盤整備を行った。

### A . 研究組織

研究代表者

小田切孝人

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  
センター長

浅沼秀樹

エンザウイルス研究センター  
室長

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

研究分担者

渡邊真治

国立感染症研究所インフル

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
藤崎誠一郎	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 研究員
原田勇一	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
高橋仁	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

## B. 研究目的

WHO は、世界 143 か所の National Influenza Center( NIC )と 6 か所の WHO-CC との連携からなる世界インフルエンザ監視対応ネットワーク(GISRS)を構築している。感染研インフルセンターは、東アジア地域を担当する WHO-CC の一つとして、季節性及び新型インフルエンザウイルスの流行監視と当該地域から分離株の収集、分析および情報発信を担ってきた。毎年の WHO インフルエンザワクチン推奨株の選定においては、当センターは、わが国および東アジア地域の流行株情報がワクチン株選定に反映されるよう WHO へ情報提供してきた。

一方、2003 年から家禽やヒトでの感染が続いている H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルス対策においては、感染研インフルセンターは、GISRS をとおして適宜情報収集し、中東・エジプトおよび東南アジア諸国から最新の H5N1 分離株を入手し、ワクチン種株の開発や H5N1 備蓄ワクチンの更新など、わが国の新型インフルエンザ対策に貢献してきた。さらに、2013 年に中国で H7N9 鳥インフルエンザウイルスのヒト感染事例においては、中国 CDC からウイルス遺伝子情報をいち早く入手し、ウイルスリスク評価およびパンデミックリスク評価を行い、国内外の関係機関へ情報を提供した。この分析情報は、WHO の H7N9 ウイルスリスク評価ガイドライン作成の基盤情報となり、タ

イムリーな国際貢献として高く評価されている。

本研究では、季節性および新型インフルエンザ株サーベイランス体制の維持、強化のため国内においては地方衛生研究所、海外においては周辺諸国よび GISRS の NIC と連携し、流行株の収集と解析力を補強し、より適切なワクチン株選定に貢献する。また、薬剤耐性株サーベイランスを技術的に支援する。これらの活動をとおして、WHO のインフルエンザ対策に直接的に参画し、わが国のインフルエンザ対策にもそれらの政策を反映させ、国際的な施策から遅れを取らないようにする。また、細胞培養インフルエンザワクチンの実用化に向けて、本研究では、わが国の細胞培養季節性ワクチン導入への基礎的な研究により、実用化への基盤整備の支援を行う。

## C. 研究方法

- 1) 株サーベイランスに用いるウイルス分離用細胞株  
MDCK 細胞およびヒト型レセプターを過剰発現させた MDCK-SIAT1 細胞( SIAT1 )を用いた。
- 2) 供試ウイルス株  
2013/2014 および 2014/2015 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、感染症サーベイランスシステム NESID に登録された分離株の約 10% について収集。また、周辺諸国( モンゴル、ミャンマー、台湾、ラオス等 )からも流行株を収集。
- 3) ウイルス分離の抗原性、遺伝子解析  
ワクチン株に対する流行株の抗原性の乖離度合いをフェレット感染血清を用いて、赤血球凝集抑制( HAI )試験で実施。また、H3N2 ウイルスについては、適宜、反応液に最終濃度 20nM のオセルタミビルを添加し、正確な HAI 試験を実施。また、被験ウイルスによっては、マイクロ中和試験

を用いた。

- 4) 流行株の進化系統樹解析により、前シーズンからの遺伝子分別トレンドを把握した。また、抗ウイルス薬への感受性試験は、オセルタミビル、ザナミビル、ペラミビルおよびラニナミビルに対する感受性試験を実施し、IC50 値を算出した。さらにウイルスの NA 遺伝子解析により、既知の薬剤耐性マーカーの有無を検索した。
- 5) 感染防御実験  
2011/12 シーズンの H3N2 亜型 A/Victoria/361/2011 ワクチン類似株から、不活化抗原を作製し、フェレットに2回接種し、免疫原性、抗体応答および感染防御を検討した。
- 6) 品質管理された MDCK 細胞 (NIID-MDCK) を用いた細胞培養ワクチン開発用種ウイルスの回収。2010/11、2012/13、2013/14 シーズンにインフルエンザ様疾患を呈した患者より採取された臨床検体から、NIID-MDCK 細胞を用いてウイルス分離回収を行った。それらを同細胞で3代目から5代目まで継代し、ウイルスの遺伝子および抗原性の解析を既報に従って実施した。

## D. 結果

### 1. インフルエンザ株サーベイランス体制の連携強化と WHO ワクチン株選定への直接的な参画

国内流行株の収集と解析は、地衛研との連携により、毎年 5000 ~ 7000 株が国内では分離検出される。そのうちの約 10% に相当する分離株について、地域的な偏りが生じないようにランダムに選定して、感染研インフルセンターでフェレット感染抗血清を用いて詳細な抗原解析、遺伝子進化系統樹解析、薬剤感受性試験を実施した。これにより、国内流行株の性状、ワクチン株と抗原性の違い等について評価を行い、次期ワクチン候補株の検索と選定のための科

学的な成績を提供した。

一方、海外の流行株については、WHO-CC として、日本周辺諸国の NIC (韓国、モンゴル、ミャンマー、ラオス、ネパール、台湾) へ抗原抗体サーベイランスキットを配布し、株サーベイランスの技術支援を行った。この国際貢献を背景に、海外 NIC (今シーズンはモンゴル、ミャンマー、台湾、ラオス等) から分離株の供与を依頼し、入手できたウイルスについては国内分離株と同様な解析を実施し、成績はウイルス供与国へ還元した。

感染研インフルセンターで得られた国内外の流行株の解析成績は、WHO ワクチン株選定会議へ提供し、日本および東アジア地域の情報が反映されたワクチン株の選定となるよう、WHO のワクチン株選定に直接的に参画した。

### 2. 国内インフルエンザワクチン株選定への支援

WHO ワクチン株選定会議へ WHO-CC 東京センター長として参加していることから、世界中のインフルエンザ流行株の解析情報が入手できる。また、適切なワクチン候補株を適時に優先供与される。この利点を基盤にして、国内流行株の解析状況、ワクチン候補株の準備状況、WHO ワクチン推奨株の情報など、入手できる全ての成績と情報を国内ワクチン株の選定会議に提供した。これによって、次シーズン向けの国内ワクチン株選定に貢献した。

### 3. 国内インフルエンザ株サーベイランス体制の見直しと連携強化

最近の A(H3N2) 流行株は、ウイルス分離に用いている通常の MDCK 細胞で培養すると NA 遺伝子に変異が入り、NA 蛋白にも赤血球凝集活性が備わり、これによって正確な抗原解析ができない状況になっている。このため、遺伝子変異が起こらない特殊な MDCK 細胞で臨床検体からウイルス分離する必要性が出てきた。このため、地衛研がサーベイランスで収集した臨床検体を感染研にも分与できる仕組みを厚労省結核感染症課の支援のもとに整備し



た。すなわち、株サーベイランスは感染症法第15条および予防接種法第23条第4項に基づく国の事業として実施していることから、感染研への臨床検体の分与には倫理審査は不要で、インフォームドコンセントも不要である。この確認と地衛研との情報共有により、地衛研からの分与協力も得られることになり、分離株と臨床検体の供与基盤が国内サーベイランスで整備された。

4．株サーベイランスの実施を円滑にするため、地衛研担当者への情報提供、技術的問題点、改善への相談、支援を行った。また、海外からの研修生への技術指導、共同研究の協議等を実施した。

5．2013/14 および 2014/15 シーズンに国内で分離されたインフルエンザウイルスについて遺伝子解析を行った。A(H1N1)pdm09、A(H3N2)、B型山形系統、ヴィクトリア系統ウイルスについて抗原性および薬剤耐性に関するアミノ酸の変化を解析した。

6．ワクチン接種前後のペア血清を入手し、ワクチンの有効性に関する評価を実施。この成績はWHOおよび国内ワクチン株選定の参考資料として活用された。

7．株サーベイランスで検出された変異株等の重点解析株について、フェレット抗血清を作製し、そのリスク評価を行った。また、細胞培養系で製造した季節性インフルエンザワクチンの免疫誘導能および防御効果を検討するため、臨床検体から MDCK 細胞で分離し増殖させた H3N2 株の不活化抗原を作製し、フェレットに接種後、免疫応答および防御効果を検討した。

8．細胞培養季節性インフルエンザワクチンの開発を見据えて、過去2シーズン中に採取された臨床検体を確保する基盤を整備し、臨床検体からのウイルスの回収とその性状について検討した。

9．ワクチン製造向けに安全性の検証された細胞(NIID-MDCK細胞)で分離したウイルスについて、増殖性、ウイルス抗原性の安定性等の

検証を行い、本細胞の有用性を検討した。

10．NIID-MDCK細胞から臨床検体を用いて分離継代した各型・亜型ウイルス株は、多くの株が流行の主流となっている株と抗原的および遺伝的に同等であり、ワクチン製造用ウイルス株として使用可能であることを確認した。

## E．考察

改正感染症法が平成28年度から施行され、これによって法的にサーベイランス体制の強化が図られる。現行の国内株サーベイランス体制を維持しつつ、流行株の性状変化に応じた改善をし、地衛研との連携をより強固なものにしなければならない。また、海外のNICへの情報提供、技術支援を継続し、周辺諸国での流行状況も正確に把握し、WHOへ情報提供を継続する。これによって、新型ウイルスとなる可能性を秘めたウイルス発生の際にはワクチン製造候補株を優先的に確保でき、また、WHOインフルエンザ施策の実施において発言権を維持できる。これは、国内インフルエンザ対策の推進とワクチン施策の実施にとって、直接的に影響するので、今後も現行の役割を維持し、国際貢献を継続する。

細胞培養季節性インフルエンザワクチンが5年以内を目途に実用化され、本格導入の方針で準備が進められている。本研究でその基礎研究部分を支援した。感染研で開発したワクチン製造用種ウイルス分離用の細胞が使用可能であることが確認されたことから、今後は細胞培養ワクチン研究班で、実用化まで開発研究が進められることを期待する。

## F．結論

- ・国内地衛研および周辺諸国のNICと連携して、インフルエンザ株サーベイランスを実施。
- ・サーベイランス事業で収集した臨床検体を感染研へ供与する枠組みができた。
- ・細胞培養季節性インフルエンザワクチンの導入に向けての基盤整備、初期研究開発の支援を

