

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27年度－平成29年度 総合研究報告書

研究代表者 小田切孝人  
平成30年(2018)5月

# 目 次

## I. 総合研究報告書

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
インフルエンザウイルスサーベイランスにおける地方衛生研究所および国立感染症研究所との連携強化に関する研究 渡邊真治	P12
インフルエンザ株サーベイランスにおける分離株抗原性解析および新規解析手法の確立と改良 中村一哉	P18
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	P27
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	P31
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 研究協力者：高下 恵美	P37
抗インフルエンザ薬耐性株の発生動向ならびにリスク評価および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	P41
成人層および高齢者層に対する 2015-18 年にかけて使用された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）、 樋熊紀男（女池南風苑・施設長（-H28））、金沢宏（女池南風苑・施設長（H29-））	P48
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	P59
フェレット抗血清作製とウイルスリスク評価に関する研究 浅沼秀樹	P64
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	P71

## 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

世界保健機関(WHO)は世界インフルエンザ監視対応ネットワーク(GISRS)を構築し、季節性インフルエンザおよび動物由来の新型インフルエンザの地球規模での発生動向監視を行っている。感染研インフルエンザウイルス研究センター（感染研インフルセンター）は、GISRSの中核を担うWHOインフルエンザ協力センター(WHO-CC)の一つとして、東アジア諸国のサーベイランス支援および当該地域から収集した流行株の解析情報をWHOへ提供し、WHOが推奨するワクチン株の選定会議へ東アジア地域代表として参画している。わが国の流行状況もWHOの施策に反映させるためには、国内でのインフルエンザサーベイランス体制が盤石であり、かつ精度の高い信頼性のある解析情報を発信できる体制の維持が重要である。GISRS経由で収集した海外情報は国内のインフルエンザワクチン株選定にとって必須であり、本研究はその役割を担っているために、国のインフルエンザワクチン対策にとって重要な位置をしめている。そのため、本研究では、流行株分離用検体および分離株の収集力の向上、分離株の抗原解析法の改良および国際標準化を行った。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、全国規模での実施に備えた。また、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推奨され、国内の2017/18シーズン用のワクチン株として選定された功績は大きい。一方、パンデミック対策として、動物由来のインフルエンザウイルスの鳥型レセプターとヒト型レセプターへの親和性を簡便、短時間で鑑別できる検査系を構築し、パンデミックリスク評価系を完成させた。さらに、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ために、ワクチン接種者の血清抗体を用いた評価研究をおこない、B型ワクチンの免疫原性の改善が必要であることを提言した。

### A. 研究目的

- 国内インフルエンザ株サーベイランス体制の維持と強化を地方衛生研究所（地衛研）と連携して進め、インフルエンザワクチン株の検索と選定を適正
- WHOのワクチン株選定への参画と選定法改良への支援を行う。
- 国内における流行株の回収力の向上および臨床検体の収集体制を地衛研と連

携して行う。

- ・ 近隣諸国および東南アジア諸国からの流行株、臨床検体の収集力を強化し、収集ウイルスの解析情報を発信、ワクチン株選定に有効活用する。
- ・ 感染研において臨床検体から卵分離株を回収し、ワクチン製造に使用できるウイルスを恒常的に供給する。
- ・ A(H3N2)流行株の抗原解析法の改善と適正評価をし、海外の WHO-CC と連携して解析法の国際標準化を進める。
- ・ 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全国規模での EQA 実施を支援する。
- ・ 血清学的な評価からもワクチン株選定を支援する。
- ・ 新型インフルエンザの発生の初動対応の一部として、パンデミックリスク評価を迅速にするために、ウイルスのレセプター親和性の迅速鑑別試験系の構築を行う。

## B. 研究方法

### 1)地衛研との連携

6つの地方ブロックのうち、4つのブロック(北海道・東北・新潟地区、関東・甲・信・静地区、東海・北陸地区、九州地区)で開催された会議へ赴き、サーベイランス担当者と協議した。

2)流行ウイルスの抗原性解析法の改善と中和試験法の導入を実施した。

### 3)遺伝子系統樹解析

3シーズンで収集した国内外の流行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。

### 4)フェレット感染血清の作製

抗原性解析に用いるフェレット感染血清を作製した。

### 5)卵分離株の収集

2014/15—2017/18 の3シーズンに地衛研から分与された臨床検体から、卵分離株の回収および増殖性の改善条件設定を試みた。

### 6)ヒト血清抗体の測定によるワクチンの有効性の評価

インフォームドコンセントを得た新潟市内の高齢者施設のスタッフと入所者から3シーズン継続的にワクチン接種前後のペア血清を採取した。HI 試験法にて抗体価測定を行った。

### 7)レセプター特異性鑑別診断系の構築

$\alpha 2,3$  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  $\alpha 2-3$ Gal  $\beta 1-4$ GlcNAc  $\beta 1-pAP- \alpha -PGA$ 、Neu5Ac  $\alpha 2-6$ Gal  $\beta 1-4$ GlcNAc  $\beta 1-pAP- \alpha -PGA$ ) を用いた Solid-phase binding assay を行った。

8)ウイルス分離効率の高い培養細胞の検索をした。

9)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。

### (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および感染研の倫理委員会にて承認された。

## C. 研究結果

1. 国内インフルエンザ株サーベイランス体制の連携強化および近隣諸国との連携

6つのブロックのうち、4つのブロック(北海道・東北・新潟地区、関東・甲・信・静地区、東海・北陸地区、九州地区)で開催された会議へ赴き、サーベイランス担当者と協議した。株サーベイランスにはウイルス分離が必須であ

ること、また、ワクチン候補株には卵分離株が必須であるため、感染研に臨床検体を供与することの理解を得た。

一方、近隣諸国、とくに東南アジアとの交流を深めるためにWHO西太平洋事務局が主催する各国のナショナルインフルエンザセンター(NIC)が招聘されるNIC会議にコアメンバーとして参加し、日本および東アジア地域から収集した流行株情報を含む北半球でのインフルエンザの流行株情報の総括を行った。

## 2. WHO インフルエンザワクチン株選定への貢献

国内およびアジア地域の流行株の解析情報を年2回(2月北半球用、9月南半球用)開催されるWHOのワクチン株選定会議へ提出し、それらの情報が反映されたワクチン株の選定に参画した。2015年および2017年9月のWHOワクチン選定会議では、議長としてワクチン株選定を行った。

## 3. 国内インフルエンザワクチン株選定への支援

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

## 4. 国内外流行株の抗原性解析

国内外から収集したA(H1N1)pdm09、A(H3N2)、B型流行株について、HI試験法にて抗原性解析を行い、ワクチン株との抗原性の

乖離度を評価した。A(H3N2)ワクチンについては、製造過程で起こる卵馴化による抗原変異によって、流行株とは大きく抗原性が乖離していたことを示した。

また、A(H3N2)ウイルスについては、HI試験法の変法としてマイクロ中和法を採用して実施した。成績の信頼性についても検証を行い、導入したマイクロ中和法は適正であり、今後も継続して採用できることを確認した。

## 5. 流行株の遺伝子系統樹解析

主に国内分離株およびアジア周辺諸国から入手した流行株について、遺伝子解析を行い、系統樹作成、特徴的なグループの出現の有無などを評価し、ワクチン株選定の資料として提供した。

## 6. 卵分離株の収集の試み

我が国では卵分離株の収集が少ないため、ワクチン製造株を国内外へ提供する機会が少ない。わが国発の世界標準となるワクチン株を供給するため、臨床検体から卵分離株の回収を実施し、手法の改善にも取り組んだ。その結果、回収のきわめて困難なA(H3N2)亜型から、WHO かも推奨されたワクチン株A/Saitama/105/2015の収集と改良に成功した。これは、2017/18シーズン用の国内ワクチン株に選定されたが、国の決定株とはならなかった。

## 7. ワクチン接種前後のペア血清の抗体価測定によるワクチンの有効性の評価

使用したワクチン株に対するヒト血清中の抗体価を測定し、ワクチンの免疫原性をもとに2社の国産ワクチンの有効性を評価した。

A(H1N1)pdm09、A(H3N2)ワクチンでは国際基準を満たす抗体価上昇が認められたが、B型ワクチンでは2系統(山形系統、ビクトリア系統)いずれに対しても低い抗体価しか検出さ

れなかった。

海外で供給されるワクチンに比べて国産ワクチンの免疫原性の低さが際立つため、特に B 型ワクチンについては、免疫原性の向上に向けた改善の必要性が明確になった。

#### 8. レセプター特異性鑑別診断系の構築

新型インフルエンザが発生した際に、初動対応として、ヒト社会で流行拡大するかパンデミックリスク評価を迅速に行う必要がある。そのために、鳥由来ウイルスの場合は、レセプター特異性を識別する迅速診断系が強力なツールとなる。本研究では、 $\alpha 2,3$  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を用いた **Solid-phase binding assay** 法を確立し、鳥インフルエンザウイルス A(H7N9)について検討した。本亜型ウイルスは両方のレセプターを認識でき、ヒト型レセプターをさらに効率よく認識する変異の追加でパンデミックポテンシャルが上がる可能性を確認した。

#### D. 考察

国内サーベイランス体制については、地衛研との連携と意思疎通の向上を図ることで、円滑にサーベイランスを運用できるようになっている。また、地衛研から臨床検体をよりスムーズに収集できる協力体制ができたことから、ワクチン製造に用いることができる、卵分離株の収集体制が構築され、今後は、日本発の分離株を用いた世界標準ワクチン株の供給も可能となる。さらに、卵分離が極めて困難な A(H3N2)ウイルスの回収効率を上げるために、細胞培養ワクチン製造の種ウイルスを分離する安全性が検証された細胞 (NIID-MDCK) を用いて初期分離、その後卵で継代したワクチン候補株の供給を世界に先駆けて行った。わが国では、このような経歴のウイルスもワクチン製造に採用でき

ることを厚労省審査管理課および医薬品医療機器総合機構から確認されており、今後は細胞分離と卵継代を組み合わせたワクチン製造用種ウイルスの収集法を検討する契機となった。

A(H3N2)ウイルスの抗原性解析に中和試験法を採用せざるを得ない事態になっていることから、マイクロ中和法 (感染研採用)、プラーク減少法およびフォーカ減少法 (アトランタ CC、ロンドン CC 採用) と、各 WHO 協力センター間でも手法が異なり、結果もそれに応じて異なる問題が発生している。これへの対応として、各センターが参加した WG で、手法の統一化を進めている。

日本も 4 価のインフルエンザワクチンを採用した。一番の懸念事項は、2 種類の B 型ワクチンが互いに干渉し合い双方の抗体が十分に誘導されなくなることである。本研究でワクチン接種前後のペア血清の抗体価を測定し、少なくとも検討した 2 社のワクチンでは、B 型には効果が期待できないレベルでしか免疫原性がないことを確認した。海外の 4 価ワクチンではこのようなことは報告されていないことから、今後も本研究班で国内ワクチンの免疫原性について追及していく必要がある。国内ワクチンが恒常的に低い免疫原性である場合は、現行のワクチンの力価や剤形について見直しが必要になる。

#### E. 結論

- ・ 国内地衛研および周辺諸国の NIC と連携して、インフルエンザ株サーベイランスの強化と活性化を図った。
- ・ WHO ワクチン選定および国内ワクチン選定へのタイムリーな情報提供による貢献をした。
- ・ ワクチン製造に採用可能な卵分離株の供給体制と手法の改良を進めた。

- ・ 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巢減数試験法 (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 型ピ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。
- ・ コア・サポート地衛研において試験的な EQA を実施し、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、免疫原性の低いことを明らかにした。今後も調査を継続し、情報発信する。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Tadaki Suzuki, Akira Kawaguchi, Akira Ainaia, Shin-ichi Tamura, Ryo Ito, Pretty Multihartina, Vivi Setiawaty, Krisna Nur Andriana Pangesti, Takato Odagiri, Masato Tashiro, and Hideki Hasegawa Relationship of the quaternary structure of human secretory IgA to neutralization of influenza virus. PNAS (2015 May) [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1503885112](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1503885112)
- 2) Takashita E, Kiso M, Fujisaki S, Yokoyama M, Nakamura K, Shirakura M, Sato H, Odagiri T, Kawaoka Y, Tashiro M, and the Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Characterization of a large outbreak of influenza A(H1N1)pdm09 virus

cross-resistant to oseltamivir and peramivir in the 2103-14 influenza season in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 May;59(5):2607-17. doi: 10.1128/AAC.04836-14. Epub 2015 Feb 17.

- 3) Sakai K, Sekizuka T, Ami Y, Nakajima N, Kitazawa M, Sato Y, Nakajima K, Anraku M, Kubota T, Komase K, Takehara K, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Kuroda M, Takeda M. A Mutant H3N2 Influenza Virus Uses an Alternative Activation Mechanism in TMPRSS2 Knockout Mice by Loss of an Oligosaccharide in the Hemagglutinin Stalk Region. See comment in PubMed Commons below., *J Virol.* 2015 May 1;89(9):5154-8. doi:10.1128/JVI.00124-15. Epub 2015 Feb 11.
- 4) Bedford T, Riley S, Barr IG, Broor S, Chadha M, Cox NJ, Daniels RS, Gunasekaran CP, Hurt AC, Kelso A, Klimov A, Lewis NS, Li X, McCauley JW, Odagiri T, Potdar V, Rambaut A, Shu Y, Skepner E, Smith DJ, Suchard MA, Tashiro M, Wang D, Xu X, Lemey P, Russell CA Global circulation patterns of seasonal influenza viruses vary with antigenic drift *Nature.* 2015 Jul 9;523(7559):217-20.
- 5) Aina A, Hasegawa H, Obuchi M, Odagiri T, Ujike M, Shirakura M, Nobusawa E, Tashiro M, Asanuma H Host Adaptation and the Alteration of Viral Properties of the First Influenza A/H1N1pdm09 Virus Isolated in Japan. *PLoS One.* 2015 Jun 16;10(6):e0130208. doi: 10.1371/journal.pone.0130208.
- 6) Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Ohmiya S, Sato K, Ito H, Chiba F, Nishimura H,

- Shindo S, Watanabe S, Odagiri T; Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Characterization of an A(H1N1)pdm09 virus imported from India, March 2015. *Jpn J Infect Dis.* 2016 Jan 21;69(1):83-6. doi: 10.7883/yoken.JJID.2015.460
- 7) Fudo S, Yamamoto N, Nukaga M, Odagiri T, Tashiro M, Neya S, Hoshino T Structural and computational study on inhibitory compounds for endonuclease activity of influenza virus polymerase. *Bioorg Med Chem.* 23(17):5466-75. 2015
- 8) Takayama I, Hieu NT, Shirakura M, Nakauchi M, Fujisaki S, Takahashi H, Nagata S, Long NT, Odagiri T, Tashiro M, Kageyama T. Novel Reassortant Avian Influenza A(H5N1) Virus in Human, Southern Vietnam, 2014. *Emerg Infect Dis.* 2016 Mar;22(3). doi: 10.3201/eid2203.151360
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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
- 16) 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
- 17) 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
- 18) 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
- 19) 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
- 20) 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.
- 21) 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
- 22) 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.
- 23) Terauchi Y, Sano K, Ainai 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

- 1) Shinji Watanabe, Kazuya Nakamura, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Emi Takashita, Noriko Kishida, Tomoko Kuwahara, Aya Sato, Ogawa Rie, Hiromi Sugawara, Miki Akimoto, Hideka Miura, Takato Odagiri, The Influenza Surveillance Group of Japan Characterizations of circulating influenza viruses in the 2014/2015 season and vaccine viruses selected for the 2015/16 season 第 63 回日本ウイルス学会 2015 年 11 月 福岡
- 2) E Takashita, S Fujisaki, N Gabriele, Y Furuta, Y Kawaoka, M Tashiro, T Odagiri. Antiviral susceptibility of influenza viruses isolated from patients pre- and post-administration of favipiravir. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、福岡、2015
- 3) C Kawakami, E Takashita, S Fujisaki, M Saikusa, S Usuku, T Odagiri, K Mitamura. Genetic analysis of influenza B viruses isolated during the five seasons in Yokohama. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、福岡、2015
- 4) 高下恵美、小川理恵、藤崎誠一郎、中村一哉、白倉雅之、岸田典子、桑原朋子、菅原裕美、佐藤彩、三浦秀佳、秋元未来、渡邊真治、小田切孝人 2014/15 シーズンにおける日本国内の抗インフルエンザ薬耐性ウイルス検出状況 第 47 回日本小児感染症学会、福島、2015
- 5) C Kawakami, K Shimizu, S Usuku, K Mitamura, E Takashita, S Fujisaki, T Odagiri. Gene Analysis of Influenza B Viruses in Yokohama during the Past 5 Seasons. The 4th isirv Antiviral Group Conference, Texas, USA, 2015
- 6) E Takashita, M Kiso, S Fujisaki, M Yokoyama, K Nakamura, M Shirakura, H Sato, T Odagiri, Y Kawaoka and M Tashiro. Characterization of a Large Cluster of Influenza A(H1N1)pdm09 Virus Cross-Resistant to Oseltamivir and Peramivir during the 2013/2014 Influenza Season in Japan. The 4th isirv Antiviral Group Conference, Texas, USA, 2015
- 7) 高下恵美、小川理恵、藤崎誠一郎、中村一哉、白倉雅之、岸田典子、桑原朋子、菅原裕美、佐藤彩、三浦秀佳、秋元未来、渡邊真治、小田切孝人. 2014/15 シーズンにおける日本国内の抗インフルエンザ薬耐性ウイルス検出状況. 第 47 回日本小児感染症学会. 2015 年 10 月. 福島.
- 8) Yasushi Suzuki, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Eri Nobusawa Development of a high-growth PR8 master virus for influenza vaccine production in cell culture systems. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、福岡、2015
- 9) Akira Ainai, Shinji Saito, Tadaki Suzuki, Norihiro Harada, Shin-ichi Tamura, Yoshikazu Yuki, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Haruko Takeyama, Hideo Tsukada, Hiroshi Kiyono, Hideki Hasegawa Impact of a nasal mucoadhesive excipient on enhancement of immune responses induced by intranasal vaccination against influenza. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、福岡、2015

- 10) 相内章、鈴木忠樹、池田千将、寺内芳彦、齊藤慎二、田村慎一、小田切孝人、田代真人、長谷川秀樹 経鼻インフルエンザワクチン接種直前の鼻腔洗浄が誘導される抗体応答に与える影響 第 19 回日本ワクチン学会、犬山、2015
- 11) 島崎典子、原田勇一、落合雅樹、板村繁之、小田切孝人 4 価インフルエンザ HA ワクチン B 型 2 系統 HA 抗原量を適正に測定するための一元放射免疫拡散試験法の評価及び実施手順の確立 第 19 回日本ワクチン学会、犬山、2015
- 12) 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.
- 13) 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
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) 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
- 18) 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.

- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) 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.
- 25) 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
- 26) 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
- 27) Odagiri T Avian influenza viruses and pandemic preparedness in Japan. The 11<sup>th</sup> Korea-Japan-China Forum for Communicable Diseases Control and Prevention. Seoul, 2017. November.
- 28) 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

## インフルエンザウイルスサーベイランスにおける地方衛生研究所および国立感染症研究所との連携強化に関する研究

研究分担者 渡邊 真治

国立感染症研究所・インフルエンザウイルス研究センター・室長

### 研究要旨

日本におけるインフルエンザウイルスサーベイランスは地方衛生研究所（地衛研）と国立感染症研究所（感染研）と連携により成り立っている。したがって、この協力・連携体制を維持し、さらに強化することが、今後も有効なサーベイランスを実施する上で重要である。平成 27 年度は、国内におけるサーベイランスの重要性の再認識と強化を目的に、地方衛生研究所のサーベイランス担当者と協議し、サーベイランスに関する情報交換・技術支援を行い、時宜にかなった検体およびウイルス分離株の収集を図った。平成 28・29 年度は、地衛研へのウイルス分離・同定に関する技術面での支援を目的に、ウイルスの分離・増殖効率を改善する細胞株の探索を進めた。

### A. 研究目的

新型インフルエンザウイルスの出現や季節性インフルエンザウイルス変異株の出現を監視するために、ウイルスサーベイランスは必須である。さらに、それらウイルスに対するワクチン作製のためのウイルス株確保のためにもウイルスサーベイランスは重要である。そのため地衛研と感染研の協力・連携体制を維持し、国内におけるインフルエンザウイルスサーベイランスの重要性の再認識とさらなる強化を目的とした。

### B. 研究方法

現在、国内の地方衛生研究所は都道府県単位で 6 つのブロック（北海道・東北・新潟地区、関東・甲・信・静地区、東海・北陸地区、近畿地区、中国・四国地区、九州地区）に分けられており、ブロック単位で研究所間の連携を図るため、各種会議が開催されている。6 つのブロックのうち、4 つのブロック（北海道・東北・新潟地区、関東・甲・信・静地区、東海・北陸地区、九州地区）で開催された会議へ赴き、サーベイランス担当者と

協議した。

また、サーベイランスの一環であるウイルス分離・培養技術支援のために、ウイルス分離・増殖効率の改善を見込める細胞株を探索・樹立を目標に、各種細胞株を用いた検討試験を進めた。

（倫理面への配慮）

該当なし

### C. 研究結果

地衛研と感染研が協力して行っているサーベイランスの成績が WHO を中心とした世界インフルエンザ監視システムに提供され、季節性ワクチン株選定の大切な資料となっていることを説明し、サーベイランスの重要性について再認識していただいた。非流行期におけるサーベイランスの意義については考え方が統一的ではない印象があったため、変異株の出現を捉えるという意味では、非流行期・流行期間問わず年間を通して、かつタイムリーな監視が重要であり、その視点での連携体制をお願いした。

この協議の中で、ウイルス分離やウイルス性状を利用した亜型・系統同定などの技術に関する質問や意見が出た。実際、季節性 H3N2 亜型ウイルスの分離・同定は国際的にも問題となっている。そこで技術支援を目的に、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。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。このことは、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

サーベイランス担当者と実際に意見交換を持つことは、生の現場の声を聴き、かつこちらの思いも伝えることが出来るため、感染研-地方衛生研究所の連携体制にとって大変意義のあるものと実感した。今後も積極的に意見交換・情報共有を行うことが、地衛研-感染研の協力連携体制を維持し、サーベイランスを実施する上で大変重要である。

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が、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。今後は、この細胞で増殖させた時に誘導される変異の蓄積の情報を収集し、その結果、誘導される変異が少なければ、実際のサーベイランスにも活用できる可能性がある。また、この細胞に季節性ウイルスが効率よく感染できるように、レセプターの発現を調節した細胞株を樹立して、サーベイランスに活用できる可能性を模索する。

#### E. 結論

地衛研のインフルエンザ担当者と意見交換・情報共有を行い、地衛研-感染研の協力・連携によるサーベイランスの重要性を再認識した。

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った。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Shoemaker JE, Fukuyama S, Eisfeld AJ, Zhao D, Kawakami E, Sakabe S, Maemura T, Gorai T, Katsura H, Muramoto Y, Watanabe S, Watanabe T, Fuji K, Matsuoka Y, Kitano H, Kawaoka Y, An ultrasensitive mechanism regulates influenza virus-induced inflammation., PLoS Pathog., 11(6)
- Zhao D, Fukuyama S, Yamada S, Lopes TJ, Maemura T, Katsura H, Ozawa M, Watanabe S, Neumann G, Kawaoka Y., Molecular determinants of virulence and stability of a reporter-expressing H5N1 Influenza A virus., J. Virology., 89(22), 11337-11346, 2015
- Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Ohmiya S, Sato K, Ito H, Chiba F, Nishimura H, Shindo S, Watanabe S, Odagiri T; Influenza

- Virus Surveillance Group of Japan., Characterization of an A (H1N1)pdm09 Virus Imported from India in March 2015. , *Jpn. J. Infect. Dis.*, 69(1), 83-6, 2016
- Katsura H, Fukuyama S, Watanabe S, Ozawa M, Neumann G, Kawaoka Y., Amino acid changes in PB2 and HA affect the growth of a recombinant influenza virus expressing a fluorescent reporter protein., *Sci. Rep.* , 6, 19933, 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
  - 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
  - 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
  - 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
  - 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
  - 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
  - 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
  - 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

- 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

- 渡邊真治. 2014/15シーズンのインフルエンザ流行株と平成27年度ワクチン株について. 5<sup>th</sup> Negative Strand Virus-Japan Symposium, 沖縄、2016
- Watanabe S, Nakamura K, Fujisaki S, Shirakura M, Takashita M, Kishida N, Kuwahara T, Sato A, Ogawa R, Sugawara H, Akimoto M, Miura H, Odagiri T, The Influenza Surveillance Group of Japan. Characterizations of circulating influenza viruses in the 2014/2015 season and vaccine viruses selected for the 2015/16 season. 第63回日本ウイルス学会学術集会、博多、2015
- Ando T, Yamayoshi S, Watanabe S, Watanabe T, Kawaoka T. A novel host factor plays a key role in the nuclear export of influenza viral ribonucleoprotein complex

s. 第63回日本ウイルス学会学術集会、博多、2015

- Zhao D, Fukuyama S, Yamada S, Tiago L, Maemura T, Katsura H, Ozawa M, Watanabe S, Neumann G, Kawaoka Y. In vitro and in vivo characterization of an H5N1 influenza A virus expressing a reporter gene. 第63回日本ウイルス学会学術集会、博多、2015
- 渡邊真治. 日本でのヒトに対する動物インフルエンザ対応. 第29回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム、東京、2015
- 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)pdm

- 09 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, Aina 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, Shaky 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, Aina 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
  - 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
  - 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
  - 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

**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

## インフルエンザ株サーベイランスにおける分離株抗原性解析 および新規解析手法の確立と改良

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、中和試験法による A/H3N2 亜型株抗原性解析を確立した。さらにこの中和試験法を改良し、試験精度や結果の再現性により優れたウイルス感染細胞巢減数試験法（Focus reduction assay, FRA）を確立、実際のサーベイランス業務へ導入することで A/H3N2 亜型分離株抗原性解析業務のさらなる推進に寄与した。

### 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。本研究では国内外のインフルエンザウイルス野外流行株の抗原性解析業務を時期に即して遅滞なく実施する。また、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 A/H3N2 亜型株が急速に分布を広げてきたことを受け、これに対応すべく H3N2 亜型分離株の抗原性解析代替手法の模索検討し、中和試験法

による抗原性解析法、さらには試験精度、結果再現性の向上が見込める改良変法であるウイルス感染細胞巢減数試験法（Focus reduction assay, FRA）を確立し、実際のウイルス株サーベイランス分離株抗原性解析業務に実用導入することで、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していくことを目的とする。

### B. 研究方法

#### 1) 細胞株

インフルエンザウイルス分離増殖に広く用いられる MDCK 細胞は 10%FCS と抗生物質を添加した D-MEM 培地を用いた静置培養にて、継代維持を行った。

インフルエンザウイルスの受容体を人為的に強発現させた細胞株である MDCK-SIAT1 細胞（SIAT1）はロンドン WHO 協力センター

から提供を受けた。SIAT1 の維持は、5%FCS と抗生物質を添加した D-MEM 培地を用いた静置培養にて、標準手順書に記載の手法に従って行った。

## 2) 供試ウイルス株

2014/15、2015/2016、2016/2017 および 2017/18 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 MDCK 細胞あるいは 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

MDCK 細胞または SIAT1 細胞を 25cm<sup>2</sup> 細胞培養用フラスコに播種し、単層形成後に分与ウイルス株を D-MEM 培地で 10-1000 倍に適宜希釈したものを 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%CO<sub>2</sub> の恒温条件下で 72 時間静置培養した。接種 72 時間後に培養液を回収遠心し、得られたウイルス液を供試材料とした。

## 4) 赤血球凝集 (HA) 試験

常法 HA 試験については、検体ウイルスの 2 倍階段希釈列を PBS で作製し、これにウイルス液と等量の 0.5%ニワトリあるいは 0.5%七面鳥赤血球液を加え、45 分間反応後、赤血球の完全凝集像を示すものを HA 陽性と判定した。

## 5) 赤血球凝集阻止 (HI) 試験

参照血清は時期代表的なウイルス株をフェレットに感染させ、2 週間後に採取した血液から分離回収した。常法 HI 試験では、参照血清の 2 倍階段希釈列を PBS で作製し、これに 4 HA 価含有に調製したウイルス液を等量混合後 60 分間反応させた。この血清/ウイルス混合液に 0.5%ニワトリあるいは 0.5%七面鳥赤血球液を加え、45 分間反応後、赤血球凝集の完全阻止像を示すものを HI 陽性と判定し

た。

## 6) 中和試験法

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、100TCID<sub>50</sub>/50μl に調製したウイルス液と混合、1 時間反応後、細胞懸濁液を添加し、18-20 時間、34°C の CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。培養後の細胞プレートをアセトン固定後、抗インフルエンザウイルス NP 抗体とペロキシダーゼ標識 2 次抗体を用いた酵素免疫抗体 (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。

## 7) ウイルス感染細胞単減数試験法

(Focus reduction assay, FRA)

参照血清の 2 倍階段希釈列を作製し、前日に SIAT1 細胞を 2.5x10<sup>4</sup>/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 CO<sub>2</sub> 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

1) 2015/16 シーズン A/H1N1pdm09 亜型およびB型ウイルス野外流行株のHI 試験による抗原性解析

2015/16 シーズンの A/H1N1pdm 亜型野外分離株はワクチン製造株である高増殖性 A/California/7/2009 (X-179A) のフェレット感染血清との反応性をみると、2014/15 シーズン 3 - 8 月期に比べて、抗血清のホモ HI 価 (抗血清と当該抗血清作製に用いたウイルスとの反応価) から 4 倍の低下を示す分離株の割合が増加していた (図 1) が、4 倍の低下は抗原性類似の範疇に入るため、分離株のほぼ全てが A/California/7/2009 に抗原性が類似した株であると判定された。

B 山形系統の野外分離株はほぼ全てが 2015/16 シーズンのワクチン株 B/Phuket/3073/2013 の細胞分離株および鶏卵分離株のいずれにも抗原性が類似していた (図 2)。

B ビクトリア系統の野外分離株は B/Texas/02/2013 鶏卵分離株のフェレット感染血清との反応性低下を示す割合が増加していた (図 3) が、4 倍の低下は抗原性類似の範疇に入るため、2015/16 シーズンのワクチン株 B/Texas/02/2013 に抗原性が類似した株であると判定された。

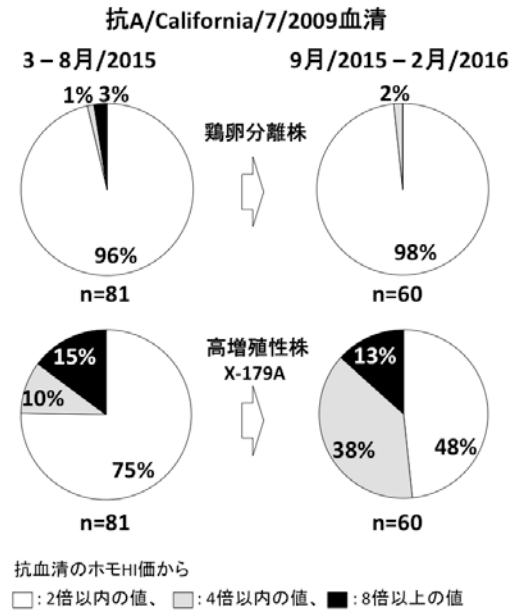


図 1 各種フェレット感染血清と A(H1N1)pdm09 分離株との反応性

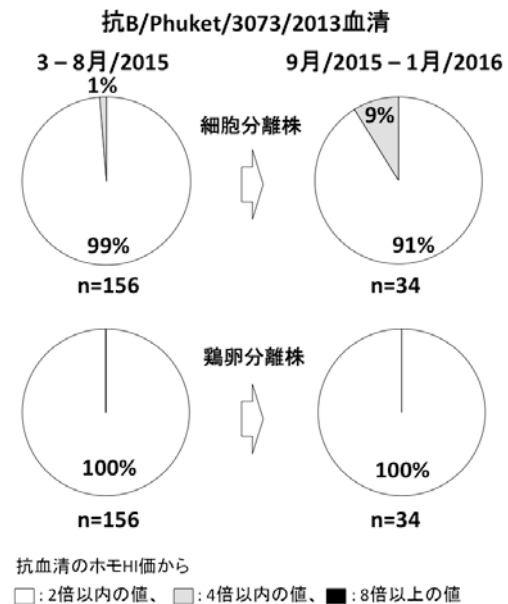


図 2 各種フェレット感染血清と B 山形系統分離株との反応性

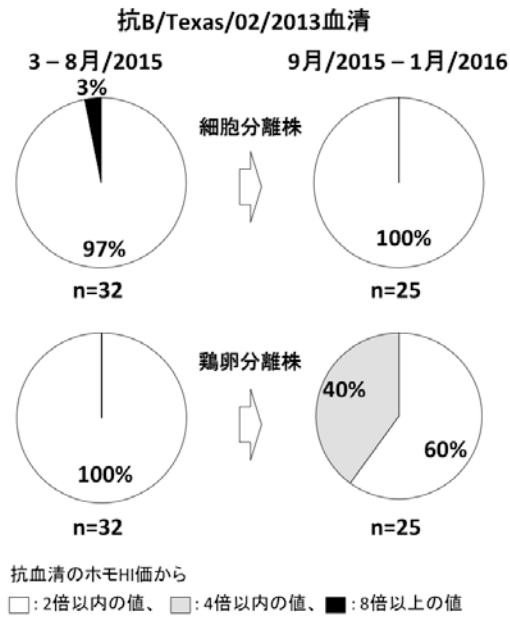


図3 各種フェレット感染血清と B ビクトリア系統分離株との反応性

2) 2016/17 シーズン A/H3N2 亜型ウイルス 野外流行株の中和試験法による抗原性解析

2015/16 および 2016/17 シーズンの A/H3N2 亜型野外分離株の抗原性解析は中和試験法を用いて行った。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ホモ中和抗体価と比べて同等（4 倍差以内）の交代価を示していた。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製造株と抗原性が異なっている傾向が認められた（図 4）。

