

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29年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小田切孝人
平成30年(2018)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

渡邊真治 _____ P9

ウイルス中和試験改良変法を用いた A/H3N2 亜型野外流行株の抗原性解析

中村一哉 _____ P12

(H1N1)pdm09 分離株の赤血球凝集阻止試験をもちいた抗原性解析

岸田典子 _____ P17

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 _____ P19

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 _____ P22

研究協力者：高下 恵美

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 _____ P24

成人層および高齢者層に対する 2017-18 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、尾ヶ井マサヨ（女池南風苑・看護介護科長）、

金沢宏（女池南風苑・施設長）

_____ P27

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及び次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析に関する研究

白倉雅之 _____ P34

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

_____ P37

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

本研究班は、国内および東アジア地域でのインフルエンザ株サーベイランス体制を支援し、当該地域から得られる株サーベイランス情報を WHO 世界インフルエンザ監視対応ネットワーク (GISRS) へ提供し、国内情報が WHO の施策およびワクチン株選定に確実に反映されるよう、また、国内対応としては、本年度のワクチン株選定を支援する。本研究による国際貢献を維持することにより、新型インフルエンザウイルスの海外発生の継続的な監視および病原体の迅速な入手と解析が可能となる。これにより、わが国の新型インフルエンザ対策を遅滞なく進めることができる。また、地方衛生研究所（地衛研）への技術支援を継続することにより、国内流行株から適切なワクチン候補株を収集する基盤強化に貢献できる。さらに、インフルエンザワクチンの血清学的な評価研究をおこない、ワクチンの有効性やワクチン株の適正な選定に貢献する。

A. 研究目的

- (1) 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。国内においては地衛研、海外においては周辺諸国および GISRS と連携し、流行株の収集力と解析系の改良と国際標準化を促進する。
- (2) 地衛研から臨床検体と分離株を収集できる連携基盤が強固になったことから、国内発の世界標準ワクチン株の開発と供給力を強化する。また、他の研究事業で実施している国家プロジェクトの細胞培養ワクチン開発研究と連携し、その実用化に貢献する。
- (3) WHO インフルエンザ協力センターとしての国際貢献およびわが国のワクチン株選定への貢献をすべく研究を行い、国内および世界のインフルエンザ対策に直接的に参画し、研究から得られた成果、情報を適宜提供し、国内外のインフルエンザ対策に貢献する。

B. 研究方法

- A/H3N2 亜型ウイルスの分離・増殖効率を改善する細胞株として、上気道咽頭由来の Detroit 562 細胞について検討した。
- A(H3N2) 流行株の抗原性解析系を見直し、従来法として中和試験法、改良法として Focus Reduction Assay (FRA) の導入と標準化を行った。
- 2016/17, 2017/18 シーズンに国内および海外（ラオス、台湾、モンゴル、韓国、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。
- 11 箇所のコア・サポート地衛研に合成した RNA 陽性コントロールを配布し、「A/H1N1pdm09 H275Y 耐性株検出法実験プロトコール ver.2」に従って TaqMan RT-PCR 法の精度管理試験を実施した。
- 国内の提携医療機関から臨床検体の提供

を受け、鶏卵の羊膜腔に接種してウイルスの分離・回収を行った。

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、2017年11月に国内2社のワクチン接種を実施した。接種前と接種3-4週間後の2回、血清を採血した

(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

- ① サーベイランスに用いてきた MDCK 細胞の代替えとなる細胞を検索し、咽頭由来株化細胞の Detroit 562 細胞について検討した。本細胞は、長期間培養 (2 週間) ではトリプシン非存在下でウイルス増殖を確認できた。
- ② 2017/18 シーズンの国内用ワクチン株について、FRA 試験にて抗原性解析を実施した。ワクチン製造に供される鶏卵分離株、高増殖株に対する抗血清に対しては、流行株の 9 割は反応性が低く、抗原性がミスマッチしていることが示された。一方で、細胞分離株の A/シンガポール/INFIMH-16-0019/2016 株に対する抗血清とは 8 割以上、抗鶏卵分離 A/シンガポール/INFIMH-16-0019/2016 株血清とは 5 割程度の野外分離株が抗原的に類似性していた。
- ③ 入手できた国内外の流行株の HA 遺伝子について進化系統樹解析を行った。A(H1N1)pdm09 ウイルスは全てクレード 6B.1、A(H3N2) ウイルスは 2016/17、2017/18 シーズンは全ての株が 3C.2a に属した。3C.2a 内には複数のサブクレードが形成され、2017/18 シーズンには 3C.2a1a, 3C.2a1b, 3C.2a2, 3C.2a3, 3C.2a4 に細分化された。B 型ウイルス Yamagata 系統は、クレード 3 に全て属した。Victoria 系統の分離株は全て、サブクレード 1A に属した。海外で報告されている抗原性変異株群のうち、2 アミノ酸欠損株 (162, 163 位)、3 アミノ酸欠損株 (162-164 位)、および 2 アミノ酸置換株 (K165N, T221I) は散発的に検出されているが現在のところ広い流行は確認されていない。
- ④ 最近の A(H3N2) ウイルスはワクチン製造用として鶏卵で分離することが困難な性質になっているため、WHOCC ロンドンセンター法を参考にして、鶏卵分離条件の検討を行った。変更可能は技法の修正を行った結果、分離率が 20%にまでに上昇し、これまでの 0%から大きな改善を達成できた。他の亜型のウイルスに関しては、A(H1N1)pdm09 ウイルス 37 株、A(H3N2) ウイルス 23 株、B 型ビクトリア系統ウイルス 20 株、B 型山形系統ウイルス 17 株を分離することができた。
- ⑤ A(H1N1)pdm09 ウイルスは国内株 371 株および海外株 64 株、A(H3N2) ウイルスは国内株 268 株および海外株 131 株、B 型ウイルスは国内株 451 株および海外株 105 株について薬剤耐性モニタリングを実施した。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 10 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。
- ⑥ 薬剤耐性検査の外部精度管理に向けた実態調査を 11 箇所すべてのコア・サポート地衛

研において実施し、達成目標の2項目について良好な成績を得た。

- ⑦ 成人層 (41.7±10.1 歳) のペア血清は 94 件、高齢者層 (83.5±11.3 歳) のペア血清 57 件を採取した。EMEA が定めるワクチンの有効性の国際基準に沿って、国産ワクチンの免疫原性を評価した。その結果、今年度の国産ワクチンは全体的に低い免疫原性であることが明らかになった。一方、ワクチン接種後の副反応について、昨シーズンと比較したところ、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減少した。また、全身的な重度の副反応は認められなかった。
- ⑧ Multi-segment RT-PCR による増幅後、ウイルス株 A/Guangdong/17SF003/2016 (H7N9) 及び A/Taiwan/1/2017 (H7N9) の全ゲノム解析を行った結果、迅速かつ正確にウイルス株の全ゲノムを解析することが出来た。

D. 考察

国内およびWHOのインフルエンザ株サーベイランスおよびワクチン候補株の検索と選定を支援するための研究を進め、これらの基盤強化への貢献を目標とした。

本研究班では、ウイルス分離効率を高める試み、H3N2 ウイルスの鶏卵分離効率の改善および薬剤耐性株検出検査のEQA実施への試行的な調査を行い、本研究の目標達成に前進が見られた。また、収集した流行株の解析法の改良と諸外国のWHO-CCとの技術統一のための国際標準化を進め、センター間での解析データのバラツキの改善に貢献した。さらに、各年度の国産ワクチンの有効性評価の一環として、免疫原性を国際基準に照らし合わせて評価した。海外ワクチンの情報(非公開)と比べて、国産ワクチンは良好とは言えない現状を国のワクチン対策に適切に助言し、今後の検討に貢献したい。

E. 結論

- ウイルス分離・増殖効率を改善する細胞株の探索を継続した。
- A/H3N2 亜型分離株抗原性解析法に感染細胞巣減数試験法 (Focus reduction assay, FRA) を確立。次期 2018/19 シーズンワクチン推奨株選定に大きく貢献した。
- 2009 年以降、(H1N1)pdm09 の抗原性は変化していることを、ワクチン接種者のヒト血清で捉えた。
- B 型ビクトリア系統に出現した 2 アミノ酸欠損変異株の国内流行に注視が必要。
- ワクチン候補株の鶏卵分離法の改訂に成功した。
- コア・サポート地衛研においては、薬剤耐性株検出系の検査精度が昨年度より上昇していることを確認した。
- 2017-2018 年シーズンのワクチンは接種後の抗体価上昇が低く、免疫原性の低いワクチンであった。次のシーズンのワクチン株の選定のために、今後も調査を継続する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Wada Y, Nithichanon A, Nobusawa E, Moise L, Martin WD, Yamamoto N, Terahara K, Hagiwara H, Odagiri T, Tashiro M, Lertmemongkolchai G, Takeyama H, Groot AS, Ato M, Takahashi Y. A humanized mouse model identifies key amino acids for low immunogenicity of H7N9 vaccines. *Sci Rep.* 2017 Apr 28;7(1):1283
- 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.* 2017 Apr 10;8:584.