実施。感染研開発の精度管理された MDCK 細胞は、ワクチン製造用種ウイルスの供給に有効であることを確認した。

## G . 研究発表

### 1 . 論文発表

- 1) Barr IG, Russell C, Besselaar TG, Cox NJ, Daniels RS, Donis R, Engelhardt OG, Grohmann G, Itamura S, Kelso A, McCauley J, Odagiri T, Schultz-Cherry S, Shu Y, Smith D, Tashiro M, Wang D, Webby R, Xu X, Ye Z, Zhang W; Writing Committee of the World Health Organization Consultation on Northern Hemisphere Influenza WHO recommendations for the viruses used in the 2013-2014 Northern Hemisphere influenza vaccine: Epidemiology, antigenic and genetic characteristics of influenza A(H1N1)pdm09, A(H3N2) and B influenza viruses collected from October 2012 to January 2013. *Vaccine*. 2014 Aug 20;32(37):4713-25
- 2) Yamanaka A, Iwakiri A, Yoshikawa T, Sakai K, Singh H, Himeji D, Kikuchi I, Ueda A, Yamamoto S, Miura M, Shioyama Y, Kawano K, Nagaishi T, Saito M, Minomo M, Iwamoto N, Hidaka Y, Sohma H, Kobayashi T, Kanai Y, Kawagishi T, Nagata N, Fukushi S, Mizutani T, Tani H, Taniguchi S, Fukuma A, Shimojima M, Kurane I, Kageyama T, Odagiri T, Saijo M, Morikawa S: Imported case of acute respiratory tract infection associated with a member of species nelson bay orthoreovirus. *PLoS One*. 2014 Mar 25;9(3):e92777
- 3) Adam Meijer, Helena Rebelo-de-Andrade, Vanessa Correia, Terry Besselaar, Renu Drager Dayal, Alicia Fry, Vicky Gregory, Larisa Gubareva, Tsutomu Kageyama, Angie Lackenby, Janice Lo, Takato Odagiri, Dmitriy Pereyaslov, Marilda M. Siqueira, Emi Takashita, Masato Tashiro, Dayan Wang, Sun Wong, Wenqing Zhang, Rod S. Daniels, Aeron C. Hurt: Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2012-2013 *Antiviral Research*. 2014, Oct;110:31-41
- 4) Takashita E, Ejima M, Itoh R, Miura M, Ohnishi A, Nishimura H, Odagiri T, Tashiro M.: A community cluster of influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting cross-resistance to oseltamivir and peramivir in Japan, November to December 2013. *Euro Surveill*. 2014 Jan 9;19(1)
- 5) Yasuko Tsunetsugu-Yokota, Kengo Nishimura, Shuhei Misawa, Mie Kobayashi-Ishihara, Hitoshi Takahashi, Ikuyo Takayama, Kazuo Ohnishi, Shigeyuki Itamura, Hang L. K. Nguyen, Mai T. Q. Le, Giang T. Dang, Long T. Nguyen, Masato Tashiro, Tsutomu Kageyama.: Development of a sensitive novel diagnostic kit for the highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus. *BMC Infect Dis*. 3;14(1):362-, 2014

### 2 . 学会発表

- 1) 小田切孝人 A(H7N9)インフルエンザとワクチン開発 第 55 回臨床ウイルス学会

- 2014年6月 札幌
- 2) 高下恵美、江島美穂、藤崎誠一郎、横山勝、中村一哉、白倉雅之、菅原裕美、佐藤彩、佐藤裕徳、小田切孝人、全国地方衛生研究所. 2013/14シーズンにおけるNA阻害剤耐性A(H1N1)pdm09ウイルスの地域流行. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月10-12日 横浜.
  - 3) 酒井宏治、網康至、田原舞乃、久保田耐、安楽正輝、中島典子、高下恵美、関塚剛史、駒瀬勝啓、信澤枝里、小田切孝人、前中勝実、黒田誠、長谷川秀樹、河岡義裕、田代真人、竹田誠 II型膜貫通型セリンプロテアーゼ TMPRSS2 は HA 開裂部位に mono-basic なアミノ酸配列をもつ A 型インフルエンザウイルスに対する肺内必須活性化酵素である 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月10-12日 横浜.
  - 4) 内藤忠相、齋藤峰輝、信澤枝里、小田切孝人、田代真人 インフルエンザウイルスのゲノム変異導入率を生業する RNA ポリメラーゼの機能領域 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月10-12日 横浜.
  - 5) 川上千春、高下恵美、藤崎誠一郎、江島美穂、七種美和子、宇宿秀三、小田切孝人 過去3シーズンに混合流行した B 型インフルエンザウイルスの遺伝子解析 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月10-12日 横浜.
  - 6) 浅沼秀樹、相内章、許斐奈美、佐藤佳代子、田代真人、小田切孝人 フェレットに対する免疫原性を基盤とした細胞培養ワクチン用種株選定法の確立 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月10-12日 横浜.
  - 7) A Yoppy R Candra, Anna L Poetranto, Aldise M Nastri, Edith F Puruhito, 横田(恒次)恭子, 西村 研吾, 影山 努, 高原 悠佑, 堀田 博, 清水 一史. Comparative analysis for the detection of avian influenza H5N1 virus by using a novel luminescence analyzer(POCube) and real-time RT-PCR. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月 横浜
  - 8) 高山 郁代, Nguyen Trung Hieu, 中内 美名, 高橋 仁, Nguyen Thanh Long, 小田切 孝人, 田代 真人, 影山 努. 2014年にベトナムでヒト感染が確認された高病原性鳥インフルエンザ A(H5N1)ウイルスの遺伝子解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月 横浜
  - 9) 齊藤慎二、Elly van Riet、相内章、鈴木忠樹、池田千將、伊藤良、泉池恭輔、高橋宣聖、浅沼秀樹、小田切孝人、田代真人、田村慎一、竹山春子、長谷川秀樹 高病原性鳥インフルエンザ A(H5N1)ウイルスの経鼻不活化全粒子ワクチンにより誘導されたヒトモノクローナル抗体の特異性 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月 横浜
  - 10) 長谷川秀樹、相内章、鈴木忠樹、川口晶、田村慎一、小田切孝人、田代真人、倉田毅 経鼻不活化全粒子インフルエンザワクチンと現行皮下接種ワクチンの抗体応答の比較 第18回日本ワクチン学会学術集会. 2014年12月 福岡
  - 11) 齊藤慎二、Elly van Riet、相内章、鈴木忠樹、大原有樹、池田千將、伊藤良、泉池恭輔、高橋宣聖、浅沼秀樹、小田切孝人、田代真人、田村慎一、竹山春子、長谷川秀樹 経鼻不活化全粒子インフルエンザワクチンにより誘導されたヒトモノクローナル抗体の特性解析 第18回日本ワクチン学会学術集会. 2014年12月 福岡
  - 12) 相内章、鈴木忠樹、齊藤慎二、田村慎一、幸義和、小田切孝人、田代真人、清野宏、長谷川秀樹 経鼻インフルエンザワクチンの動態と抗体応答 第18回日本ワクチン学会学術集会. 2014年12月 福岡

- チン学会学術集会. 2014年12月 福岡
- 13) 佐藤佳代子、浅沼秀樹、高橋宣聖、阿戸学、小田切孝人、板村繁之 剤形の異なるインフルエンザワクチンにより誘導される抗体の性状に対する TLR アゴニストの影響 第18回日本ワクチン学会学術集会. 2014年12月 福岡

## **H. 知的財産権の出願・登録状況**

### 1. 特許取得

無し

### 2. 実用新案登録

無し

### 3. その他

無し

WHO世界インフルエンザ監視対応ネットワークを駆使したわが国のインフルエンザ株サーベイランスシステムの強化と基盤整備、ワクチン株の検索および国際協力に関する研究

季節性および新型インフルエンザ株サーベイランスおよび薬剤耐性株サーベイランス、ワクチン候補株の検索、流行株のリスク評価に関する研究（統括：小田切）

国内外の流行株の収集と抗原変異株のモニター（中村）

薬剤耐性株の網羅的スクリーニングおよび薬剤感受性試験、新規薬剤感受性試験系の構築（渡邊）

国内外の流行株の遺伝子解析、変異遺伝子、薬剤耐性遺伝子の同定・ヒト型レセプター、鳥型レセプター識別系の構築（藤崎）

ワクチン接種前後のペア血清を用いたワクチン免疫原性および流行株との交叉反応性をもとにしたワクチンの有効性の評価研究（中村、藤崎、浅沼）

地衛研および周辺諸国のNICへ株サーベイランス技術支援・研修（中村、渡邊、藤崎、原田、高橋、浅沼）

全国地衛研および海外NICへの抗原抗体サーベイランスキットの開発と国内外のサーベイランス実施機関への供与（中村、渡邊、浅沼）

WHOインフルエンザ協力センターとしての役割、施策の実施

国内外から収集した分離株からワクチン候補株の検索と特定

WHOワクチン株選定会議および国内ワクチン株選定会議への情報提供とワクチン株選定への貢献

オリジナル臨床検体からのワクチン株の確保および戦略検討

GMP準拠施設で品質管理基準を満たしたMDCK細胞（MDCK-NIID細胞）で流行株からワクチン候補種ウイルスの分離、培養および増殖性の評価（原田）

MDCK-NIID細胞分離のワクチン候補種ウイルスの遺伝的安定性、抗原的安定性の評価（高橋）

動物モデル（フェレット）を用いたワクチン候補種ウイルスの免疫原性の評価研究（浅沼）

細胞培養季節性インフルエンザワクチン株の選定プロセスの整備と戦略策定（小田切）

## 1. 分担研究報告書



## 抗インフルエンザ薬耐性株発生状況の迅速な把握および情報提供 および地方衛生研究所ならびに海外インフルエンザセンターとの 連携強化に関する研究

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

研究協力者 高下 恵美

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** 抗インフルエンザ薬耐性株の発生とその流行状況を迅速に把握し、その情報を発信することは、薬剤の種類を考慮するなどの対策を早急に行えるため、公衆衛生上非常に重要であり、本研究により遂行することができた。また、国内外のインフルエンザ株サーベイランスを円滑に実行することは、インフルエンザウイルスの流行状況を把握するために不可欠である。本研究により地方衛生研究所、海外インフルエンザセンターとのサーベイランスについての情報交換、情報共有を行うことができた。今後もこれらを継続していくことが重要である。