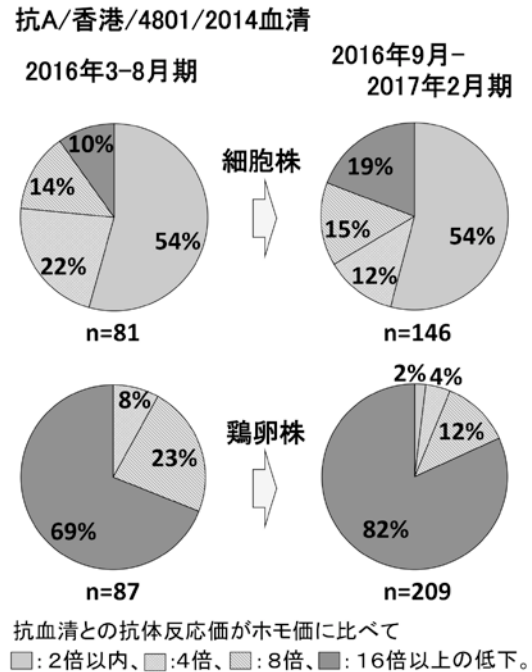


図4 各種フェレット抗血清と A/H3N2 亜型分離株との反応性

3) A/H3N2 亜型分離株抗原性解析における 中和試験改良変法の確立

上述中和試験法による野外分離株の抗原性解析では算定される抗体価の結果の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た。結果として、ウイルス感染細胞巢減数試験法 (Focus reduction assay, FRA) を各種使用試薬や試験条件の検討を経て、実際の野外分離株抗原性解析業務に導入可能な抗原性解析改良変法として確立した（図 5）。

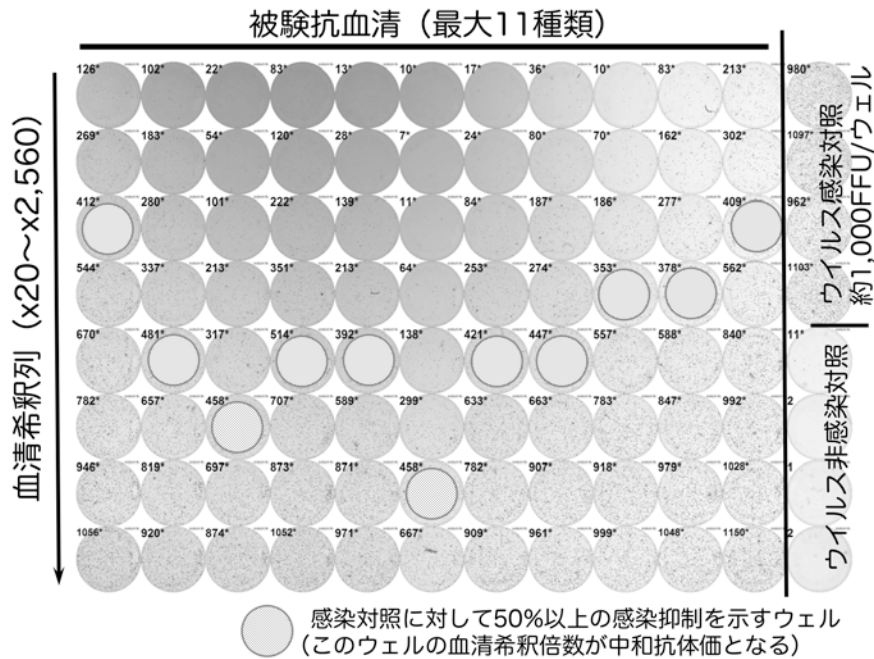


図5 FRA 試験プレートの一例

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	<u>640</u>	640	640	160
A/香港/7127/13 細胞株	160	<u>320</u>	160	160
A/埼玉/103/14 細胞株	320	320	<u>1280</u>	320
A/埼玉/103/14 鶏卵株	<20	40	40	<u>160</u>

4) 2017/18 シーズン A/H3N2 亜型ウイルス  
野外流行株の FRA による抗原性解析

2017年9月以降に分離された野外流行株について、FRA による抗原性解析を行った結果、2017/18 シーズンの国内ワクチン株である 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、5割程度の野外分離株が抗細胞分離株血清とホモ価と同等(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6)。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6)。

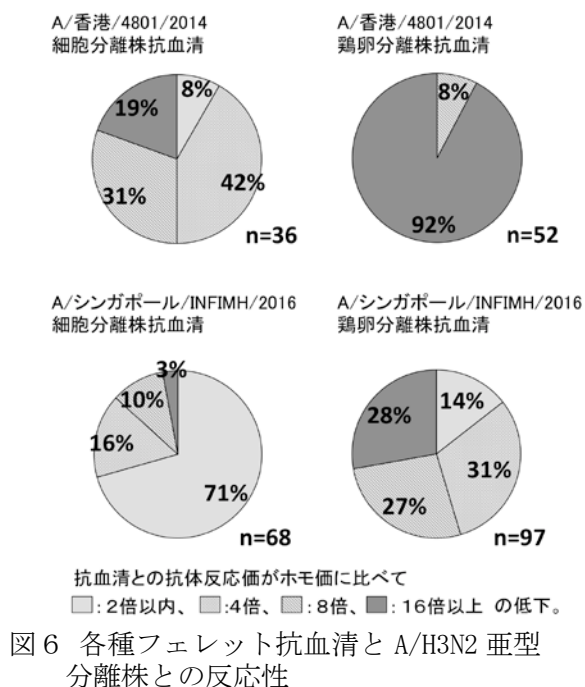


図6 各種フェレット抗血清と A/H3N2 亜型分離株との反応性

これら結果は国内外で毎年度実施された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、次期ワクチン推奨株の決定に大きく寄与した。

#### D. 考察

常に変異を続けその性状を変化させるインフルエンザウイルスは、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。本研究を通じて

確立したウイルス感染細胞巢減数試験法 (Focus reduction assay, FRA) は、分離株抗原性解析に常法として用いられている HI 試験の代替手法として、A/H3N2 亜型分離株の抗原性解析に十分に利用でき、従来の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。これにより当該業務の今後の成果拡大も見込まれる。

#### E. 結論

本研究期間を通じて、毎年流行するインフルエンザの野外流行株の抗原性状を時期に即して遅滞なく解析を行った。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、この代替手法の確立、改良に努め、ウイルス感染細胞巢減数試験法 (Focus reduction assay, FRA) をインフルエンザウイルス株サーベイランス業務に導入し、成果をあげた。これら成果は国内外で毎年度実施されたワクチン株選定会議に提供され、次期ワクチン推奨株の決定に大きく寄与した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Takashita E, Kiso M, Fujisaki S, Yokoyama M, Nakamura K, Shirakura M, Sato H, Odagiri T, Kawaoka Y, Tashiro M, and the Influenza Virus Surveillance Group of Japan. , Characterization of a large cluster ( outbreak ) of influenza A(H1N1)pdm09 virus cross-resistant to oseltamivir and peramivir during(in) the 2013-14 influenza season in Japan., Antimicrob. Agents.

- Chemother., 59(5), 2607-17, 2015
- 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
  - Nakamura K, Shirakura M, Suzuki Y, Naito T, Fujisaki S, Tashiro M, Nobusawa E., Development of a high-yield reassortant influenza vaccine virus derived from the A/Anhui/1/2013 (H7N9) strain., Vaccine, 34(3), 328-33, 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
  - Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Ohmiya S, Sato K, Ito H, Chiba F, Nishimura H, Shindo S, Watanabe S, Odagiri T; Influenza Virus Surveillance Group of Japan., Characterization of an A (H1N1)pdm09 Virus Imported from India in March 2015., Jpn. J. Infect. Dis., 69(1), 83-6, 2016
  - 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
  - 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
- ## 2. 学会発表
- 1) 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 2017 年 10 月
  - 2) 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 2017年

- 10月
- 3) 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 2017年10月
- 4) 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 2017年10月
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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.  
Earlier detection of an ancestral variant of influenza A(H1N1)pdm09 subclade 6B.1 virus from Nepalese and Indian outbreak patients.  
The 6th China-Japan Bilateral Symposium on All Influenza virus (Beijing, China), Mar/2017
- 8) Kazuya Nakamura, Masayuki Shirakura, Seiichiro Fujisaki, Noriko Kishida, Tomoko Kuwahara, Emi Takashita, Ikuyo Takayama, Mina Nakauchi, Mandeep Chadha, Varsha Potdar, Bishnu Prasad Upadhyay, Geeta Shakya, Takato Odagiri, Tsutomu Kageyama, Shinji Watanabe.  
Characterizations of influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated from patients including fatal or severe cases in Nepal and India, early 2015.  
Options for the Control of Influenza IX (Chicago, USA), Aug/2016
- 9) 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 high growth reassortant whole-virus A(H3N2) influenza vaccine in ferret.  
Options for the Control of Influenza IX

(Chicago, USA), Aug/2016

10) 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

11) Noriko Kishida, Masaki Imai, Akira Aina, 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

12) 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

13) Shinji Watanabe, Kazuya Nakamura, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Emi Takashita, Noriko Kishida, 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 2014/2015 season and vaccine viruses selected for the 2015/16 season.

第63回日本ウイルス学会学術集会 2015年11月

14) 高下恵美、小川理恵、藤崎誠一郎、中村一哉、白倉雅之、岸田典子、桑原朋子、菅原裕美、佐藤彩、三浦秀佳、秋元未来、渡邊真治、小田切孝人：2014/15 シーズンにおける日本国内の抗インフルエンザ薬耐性ウイルス検出状況

第47回日本小児感染症学会学術集会 2015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

## 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 山形系統および B ビクトリア系統の 2016/17 及び 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、2015/16 及び 2016/17 シーズンの国内およびアジア諸国から収集した 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、フェレット感染血清をもちいた赤血球凝集阻止試験により実施した。B 型は両系統の分離株とも調べた各シーズンのワクチン株とそれぞれ抗原性は類似していた。A(H1N1)pdm09 については、フェレット感染血清では、ワクチン製造株の製造過程やウイルスの細胞培養途中で起こる抗原性の変化はとらえることはできたが、それ以外の抗原性の変化はとらえることができないことがわかった。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 年までの分離株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、A(H1N1)pdm09 ではクレード 6B に属するウイルスが出現した際に明らかな抗原性の変化が起こっていることがわかった。得られた結果をワクチン株選定のための資料として国内外の株選定会議に提供した。

### 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、それにともなっ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

2015/16 及び 2016/17 シーズンの国内およびアジア諸国から収集した 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、フェレット感染血清を用いた赤血球凝集阻止試験により実施した。2016/17 シーズンの A(H1N1)pdm09 分離株解析については 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。さらに、A(H1N1)pdm09 については、2009 年以降の抗原性の変化を明らかにすることを目的とし、2009 年から 2016 年までの分離株についてワクチン接種者血清を用いた HI 試験により比較解析した。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

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 株は細胞培養途中で怒った HA の 190 番目のアミノ酸置換 (S→R) を持ち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。

(倫理面への配慮)

該当なし

### C. 研究結果

2015/16 シーズン :

A(H1N1)pdm09 : 2015/16 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) のフェレット感染血清との反応性から、分離株はいずれも A/California/7/2009 に抗原性が類似した株であると判定された。

B 型インフルエンザの流行は、2015/16 シーズンは山形系統とビクトリア系統の混合流行であった。その割合は山形系統が 56%、ビクトリア系統が 44%であった。

B 山形系統 : 2015/16 シーズン分離株はいずれも 2015/16 シーズンのワクチン株 B/Phuket/3073/2013 の細胞分離株および鶏卵分離株のいずれにも抗原性が類似していた。

B ビクトリア系統 : B/Texas/02/2013 鶏卵分離株のフェレット感染血清との反応性から、分離株はいずれも 2015/16 シーズンのワクチン株 B/Texas/02/2013 に抗原性が類似した株であると判定された。

2016/17 シーズン :

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。しか

しながら、ワクチン接種者のプール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。

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。

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。

2009 年から 2016 年までの分離株についてワクチン接種者血清を用いた HI 試験による比較解析から、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良好に反応 (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。

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

2015/16 及び 2016/17 シーズンともフェレット感染血清を使用した HI 試験では A(H1N1)pdm09、B 山形系統および B ビクトリア系統のいずれにおいても、分離株の抗原性の変化はとらえられなかった。しかしながら、A(H1N1)pdm09 でワクチン接種者血清を用いた解析ではワクチン接種者血清がクレード 6B、6B1 に属する分離株と特に反応性が低かったことから、A(H1N1)pdm09 の抗原性が変化していることが明らかとなった。A(H1N1)pdm09 で見られたように、フェレット感染血清が B 型の抗原性の変化を見逃している可能性を否定できない。今後は、B 型についても解析に使用する血清の検討が必要であると考えられた。

ワクチン接種者血清を用いた HI 試験による A(H1N1)pdm09 分離株の比較解析から、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小さくなかったと考えられた。

#### E. 結論

A(H1N1)pdm09 のワクチン接種者血清を用いた解析により、A(H1N1)pdm09 の抗原性の変化が明らかとなったことから、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、めだっ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性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, Ohmiya S, Sato K, Ito H, Chiba F, Nishimura H, Shindo S, Watanabe S, Odagiri T; Influenza Virus Surveillance Group of Japan., Characterization of an A (H1N1)pdm09 Virus Imported from India in March 2015., *Jpn. J. Infect. Dis.*, 69(1), 83-6, 2016
- Li TC, Yang T, Yoshizaki S, Ami Y, Suzaki Y, Ishii K, Kishida N, Shirakura M, Asanuma H, Takeda N, Wakita T., Ferret Hepatitis E Virus Infection Induces Acute Hepatitis and Persistent Infection in Ferrets., *Vet. Microbiol.*, 183, 30-36, 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
- 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
- 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

- 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

- Shinji Watanabe, Kazuya Nakamura, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Emi Takashita, Noriko Kishida, Tomoko Kuwahara, Aya Sato, Ogawa Rie, Hiromi Sugawara, Miki Akimoto, Hideka Miura, Takato Odagiri, The Influenza Surveillance Group of Japan Characterizations of circulating influenza viruses in the 2014/2015 season and vaccine viruses selected for the 2015/16 season 第63回日本ウイルス学会 2015年11月 福岡
- 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 high growth reassortant whole-virus A(H3N2) influenza vaccine in ferret Options IX for the control of influenza 24 - 28 August, 2016, Chicago

- 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 The 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

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

2014/15～2017/18 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、クレード 6B 内にサブクレード 6B.1, 6B.2 が出現し、6B.1 が流行の主流となった。A(H3N2) ウイルスは 3C.2a が主流でありシーズンを経るにつれサブクレードが多様化し、大別すると 3C.2a 内に 4 つの集団が形成された。B 型では、Yamagata 系統は各シーズンを通してクレード 3 が流行した。Victoria 系統ではクレード 1A が流行しているが、アミノ酸欠損または置換を有する抗原性変異株集団が派生した。各亜型・系統のウイルスにも遺伝子変異の蓄積が認められ遺伝子系統樹上では明確に区別される集団が複数確認される。抗原性の変異したウイルスが出現・伝播する可能性は否定できないため、今後もウイルスの発生とその遺伝子の特徴を把握していくことが重要である。

