

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

新型及び季節性インフルエンザワクチン株の選定に資する
サーベイランスの強化とゲノム解析に関する研究

平成28年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小田切孝人
平成29年(2017)5月

目 次

I. 総括研究報告書

新型及び季節性インフルエンザワクチン株の選定に資するサーベイランスの強化とゲノム解析に関する研究

研究代表者： 小田切孝人 _____ P1

II. 分担研究報告書

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・樹立

渡邊真治 _____ P10

インフルエンザ株サーベイランス A/H3N2 亜型株抗原性解析における中和試験法の改良

中村一哉 _____ P14

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

岸田典子 _____ P20

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 _____ P23

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

桑原朋子 _____ P26

抗インフルエンザ薬耐性株の発生動向調査ならびに薬剤耐性株検出系の外部精度管理に向けた実態調査

高下恵美 _____ P29

成人層および高齢者層に対する 2016-17 年季節性インフルエンザワクチン接種後の抗体価反応

齋藤玲子

研究協力者 小田切崇、菖蒲川由郷、八神錬、尾ヶ井マサヨ（女池南風苑・看護介護科長）、樋熊紀男
（女池南風苑・施設長）

_____ P33

動物由来インフルエンザウイルスのレセプター結合特異性に関する研究

白倉雅之 _____ P40

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 _____ P44

I. 総括研究報告書

新型及び季節性インフルエンザワクチン株の選定に資する サーベイランスの強化とゲノム解析に関する研究

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

インフルエンザ株サーベイランスを強化し、流行株分離用検体および分離株の収集力の向上、さらに分離株の解析法の改良、特に最近の A(H3N2)亜型株の解析は、困難を極めていることから国際標準化された抗原解析手法の導入と安定的な実施基盤の構築が急務となっている。また、薬剤耐性株の検出精度を向上させるために、コア・サポート地衛研と連携し外部制度管理試験（EQA）の試行を行い、今後予定されている全国規模での実施に向けた準備が開始された。一方、卵馴化による抗原変異の影響の極めて少ない A(H3N2)ワクチン製造用株（A/埼玉/103/2014-CEXP002）の開発に成功し、WHO から次シーズンのワクチン候補株として認定された。本ワクチン株は、細胞培養ワクチン用に開発した品質管理された細胞(NIID-MDCK)で分離後に、卵で高継代馴化した株で、流行株からの抗原性の乖離が小さい。この手法は、卵馴化で抗原変異し難いワクチン株の収集法にとって、新たな一頁を開くマイルストーンとなった。一方、国産インフルエンザワクチンの免疫原性を国際基準に照らし合わせて評価した結果、B 型ワクチンの免疫原性の改善の必要性が示された。

A. 研究目的

本研究班の実働母体は、東アジア地域を担当する WHO インフルエンザ協力センター（WHO-CC）であるため、WHO 世界インフルエンザ監視対応システム（WHO-GISRS）から海外の季節性および動物由来インフルエンザ発生・動向情報、原因ウイルスを迅速に入手できるという利点を持っている。この利点を活かし、毎年見直しと更新が行われる季節性インフルエンザワクチン株の国内外からの検索と適正株の選定のための試験および試験法の改良、その国際標準化を目指す。

本研究では、H28 年度から施行される改正感染症法により地衛研からウイルス分離用の臨床検体を広範囲に入手できるようになったことから、ワクチン製造に採用可能な卵分離株の確保を本格的に行う。これにより、諸外国に日本発のワクチン株の提供が可能となり、国際貢

献を果たせるばかりか、国内ワクチン選定会議およびWHO ワクチン選定会議を支援することが可能となる。

最近の A(H3N2)流行株は、従来の赤血球凝集抑制(HI)試験では、正確な抗原解析ができない性状に変化しており、その代替え法として中和試験法の導入が必須となっている。初年度にこれら改善策を実施し、軌道に乗ったことから、本年度は、海外の WHO-CC が採用している技術も取り入れて、流行株の抗原解析法の国際標準化を図る。

全国地衛研における薬剤耐性株のサーベイランス精度を向上させるために、外部制度管理試験（EQA）の試行をコア・サポート地衛研と共同で行い、これを足掛かりとして将来的には全国規模での EQA 実施を目指す。

一方、H27 年度に新規に導入された 4 価ワクチンの有効性の評価の一環として、ワクチンの

免疫原性を調べ、改良が必要であれば、成績に基づいた提言をする。

B. 研究方法

- ウイルス分離効率の高い培養細胞の検索：ウイルス増殖効率を改善するため6種類の細胞について検討した。
- 中和試験法によるウイルス抗原性解析系の改善：本研究班で実施してきた中和試験法を改善するため、諸外国のWHO-CCで採用しているウイルス感染細胞巢減数試験（Focus reduction assay; FRA）の導入と標準化を行った。
- A(H3N2)感染患者の臨床検体から、卵分離株の回収法の改良を行った。また、細胞分離—卵高継代によるワクチン製造株の開発を行った。
- 地衛研と共同で薬剤耐性株のモニターと試験法のEQA予備試験を実施した。
- 新型インフルエンザとしてヒト社会で流行する可能性を秘めたウイルスによるヒト感染事例が発生した際に、速やかにリスク評価できるように、ウイルスレセプター特異性を簡便に鑑別できる系の構築と、改良を行った。
- 4価インフルエンザワクチンの免疫原性を評価するために、成人層および老人層のワクチン接種前後の抗体価を赤血球凝集抑制（HI）試験で測定した。

（倫理面への配慮）

ワクチン接種前後の成人層および老人層の血清抗体の採取においては、患者・協力者には十分な説明を行い書式にて署名にて了解を得た。なお本調査は新潟大学医学部倫理委員会にて承認された。

C. 研究結果

①A/H3N2 亜型ウイルスの分離・増殖効率を改善するため、細胞株の探索・樹立を目的に A549

細胞、MRC5 細胞および Mv1-Lu 細胞について増殖性を検討した。期待に反して、これらの細胞は現行使用の MDCK-SIAT1（SIAT1）細胞より、増殖効率が劣っており、サーベイランスには不適であることが分かった。さらに、別の細胞で検討を継続する。

②A/H3N2 亜型株の抗原性解析に中和試験法を用いているが、精度面と国際標準化を目指すために、FRA 法の確立、実際のサーベイランスへの導入に向けた検討を行い、実施可能であることが確認された。

③2016/17 シーズンの国内外から収集した A(H1N1)pdm09 および B 型流行株について、抗原性解析を行った。その結果、A(H1N1)pdm09 はワクチン株と流行株の抗原性が異なっていたため、次シーズンはワクチン株の変更が必要と判断された。一方、B 型についてはビクトリア系統、山形系統とも変化しておらず、ワクチン株の変更は不要と考えられた。

④2015/16, 2016/17 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 ウイルスはサブクレード 6B.1 が主流であった。A(H3N2) ウイルスはほぼ全てがクレード 3C.2a であり、2016/17 シーズンには 3C.2a1 が派生した。B 型では、Yamagata 系統はクレード 3 が、Victoria 系統はクレード 1A が継続して流行した。

⑤近年の A(H3N2) ウイルスは、トリ型レセプターとの親和性が低く、ワクチン製造に用いる鶏卵分離株を確保することは非常に困難である。これを改善するために、1) 凍結融解をせずにウイルスタイターが高い状態で羊膜腔に接種する方法と、2) 細胞で増殖させたウイルスを羊膜腔に接種する二通りの方法により、ウイルスの鶏卵における増殖効率が改善させるかどうかを検証した。1)の手法では B 型ウイルスは回収できたが、A(H3N2)は実施した 94 検体いずれからも回収されなかった。一方、2)の手法では、A/埼玉/103/2014 が分離され、ワクチン候補株となった。このことから、2)の手法が

A(H3N2)ワクチン候補株の回収には有効であることが示された。

⑥既報に従って、国内外から収集した流行株について薬剤感受性試験を実施し、A(H1N1)pdm09型から2株の耐性株を検出した。また、耐性株サーベイランス精度を向上させるために、検出系のEQAを試験的に実施した。その結果、コア・サポート地衛研では、検査精度が十分に保持されていることが確認された。

⑦一般的に、国産のインフルエンザワクチンは海外のものに比べて免疫原性が低いといわれている。平成27年度からわが国では4価ワクチンが導入されたこともあり、国産ワクチンの免疫原性について再評価する必要がある。成人層99名(平均年齢42歳)と、高齢者層49名(平均年齢85歳)のワクチン接種前後の抗体価をHI試験法で評価した。その結果、A型ワクチンは国際基準を満たしていたが、B型ワクチンはそれを満たしておらず、改良の必要性が示唆された。

⑧新型インフルエンザとなりうる鳥インフルエンザウイルスのヒト感染事例が発生した場合には、迅速かつ的確にウイルスの詳細な性状解析を実施し、ヒト社会での拡散いわゆるパンデミックリスク評価が必要になる。その評価手法の一つを確立するために、レセプター結合特異性実験系の改良を行い、さらに次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析を行った。その結果、新規に合成したシアロ糖鎖ポリマーを用いたより信頼性の高いレセプター結合実験系を構築できた。

D. 考察

インフルエンザ株サーベイランス基盤を強固にし、ウイルス分離用臨床検体およびウイルス分離株の収集力を高めることは、精度の高いサーベイランスとワクチン株の検索、選定幅を広げるために必要な対応である。

本研究班では、ウイルス分離効率を高める試

みとして、現行のウイルス分離に使用している培養細胞より効率の高い細胞がないか検索しているが、まだ見つかっておらず今後も精力的に適切な細胞の特定を続けたい。

最近のA(H3N2)亜型ウイルスは、分離効率が低く、赤血球凝集活性も低く、従来の手法を用ではウイルスの確保および抗原性解析に困難を極めている。諸外国のWHO-CCおよび本研究班では、分離用細胞の変更の検討および中和試験法の採用でそれを克服しようとしているが、まだ途中段階で諸外国のWHO-CCと技術的なすり合わせをしつつ、同一の手法の導入と国際標準化を進めていきたい。次シーズンから改訂したシステムを実稼働させる予定である。

現在国内外で使用されているA(H3N2)ワクチンは、卵馴化による抗原変異が甚だしく、流行株からの抗原性の乖離が大きく、ワクチンの有効性を低下させている。国内外のワクチン対策に影響を与えているこの問題を克服できるワクチン株A/埼玉/103/2014の開発に、本研究班が成功した。このワクチン株は、卵馴化しても流行株に近い抗原性を維持しており、この株を採用した場合は、有効性の期待できるA(H3N2)ワクチンを供給できる。このため、A/埼玉/103/2014株はWHOからもワクチン候補株として認定され、世界標準ワクチン株として本研究班から供給可能となっている。本研究班の国際貢献の典型例となった。今後も、このような利点を持った日本発の世界標準ワクチン株をどんどん供給していきたい。

4価ワクチンの免疫原性を本研究班で評価したところ、B型ワクチンは世界基準値を下回り、有効性の期待できない力価不足のワクチンとなっていることが判明した。ワクチンの抗原量を増加させる等の改善が必要であり、それに向けての対応を提言したい。

E. 結論

● より分離効率の良い培養細胞を検索し、株

サーベイランスにおけるウイルス回収力の向上を図った。まだ検討が継続中である。

- 2016/17 シーズンのインフルエンザ流行株の抗原性解析、遺伝子解析、薬剤耐性感受性試験を実施した。前シーズンから大きな変化はなかった。
- 薬剤耐性株検出検査のEQAの試験実施を行った。コア・サポート地衛研では、期待どおりの精度で、検査が実施されていた。
- A(H3N2)亜型ウイルスの抗原性解析手法の改良と国際標準化を完了し、次シーズンから本格的に導入ができる見通しができた。
- 卵に馴化させても抗原変異しないワクチン株 A/埼玉/103/2014 の開発に成功し、わが国発のWHO承認世界標準ワクチン株として、国内外のワクチンメーカーに供給できるようになった。
- 国産ワクチンの B 型ワクチンの免疫原性は低い。改良が必要。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ・ Takashita E, Ejima M, Ogawa R, Fujisaki S, Neumann G, Furuta Y, Kawaoka Y, Tashiro M, Odagiri T., Antiviral susceptibility of influenza viruses isolated from patients pre- and post-administration of favipiravir., *Antiviral Res.*, 132, 170-7, 2016
- ・ Fudo S, Yamamoto N, Nukaga M, Odagiri T., Tashiro M, Hoshino T, Two Distinctive Binding Modes of Endonuclease Inhibitors to the N-Terminal Region of Influenza Virus Polymerase Acidic Subunit., *Biochemistry.*, 55(10), 2646-60, 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
- ・ Onodera T, Hosono A, Odagiri T., Tashiro M, Kaminogawa S, Okuno Y, Kurosaki T, Ato M, Kobayashi K, Takahashi Y., Whole-Virion Influenza Vaccine Recalls an Early Burst of High-Affinity Memory B Cell Response through TLR Signaling., *J Immunol.*, 196(10), 4172-84, 2016
- ・ Ishikane M, Kamiya H, Kawabata K, Higashihara M, Sugihara M, Tabuchi A, Kuwabara M, Yahata Y, Yamagishi T, Odagiri T., Sugiki Y, Ohmagari N, Matsui T, Oishi K, Seasonal influenza vaccine (A/New York/39/2012) effectiveness against influenza A virus of health care workers in a long term care facility attached with the hospital, Japan, 2014/15: A cohort study., *J Infect Chemother.*, 22(11), 777-9, 2016
- ・ Sriwilaijaroen N, Magesh S, Imamura A, Ando H, Ishida H, Sakai M, Ishitsubo E, Hori T, Moriya S, Ishikawa T, Kuwata K, Odagiri T., Tashiro M, Hiramatsu H, Tsukamoto K, Miyagi T, Tokiwa H, Kiso M, Suzuki Y., A Novel Potent and Highly Specific Inhibitor against Influenza Viral N1-N9 Neuraminidases: Insight into Neuraminidase-Inhibitor Interactions., *J Med Chem*, 59(10), 4563-77, 2016
- ・ Li C, Hatta M, Burke DF, Ping J, Zhang Y, Ozawa M, Taft AS, Das SC, Hanson AP, Song J, Imai M, Wilker PR, Watanabe T, Watanabe S, Ito M, Iwatsuki-Horimoto K, Russell CA, James SL, Skepner E, Maher