### A. 研究目的

インフルエンザの治療には主に、インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ（NA）蛋白質を標的とする NA 阻害剤（オセルタミビル、ペラミビル、ザナミビル、ラニナミビル）が使用されている。世界各国で分離されるインフルエンザウイルスのほとんどは上記の抗インフルエンザ薬に対して感受性であるが、散発的に、NA 蛋白質に特徴的なアミノ酸変異（H275Y）をもつオセルタミビル・ペラミビル耐性ウイルスが検出されている。日本を含む東アジア地域における薬剤耐性ウイルスの発生状況の迅速な把握および速やかな情報提供が本研究の目的である。

また、WHO 世界インフルエンザ監視対応ネットワークを通して得られた技術的な問題点やその改善方法等を含む情報を株サーベイランスに役立てるために、速やかに地方衛生研究所（地衛研）へ提供し共有することが目的である。さらに、海外（東および東南アジアなど）との株サーベイランスの強化を図るために、技

術支援や情報共有することが目的である。

### B. 研究方法

日本、ラオス、ネパール、モンゴル、台湾およびベトナムの分離株について、MUNANA 基質を用いた蛍光法により、オセルタミビル、ザナミビル、ペラミビルおよびラニナミビルに対する感受性試験を実施し、IC<sub>50</sub> 値を算出した。さらにウイルスの NA 遺伝子解析により、既知の薬剤耐性マーカーの有無を検索した。また、国内の A(H1N1)pdm09 株については、地衛研において、NA 遺伝子解析による H275Y 耐性変異のスクリーニングを行った。

地方衛生研究所とのやり取りは、E メールあるいは電話で行った。海外とのやり取りは、E メールをはじめ、研修で国立感染症研究所（感研）を訪問中の研究者と直接協議を行った。

（倫理面への配慮）

該当無し



## C. 研究結果

国内株はA(H1N1)pdm09 ウイルス 2,531 株、A(H3N2)ウイルス 326 株および B 型ウイルス 317 株、また、海外株は A(H1N1)pdm09 ウイルス 74 株、A(H3N2)ウイルス 46 株および B 型ウイルス 36 株について解析を行った。その結果、国内では北海道を中心にオセルタミビル・ペラミビル耐性 A(H1N1)pdm09 ウイルスが 105 株検出され、検出率は 4.1%であった。A(H3N2)ウイルスおよび B 型ウイルスでは耐性株は検出されなかった。また海外株はすべて感受性株で耐性株は検出されなかった。解析結果は感染研ウェブサイト上で毎週公表し、自治体や医療機関に情報提供を行った。また、各国のナショナルインフルエンザセンターに対して随時結果を報告した。

地衛研への情報提供に関しては、例えばサーベイランスで使用されているキットの保存方法の改善策を提案したり、A(H3N2)ウイルスの性状がこれまでと違ってきている実情を鑑みウイルス分離における情報共有を図り、地衛研での現状を把握したりした。海外との連携として、感染研を訪問中の研修生とは、日本と現地とのサーベイランスの情報交換を行い、技術的な問題点の改善策を提案した。また、WHO 協力センターとして参照ウイルスやキットの提供を行い、相手国のサーベイランスの支援を行った。

## D. 考察

国内におけるオセルタミビル・ペラミビル耐性ウイルスの検出率は、過去 5 シーズンにわたって 0.5-2%前後であったが、2013/14 シーズンには 4.1%に達した。北海道内における耐性ウイルスの検出率は 28%、北海道外では 2.8%となり、北海道内で耐性ウイルスが地域流行したと考えられる。2013/14 シーズンにおける耐性ウイルスの検出率の上昇は、米国および中国でも報告されており、今後の動向に注意が必要である。

地衛研との情報共有により、日本でのサーベイランスが円滑に進められていると思われる。また海外との情報交換、支援を通して、近隣諸国との信頼関係が構築され、インフルエンザ株サーベイランスにおける国際協力がなされていると考えられる。

## E. 結論

北海道を中心にオセルタミビル・ペラミビル耐性 A(H1N1)pdm09 ウイルスの地域流行が起こった。耐性ウイルスの検出は同時期に海外でも増加しており、今後も耐性ウイルスの監視を継続する必要がある。

国内外のインフルエンザ株サーベイランスを継続して円滑に進めるために、情報提供・情報共有は大変重要である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Watanabe T, Kawakami E, Shoemaker JE, Lopes TJ, Matsuoka Y, Tomita Y, Kozuka-Hata H, Gorai T, Kuwahara T, Takeda E, Nagata A, Takano R, Kiso M, Yamashita M, Sakai-Tagawa Y, Katsura H, Nonaka N, Fujii H, Fujii K, Sugita Y, Noda T, Goto H, Fukuyama S, Watanabe S, Neumann G, Oyama M, Kitano H, Kawaoka Y. Influenza virus-host interactome screen as a platform for antiviral drug development. *Cell Host Microbe* 16:795-805, 2014.
- 2) Watanabe T, Zhong G, Russell CA, Nakajima N, Hatta M, Hanson A, McBride R, Burke DF, Takahashi K, Fukuyama S, Tomita Y, Maher EA, Watanabe S, Imai M, Neumann G, Hasegawa H, Paulson JC, Smith DJ, Kawaoka Y. Circulating avian influenza viruses closely related to the 1918 virus

- have pandemic potential. *Cell Host Microbe* 15:692-705, 2014.
- 3) Katsura H, Piao Z, Iwatsuki-Horimoto K, Akeda Y, Watanabe S, Horimoto T, Oishi K, Kawaoka Y. A bivalent vaccine based on a replication-incompetent influenza virus protects against *Streptococcus pneumoniae* and influenza virus infection. *J Virol* 88:13410-13417, 2014.
  - 4) Watanabe T, Watanabe S, Maher EA, Neumann G, Kawaoka Y. Pandemic potential of avian influenza A (H7N9) viruses. *Trends Microbiol* 22:623-631, 2014.
  - 5) Meijer A, Rebelo-de-Andrade H, Correia V, Besselaar T, Drager-Dayal R, Fry A, Gregory V, Gubareva L, Kageyama T, Lackenby A, Lo J, Odagiri T, Pereyaslov D, Siqueira MM, Takashita E, Tashiro M, Wang D, Wong S, Zhang W, Daniels RS, Hurt AC. Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2012-2013. *Antiviral Res.* 2014 Oct;110:31-41.
  - 6) Takashita E, Meijer A, Lackenby A, Gubareva L, Rebelo-de-Andrade H, Besselaar T, Fry A, Gregory V, Leang SK, Huang W, Lo J, Pereyaslov D, Siqueira MM, Wang D, Mak GC, Zhang W, Daniels RS, Hurt AC, Tashiro M. Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2013-2014. *Antiviral Res.* in press.
- 2 . 学会発表
- 1) Takashita E, Ejima M, Fujisaki S, Kishida N, Xu H, Imai M, Kim N, Sato A, Sugawara H, Itoh R, Doi T, Tashiro M, Odagiri T. A community cluster of influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting cross-resistance to oseltamivir and peramivir in Japan. 3rd isirv-AVG Conference; Influenza and other Respiratory Virus Infections: Advances in Clinical Management. June 2014
  - 2) Kawakami C, Takeuchi M, Mitamura K, Takashita E, Odagiri T. Analysis of influenza virus responsible for persistent infection after drug administration in immunosuppressed patients. 3rd isirv-AVG Conference; Influenza and other Respiratory Virus Infections: Advances in Clinical Management. June 2014
  - 3) 高下恵美、江島美穂、藤崎誠一郎、中村一哉、白倉雅之、菅原裕美、佐藤彩、小田切孝人 札幌市を中心とした抗インフルエンザ薬耐性ウイルスの地域流行 第28回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム 2014年7月
  - 4) Takashita E, Ejima M, Fujisaki S, Yokoyama M, Nakamura K, Shirakura M, Sugawara H, Sato A, Sato H, Tashiro M, Odagiri T. A community cluster of influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting cross-resistance to oseltamivir and peramivir in Japan, November 2013 to February 2014. 5th ESWI Influenza Conference, September 2014
  - 5) 高下恵美、江島美穂、藤崎誠一郎、中村一哉、白倉雅之、菅原裕美、佐藤彩、小田切孝人 2013/14シーズンにおける抗インフ

ルエンザ薬耐性ウイルスの地域流行と高度耐性ウイルスの検出について 第 46 回日本小児感染症学会学術集会 2014 年 10 月

- 6) 川上千春、七種美和子、豊澤隆弘、高下恵美 入院・重症例における AH1pdm09 インフルエンザウイルスの解析 第 46 回日本小児感染症学会学術集会 2014 年 10 月
- 7) 高下恵美、江島美穂、藤崎誠一郎、横山勝、中村一哉、白倉雅之、菅原裕美、佐藤彩、佐藤裕徳、小田切孝人、全国地方衛生研究所 2013/14 シーズンにおける NA 阻害剤耐性 A(H1N1)pdm09 ウイルスの地域流行 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 2014 年 11 月
- 8) Takashita E. Global update on the antiviral susceptibility of influenza viruses. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 2014 年 11 月
- 9) 酒井宏治、網康至、田原舞乃、久保田耐、安楽正輝、中島典子、高下恵美、関塚剛史、駒瀬勝啓、信澤枝里、小田切孝人、前仲勝実、黒田誠、長谷川秀樹、河岡義裕、田代真人、竹田誠 II 型膜貫通型セリンプロテアーゼ TMPRSS2 は、HA 開裂部位に mono-basic なアミノ酸配列をもつ A 型インフルエンザウイルスに対する肺内必須活性化酵素である 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 2014 年 11 月
- 10) 川上千春、高下恵美、藤崎誠一郎、江島美穂、七種美和子、宇宿秀三、小田切孝人 過去 3 シーズンに混合流行した B 型インフルエンザウイルスの遺伝子解析 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月
- 11) 高下恵美 オセルタミビル・ペラミビル耐性 A(H1N1)pdm09 インフルエンザウイルスの地域流行 4th Negative Strand Virus-Japan 2015 年 1 月