### 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

2014/15 シーズンから 2017/18 シーズンにかけて国内および海外（ラオス、台湾、モンゴル、韓国、ミャンマー、ネパール、インド）から分与され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、上記シーズンを通して A(H1N1)pdm09 を 817 株、A(H3N2) を 1343 株、B 型を 1102 株、解析を行った。ウイルスからの核酸抽出には QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)、核酸増幅の RT-PCR には SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher)、シークエンシン

グには 3730xl DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific) および MiSeq (Illumina) を用いた。

（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、2014/15 シーズンにはクレード 1～8 の 8 つに区分されていたが、流行の主流であるクレード 6 はサブクレード 6A, 6B, 6C に分岐した。2015/16 シーズンには分離株は全て 6B に分類され、さらに 6B.1 (アミノ酸置換:S84N, S162N, I216T、代表株：A/Michigan/45/2015 株、A/Singapore/GP1908/2015 株)、6B.2 (V152T, V173I, E491G, D501E) が出現した。2016/17 シーズンには S74R, S164T, I295V を持つ集団が発生し流行の主流となった。また、NA タンパク質に薬剤耐性マーカーのアミノ酸置換 H275Y を有する株は稀に検出されたが、流行は確認されていない。

A (H3N2) ウイルス : HA 遺伝子系統樹においてクレード 3C はサブクレード 3C.1, 3C.2 (N145S, D489N) , 3C.3 (T128A, R142G, N145S) に分かれており、さらに 3C.2a (L3I, N144S, K160T, N255D, Q311H, F159Y、代表株 : A/Hong Kong/4801/2014 株) と 3C.3a (A138S, F159Y, N225D) 、および 3C.3b (E62K, K83R, M347K) に細分化していた。2014/2015 シーズン以降、流行株の主流は 3C.2a とその派生ウイルスである。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、代表株 : A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 株) が主流となった。2017/18 シーズンには、3C.2a 内に 3C.2a1 以外にも複数の集団の流行が確認され、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。これらのウイルスが有するアミノ酸置換に依る抗原性への影響は明らかにされていない。

B 型ウイルス : Yamagata 系統分離株は全て、各シーズンを通して 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時点では流行は確認されていない。

#### D. 考察

4 シーズンを通して A (H3N2) 亜型ウイルスは遺伝子変異の蓄積とアミノ酸の多様化が特徴的と言える。各ウイルス集団が有するアミノ酸置換には抗原部位近傍と考えられるものもあり、今後、抗原性変異ウイルスの出現に注視したい。A (H1N1) pdm09 亜型もパンデミック発生から約 9 年が経過しアミノ酸置換が蓄積されてきた。抗原性変異株はほとんど報告されていないが、引き続き注意が必要であろう。B 型については、数年前までとは異なり流行のパターンが変化し、シーズンの早い時期からウイルスの検出が報告される場合がある。山形系統ウイルスは他の亜型・系統に比べ遺伝子の多様性が低い、大きく流行することがあり興味深い。ビクトリア系統ウイルスは 2017/18 シーズンに抗原性変異株の発生・流行が海外で報告された。現時点で日本では検出例が少ないが来シーズン以降に流行を引き起こす可能性は否定できない。変異を迅速に捉えるために、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 ウイルスには抗原性変異株の流行は報告されていない。A (H3N2) ウイルスは、多様化した各サブクレードのウイルスが持つアミノ酸置換と抗原性の関係および、今後の流行状況に注意したい。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。いずれのウイルスについても、遺伝子の変異と流行の変化に注意深く監視を続ける必要がある。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Takashita E, Kiso M, Fujisaki S, Yokoyama M, Nakamura K, Shirakura M, Sato H, Odagiri T, Kawaoka Y, Tashiro M, and the Influenza Virus Surveillance Group of Japan., Characterization of a

- large cluster (outbreak) of influenza A(H1N1)pdm09 virus cross-resistant to oseltamivir and peramivir during(in) the 2013-14 influenza season in Japan., *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 59(5), 2607-17, 2015
- Nakamura K, Shirakura M, Suzuki Y, Naito T, Fujisaki S, Tashiro M, Nobusawa E., Development of a high-yield reassortant influenza vaccine virus derived from the A/Anhui/1/2013 (H7N9) strain., *Vaccine*, 34(3), 328-33, 2016
  - Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Ohmiya S, Sato K, Ito H, Chiba F, Nishimura H, Shindo S, Watanabe S, Odagiri T; Influenza Virus Surveillance Group of Japan., Characterization of an A (H1N1)pdm09 Virus Imported from India in March 2015., *Jpn. J. Infect. Dis.*, 69(1), 83-6, 2016
  - Takayama I, Hieu NT, Shirakura M, Nakauchi M, Fujisaki S, Takahashi H, Nagata S, Long NT, Odagiri T, Tashiro M, Kageyama T., Novel Reassortant Avian Influenza A(H5N1) Virus in Human, Southern Vietnam, 2014., *Emerging Infectious Diseases.*, 22(3), 557-9, 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
  - 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
  - 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
  - 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
  - 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
  - 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
- 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
- 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, Hiromi Sugawara, 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
- 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
- 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, 2017
- 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
  - E Takashita, S Fujisaki, N Gabriele, Y Furuta, Y Kawaoka, M Tashiro, T Odagiri. Antiviral susceptibility of influenza viruses isolated from patients pre- and post-administration of favipiravir. 第63回日本ウイルス学会学術集会、福岡、2015
  - S Watanabe, K Nakamura, S Fujisaki, M Shirakura, E Takashita, N Kishida, T Kuwahara, A Sato, R Ogawa, H Sugawara, M Akimoto, H Miura, T Odagiri, The Influenza Surveillance Group of Japan. Characterizations of circulating influenza viruses in the 2014/2015 season and vaccine viruses selected for

the 2015/2016 season. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、福岡、2015

- C Kawakami, E Takashita, S Fujisaki, M Saikusa, S Usuku, T Odagiri, K Mitamura. Genetic analysis of influenza B viruses isolated during the five seasons in Yokohama. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、福岡、2015
- 高下恵美、小川理恵、藤崎誠一郎、中村一哉、白倉雅之、岸田典子、桑原朋子、菅原裕美、佐藤彩、三浦秀佳、秋元未来、渡邊真治、小田切孝人 2014/15 シーズンにおける日本国内の抗インフルエンザ薬耐性ウイルス検出状況 第 47 回日本小児感染症学会、福島、2015
- C Kawakami, K Shimizu, S Usuku, K Mitamura, E Takashita, S Fijisaki, T Odagiri. Gene Analysis of Influenza B Viruses in Yokohama during the Past 5 Seasons. The 4th isirv Antiviral Group Conference, Texas, USA, 2015
- E Takashita, M Kiso, S Fujisaki, M Yokoyama, K Nakamura, M Shirakura, H Sato, T Odagiri, Y Kawaoka and M Tashiro. Characterization of a Large Cluster of Influenza A(H1N1)pdm09 Virus Cross-Resistant to Oseltamivir and Peramivir during the 2013/2014 Influenza Season in Japan. The 4th isirv Antiviral Group Conference, Texas, USA, 2015

#### **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。当研究所でも、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、全国の地方衛生研究所や提携医療機関から分与された臨床検体を用いてワクチン候補株の分離を行っている。近年、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。当研究所においても、従来の方法では全く A(H3N2)ウイルスを鶏卵で分離できなくなってしまうため、分離条件の再検討を行った。その結果、A(H3N2)ウイルスの分離率を上昇させることに成功した。また、我々が鶏卵で分離した A/Saitama/103/2014(H3N2)株は、鶏卵で分離しても流行株と類似の抗原性を保持していたため、A/Saitama/103/2014(CEXP-002)株は、2017 年に WHO ワクチン株選定会議においてワクチン候補株として承認された。

### 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、WHO Collaborating Centre (WHOC)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 WHOC の一つであり、より有効性の高いワクチン株の選定に貢献するため、全国の地方衛生研究所や提携医療機関から分与された臨床検体を鶏卵に接種し、ワクチン候補株の分離を行っている。しかしながら、近年の A(H3N2)ウイルスは、鶏卵で増殖しづらく、さらに鶏卵で増殖しても主要抗原である HA に変異が入り、ウイルスの抗原性が変化する現象が起こっている。ワクチン候補株の抗原性の変化は、ワクチン株と流行株の抗原性の乖離を意味しており、これによりワクチンの有効性も低下することが報告されている。このような背景のもと、我々は、特に A(H3N2)ワクチン候補株の鶏卵での分離率の改善と、これまでに鶏卵で分離した A/Saitama/103/2014 (H3N2)(埼玉株)の性状解析を試みた。

### B. 研究方法

27 年度は、2014/15 シーズンと 2015/16 シーズンに全国の地方衛生研究所で集められた臨床検体を用いた。28 年度以降は、4 箇所の提携医療機関から分与された臨床検体を用いた。ウイルスの分離は、27 年度は臨床検体を鶏卵（9-10 日齢）に直接接種するか、臨床検体を当研究所において細胞培養ワクチンの種株分離用に品質管理されている MDCK 細胞 (NIID-CK 細胞) に接種し、分離されたウイルスを鶏卵の羊膜腔および漿尿膜腔で継代することにより行った。

28 年度には、臨床検体到着後、まず 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。29 年度は、28 年度とほぼ同様の手法を用いたが、鶏卵は従来の 9-10 日齢の白

玉鶏ジュリアに加え、14日齢の赤玉鶏ボリスブラウンも用いた。また、ウイルス接種の際に漿尿膜に接している卵殻膜を取り除かずに、PBSを添加して膜の透過性を高めて接種する方法も用いた。羊膜腔で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

27年度は、臨床検体またはNIID-CK細胞で分離したウイルスを発育鶏卵に接種し分離を試みた。その結果、A(H1N1)pdm09ウイルスを4株、A(H3N2)ウイルスを1株、B型ビクトリア系統ウイルスを2株分離した。近年のA(H3N2)ウイルスは、ほぼ例外なく、鶏卵で増殖するようになると、主要抗原であるHAの抗原部位に変異を獲得し、ウイルスの抗原性が変化してしまう。ところが、我々が鶏卵で分離したA(H3N2)ウイルスのA/Saitama/103/2014株(埼玉株)は、臨床検体と比較してHAには抗原部位ではない場所の1ヶ所にしか変異が入っておらず、HAとともにウイルス粒子上に膜タンパクとして存在するNAに10ヶ所の変異が入っていた。またこのウイルスの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ところ、流行株と類似の抗原性を保持していることが明らかになった。埼玉株は、鶏卵で分離しても流行株と類似の抗原性を保持した非常に珍しいウイルスであり、2017年にはWHOの季節性ワクチン株推奨リストに掲載された。さらに、29年度には、埼玉株についてまとめた論文が科学雑誌Japan Journal of Infectious Diseasesに受理された。

一方で、A(H3N2)ウイルスの分離率は年々低下傾向にあり、28年度には1株も分離することができなかった。そこで、我々は28年度から、凍結する前のウイルスタイターが高い状態の

臨床検体を羊膜腔に接種すれば分離率が改善するのではないかと考え、東京都と神奈川県の実験医療機関から凍結前の臨床検体を分与してもらい、鶏卵に接種した。ところが、これらの臨床検体を用いても、B型ウイルスでは分離率が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。29年度には、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、分離条件を再検討した。その結果、使用する鶏卵の種類を14日齢の赤玉鶏ボリスブラウンに変更し、漿尿膜と接している卵殻膜を取り除く方法を用いると、A(H3N2)ウイルスの分離率が0%から20%にまで上昇し、他の亜型のウイルスにおいても高い分離率を保っていた。この方法により、28年度には1株も分離できなかったA(H3N2)ウイルスを23株分離することに成功した。その他の亜型では、A(H1N1)pdm09ウイルス37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株を分離した。

### D. 考察

A(H3N2)ウイルスは、目まぐるしく変化しており、ワクチン株の鶏卵での分離は大きな課題である。本研究課題で我々は、初年度にA(H3N2)ワクチン候補株の埼玉株を分離し、この株は2017年にWHOからワクチン株として承認された。このウイルスはHAではなくNAに変異を獲得し、抗原性変異を起こさなかった特殊なウイルスであるため、今後このウイルスの更なる性状解析を行うことにより、HAの抗原部位に変異を獲得しないワクチン候補株の開発に寄与することが期待される。また、29年度に鶏卵分離の手法を再検討したことにより、これまで分離することが困難であったA(H3N2)ウイルスの分離に成功した。今回改良した手法を用いることにより、今後さらに多くのワクチン候補株を分離し、より有効性の高いワクチン株が分離できると期待される。



## E. 結論

インフルエンザウイルスは、変異を起こしやすく、流行するウイルスも日々変化する。今後とも有効性の高いワクチン株の分離を目指し、新たな分離手法の開発や、既存の手法を改良していくことは、公衆衛生上非常に重要である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Ohmiya S, Sato K, Ito H, Chiba F, Nishimura H, Shindo S, Watanabe S, Odagiri T; Influenza Virus Surveillance Group of Japan., Characterization of an A (H1N1)pdm09 Virus Imported from India in March 2015., Jpn. J. Infect. Dis., 69(1), 83-6, 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
- 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

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

### 2. 学会発表

- Watanabe S, Nakamura K, Fujisaki S, Shirakura M, Takashita M, Kishida N, Kuwahara T, Sato A, Ogawa R, Sugawara H, Akimoto M, Miura H, Odagiri T, The Influenza Surveillance Group of Japan
- Characterizations of circulating influenza viruses in the 2014/2015 season and vaccine viruses selected for the 2015/16 season. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、博多市、2015
- 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
- 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。 5th Negative Strand Virus-Japan、恩納村、2016
- 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

- ・ 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、宜野湾市、2017
  
- ・ 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、静岡市、2017
  
- ・ 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 2016/2017 season and vaccine viruses selected for the 2016/17 season. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪市、2017
  
- ・ Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, 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、大阪市、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

## 抗インフルエンザ薬耐性株の発生動向ならびにリスク評価 および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、ベトナム、モンゴル、ミャンマー、ラオス、ネパールおよびインドの分離株について、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 A(H1N1)pdm09 株が 12 株、オセルタミビル・ペラミビル耐性 A(H3N2) ウイルスが 2 株検出された。A(H3N2) 耐性ウイルスに関しては薬剤選択圧によって出現したと考えられるが、A(H1N1)pdm09 耐性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ウイルスの監視を行う必要がある。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・サポート地衛研における検査精度は年々上昇しており、十分に検査精度が保持され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、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。世界各国で分離されるインフルエンザウイルスのほとんどは NA 阻害薬に対して感受性であるが、日本国内では 2013/2014 シーズンに札幌市を中心とする北海道内で NA 蛋白質に特徴的なアミノ酸変異（H275Y）をもつオセルタミビル・ペラミビル耐性 A(H1N1)pdm09 ウイルスの地域流行があった。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いて、NA

阻害薬耐性株の発生動向を調査し、その性状解析およびリスク評価を行った。

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、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

日本、韓国、台湾、ベトナム、モンゴル、ミャンマー、ラオス、ネパールおよびインドの分離株について、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、

IC<sub>50</sub> 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。薬剤耐性の判定は WHO の判定基準に準じ、感受性参照株と比較して IC<sub>50</sub> 値が A 型ウイルスでは 100 倍以上、B 型ウイルスでは 50 倍以上上昇した株を耐性株と判定した。

11 箇所のコア・サポート地衛研において、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 倍階段希釈液を製作し、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 744 株および海外株 218 株、A(H3N2) ウイルスは国内株 917 株および海外株 296 株、B 型ウイルスは国内株 1,040 株および海外株 275 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 12 株検出された。また A(H3N2) ウイルスでは、NA 蛋白質に R292K 変異をもつオセルタミビル・ペラミビル耐性株が 2 株検出された。B 型ウイルスでは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。平成 28 年度には、11 箇所のうち 9 箇所の地衛研で評価項目 (1) および (2) を満

たしていた。一方、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。

平成 29 年度には、11 箇所すべてのコア・サポート地衛研で評価項目 (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 A(H3N2) ウイルスが検出された 2 名の患者は、オセルタミビルおよびペラミビルの投与を受けており、薬剤選択圧によって患者の体内で耐性ウイルスが選択的に増殖したと考えられる。一方、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 12 名の患者のうち 7 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。