- EA, Neumann G, Klimov AI, Kelso A, McCauley J, Wang D, Shu Y, Odagiri T, Tashiro M, Xu X, Wentworth DE, Katz JM, Cox NJ, Smith DJ, Kawaoka Y, Selection of antigenically advanced variants of seasonal influenza viruses., *Nat. Microbiol.*, 1(6), 16058, 2016
- Sakai K, Ami Y, Nakajima N, Nakajima K, Kitazawa M, Anraku M, Takayama I, Sangsriratanakul N, Komura M, Sato Y, Asanuma H, Takashita E, Komase K, Takehara K, Tashiro M, Hasegawa H, Odagiri T, Takeda M., *TMPRSS2 Independency for Haemagglutinin Cleavage In Vivo Differentiates Influenza B Virus from Influenza A Virus.*, *Sci. Rep.*, 6, 29430, 2016
 - Yokoyama M, Fujisaki S, Shirakura M, Watanabe S, Odagiri T, Ito K, Sato H., *Molecular Dynamics Simulation of the Influenza A(H3N2) Hemagglutinin Trimer Reveals the Structural Basis for Adaptive Evolution of the Recent Epidemic Clade 3C.2a.*, *Front Microbiol.*, 8, 584, 2017
 - Naito T, Mori K, Ushirogawa H, Takizawa N, Nobusawa E, Odagiri T, Tashiro M, Ohniwa RL, Nagata K, Saito M., *Generation of a Genetically Stable High-Fidelity Influenza Vaccine Strain.*, *J Virol.*, 91(6), pii:e01073-16, 2017
2. 学会発表
- Takashita E, Ejima M, Ogawa R, Fujisaki S, Neumann G, Furuta Y, Kawaoka Y, Tashiro M, Odagiri T. *Antiviral susceptibility of influenza viruses isolated from patients pre-and post-administration of favipiravir.* *Options IX for the Control of Influenza.* August 2016. Chicago, USA.
 - Kishida N, Imai M, Ainai A, Saito R, Nakamura K, Kuwahara T, Fujisaki S, Takashita E, Shirakura M, Kashiwagi Y, Tashiro M, Odagiri T, Watanabe S. *Evaluation of efficacy of an inactivated high growth reassortant whole-virus seasonal influenza vaccine in ferret.* *Options IX for the control of influenza,* Chicago, USA, 2016
 - Kishida N, Imai M, Ainai A, Saito R, Nakamura K, Kuwahara T, Fujisaki S, Takashita E, Shirakura M, Kashiwagi Y, Tashiro M, Odagiri T, Watanabe S. *Evaluation of efficacy of an inactivated high growth reassortant whole-virus A(H3N2) influenza vaccine in ferret.* *Options IX for the Control of Influenza.* August 2016. Chicago, USA.
 - Nakamura K, Shirakura M, Fujisaki S, Kishida N, Kuwahara T, Takashita E, Takayama I, Nakauchi M, Chadha M, Potdar V, Upadhyay BP, Shakya G, Odagiri T, Kageyama T, Watanabe S. *Characterizations of influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated from patients including fatal or severe cases in Nepal and India, early 2015.* *Options IX for the Control of Influenza.* August 2016. Chicago, USA.
 - Kawakami C, Fujisaki S, Takashita E, Sugawara H, Shimizu K, Ozawa H, Momoki T, Saikusa M, Usuku S, Sasao T, Watanabe S, Odagiri T. *Characterization of influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated from hospitalized cases in the 2015/16 season.* *Options IX for the Control of Influenza.* August 2016. Chicago, USA.
 - Kawakami C, Fujisaki S, Takashita E,

- Sugawara H, Shimizu K, Ozawa H, Momoki T, Saikusa M, Usuku S, Sasao T, Watababe S, Odagiri T. Gene analysis of influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated from hospitalized cases in the 2015/16 seasons. Options IX for the control of influenza, Chicago, USA, 2016
- Watanabe S, Nakamura K, Kishida N, Fujisaki S, Shirakura M, Takashita E, 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 for the 2016/17 season. 第64回日本ウイルス学会. 2016年10月. 札幌.
 - Kishida N, Imai M, Ainai A, Saito R, Nakamura K, Kuwahara T, Fujisaki S, Takashita E, Shirakura M, Kashiwagi Y, Tashiro M, Odagiri T, Watanabe S. Evaluation of efficacy of an inactivated whole-virus A/Victoria/361/2011 (IVR-165) (H3N2) influenza vaccine in ferret. 第64回日本ウイルス学会. 2016年10月. 札幌.
 - Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Shimazu Y, Shimomura T, Doi I, Watanabe S, Odagiri T, The Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Detection of influenza A(H1N1)pdm09 viruses exhibiting enhanced cross-resistance to oseltamivir and peramivir in the 2015/16 season. 第64回
- 日本ウイルス学会. 2016年10月. 札幌.
- 高下恵美, 小川理恵, 藤崎誠一郎, 白倉雅之, 三浦秀佳, 中村一哉, 岸田典子, 桑原朋子, 菅原裕美, 佐藤彩, 秋元未来, 渡邊真治, 小田切孝人. 2015/16 シーズンに検出されたオセルタミビル・ペラミビルに強い耐性を示すインフルエンザウイルス. 第48回日本小児感染症学会. 2016年11月. 岡山.

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

H. 健康危険情報

なし

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・樹立

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 第一室長

研究要旨

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] が慣習的に使用されている。近年、季節性インフルエンザウイルスのひとつである A/H3N2 亜型ウイルスについて、MDCK 細胞を用いた分離・増殖の効率低下の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が懸念されている。そこで本研究では、A/H3N2 亜型ウイルスの分離・増殖効率を改善する細胞株の探索・樹立を目的に各種細胞株を用いた検討試験を進めた。

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、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きた。しかしながら近年、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、ウイルス分離・増殖効率の改善を見込める細胞株を探索・樹立し、こ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標に、各種細胞株を用いた検討試験を進めた。

B. 研究方法

現在感染研では、MDCK-SIAT1 (SIAT1) 細胞と呼ばれる、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 A/H3N2 亜型ウイルスの分離・増殖に使用しており、ウイルスの分離・増殖効率改善に一定の効果を上げている。しかしながら、この SIAT1 細胞は培養維持費が高額であることと、海外研究機関で樹立された細胞である点で、地衛研での恒常的な使用については難しい面がある。そのため、SIAT1 細胞以外の以下の呼吸器系由来株化細胞およびインフルエンザウイルス分離に使用実績のある結腸由来株化細胞を用意し、インフルエンザウイルスの増殖効率を検討した。SIAT1 細胞は高いウイルス増殖を示す細胞株として比較対照に供した。

・ A549 細胞： ヒト肺由来株化細胞

- ・ Mv1-Lu 細胞： ミンク肺由来株化細胞
- ・ MRC5 細胞： ヒト胎児肺由来正常二倍体線維芽細胞
- ・ Detroit 562 細胞： ヒト咽頭由来株化細胞
- ・ Calu-3 細胞： ヒト気管支由来株化細胞
- ・ Caco-2 細胞： ヒト結腸由来株化細胞

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果および考察

A549 細胞、MRC5 細胞および Mv1-Lu 細胞について増殖性を検討した。A549 細胞においてはウイルスの増殖が認められたが、SIAT1 細胞との比較において増殖性は劣っていた。一方、MRC5 細胞および Mv1-Lu 細胞においては、ウイルス増殖がほとんど認められなかった。他の細胞株については現在検討中である。

D. 結論

現時点ではインフルエンザウイルスの分離増殖効率改善が見込める細胞株を選定できていない。すでに検討を行った細胞株については、培養条件やウイルス増殖に必要なトリプシンの添加量などについて検討を重ねるとともに、これまでに候補として挙げた以外の細胞株も検討対象として模索していく予定である。高増殖性細胞を樹立したのちは当該細胞などのレセプター発現量といった増殖性に寄与する要因も解明し、最適な細胞株の探索・樹立を目指す。

E. 研究発表

1. 論文発表

- ・ 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.

- ・ Li C, Hatta M, Burke DF, Ping J, Zhang Y, Ozawa M, Taft AS, Das SC, Hanson AP, Song J, Imai M, Wilker PR, Watanabe T, Watanabe S, Ito M, Iwatsuki-Horimoto K, Russell CA, James SL, Skepner E, Maher EA, Neumann G, Klimov AI, Kelso A, McCauley J, Wang D, Shu Y, Odagiri T, Tashiro M, Xu X, Wentworth DE, Katz JM, Cox NJ, Smith DJ, Kawaoka Y. Selection of antigenically advanced variants of seasonal influenza viruses. Nat Microbiol., 1:16058, 2016.
- ・ Ando T, Yamayoshi S, Tomita Y, Watanabe S, Watanabe T, Kawaoka Y. The host protein CLUH participates in the subnuclear transport of influenza virus ribonucleoprotein complexes. Nat Microbiol., 1:16062, 2016.
- ・ Sarawar S, Hatta Y, Watanabe S, Dias P, Neumann G, Kawaoka Y, Bilsel P. M2SR, a novel live single replication influenza virus vaccine, provides effective heterosubtypic protection in mice. Vaccine, 34:5090-5098, 2016.

2. 学会発表

- ・ 高下恵美、小川理恵、藤崎誠一郎、白倉雅之、三浦秀佳、中村一哉、岸田典子、桑原朋子、菅原裕美、佐藤彩、秋元未来、渡邊真治、小田切孝人. 2015/16 シーズンに検出されたオセルタミビル・ペラミビルに強い耐性を示すインフルエンザウイルス. 第48回日本小児感染症学会、岡山、2016
- ・ 宇田 和宏、古市 宗弘、小山 ちとせ、岩瀬 徳康、藤崎 誠一郎、渡邊 真治、庄司 健介、宮入 烈. 2015-16 年シーズンのインフルエンザ下気道炎の臨床的特徴. 第48回日本小児感染症学会、岡山、2016
- ・ Watanabe S, Nakamura K, Kishida N, Fujisaki S, Shirakura M, Takashita E, 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、2016
- ・ Takashita E, Fujisaki Y, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Shimazu Y, Shimomura T, Doi I, Watanabe S, Odagiri T. Detection of influenza A(H1N1)pdm09 viruses exhibiting enhanced cross-resistance to oseltamivir and peramivir in the 2015/16 season. 第64回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2016
- ・ Ando T, Yamayoshi S, Tomita Y, Watanabe S, Watanabe T, Kawaoka T. Analysis of the regulatory mechanisms of the subnuclear transport of influenza progeny ribonucleoprotein complexes. 第64回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2016
- ・ Kishida N, Imai M, Ainai A, Saito R, Nakamura K, Kuwahara T, Fujisaki S, Takashita E, Shirakura M, Kashiwagi Y, Tashiro M, Odagiri T, Watanabe S. Evaluation of efficacy of an inactivated whole-virus A/Victoria/361/2011 (IVR-165) (H3N2) influenza vaccine in ferret. 第64回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2016
- ・ Kawakami C, Fujisaki S, Takashita E, Saikusa M, Usuku S, Watanabe S. Characterization of influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated from hospitalized cases in the 2015/16 season. 第64回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2016
- ・ Ando T, Yamayoshi S, Watanabe S, Watanabe T, Kawaoka T. Involvement of CLUH in the subnuclear transport of influenza progeny ribonucleoprotein complexes. Options IX for the control of influenza, Chicago, USA, 2016
- ・ Nakamura K, Shirakura M, Fujisaki S, Kishida N, Kuwahara T, Takashita E, Takayama I, Nakauchi M, Chadha M, Potdar V,

Upadhyay BP, Shakya G, Odagiri T, Kageyama T, Watanabe S. Characterizations of influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated from patients including fatal or severe cases in Nepal and India, early 2015. Options IX for the control of influenza, Chicago, USA, 2016

- Kishida N, Imai M, Ainai A, Saito R, Nakamura K, Kuwahara T, Fujisaki S, Takashita E, Shirakura M, Kashiwagi Y, Tashiro M, Odagiri T, Watanabe S. Evaluation of efficacy of an inactivated high growth reassortant whole-virus seasonal influenza vaccine in ferret. Options

IX for the control of influenza, Chicago, USA, 2016

- Kawakami C, Fujisaki S, Takashita E, Sugawara H, Shimizu K, Ozawa H, Momoki T, Saikusa M, Usuku S, Sasao T, Watababe S, Odagiri T. Gene analysis of influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated from hospitalized cases in the 2015/16 seasons. Options IX for the control of influenza, Chicago, USA, 2016