## G . 知的財産権の出願・登録状況

なし

## ワクチン候補株の免疫原性、適正の検討

研究分担者 浅沼秀樹

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** インフルエンザサーベイランスで迅速な作製が必要とされるフェレット抗血清を作製した。H3N2 亜型の新規株である A/Osaka-C/2003/2014 および A/Niigata/296/2014 株のフェレット感染抗血清を作製し評価した結果、新規抗血清としてリファランの用いることが可能であることが示唆された。また、抗原性が類似した 3 株の不活化抗原でフェレットに免疫後、感染防御効果も検討したところ、株間で防御効果に差異が認められた。この結果はワクチン株選定に各株の免疫原性が重要であることを示唆している。

### A. 研究目的

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は世界保健機関（WHO）の世界インフルエンザ監視対応ネットワーク（GISRS）に参加し、新型を含むインフルエンザウイルスの発生動向監視（サーベイランス）および流行予測を行っている。このサーベイランスは国内の各地方衛生研究所で分離された株の性状解析情報（遺伝子、抗原性等）から、現在流行中の株における国際間の比較や過去の流行との比較を行い、現行のワクチンの有効性の評価につなげている。

インフルエンザウイルスの抗原性はフェレットの免疫抗血清を用いて行われている。過去の流行株に対する抗血清を現在流行中の株に反応させた場合に著しい低下を示した場合、抗原性が大きく変化したことが予測され、これは昨年のワクチン株では現行の流行株に対する防御効果が著しく減弱することを示唆している。ところが個々の株に対する反応性は株毎に大きく異なるため、過去の株に対する抗血清を用いた場合に現在の流行株の抗原性が類似株であると評価される場合であっても、現在流行している株に対する抗血清を過去の株と反応させた場合には必ずしも高い反応性は認めら

れない。それ故、現在流行している株の抗原性を適切に評価するためには、現行の流行株に対する抗血清の迅速な作製が必須となる。そこで本研究では 2013 年から 2014 年シーズンに分離された株の評価を行うための抗血清を作製した。また、過去の株に対する抗血清を用いた抗原性試験の結果、同じ抗原型と評価された新たな複数の分離株においても、各分離株に対する抗血清を用いた抗原性試験ではホモ値が大きく異なる場合もある。現在この差異はワクチン株の選定には考慮されていない。そこでこのような差異とワクチン効果との相関性を明らかにするために、同シーズンに分離され、抗原性が同類であると評価された数株の不活化抗原を作製してフェレットに免疫し、感染後の防御効果を検討した。

### B. 研究方法

#### ・フェレット

日本 SLC より購入した 6~12 ヶ月齢のメスのフェレットを用いた。

なお、本研究における動物実験については国立感染症研究所動物実験委員会による審査を受け、同研究所が定める実験動物管理運営規定を遵守して行われた。

・抗血清採取

2013～2014 シーズンに分離された H3N2 株、A/Osaka-C/2003/2014 株 (A/Osaka-C) および A/Niigata/296/2014 株 (A/Niigata) を MDCK (Madin Darby Canine Kidney) 細胞で増殖させた培養上清をフェレットに経鼻接種 (500  $\mu$ L) した。接種 2 週間後、全採血を行い遠心した上清を回収し抗血清として使用した。

・感染防御実験

2011～2012 シーズンに分離され、参照株である A/Victoria/361/2011 株 (A/Vic) に対する抗血清を用いた抗原性試験で類似株と認められた H3N2 株、3 株 (N273、N316、N337 株) を  $\beta$ -プロピオラクトンで不活化した全粒子抗原を作製した。抗原 (100  $\mu$ g) を筋肉内接種し (500  $\mu$ L) 3 週間後、追加免疫を行った。最終免疫の 2 週間後、N337 株を経鼻感染させ (1 x 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>, 1mL) 1 日および 3 日後に鼻腔洗浄液を回収し、ウイルス価を測定した。感染 3 日後には血清も回収し、抗体価の測定に用いた。

・ウイルス価測定

ウイルス価の測定は単層培養した MDCK 細胞を用いた寒天プラーク法により測定した。

・血球凝集阻害試験 (Hemagglutinin inhibition test: HI 試験)

採取した血清を RDE 処理し、HI 試験に用いた。段階希釈した RDE 処理試験血清とウイルス抗原を混合し、1%モルモット血球を加え、赤血球凝集抑制像を観察するにより HI 抗体価を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究ではウイルスを分離するためにヒト臨床検体材料を使用した。そのため国立感染症研究所倫理委員会の審査の下に行われた。

## C. 研究結果

### 1) A/Osaka-C および A/Niigata に対するフェレット抗血清作製

2013～2014 年シーズンの終盤に分離された H3N2 株に抗原性の変化が推察される株が認められたため、国内で出現した類似株である A/Osaka-C および A/Niigata を用い、フェレット感染抗血清を作製した。それぞれ 3 頭のフェレットを用い、感染 2 週間後の血清を採取し、リファランス抗原 6 株と同時に抗原性試験を行った (表 1)。その結果、全てのフェレット血清は Clade3C.3 の A/Tokyo/31512/2013 株および A/New York/39/2012 株、さらには Clade3C.1 の A/Texas/50/2012 と高い反応性を示し、HI 価はホモ値と同等であった。なお、H1N1pdm のリファランス株である A/California/07/2009 との反応性は認められなかった。このことから A/Osaka-C、A/Niigata とともに Clade3C 群と類似の抗原性であることが確認できたのと同時に、今回作製した抗血清がリファランス用の抗血清として有用であることも示唆された。

### 2) H3N2 分離株の不活化抗原による防御効果

2011～2012 年シーズンに臨床検体から分離した H3N2 株で、同シーズンのリファランス株である A/Vic と抗原性が類似であった 3 株 (N273、N316、N337) の不活化抗原を作製し、フェレットに免疫後、ウイルスチャレンジ (N337) に対する防御効果を検討した (表 2)。その結果、全てのフェレットにおいて、感染 1 日目はでは非免疫群と同等の高いウイルス価が認められたのに対し、感染 3 日目には N273 および N316 で免疫した群では 1/3 頭に、N337 で免疫下群では 3/3 頭に顕著なウイルス価の減少が認められた。また N273 で免疫した群の 1/3 頭と N316 で免疫した群の 2/3 頭においても部分的なウイルス価の減少が認められた。続いて血清中の HI 抗体応答を検討した (表 3)。その結果、感染 3 日目に顕著なウイルス価の減少が

認められたフェレットでは 640 以上の高い HI 価を示しており、防御が認められなかったフェレットにおいては HI 抗体の誘導も全く認められなかった。部分的な防御効果が認められた N273 の 1 頭は HI 価が 40 であり、同じく部分的な防御効果が認められた N316 で免疫した 2 頭のフェレットでは N337 に対する HI 価は認められなかったが、ホモ値が 20 ないしは 40 であったため、HI 価の検出限界以下ではあるものの、交叉的な部分防御が認められたことが示唆される。このことから、今回免疫に用いた 3 株は、抗原性がリファランスと同類であるが、免疫誘導能は株間で差が認められることが明らかとなった。

#### D. 考察

インフルエンザは常に変化し続けることで既存の免疫から逃避するため、ワクチンに用いる種株は、流行予測を基に選定されている。それゆえ、インフルエンザサーベイランスでは迅速な流行株の性状解析が求められる。サーベイランスでは主に遺伝子と抗原性の解析を中心に情報の収集が行われており、これらの情報から流行予測ならびにワクチン株が選定される。抗原性の解析にはフェレットの抗血清が必須であるため新規株の出現時には迅速に対応できる体制も必要とされる。本研究所の当センターではこの体制が構築されており、本研究においても新規株が疑われた A/Osaka-C および A/Niigata の抗血清を迅速に作製することができた。3 頭ずつのフェレットにそれぞれの株を感染させた抗血清の HI 試験を行った結果、全ての抗血清に高い HI 抗体が認められた。また同時にリファランス抗原との同様の試験から、Clade3C.3 および Clade3C.1 に分類させる抗原とホモ値が同等であった。また共同研究者の遺伝子解析の結果より、Clade3C.3a に分類されることが明らかになっていること、ならびに本血清を用いた Clade3C.3a のリファランス株である、A/Switzerland/9715293/13 株との HI

試験で同等の HI 価を示したことから、本研究で採取した抗血清は流行株を解析するため、ならびにワクチン候補株の評価に用いる抗血清として有用であることが示唆された。

続いて同類の抗原性を有するワクチンの免疫原性の違いと防御効果との相関性について検討した。現行のインフルエンザワクチンは鶏卵で製造するため、鶏卵で高い増殖性を獲得した種株が作製され候補株となっている。H3N2 亜型の場合、この製造過程において変異することが問題となっているが、ワクチン候補株数が限られているため、流行株の抗原性と部分的に相違する株を選択せざるを得ないのが現状である。そのため細胞培養系で製造するワクチンの実用化が検討されているが、候補株の選択基準が確立されていない。その一方で抗原性や遺伝子背景が類似の株でありながら、フェレットで抗血清を作製した場合のホモ値は様々であり、この差異についての詳細は検討されていない。そのため本研究ではリファランスと同類の抗原性と評価された H3N2 亜型 3 株を細胞培養系で不活化抗原を作製し、フェレットに免疫後、感染に対する防御効果と免疫応答を検討した。その結果、感染 1 日目の鼻腔ウイルス価は非免疫群との相違が認められなかったが、感染 3 日目の鼻腔では、HI 抗体価と関連したウイルス価の低下が認められた。このことから HI 抗体は感染阻止には直接貢献できないが、増殖の抑制には大きく貢献することが示唆される。また今回リファランスと同類の抗原 3 株用い、N337 を用いたフェレットの 3/3 頭に高い HI 抗体の誘導が認められたが、N273 および N316 では 1/3 のみ、高い HI 抗体の誘導が認められていた。他の研究でこれら 3 株の感染後の HI 抗体価を検討し、N337 株で非常に高い HI 抗体価が認められた結果が得られている。これらの結果から、感染させた後に誘導される HI 抗体価が高い株は、高い免疫原性を有する可能性が高いことが示唆される。