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 8 年が経過したが、コア・サポート地衛研において、薬剤耐性株検出系の検査精度は年々上昇しており、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, Kiso M, Fujisaki S, Yokoyama M, Nakamura K, Shirakura M, Sato H, Odagiri T, Kawaoka Y, Tashiro M, and the Influenza Virus Surveillance Group of Japan. , Characterization of a large cluster ( outbreak ) of influenza A(H1N1)pdm09 virus cross-resistant to oseltamivir and peramivir during(in) the 2013-14 influenza season in Japan. , *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 59(5), 2607-17 , 2015
- Takashita E, Meijer A, Lackenby A, Gubareva L, Rebelo-de-Andrade H, Besselaar T, Fry A, Gregory V, Leang SK, Huang W, Lo J, Pereyaslov D, Siqueira MM, Wang D, Mak GC, Zhang W, Daniels RS, Hurt AC, Tashiro M. , Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2013-2014. , *Antiviral Res.* , 117, 27-38, 2015
- Sriwilaijaroen N, Suzuki K, Takashita E, Hiramatsu H, Kanie O, Suzuki Y. , 6SLN-lipo PGA specifically catches (coats) human influenza virus and synergizes neuraminidase-targeting drugs for human influenza therapeutic potential. , *J. Antimicrobial Chemotherapy.* , 70(10), 2797-809, 2015
- Zhao D, Fukuyama S, Sakai-Tagawa Y, Takashita E, Shoemaker JE, Kawaoka Y. , C646, a novel p300/CREB-binding protein-specific inhibitor of histone acetyltransferase, attenuates influenza A virus infection. , *Antimicrob. Agents. Chemother.* , 60(3), 1902-6, 2015
- Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Ohmiya S, Sato K, Ito H, Chiba F, Nishimura H, Shindo S, Watanabe S, Odagiri T; Influenza Virus Surveillance Group of Japan. , Characterization of an A (H1N1)pdm09 Virus Imported from India in March 2015. , *Jpn. J. Infect. Dis.* , 69(1), 83-6, 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
- 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. , TMRSS2 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
- 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
  - 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), 17735, 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)
2. 学会発表
- Takashita E, Kiso M, Fujisaki S, Yokoyama M, Nakamura K, Shirakura M, Sato H, Odagiri T, Kawaoka Y, Tashiro M. Characterization of a Large Cluster of Influenza A(H1N1)pdm09 Virus Cross-Resistant to Oseltamivir and Peramivir during the 2013–2014 Influenza Season in Japan. 4th isirv-AVG Conference; Influenza and other Respiratory Virus Infections: Advances in Clinical Management. June 2015. Texas, USA.
  - Kawakami C, Momoki T, Saikusa M, Ozawa H, Shimizu K, Usuku S, Mitamura K, Takashita E, Fujisaki S, Odagiri T. Genetic Analysis of Influenza B Viruses Isolated During the Five Seasons in Yokohama, Japan. 4th isirv-AVG Conference; Influenza and other Respiratory Virus Infections: Advances in Clinical Management. June 2015. Texas, USA.
  - 高下恵美, 小川理恵, 藤崎誠一郎, 中村一哉, 白倉雅之, 岸田典子, 桑原朋子, 菅原裕美, 佐藤彩, 三浦秀佳, 秋元未来, 渡邊真治, 小田切孝人. 2014/15 シーズンにおける日本国内の抗インフルエンザ薬耐性ウイルス検出

- 状況. 第47回日本小児感染症学会. 2015年10月. 福島.
- 川上千春, 七種美和子, 豊澤隆弘, 高下恵美. 横浜市における過去5シーズンのB型インフルエンザウイルスの遺伝子解析. 第47回日本小児感染症学会. 2015年10月. 福島.
  - Takashita E, 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. 第63回日本ウイルス学会. 2015年11月. 福岡.
  - Kawakami C, Takashita E, Fujisaki S, Saikusa M, Usuku S, Odagiri T, Mitamura K. Genetic Analysis of Influenza B Viruses isolated during the Five Seasons in Yokohama. 第63回日本ウイルス学会. 2015年11月. 福岡.
  - Watanabe S, Nakamura K, Fujisaki S, Shirakura M, Takashita E, Kishida N, Kuwahara T, Sato A, Ogawa R, Sugawara H, Akimoto M, Miura H, Odagiri T, The Influenza Surveillance Group of Japan. Characterizations of circulating influenza viruses in the 2014/2015 season and vaccine viruses selected for the 2015/16 season. 第63回日本ウイルス学会. 2015年11月. 福岡.
  - 高下恵美. 日本国内におけるNA阻害薬耐性インフルエンザウイルス検出状況. 5th Negative Strand Virus-Japan. 2016年1月. 沖縄.
  - 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, Aina 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
- 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, Aina 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.
  - 高下恵美. 日本国内で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91回日本感染症学会. 2017年4月. 新宿.
  - 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会シンポジウム. 2017年6月. 静岡.
  - 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会シンポジウム. 2017年6月. 静岡.
  - 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. June 2017. Shanghai, China.



- 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. September 2017. Riga, Latvia.
- 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. 2016年10月. 大阪.
- 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. 2016年10月. 大阪.
- 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. 2016年10月. 大阪.
- 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. 2018年1月. 沖縄.

## H. 健康危険情報

該当なし

## G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

## 成人層および高齢者層に対する 2015-18 年にかけて使用された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）、樋熊紀男（女池南風苑・施設長（-H28））、金沢宏（女池南風苑・施設長（H29-））

### 研究要旨

2015-2018 年の 3 シーズンにおける 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（≤60 歳）のべ 293 名と、高齢者層（>60 歳）のべ 152 名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。

成人層で抗体価 40 倍以上の保有率に着目した場合、A 型（A/H1N1pdm09、A/H3N2）は 2015-2016、2016-2017 シーズンの 2 シーズンまでは基準の 70%を上回っていたが、2017-2018 シーズンは A/H3N2 がかろうじて基準を満たしたものの、A/H1N1pdm09 は基準を下回り、防御に不安を残す結果となっていた。B 型は 3 シーズン通じて基準を下回っており、何かしらの改善が必要であると考えられる。高齢者層の結果も成人層と同様の傾向を示していたが、反応性は成人層よりも低い結果となっており、高齢者の抗体獲得能は低いことを表す結果となった。また両年齢群とも 2017-2018 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、反応性が低かったことから、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、3 シーズン通じて成人群、高齢者群ともに局所の発赤・腫れを申告した割合が多かった。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 3 シーズンの間に使用されたワクチンは重篤な副反応を示すことのない安全性の高いワクチンであったが、その反面、反応性は期待したほど高くはなく、4 種類すべてのワクチン抗原で基準を満たしたシーズンは 1 度もなかった。今後は免疫原性を高めるための改善を進めていく必要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問題となっている。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。2015-2018年にかけての3シーズンでワクチン株はA/H1N1pdm、A/H3N2が1回ずつ変更されているが、B型のワクチン株は両系統(B/山形系統、B/ビクトリア系統)とも変更されることなく、3シーズン同じワクチン株が使用されている(表1)。

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、2015-2018年の3シーズンにかけて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、毎シーズン11月頃にデンカ生研社製(デンカ)または阪大微研社製(微研)の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/H1N1pdm抗原、A/H3N2抗原、B/山形系統抗原、B/ビクトリア系統抗原を用いて測定した。

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2015-2016シーズン:100件(平均年齢42.0±12.0歳)、2016-2017シーズン:99件(平均年齢41.8±10.2歳)、2017-2018シーズン:94件(平均年齢は41.7±10.1歳)採取され、高齢者層のペア血清は2015-2016シーズン:46件(平均年齢87.2±7.6歳)、2016-2017シーズン:49件(平均年齢84.5±9.8歳)、2017-2018シーズン:57件(平均年齢83.5±11.3歳)採取された。

全てのシーズンにおいて成人層、高齢者層ともに接種後の抗体価上昇が認められた。

成人層における接種後40倍以上の抗体価保有率は、A/H1N1pdm09で2015-2016、2016-2017シーズンともに国際基準が定める70%を上回っていたが、ワクチン株が変更された2017-2018シーズンは基準を大きく下回る結果となった(2015-2016シーズン:75.8%、2016-2017シーズン:97.0%、

2017-2018 シーズン：8.8%)。A/H3N2 は3シーズンともに国際基準の70%を上回っていたものの、2016-2017 シーズンにワクチン株が変更になって以降、保有率は徐々に減少傾向にあった(2015-2016 シーズン：90.5%、2016-2017 シーズン：89.9%、2017-2018 シーズン：70.2%)。B/山形系統は3シーズン通じて基準の70%を下回っており(2015-2016 シーズン：20.0%、2016-2017 シーズン：61.6%、2017-2018 シーズン：46.8%)、B/ビクトリア系統も同様の結果であった(2015-2016 シーズン：14.7%、2016-2017 シーズン：35.4%、2017-2018 シーズン：50.0%) (表2、図1A-D)。

高齢者層ではA/H1N1pdm09(2015-2016 シーズン：64.7%、2016-2017 シーズン：63.3%、2017-2018 シーズン：3.5%)とA/H3N2(2015-2016 シーズン：74.5%、2016-2017 シーズン：83.7%、2017-2018 シーズン：52.6%)は2016-2017 シーズンまでは国際基準で定められている60%を上回っていたが、2017-2018 シーズンは基準を下回る結果となり、特にこのシーズンからワクチン株が変更されたA/H1N1pdmは保有率が著しく減少していた。一方でB/山形系統(2015-2016 シーズン：13.7%、2016-2017 シーズン：28.6%、2017-2018 シーズン：14.0%)とB/ビクトリア系統(2015-2016 シーズン：19.6%、2016-2017 シーズン：30.6%、2017-2018 シーズン：28.1%)は成人層と同様3シーズン通じて基準を下回っていた(表2、図2A-D)。

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、3シーズン通じてA/H3N2での陽転率が一番高く(2015-2016 シーズン：42.1%、2016-2017 シーズン：37.4%、2017-2018 シーズン：6.4%)、高齢者層でも同様の傾向(2015-2016 シーズン

：56.9%、2016-2017 シーズン：42.9%、2017-2018 シーズン：7.0%)がみられた(表2)。

成人層のワクチン接種後のHI抗体価の幾何平均(GMT)はワクチンに用いられている全ての抗原で接種前のGMTよりも上昇していることが3シーズン通じて確認されたが、GMTの前後比(Fold Increase)で評価した場合、国際基準の $\geq 2.5$ 倍を満たしているのは2015-2016、2016-2017シーズンのA/H3N2のみ(2015-2016 シーズン：3.0、2016-2017 シーズン：2.5、2017-2018 シーズン：1.5)であり、A/H1N1pdm09(2015-2016 シーズン：1.5、2016-2017 シーズン：1.4、2017-2018 シーズン：1.5)、B/山形系統(2015-2016 シーズン：1.3、2016-2017 シーズン：1.2、2017-2018 シーズン：1.3)、B/ビクトリア系統(2015-2016 シーズン：1.4、2016-2017 シーズン：1.3、2017-2018 シーズン：1.3)は基準を下回る結果となった(表3、図3A-D)。

高齢者のGMTも成人層同様、ワクチンに用いられているすべての抗原で接種前のGMTよりも上昇していることが確認されたが、こちらもGMTの前後比(Fold Increase)で国際基準の $\geq 2.0$ 倍を満たしていたのは2015-2016、2016-2017シーズンのA/H3N2のみ(2015-2016 シーズン：4.0、2016-2017 シーズン：2.8、2017-2018 シーズン：1.5)であり、A/H1N1pdm(2015-2016 シーズン：1.8、2016-2017 シーズン：1.8、2017-2018 シーズン：1.2)、B/山形系統(2015-2016 シーズン：1.9、2016-2017 シーズン：1.6、2017-2018 シーズン：1.5)、B/ビクトリア系統(2015-2016 シーズン：1.5、2016-2017 シーズン：1.4、2017-2018 シーズン：1.4)は基準を下回る結果となった(表3、図4A-D)。

成人層、高齢者層ともにA型(特に

A/H1N1pdm)で2017-2018シーズンのワクチン接種後 GMT 値が他の2シーズンに比べ低い結果が得られたが、各シーズンで GMT 値ならびに前後比の結果をワクチン製造会社別で比較してみると2社間に大きな差は見られなかった。

ワクチン接種後の副反応は、局所の発赤が成人層(2015-2016シーズン:55.3%、2016-2017シーズン:58.6%、2017-2018シーズン:36.2%)と高齢者層(2015-2016シーズン:80.4%、2016-2017シーズン:87.8%、2017-2018シーズン:63.2%)ともに一番割合の高い副反応として申告されており、次いで局所の腫れが成人層(2015-2016シーズン:44.7%、2016-2017シーズン:52.5%、2017-2018シーズン:30.9%)と高齢者層(2015-2016シーズン:21.6%、2016-2017シーズン:26.5%、2017-2018シーズン:47.4%)で多く申告された。その他、全身的な重度の副反応は認められなかった(表4)。

#### D. 考察

成人層において、A型(A/H1N1pdm09、A/H3N2)は2015-2016、2016-2017シーズンまでの2シーズンはワクチン接種後40倍以上のHI抗体保有率が国際基準の70%を上回っており、予防効果が期待できると考えられたが、2017-2018シーズンはA/H3N2がそろって基準を満たしたものの、ワクチン株が変更になったA/H1N1pdm抗原に対しては基準を大きく下回っており、防御には不十分と考えられる。またB型(B/山形系統、B/ビクトリア系統)は3シーズン通じて基準を下回っており、防御の期待は薄いと考えられる。接種前後での4倍以上の抗体価の上昇を認めた割合で評価した場合、2015-2016シーズンのA/H3N2のみが基準として定められている40%を満たしただけで、その他のワクチン抗原で満たしているもの

は見られなかった。該当施設での成人層はほとんどが毎シーズン、ワクチンを接種していたことから、ワクチン接種前の段階である程度の抗体を保有していたため、接種前後で比較した際に4倍以上の上昇がみえにくくなったのがこの結果の1つの要因と考えられる。しかし、2017-2018シーズンからワクチン株が変更されたA/H1N1pdm09に関して上昇がみられなかった原因は不明である。

高齢者層でも成人層で得られた結果と同様の傾向を示しており、A型(A/H1N1pdm09、A/H3N2)は2015-2016、2016-2017シーズンまでの2シーズンはワクチン接種後40倍以上のHI抗体保有率が国際基準の60%を上回っており、予防効果が期待できると考えられたが、2017-2018シーズンは基準を下回り、防御に不十分であったと考えられる。B型(B/山形系統、B/ビクトリア系統)は3シーズン通じて基準の60%を下回り、防御に不安を残す結果となったため、今後も改善の余地があると考えられる。抗体保有率の結果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、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3シーズン通じて成人群、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かった。また3シーズンとも重篤な副反応はみとめられなかったため、使用されたインフルエンザワクチンは安全性が高いワクチンであったと考えられる。

#### E. 結論

2015-2018年の3シーズンにかけて使用されたワクチンは接種者において局所の発赤・腫れが報告されたものの、重篤な副反応は報告されず、安全性の高いワクチンであった。しかしその反面、反応性は期待し

たほど高くはなく、国際基準に照らし合わせた際に、ワクチンに使用されている抗原単体では基準を満たすもの(A/H1N1pdm09のみ基準を満たすなど)は確認されたが、4種類すべてのワクチン抗原で基準を満たしたシーズンは1度もなかった。特に2017-2018シーズンは成人層、高齢者層ともにA型(A/H1N1pdm09、A/H3N2)で反応性が低下しており、免疫原性の低いワクチンであったと考えられる。中でもこのシーズンから変更されたA/H1N1pdm 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/H1N1pdm 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。

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*, 53 (1), 89-94, 2016

### 2. 学会発表

- 第65回日本ウイルス学会学術集会

### • 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 3 シーズンの間に使用されたインフルエンザワクチン株

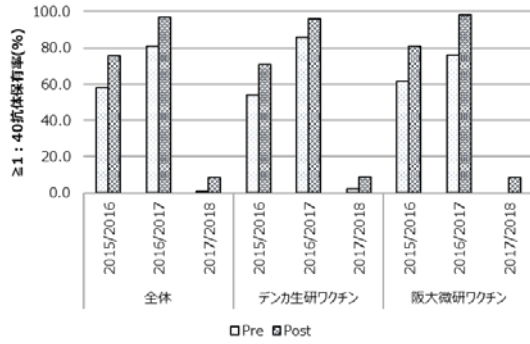
シーズン	ワクチン株			
	A/H1N1pdm	A/H3N2	B/Yamagata	B/Victoria
2015/2016	A/カリフォルニア/07/2009	A/スイス/9715293/2013	B/ブーケット/3073/2013	B/テキサス/2/2013
2016/2017	A/カリフォルニア/07/2009	A/香港/4801/2014	B/ブーケット/3073/2013	B/テキサス/2/2013
2017/2018	A/シンガポール/GP1908/2015	A/香港/4801/2014	B/ブーケット/3073/2013	B/テキサス/2/2013