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

インフルエンザ株サーベイランス A/H3N2 亜型株抗原性解析における中和試験法の改良

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。従来流行株の抗原性解析は赤血球凝集阻止（HI）試験を用いて行われてきたが、近年の赤血球凝集活性が極めて弱く HI 試験に供試できない A/H3N2 亜型株流行拡大を受け、前年度には中和試験法による A/H3N2 亜型株抗原性解析を確立、実用に供した。本年度はこの中和試験法を用いて A/H3N2 亜型株抗原性解析を実施するとともに、試験結果の再現性に課題を残す本手法の改良を目的に、ウイルス感染細胞巢減数試験法（Focus reduction assay, FRA）の確立、実際のサーベイランス業務への応用に向けた種々の条件検討を行い、A/H3N2 亜型分離株抗原性解析の精度向上に寄与した。

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。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、近年の H3N2 亜型分離株の抗原性解析は中和試験法を代替手法として実施してきた。しかしながら、中和試験法による抗原性解析では試験ごとの結果安定性に疑義が生じることがあり、試験結果再現性を

より高めるために手法の改良が求められている状況である。本研究では中和試験法による分離株抗原性解析試験の結果の安定度、信頼性を向上させ、将来の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、従来の中和試験法を改良したウイルス感染細胞巢減数試験法（Focus reduction assay, FRA）の抗原性解析試験への導入に向けての種々の検討を行い FRA による H3 亜型分離株の抗原性解析法として確立させた。

B. 研究方法

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

2015/2016 および 2016/2017 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、抗原性解析に供した。

3) ウイルス分離・継代

SIAT1 細胞を 25cm² 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、3・g/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) 中和試験従来法

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 に記載の方法に準じて行った。参照血清の 2 倍階段希釈列を 96 穴プレート上で作製後、100TCID₅₀/50・1 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°C の CO₂ 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 (ELISA) 法によるウェルの呈色反応をもってウイルス感染細胞の存否を判定した。中和抗体価は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算定した。

5) FRA

参照血清の 2 倍階段希釈列を作製し、前日に SIAT1 細胞を 2.5x10⁴/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、Avicel ないしカルボキシメチルセルロース (CMC) 半流動体ゲルを各ウェルに添加した。18-20 時間、34°C の CO₂ インキュベーター内で培養後、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。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

2016 年度のインフルエンザサーベイランス分離株抗原性解析は中和試験従来法を用いて行った。A/香港/4801/2014 株は 2016/17 シーズンの国内用ワクチン株である。この株をフェレットに感染して得た抗血清と野外分離株との反応性を見た場合、2016 年 3-8 月期には 7 割以上、2016 年 9 月以降 7 割程度の野外分離株が抗血清作製に用いたウイルスとの中和抗体反応価 (ホモ価) と比べて同等 (4 倍差以内) の中和抗

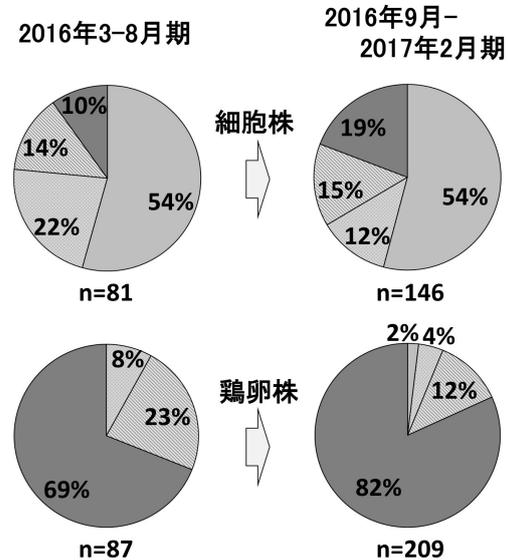
体価を示していた。ワクチン製造に供される同鶏卵株、高増殖性株の場合では2016年3月以降、それぞれの抗血清との中和抗体価がホモ価に比べ4倍差以内に収まっている野外分離株は1割未満であり、分離株の多くがワクチン株と抗原性が異なっている傾向が認められた(図1 a)。一方でA/埼玉/103/2014株は細胞株、鶏卵株ともにこれらに対する抗血清との抗体価がホモ価と同等である野外分離株が7割以上であり、A/埼玉/103/2014株と野外分離株との抗原的類似性が確認された(図1 b)。

これら結果は国内外の2017/18シーズン用ワクチン株選定会議に際しての有用な資料として活用された。しかしながら、この従来の中和試験法では算定される抗体価が供試株の細胞での増殖性差異の影響を受け、必ずしも分離株のHA抗原性と相関しないことが懸念されており、細胞感染に主要な役割を果たすウイルスHAと赤血球上受容体との結合、及びこの阻害反応に基づいてHAの抗原性を評価するHI試験に比して抗原性の評価に必ずしもそぐわない状況が明らかになってきた。一方でFRAは抗血清により中和されなかったウイルスが細胞に感染した後、半流動体ゲルにより細胞を覆うことにより、感染細胞内で増殖したウイルスが遊離し他の細胞に伝播する多段階増殖を抑制することで、ウイルスが細胞に感染、侵入する段階に絞った観察を行うことができる。そこで、抗血清によるウイルスの感染抑制効果ならびにHA抗原性のより正確な評価を期待し、FRAの抗原性解析試験への実用導入に向けての検討を進めた。

FRAにおいては形成されるfocusの大きさ、形態が供試株や試験ごとに異なることが解析結果の再現性確保に難を生じる可能性を考慮し、形成focusの均一性を図れる

図1 各種フェレット抗血清とA/H3N2亜型分離株との反応性

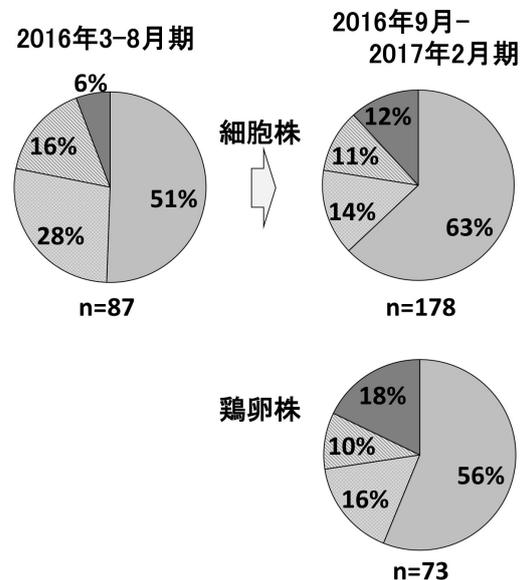
a) 抗A/香港/4801/2014血清



抗血清との抗体反応価がホモ価に比べて
 ■: 2倍以内、▨: 4倍、▩: 8倍、■: 16倍以上の低下。

図1 続き

b) 抗A/埼玉/103/2014血清



抗血清との抗体反応価がホモ価に比べて
 ■: 2倍以内、▨: 4倍、▩: 8倍、■: 16倍以上の低下。

ウイルス感染条件や使用する重層ゲルについて検討を行った。結果、Avicelを重層した場合には株によるfocusの形態や大きさ

の違いが著しく、focus 数を自動計数する際の認識誤差の原因になることが予想された (図 2 a)。CMC を重層した場合には focus の均一性に改善が認められた (図 2 c)、CMC 重層後のウイルス感染拡散抑制が不十分なことによるとと思われる focus の増数が観察されたため、FRA への使用には引続きの検討を要した。インフルエンザの細胞での多段階増殖には HA を開裂させるためにトリプシンが要求されるが、このトリプシンを被験プレートに添加せず、ウイルスの多段階増殖を抑制させた場合の形成 focus 像を検討した結果、上述の形成 focus の不均一性が顕著であった Avicel 重層の手法において、focus 発色減弱が認められたものの、focus の形態や大きさにある程度の均一化を図ることができた (図 2 b)。この条件において、抗原解析用参照ウイルス株及びこれらに対する抗血清を用いて FRA を実施したところ、供試ウイルス抗原と抗血清との

反応性を概ね反映した結果が観察されることを確認できた (図 3)。

図 2 感染条件、重層ゲルによる形成 focus の差異

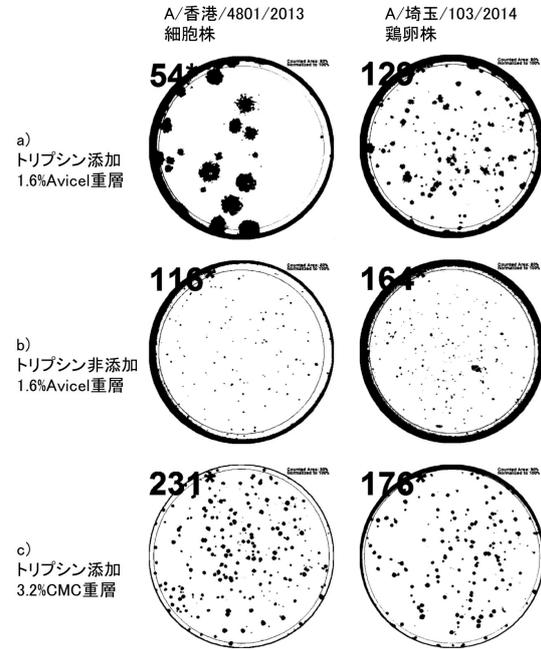
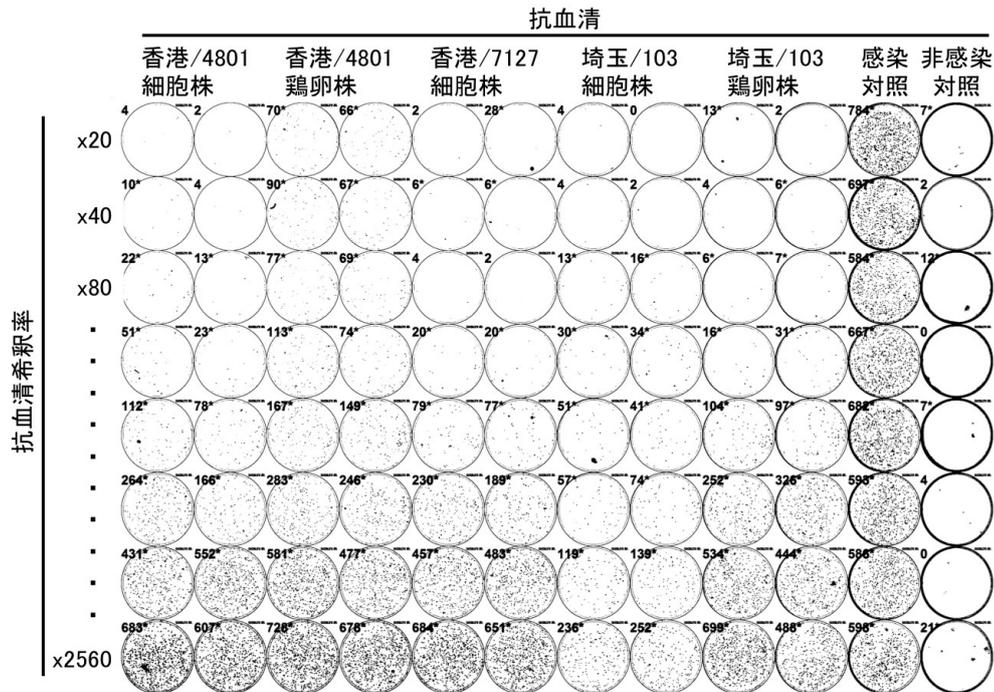


図 3 FRA 試験プレートの focus 形成像一例



供試抗原ウイルス:A/埼玉/103/2014細胞株
トリプシン非添加 1.6% Avicel 重層

複数の試験プレートの結果を解析し、得られた中和抗体価測定結果を以下にまとめた。予想される各参照ウイルス株間の抗原性差異が示されており、実際のインフルエンザ

株サーベイランスにおいて、本手法が A/H3N2 亜型分離株抗原性解析に適用可能であることを確認した。

FRAにより算出された参照ウイルス株間の中和抗体価

参照ウイルス株	抗血清			
	香港/4801 細胞株	香港/7127 細胞株	埼玉/103 細胞株	埼玉/103 鶏卵株
A/香港/4801/13 細胞株	640	640	640	160
A/香港/7127/13 細胞株	160	320	160	160
A/埼玉/103/14 細胞株	320	320	1280	320
A/埼玉/103/14 鶏卵株	<20	40	40	160

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、従来の手法で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。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強く望まれるものである。本研究では、近年の A/H3N2 亜型野外分離株の抗原性解析に用いられている中和試験法のさらなる精度向上、再現性確保を目的に、ウイルス感染細胞巢減数試験法 (Focus reduction assay, FRA) について、種々の条件検討を行い、実際の業務における抗原性解析改良手法としての有用性を示した。

E. 結論

H3N2 亜型分離株抗原性解析は従来の HI 試験では行えない近年の状況を踏まえて、中和試験法が用いられている。抗原性解析試験のさらなる精度向上を目的に、ウイルス感染細胞巢減数試験法 (Focus reduction assay, FRA) を抗原性解析試験改良法とし

て確立した。次期 2017/18 シーズンの分離株抗原性解析にはこの改良手法を導入して、至適なワクチン製造用株の選定に結びつく資料を国内外の株選定会議に提供していく。

F. 研究発表

1. 論文発表

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

2. 学会発表

- Shinji Watanabe, Kazuya Nakamura, Noriko Kishida, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Emi Takashita, Tomoko Kuwahara, Aya Sato, Rie Ogawa, Hiromi Sugawara, Miki

Akimoto, Hideka Miura, Takato Odagiri, 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
2016 年 10 月

- ・ 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.