- Gubareva LV, Besselaar TG, Daniels RS, Fry A, Gregory V, Huang W, Hurt AC, Jorquera PA, Lackenby A, Leang SK, Lo J, Pereyaslov D, Rebelo-de-Andrade H, Siqueira MM, Takashita E, Odagiri T, Wang D, Zhang W, Meijer A Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2015–2016. *Antiviral Res.* 2017 Aug 10;146:12–20.
 - Nakamura K, Shirakura M, Fujisaki S, Kishida N, Burke DF, Smith DJ, Kuwahara T, Takashita E, Takayama I, Nakauchi M, Chadha M, Potdar V, Bhushan A, Upadhyay BP, Shakya G, Odagiri T, Kageyama T, Watanabe S Characterization of influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated from Nepalese and Indian outbreak patients in early 2015 *Influenza Other Respir Viruses.* 2017 Sep;11(5):399–403
 - Imai M, Watanabe T, Kiso M, Nakajima N, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Hatta M, Yamada S, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Shirakura M, Takashita E, Fujisaki S, McBride R, Thompson AJ, Takahashi K, Maemura T, Mitake H, Chiba S, Zhong G, Fan S, Oishi K, Yasuhara A, Takada K, Nakao T, Fukuyama S, Yamashita M, Lopes TJS, Neumann G, Odagiri T, Watanabe S, Shu Y, Paulson JC, Hasegawa H, Kawaoka Y. A Highly Pathogenic Avian H7N9 Influenza Virus Isolated from a Human Is Lethal in Some Ferrets Infected via Respiratory Droplets. *Cell Host Microbe.* 2017 Nov 8;22(5):615–626. e8.
 - Terauchi Y, Sano K, Aina A, Saito S, Taga Y, Ogawa-Goto K, Tamura SI, Odagiri T, Tashiro M, Fujieda M, Suzuki T, Hasegawa H. IgA polymerization contributes to efficient virus neutralization on human upper respiratory mucosa after intranasal inactivated influenza vaccine administration. *Hum Vaccin Immunother.* 2018 Feb 9:1–11.
2. 学会発表
- Takashita E, Shirakura M, Fujisaki S, Nakamura K, Kuwahara T, Kishida N, Watanabe S, Odagiri T Antiviral susceptibility of avian influenza A(H7N9) viruses isolated from humans. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017 年 10 月.
 - Watanabe S, Nakamura K, Kishida N, Fujisaki S, Shirakura M, Takashita E, Kuwahara T, Sato A, Akimoto M, Miura H, Ogawa R, Sugawara H, Watanabe K, Miura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Odagiri T, The influenza surveillance group of Japan. Characterizations of circulating influenza viruses in the 2016/17 season and vaccine viruses for the 2017/18 season. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017 年 10 月.
 - Takahashi H, Fujimoto T, Horikoshi F, Uotani T, Okutani M, Hamamoto I, Odagiri T, Nobusawa E. Development of the cell-culture candidate vaccine viruses and quality evaluation method for production of cell-based influenza vaccines. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017 年 10 月.
 - Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Sato A, Ogawa R, Miura H, Akimoto M, Sugawara H,

Watanabe S, Odagiri T.
Characterization of cell-derived and
egg-passaged influenza
A/Saitama/103/2014 (H3N2) strain. 第
65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、
2017 年 10 月

- ・ 小田切孝人 鳥インフルエンザの疫学
について 新型インフルエンザの診療
と対策に関する研修、東京、2017 年 11
月
- ・ Odagiri T Avian influenza viruses
and pandemic preparedness in Japan.
The 11th Korea-Japan-China Forum for
Communicable Diseases Control and
Prevention. Seoul, 2017. November.
- ・ 小田切孝人、倉根一郎 2017/18 シーズ
ンのインフルエンザ A(H3N2) ワクチン株
について 第 21 回日本ワクチン学会、
福岡、2017 年 12 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

H. 健康危険情報

該当なし

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

研究分担者 渡邊 真治

国立感染症研究所・インフルエンザウイルス研究センター・室長

研究要旨

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を目的に検討試験を進めた。

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、特に季節性ウイルスのひとつである A/H3N2 亜型ウイルスについて、MDCK 細胞を用いての分離・増殖効率の低下傾向が報告されてきており、野外流行株の分離捕捉率の低下、またこれによる流行株性状の正確な把握が妨げられることが懸念されている。そこで、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、昨年度より株化細胞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 細胞以外でヒト呼吸器系由来株化細胞に着目した。中でも、季節性インフルエンザウイルスの増殖の場である上気道咽頭由来の Detroit 562 細胞について検討した。

（倫理面への配慮）

該当なし

C. 研究結果

通常、株化細胞は継代後 3-4 日で培養面一面に増殖し、その状態でウイルス感染に用いられることが一般的である。ところが、肺胞上皮由来株化細胞において、長期間（約 3 週間）培養によって細胞の性質が分化状態へ誘導される報告があり (Cooper et al., PLoS One, 11:

e0164438, 2016)、咽頭由来株化細胞の Detroit 562 細胞について、通常培養と長期間（2 週間）培養を行い、ウイルスの増殖について調べた。インフルエンザウイルスの増殖には、トリプシン様酵素が必須であるが、通常培養（2-3 日間）ではトリプシン非存在下ではウイルス増殖が確認されなかったが、長期間培養ではトリプシン非存在下においてもウイルス増殖が確認された。以上の結果は、Detroit 562 細胞は、長期間培養によりトリプシン様酵素を分泌する細胞へ状態が変化したことを示唆している。

D. 考察

Detroit 562 細胞は、長期間培養によりトリプシン様酵素を分泌する細胞へ状態が変化したことを示唆しており、よりヒト体内における性質を有した細胞に状態が変化し、そのためウイルスが増殖出来るようになったと考えられた。

E. 結論

ウイルス分離・増殖に関する技術支援の一環で、分離・増殖効率を改善する細胞株の探索を行い、これまでの培養法（2-3 日間の培養）とは違い、長期間培養（約 3 週間の培養）で、よりヒト体内における性質を有した細胞に状態が変化し、ウイルスが増殖することを確認した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Nakamura K, Shirakura M, Fujisaki S, Kishida N, Burke DF, Smith DJ, Kuwahara T, Takashita E, Takayama I, Nakauchi M, Chadha M, Potdar V, Bhushan A, Upadhyay BP, Shakya G, Odagiri T, Kageyama T, Watanabe S, Characterization of influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated from Nepalese and Indian outbreak patients

in early 2015. *Influenza Other Respir Viruses*. 11(5) 399-403 2017

- 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
- Imai M, Watanabe T, Kiso M, Nakajima N, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Hatta M, Yamada S, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Shirakura M, Takashita E, Fujisaki S, McBride R, Thompson AJ, Takahashi K, Maemura T, Mitake H, Chiba S, Zhong G, Fan S, Oishi K, Yasuhara A, Takada K, Nakao T, Fukuyama S, Yamashita M, Lopes TJS, Neumann G, Odagiri T, Watanabe S, Shu Y, Paulson JC, Hasegawa H, Kawaoka Y. Highly Pathogenic Avian H7N9 Influenza Virus Isolated from A Human Is Lethal in Some Ferrets Infected via Respiratory Droplets. *Cell Host Microbe*. 22(5) 615-26 2017
- Uda K, Shoji K, Koyama-Wakai C, Furuichi M, Iwase N, Fujisaki S, Watanabe S, Miyairi I. Clinical characteristics of influenza virus-induced lower respiratory infection during the 2015 to 2016 season. *J Infect Chemother*. pii: S1341-321X(18)30007-2. 2018
- Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Watanabe S, Odagiri T. Isolation of egg-adapted influenza A(H3N2) virus without amino acid substitutions in the antigenic

sites of its hemagglutinin. Jpn J Infect Dis. (In press)

2. 学会発表

- Watanabe S, Nakamura K, Kishida N, Fujisaki S, Shirakura M, Takashita E, Kuwahara T, Sato A, Akimoto M, Miura H, Ogawa R, Sugawara H, Watanabe K, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Odagiri T, The Influenza Surveillance Group of Japan. Characterizations of circulating influenza viruses in the 2016/17 season and vaccine viruses selected for the 2017/18 season. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017 年 10 月
- Takashita E, Shirakura M, Fujisaki S, Nakamura K, Kuwahara T, Kishida N, Watanabe S, Odagiri T. Antiviral susceptibility of avian influenza A(H7N9) viruses isolated from humans. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017 年 10 月
- Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Sato A, Ogawa R, Miura H, Akimoto M, Sugawara H, Watanabe S, Odagiri T. Characterization of cell-derived and egg-passaged influenza A/Saitama/ 103/2014 (H3N2) strain. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017 年 10 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

H. 健康危険情報

該当なし

ウイルス中和試験改良変法を用いた A/H3N2 亜型野外流行株の抗原性解析

研究分担者 中村一哉

国立感染症研究所・インフルエンザウイルス研究センター・主任研究官

研究要旨

有効性の高いインフルエンザワクチンの製造、供給には流行株の性状を正確に捉え、流行株の抗原性に一致したウイルス株をワクチン製造用株として選定することが肝要である。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、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 亜型株の流行が拡大している。これに対応すべく、前年度までに HI 試験の代替法として中和試験法を用いた A/H3N2 亜型株抗原性解析法およびその改良変法であるウイルス感染細胞単減数試験法（Focus reduction assay, FRA）を確立した。本年度は FRA の試験精度や試験結果の再現性の評価を行うとともに、FRA を用いた A/H3N2 亜型株抗原性解析を駆使して、インフルエンザ野外流行株の抗原性状の正確な捕捉に寄与した。

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、近年では中和試験法を代替手法として H3N2 亜型分離株の抗原性解析を実施している。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たため、試験結果再現性をよ

り高めるために手法の改良を進めてきた。本研究では中和試験法による分離株抗原性解析の問題点改善を目的に、前年度に確立したウイルス感染細胞単減数試験法（Focus reduction assay, FRA）について、試験精度や試験結果の再現性の評価を行うとともに、FRA を用いた A/H3N2 亜型株抗原性解析を駆使して、インフルエンザウイルス野外流行株の抗原性状の正確な捕捉に寄与することを目的とする。

B. 研究方法

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

2016/2017 および 2017/2018 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、3μg/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、100TCID₅₀/50μl 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°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、半流動体ゲル Avicel 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

各種被験抗血清と供試ウイルス株との反応性 (中和抗体価) は、図 1 に例示する FRA 試験プレートから算定された。2017 年 9 月以降に分離された野外流行株の抗原性解析を行った結果、2017/18 シーズンの国内用ワクチン株である A/香港/4801/2014 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、抗細胞分離株血清の場合、5 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。しかし、