表2 インフルエンザワクチン接種前後の抗体保有率と抗体陽転率の評価

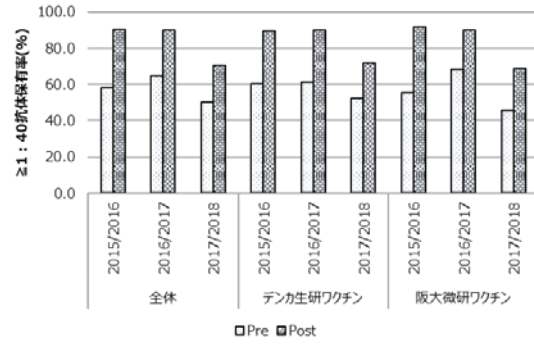
	シーズン	A/H1N1pdm						A/H3N2						B/Yamagata						B/Victoria							
		Pre(%)		Post(%)		4倍以上上昇(%)		Pre(%)		Post(%)		4倍以上上昇(%)		Pre(%)		Post(%)		4倍以上上昇(%)		Pre(%)		Post(%)		4倍以上上昇(%)			
		Pre(%)	Post(%)	Pre(%)	Post(%)	Pre(%)	Post(%)	Pre(%)	Post(%)	Pre(%)	Post(%)	Pre(%)	Post(%)	Pre(%)	Post(%)	Pre(%)	Post(%)	Pre(%)	Post(%)	Pre(%)	Post(%)	Pre(%)	Post(%)	Pre(%)	Post(%)		
成人層 (≤60)	全体	2015/2016	57.9	75.8	12.6	57.9	90.5	42.1	9.5	20.0	5.3	2.1	14.7	5.3	2.1	14.7	5.3	2.1	14.7	5.3	2.1	14.7	5.3	2.1	14.7	5.3	
		2016/2017	80.8	97.0	3.0	64.6	89.9	37.4	47.5	61.6	2.0	24.2	35.4	2.0	24.2	35.4	2.0	24.2	35.4	2.0	24.2	35.4	2.0	24.2	35.4	2.0	
		2017/2018	1.1	8.5	6.4	50.0	70.2	6.4	37.2	46.8	3.2	34.0	50.0	4.3	34.0	50.0	4.3	34.0	50.0	4.3	34.0	50.0	4.3	34.0	50.0	4.3	
	デング生研ワクチン	2015/2016	54.2	70.8	18.8	60.4	89.6	50.0	10.4	20.8	4.2	2.1	16.7	4.2	2.1	16.7	4.2	2.1	16.7	4.2	2.1	16.7	4.2	2.1	16.7	4.2	
		2016/2017	85.7	95.9	0.0	61.2	89.8	36.7	49.0	61.2	2.0	22.4	30.6	2.0	22.4	30.6	2.0	22.4	30.6	2.0	22.4	30.6	2.0	22.4	30.6	2.0	
		2017/2018	2.2	8.7	6.5	52.2	71.7	6.5	34.8	47.8	4.3	26.1	45.7	8.7	26.1	45.7	8.7	26.1	45.7	8.7	26.1	45.7	8.7	26.1	45.7	8.7	
	高齢者層 (>60)	阪大微研ワクチン	2015/2016	61.7	80.9	6.4	55.3	91.5	34.0	8.5	19.1	6.4	2.1	12.8	6.4	2.1	12.8	6.4	2.1	12.8	6.4	2.1	12.8	6.4	2.1	12.8	6.4
			2016/2017	76.0	98.0	6.0	68.0	90.0	38.0	46.0	62.0	2.0	26.0	40.0	2.0	26.0	40.0	2.0	26.0	40.0	2.0	26.0	40.0	2.0	26.0	40.0	2.0
			2017/2018	0.0	8.3	6.3	45.8	68.8	6.3	39.6	45.8	2.1	41.7	54.2	4.2	41.7	54.2	4.2	41.7	54.2	4.2	41.7	54.2	4.2	41.7	54.2	4.2
全体		2015/2016	39.2	64.7	17.6	15.7	74.5	56.9	2.0	13.7	9.8	7.8	19.6	5.9	7.8	19.6	5.9	7.8	19.6	5.9	7.8	19.6	5.9	7.8	19.6	5.9	
		2016/2017	46.9	63.3	14.3	49.0	83.7	42.9	16.3	28.6	8.2	22.4	30.6	6.1	22.4	30.6	6.1	22.4	30.6	6.1	22.4	30.6	6.1	22.4	30.6	6.1	
		2017/2018	1.8	3.5	1.8	36.8	52.6	7.0	8.8	14.0	3.5	19.3	28.1	5.3	19.3	28.1	5.3	19.3	28.1	5.3	19.3	28.1	5.3	19.3	28.1	5.3	
デング生研ワクチン		2015/2016	28.0	44.0	16.0	16.0	60.0	40.0	4.0	12.0	8.0	8.0	24.0	8.0	8.0	24.0	8.0	8.0	24.0	8.0	8.0	24.0	8.0	8.0	24.0	8.0	
		2016/2017	44.4	63.0	22.2	44.4	81.5	40.7	11.1	18.5	7.4	18.5	33.3	11.1	18.5	33.3	11.1	18.5	33.3	11.1	18.5	33.3	11.1	18.5	33.3	11.1	
		2017/2018	3.1	6.3	3.1	31.3	50.0	9.4	6.3	12.5	6.3	25.0	31.3	6.3	25.0	31.3	6.3	25.0	31.3	6.3	25.0	31.3	6.3	25.0	31.3	6.3	
阪大微研ワクチン	2015/2016	50.0	84.6	19.2	15.4	88.5	73.1	0.0	15.4	11.5	7.7	15.4	3.8	7.7	15.4	3.8	7.7	15.4	3.8	7.7	15.4	3.8	7.7	15.4	3.8		
	2016/2017	50.0	63.6	4.5	54.5	86.4	45.5	22.7	40.9	9.1	27.3	27.3	0.0	27.3	27.3	0.0	27.3	27.3	0.0	27.3	27.3	0.0	27.3	27.3	0.0		
	2017/2018	0.0	0.0	0.0	44.0	56.0	4.0	12.0	16.0	0.0	12.0	24.0	4.0	12.0	24.0	4.0	12.0	24.0	4.0	12.0	24.0	4.0	12.0	24.0	4.0		



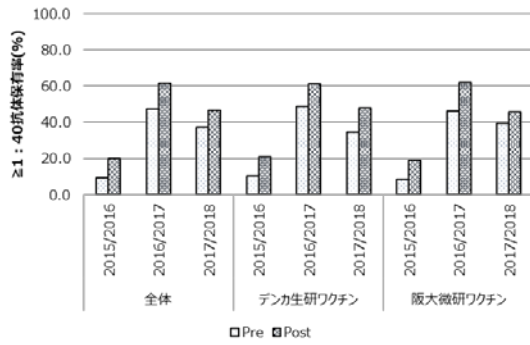
A. A/H1N1pdm



B. A/H3N2



C. B/山形系統



D. B/ビクトリア系統

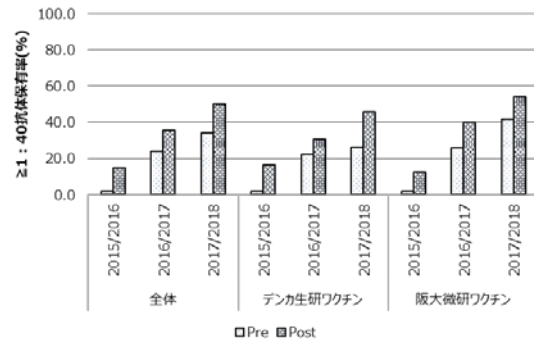
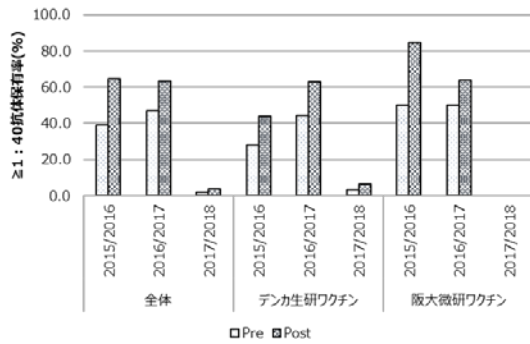
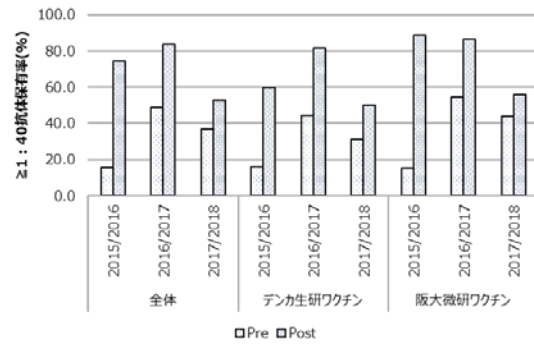


図1 ワクチン接種後の抗体保有率の推移(成人層)

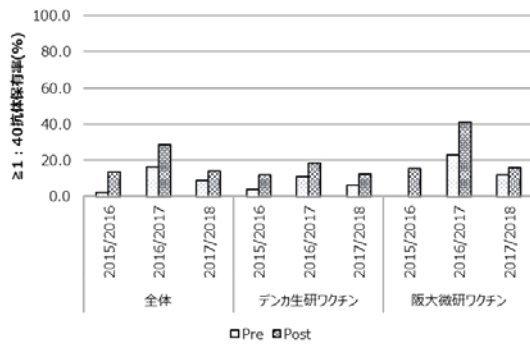
A. A/H1N1pdm



B. A/H3N2



C. B/山形系統



D. B/ビクトリア系統

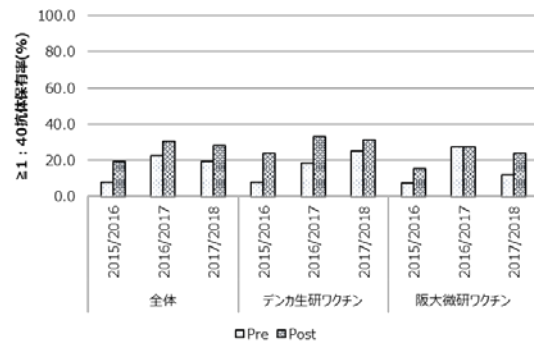
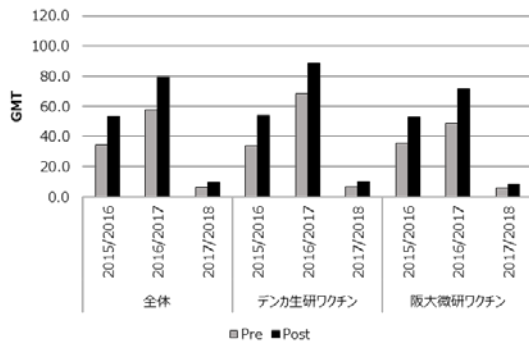


図2 ワクチン接種後の抗体保有率の推移(高齢者層)

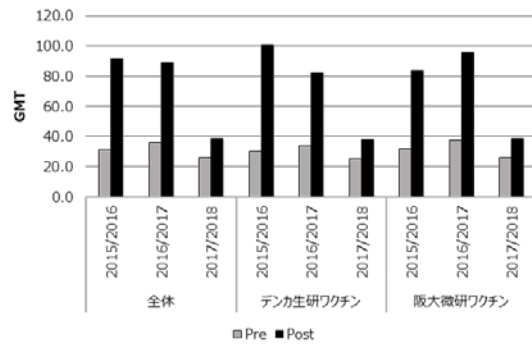
表3 インフルエンザワクチン接種前後の GMT と前後比の評価

年齢層	シーズン	A/H1N1pdm				A/H3N2				B/Yamagata				B/Victoria			
		Pre	Post	Fold Increase	Pre	Post	Fold Increase	Pre	Post	Fold Increase	Pre	Post	Fold Increase	Pre	Post	Fold Increase	
成人層 (<60)	全体	2015/2016	34.6	53.6	1.5	31.0	91.9	3.0	11.3	14.8	1.3	7.9	11.2	1.4			
		2016/2017	57.6	79.4	1.4	35.8	88.9	2.5	24.3	30.2	1.2	13.2	17.8	1.3			
		2017/2018	6.3	9.3	1.5	25.7	38.6	1.5	19.6	25.7	1.3	20.3	26.3	1.3			
	デング生研ワクチン	2015/2016	33.6	54.2	1.6	30.4	100.8	3.3	12.1	15.0	1.2	8.3	10.9	1.3			
		2016/2017	68.5	88.3	1.3	33.8	82.3	2.4	24.4	29.7	1.2	12.4	15.3	1.2			
		2017/2018	6.7	10.2	1.5	25.5	38.2	1.5	16.9	23.3	1.4	17.7	22.9	1.3			
	阪大生研ワクチン	2015/2016	35.5	52.9	1.5	31.6	83.6	2.6	10.6	14.7	1.4	7.6	11.4	1.5			
		2016/2017	48.6	71.6	1.5	37.8	95.8	2.5	24.3	30.7	1.3	14.1	20.6	1.5			
		2017/2018	5.9	8.5	1.4	25.9	38.9	1.5	22.4	28.3	1.3	23.1	30.0	1.3			
高齢者層 (>60)	全体	2015/2016	21.7	39.5	1.8	13.7	54.7	4.0	6.1	11.5	1.9	7.7	11.8	1.5			
		2016/2017	28.9	51.6	1.8	31.5	89.6	2.8	11.4	18.4	1.6	10.0	14.0	1.4			
		2017/2018	6.5	8.0	1.2	18.6	27.4	1.5	9.1	13.2	1.5	12.1	16.5	1.4			
	デング生研ワクチン	2015/2016	14.3	25.7	1.8	12.8	33.9	2.6	5.9	9.7	1.6	7.2	10.3	1.4			
		2016/2017	21.6	45.5	2.1	30.9	80.0	2.6	9.0	13.6	1.5	9.0	14.0	1.6			
		2017/2018	6.8	8.2	1.2	17.6	28.3	1.6	8.8	13.0	1.5	12.2	17.6	1.4			
	阪大生研ワクチン	2015/2016	32.3	59.7	1.8	14.5	86.7	6.0	6.4	13.4	2.1	8.3	13.4	1.6			
		2016/2017	41.3	60.2	1.5	32.1	102.9	3.2	15.1	26.6	1.8	11.3	14.1	1.2			
		2017/2018	6.1	7.8	1.3	20.0	26.4	1.3	9.5	13.6	1.4	12.1	15.2	1.2			

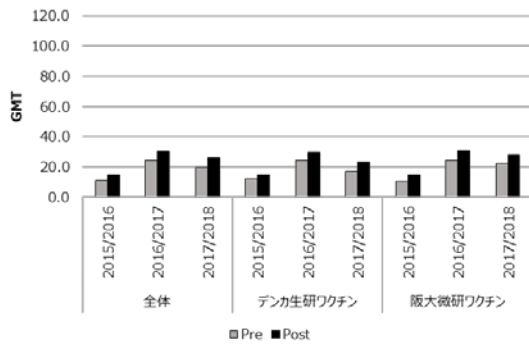
A. A/H1N1pdm



B. A/H3N2



C. B/山形系統



D. B/ビクトリア系統

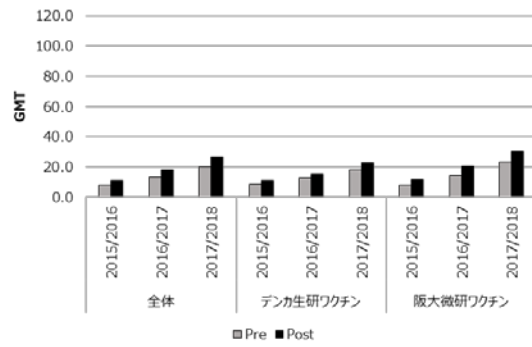
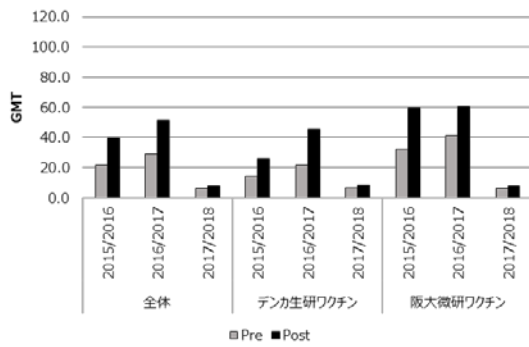
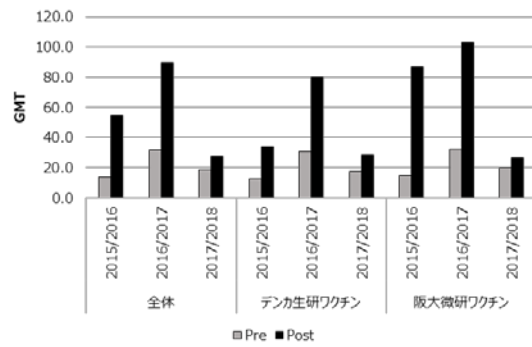