第 64 回日本ウイルス学会学術集会
2016 年 10 月

- ・ Emi Takashita, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Kazuya Nakamura, Noriko Kishida, Tokoko Kuwahara, Yukie Shimazu, Takeshi Shimomura, Ikuko Doi, Shinji Watanabe, Takato Odagiri, The Influenza Surveillance Group of Japan. Detection of influenza A(H1N1)pdm09 viruses exhibiting enhanced cross-resistance to oseltamivir and peramivir in the 2015/16 season.

第 64 回日本ウイルス学会学術集会
2016 年 10 月

3. その他

なし

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

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 ビクトリア系統および B 山形系統の 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、2016/17 シーズンに国内および海外（台湾、モンゴル、ラオス）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赤血球凝集阻止試験により実施した。解析結果から、A(H1N1)pdm09 分離株は 2016/17 シーズンワクチン株とは抗原性が異なることがわかった。B 型はいずれの系統の分離株も 2016/17 シーズンワクチン株に抗原性が類似していた。以上から、A(H1N1)pdm09 は 2017/18 シーズンのワクチン株を変更する必要があると考えられる。B 型についてはいずれの系統もめだだった抗原性変異株の出現がなかったことから、ワクチン株の変更の必要性は低いと考えられた。

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、それにもなつ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

2016 年 9 月から 2017 年 3 月までの A(H1N1)pdm09 と B 型の分離株または臨床検体を国内と海外（台湾、モンゴル、ラオス）から収集し、フェレット感染血清をもちいた HI 試験による抗原性解析を行った。A(H1N1)pdm09 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。国内株については、全国の地方衛生研究所から分離株、関東圏の病院から臨床検体の提供をうけた。

（倫理面への配慮）

C. 研究結果

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（図 1）。しかしながら、ワクチン接種者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（図 2）。

図 1 抗A/California/7/2009血清
9月/2016 - 2月/2017

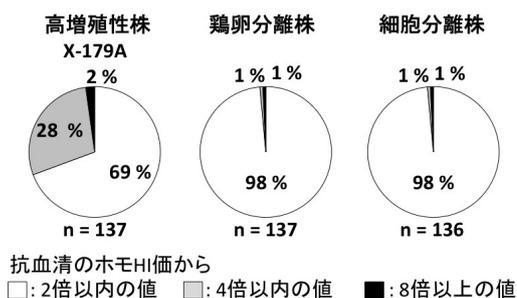
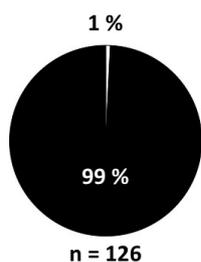


図2 X-179Aを含むワクチン接種者の血清と流行株(9月/2016 – 2月/2017)との反応性

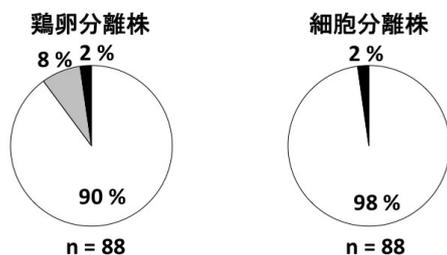


抗血清のホモHI価から
 □: 2倍以内の値 ▨: 4倍以内の値 ■: 8倍以上の値

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(図3)。

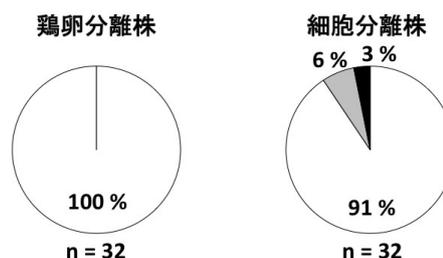
図3 抗B/Texas/02/2013血清 9月/2016 – 3月/2017



抗血清のホモHI価から
 □: 2倍以内の値 ▨: 4倍以内の値 ■: 8倍以上の値

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(図4)。

図4 抗B/Phuket/3073/2013血清 9月/2016 – 3月/2017



抗血清のホモHI価から
 □: 2倍以内の値 ▨: 4倍以内の値 ■: 8倍以上の値

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

A(H1N1)pdm09：2016/17シーズン分離株はワクチン株のフェレット感染血清とよく反応したが、ワクチン接種者血清と流行株との反応性については、ほとんどの流行株で8倍の反応性低下が認められた。通常、フェレット感染血清を用いたHI試験では、8倍以上の反応性の低下を示す株を抗原性変異株と判定する。この反応性の低下に最も大きく影響を及ぼしているのは卵馴化により生じたHAレセプター結合部位に存在するアミノ酸置換 Q223R と考えられた。さらに、16/17シーズンの流行の主流であるクレード6B1に属するウイルスのHAの特徴的アミノ酸置換(K163Q, S162N)も影響を及ぼしていることが考えられた。これら2つのアミノ酸は抗原部位に位置し、さらにS162Nのアミノ酸置換は糖鎖付加されることが予想され、抗原性の変化への影響が考えられる。一部のワクチン接種者の血清は、この抗原性の差を区別できるが、フェレット感染血清ではこの抗原性の差を区別できないと考えられる。以上から、16/17シーズン分離株の抗原性はワクチン株 A/California/7/2009 (X-179A) から抗原性が異なることが明らかになった。

Bビクトリア系統とB山形系統はいずれも2016/17シーズンの流行株はワクチン類似株が流行の主流であり、抗原性の変化は起っていないことがわかった。

E. 結論

2016/17 シーズンのワクチン株と流行株の抗原性が異なっていた 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、めだつ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, 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

2. 学会発表

- Evaluation of efficacy of an inactivated high growth reassortant whole-virus A(H3N2) influenza vaccine in ferret 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
Options IX for the control of influenza
24 - 28 August, 2016, Chicago

- Evaluation of efficacy of an inactivated whole-virus A/Victoria/361/2011 (IVR-165) (H3N2) influenza vaccine in ferret 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 The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology 23 - 25 October, 2016, Sapporo

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

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・研究員

研究要旨

2015/16, 2016/17 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 ウイルスはサブクレード 6B.1 が主流であった。A(H3N2) ウイルスはほぼ全てがクレード 3C.2a であり、2016/17 シーズンには 3C.2a1 が派生した。B 型では、Yamagata 系統はクレード 3 が、Victoria 系統はクレード 1A が継続して流行した。2016/17 シーズンには、A(H3N2) ウイルスには多様な遺伝子集団が出現し流行したため、今後のウイルス伝播の動向に注意を払う必要がある。

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

2015/16, 2016/2017 シーズンに国内および海外（ラオス、台湾、モンゴル、韓国、ネパール、ミャンマー）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、2015/16 シーズンには A(H1N1)pdm09 を 329 株、A(H3N2) を 234 株、B 型を 393 株、2016/17 シーズン（2017 年 4 月時点）には A(H1N1)pdm09 を 96 株、A(H3N2) を 326 株、B 型を 69 株、解析を行った。

（倫理面への配慮）
該当なし

C. 研究結果

A(H1N1)pdm09 ウイルス:HA 遺伝子系統樹上で、

2015/16, 2016/17 シーズンの分離株は全てクレード 6B に属していた。2015/2016 シーズンは 6B 内の 6B.1（アミノ酸置換：S84N, S162N, I216T）、6B.2（V152T, V173I, E491G, D501E）のうち 6B.1 が主流であったが、2016/17 シーズンには全ての株が 6B.1 に属した。NA タンパク質に薬剤耐性マーカーのアミノ酸置換 H275Y を有する株はごく少数検出されたが、流行は認められなかった。

A(H3N2) ウイルス：現在の流行株は HA 遺伝子系統樹上でクレード 3C.2a(L3I, N144S, K160T, N255D, Q311H, F159Y) と 3C.3a（A138S, F159Y, N225D）の 2 つに分岐している。2015/2016, 2016/17 シーズンはほぼ全ての株が 3C.2a に属した。2016/2017 シーズンには 3C.2a 内に複数のクレードが形成され、サブクレード 3C.2a1(N171K, I406V, G484E) が 67.5%と最も多く、その他 3C.2a 内に細分化した遺伝子集団が派生した。

B 型ウイルス：Yamagata 系統では、分離株は HA タンパク質に S150I, N165Y, N202S, S229D を持つクレード 3（代表株：B/Wisconsin/1/2010, B/Phuket/3073/2013）が主流であった。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 株を代表とするサブクレード 1A に属した。これらの傾向は過去 3 年近く変化していない。

D. 考察

2016/17 シーズンは A(H3N2) ウイルスが流行の主流であった。A(H3N2) ウイルスでは遺伝子変異によるアミノ酸置換が蓄積され、遺伝子的に多様な集団が形成されている。各集団に特徴的なアミノ酸置換と抗原性変異の関連性は明らかにされておらず、引き続き注視していく必要がある。A(H1N1)pdm09 ウイルスは流行規模が小さく抗原性変異株の流行も認められていない。B 型両系統のウイルスは遺伝子的に大きな変化はなく、抗原性変異に関与するアミノ酸置換を持つ株の流行も確認されていないが、継続した監視が必要と考えている。

E. 結論

A(H3N2) ウイルスはクレード 3C.2a, 3C.2a1 内で多様化した各遺伝子集団の今後の流行状況と抗原性の変異について注視したい。A(H1N1)pdm09 ウイルスは今年度流行が少なかったため、来年度に流行規模が拡大するのか、また遺伝子および抗原性の変異株が出現するのか懸念される。B 型は Yamagata, Victoria 両系統が混合流行しており今後も流行状況を監視する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 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

- Takashita E, Ejima M, Ogawa R, Fujisaki S, Neumann G, Furuta Y, Kawaoka Y, Tashiro M, Odagiri T., Antiviral susceptibility of influenza viruses isolated from patients pre- and post-administration of favipiravir., Antiviral Res., 132, 170-7, 2016
- 渡邊真治, 藤崎誠一郎, 中村一哉, 香港型インフルエンザウイルスの最近の変異(性状変化), インフルエンザ, Vol.17 No.3, 37-44, 2016

2. 学会発表

- 高下恵美、小川理恵、藤崎誠一郎、白倉雅之、三浦秀佳、中村一哉、岸田典子、桑原朋子、菅原裕美、佐藤彩、秋元未来、渡邊真治、小田切孝人 2015/16 シーズンに検出されたオセルタミビル・ペラミビルに強い耐性を示すインフルエンザウイルス 第 48 回日本小児感染症学会総会・学術集会、岡山、2016
- 宇田 和宏、古市 宗弘、小山 ちとせ、岩瀬 徳康、藤崎誠一郎、渡邊 真治、庄司 健介、宮入 烈 2015-16 年シーズンのインフルエンザ下気道炎の臨床的特徴 第 48 回日本小児感染症学会総会・学術集会、岡山、2016
- Emi Takashita, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Kazuya Nakamura, Noriko Kishida, Tomoko Kuwahara, Yukie Shimazu, Takeshi Shimomura, Ikuko Doi, Shinji Watanabe, Takato Odagiri, The Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Detection of influenza A(H1N1)pdm09 viruses exhibiting enhanced crossresistance to oseltamivir and peramivir in the 2015/16 season. 第 64 回日本ウイルス学

会学術集会、札幌、2016

- ・ Shinji Watanabe, Kazuya Nakamura, Noriko Kishida, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Emi Takashita, Tomoko Kuwahara, Aya Sato, Rie Ogawa, Hiromi Sugawara, Miki Akimoto, Hideka Miura, Keiko Mitamura, Takashi Abe, Masataka Ichikawa, Masahiko Yamazaki, Takato Odagiri. Characterizations of circulating influenza viruses in the 2015/2016 season and vaccine viruses for the 2016/17 season. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2016
- ・ 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. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2016
- ・ Chiharu Kawakami, Seiichiro Fujisaki, Emi Takashita, Miwako Saikusa, Syuzo Usuku, Shinji Watanabe. Characterization of Influenza A(H1N1)pdm09 Viruses Isolated from Hospitalized Cases in the 2015/16 Season. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2016

G. 知的財産権の出願・登録状況

- ・ なし

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・研究員

研究要旨

現行の季節性インフルエンザワクチンは、臨床検体を発育鶏卵（鶏卵）に接種し、鶏卵で分離したウイルスを用いて作製される。しかしながら、近年の A(H3N2)ウイルスは、トリ型レセプターとの親和性が低いため、鶏卵で増殖させることは非常に困難である。そこで我々は、地方衛生研究所から凍結保存された臨床検体を取り寄せ、臨床検体を鶏卵の羊膜腔に直接接種する従来の方法に加え、前シーズン（2015/16 シーズン）と今シーズン（2016/17 シーズン）にわたり、新たな 2 通りの方法を試すことにより、ウイルスの鶏卵における増殖効率が改善するかどうかを検証した。2016/17 シーズン中は、1) 凍結保存する前の臨床検体を病院から取り寄せ、ウイルスタイターがなるべく高い状態で羊膜腔に接種する方法を試みた。2015/16 シーズン中には、2) 臨床検体を細胞培養ワクチン用の細胞で増やしてから鶏卵の羊膜腔に接種することにより、ウイルスの鶏卵での分離を試みた。本報告書では、1)の方法で鶏卵にウイルスを接種した結果と、前年度に 2)の方法で分離した A/Saitama/103/2014 株のワクチン候補株としての経過を報告する。

A. 研究目的

季節性インフルエンザワクチン推奨株は、5 つの WHO Collaborating Centre (WHOCC) によって、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 WHOCC の 1 つとして、より有効性の高いワクチン株の選定に貢献するため、発育鶏卵を用いたワクチン候補株の分離を行っている。近年の 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。また、従来のように凍結保存された臨床検体を鶏卵の羊膜腔に接種する方法では、ほぼ分離が不可能となっている。そこで、我々は 1) 凍結融解をせずにウイルスタイターが高い状態で羊膜腔に接種する方法と、2) 細胞で増殖させたウイルスを羊膜腔に接種する二通りの方法により、ウイルスの鶏卵における増殖効率が改善されるかどうかを検証した。