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2017年9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た(図2)。

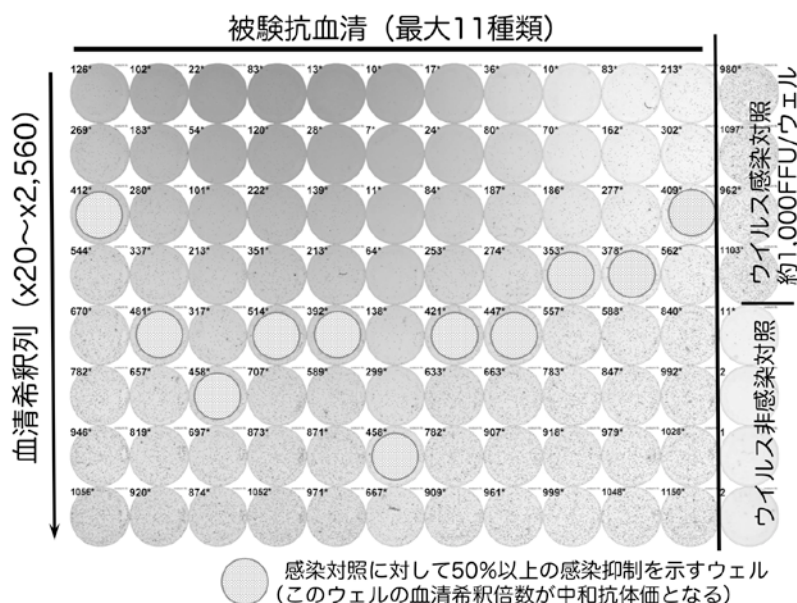


図1 FRA 試験プレートの一例

一方で、A/シンガポール/INFIMH-16-0019/2016株は細胞分離株に対する抗血清とは8割以上、抗鶏卵分離株血清とは5割程度の野外分離株がホモ価との反応性差異が4倍以内であり、現在の野外分離株とA/シンガポール/INFIMH-16-0019/2016株の抗原的類似性が確認された(図2)。

これら結果は国内外で実施された2018/19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、次期2018/19シーズンワクチン推奨株は前シーズンのA/香港/4801/2014株からA/シンガポール/INFIMH-16-0019/2016株に変更された。

今回分離株抗原性解析に用いたFRAは試験結果の対照評価に用いる参照抗原と抗血清との反応で得られる中和抗体価が従来行っていた試験法よりも複数回の試験を通じて、安定して観察されることを確認した。

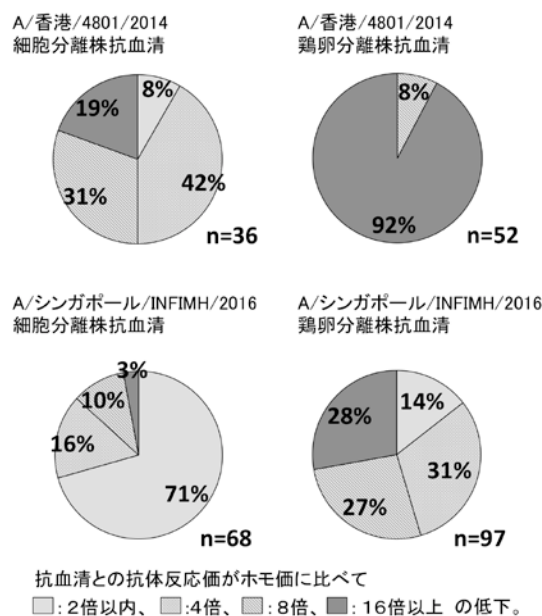


図2 各種フェレット抗血清とA/H3N2型型分離株との反応性

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え手段の検討、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。本研究で確立したウイルス感染細胞巢減数試験法 (Focus reduction assay, FRA) は、従来実施していた中和試験法よりも試験精度や結果再現性に優れるものと考えられた。また、実際の業務における FRA の抗原性解析改良手法としての有用性も併せて示されたことで、当該業務の今後の成果拡大も見込まれる。

E. 結論

A/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確立したウイルス感染細胞巢減数試験法 (Focus reduction assay, FRA) を用いて 2017/18 シーズンの分離株抗原解析を実施した。次期 2018/19 シーズンワクチン推奨株 A/シンガポール/INFIMH-16-0019/2016 株の選定に大きく寄与した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Kazuya Nakamura, Masayuki Shirakura, Seiichiro Fujisaki, Noriko Kishida, David F Burke, Derek J Smith, Tomoko Kuwahara, Emi Takashita, Ikuyo Takayama, Mina Nakauchi, Mandeep Chadha, Varsha Potdar, Arvind

Bhushan, Bishnu Prasad Upadhyay, Geeta Shakya, Takato Odagiri, Tsutomu Kageyama, Shinji Watanabe. Characterization of influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated from Nepalese and Indian outbreak patients in early 2015.

Influenza and Other Respiratory Viruses 11, 399-403, 2017

- Tomoko Kuwahara, Emi Takashita, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Kazuya Nakamura, Noriko Kishida, Hitoshi Takahashi, Noriko Suzuki, Yoshihiro Kawaoka, Shinji Watanabe, Takato Odagiri. Isolation of egg-adapted influenza A(H3N2) virus without amino acid substitutions in the antigenic sites of its hemagglutinin. Japanese Journal of Infectious Diseases (in press), 2018

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, Kayo Watanabe, Keiko Mitamura, Takashi Abe, Masataka Ichikawa, Masahiko Yamazaki, Takato Odagiri, The Influenza Surveillance Group of Japan. Characterizations of circulating influenza viruses in the 2016/2017 season and vaccine viruses for the 2017/18 season.

第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017 年 10 月

- Emi Takashita, Masayuki Shirakura,

Seiichiro Fujisaki, Kazuya Nakamura, Tomoko Kuwahara, Noriko Kishida, Shinji Watanabe, Takato Odagiri. Antiviral susceptibility of avian influenza A(H7N9) viruses isolated from humans.

第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017 年 10 月

- Tomoko Kuwahara, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Kazuya Nakamura, Emi Takashita, Hitoshi Takahashi, Noriko Kishida, Aya Sato, Rie Ogawa, Hideka Miura, Miki Akimoto, Hiromi Sugawara, Noriko Suzuki, Shinji Watanabe, Takato Odagiri. Characterization of cell-derived and egg-passaged influenza A/Saitama/103/2014 (H3N2) strain.

第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017 年 10 月

- Chiharu Kawakami, Shigeo Sugita, Seiichiro Fujisaki, Kazuya Nakamura, Miwako Saikusa, Shuzo Usuku. 2016/17 シーズンに流行した AH3 型インフルエンザウイルスの遺伝子多様性

第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017 年 10 月

- Emi Takashita, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Kazuya Nakamura, Noriko Kishida, Tomoko Kuwahara, Masaru Yokoyama, Hironori Sato, Shinji Watanabe, Takato Odagiri.

Growth capabilities of influenza A(H1N1)pdm09 viruses exhibiting

enhanced cross-resistance to oseltamivir and peramivir.

The 6th ESWI Influenza Conference Riga, Latvia, Sep/2017

- Emi Takashita, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Kazuya Nakamura, Noriko Kishida, Tomoko Kuwahara, Shinji Watanabe, Takato Odagiri, The Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Detection of influenza A(H1N1)pdm09 viruses exhibiting enhanced cross-resistance to oseltamivir and peramivir in Japan. The 5th ISIRV-AVG Conference Shanghai, China, June/2017

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

H. 健康危険情報

該当なし

(H1N1)pdm09 分離株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

(H1N1)pdm09 分離株の抗原性は比較的安定であるとされ、2009 年の流行以来、ワクチン株の変更は行われていないが、2009 年当初の株と比較すると、少しずつ抗原性部位にアミノ酸置換の集積が認められた。しかしながら、フェレット感染血清を用いた抗原性解析では(H1N1)pdm09 の抗原性の変化を捉えることができなかった。そこで、ワクチン接種者の血清を用いて、ワクチン製造株および2009年から2016年までの特徴的なアミノ酸置換を持つウイルスとの反応性を赤血球凝集阻止試験により比較解析した結果、ワクチン接種者の血清は(H1N1)pdm09 の抗原性の変化を捉えられることがわかった。

A. 研究目的

フェレット感染血清を用いた赤血球凝集阻止(HI)試験による解析では、(H1N1)pdm09 ウイルスは、2009 年の分離当初から目立った抗原性の変化は認められていないが、遺伝子解析から抗原性に影響すると考えられるアミノ酸置換は認められている。そこで、(H1N1)pdm09 分離株の抗原性の変化を明らかにするために、2009 年から 2016 年までの分離株についてワクチン接種者の血清を用いて比較した。

B. 研究方法

ヒト血清は、2010/11、2012/13、2015/16 シーズンのワクチン接種後血清(20歳以上60歳未満)各シーズン24人ずつを使用した。使用ウイルスは、ワクチン製造株 California/7/09 (X-179A)、2009 年分離株 3 株、クレード 6 (A185T, S203T のアミノ酸置換)に属する 2010 から 2012 年分離株 3 株、クレード 6B (K163Q のアミノ酸置換)に属する 2013 から 2015 年の分離株 3 株、クレード 6B1 (K163Q + S162N のアミノ酸置換)に属する 2015 年の分離株 2 株、クレード 6B2 (K163Q + V152T のアミノ酸置換)に属する 2015 と 2016 年の分離株 2 株、反応性低下株のコントロールとしてクレード 7 に属する札幌/163/11 株、以上 15 株を使用した。札幌

/163/11 株はフェレット感染血清でも反応性が大きく低下する株である。抗原性解析には HI 試験を用いた。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