図3 ワクチン接種後の GMT の推移(成人層)

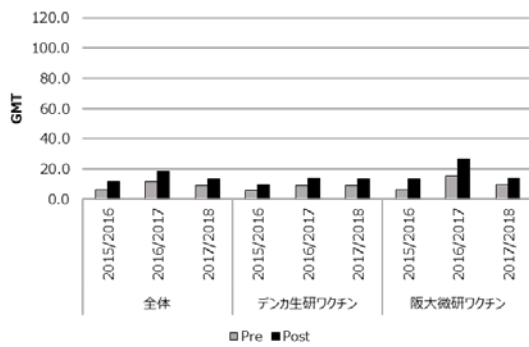
A. A/H1N1pdm



B. A/H3N2



C. B/山形系統



D. B/ビクトリア系統

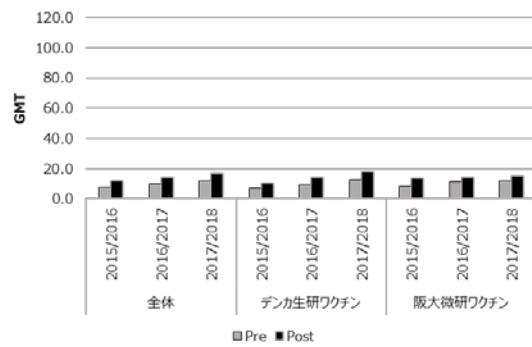


図4 ワクチン接種後の GMT の推移(高齢者層)

表4 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		
	2015/2016	2016/2017	2017/2018	2015/2016	2016/2017	2017/2018	2015/2016	2016/2017	2017/2018	2015/2016	2016/2017	2017/2018
All	4	6	2	93	101	70	53	65	56	37	41	26
(%)	(2.8)	(4.1)	(1.3)	(64.1)	(68.2)	(46.4)	(36.6)	(43.9)	(37.1)	(25.5)	(27.7)	(17.2)
成人層 (≤60歳)	4	5	0	52	58	34	42	52	29	37	41	25
(%)	(4.3)	(5.1)	(0.0)	(55.3)	(58.6)	(36.2)	(44.7)	(52.5)	(30.9)	(39.4)	(41.4)	(26.6)
高齢者層 (>60)	0	1	2	41	43	36	11	13	27	0	0	1
(%)	(0.0)	(2.0)	(3.5)	(80.4)	(87.8)	(63.2)	(21.6)	(26.5)	(47.4)	(0.0)	(0.0)	(1.8)

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)  
 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、レセプター結合特異性実験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、合成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、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、ウイルスが分離された宿主動物によって異なる。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、合成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とその改良を試みた。さらに、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析を実施した。

## B. 研究方法

1) ウイルス：中国 CDC より分与された A/Anhui/1/2013 (H7N9)、A/Guangdong/17SF003/2016 (H7N9)、台湾 CDC より分与された A/Taiwan/1/2014 (H7N9)、A/Taiwan/1/2017 (H7N9)を使用した。比較対照ウイルス株として、NIBRG-14 (A/Vietnam/1194/2004: H5N1)、A/California/4/2009 (H1N1pdm09)、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、ニワトリ赤血球 (CRBC) を用いて赤血球凝集 (HA) 価を測定し、ストックした。

2) 遺伝子解析：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 は、NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs)、あるいは、Multi-segment RT-PCR により増幅後、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  $\alpha 2$ -3Gal  $\beta 1$ -4GlcNAc  $\beta 1$ -pAP- $\alpha$ -PGA、Neu5Ac  $\alpha 2$ -6Gal  $\beta 1$ -4GlcNAc  $\beta 1$ -pAP- $\alpha$ -PGA：中部大学 生命健康科学部 鈴木康夫教授

より分与)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、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/California/4/2009 (H1N1pdm09)、A/Narita/1/2009 (H1N1pdm09)は、ヒト型レセプターである  $\alpha 2, 6$  結合した糖鎖のみに結合性を示した。一方、NIBRG-14 (A/Vietnam/1194/2004: H5N1)は、鳥型レセプターである  $\alpha 2, 3$  結合した糖鎖のみに結合性を示した。この結果は、既に論文等で報告されている結果と一致し、本実験の信頼性が示された。

次に、2013 年、2014 年にヒトから分離された A (H7N9) ウイルスを用いて実験を行った。A/Anhui/1/2013 (H7N9)、A/Taiwan/1/2014 (H7N9)の 2 つのウイルスは、鳥型レセプターである  $\alpha 2, 3$  結合した糖鎖のみならず、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。

また、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

今回、解析に用いた A (H7N9) 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である Q226L (H3 numbering) を有していた。さらに、Q226L に加えてヒト型レセプターへの結合能を高める別の変異 (G186V: H3 numbering) をも有

していた。しかしながら、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た。このことは、こ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、これら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。さらに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、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

- Takashita E, Kiso M, Fujisaki S, Yokoyama M, Nakamura K, Shirakura M, Sato H, Odagiri T, Kawaoka Y, Tashiro M, and the Influenza Virus Surveillance Group of Japan., Characterization of a large cluster (outbreak) of influenza A(H1N1)pdm09 virus cross-resistant to oseltamivir and peramivir during(in) the 2013-14 influenza season in Japan., *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 59(5), 2607-17, 2015
- Aina A, Hasegawa H, Obuchi M, Odagiri T, Ujike M, Shirakura M, Nobusawa E, Tashiro M, Asanuma H, Host adaptation and the alteration of viral properties of the first influenza A/H1N1pdm09 virus isolated in Japan., *PLoS ONE*, 10(6), e0130208, 2015
- Nakamura K, Shirakura M, Suzuki Y, Naito T, Fujisaki S, Tashiro M, Nobusawa E., Development of a high-yield reassortant influenza vaccine virus derived from the A/Anhui/1/2013 (H7N9) strain., *Vaccine*, 34(3), 328-33, 2016
- Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Ohmiya S, Sato K, Ito H, Chiba F, Nishimura H, Shindo S, Watanabe S, Odagiri T; Influenza Virus Surveillance Group of Japan., Characterization of an A (H1N1)pdm09 Virus Imported from India in March 2015., *Jpn. J. Infect. Dis.*, 69(1), 83-6, 2016
- Li TC, Yang T, Yoshizaki S, Ami Y, Suzaki Y, Ishii K, Kishida N, Shirakura M, Asanuma H, Takeda N, Wakita T., Ferret Hepatitis E Virus Infection Induces Acute Hepatitis and Persistent Infection in Ferrets., *Vet. Microbiol.*, 183, 30-36, 2016
- Takayama I, Hieu NT, Shirakura M, Nakauchi M, Fujisaki S, Takahashi H, Nagata S, Long NT, Odagiri T, Tashiro M, Kageyama T., Novel Reassortant Avian Influenza A(H5N1) Virus in Human, Southern Vietnam, 2014., *Emerging Infectious Diseases.*, 22(3), 557-9, 2016
- Takayama I, Hieu NT, Shirakura M, Nakauchi M, Fujisaki S, Takahashi H, Nagata S, Long NT, Odagiri T, Tashiro M, Kageyama T., Novel Reassortant Avian Influenza A(H5N1) Virus in Human, Southern Vietnam, 2014., *Emerging Infectious Diseases.*, 22(3), 557-9, 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
- 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
  - 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
  - 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)
- ## 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, Odagiri T; The Influenza Surveillance Group of Japan. Characterizations of circulating influenza viruses in the 2014/2015 season and vaccine viruses selected for the 2015/16 season. 第63回日本ウイルス学会. 2015年11月. 福岡.
  - 高下恵美, 小川理恵, 藤崎誠一郎, 中村一哉, 白倉雅之, 岸田典子, 桑原朋子, 菅原裕美, 佐藤彩, 三浦秀佳, 秋元未来, 渡邊真治, 小田切孝人. 2014/15 シーズンにおける日本国内の抗インフルエンザ薬耐性ウイルス検出状況. 第47回日本小児感染症学会. 2015年10月. 福島.
  - Takashita E, Kiso M, Fujisaki S, Yokoyama M, Nakamura K, Shirakura M, Sato H, Odagiri T, Kawaoka Y, Tashiro M. Characterization of a Large Cluster of Influenza A(H1N1)pdm09 Virus Cross-Resistant to Oseltamivir and Peramivir during the 2013-2014 Influenza Season in Japan. 4th isirv-AVG Conference; Influenza and other Respiratory Virus Infections: Advances in Clinical Management. June 2015. Texas, USA.



- 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 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.
- 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 (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 (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 (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

## フェレット抗血清作製とウイルスリスク評価に関する研究

研究分担者 浅沼秀樹

国立感染症研究所・インフルエンザウイルス研究センター・第六室長

### 研究要旨

インフルエンザワクチン候補株および市中流行株の抗原性を試験するためのフェレット抗血清の作製を行った。また鶏卵や細胞培養を用いた継代によって生じる変異による病原性の変化ならびに防御抗体の誘導能に関する検討を行った。一方、鶏卵を用いた継代によって変異した H1N1pdm (A/Narita 株) ならびに臨床分離株の感染抗血清を作製し、抗原性試験を行った結果、分離株の抗血清は継代株の抗原性の違いを評価できたが、鶏卵継代株に対する抗血清は原株および分離株の抗原性の違いは評価できなかった。

### A. 研究目的

各国で流行するインフルエンザウイルスは、世界保健機構（WHO）の世界インフルエンザ監視対応ネットワーク（GISRS）が中心となり、発生動向監視（サベイランス）や流行予測が行われており、国立感染症研究所・インフルエンザウイルス研究センターはこのネットワークに参加し、日本国内を中心としたサベイランスを行っている。このサベイランスは定点医療機関より各地方衛生研究所に報告されたインフルエンザの遺伝子および抗原情報等を基に、国際間の流行の違いや過去の流行との相違を比較し次年度のワクチン選定やワクチンの有効性を評価している。このような流行株の抗原性解析には、フェレットの感染血清が用いられている。そのため本研究では、流行株およびワクチン株の抗原性解析のためのフェレット抗血清の作製およびその評価を行った。

また、近年のインフルエンザワクチンは鶏卵で増殖を高めるための遺伝子改変が行われているが、この過程で抗原性が変化し、ワクチンの有効性を著しく減弱させることが指摘されている。そのため本研究では鶏卵で馴化されたウイルス株を用いたフェレット抗血清を作製

し、鶏卵馴化による変異がもたらす影響について検討した。

### B. 研究方法

#### ・フェレット

日本 SLC より購入した 6～12 ヶ月齢のフェレット（メスおよびオス）を用いた。なお、本研究における動物実験については国立感染症研究所動物実験委員による審査を受け、同研究所が定める実験動物管理規定を遵守して行われた。

#### ・抗血清採取

A/Saitama/103/2014(A/Saitama;H3N2)、A/Hong Kong/4801/2014(X-263B;H3N2)、A/Yokohama/50/2015(A/Yokohama;H1N1pdm)、A/Ibaraki/N12014/2009(N14;H1N1pdm) および A/Narita/1/2009(A/NCK;H1N1pdm) と鶏卵馴化株 (A/NE15)、それぞれの株を経鼻接種 (100 もしくは 500  $\mu$ L) した。接種 2 週後、部分ないしは全採血を行い、血清を分離し抗血清として使用した。

#### ・感染防御実験

A/NE15 株を投与したフェレットは野外株で

ある N14 株をチャレンジし経時的に鼻腔洗浄液を回収し、ウイルス価を測定した。ウイルス価の測定には単層培養した MDCK 細胞を用いた寒天プラーク法により測定した。

・血球凝集阻害試験 (Hemagglutinin inhibition test; HI) および中和試験 (Neutralization test; NT)

HI および NT は WHO Global Influenza Surveillance Network の “Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza” に記載された手法に則って行った。

HI は RDE 処理した血清の 2 倍階段希釈列を 96 穴プレート上で作製後、4HA 価に調整したウイルス抗原を今後し、0.5%七面鳥もしくは 1%モルモット血球を混合し、血球凝集阻害能を観察した。NT は HI 同様、2 倍階段希釈列を 96 穴プレート上で作製後、100TCID<sub>50</sub>/50 μl 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 CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。培養後の細胞プレートをアセトン固定後、抗インフルエンザウイルス NP 抗体とペロキシダーゼ標識 2 次抗体を用いた酵素免疫抗体 (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有無を判定した。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。

(倫理面への配慮)

本研究ではヒト臨床検体由来のウイルスを用いた。ヒト臨床検体の採材ならびに使用に関しては、国立感染症研究所・倫理委員会の審査を受け行われた。

### C. 研究結果

1) A/Saitama、X-263B および A/Yokohama の抗血清作製

・A/Saitama 株: 3 頭のフェレットに A/Saitama

株を経鼻的に投与し 2 週に血清を回収した。HI 価を測定した結果、ホモ値は 320、640、320 と高い HI 価が認められた (表 1)。埼玉株はクレード 3C.2a に分類されるが、同じクレードの Hong Kong/4801 に対しても高い HI 価を示した。このことから今回作製した抗血清が抗原性の評価に使用可能であることが示唆された。

・X-263B 株: 4 頭のフェレットを用い、X-263B 株の感染 2 週目の抗血清を作製した。これら抗血清を用いた HI 試験を行った結果、4 頭すべてに 2560 以上の高いホモ値を示した (表 2)。同じクレードの Saitama 株に対する反応性はホモ値よりも 2 冠以上低いが、X-263B は HGR 株であるため、HA に変異を伴っていることがこのような反応性の低下につながったことが示唆される。今後、他の株との反応性を精査し試験血清としての適否を評価する。

・A/Yokohama 株: 4 頭のフェレットを用いて抗血清を作製した。これら抗血清を用いた HI 試験を行った結果、4 頭すべて 5120 の高いホモ値が認められた (表 3)。他の H1N1pdm 株である A/California および A/Narita に対しても 1280~5120 と一律に高い HI 価が認められたことから、試験血清として高い有用性があることが示唆される。

2) 鶏卵馴化 A/Narita 感染フェレットにおける野外株に対する感染阻止能および抗血清の反応性の検討

鶏卵馴化 A/Narita 株 (A/NE15) もしくは原株 (A/NCK) をそれぞれ 3 頭のフェレットに経鼻投与後 2 週間後に部分採血により抗血清を採取した、その 2 週後、野外株である N14 株を感染し、経時的に鼻腔洗浄液を回収し、ウイルス価を測定した。N14 株は 2009 年に国内で流行し、リファランス株の A/California/7/2009 株の類似株であることが明らかとなっている株である (結果非表示)。その結果、原株を感染させた 1/3 頭で、感染 1 日目に僅かなウイルスが検出されたのみで、他の全ての鼻腔洗浄液

でウイルスの完全な防御が認められた (図 1)。これら感染血清を用いて抗原性試験を行ったところ、馴化株および原株で免疫したすべてのフェレットで感染株の N14 に対する高い HI 抗体価が確認された。しかしその一方、N14 の抗血清で抗原性試験を行った場合には、鶏卵馴化株との抗原性の著しい乖離が認められた (表 4)。以上の結果は、A/Narita 株の場合、鶏卵で馴化した株を感染させたフェレットでは原株および原株との類似株の抗原性を高く認識できることが示唆された。

#### D. 考察

近年の H3N2 株は鶏卵での分離および増殖が困難になっており、また鶏卵で分離できた株でも変異を伴っていることが多い。一方、インフルエンザワクチンは鶏卵を用いて製造するため、遺伝子を改変し、鶏卵での増殖性を高める必要があるが、この過程で生じた変異により、ワクチンの抗原性が流行株と乖離し、効果が著しく減弱する。それに加え野外株も毎年変異を繰り返しているため、適切に流行株を評価するサベイランスの重要性が一段と増している。