B. 研究方法

臨床検体は、2016/17 シーズンに東京都と神奈川県 の 4 つの病院で集められたものを用いた。臨床検体到着後、まず RT-LAMP 法により亜型同定とウイルスゲノム量の測定を行い、ウイルスゲノム量が低いものを除外した。その後、発育鶏卵（鶏卵）（8 日齢または 10 日齢）の羊膜腔に 200 μ l ずつ接種した。羊膜腔で増えたウイルスは、ワクチン候補株として十分な量を確保

するため、さらに漿尿膜腔で継代した。ウイルスが鶏卵で増殖したかどうかは、RT-LAMP 法でウイルスゲノム量を測定することにより調べた。

（倫理面への配慮）

該当なし

C. 研究結果

2016/17 シーズンに、東京都と神奈川県 の 4 つの病院から取り寄せた臨床検体は、合計 119 株で、A(H1N1)pdm09 ウイルスが 0 株、A(H3N2) ウイルスが 94 株、B 型ビクトリア系統のウイルスが 20 株、B 型山形系統のウイルスが 5 株だった。これらのウイルスを鶏卵に接種した結果、A(H3N2)ウイルスでは 94 株中 1 株も鶏卵で増殖しなかった。一方で、B 型ウイルスでは、ビクトリア系統で 18 株、山形系統で 4 株が鶏卵で増殖した。

鶏卵で分離した B 型ビクトリア系統の B/Kanagawa/AC1623/2017 ウイルスに関して、HA と NA の遺伝子解析を行った。その結果、臨床検体と比較して、HA では 1 箇所のアミノ酸置換が認められたが、NA に変異は認められなかった。アミノ酸置換が認められたのは、199 番目アミノ酸で、糖鎖付加に関与する場所だった。このウイルスのフェレット抗血清を作製し、HI 試験により流行株との反応性を調べたとこ

ろ、解析した流行株 83 株中 82 株と抗原的に類似していた。

鶏卵で分離した B 型山形系統のウイルスにおいては、B/Kanagawa/IC1617/2017 と B/Kanagawa/IC1641/2017 の 2 株について HA と NA の遺伝子を解析した。その結果、両株とも細胞分離株と比較して、HA では 1 箇所のアミノ酸置換が認められたが、NA に変異は認められなかった。アミノ酸置換が認められた 198 番目のアミノ酸は、糖鎖付加に関与することが分かっている。B/Kanagawa/IC1617/2017 に対するフェレット抗血清を作製し、流行株との抗原性を調べたところ、解析した流行株 20 株の全てと抗原的に類似していた。今後、これらのウイルスをリアソータントラボに送り、ワクチン用の高増殖株を作製することを検討している。

昨年度、臨床検体を細胞培養ワクチン用の MDCK 細胞に接種し、その後鶏卵に接種して増殖させた A/Saitama/103/2014 株 (H3N2) は、遺伝子解析の結果、細胞分離株と比較して、NA に 9 箇所のアミノ酸置換があったが、HA には抗原部位ではない 1 箇所にしかアミノ酸置換が認められなかった。通常、ウイルスを鶏卵で分離すると、HA の抗原部位に変異が入り、抗原性が変化してしまう。HA はインフルエンザウイルスの主要抗原であるため、ワクチン株を選定する上でこれは大きな問題となっている。我々が分離した A/Saitama/103/2014 株は、鶏卵で分離しても HA の抗原部位に変異が入らなかった非常に珍しいウイルスである。そのため、鶏卵分離 A/Saitama/103/2014 株は、2017 年 2 月に WHO 本部で開催されたワクチン株選定会議において、WHO が推奨するワクチン候補株として認定された。さらに、国内のワクチン株選定会議において、次シーズンのワクチン株として推奨された。現在、鶏卵分離 A/Saitama/103/2014 株の詳細な性状解析を進めている。

D. 考察

今回、B 型系統のウイルス 22 株を鶏卵で分離した。そのうち、ビクトリア系統の 1 株と山形の 1 株について、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。その結果、解析したほぼ全ての流行株と抗原的に類似していることが明らかになった。これらのウイルスは有効性の高いワクチン候補株になることが期待される。

一方で、A(H3N2)ウイルスに関しては、RT-LAMP 法により臨床検体中に高いウイルス量があることを確認していたにもかかわらず、

94 株中 1 株も鶏卵で増殖しなかった。昨年度、培養細胞で増やしたウイルスを鶏卵に接種した際には、3 株が鶏卵で増殖したため、A(H3N2)ウイルスの鶏卵分離には、1 度培養細胞で増やしたウイルスを鶏卵に接種する方法の方が有効であると思われる。

E. 結論

インフルエンザウイルスは変異を起しやすく、シーズンごとにワクチン推奨株を決めなければならない。ワクチン候補株には、鶏卵で分離したウイルスが用いられるが、近年、A(H3N2)ウイルスは変異を繰り返し、鶏卵での分離が年々困難になっている。ウイルス自体が鶏卵で増殖しないことに加え、鶏卵で増殖しても HA に変異が入り、ウイルスの抗原性が変化し、ワクチン株にしても高い有効性が期待できない。したがって、十分な A(H3N2)ワクチン候補ウイルスを供給するためには、新たな手法を開発する必要がある。その 1 つとして、細胞培養ワクチン用の培養細胞を介した鶏卵分離の手法は有効であると考えられる。また、鶏卵馴化による抗原性の変化を回避するために、細胞培養ワクチンも有効であると思われる。現在、培養細胞を介して分離された鶏卵分離 A/Saitama/103/2014 株の性状を更に解析しているが、このウイルスの詳細な性状が明らかになれば、今後 A(H3N2)ウイルスの鶏卵分離に関する諸問題を解決する一端となることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

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

2. 学会発表

- ・ 桑原朋子. 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. 2017 年

1月. 宜野湾市.

- 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

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

抗インフルエンザ薬耐性株の発生動向調査ならびに 薬剤耐性株検出系の外部精度管理に向けた実態調査

研究分担者 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

日本を含む東アジア地域における抗インフルエンザ薬耐性株の監視を目的として、日本、韓国、台湾、モンゴル、ミャンマーおよびラオスの分離株について、ノイラミニダーゼ（NA）阻害薬、オセルタミビル、ペラミビル、ザナミビルおよびラニナミビルに対する感受性を調べた。その結果、日本国内において、オセルタミビル・ペラミビル耐性株が 2 株検出された。また、日本国内の耐性株サーベイランスにおいて、全国地方衛生研究所（地衛研）が実施している薬剤耐性株検出系について、検査精度の維持・向上を目的とした外部精度管理に向け、コア・サポート地衛研を対象とした実態調査を行った。その結果、コア・サポート地衛研では、検査精度が十分に保持されていることが確認された。

A. 研究目的

インフルエンザの治療・予防には主に、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 阻害薬、オセルタミビル、ペラミビル、ザナミビルおよびラニナミビルが使用されている。日本は世界最大級の抗インフルエンザ薬使用国であり、薬剤耐性株の出現リスクが高い。したがって耐性株の発生動向の把握は公衆衛生上極めて重要である。そこで、本研究では、薬剤耐性株の監視を目的として、日本を含む東アジア地域における NA 阻害薬耐性株の発生動向を調査した。

日本国内における耐性株サーベイランスは、国立感染症研究所（感染研）と全国地方衛生研究所（地衛研）が共同で実施している。地衛研では、平成 22 年度に導入された TaqMan RT-PCR 法により耐性株の検出を行っているが、検査精度の維持・向上を目的とした外部精度管理を平成 29 年度に開始予定である。そこで、本研究では、外部精度管理の開始に向け、11 箇所のコア・サポート地衛研を対象とした実態調査を行った。

B. 研究方法

感染研において、日本、韓国、台湾、モンゴル、ミャンマーおよびラオスの分離株について、MUNANA 基質を用いた蛍光法または NA-XTD 基質を用いた化学発光法により、オセルタミビル、ペラミビル、ザナ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 NA 遺伝子のシーケンス解析により、既知の薬剤耐性マーカーの有無を検索した。

11 箇所のコア・サポート地衛研において、平成 22 年度に感染研から配布された H275 RNA 陽性コントロールおよび Y275 RNA 陽性コントロールについて、「A/H1N1pdm09 H275Y 耐性株検出法実験プロトコール ver.2」に従って 10 倍階段希釈液を作製し、陰性コントロールと共に、TaqMan RT-PCR 法により検出した。

（倫理面への配慮）

該当なし

C. 研究結果

A(H1N1)pdm09 ウイルスは国内株 297 株および海外株 60 株、A(H3N2)ウイルスは国内株 441 株および海外株 73 株、B 型ウイルスは国内株 284 株および海外株 107 株について解析を行った。その結果、日本国内において、NA 蛋白質に H275Y 耐性変異をもつオセルタミビル・ペラミビル耐性の A(H1N1)pdm09 ウイルスが 2 株検出された。A(H3N2)ウイルスおよび B 型ウイルスでは、国内外ともに耐性株は検出されなかった。国内株の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広く情報提供を行った。また、海外株の解析結果は、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報告した。

外部精度管理に向けた実態調査では、評価項目を(1) H275 陽性コントロールおよび Y275 陽性コントロールを結んだ線が直線状になっているか。(2) 陰性コントロールが、両陽性コントロールの直線との交点付近にあるか。の2点とした。その結果、9 箇所の地衛研では評価項目(1) および(2) を満たしていた。2 箇所の地衛研では、評価項目(1) に問題があったが、機器の設定を見直した結果、再試験では問題が解決された。

D. 考察

オセルタミビル・ペラミビル耐性の A(H1N1)pdm09 ウイルスが検出された2名の患者は同じ地域に居住しており、同年齢で発病日もほぼ同じであった。いずれも検体採取時に抗インフルエンザ薬の投与を受けておらず、耐性株の感染伝播が起こった可能性がある。幸いなことに、その後耐性株の感染が広がった形跡は認められないが、今後の動向に注意が必要である。

コア・サポート地衛研においては、多種多様な機器および解析ソフトを用いて TaqMan RT-PCR 法が実施されたが、機器間で結果に差は認められなかった。また、今回新たに ABI QuantStudio 12K Flex での検証が行われたが、問題なく検査が実施できることが確認された。

E. 結論

日本国内において検出されたオセルタミビル・ペラミビル耐性の A(H1N1)pdm09 ウイルスについては、限局的な感染伝播が起こった可能性があり、今後も引き続き耐性株の監視を行う必要がある。

日本国内の耐性株サーベイランスでは、TaqMan RT-PCR 法の導入から7年が経過したが、コア・サポート地衛研においては、検査精度が十分に保持されていることが確認された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 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

- Sakai K, Ami Y, Nakajima N, Nakajima K, Kitazawa M, Anraku M, Takayama I, Sangsriratanakul N, Komura M, Sato Y, Asanuma H, Takashita E, Komase K, Takehara K, Tashiro M, Hasegawa H, Odagiri T, Takeda M., Tmprss2 Independency for Haemagglutinin Cleavage In Vivo Differentiates Influenza B Virus from Influenza A Virus., Sci. Rep., 6:, 29430, 2016
 - Hurt AC, Besselaar TG, Daniels RS, Ermetal B, Fry A, Gubareva L, Huang W, Lackenby A, Lee RT, Lo J, Maurer-Stroh S, Nguyen HT, Pereyaslov D, Rebelo-de-Andrade H, Siqueira MM, Takashita E, Tashiro M, Tilmanis D, Wang D, Zhang W, Meijer A., Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2014-2015., Antiviral Res., 132, 178-85, 2016
 - Takashita E, Ejima M, Ogawa R, Fujisaki S, Neumann G, Furuta Y, Kawaoka Y, Tashiro M, Odagiri T., Antiviral susceptibility of influenza viruses isolated from patients pre- and post-administration of favipiravir., Antiviral Res., 132, 170-7, 2016
- ##### 2. 学会発表
- Takashita E, Ejima M, Ogawa R, Fujisaki S, Neumann G, Furuta Y, Kawaoka Y, Tashiro M, Odagiri T. Antiviral susceptibility of influenza viruses isolated from patients pre-and post-administration of favipiravir.