## E. 結論

短時間で変化するインフルエンザウイルスの株サーベイランスでは、ウイルスの性状解析のための迅速なフェレット抗血清の作製は必須あり、今シーズンにおいてもめまぐるしく変化する H3N2 亜型に対する抗血清を迅速かつ的確に作製することができた。また、細胞培養ワクチンなどで候補株を選出するためには、各ウイルス株の遺伝子および抗原性の解析だけでなく、フェレットに感染させた後に誘導される HI 抗体価の誘導能を確認し、免疫原性を評価することも重要である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

該当なし

### 2. 学会発表

- 1) Asanuma H, Ainai A, Nagata N, Tashiro M, Odagiri T. Relationship between innate immune responses and pathogenesis of influenza H7N9 virus that is adapted to mice. 4th International Influenza Meeting, Muenster, Germany 2014 年 9 月
- 2) 浅沼 秀樹、相内 章、許斐 奈美、佐藤佳代子、岸田典子、田代 真人、小田切孝人：フェレットに対する免疫原性を基盤とした細胞培養ワクチン用種株選定法の確立 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 3) Asanuma H, Ainai A Innate immune responses in mice lung given novel influenza H7N9 virus acquired increased mortality by prolonged passage in mice. 第 43 回日本免疫学会学術集会、京都、2014 年 12 月
- 4) Sato K, Asanuma H, Ato M, Itamura S, Odagiri T. Evaluations of influenza vaccine immunogenicity using human

cell lines. 第 43 回日本免疫学会学術集会、京都、2014 年 12 月

## G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表1 H3N2国内分離株のフェレット血清ロットチェック

株名	型・亜型	A/Osaka-C /2003/2014 NIIDNo.5	A/Osaka-C /2003/2014 NIIDNo.6	A/Osaka-C /2003/2014 NIIDNo.7	A/Niigata/ 296 /2014 NIIDNo.2	A/Niigata/ 296 /2014 NIIDNo.3	A/Niigata/ 296 /2014 NIIDNo.4	A/Tokyo/ 31512/20 13 No.1	A/Tokyo/ 31512/20 13 No.2	A/Texas/50/ 2012 (H3N2)	Cell No.2
A/Osaka-C/2003/2014	A/H3N2	320	160	320	160	160	160	40	80	80	80
A/Niigata/296/2014	A/H3N2	320	160	320	320	160	160	40	80	80	80
A/Tokyo/31512/2013	A/H3N2	160	80	160	160	80	160	160	160	160	160
A/New York/39/2012	A/H3N2	160	80	80	160	80	80	80	80	80	80
A/Texas/50/2012	A/H3N2	320	160	160	320	160	160	80	160	160	160
A/California/07/2009	A/H1N1pdm09	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
B/Massachusetts/02/2012	B (Yamagata)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	10
B/Brisbane/60/2008	B (Victoria)	80	80	80	80	160	80	80	80	80	40



表2 不活化抗原で免疫したフェレットの感染後のウイルス価

免疫株 <sup>1)</sup>	フェレット 番号	ウイルス価 (pfu/mL) <sup>2)</sup>	
		1日目	3日目
非免疫群	1	6.3	5.7
	2	6.5	4.9
	3	6.3	5.0
	4	6.0	6.0
N273	1	6.0	5.3
	2	6.6	2.1
	3	6.5	4.1
N316	1	6.4	4.8
	2	6.6	4.1
	3	5.3	< 1.0
N337	1	6.3	1.3
	2	6.0	1.8
	3	6.1	2.7

<sup>1)</sup> 各株の不活化抗原を3週間隔で2回筋肉内接種し、最終免疫2週後、  
 $1 \times 10^6$  pfu/mLのウイルスを経鼻感染(1mL)させた。

<sup>2)</sup> 感染1もしくは2週後、0.1%BSA加PBS(2mL)で鼻腔を洗浄し、回収された  
 洗浄液のウイルス価をプラーク法で測定した。

表3 リファランス株と抗原性が類似した株の感染抗血清を用いた抗原性試験

抗原	抗血清 <sup>1)</sup>								
	N273			N316			N337		
	1 <sup>2)</sup>	2	3	1	2	3	1	2	3
N273	< 20	640	80	20	40	2560	640	640	160
N316	< 20	160	40	< 20	< 20	640	320	160	80
N337	< 20	640	40	< 20	< 20	1280	640	640	160

<sup>1)</sup> 各株を3頭のアレットに感染させ2週後に抗血清を採取した。

<sup>2)</sup> アレット番号



## インフルエンザ株サーベイランスにおける H3N2 亜型株の 抗原性解析法の改良と導入

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。近年ウイルス NA タンパク質が赤血球凝集活性を示し、通常の赤血球凝集阻止（HI）試験によって正確に抗原性を評価できない、あるいは HA タンパク質による赤血球凝集活性が極めて低いために HI 試験に供試できない H3N2 亜型株の存在が明らかにされてきた。本研究では当該亜型株の抗原性をより正確に解析することを目的に赤血球凝集阻止試験の改良や中和試験法の手技的検討を行い、同手法をインフルエンザ株サーベイランス抗原性解析試験に導入することで業務遂行に大きく貢献した。

### 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。近年の H3N2 亜型株は MDCK 細胞で分離することでノイラミニダーゼタンパク質（NA）のアミノ酸に特徴的な置換が生じ、NA が赤血球凝集活性を示すようになる。この NA による赤血球凝集活性が赤血球凝集阻止（HI）試験によるヘマグルチニンタンパク質（HA）の抗原性評価の正確の実施の妨げになっていることが明らかになってきた。また 2014 年春期以降急速に分布を広げた H3N2 亜型株については、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状況が出てきた。本研究では 2015 年度接種用ワクチン製

造に供する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することを目的に、上述した H3N2 亜型株抗原性解析における問題点を明確にし、これを解決するための解析手法の改良や新規手法の検討、導入を行った。

### 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

2013/2014 および 2014/2015 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 SIAT1 細胞で再増殖後、抗原性解析、遺伝子解析に供した。

### 3) ウイルス分離・継代

SIAT1 細胞を 25cm<sup>2</sup> 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℃、5%CO<sub>2</sub> 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 1%モルモット赤血球液を加え、60 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。HA 試験改良法では、NA による血球凝集活性を排除するために、反応液に終濃度 20nM のオセルタミビルを添加した。

### 5) 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 4HA 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 1%モルモット赤血球液を加え、60 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。HI 試験改良法では、NA による血球凝集活性を排除するために、反応液に終濃度 20nM のオセルタミビルを添加した。HI 反応時の各種溶液量については後述結果項に記載する。

### 6) 中和試験

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、100TCID<sub>50</sub>/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℃ の CO<sub>2</sub> 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法によりウイルス感染細胞を検出し、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中和抗体価を判定した。

### (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

近年の H3N2 亜型株は MDCK 細胞で分離培養すると NA アミノ酸 151 番目のアスパラギン酸にグリシンやアスパラギンへの置換が高頻度に生じ、これが NA に赤血球凝集活性を付与させることが明らかになっている。また、この NA の赤血球凝集活性はオセルタミビル存在下で阻止されることも報告されている。地衛研から入手した国内分離株について当該アミノ酸置換の出現状況やオセルタミビル存在下での NA による赤血球凝集活性が除去された本来の HA による赤血球凝集活性の程度を試験検討した。結果、国内分離株のほぼ全てで NA に D151G or N のアミノ酸置換が生じており、MDCK 細胞で再増殖させたこれらの株は終濃度 20nM のオセルタミビル存在下で HA 活性が消失してしまうことから、観察される赤血球凝

集活性が変異NAによるものであることが明らかとなった(図1)。これら分離株をオセルタミビル存在条件下 HI 試験により HA の抗原性評価を行うことが困難であることも示された。

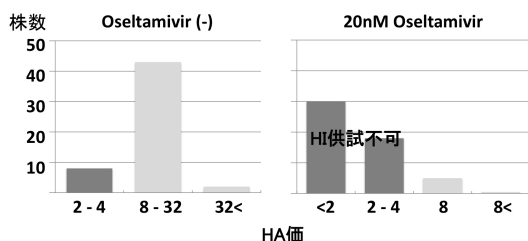


図1 国内分離株のオセルタミビル添加・非添加による HA 価の変化

当該 NA アミノ酸置換回避の方策として SIAT1 による分離株の再増殖の有用性を検討した。地衛研からの入手株を SIAT1 で継代することで供試株の 70~80%は NA の 151 番目アミノ酸がアスパラギン酸に戻り、終濃度 20nM オセルタミビル存在下でも相応の HA 価を示した(図2)。

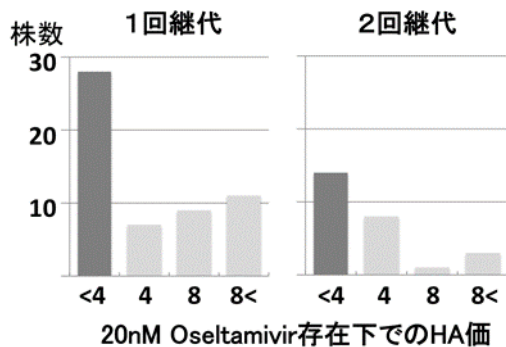


図2 国内分離株 SIAT1 継代後のオセルタミビル存在下での HA 価

上述により SIAT1 で再増殖させた株を用いて、オセルタミビル添加により NA による赤血球凝集活性を排除した HI 試験改良法を確立し(図3) HA の抗原性評価を正確に行うことができたようになった。

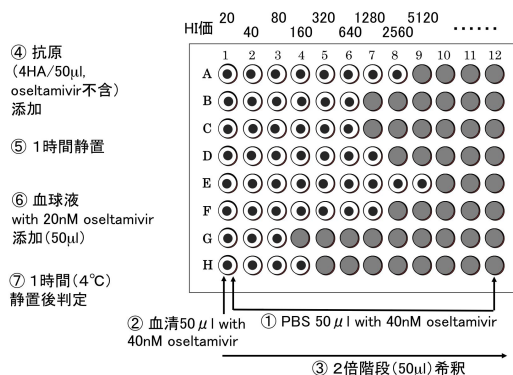


図3 HI 試験オセルタミビル添加変手法手順概略

しかしながら、SIAT1 での再増殖を経てもオセルタミビル存在下で HA 活性が全く消失してしまう分離株が一定の割合で存在しており、遺伝学的解析の結果から、これら分離株は 2014 年初頭に出現した新規遺伝学的クレード 3C.2a に属する一群であることが明らかになった。これらの株はウイルスの性状として極めて弱い赤血球凝集活性を示しているため、HI 試験での抗原性解析を実施することができない状況であった。そこで HI 試験に替えて中和試験によって 3C.2a 群分離株の抗原性解析ができるかどうかを検討した。種々の試験条件の検討を経て中和試験による分離株抗原性解析を行った結果、参照ウイルス、被検ウイルスの抗原的類似性や乖離を中和試験法によっても明確に区別されることが確認でき、3C.2a 分離株の抗原性解析における有用性を示した。