3 シーズンの血清全てにおいて、2009 年の(H1N1)pdm09 流行当初から野外株との反応性がワクチン製造株との反応性より大きく低下していることがわかった。2010/11 シーズン血清でみると、2010 年に分離され始めたクレード 6 のウイルスには比較的よく反応(80 - 142.5 GMT)したのに対して、2012 年に分離され始めたクレード 6B ウイルスとの反応性は大きく低下した(44.9 - 71.3 GMT)。またクレード 6B1 のウイルスに対してはさらに反応性が低下していた(26.7 - 28.3 GMT)。6B2 のウイルスに対しては 6B のウイルスとの反応性と同等であった(40.0 - 65.4 GMT)。反応性低下株のコントロールとして用いた札幌/163/11 株の GMT は 15.4 であった。この反応性のパターンは 3 シーズンとも共通していたが、シーズンを経るごとに野外株との反応性は上がり、20 HI 以下の検体数は減った。

D. 考察

3 シーズンの血清全てにおいて、2009 年の (H1N1)pdm09 流行当初から野外株との反応性がワクチン製造株との反応性より大きく低下したのは、ワクチン製造過程の発育鶏卵培養中に起こった HA の抗原部位のアミノ酸置換 (Q223R) による影響が大きいと考えられる。クレード 6B ウイルスとの反応性が大きく低下したのは、抗原部位にある 163 番目のアミノ酸置換 (K→Q) の影響が大きいと考えられる。またクレード 6B1 のウイルスとの反応性の低下は 162 番目のアミノ酸置換により付加される糖鎖が影響していることが考えられた。6B2 のウイルスが持つアミノ酸置換 (V152T) は 6B1 の糖鎖付加ほどは影響が大きくなかったと考えられた。

E. 結論

2009 年以降、(H1N1)pdm09 の抗原性は変化しており、フェレット感染血清では捉えられなかったが、ワクチン接種者の血清では捉えられることがわかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Nakamura K, Shirakura M, Fujisaki S, Kishida N, Burke DF, Smith DJ, Kuwahara T, Takashita E, Takayama I, Nakauchi M, Chadha M, Potdar V, Bhushan A, Upadhyay BP, Shakya G, Odagiri T, Kageyama T, Watanabe S. Characterization of influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated from Nepalese and Indian outbreak patients in early 2015. *Influenza Other Respir Viruses*. 11(5) 399-4032017
- Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Watanabe S, Odagiri T. Isolation of egg-adapted influenza A(H3N2) virus without amino acid substitutions in the antigenic sites of its hemagglutinin. *Jpn J Infect Dis*. (In press)

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

H. 健康危険情報

該当なし

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・主任研究官

研究要旨

2016/17, 2017/18 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 ウイルスは全てサブクレード 6B.1 に属した。A(H3N2) ウイルスは全てがクレード 3C.2a に属し、更に 3C.2a1 を含む複数の集団に分岐した。B 型では、Yamagata 系統はクレード 3 が、Victoria 系統はクレード 1A が流行した。A(H3N2) ウイルスだけでなく他の亜型、系統にも多様な遺伝子集団が出現しているため抗原性の変化を含め、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

2016/17, 2017/18 シーズンに国内および海外（ラオス、台湾、モンゴル、韓国、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、2016/17 シーズンには A(H1N1)pdm09 を 249 株、A(H3N2) を 540 株、B 型を 302 株、2017/18 シーズン（2018 年 4 月時点）には A(H1N1)pdm09 を 127 株、A(H3N2) を 127 株、B 型を 162 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、2016/17, 2017/18 シーズンの分離株は全てクレ-

ド 6B.1（アミノ酸置換：S84N, S162N, I216T に属した。さらに、S74R, S164T, I295V を持つ集団が流行の中心となった。NA タンパク質に薬剤耐性マーカーのアミノ酸置換 H275Y を有する株はごく少数検出されたが、流行は確認されていない。

A(H3N2) ウイルス：2016/17, 2017/18 シーズンは全ての株が 3C.2a (L3I, N144S, K160T, N255D, Q311H, F159Y) に属した。3C.2a 内にはサブクレード 3C.2a1 (N171K, I406V, G484E) を含め複数の集団が形成され、2017/18 シーズンには 3C.2a1a (3C.2a1 + N121K, G479E, T135K, N122D), 3C.2a1b (3C.2a1 + N121K, K92R, H311Q), 3C.2a1b + 135K (3C.2a1b + E62G, R142G, T135K), 3C.2a1b + 135N (3C.2a1b + T135N), 3C.2a2 (T131K, R142K, R261Q), 3C.2a3 (N121K, S144K), 3C.2a4 (N31S, D53N, R142G, S144R, N171K, I192T, Q197H) と細分化した。

B 型ウイルス：Yamagata 系統は、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）に全て属した。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。海外で報告されている抗原性変異株群のうち、2 アミノ酸

欠損株 (162, 163 位)、3 アミノ酸欠損株 (162-164 位)、および 2 アミノ酸置換株 (K165N, T221I) は散発的に検出されているが現在のところ広い流行は確認されていない。

D. 考察

2017/18 シーズンは、A 型については当初 A(H1N1)pdm09 ウイルスが流行の主流であったが、2018 年に入り A(H3N2) ウイルスの流行が A(H1N1)pdm09 を上回った。昨シーズンに引き続き 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ことが特徴的である。A(H1N1)pdm09 ウイルスでも同様にウイルス群が遺伝的に多様化しつつある。B 型については、例年と異なりシーズンの早い段階から山形系統が流行し各亜型・系統の中で最も多く検出されたことが特徴的といえる。山形系統では遺伝的に大きな変化は認められなかったが、ビクトリア系統では遺伝的にも明確に他と異なる抗原性変異群が出現した。流行シーズン以外でも、報告されるウイルスに注意し継続した監視が必要である。

E. 結論

A(H1N1)pdm09 ウイルスはシーズン初めに流行の主流となったが、今後の遺伝子の変化と抗原性への影響に注視したい。A(H3N2) ウイルスは細分化した各サブクレード群のアミノ酸置換と抗原性の関係解明が課題に残っている。B 型はビクトリア系統に出現した各抗原性変異株群が伝播するのか懸念される。

F. 研究発表

1. 論文発表

・ Nakamura K, Shirakura M, Fujisaki S, Kishida N, Burke DF, Smith DJ, Kuwahara T, Takashita E, Takayama I, Nakauchi M, Chadha M, Potdar V, Bhushan A, Upadhyay BP, Shakya G, Odagiri T, Kageyama T, Watanabe S. Characterization of influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated from Nepalese and Indian outbreak patients in early 2015. *Influenza*

Other Respir Viruses. 11(5) 399-403 2017

- ・ 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
- ・ Imai M, Watanabe T, Kiso M, Nakajima N, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Hatta M, Yamada S, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Shirakura M, Takashita E, Fujisaki S, McBride R, Thompson AJ, Takahashi K, Maemura T, Mitake H, Chiba S, Zhong G, Fan S, Oishi K, Yasuhara A, Takada K, Nakao T, Fukuyama S, Yamashita M, Lopes TJS, Neumann G, Odagiri T, Watanabe S, Shu Y, Paulson JC, Hasegawa H, Kawaoka Y. A Highly Pathogenic Avian H7N9 Influenza Virus Isolated from a Human Is Lethal in Some Ferrets Infected via Respiratory Droplets. *Cell* Uda K, Shoji K, Koyama-Wakai C, Furuichi M, Iwase N, Fujisaki S, Watanabe S, Miyairi I. Clinical characteristics of influenza virus-induced lower respiratory infection during the 2015 to 2016 season. *J Infect Chemother*. pii: S1341-321X(18)30007-2. 2018 *Host Microbe*. 22(5) 615-26 2017
- ・ Uda K, Shoji K, Koyama-Wakai C, Furuichi M, Iwase N, Fujisaki S, Watanabe S, Miyairi I. Clinical characteristics of influenza virus-induced lower respiratory infection during the 2015 to 2016 season. *J Infect Chemother*. pii: S1341-321X(18)30007-2. 2018
- ・ Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Watanabe S, Odagiri T. Isolation of egg-adapted

influenza A(H3N2) virus without amino acid substitutions in the antigenic sites of its hemagglutinin. Jpn J Infect Dis. (In press)

2. 学会発表

- Genetic diversity of AH3 influenza virus prevalent in the 2016/17 season
Chiharu Kawakami, Shigeo Sugita, Seiichiro Fujisaki, Kazuya Nakamura, Miwako Saikusa, and Shuzo Usuku
第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017 年 10 月
- Characterizations of cell-derived and egg-passaged A/Saitama/103/2014 virus
Tomoko Kuwahara, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Kazuya Nakamura, Emi Takashita, Hitoshi Takahashi, Noriko Kishida, Aya Sato, Rie Ogawa, Hideka Miura, Miki Akimoto, Hiromi Sugawara, Noriko Suzuki, Shinji Watanabe, Takato Odagiri
第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017 年 10 月
- Characterizations of circulating influenza viruses in the 2016/2017 season and vaccine viruses for the 2017/18 season
Shinji Watanabe, Kazuya Nakamura, Noriko Kishida, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Emi Takashita, Tomoko Kuwahara, Aya Sato, Rie Ogawa, Hiromi Sugawara, Miki Akimoto, Hideka Miura, Kayo Watanabe, Keiko Mitamura, Takashi Abe, Masataka Ichikawa, Masahiko Yamazaki, Takato Odagiri, The Influenza Surveillance Group of Japan
第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017 年 10 月
- Antiviral susceptibility of avian influenza A(H7N9) viruses isolated from humans
Emi Takashita, Masayuki Shirakura, Seiichiro Fujisaki, Kazuya Nakamura, Tomoko Kuwahara, Noriko Kishida, Shinji Watanabe, and Takato Odagiri
第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017 年 10 月
- 2016/17 シーズンに流行した AH3 型インフルエンザウイルスの特徴と遺伝子解析
七種美和子、宇宿秀三、笹尾忠由、豊澤隆弘、藤崎誠一郎、中村一哉、渡邊真治
第 49 回日本小児感染症学会総会・学術集会、金沢、2017 年 10 月
- Growth capabilities of influenza A(H1N1)pdm09 viruses exhibiting enhanced cross-resistance to oseltamivir and peramivir
Emi Takashita, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Kazuya Nakamura, Noriko Kishida, Tomoko Kuwahara, Masaru Yokoyama, Hironori Sato, Shinji Watanabe, Takato Odagiri
- 6th ESWI Influenza Conference, Latvia, Sep. 2017