- Options IX for the Control of Influenza. August 2016. Chicago, USA.
- Kishida N, Imai M, Ainai A, Saito R, Nakamura K, Kuwahara T, Fujisaki S, Takashita E, Shirakura M, Kashiwagi Y, Tashiro M, Odagiri T, Watanabe S. Evaluation of efficacy of an inactivated high growth reassortant whole-virus A(H3N2) influenza vaccine in ferret. Options IX for the Control of Influenza. August 2016. Chicago, USA.
 - Yasuhara A, Yamayoshi S, Ito M, Uraki R, Nakatsu S, Oishi K, Soni P, Takenaga T, Kawakami C, Takashita E, Sasaki T, Ikuta K, Yamada S, Kawaoka Y. Characterization of the antigenic properties of influenza A(H1N1)pdm09 virus. Options IX for the Control of Influenza. August 2016. Chicago, USA.
 - Nakamura K, Shirakura M, Fujisaki S, Kishida N, Kuwahara T, Takashita E, Takayama I, Nakauchi M, Chadha M, Potdar V, Upadhyay BP, Shakya G, Odagiri T, Kageyama T, Watanabe S. Characterizations of influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated from patients including fatal or severe cases in Nepal and India, early 2015. Options IX for the Control of Influenza. August 2016. Chicago, USA.
 - Kawakami C, Fujisaki S, Takashita E, Sugawara H, Shimizu K, Ozawa H, Momoki T, Saikusa M, Usuku S, Sasao T, Watanabe S, Odagiri T. Characterization of influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated from hospitalized cases in the 2015/16 season. Options IX for the Control of Influenza. August 2016. Chicago, USA.
 - Kishida N, Imai M, Ainai A, Saito R, Nakamura K, Kuwahara T, Fujisaki S, Takashita E, Shirakura M, Kashiwagi Y, Tashiro M, Odagiri T, Watanabe S. Evaluation of efficacy of an inactivated whole-virus A/Victoria/361/2011 (IVR-165) (H3N2) influenza vaccine in ferret. 第64回日本ウイルス学会. 2016年10月. 札幌.
 - Kawakami C, Fujisaki S, Takashita E, Saikusa M, Usuku S, Watanabe S. Characterization of influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated from hospitalized cases in the 2015/16 season. 第64回日本ウイルス学会. 2016年10月. 札幌.
 - Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Shimazu Y, Shimomura T, Doi I, Watanabe S, Odagiri T, The Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Detection of influenza A(H1N1)pdm09 viruses exhibiting enhanced cross-resistance to oseltamivir and peramivir in the 2015/16 season. 第64回日本ウイルス学会. 2016年10月. 札幌.
 - Watanabe S, Nakamura K, Kishida N, Fujisaki S, Shirakura M, Takashita E, 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 for the 2016/17 season. 第64回日本ウイルス学会. 2016年10月. 札幌.
 - Yasuhara A, Yamayoshi S, Ito M, Uraki R, Nakatsu S, Oishi K, Soni P, Takenaga T, Kawakami C, Takashita E, Sasaki T,

Ikuta K, Yamada S, Kawaoka Y. Characterization of the antigenic properties of influenza A(H1N1)pdm09 virus. 第 64 回日本ウイルス学会. 2016 年 10 月. 札幌.

- ・ 高下恵美, 小川理恵, 藤崎誠一郎, 白倉雅之, 三浦秀佳, 中村一哉, 岸田典子, 桑原朋子, 菅原裕美, 佐藤彩, 秋元未来, 渡邊真治, 小田切孝人. 2015/16 シーズンに検出されたオセルタミビル・ペラミビルに強い耐性を示すインフルエンザウイルス. 第 48 回日本小児感染症学会. 2016 年 11 月. 岡山.
- ・ 川上千春, 高下恵美, 七種美和子, 豊澤隆弘. 入院・重症例における AH1pdm09 インフルエンザウイルスの解析 (2015/16 シーズン). 第 48 回日本小児感染症学会. 2016 年 11 月. 岡山.
- ・ 高下恵美. 日本国内で検出された A(H1N1)pdm09 二重耐性変異ウイルスの性状解析. 6th Negative Strand Virus-Japan. 2017 年 1 月. 沖縄.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

成人層および高齢者層に対する 2016-17 年季節性インフルエンザ ワクチン接種後の抗体価反応

研究分担者 齋藤玲子 新潟大学大学院医歯学総合研究科・教授

研究協力者 小田切崇、菖蒲川由郷、八神錬、尾ヶ井マサヨ（女池南風苑・看護介護科長）、
樋熊紀男（女池南風苑・施設長）

研究要旨

2016-2017 年シーズンの 4 価インフルエンザワクチン接種前後の成人・高齢者の A(H1N1)pdm09 抗原、A(H3N2)抗原、B/ビクトリア系統、B/山形系統の抗原に対する血清抗体価の調査を行った。成人層 99 名(平均年齢 42 歳)と、高齢者層 49 名(平均年齢 85 歳)のワクチン接種前後の抗体価を赤血球凝集素阻害反応(HI 法)で測定し、ワクチン接種による変化を評価した。

成人層で A(H1N1)pdm09, A(H3N2)で接種後には約 90%の抗体価 40 倍以上の保有率を認め、高齢者層でも同様に A(H1N1)pdm09 と A(H3N2)は、60%以上が抗体価 40 倍以上の保有率を認め、両群ともに抗体保有率割合の面からみた国際基準(成人層：70%以上、高齢者層：60%以上)を満たしていた。一方で B 型は成人層、高齢者層ともに接種後の 40 倍以上の抗体保有率は 30-60%程度にとどまる結果となり、国際基準を下回っていた。また GMT 値もすべての抗原で接種後に上昇が確認できたものの、A 型に比べると B 型の値は低く反応性が低い傾向があった。接種後の副反応については、成人層、高齢者層ともに局所の発赤・腫れを申告した割合が多く、特に接種者の半数以上が発赤を申告していた。副反応症状申告数は昨シーズンに比べ若干の増加がみられたが、大きな差はなく、重篤な全身反応は認められなかった。全体的にみると今シーズンのワクチンも昨シーズンと同様、A 型は免疫原性の国際的な評価基準を満たしていたが、B 型は山形系、ビクトリア系統とも十分とは言えず、今後 B 型ワクチンの改善の余地があると考えられる。

A. 研究目的

流行するインフルエンザウイルスは、抗原性や型・亜型が年ごとに変化するため、インフルエンザワクチンと流行するインフルエンザの抗原性が一致しないことがしばしばある。このため、WHO が 1 年ごとに次のシーズンに流行するウイルス株を予測し

その情報をもとに、次のシーズンのインフルエンザのワクチン株が決定される。

近年のインフルエンザの流行においては、A(H1N1)pdm09 および A(H3N2)に加えて B 型ウイルスは山形系統とビクトリア系統の混合流行が続いており、WHO も 2012/13 シーズンから 4 価用ワクチン向けには B 型 2 系

統からそれぞれワクチン株を推奨している。また、米国においては 2013/14 シーズンから 4 価のインフルエンザワクチンが製造承認され、世界の動向は 4 価ワクチンの供給へと移行してきている。

わが国においても米国から 2 シーズン遅れる形で 2015-2016 年シーズンのワクチンより A 型 2 株に加えて B 型 2 株を含めた 4 価のワクチンが導入された。2016-2017 年シーズンのインフルエンザワクチンには、

*A/カリフォルニア/7/2009 (H1N1)pdm09

*A/香港/4801/2014 (H3N2)

*B/プーケット/3073/2013 (山形系統)

*B/テキサス/3/2013 (ビクトリア系統)

が使用されている。本調査では、高齢者施設の成人層(≤60 歳)、高齢者層(>60 歳)に対して、2016-2017 シーズンにおけるワクチン接種前後の抗体価の変化を赤血球凝集素阻害試験(HI 法)で測定し、ワクチン接種による HI 抗体価の変化を評価した。また、ワクチン接種後の副反応を検討した。

B. 研究方法

新潟市内の高齢者施設のスタッフと入所者に対し、研究についてのインフォームドコンセントを得たうえで、年齢、前シーズンのワクチン接種歴、インフルエンザの罹患歴について聴取した。調査の参加者には、2016 年 11 月にデンカ生研社製(デンカ)または阪大微研社製(微研)の 2016-2017 年シーズン HA インフルエンザワクチン(4 価)を用法に基づき皮下接種した。接種前と接種 3-4 週間後の 2 回、血清を採血した。

血清は採取後すぐに血清分離し、抗体価検査を行うまで-20°Cにて新潟大学で保管した。ワクチン接種前後の抗体価は、赤血球凝集抑制試験(HI)法にてモルモット赤血球と、デンカ生研社製の A/H1N1pdm 抗原(A/カリフォルニア/7/2009)、H3N2 抗原

(A/香港/4801/2014)、B/山形系統抗原(B/プーケット/3073/2013)、B/ビクトリア系統抗原(B/テキサス/3/2013)を用いて測定した。

抗体価の解析は高齢者施設における 60 歳以下を“成人層”とし、60 歳より上の年齢を“高齢者層”として、大きく 2 つのグループに分けて評価した。

接種後 48 時間以内の副反応について自己申告(入所者の場合はスタッフの観察による)にて、「発疹、発赤、腫れ、痛み」の有無を報告してもらい、スタッフ群と入所者群で副反応症状を訴えたものの割合を検討した。

(倫理面への配慮)

患者・協力者には十分な説明を行い書式にて署名にて了解を得た。なお本調査は新潟大学医学部倫理委員会にて承認された。

C. 研究結果

成人層のペア血清は 99 件、高齢者層のペア血清は 49 件採取された。成人層の平均年齢は 41.8±10.2 歳、高齢者層の平均年齢は 84.5±9.8 歳であった。

接種後 40 倍以上の抗体価保有率は、成人層で A/カリフォルニア/7/2009 : 97.0%(接種前 : 80.8%)、A/香港/4801/2014 : 89.9%(接種前 : 64.6%)、B/プーケット/3073/2013(山形系統) : 61.6%(接種前 : 47.5%)、B/テキサス/3/2013(ビクトリア系統) : 35.4%(接種前 : 24.2%)であり、A 型では EMEA が定める基準の 70%を超していたが、B 型では基準を下回る結果となった。(表 1、図 1A)。

一方、高齢者層では A/カリフォルニア/7/2009 : 63.3%(接種前 : 46.9%)、A/香港/4801/2014 : 83.7%(接種前 : 49.0%)、B/プーケット/3073/2013(山形系統) : 28.6%(接種前 : 16.3%)、B/テキサス/3/2013(ビクト

リア系統) : 30.6%(接種前 : 22.4%)であり、こちらでも B 型において国際基準の 60%を下回る結果となった(表 1、図 1B)。

成人層のワクチン接種後の HI 抗体価の幾何平均 (GMT) は、A/カリフォルニア/7/2009 : 79.4(接種前 : 57.6、前後比=1.4 倍)、A/香港/4801/2014 : 88.9(接種前 : 35.8、前後比 = 2.5 倍)、B/プーケット/3073/2013(山形系統) : 30.2(接種前 24.3、前後比=1.2 倍)、B/テキサス/3/2013(ビクトリア系統) : 17.8(接種前 : 13.2、前後比 = 1.3 倍)であり、GMT の前後比 (Fold Increase) でみた場合 H3N2 以外は国際基準の ≥ 2.5 倍を下回る結果となった (表 1、図 2A)。

一方、高齢者の GMT は、A/カリフォルニア/7/2009 : 51.6(接種前 : 28.9、前後比 = 1.8 倍)、A/香港/4801/2014 : 89.6(接種前 : 31.5、前後比 = 2.8 倍)、B/プーケット/3073/2013(山形系統) : 18.4(接種前 : 11.4、前後比 = 1.6 倍)、B/テキサス/3/2013(ビクトリア系統) : 14.0(接種前 : 10.0、前後比 = 1.4 倍)であり、こちらでも GMT の前後比 (Fold Increase) は H3N2 以外、国際基準の ≥ 2.0 倍を下回る結果となった。この増加率の結果を製造会社別で比較してみると成人層、高齢者層ともに 2 社間に大きな差は見られなかった(表 1、図 2B)。

接種後の反応を、抗体陽転率 (ワクチン接種前後での抗体価 4 倍以上の上昇率) で評価すると、成人層では、A/カリフォルニア/7/2009 : 3.0%、A/香港/4801/2014 : 37.4%、B/プーケット/3073/2013(山形系統) : 2.0%、B/テキサス/3/2013(ビクトリア系統) : 2.0%であった (表 1)。高齢者群では A/カリフォルニア /7/2009 : 14.3%、A/香港 /4801/2014 : 42.9%、B/プーケット /3073/2013(山形系統) : 8.2%、B/テキサス /3/2013(ビクトリア系統) : 6.1%という結果

を示した。製造会社別で比較すると成人層では両社間に差は見られなかったが、高齢者層では A/H1N1pdm と B/ビクトリア系統でデンカ生研ワクチン接種群の抗体陽転率が高い結果が得られた。(表 1)。

ワクチン接種後の副反応について、成人 99 名と高齢者 49 名で比較したところ、最も多い副反応は成人層、高齢者層共に局所の発赤(成人層 : 58.6%、高齢者層 : 87.8%)で。次いで多いのが局所の腫れ(成人層 : 52.5%、高齢者層 : 26.5%)であった(表 2)。また副反応を申告した者の割合は昨シーズンと比較して、同程度あったが、今シーズンのワクチン接種者の方が若干、副反応症状を申告した者の割合が増加した。その他、全身的な重度の副反応は認められなかった。

D. 考察

成人層は、A/H1N1pdm09、A/H3N2 においてワクチン接種後 40 倍以上の HI 抗体保有率は国際基準の 70%を超え、予防効果が期待できると考えられるが、接種前後での 4 倍以上の抗体価の上昇を認めたものの割合では国際基準の 40%を下回っていた。しかし該当施設での成人層はほとんどが昨シーズンもワクチンを接種しており、接種前から抗体を保有していたことがこの結果の 1 つの要因と考えられる。一方で B/山形系統ならびに B/ビクトリア系統ではワクチン接種後の 40 倍以上の抗体保有率が国際基準 70%に満たさず防御に若干の不安を残す結果となった。しかし昨シーズンの抗体保有率結果と比較すると、昨シーズンの B/山形系統 (20.0%)、B/ビクトリア系統 (14.7%) よりも高い抗体保有率を示しており、昨シーズンよりも好転したと考えられる。

高齢者層でも、A/H1N1pdm09、A/H3N2 に対して、接種後 40 倍以上の HI 抗体価保有率を認めた割合は国際基準の 60%を上回っ

ており防御の効果が期待できるが、成人群同様 B 型の両系統は接種後 30%程度と低めであり、こちらも防御効果に不安を残す結果となった。昨シーズンの高齢者層における B 型抗体価保有率は 20%程度(B/山形系統：13.7%、B/ビクトリア系統：19.6%)であり低かったが、今シーズンは 30%程度と昨シーズンに比べ成人層と同様に若干の好転が見られた。今シーズンの B/山形系統、B/ビクトリア系統は昨シーズンのワクチン株から変更がなかったため、今シーズンのワクチン接種により昨シーズン保有した抗体にブースター効果が加味され、保有率が昨シーズンよりも好転したと考えられる。