上記 HI 試験改良法と中和試験法を併用し、2014/15 シーズンの H3N2 亜型国内分離株について抗原性解析を実施した結果、2014/15 シーズンの流行株は昨年までのワクチン製造用推奨株である A/Texas/50/2012 と抗原性に大きく異なっていることを明確に示した。次期ワクチン製造用株には最近の流行株の抗原的に類似している株の推奨を提議するために、国内外のワクチン株選定会議に際しての有用な資料として提供した。

#### 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、今回のように常法によって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。不測の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。今回海外のWHO協力センターから提供、共有された情報が事態の改善に大きく寄与した。このことから国内外の関係各機関連携のもと、情報発信、取得に努めることもサーベイランス業務遂行に重要だと思われる。

## E. 結論

最近の H3N2 亜型分離株は従来の手法によっては抗原性解析が行えない状況を踏まえて、分離株の再増殖用細胞基材の変更、抗原性解析手法の改良を行った。これら知見を駆使して2014/15シーズンに流行の主流を占めるウイルス株の抗原性解析を遂行し、得られた結果を至適なワクチン製造用株の選定に結びつく有用な資料として国内外の株選定会議での検討に提供した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

K. Sakai, Y. Ami, M. Tahara, T. Kubota, M. Anraku, M. Abe, N. Nakajima, T. Sekizuka, K. Shirato, Y. Suzaki, A. Ainai, Y. Nakatsu, K. Kanou, K. Nakamura, T. Suzuki, K. Komase, E. Nobusawa, K. Maenaka, M. Kuroda, H. Hasegawa, Y. Kawaoka, M. Tashiro and M. Takeda. “ The host protease TMPRSS2 plays a major role for *in vivo* replication of emerging H7N9 and seasonal influenza viruses. ” Journal of Virology,88,5608-5616, 2014

### 2. 学会発表

1) Emi Takashita, Miho Ejima, Seiichiro

Fujisaki, Masaru Yokoyama, Kazuya Nakamura, Masayuki Shirakura, Hiromi Sugawara, Aya Sato, Hironori Sato, Masato Tashiro, Takato Odagiri “ A community cluster of influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting cross-resistance to oseltamivir and peramivir in Japan, November 2013 to February 2014.” 5th ESWI Influenza Conference (Riga, Latvia), Sep/2014

2) 高下恵美、江島美穂、藤崎誠一郎、横山勝、中村一哉、白倉雅之、菅原裕美、佐藤彩、佐藤裕徳、小田切孝人、全国地方衛生研究所: 2013/14 シーズンにおける NA 阻害剤耐性 A(H1N1)pdm09 ウイルスの地域流行 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 2014 年 11 月

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

## インフルエンザウイルス分離株についての遺伝子解析

研究分担者 藤崎誠一郎

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・第一室

研究協力者 白倉雅之

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・第一室

**研究要旨** 2013/14, 2014/15 シーズンのインフルエンザウイルス分離株について遺伝子解析を実施した。A(H1N1)pdm09 ウイルスは両シーズンを通してクレード 6B が主流であった。A(H3N2) ウイルスは 2013/14 シーズンにはクレード 3C.2, 3C.3 が混合流行していたが、2014/15 シーズンには新たに出現したクレード 3C.2a, 3C.3a の 2 集団が主流となった。3C.2a, 3C.3a に属するウイルスは抗原部位にアミノ酸置換を有していた。B 型 Yamagata 系統ウイルスはクレード 2, 3 が混合流行していた。B 型 Victoria 系統ウイルスはクレード 1A が主流であった。2014/15 シーズンは A(H3N2)ウイルスが流行の主流であることから、抗原性に変異が生じていたのか懸念された。

### A. 研究目的

国内外から流行株を収集し、それらの遺伝子配列に基づいた進化系統樹解析、抗原性および薬剤耐性アミノ酸の検出を行う。これらの結果から、特定のアミノ酸が抗原性や薬剤耐性に与える影響を解析し次シーズンの流行予測および適切なワクチン株の選定に役立てる。

### B. 研究方法

2013/14, 2014/15 シーズンに国内および海外（ラオス、台湾、モンゴル）から収集した分離株について遺伝子配列を決定し、アミノ酸解析、進化系統樹解析を実施した。具体的には、2013/14 シーズンには A(H1N1)pdm09 を 284 株、A(H3N2) を 202 株、B 型を 186 株、2014/15 シーズン（2015 年 1 月時点）には A(H1N1)pdm09 を 2 株、A(H3N2) を 115 株、B 型を 8 株、解析を行った。

（倫理面への配慮）

特になし

### C. 研究結果

#### 2013/14, 2014/15 シーズン流行株の遺伝子解析：

A(H1N1)pdm09 ウイルス：HA 遺伝子系統樹上でクレード 1～8 の 8 つに区分されており、クレード 6 は更にサブクレード 6A, 6B, 6C に細分された。2013/14 シーズンの国内分離株は全てサブクレード 6B または 6C に属しており、流行の主流はクレード 6B であった。これらの株は、遺伝子的には異なるサブクレードではあるが抗原性に違いはなく、すべてワクチン株 A/California/7/2009 類似株であった。NA タンパク質に薬剤耐性マーカーのアミノ酸置換 H275Y を有する株が、2013 年 11 月～2014 年 2 月にかけて札幌市を中心に地域流行したが、以降の流行は認められなかった。また同様の薬剤耐性株は北海道以外でも散発的に検出されたが、遺伝子系統樹内で特定の集団形成は認められなかった。

A(H3N2)ウイルス：HA 遺伝子系統樹においてクレード 3C はサブクレード 3C.1, 3C.2, 3C.3 に分かれた。国内分離株は、クレード 3C.2



(アミノ酸置換：N145S, D489N)または3C.3 (アミノ酸置換：T128A, R142G, N145S、代表株：A/New York/39/2012株、A/Tokyo/31512/2013株)に属した。さらにサブクレード3C.2内には3C.2a(アミノ酸置換：L3I, N144S, K160T, N255D, Q311H, F159Y)が、3C.3内には3C.3a(アミノ酸置換：A138S, F159Y, N225D)、および3C.3b(アミノ酸置換：E62K, K83R, M347K)の新たな集団形成が認められ、2014/15シーズンには3C.2aおよび3C.3aサブクレードが流行の主流となりそれぞれ70%、30%の検出率であった(2015年1月時点)。

B型ウイルス：Yamagata系統では、分離株はHAタンパク質にS150I, N165Y, S229Dアミノ酸置換を持つクレード3(代表株：B/Wisconsin/1/2010株、B/Sakai/36/2011株)が主流であった(72%)。一部の株(28%)は、R48K, P108A, T181A, S229Gアミノ酸置換を持つクレード2(代表株：B/Massachusetts/02/2012株、B/Kanagawa/37/2011株)に属した。クレード3に属する分離株にはYamagata系統とVictoria系統のリアソータント株(HA: Yamagata系統、NA: Victoria系統)も散発的に検出された。Victoria系統の分離株は全て、HAタンパク質にN75L, N165K, S172Pアミノ酸置換を持ち、B/Brisbane/60/2008株、B/Sakai/43/2008株を代表とするサブクレード1Aに属した。

#### D. 考察

2013/14シーズンに流行の中心であったA(H1N1)pdm09亜型は、2009年に出現して以降、遺伝子的に変化はしているものの抗原性に大きな影響を与え得るアミノ酸置換は認められない。A(H3N2)亜型は2013/14シーズンから2014/15シーズンにかけて流行のsubcladeが3C.2および3C.3から3C.2aと3C.3aへと変化し、抗原性に影響を与え得るアミノ酸置換が確

認されたことから、実際の抗原性の変異および同ウイルス流行の拡大が懸念された。B型Yamagata系統についてはclade 2, 3が混合流行する状況が続いており抗原性が変異するアミノ酸置換は認められなかった。B型Victoria系統についても抗原性変異に関わるアミノ酸置換は確認されていない。

#### E. 結論

2013/14シーズンに検出されたA(H1N1)pdm09には抗原性に影響を与える変異は見つからず2009年から大きな変化はなかった。A(H3N2)は抗原部位に変異を持つ3C.2a, 3C.3aが出現、伝播し今後の流行が懸念された。B型はYamagata系統が主流でありクレード2, 3の混合流行が確認された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- 1) 高下恵美、江島美穂、藤崎誠一郎、横山勝、中村一哉、白倉雅之、菅原裕美、佐藤彩、佐藤裕徳、小田切孝人、全国地方衛生研究所 2013/14シーズンにおけるNA阻害剤耐性A(H1N1)pdm09ウイルスの地域流行 第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
- 2) 川上千春、七種美和子、宇宿秀三、高下恵美、藤崎誠一郎、江島美穂、小田切孝人 3シーズンにわたって混合流行したB型インフルエンザウイルスの遺伝子解析 第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## ワクチン製造用 MDCK 細胞でのウイルス分離効率、適性の解析

研究分担者 原田勇一

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** 細胞培養インフルエンザワクチン製造用種ウイルス株を分離するための培養細胞候補として自家樹立した NIID-MDCK 細胞を用いて、臨床検体からのウイルス分離効率並びに分離ウイルスの増殖性について解析を行った。NIID-MDCK 細胞からのウイルス分離効率は、分離ウイルスの型・亜型によって異なる傾向を示した。A(H3N2)型、B 型ウイルスの分離効率は 90%を超えていた。一方、A(H1N1)pdm09 型ウイルスの分離効率は約 50%であったが、使用する臨床検体を選択することにより、ウイルス分離効率は改善した。また、分離されたウイルスの増殖性にも型・亜型による特徴が観察され、A 型ウイルスが継代を経るごとに増殖性を増していくのに対し、B 型ウイルスは分離初期から高い増殖性を示した。いずれの分離ウイルスも増大した増殖性は継代を経ても維持されることが明らかとなった。以上の結果から、NIID-MDCK 細胞は、ワクチン製造用種ウイルス株の分離用細胞として、有用であることが示唆された。