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

H. 健康危険情報

該当なし

インフルエンザウイルスワクチン株の鶏卵における分離

研究分担者：桑原 朋子 国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター・研究官
研究協力者：高下 恵美 同上・主任研究官

研究要旨

現行の季節性インフルエンザワクチンには、発育鶏卵（鶏卵）で分離されたウイルスが用いられる。より有効性の高いワクチン株の選定に貢献することを目的として、当研究所でもワクチン候補株の分離を行っている。今年度は、鶏卵におけるウイルス分離率の改善を目指し、分離条件を再検討した。その結果、昨年度は A (H3N2) ウイルスが分離できていなかったが、今回分離条件を変更することにより、A (H3N2) ウイルスの分離に成功した。総合すると、97 株のウイルスをワクチン候補株として鶏卵で分離した。

A. 研究目的

WHO の季節性インフルエンザワクチン推奨株は、5 つの WHO Collaborating Centre (WHOCC) により、鶏卵で分離されたウイルスの中から選定される。我々、国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センターも 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。この現象により、現在 A (H3N2) ウイルスのワクチン候補株が世界的に不足するという事態が起こっている。

我々は、昨年度から A (H3N2) ウイルスの鶏卵での分離率の改善を目指し、4 箇所の提携医療機関から、凍結する前でウイルスタイターが高い状態にある臨床検体を提供してもらい、ウイルスの鶏卵分離を試みてきた。しかしながら、B 型ウイルスの分離率は 92%程度であるのに対し、A (H3N2) ウイルスの分離率は 0%であった。今年度、我々は、さらに分離条件を検討し、ワクチン候補株の分離効率の改善を試みた。

B. 研究方法

臨床検体は、国内の提携医療機関から、凍結せずに低温に保った状態で送付されてきたも

のをを用いた。臨床検体到着後、RT-LAMP 法により検体中のウイルス量の測定と亜型同定を行い、ウイルス量が低いものを除外した。ウイルスは、鶏卵の羊膜腔に臨床検体を原液で 200 μ l ずつ接種した。羊膜腔でウイルスが増殖したかどうかは、HA アッセイまたは、RT-LAMP 法により判定した。羊膜腔での増殖が確認されたウイルスは、ワクチン候補株として十分な量を確保するため、漿尿膜腔でさらに継代した。

（倫理面への配慮）

該当なし

C. 研究結果

我々の従来の方法では A (H3N2) ウイルスが分離できなかったため、WHOCC ロンドンセンターで採用されているプロトコルを共有してもらい、このプロトコルをもとに分離条件の検討を行った。具体的な検討項目は、鶏卵の種類では、これまで使用してきた 9-10 日齢の白玉鶏ジュリアとロンドンセンターで用いられている 14 日齢の赤玉鶏ボリスブラウンとの比較、接種方法では、従来行ってきた漿尿膜の上の卵殻膜を取り除いて鶏卵内を可視化し接種する方法と、卵殻膜を取り除かず上から PBS を添加するこ

とにより鶏卵内を可視化して接種する方法ではどちらの分離率が良いかを比較検討した。その結果、14日齢の赤玉鶏に、卵殻膜を取り除いた状態で接種した時に最も分離率が高いことが分かった。A(H3N2)ウイルスにおいては、分離率が0%から20%にまで上昇した。他の亜型のウイルスに関しては、どちらの方法でも高い分離率を示したため、引き続き新規の方法でウイルスの鶏卵分離を行った。その結果、A(H1N1)pdm09ウイルス37株、A(H3N2)ウイルス23株、B型ビクトリア系統ウイルス20株、B型山形系統ウイルス17株を分離することができた。

D. 考察

今回の結果から、14日齢の赤玉鶏に卵殻膜を取り除いてウイルスを接種する方法が最も効率のよい鶏卵分離法であることがわかった。これは、胎児が小さくて弱い9-10日齢の鶏卵では、卵殻膜を取り除くことで胎児に過度なストレスがかかり、胎児が死亡してしまうことがあるが、胎児も成長している14日齢の鶏卵では、胎児も強く、卵殻膜を取り除いても胎児へのストレスが少ないためではないかと考えられる。

E. 結論

今後、ワクチン候補株の鶏卵分離には、14日齢の赤玉鶏ボリスブラウンを用い、接種時には卵殻膜を取り除く方法を採用する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Nakamura K, Shirakura M, Fujisaki S, Kishida N, Burke DF, Smith DJ, Kuwahara T, Takashita E, Takayama I, Nakauchi M, Chadha M, Potdar V, Bhushan A, Upadhyay BP, Shakya G, Odagiri T, Kageyama T, Watanabe S. Characterization of influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated from Nepalese and Indian outbreak patients in early 2015. *Influenza Other Respir Viruses*. 11(5) 399-4032017

- Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Watanabe S, Odagiri T. Isolation of egg-adapted influenza A(H3N2) virus without amino acid substitutions in the antigenic sites of its hemagglutinin. *Jpn J Infect Dis*. (In press)

2. 学会発表

- Tomoko Kuwahara, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Kazuya Nakamura, Emi Takashita, Hitoshi Takahashi, Noriko Kishida, Aya Sato, Rie Ogawa, Hideka Miura, Miki Akimoto, Hiromi Sugawara, Noriko Suzuki, Shinji Watanabe, Takato Odagiri

Characterizations of cell-derived and egg-passaged A/Saitama/103/2014 virus. 第65回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017年10月

- 桑原朋子、高下恵美、藤崎誠一郎、白倉雅之、中村一哉、岸田典子、高橋仁、佐藤彩、小川理恵、三浦秀佳¹、秋元未来、菅原裕美、鈴木典子、渡邊真治、小田切孝人
鶏卵で継代培養した埼玉株のNAに特徴的に認められたアミノ酸置換
第31回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム、静岡、2017年6月

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

H. 健康危険情報

該当なし

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、4 種類のノイラミニダーゼ（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 10 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、昨年度に続き、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・サポート地衛研における検査精度が昨年度より上昇していることが確認された。

A. 研究目的

日本国内において、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 阻害薬のオセルタミビル、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の開始に向けて、本研究では昨年度に続き、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・サポート地衛研では、平成 22 年度に感染研から配布された RNA 陽性コントロールを継続的に使用しており、RNA の経年劣化の可能性を否定できない。そこで、新たに RNA 陽性コントロールを合成し、11 箇所のコア・サポート地衛研に配布した。コア・サポート地衛研では、「A/H1N1pdm09 H275Y 耐性株検出法実験プロトコール ver. 2」に従って RNA 陽性コントロールの 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 371 株および海外株 64 株、A(H3N2) ウイルスは国内株 268 株および海外株 131 株、B 型ウイルスは国内株 451 株および海外株 105 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 10 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、11 箇所すべてのコア・サポート地衛研において評価項目 (1) と (2) の両方を満たしていた。

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 10 名の患者のうち 5 名は集団発生例であり、3 名は家族内発生例だった。いずれも耐性株の感染伝播が起こった可能性を否定できない。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。

昨年度のコア・サポート地衛研における薬剤耐性株検出系の実態調査では、2 箇所の地衛研で評価項目 (1) に問題があった。一方、今年度の実態調査では、11 箇所すべてのコア・サポート地衛研において評価項目 (1) と (2) の両方を満たしていた。

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。

コア・サポート地衛研においては、薬剤耐性株検出系の検査精度が昨年度より上昇していることが確認された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Nakamura K, Shirakura M, Fujisaki S, Kishida N, Burke DF, Smith DJ, Kuwahara T, Takashita E, Takayama I, Nakauchi M, Chadha M, Potdar V, Bhushan A, Upadhyay BP, Shakya G, Odagiri T, Kageyama T, Watanabe S. Characterization of influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated from Nepalese and Indian outbreak patients in early 2015. *Influenza Other Respir Viruses*. 11(5) 399-4032017
- Gubareva LV, Besselaar TG, Daniels RS, Fry A, Gregory V, Huang W, Hurt AC,

Jorquera PA, Lackenby A, Leang SK, Lo J, Pereyaslov D, Rebelo-de-Andrade H, Siqueira MM, Takashita E, Odagiri T, Wang D, Zhang W, Meijer A. Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2015-2016. *Antiviral Res*. 146 12-20 2017

- Imai M, Watanabe T, Kiso M, Nakajima N, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Hatta M, Yamada S, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Shirakura M, Takashita E, Fujisaki S, McBride R, Thompson AJ, Takahashi K, Maemura T, Mitake H, Chiba S, Zhong G, Fan S, Oishi K, Yasuhara A, Takada K, Nakao T, Fukuyama S, Yamashita M, Lopes TJS, Neumann G, Odagiri T, Watanabe S, Shu Y, Paulson JC, Hasegawa H, Kawaoka Y. A Highly Pathogenic Avian H7N9 Influenza Virus Isolated from A Human Is Lethal in Some Ferrets Infected via Respiratory Droplets. *Cell Host Microbe*. 22(5) 615-26 2017
- Yasuhara A, Yamayoshi S, Soni P, Takenaga T, Kawakami C, Takashita E, Sakai-Tagawa Y, Uraki R, Ito M, Iwatsuki-Horimoto K, Sasaki T, Ikuta K, Yamada S, Kawaoka Y. Diversity of antigenic mutants of influenza A(H1N1)pdm09 virus escaped from human monoclonal antibodies. *Sci Rep*. 7(1)177352017
- Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Watanabe S, Odagiri T. Isolation of egg-adapted influenza A(H3N2) virus without amino acid substitutions in the antigenic sites of its hemagglutinin. *Jpn J Infect Dis*. (In press)