副反応については成人群、高齢者群ともに局所の発赤・腫れを申告したものの割合が多く、特に接種者の半数以上が発赤を申告していた。その他の副反応でも昨シーズンより申告をした割合が上昇していたが、同程度と考えられる。副反応を申告する割合は昨シーズンから急激に上昇したが、これは昨シーズンのワクチンから抗原が 1 種類増え、4 価のワクチンになったことが何かしら影響しているとも考えられるが、実際のところは不明である。一方で昨シーズン同様重篤な副反応はみとめられなかったため、今シーズンのインフルエンザワクチンも安全に接種できると考えられる。

E. 結論

2016-2017 年シーズンのワクチン接種後、成人層、高齢者層ともに A 型ではおおむね良好なワクチン効果が得られたが、B 型では接種後も 40 倍以上の抗体価を示した割合は国際基準を満たしておらず、若干の不安を残す結果が得られた。副反応は昨シーズンと同様に局所の発赤・腫れを申告する割合が多かったが、重篤な副反応はみられなかった。インフルエンザは毎年流行株が

異なるため、今後もワクチン接種が必要である。調査を行った情報は、次のシーズンのワクチン株の選定のために有益であるため、今後も調査の継続が必要である。

謝辞：調査にご協力いただいた女池南風苑・看護介護科長の尾ヶ井マサヨ様ならびにスタッフの方々に感謝いたします。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hibino A, Kondo H, Masaki H, Tanabe Y, Sato I, Takemae N, Saito T, Zaraket H, and Saito R. Community- and hospital-acquired infections with oseltamivir- and peramivir-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses during the 2015-2016 season in Japan. *Virus Genes*. 2017 Feb;53(1):89-94 doi: 10.1007/s11262-016-1396-9

2. 学会発表

なし

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

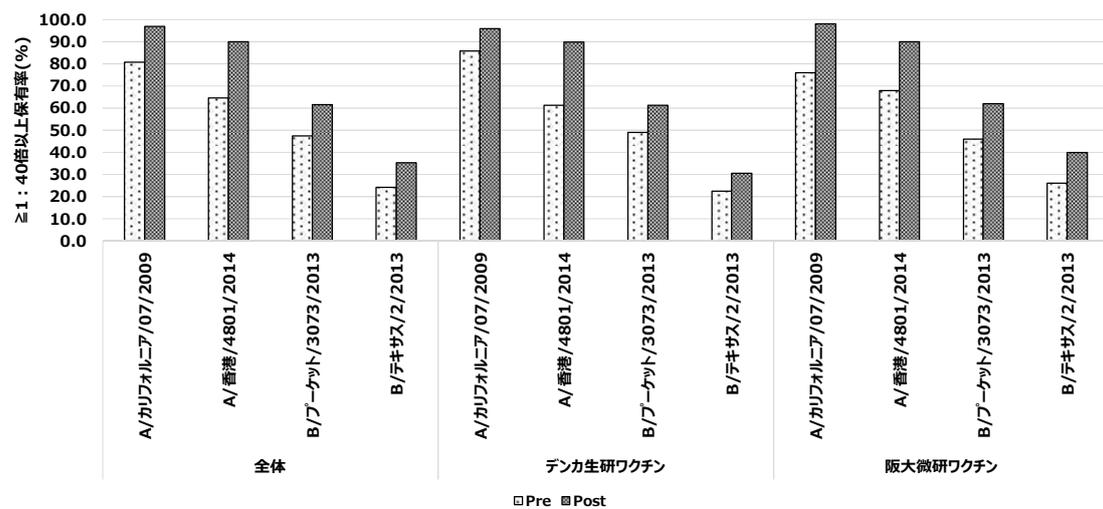
3. その他

なし

表1 2016-2017年インフルエンザワクチン接種前後の抗体価の評価

ワクチン種類	GMT		Fold Increase	接種前後 4倍以上上昇 (%)	抗体価 >40倍以上保有(%)			
	Pre	Post			Pre	Post		
成人層 (≤60歳)	全体 (n=99)	A/カリフォルニア/07/2009	57.6	79.4	1.4	3.0	80.8	97.0
		A/香港/4801/2014	35.8	88.9	2.5	37.4	64.6	89.9
		B/ブーケット/3073/2013	24.3	30.2	1.2	2.0	47.5	61.6
		B/テキサス/2/2013	13.2	17.8	1.3	2.0	24.2	35.4
	デンカ生研ワクチン (n=49)	A/カリフォルニア/07/2009	68.5	88.3	1.3	0.0	85.7	95.9
		A/香港/4801/2014	33.8	82.3	2.4	36.7	61.2	89.8
		B/ブーケット/3073/2013	24.4	29.7	1.2	2.0	49.0	61.2
		B/テキサス/2/2013	12.4	15.3	1.2	2.0	22.4	30.6
	阪大微研ワクチン (n=50)	A/カリフォルニア/07/2009	48.6	71.6	1.5	6.0	76.0	98.0
		A/香港/4801/2014	37.8	95.8	2.5	38.0	68.0	90.0
		B/ブーケット/3073/2013	24.3	30.7	1.3	2.0	46.0	62.0
		B/テキサス/2/2013	14.1	20.6	1.5	2.0	26.0	40.0
高齢者層 (>60歳)	全体 (n=49)	A/カリフォルニア/07/2009	28.9	51.6	1.8	14.3	46.9	63.3
		A/香港/4801/2014	31.5	89.6	2.8	42.9	49.0	83.7
		B/ブーケット/3073/2013	11.4	18.4	1.6	8.2	16.3	28.6
		B/テキサス/2/2013	10.0	14.0	1.4	6.1	22.4	30.6
	デンカ生研ワクチン (n=27)	A/カリフォルニア/07/2009	21.6	45.5	2.1	22.2	44.4	63.0
		A/香港/4801/2014	30.9	80.0	2.6	40.7	44.4	81.5
		B/ブーケット/3073/2013	9.0	13.6	1.5	7.4	11.1	18.5
		B/テキサス/2/2013	9.0	14.0	1.6	11.1	18.5	33.3
	阪大微研ワクチン (n=22)	A/カリフォルニア/07/2009	41.3	60.2	1.5	4.5	50.0	63.6
		A/香港/4801/2014	32.1	102.9	3.2	45.5	54.5	86.4
		B/ブーケット/3073/2013	15.1	26.6	1.8	9.1	22.7	40.9
		B/テキサス/2/2013	11.3	14.1	1.2	0.0	27.3	27.3

A. 成人層(≤60歳)



B. 高齢者層(>60歳)

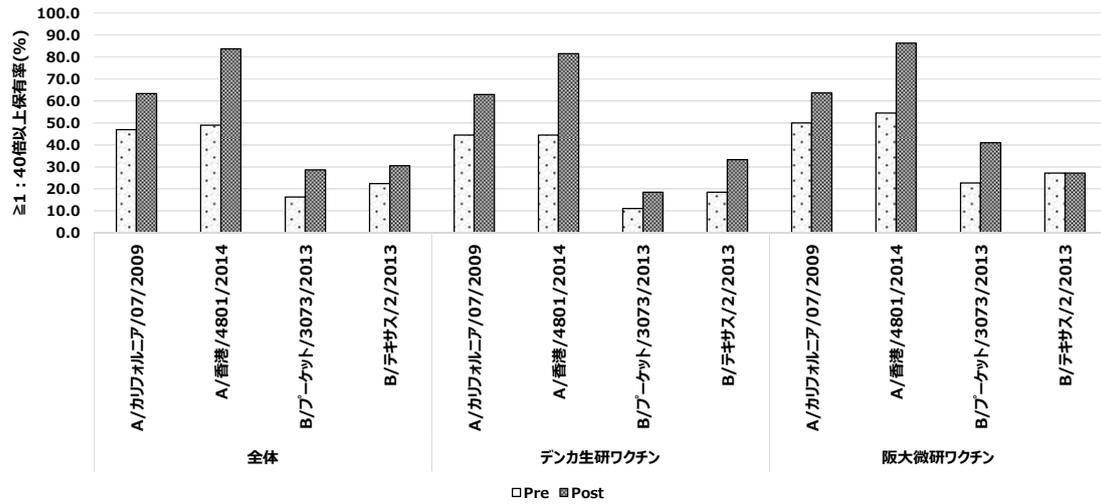
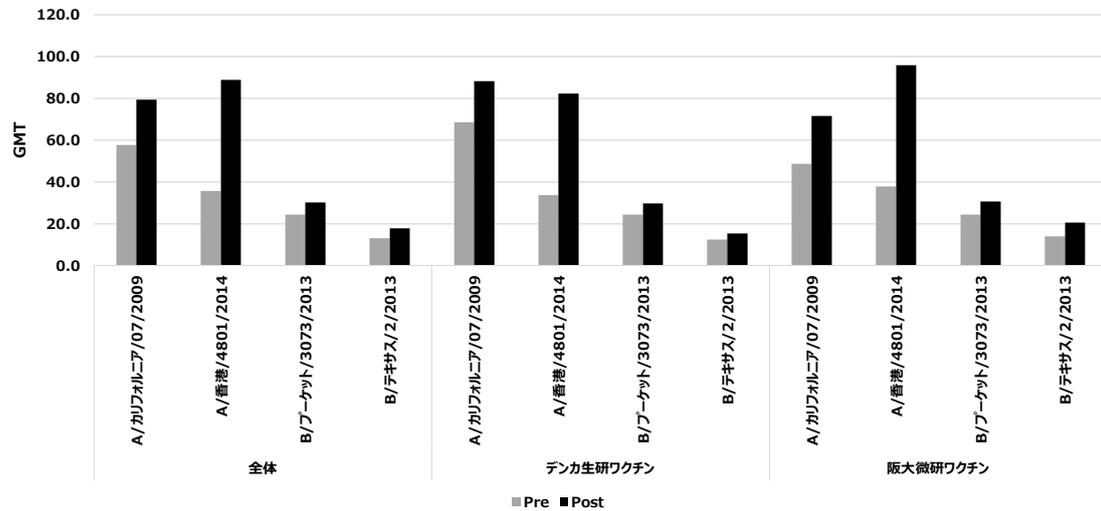


図1 ワクチン接種後の抗体保有率の推移(A.成人層、B.高齢者層)

A. 成人層(≤60歳)



B. 高齢者層(>60歳)

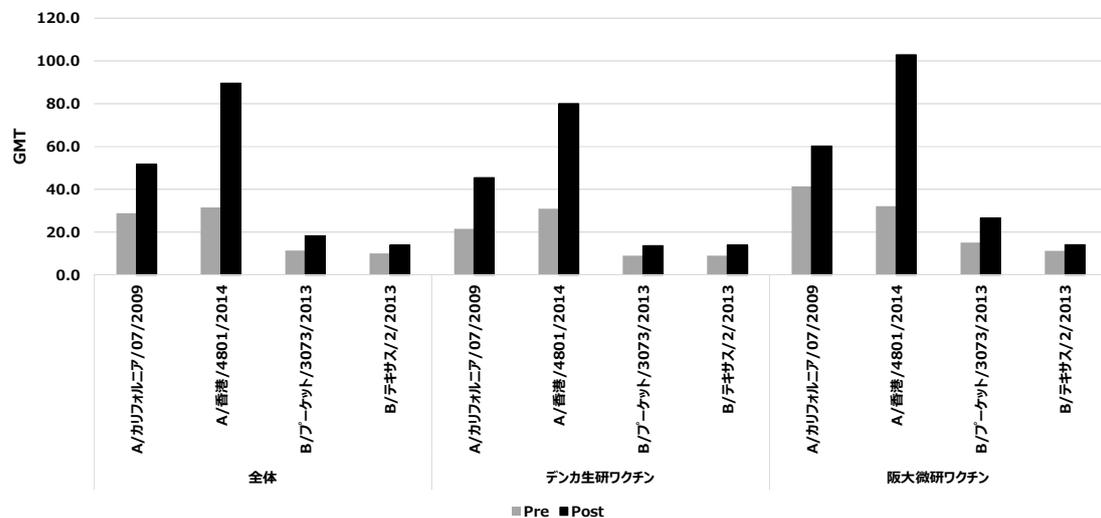


図2 ワクチン接種後の GMT の推移(A.成人層、B.高齢者層)

表2 インフルエンザワクチン接種後の副反応（複数回答）

副反応 シーズン	発疹		発赤		腫れ		痛み	
	2015/2016	2016/2017	2015/2016	2016/2017	2015/2016	2016/2017	2015/2016	2016/2017
All	4	6	93	101	53	65	37	41
(%)	2.8	4.1	64.1	68.2	36.6	43.9	25.5	27.7
成人層 (≤60歳)	4	5	52	58	42	52	37	41
(%)	4.3	5.1	55.3	58.6	44.7	52.5	39.4	41.4
高齢者層 (>60)	0	1	41	43	11	13	0	0
(%)	0.0	2.0	80.4	87.8	21.6	26.5	0.0	0.0

2015/2016シーズン：成人層(n = 94), 高齢者層(n = 51)

2016/2017シーズン：成人層(n = 99), 高齢者層(n = 49)