### A. 研究目的

現在、国のパンデミック対策として、細胞培養インフルエンザワクチン（H5N1 株、プロトタイプワクチン）の開発が進められている。一方で、細胞培養インフルエンザワクチンは、季節性インフルエンザワクチンとしても現行の鶏卵培養ワクチンが抱えるいくつかの問題点を克服できる可能性があることから、その応用が期待されている。しかしながら、季節性細胞培養インフルエンザワクチンの有益性を十分に発揮させるためには、ワクチン製造に用いる種ウイルス株を分離・増殖させるための培養細胞が必須である。我々はこれまでに、一定の品質が保証された、血清非依存性の細胞株（NIID-MDCK 細胞）を樹立した。本研究は、NIID-MDCK 細胞のワクチン製造用種ウイルス株分離用細胞としての適性を、細胞からのウイルス分離効率、分離されたウイルスの増殖性という観点から評価することを目的とする。

2010/11、2012/13、2013/14 シーズンにインフルエンザ様疾患を呈した患者より採取された臨床検体を用い、検体中のインフルエンザウイルスの有無を、リアルタイム RT-PCR 法により確認した。インフルエンザウイルス陽性となった臨床検体を NIID-MDCK 細胞に接種し、ウイルス分離効率を培養上清中の HA 価の有無により評価した。HA 価陰性の検体については、盲継代を 4 代目まで行った。ウイルスが分離できた検体についてはその培養上清を新たな細胞に接種し、3-5 代連続継代を行った。ウイルスの増殖性は、培養上清の HA 価を測定することにより評価した。

（倫理面への配慮）

本研究において使用した臨床検体については、あらかじめ国立感染症研究所ヒトを対象とした医学研究倫理審査委員会より承認を受けた後、実験に供した。

### B. 研究方法

## C. 研究結果

### ・ A(H1N1)pdm09 型ウイルス

ランダムに選択したインフルエンザウイルス陽性臨床検体を NIID-MDCK 細胞に接種したところ、ウイルスの分離効率は 47%であった。ウイルス分離の成否は、臨床検体中に含まれるウイルス RNA の量と強く相関していた。そこで、ウイルス分離が可能と予測される量以上のウイルス RNA を含む臨床検体を用いてウイルス分離を試みたところ、ウイルス分離効率は 100%となった。この分離効率は、採取シーズンの異なる臨床検体を用いた場合も再現できた。分離されたウイルスの増殖性は継代とともに増大したが、もっとも良く増殖した株でもその力価は 64 HAU 程度にとどまった。

### ・ A(H3N2)型ウイルス

臨床検体からのウイルス分離効率は、91%であった。継代 1 代目で HA 価陽性となる検体は少なく、継代 2-3 代目から陽性となるものが多かった。分離されたウイルス株は継代とともに増殖性を増し、128-256 HAU まで増殖した。2013/14 シーズンに採取された臨床検体の中には、細胞に強い毒性 (CPE) をもたらすものが存在したが、HA 価は継代を行っても陽性とならなかった。しかしながら、この培養上清をリアルタイム RT-PCR 試験に供したところ、強い A/H3 型のシグナルが検出された。

### ・ B 型ウイルス

B 型ウイルスの分離効率は、Victoria 系統株についても Yamagata 系統株についても、いずれも 100%であった。また、分離されたウイルスの増殖性も、多くの株で継代初期から 256-512 HAU を示し、その増殖性は継代を経ても維持されていた。

## D. 考察

NIID-MDCK 細胞を用いた臨床検体からのウイルス分離効率と、分離されたウイルス株の

増殖性は、ウイルスの型・亜型によって異なる特徴を示した。

A(H1N1)pdm09 型ウイルスの分離効率は解析した中では最も低かったが、臨床検体中のウイルス RNA 量を測定して、用いる臨床検体を選別することにより、克服できる可能性が強く示唆された。今回解析に供した A(H1N1)pdm09 型ウイルス陽性臨床検体のうち、ウイルス分離可能と予測できる臨床検体の数は全体の約 70%であり、この面からも NIID-MDCK 細胞を用いてワクチン製造用 A(H1N1)pdm09 型種ウイルス株を分離することは十分に可能であると考えられた。

B 型ウイルス、A(H3N2)型ウイルスの分離効率、分離されたウイルスの増殖性は概ね良好であったが、2013/14 シーズンに採取された臨床検体の中に、細胞に強い CPE を引き起こすが、HA 価が観察できない A(H3N2)型ウイルスを含むものが存在した。日本を含めた世界的なインフルエンザウイルス株サーベイランスにおいて、2013/14 シーズンに分離された A(H3N2)型ウイルスでは、その HA 遺伝子の分類上、Clade 3C.2a に属する株が出現し、この Clade 3C.2a ウイルスは赤血球凝集能が弱く、場合によっては HA 活性を示さないことが知られている。今回観察された現象は、臨床検体中に含まれるウイルスの HA 遺伝子が Clade 3C.2a に属するためであるかもしれず、このウイルス株の HA 遺伝子配列を解析する必要がある。また、Clade 3C.2a に属するウイルスの流行は増加傾向にあることから、A(H3N2)型ウイルスについては、分離効率や継代による増殖性の評価法についても見直す必要がある。

## E. 結論

細胞培養季節性インフルエンザワクチン製造のための種ウイルス株分離用細胞として、NIID-MDCK 細胞は、ウイルスの分離効率、分離したウイルスの増殖性という観点から有用であることが示唆された。引き続き新たなシー

ズンの臨床検体を用い、NIID-MDCK 細胞の評価を行う必要がある。

**F . 研究発表**

1 . 論文発表

なし

2 . 学会発表

なし

**G . 知的財産権の出願・登録状況**

なし



## MDCK (NIID-MDCK) 細胞で分離したワクチン候補種ウイルスの 遺伝的および抗原的安定性の評価

研究分担者 高橋 仁

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** 細胞培養季節性インフルエンザワクチンの実用化に向けた研究を行う。本研究では、安全性等の基準を満たした MDCK (NIID-MDCK) 細胞を用いて分離継代したウイルスの遺伝的および抗原的安定性の評価を行い、ワクチン製造の元株となるワクチン候補種ウイルスとして使用可能であるかの検討を行った。その結果、多くのウイルス株が流行の主流となっている株と遺伝的および抗原的に同等（安定）であり、ワクチン候補種ウイルスとして使用可能であることが確認された。

### A. 研究目的

細胞培養季節性インフルエンザワクチンの実用化に向けて、ワクチン製造の元株となるワクチン候補種ウイルスの製造所への配布を考えたときに、配布する株が流行の主流となっている株と遺伝的および抗原的に同等（安定）であることを確認しておくことは重要である。

本研究では、安全性等の基準を満たした MDCK (NIID-MDCK) 細胞から臨床検体を用いて分離継代した各型・亜型ウイルス株の遺伝的および抗原的安定性の評価を行い、ワクチン候補種ウイルスとして使用可能であるかの検討を行う。

### B. 研究方法

今回使用するワクチン候補種ウイルス分離用の培養細胞としては、安全性等の基準を満たし、無血清培地に馴化させた MDCK (NIID-MDCK) 細胞を用いた。

A(H1N1)pdm09 株と H3N2 株、B 型インフルエンザウイルスの B/Victoria 系統株と B/Yamagata 系統株のウイルスゲノムの存在が確認されている複数の臨床検体から、MDCK (NIID-MDCK) 細胞を用いて分離したウイル

スを 1 代目として、分離状況により 3 代目から 5 代目までウイルス継代を行った。その後、最終継代数のウイルスを用いて、ウイルスの遺伝子および抗原性の解析を行った。

ウイルスの遺伝子解析を行うための方法として、臨床検体および最終継代ウイルスからウイルス RNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて HA および NA 遺伝子の全長を増幅させた。この PCR 産物を鋳型としてシーケンス解析を行い、塩基配列を決定した。HA、NA タンパク質のアミノ酸配列は、遺伝子配列から推定した。

ウイルスの抗原性解析を行うための方法として、赤血球凝集阻止 (HI) 試験を行った。臨床検体採取時に流行の主流となっていた株の中で、代表となる基準ウイルス（細胞分離株）を参照抗原とし、これをフェレットに感染させて得た血清を使用した。また、赤血球は 1% モルモット赤血球または 0.5% ニワトリ赤血球を使用した。

（倫理面への配慮）

本研究では、鼻腔スワブ等の臨床検体を用いるため、検体採取にあたってはインフォームドコンセントを取り、倫理委員会の承認を得た。

試料は匿名処理を行うため個人情報が流出することはない。

### C. 研究結果

MDCK (NIID-MDCK) 細胞を用いて臨床検体からのウイルス分離を行い、複数の各型・亜型ウイルス株を得ることができた。これらのウイルス株について遺伝子および抗原性の解析を行った。

遺伝子解析については分離されたウイルス株の内、A(H1N1)pdm09 2株と H3N2 5株、B/Victoria 系統 2株と B/Yamagata 系統 2株について臨床検体との比較を行った。A(H1N1)pdm09 2株の内、1株で HA および NA の遺伝子変異が起こりつつあり、HA については抗原性に影響を与える部位であった。H3N2 株では HA の遺伝子変異は確認されなかった。NA では 5株の内、4株で遺伝子変異が起こりつつあり、これらの部位は HA 活性に影響を及ぼすとされる部位であった。B/Victoria 系統株では遺伝子変異は確認されなかった。B/Yamagata 系統 2株の内、1株で臨床検体中の NA で混合塩基となっていた部位が一つの塩基へ収束することが確認された。この部位は NA タンパク質の性質に影響を与える部位ではなかった。

抗原性解析については分離されたウイルス株の内、A(H1N1)pdm09 7株と H3N2 5株、B/Victoria 系統 5株と B/Yamagata 系統 5株について行った。A(H1N1)pdm09 株については、全ての分離株で参照抗原である A/Narita/1/2009 株と同等の抗原性を示した。H3N2 株については、5株中 3株で参照抗原である A/Victoria/361/2011 株と同等の抗原性を示したが、残り 2株で参照抗原との抗原性乖離がみられた。B/Victoria 系統株については、全ての分離株で参照抗原である B/Brisbane/60/2008 株と同等の抗原性を示した。B/Yamagata 系統株については、全ての分離株で参照抗原である B/Wisconsin/1/2012 株