2. 学会発表

- ・ 高下恵美. 日本国内で検出されたオセルトミビル・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 91 回日本感染症学会、新宿、2017 年 4 月
- ・ 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、佐藤彩、秋元未来、渡辺佳世、渡邊真治、小田切孝人. 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. 第 31 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム、静岡 2017 年 6 月
- ・ 桑原朋子、高下恵美、藤崎誠一郎、白倉雅之、中村一哉、岸田典子、高橋仁、秋元未来、小川理恵、三浦秀佳、佐藤彩、菅原裕美、鈴木典子、渡邊真治、小田切孝人. 鶏卵で継代培養した埼玉株の NA に特徴的に認められたアミノ酸置換. 第 31 回 インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム、静岡、2017 年 6 月
- ・ Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, 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 Japan. 5th ISIRV AVG conference, Shanghai, China, June 2017.
- ・ Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Yokoyama M, Sato H, Watanabe S, Odagiri T. Growth capabilities of influenza A(H1N1)pdm09 viruses exhibiting enhanced cross-resistance to oseltamivir and peramivir. 6th ESWI Influenza Conference, Riga, Latvia, Sep. 2017
- ・ Takashita E, Shirakura M, Fujisaki S, Nakamura K, Kuwahara T, Kishida N, Watanabe S, Odagiri T. Antiviral susceptibility of avian influenza A(H7N9) viruses isolated from humans. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017 年 10 月
- ・ Watanabe S, Nakamura K, Kishida N, Fujisaki S, Shirakura M, Takashita E, Kuwahara T, Sato A, Akimoto M, Miura H, Ogawa R, Sugawara H, Watanabe K, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Odagiri T, The Influenza Surveillance Group of Japan. Characterizations of circulating influenza viruses in the 2016/17 season and vaccine viruses for the 2017/18 season. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017 年 10 月
- ・ Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Sato A, Ogawa R, Miura H, Akimoto M, Sugawara H, Watanabe S, Odagiri T. Characterization of cell-derived and egg-passaged influenza A/Saitama/103/2014 (H3N2) strain. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017 年 10 月
- ・ 高下恵美. 発育鶏卵における臨床検体からのインフルエンザウイルス分離. 7th Negative Strand Virus-Japan、沖縄、2018 年 1 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

H. 健康危険情報

該当なし

成人層および高齢者層に対する 2017-18 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、尾ヶ井マサヨ（女池南風苑・看護介護科長）、金沢宏
（女池南風苑・施設長）

研究要旨

2017-2018 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/H1N1pdm09 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 94 名（平均年齢 42 歳）と、高齢者層 57 名（平均年齢 84 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/H3N2 のみが接種後に 70%の抗体価 40 倍以上の保有率を認めたものの、それ以外の抗原では保有率は低く、防御に不安を残す結果となっていた。高齢者層でも A(H3N2) のおける抗体価 40 倍以上の保有率が一番高かったが、保有率はすべての抗原で 60%を下回っており、国際基準（成人層：70%以上、高齢者層：60%以上）を満たしていなかった。特に両年齢群とも今シーズンからワクチン株が変更された A/H1N1pdm09 の抗体保有率、GMT 値、GMT 上昇率（Fold Increase）が著しく低下しており、反応性が低下していたことから、免疫原性の低いワクチンとなっていたことが考えられる。

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かった。副反応症状申告数は昨シーズンに比べ若干の減少がみられ、接種者に負担の少ないワクチンであったことがうかがえる。また、そのほか重篤な全身反応も認められなかった。

全体的にみると今シーズンのワクチンは A 型、B 型ともに反応性が低下しており、免疫原性が低かったことから、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/H1N1pdm09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。2017-2018年シーズンのインフルエンザワクチンは、2016-2017シーズンからA/H1N1pdmのワクチン株のみが変更され、*A/シンガポール/GP1908/2015(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、2017-2018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、2017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2017-2018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℃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/H1N1pdm09抗原(A/シンガポール/GP1908/2015)、A/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94件、高齢者層のペア血清は57件採取された。成人層の平均年齢は41.7±10.1歳、高齢者層の平均年齢は83.5±11.3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/シンガポール/GP1908/2015:8.5%(接種前:1.1%)、A/香港/4801/2014:70.2%(接種前:50.0%)、B/プーケット/3073/2013(山形系統):46.8%(接種前:37.2%)、B/テキサス/3/2013(ビクトリア系統):50.0%(接種前:34.0%)であり、A型ではA/H3N2のみがEMEAが定める基準の70%を超していたが、B型は両系統とも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/シンガポール/GP1908/2015:3.5%(接種前:1.8%)、A/香港/4801/2014:52.6%(接種前:36.8%)、B/プーケット/3073/2013(山形系統):14.0%

(接種前：8.8%)、B/テキサス/3/2013(ビクトリア系統)：28.1%(接種前：19.3%)であり、ワクチン株として用いられている全ての抗原に対して国際基準の60%を下回る結果となった(表1、図1A)。

成人層のワクチン接種後のHI抗体価の幾何平均(GMT)は、A/シンガポール/GP1908/2015：9.3(接種前：6.3、前後比＝1.5倍)、A/香港/4801/2014：38.6(接種前：25.7、前後比＝1.5倍)、B/プーケット/3073/2013(山形系統)：25.7(接種前19.6、前後比＝1.3倍)、B/テキサス/3/2013(ビクトリア系統)：26.3(接種前：20.3、前後比＝1.3倍)であり、GMTの前後比(Fold Increase)でみた場合、ワクチンに用いられている全ての抗原で国際基準の ≥ 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/シンガポール/GP1908/2015：8.0(接種前：6.5、前後比＝1.2倍)、A/香港/4801/2014：27.4(接種前：18.6、前後比＝1.5倍)、B/プーケット/3073/2013(山形系統)：13.2(接種前：9.1、前後比＝1.5倍)、B/テキサス/3/2013(ビクトリア系統)：16.5(接種前：12.1、前後比＝1.4倍)であり、こちらもGMTの前後比(Fold Increase)は全ての抗原で国際基準の ≥ 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/シンガポール/GP1908/2015：6.4%、A/香港/4801/2014：6.4%、B/プーケット/3073/2013(山形系統)：3.2%、B/テキサス/3/2013(ビクトリア系統)：4.3%であった(表1)。高齢者群ではA/シンガポール/GP1908/2015：1.8%、A/香港/4801/2014：7.0%、B/プーケット

/3073/2013(山形系統)：3.5%、B/テキサス/3/2013(ビクトリア系統)：5.3%という結果を示した。製造会社別で比較すると成人層、高齢者層ともに両社間に差は見られなかった。(表1)。

ワクチン接種後の副反応について、成人94名と高齢者57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：36.2%、高齢者層：63.2%)で、次いで多いのが局所の腫れ(成人層：30.9%、高齢者層：47.4%)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、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減少した。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/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、A/H1N1pdm09抗原に対しては基準を下回っており、防御に不安を残す結果となった。接種前後での4倍以上の抗体価の上昇を認めた割合ではA/H1N1pdm09、A/H3N2ともに国際基準の40%を下回っていた。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、A/H3N2に関してはワクチン株に変更がなかったため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が、今シーズンから変更されたA/H1N1pdm09に関して上昇がみられなかった原因は不明である。一方でB/山形系統ならびにB/ビクトリア系統ともに昨シーズン同様、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。

高齢者層は、A/H1N1pdm09、A/H3N2、B/

山形系統、B/ビクトリア系統のすべての抗原に対して、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%を下回っており、防御に不安を残す結果となった。保有率は A/H3N2 が一番高く、次いで B/ビクトリア系統、B/山形系統、A/H1N1pdm09 の順であり、この傾向は成人層の傾向と同様であるものの、その割合は成人層より低く、これまで同様高齢者における抗体獲得能は低いことが考えられる。

副反応については成人層、高齢者層ともに局所の発赤・腫れを申告したものの割合が多かった。副反応の傾向は昨シーズンと同様の傾向であったが、申告をした割合は減少しており、接種者に負担の少ないワクチンであったことが伺える。また昨シーズン同様、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

2017-2018 年シーズンのワクチンは接種後の抗体価上昇が低く、免疫原性の低いワクチンであったと考えられる(定められている評価基準を満たしていたのは成人層の A/H3N2 における抗体保有率のみ)。特に成人層、高齢者層ともに今シーズンから変更された A/H1N1pdm09 ワクチン株に対する抗体価は著しく低く、防御にかなりの不安が残る結果となった。2015-2016 シーズンに 4 価のワクチンを導入した際にも B 型の抗体価上昇は著しく低かったが、次シーズン以降もワクチン株を接種することで徐々に好転がみられたので、A/H1N1pdm09 も流行株の抗原性が変わらず、同じワクチン株を次シーズン以降も接種することで、徐々に好転することが期待できると考えられる。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

なし

2. 学会発表

- Takashi Odagiri, Akinobu Hibino, Ren Yagami, Hiroki Kondo, Yugo Shobugawa, Reiko Saito, Immune response of quadrivalent inactivated influenza vaccine in 2015/2016 and 2016/2017 season. 第65回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017年10月
- Reiko Saito, Akinobu Hibino, Hiroki Kondo, Takeshi Odagiri, Momoko Mawatari, Ikumi Tanabe, Shinji Kimura, Isamu Sato, Yoshinari Tanabe, Takashi Kawashima, Shigeyoshi Hibi, Naoki Kodo, Hironori Masaki, Norichika Asoh, Yoshiko Tsuchihashi, Yutaka Shirahige, Yasuhiko Ono, Hirotsume Hamabata, Nobuhiro Takemae, Takehiro Saito, Viral characteristics of influenza A/H1N1pdm09 with H275Y mutation and clinical effectiveness of neuraminidase inhibitors. 第65回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017年10月