動物由来インフルエンザウイルスのレセプター結合特異性に関する研究

研究分担者 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・主任研究官

研究要旨

現在、主に東南アジアや中近東では高い致死率を伴う高病原性鳥インフルエンザ A(H5N1) ウイルスのヒト感染例が、未だ絶えず報告されている。さらに、2013 年に発生した鳥インフルエンザ A(H7N9) ウイルスは、季節に応じて発生と消失を繰り返している。このような背景から、迅速かつ的確にウイルスの詳細な性状解析を実施し、ヒトへの感染リスク評価を実施することは、重要な意義を持つと考えられる。本研究では、動物由来インフルエンザウイルスのリスク評価のため、レセプター結合特異性実験の改良、及び次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析を行った。その結果、新規に合成したシアロ糖鎖ポリマーを用いたレセプター結合特異性実験の有用性を示すことが出来た。

A. 研究目的

現在、主に東南アジアや中近東では高い致死率を伴う高病原性鳥インフルエンザ A(H5N1) ウイルスのヒト感染例が、未だ絶えず報告されている。世界保健機関（WHO）の報告によれば、2017 年 4 月 20 日現在、16 カ国で、858 例の感染者数が確認され、そのうち 453 名が死亡している。さらに、2013 年 3 月に中国で発生した鳥インフルエンザ A(H7N9) ウイルスは、中国さらに他の周辺諸国に拡大している。WHO の報告では、2017 年 5 月 1 日現在、1421 例の感染者数が確認され、そのうち 542 名の死亡例が報告されている。また、鳥インフルエンザ A(H5N6) ウイルスが我が国をはじめ、中国、台湾、韓国などのアジア諸国、またヨーロッパにまで拡大している。これらのウイルスがヒトからヒトへ容易に伝播可能なウイルスに変異し、新型インフルエンザの出現が危惧されている。

インフルエンザウイルスは、HA 蛋白を使って宿主細胞表面のレセプターに結合して感染を開始する。HA 蛋白とレセプター分子との結合特異性は、ウイルスが分離された宿主動物によ

て異なる。ヒトの季節性インフルエンザウイルスの HA 蛋白はシアル酸がガラクトースに $\alpha 2, 6$ 結合した糖鎖（Neu5Ac $\alpha 2, 6$ Gal : ヒト型レセプター）を、鳥から分離されたインフルエンザウイルスの HA 蛋白はシアル酸がガラクトースに $\alpha 2, 3$ 結合した糖鎖（Neu5Ac $\alpha 2, 3$ Gal : 鳥型レセプター）を、特異的に認識する。それらの HA 蛋白のレセプター認識特異性と一致して、ヒトの上気道ではヒト型レセプターが、鳥ウイルスの主な増殖部位である腸管では鳥型レセプターが、豊富に発現している。このように、HA 蛋白のレセプター認識特異性と宿主が発現するレセプターの種類との相関がインフルエンザウイルスの宿主域を規定していると考えられている。従って、鳥インフルエンザウイルスがヒト上気道細胞に効率良く感染するためには、その HA 蛋白のレセプター特異性が鳥型からヒト型へ変換する必要がある。このようなヒトへの適応変異を早期に検出することが、パンデミック対策の上でも非常に重要となる。

本研究では、動物由来インフルエンザウイルスのヒトへの感染リスク評価のため、新規に合

成したシアロ糖鎖ポリマーを使用してレセプター結合特異性実験の改良を試みた。さらに、2016年に発生した鳥インフルエンザ(H5N6)ウイルスについてレセプター結合特異性実験を行った。

B. 研究方法

1) ウイルス: A/duck/Hyogo/1/2016 (H5N6)、A/black swan/Akita/1/2016 (H5N6)を使用した。比較対照ウイルス株として、A/duck/Hokkaido/5/77 (H3N2)、A/Narita/1/2009 (H1N1pdm09)を使用した。これらのウイルスを発育鶏卵あるいは MDCK 細胞を用いて増殖させ、七面鳥赤血球 (TRBC) を用いて赤血球凝集 (HA) 価を測定し、ストックした。

2) 全ゲノム解析: ウイルス全ゲノム解析は、次世代シーケンサーを使用して行った。ウイルス培養液から QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA から NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs) を使用して DNA ライブラリーを調製後、MiSeq (Illumina) にて解析した。得られた塩基配列は、CLC Genomics Workbench を使用して、リファレンス配列との Assemble を行い、コンセンサス配列の作成と変異解析を行った。

3) レセプター結合特異性実験: $\alpha 2, 3$ または $\alpha 2, 6$ 結合した 2 種類の合成シアロ糖鎖ポリマー (Neu5Ac $\alpha 2$ -3LacNAc-PGA-Biotin、Neu5Ac $\alpha 2$ -6LacNAc-PGA-Biotin: 東京化成工業株式会社により合成) を用いた Solid-phase binding assay を行った。上記、合成シアロ糖鎖ポリマーを各々、Avidin コートされた 96 well plate にコーティング後、ウイルス培養液 (HA 価 32-64) を吸着させ、抗インフルエンザウイルス NP 抗体を使用した ELISA 法により結合ウイルスを検出した。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

比較対照ウイルスとして用いた A/Narita/1/2009 (H1N1pdm09) は、ヒト型レセプターである $\alpha 2, 6$ 結合した糖鎖に優先的に結合性を示した。一方、鳥由来のウイルスである A/duck/Hokkaido/5/77: H3N2) は、鳥型レセプターである $\alpha 2, 3$ 結合した糖鎖に優先的に結合性を示した。この結果は、既に論文等で報告されている結果と一致し、新規に合成したシアロ糖鎖ポリマーの有用性が示された。

次に、2016年に鳥から分離された A(H5N6) ウイルスを用いて実験を行った。A/duck/Hyogo/1/2016 (H5N6)、A/black swan/Akita/1/2016 (H5N6) の 2 つのウイルスは、ヒト型レセプターである $\alpha 2, 6$ 結合した糖鎖にも結合性を示したが、鳥型レセプターである $\alpha 2, 3$ 結合した糖鎖に優先的に親和性を示した。

D. 考察

今回、解析に用いた A(H5N6) ウイルスの 2 株は、遺伝子解析の結果、HA 遺伝子にヒト型レセプターに親和性を示すアミノ酸変異は認められなかった。しかしながら、HA 遺伝子に T156A (T160A: H3 numbering) 変異を有していた。この部位は、糖鎖付加部位であり、T156A 変異は、ヒト型レセプターへの親和性を高めることが報告されている。レセプター結合特異性実験の結果から、依然として、鳥型レセプターに対して強い結合性を示していることから、これらのウイルスがヒト型レセプターに優先的に結合するためには、このアミノ酸変異に加えて、レセプター結合特異性を変換させる別の変異が必要であることが示唆された。

E. 結論

本研究により、動物由来インフルエンザウイルスのヒトへの感染リスク評価のための方法の一つとして、ウイルスのレセプター結合特異

性を簡便に調べることが可能となった。今後は、主に鳥インフルエンザウイルスを中心とした動物由来インフルエンザウイルスの遺伝子解析、抗原性解析に加え、レセプター結合特異性を加えた継続的なサーベイランスの実施が必要であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ・ E. Takashita, S. Fujisaki, M. Shirakura, K. Nakamura, N. Kishida, T. Kuwahara, Y. Shimazu, T. Shimomura, S. Watanabe, T. Odagiri and 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., Vol.21, issue 24, 2016
- ・ Yokoyama M, Fujisaki S, Shirakura M, Watanabe S, Odagiri T, Ito K, Sato H., Molecular Dynamics Simulation of the Influenza A(H3N2) Hemagglutinin Trimer Reveals the Structural Basis for Adaptive Evolution of the Recent Epidemic Clade 3C.2a., Front Microbiol. , 10 ; 8, 584, 2017

2. 学会発表

- ・ Watanabe S, Nakamura K, Fujisaki S, Shirakura M, Takashita E, 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 for the 2015/16

season. 第 64 回日本ウイルス学会. 2016 年 10 月. 札幌.

- ・ Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Shimazu Y, Shimomura T, Doi I, Watanabe S, Odagiri T, The Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Detection of influenza AH1N1pdm09 viruses exhibiting enhanced cross-resistance to oseltamivir and peramivir in the 2015/16 season. 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

なし

Ⅲ.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

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
Takashita E, Ejima M, Ogawa R, Fujisaki S, Neumann G, Furuta Y, Kawaoka Y, Tashiro M, Odagiri T.	Antiviral susceptibility of influenza viruses isolated from patients pre- and post-administration of favipiravir.	Antiviral Res.	132	170-7	2016
Hibino A, Kondo H, Masaki H, Tanabe Y, Sato I, Takemae N, Saito T, Zaraket H, and Saito R	Community- and hospital-acquired infections with oseltamivir- and peramivir-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses during the 2015-2016 season in Japan.	Virus Genes	53(1)	89-94	2016
Ishikane M, Kamiya H, Kawabata K, Higashihara M, Sugihara M, Tabuchi A, Kuwabara M, Yahata Y, Yamagishi T, Odagiri T, Sugiki Y, Ohmagari N, Matsui T, Oishi K	Seasonal influenza vaccine (A/New York/39/2012) effectiveness against influenza A virus of health care workers in a long term care facility attached with the hospital, Japan, 2014/15: A cohort study.	J Infect Chemother.	22(11)	777-9	2016
Fudo S, Yamamoto N, Nukaga M, Odagiri T, Tashiro M, Hoshino T	Two Distinctive Binding Modes of Endonuclease Inhibitors to the N-Terminal Region of Influenza Virus Polymerase Acidic Subunit.	Biochemistry.	55(18)	2646-60	2016
Onodera T, Hosono A, Odagiri T, Tashiro M, Kaminogawa S, Okuno Y, Kurosaki T, Ato M, Kobayashi K, Takahashi Y.	Whole-Virion Influenza Vaccine Recalls an Early Burst of High-Affinity Memory B Cell Response through TLR Signaling.	J Immunol.	196(10)	4172-84	2016
Ando T, Yamayoshi S, Tomita Y, Watanabe S, Watanabe T, Kawaoka Y.	The host protein CLUH participates in the subnuclear transport of influenza virus ribonucleoprotein complexes.	Nat. Microbiol.	1(8)	16062	2016

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Li C, Hatta M, Burke DF, Ping J, Zhang Y, Ozawa M, Taft AS, Das SC, Hanson AP, Song J, Imai M, Wilker PR, Watanabe T, Watanabe S, Ito M, Iwatsuki-Horimoto K, Russell CA, James SL, Skepner E, Maher EA, Neumann G, Klimov AI, Kelso A, McCauley J, Wang D, Shu Y, Odagiri T, Tashiro M, Xu X, Wentworth DE, Katz JM, Cox NJ, Smith DJ, Kawaoka Y.	Selection of antigenically advanced variants of seasonal influenza viruses.	Nat. Microbiol.	1(6)	16058	2016
Sriwilajaroen N, Magesh S, Imamura A, Ando H, Ishida H, Sakai M, Ishitsubo E, Hori T, Moriya S, Ishikawa T, Kuwata K, Odagiri T, Tashiro M, Hiramatsu H, Tsukamoto K, Miyagi T, Tokiwa H, Kiso M, Suzuki Y.	A Novel Potent and Highly Specific Inhibitor against Influenza Viral N1-N9 Neuraminidases: Insight into Neuraminidase-Inhibitor Interactions.	J Med Chem	59(10)	4563-77	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
Suzuki Y, Odagiri T, Tashiro M, Nobusawa E	Development of an Influenza A Master Virus for Generating High-Growth Reassortants for A/Anhui/1/2013(H7N9) Vaccine Production in Qualified MDCK Cells.	PLoS One	11(7)	e0160040	2016
Sarawar S, Hatta Y, Watanabe S, Dias P, Neumann G, Kawaoka Y, Bilsel P.	M2SR, a novel live single replication influenza virus vaccine, provides effective heterosubtypic protection in mice.	Vaccine	34(42)	5090-8	2016

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sakai K, Ami Y, Nakajima N, Nakajima K, Kitazawa M, Anraku M, Takayama I, Sangsriratanakul N, Komura M, Sato Y, Asanuma H, Takashita E, Komase K, Takehara K, Tashiro M, Hasegawa H, Odagiri T, Takeda M.	TMPRSS2 Independency for Haemagglutinin Cleavage In Vivo Differentiates Influenza B Virus from Influenza A Virus.	Sci. Rep.	6	29430	2016
Hurt AC, Besselaar TG, Daniels RS, Ermetal B, Fry A, Gubareva L, Huang W, Lackenby A, Lee RT, Lo J, Maurer-Stroh S, Nguyen HT, Pereyaslov D, Rebelo-de-Andrade H, Siqueira MM, Takashita E, Tashiro M, Tilmanis D, Wang D, Zhang W, Meijer A.	Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2014-2015.	Antiviral Res.	132	178-85	2016
渡邊真治, 藤崎誠一郎, 中村一哉	香港型インフルエンザウイルスの最近の変異(性状変化)	インフルエンザ	Vol.17 No.3	37-44	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
Naito T, Mori K, Ushirogawa H, Takizawa N, Nobusawa E, Odagiri T, Tashiro M, Ohniwa RL, Nagata K, Saito M.	Generation of a Genetically Stable High-Fidelity Influenza Vaccine Strain.	J Virol.	91(6)	pii:e01073-16	2017
Yokoyama M, Fujisaki S, Shirakura M, Watanabe S, Odagiri T, Ito K, Sato H.	Molecular Dynamics Simulation of the Influenza A(H3N2) Hemagglutinin Trimer Reveals the Structural Basis for Adaptive Evolution of the Recent Epidemic Clade 3C.2a.	Front Microbiol.	8	584	2017