と同等の抗原性を示した。

### D. 考察

MDCK (NIID-MDCK) 細胞から臨床検体を用いて分離継代した各型・亜型ウイルス株は、多くの株が流行の主流となっている株と遺伝的および抗原的に同等であり、ワクチン候補種ウイルスとして使用可能であることが確認された。一部の H3N2 分離株では参照抗原との抗原性乖離がみられたが、これらの分離株での HA 遺伝子の変異は確認されていない。しかしながら、これらの分離株では NA 遺伝子で変異が起こりつつあり、その部位は HA 活性に影響を及ぼすとされる部位として報告されている。この部位が抗原性の変化に影響を与えていることも考えられ、今後この部位と抗原性の変化について検証を行っていくことが必要と考える。

今回の結果は、インフルエンザ流行の 1つのシーズンの中で採取された臨床検体から分離継代を行ったウイルス株の評価であり、別のシーズンに採取された臨床検体を用いても遺伝的および抗原的安定性を保ったワクチン候補種ウイルスの作製が可能か、引き続き検討が必要である。

細胞培養季節性インフルエンザワクチン製造のためのワクチン製造用ウイルス株を遺伝的および抗原的に安定なものとして配布することで、流行に即した効果的な細胞培養季節性インフルエンザワクチンの供給が可能となり、わが国の健康行政への貢献となる。

### E. 結論

MDCK (NIID-MDCK) 細胞で分離したワクチン候補種ウイルスの遺伝的および抗原的安定性の評価を行った。多くの株が流行の主流となっている株と遺伝的および抗原的に同等であり、ワクチン候補種ウイルスとして使用可能であることが確認された。

## F . 研究発表

### 1 . 論文発表

- 1) I Takayama, H Takahashi, M Nakauchi, S Nagata, M Tashiro, T Kageyama. Development of a diagnostic system for novel influenza A(H7N9) virus using real-time RT-PCR assay in Japan. Jpn J Infect Dis. 2014 Nov 25. [Epub ahead of print]
- 2) Y Tsunetsugu-Yokota, K Nishimura, S Misawa, M Kobayashi-Ishihara, H Takahashi, I Takayama, K Ohnishi, S Itamura, H LK Nguyen, M TQ Le, G T Dang, L T Nguyen, M Tashiro and T Kageyama. Development of a sensitive novel diagnostic kit for the highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus. BMC Infect Dis. 14:362, 2014.
- 3) M Kobayashi-Ishihara, H Takahashi, K Ohnishi, K Nishimura, K Terahara, M Ato, S Itamura, T Kageyama, Y Tsunetsugu-Yokota. Broad cross-reactive epitopes of the H5N1 influenza virus identified by murine antibodies against the A/Vietnam/1194/2004 hemagglutinin. PLoS One. 9(6):e99201, 2014.
- 4) M Nakauchi, I Takayama, H Takahashi, K Oba, H Kubo, A Kaida, M Tashiro, T Kageyama. Real-time RT-PCR assays for discriminating influenza B virus Yamagata and Victoria lineages. J Virol Methods. 205C:110-115, 2014

- 5) M Nakauchi, I Takayama, H Takahashi, M Tashiro, T Kageyama. Development of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid diagnosis of avian influenza A (H7N9) virus infection. J Virol Methods. 204:101-104, 2014

### 2 . 学会発表

- 1) 高山 郁代、Nguyen Trung Hieu、中内 美名、高橋 仁、Nguyen Thanh Long、小田切 孝人、田代 真人、影山 努 2014年にベトナムでヒト感染が確認された高病原性鳥インフルエンザ A(H5N1)ウイルスの遺伝子解析  
第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月
- 2) 中内 美名、高山 郁代、大場 邦弘、高橋 仁、田代 真人、影山 努 RT-LAMP法を用いた A/H7N9 亜型鳥インフルエンザウイルス検出系の構築  
第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月

## G . 知的財産権の出願・登録状況

なし







## 1. 研究成果の刊行に関する一覧表



## 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍：該当なし

雑誌：

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Meijer A, Rebelo-de-Andrade H, Correia V, Besselaar T, Drager-Dayal R, Fry A, Gregory V, Gubareva L, Kageyama T, Lackenby A, Lo J, Odagiri T, Pereyaslov D, Siqueira MM, Takashita E, Tashiro M, Wang D, Wong S, Zhang W, Daniels RS, Hurt AC.	Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2012-2013.	Antiviral Res.	Oct.110	31-41	2014
Takashita E, Meijer A, Lackenby A, Gubareva L, Rebelo-de-Andrade H, Besselaar T, Fry A, Gregory V, Leang SK, Huang W, Lo J, Pereyaslov D, Siqueira MM, Wang D, Mak GC, Zhang W, Daniels RS, Hurt AC, Tashiro M.	Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2013-2014.	Antiviral Res.	in press		
Y Tsunetsugu-Yokota, K Nishimura, S Misawa, M Kobayashi-Ishihara, H Takahashi, I Takayama, K Ohnishi, S Itamura, H LK Nguyen, M TQ Le, G T Dang, L T Nguyen, M Tashiro and T Kageyama.	Development of a sensitive novel diagnostic kit for the highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus.	BMC Infect Dis.	14	362	2014
Watanabe T, Kawakami E, Shoemaker JE, Lopes TJ, Matsuoka Y, Tomita Y, Kozuka-Hata H, Gorai T, Kuwahara T, Takeda E, Nagata A, Takano R, Kiso M, Yamashita M, Sakai-Tagawa Y, Katsura H, Nonaka N, Fujii H, Fujii K, Sugita Y, Noda T, Goto H, Fukuyama S, Watanabe S, Neumann G, Oyama M, Kitano H, Kawaoka Y.	Influenza virus-host interactome screen as a platform for antiviral drug development.	Cell Host Microbe	16	795-805	2014
Watanabe T, Zhong G, Russell CA, Nakajima N, Hatta M, Hanson A, McBride R, Burke DF, Takahashi K, Fukuyama S, Tomita Y, Maher EA, Watanabe S, Imai M, Neumann G, Hasegawa H, Paulson JC, Smith DJ, Kawaoka Y.	Circulating avian influenza viruses closely related to the 1918 virus have pandemic potential.	Cell Host Microbe	15	692-705	2014

Takashita E, Ejima M, Itoh R, Miura M, Ohnishi A, Nishimura H, Odagiri T, Tashiro M.	A community cluster of influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting cross-resistance to oseltamivir and peramivir in Japan, November to December 2013.	Euro Surveill.	Jan 9;19(1)		2014
Katsura H, Piao Z, Iwatsuki-Horimoto K, Akeda Y, Watanabe S, Horimoto T, Oishi K, Kawaoka Y.	A bivalent vaccine based on a replication-incompetent influenza virus protects against Streptococcus pneumoniae and influenza virus infection.	J Virol	88	13410-13417	2014
M Nakauchi, I Takayama, H Takahashi, K Oba, H Kubo, A Kaida, M Tashiro, T Kageyama.	Real-time RT-PCR assays for discriminating influenza B virus Yamagata and Victoria lineages.	J Virol Methods.	205C	110-115	2014
M Nakauchi, I Takayama, H Takahashi, M Tashiro, T Kageyama.	Development of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid diagnosis of avian influenza A (H7N9) virus infection.	J Virol Methods.	204	101-104	2014
K. Sakai, Y. Ami, M. Tahara, T. Kubota, M. Anraku, M. Abe, N. Nakajima, T. Sekizuka, K. Shirato, Y. Suzuki, A. Ainai, Y. Nakatsu, K. Kanou, K. Nakamura, T. Suzuki, K. Komase, E. Nobusawa, K. Maenaka, M. Kuroda, H. Hasegawa, Y. Kawaoka, M. Tashiro and M. Takeda.	The host protease TMPRSS2 plays a major role for in vivo replication of emerging H7N9 and seasonal influenza viruses.	Journal of Virology	88	5608-5616	2014
I Takayama, H Takahashi, M Nakauchi, S Nagata, M Tashiro, T Kageyama.	Development of a diagnostic system for novel influenza A(H7N9) virus using real-time RT-PCR assay in Japan.	Jpn J Infect Dis.	Epub ahead of print, Nov. 25		2014

Yamanaka A, Iwakiri A, Yoshikawa T, Sakai K, Singh H, Himeji D, Kikuchi I, Ueda A, Yamamoto S, Miura M, Shioyama Y, Kawano K, Nagaishi T, Saito M, Minomo M, Iwamoto N, Hidaka Y, Sohma H, Kobayashi T, Kanai Y, Kawagishi T, Nagata N, Fukushi S, Mizutani T, Tani H, Taniguchi S, Fukuma A, Shimojima M, Kurane I, Kageyama T, Odagiri T, Saijo M, Morikawa S	Imported case of acute respiratory tract infection associated with a member of species nelson bay orthoreovirus.	PLoS One.	Mar. 25;9(3)	e92777	2014
M Kobayashi-Ishihara, H Takahashi, K Ohnishi, K Nishimura, K Terahara, M Ato, S Itamura, T Kageyama, Y Tsunetsugu-Yokota.	Broad cross-reactive epitopes of the H5N1 influenza virus identified by murine antibodies against the A/Vietnam/1194/2004 hemagglutinin.	PLoS One.	9(6)	e99201	2014
Watanabe T, Watanabe S, Maher EA, Neumann G, Kawaoka Y.	Pandemic potential of avian influenza A (H7N9) viruses.	Trends Microbiol	22	623-631	2014
Barr IG, Russell C, Besselaar TG, Cox NJ, Daniels RS, Donis R, Engelhardt OG, Grohmann G, Itamura S, Kelso A, McCauley J, Odagiri T, Schultz-Cherry S, Shu Y, Smith D, Tashiro M, Wang D, Webby R, Xu X, Ye Z, Zhang W; Writing Committee of the World Health Organization Consultation on Northern Hemisphere Influenza WHO recommendations for the viruses used in the 2013-2014 Northern Hemisphere influenza vaccine	Epidemiology, antigenic and genetic characteristics of influenza A(H1N1)pdm09, A(H3N2) and B influenza viruses collected from October 2012 to January 2013.	Vaccine	Aug 20;32(37)	4713-25	2014