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

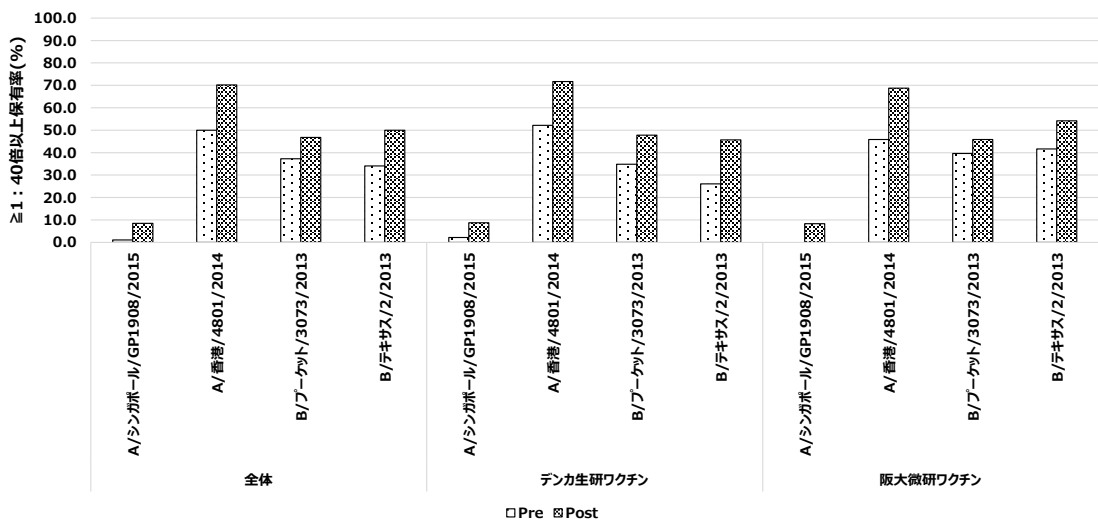
H. 健康危険情報

該当なし

表 1 2017-2018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	接種前後 4倍以上上昇 (%)	GMT		Fold Increase	抗体価 40倍以上保有(%)			
		Pre	Post		Pre	Post		
成人層 (≤60歳)	全体 (n = 94)	A/シンガポール/GP1908/2015	6.3	9.3	1.5	6.4	1.1	8.5
		A/香港/4801/2014	25.7	38.6	1.5	6.4	50.0	70.2
		B/ブーケット/3073/2013	19.6	25.7	1.3	3.2	37.2	46.8
		B/テキサス/2/2013	20.3	26.3	1.3	4.3	34.0	50.0
	デンカ生研ワクチン (n = 46)	A/シンガポール/GP1908/2015	6.7	10.2	1.5	6.5	2.2	8.7
		A/香港/4801/2014	25.5	38.2	1.5	6.5	52.2	71.7
		B/ブーケット/3073/2013	16.9	23.3	1.4	4.3	34.8	47.8
		B/テキサス/2/2013	17.7	22.9	1.3	8.7	26.1	45.7
	阪大微研ワクチン (n = 48)	A/シンガポール/GP1908/2015	5.9	8.5	1.4	6.3	0.0	8.3
		A/香港/4801/2014	25.9	38.9	1.5	6.3	45.8	68.8
		B/ブーケット/3073/2013	22.4	28.3	1.3	2.1	39.6	45.8
		B/テキサス/2/2013	23.1	30.0	1.3	4.2	41.7	54.2
高齢者層 (>60歳)	全体 (n = 57)	A/シンガポール/GP1908/2015	6.5	8.0	1.2	1.8	1.8	3.5
		A/香港/4801/2014	18.6	27.4	1.5	7.0	36.8	52.6
		B/ブーケット/3073/2013	9.1	13.2	1.5	3.5	8.8	14.0
		B/テキサス/2/2013	12.1	16.5	1.4	5.3	19.3	28.1
	デンカ生研ワクチン (n = 32)	A/シンガポール/GP1908/2015	6.8	8.2	1.2	3.1	3.1	6.3
		A/香港/4801/2014	17.6	28.3	1.6	9.4	31.3	50.0
		B/ブーケット/3073/2013	8.8	13.0	1.5	6.3	6.3	12.5
		B/テキサス/2/2013	12.2	17.6	1.4	6.3	25.0	31.3
	阪大微研ワクチン (n = 25)	A/シンガポール/GP1908/2015	6.1	7.8	1.3	0.0	0.0	0.0
		A/香港/4801/2014	20.0	26.4	1.3	4.0	44.0	56.0
		B/ブーケット/3073/2013	9.5	13.6	1.4	0.0	12.0	16.0
		B/テキサス/2/2013	12.1	15.2	1.2	4.0	12.0	24.0

A. 成人層 (≤60歳)



B. 高齢者層(>60歳)

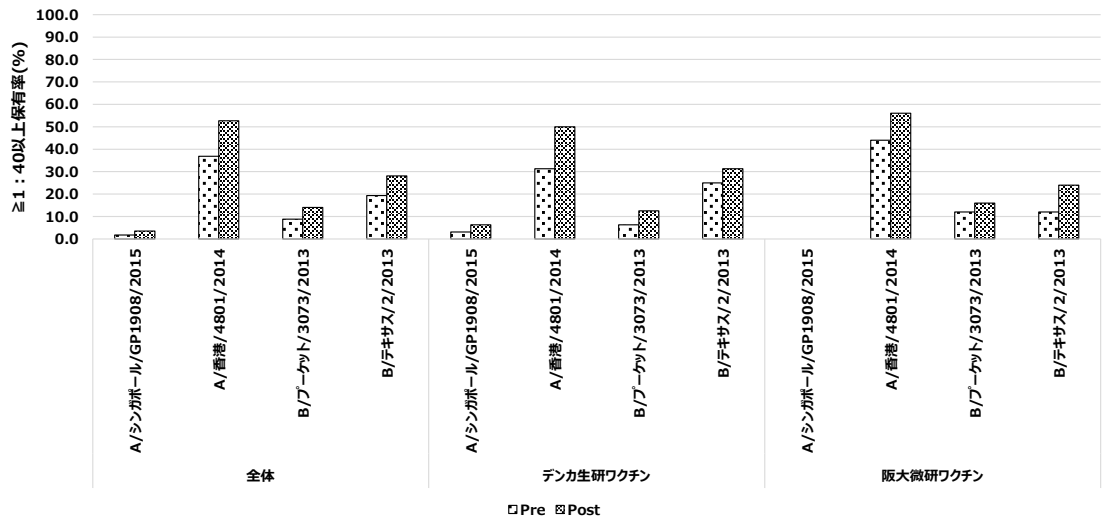
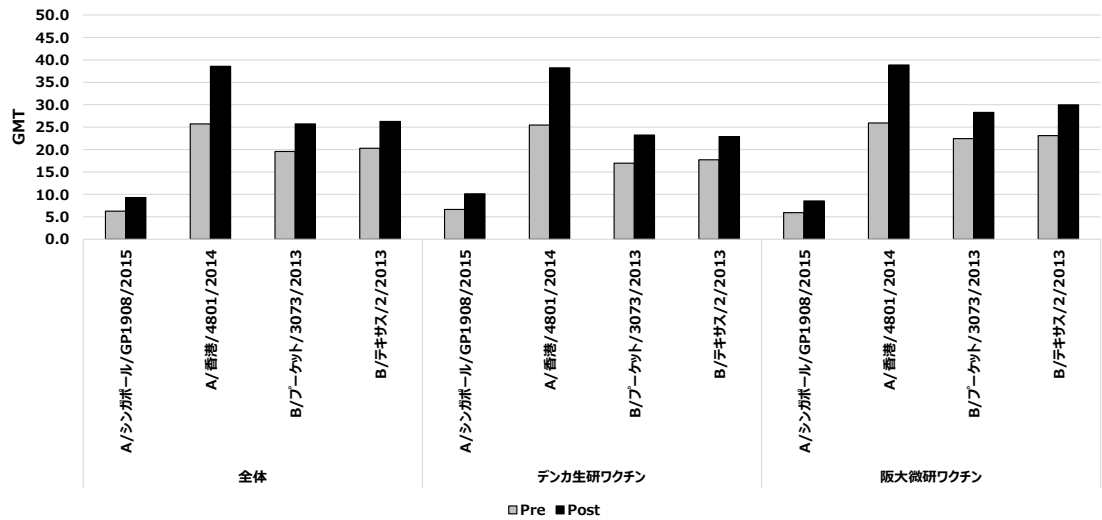


図1 ワクチン接種後の抗体保有率の推移(A.成人層、B.高齢者層)

A. 成人層(≤60歳)



B. 高齢者層(>60歳)

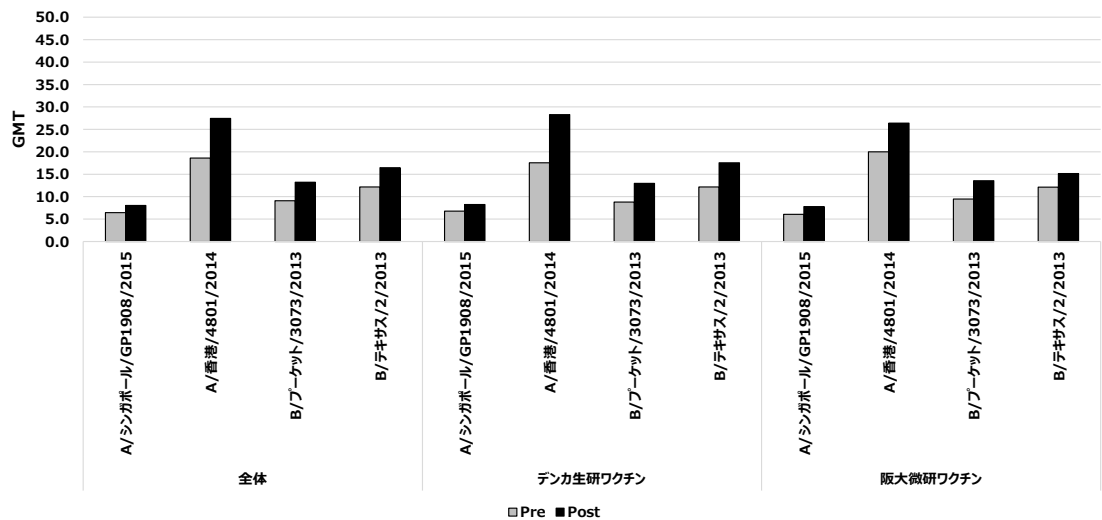


図2 ワクチン接種後の GMT の推移(A.成人層、B.高齢者層)

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	発疹		発赤		腫れ		痛み	
	2016/2017	2017/2018	2016/2017	2017/2018	2016/2017	2017/2018	2016/2017	2017/2018
シーズン								
All	6	2	101	70	65	56	41	26
(%)	(4.1)	(1.3)	(68.2)	(46.4)	(43.9)	(37.1)	(27.7)	(17.2)
成人層 (≤60歳)	5	0	58	34	52	29	41	25
(%)	(5.1)	(0.0)	(58.6)	(36.2)	(52.5)	(30.9)	(41.4)	(26.6)
高齢者層 (>60)	1	2	43	36	13	27	0	1
(%)	(2.0)	(3.5)	(87.8)	(63.2)	(26.5)	(47.4)	(0.0)	(1.8)

2016/2017シーズン：成人層(n = 99), 高齢者層(n = 49)
 2017/2018シーズン：成人層(n = 94), 高齢者層(n = 57)

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及び次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析に関する研究

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、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、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析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 9 月 27 日現在、16 カ国で、860 例の感染者数が確認され、そのうち 454 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、2018 年 3 月 2 日現在、1567 例の感染者数が確認され、そのうち 615 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、ヒトへの感染リスク評価のため、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析を実施した。

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。また、このような適応変異の起因となり得る既知の遺伝子マーカーを検出することにより、迅速

トの季節性インフルエンザウイルスの HA 蛋白はシ

B. 研究方法

1) ウイルス:A/Guangdong/17SF003/2016 (H7N9)、A/Taiwan/1/2017 (H7N9)を使用した。これらのウイルスを発育鶏卵を用いて増殖させ、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 を Multi-segment RT-PCR により増幅後、NEBNext Ultra DNA 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。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

Multi-segment RT-PCR による増幅後、ウイルス株 A/Guangdong/17SF003/2016 (H7N9) 及び A/Taiwan/1/2017 (H7N9) の全ゲノム解析を行った結果、迅速かつ正確にウイルス株の全ゲノムを解析することが出来た。

D. 考察

次世代シーケンサーによるウイルスの全ゲノム解析を行うためには、ある程度の量のウイルス RNA 量が必要となる。一般的に、継代を行った分離株を用いた解析は可能だが微量サンプルの場合、困難となる場合がある。従って、今回、Multi-segment RT-PCR による増幅法を用いた実験方法の改良によって微量サンプルでも解析が可能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実験のひとつとして、次世代シーケンサーを用いたウイルス全ゲノム

解析が可能となった。今後は、次世代シーケンサーを主に使用した動物由来インフルエンザウイルスの全遺伝子解析に応用可能であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Nakamura K, Shirakura M, Fujisaki S, Kishida N, Burke DF, Smith DJ, Kuwahara T, Takashita E, Takayama I, Nakauchi M, Chadha M, Potdar V, Bhushan A, Upadhyay BP, Shakya G, Odagiri T, Kageyama T, Watanabe S. Characterization of influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated from Nepalese and Indian outbreak patients in early 2015. *Influenza Other Respir Viruses*. 11(5) 399-403 2017
- 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
- Imai M, Watanabe T, Kiso M, Nakajima N, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Hatta M, Yamada S, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Shirakura M, Takashita E, Fujisaki S, McBride R, Thompson AJ, Takahashi K, Maemura T, Mitake H, Chiba S, Zhong G, Fan S, Oishi K, Yasuhara A, Takada K, Nakao T, Fukuyama S, Yamashita M, Lopes TJS, Neumann G, Odagiri T, Watanabe S, Shu Y, Paulson JC, Hasegawa H, Kawaoka Y. A Highly Pathogenic Avian H7N9 Influenza Virus Isolated from a Human Is Lethal in Some Ferrets Infected via Respiratory Droplets. *Cell Host Microbe*. 22(5) 615-26 2017
- Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Watanabe S, Odagiri T. Isolation of egg-adapted

influenza A(H3N2) virus without amino acid substitutions in the antigenic sites of its hemagglutinin. Jpn J Infect Dis. (In press)

H. 健康危険情報

該当なし

2. 学会発表

- Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Yokoyama M, Sato H, Watanabe S, Odagiri T. Growth capabilities of influenza A(H1N1)pdm09 viruses exhibiting enhanced cross-resistance to oseltamivir and peramivir. 6th ESWI Influenza Conference (Riga, Latvia) 2017.9.
- Watanabe S, Nakamura K, Kishida N, Fujisaki S, Shirakura M, Takashita E, Kuwahara T, Sato A, Ogawa R, Sugawara H, Akimoto M, Miura H, Watanabe K, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Odagiri T, The Influenza Surveillance Group of Japan. Characterizations of circulating influenza viruses in the 2016/2017 season and vaccine viruses for the 2017/18 season. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017 年 10 月
- Kuwahara T, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Takashita E, Takahashi H, Kishida N, Sato A, Ogawa R, Miura H, Akimoto M, Sugawara H, Suzuki N, Watanabe S, Odagiri T. Characterizations of cell-derived and egg-passaged A/Saitama/103/2014 virus. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017 年 10 月
- Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kuwahara T, Kishida N, Watanabe S, Odagiri T. Antiviral susceptibility of avian influenza A(H7N9) viruses isolated from humans. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017 年 10 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

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
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
Wada Y, Nithichanon A, Nobusawa E, Moise L, Martin WD, Yamamoto N, Terahara K, Hagiwara H, Odagiri T, Tashiro M, Lertmemongkolchai G, Takeyama H, Groot AS, Ato M, Takahashi Y	A humanized mouse model identifies key amino acids for low immunogenicity of H7N9 vaccines.	Sci Rep.	7(1)	1283	2017
Nakamura K, Shirakura M, Fujisaki S, Kishida N, Burke DF, Smith DJ, Kuwahara T, Takashita E, Takayama I, Nakauchi M, Chadha M, Potdar V, Bhushan A, Upadhyay BP, Shakya G, Odagiri T, Kageyama T, Watanabe S.	Characterization of influenza A (H1N1)pdm09 viruses isolated from Nepalese and Indian outbreak patients in early 2015.	Influenza and Other Respiratory Viruses.	11(5)	399-403	2017
Gubareva LV, Besselaar TG, Daniels RS, Fry A, Gregory V, Huang W, Hurt AC, Jorquera PA, Lackenby A, Leang SK, Loo J, Pereyaslov D, Rebelo-de-Andrade H, Siqueira MM, Takashita E, Odagiri T, Wang D, Zhang W, Meijer A.	Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2015-2016.	Antiviral Res.	146	12-20	2017
Imai M, Watanabe T, Kiso M, Nakajima N, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Hatta M, Yamada S, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Shirakura M, Takashita E, Fujisaki S, McBride R, Thompson AJ, Takahashi K, Maemura T, Mitake H, Chiba S, Zhong G, Fan S, Oishi K, Yasuhara A, Takada K, Nakao T, Fukuyama S, Yamashita M, Lopes TJS, Neumann G, Odagiri T, Watanabe S, Shu Y, Paulson JC, Hasegawa H, Kawaoka Y.	A Highly Pathogenic Avian H7N9 Influenza Virus Isolated from a Human Is Lethal in Some Ferrets Infected via Respiratory Droplets.	Cell Host & Microbe.	22(5)	615-26	2017

Yasuhara A, Yamayoshi S, Soni P, Takenaga T, Kawakami C, Takashita E, Sakai-Tagawa Y, Ura ki R, Ito M, Iwatsuki-Hori moto K, Sasaki T, Ikuta K, Yamada S, Kawaoka Y.	Diversity of antigenic mutants of influenza A(H1N1)pdm09 virus escaped from human monoclonal antibodies.	Sci Rep.	7(1)	17735	2017
Terauchi Y, Sano K, Aina A, Saito S, Taga Y, Ogawa-Goto K, Tamura SI, Odagiri T, Tashiro M, Fujieda M, Suzuki T, Hasegawa H.	IgA polymerization contributes to efficient virus neutralization on human upper respiratory mucosa after intranasal inactivated influenza vaccine administration.	Hum Vaccin Immunother.	DOI: 10.1080/21645515.2018.1438791	1-11	2018
Uda K, Shoji K, Koyama-Wakai C, Furuichi M, Iwase N, Fujisaki S, Watanabe S, Miyairi I.	Clinical characteristics of influenza virus-induced lower respiratory infection during the 2015 to 2016 season.	J Infect Chemother.	pii: S1341-321X(18)30007-2.		2018
Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Watanabe S, Odagiri T.	Isolation of egg-adapted influenza A(H3N2) virus without amino acid substitutions in the antigenic sites of its hemagglutinin.	Jpn J Infect Dis.	(In press)		2018