現在流行株やワクチン種株の抗原性の評価にはフェレット感染血清が用いられている。しかしウイルス株や個体間で抗血清の反応性が異なるため、適切な抗血清の作製はウイルス株の抗原性を適切に評価するためには重要である。

今回評価血清として 3 株の抗血清を作製した。それぞれ 3 ないし 4 頭のフェレットを用いたが、個体間での大きな差異は認められなかった。しかし、X-263B および A/Yokohama 株の抗血清は全てのフェレットで 2560 以上の高いホモ値を示したが、A/Saitama 株の抗血清は 320~640 のホモ値であった。A/Saitama と X-263B は同じ H3N2 株の同クレードに分類されている株であり、それぞれの株に対する反応性を確認したが、A/Saitama の抗血清では X-263B の抗原性との差異は認められなかったが、

X-263B の抗血清では A/Saitama との抗原性の違いに有意性が認められた。他の NIC では CDC で 1280 のホモ値が示されているため、今後、本血清を用いた抗原性の評価が他の NIC の評価との相違に繋がることも考えられる。

このような現象は鶏卵で馴化した Narita 株を用いた検討でも認められている。A/NCK 株の抗血清で馴化株の抗原性を検討した場合、1/3 頭で 2 冠、2/3 頭で 1 冠の違いを示した。しかしながら A/NE15 株の抗血清では A/NCK 株の抗原性に相違が認められなかった。さらにこのような現象は分離株である N14 株でより顕著であった。N14 株の抗血清を用いて A/NE15 の抗原性を評価した場合には、3/3 頭全ての抗血清で 4 冠の低下を示したのに対し、A/NE15 の抗血清は 3/3 頭全ての血清が N14 との抗原性の違いを示さなかった。すでに A/NE15 株は HA の 155 および 223 番目のアミノ酸の変異が明らかとなっているため、このような変異が免疫血清の反応性に影響を与えていることが示唆される。その一方で、今回鶏卵で馴化した株の抗血清が原株や流行株と高い反応性を示したことは、必ずしも鶏卵を介することで生じる変異が流行株の感染を阻止できない訳ではないことを示唆している。実際に A/NE15 株で免疫したフェレットでは N14 株の感染を完全に阻止している。

#### E. 結論

今回作製した A/Saitama、X-263B および A/Yokohama 株に対する抗血清は、流行株およびワクチン株の抗原性の評価に高い有用性がある。また鶏卵を介した変異株は、原株に対する抗血清の反応性は低い、変異株に対する抗血清は原株との反応性が高かった。これがワクチンの効果にどのように反映されるかが今後の検討課題となった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Aina A, Hasegawa H, Obuchi M, Odagiri T, Ujike M, Shirakura M, Nobusawa E, Tashiro T, Asanuma H. Host adaptation and the alteration of viral properties of the first influenza A/H1N1pdm09 virus isolated in Japan. PLoS ONE, 2015; 10(6): e0130208.
- Asanuma H, Ohori J, McGhee JR, Fujihashi K. Past Efforts and Future Prospects for a Nasal Influenza Vaccine. Clinical Immunology, Endocrine & Metabolic Drugs, 2015; VOL.2 ISSUE:1, 13-26.
- Li TC, Yang T, Ami Y, Suzaki Y, Shirakura M, Kishida N, Asanuma H, Takeda N, Wakita T. Ferret Hepatitis E Virus Infection Induces Acute Hepatitis and Persistent Infection in Ferrets. Vet Microbiol, 2016 Feb 1;183:30-6.

## 2. 学会発表

- 原田勇一、高橋 仁、浜本いつき、浅沼秀樹、許斐奈美、小田切孝人、信澤枝里
- 季節性培養細胞インフルエンザワクチン製造開発への取り組み（製造株作製用ウイルスの分離）
- 第63回日本ウイルス学会、福岡、2015
- Ohori J, Asanuma H, Aso K, Ikeda Y, Sugita G, Fujihashi K, McGhee JR, Fujihashi K. Nasal Delivery Of Plasmid Flt3 Ligand And CpG ODN Restore Influenza Virus-Specific Secretory IgA Ab Responses
- 第44回日本免疫学会学術集会、札幌、2015
- Kayoko Sato, Hideki Asanuma, Manabu Ato. NF- $\kappa$ B activation by influenza vaccines mediates through TLR3, TLR7, and RIG-I
- 第44回日本免疫学会学術集会、札幌、2015

## 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 A/Saitama株の抗血清による抗原性試験

Test Antigen	Passage history	Saitama/103/2014			Switzerland/9715293/2013
		Egg No. NIID1	Egg No. NIID2	Egg No. NIID3	Cell No.3
A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	SIAT1/SIAT2 +SIAT1 <sup>1)</sup>	160	160	160	320
A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2)	E6(Am1A)/E1+ 1 <sup>2)</sup>	320	320	640	80
A/Hong Kong/7127/2014 (H3N2)	E6/E1+1	160	320	640	160
A/Hong Kong/7127/2014 (H3N2)	MDCK1+SIAT1	80	80	80	80
A/Saitama/103/2014 (H3N2)	NC0+3+E8 (Am4A14) <sup>3)</sup>	320	640	320	80
A/Narita/1/2009 (H1N1)pdm09	MDCK1 +2	<10	<10	<10	<10
B/PHUKET/3037/2013 Byam	MDCK2 +1	<10	<10	<10	<10
B/Texas/02/2013 Bvic	MDCK1/MDCK2+1	<10	<10	<10	<10

<sup>1)</sup> SIAT: Canine cocker spaniel kidney sialic acid over expression

<sup>2)</sup> Am: amniotic cavity

<sup>3)</sup> NC: NIID-MDCK

表2 X-263B株の抗血清による抗原性試験

Test Antigen	Passage history	Switzerland/ 9715293/13 (NIB-88)	Saitama/103 /14	HK/4801/14 (X-263B)			
		Egg No.2	SIAT No.1	Egg No.1	Egg No.2	Egg No.3	Egg No.4
	SIAT1/SIAT						
A/Switzerland/9715293/2013	2 +SIAT1*	80	80	40	80	80	40
A/Switzerland/9715293/2013	E4 +1	1280	160	160	80	160	80
A/Switzerland/9715293/2013 (NIB-88)	E5 +1	640	80	20	20	40	20
	MDCK 1						
A/Saitama/103/2014	+SIAT1	320	1280	640	320	640	640
	MDCK 1						
A/Hong Kong/4801/2014(X-263B)	+SIAT1	20	1280	2560<	2560<	2560<	2560<

\* SIAT: Canine cocker spaniel kidney sialic acid over expression

表3 A/Yokohama株の抗血清による抗原性試験

Test Antigen	Passage history	A/Yokchama/50/2015 MDCK2 +1				A/California/07/2009
		NIID No.1	NIID No.2	NIID No.3	NIID No.4	NIID No.2
A/Yokohama/50/2015	MDCK2 +1	5120	5120	5120	5120	5120
A/California/07/2009pdm	E2 +2	2560	1280	1280	1280	2560
A/California/07/2009pdm (X-179A)	Ex/E1 +2	5120	5120	5120	5120	5120
A/Narita/1/2009 (H1N1)pdm09	MDCK1 +2	5120	2560	2560	2560	5120
A/Sapporo/163/2011 (H1N1)pdm09	MDCK2 +2	80	40	40	40	80
A/Texas/50/2012 (H3N2)	MDCK1/MDCK2 +SIAT1*	<10	<10	<10	<10	<10
B/Texas/02/2013	MDCK1/MDCK2+1	40	20	40	80	40
B/PHUKET/3037/2013	MDCK2 +1	20	20	40	80	40

\* SIAT: Canine cocker spaniel kidney sialic acid over expression

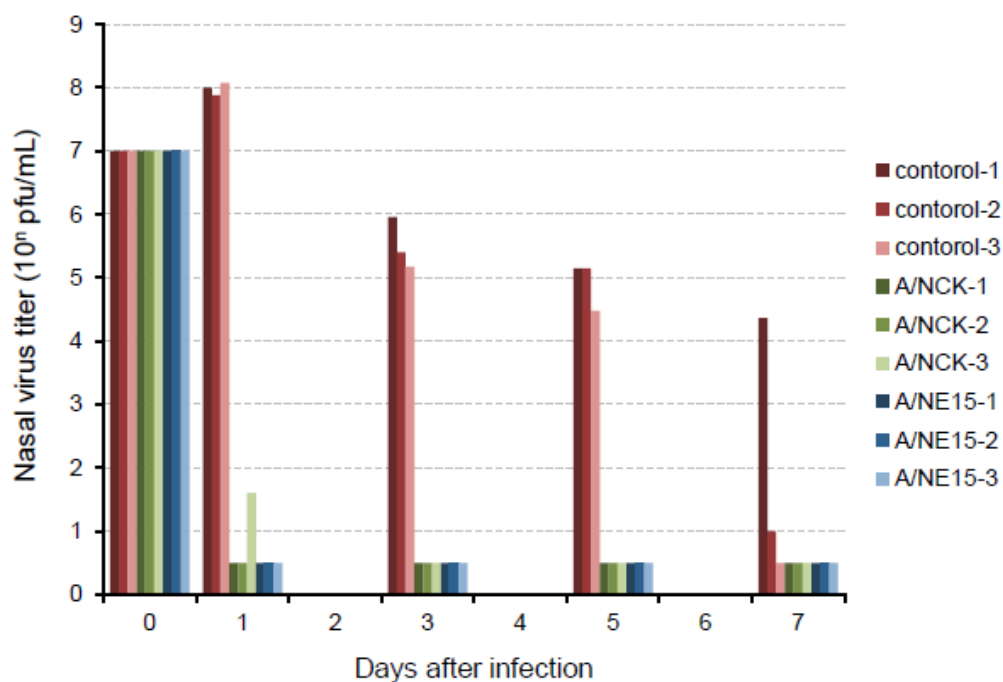


図1 鶏卵馴化株で免疫したフェレットにおける野外株に対する防御効果  
 鶏卵で馴化したA/Narita (A/NE15) もしくは原株 (A/NCK) を感染後、経時的に  
 鼻腔洗浄液を回収し、ウイルス価を測定した。

表4 鶏卵馴化フェレット抗血清による抗原性試験

Test Serum	Test antigen		
	A/NCK	A/NE15	N14
A/NCK-1	2560	640	2560
A/NCK-2	1280	640	2560
A/NCK-3	2560	1280	2560
A/NE15-1	640	640	1280
A/NE15-2	640	640	1280
A/NE15-3	1280	640	1280
N14C3-1	2560	320	5120
N14C3-2	2560	320	5120
N14C3-3	640	160	2560

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, Kiso M, Fujisaki S, Yokoyama M, Nakamura K, Shirakura M, Sato H, Odagiri T, Kawaoka Y, Tashiro M, and the Influenza Virus Surveillance Group of Japan.	Characterization of a large cluster (outbreak) of influenza A(H1N1)pdm09 virus cross-resistant to oseltamivir and peramivir during(in) the 2013-14 influenza season in Japan.	Antimicrob. Agents. Chemother.	59(5)	2607-17	2015
Takashita E, Meijer A, Lackenby A, Gubareva L, Rebelo-de-Andrade H, Besselaar T, Fry A, Gregory V, Leang SK, Huang W, Lo J, Pereyaslov D, Siqueira MM, Wang D, Mak GC, Zhang W, Daniels RS, Hurt AC, Tashiro M.	Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2013-2014.	Antiviral Res.	117	27-38	2015
Sakai K, Sekizuka T, Amiy Y, Nakajima N, Kitazawa M, Sato Y, Nakajima K, Anraku M, Kubota T, Komase K, Takehara K, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Kuroda M, Takeda M.	A Mutant H3N2 Influenza Virus Uses an Alternative Activation Mechanism in TMPRSS2 Knockout Mice by Loss of an Oligosaccharide in the Hemagglutinin Stalk Region.	J. Virology.	89(9)	5154-58	2015
Asanuma H, Ohori J, McGehee JR, Fujihashi K.	Past Efforts and Future Prospects for a Nasal Influenza Vaccine.	Clin. Immun. Endoc. & Metabolic Drugs	2(1)	13-26	2015
Shoemaker JE, Fukuyama S, Einfeld AJ, Zhao D, Kawakami E, Sakabe S, Maemura T, Gorai T, Katsura H, Muramoto Y, Watanabe S, Watanabe T, Fuji K, Matsuoka Y, Kitano H, Kawaoka Y	An ultrasensitive mechanism regulates influenza virus-induced inflammation.	PLoS Pathog.	11(6)	e1004856	2015
Ainai A, Hasegawa H, Obuchi M, Odagiri T, Ujike M, Shirakura M, Nobusawa E, Tashiro M, Asanuma H	Host adaptation and the alteration of viral properties of the first influenza A/H1N1pdm09 virus isolated in Japan.	PLoS ONE	10(6)	e0130208	2015



Tadaki Suzuki, Akira Kawaguchi, Akira Ainaia, Shin-ichi Tamura, Ryo Ito, Pretty Multihartina, Vivi Setiawaty, Krisna Nur Andriana Pangesti, Takato Odagiri, Masato Tashiro, and Hideki Hasegawa	Relationship of the quaternary structure of human secretory IgA to neutralization of influenza virus.	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.	112(25)	7809-14	2015
Bedford T, Riley S, Barr IG, Broor S, Chadha M, Cox NJ, Daniels RS, Gunasekaran CP, Hurt AC, Klesio A, Klimov A, Lewis NS, Li X, McCauley JW, Odagiri T, Potdar V, Rambaut A, Shu Y, Skepner E, Smith DJ, Suchard MA, Tashiro M, Wang D, Xu X, Lemey P, Russell CA	Global circulation patterns of seasonal influenza viruses vary with antigenic drift.	Nature	523(7559)	217-20	2015
Sriwilajaroen N, Suzuki K, Takashita E, Hiramatsu H, Kanie O, Suzuki Y.	6SLN-lipo PGA specifically catches (coats) human influenza virus and synergizes neuraminidase-targeting drugs for human influenza therapeutic potential.	J. Antimicrobial Chemotherapy.	70(10)	2797-809	2015
Fudo S, Yamamoto N, Nukaga M, Odagiri T, Tashiro M, Neya S, Hoshino T	Structural and computational study on inhibitory compounds for endonuclease activity of influenza virus polymerase.	Bioorg. Med. Chem.	23(17)	5466-75	2015
Zhao D, Fukuyama S, Yamada S, Lopes TJ, Maemura T, Katsura H, Ozawa M, Watanabe S, Neumann G, Kawaoka Y.	Molecular determinants of virulence and stability of a reporter-expressing H5N1 Influenza A virus.	J. Virology.	89(22)	11337-11346	2015
Zhao D, Fukuyama S, Sakai-Tagawa Y, Takashita E, Shoemaker JE, Kawaoka Y.	C646, a novel p300/CREB-binding protein-specific inhibitor of histone acetyltransferase, attenuates influenza A virus infection.	Antimicrob. Agents. Chemother.	60(3)	1902-6	2015
Nakamura K, Shirakura M, Suzuki Y, Naito T, Fujisaki S, Tashiro M, Nobusawa E.	Development of a high-yield reassortant influenza vaccine virus derived from the A/Anhui/1/2013 (H7N9) strain.	Vaccine	34(3)	328-33	2016

Takashita E, Fujisaki S, Shira-kura M, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Ohmiya S, Sato K, Ito H, Chiba F, Nishimura H, Shindo S, Watanabe S, Odagiri T; Influenza Virus Surveillance Group of Japan.	Characterization of an A (H1N1)pdm09 Virus Imported from India in March 2015.	Jpn. J. Infect. Dis.	69(1)	83-6	2016
Li TC, Yang T, Yoshizaki S, Ami Y, Suzaki Y, Ishii K, Kishida N, Shirakura M, Asanuma H, Takeda N, Wakita T.	Ferret Hepatitis E Virus Infection Induces Acute Hepatitis and Persistent Infection in Ferrets.	Vet. Microbiol.	183	30-36	2016
Katsura H, Fukuyama S, Watanabe S, Ozawa M, Neumann G, Kawaoka Y.	Amino acid changes in PB2 and HA affect the growth of a recombinant influenza virus expressing a fluorescent reporter protein.	Sci. Rep.	6	19933	2016
Takayama I, Hieu NT, Shirakura M, Nakauchi M, Fujisaki S, Takahashi H, Nagata S, Long NT, Odagiri T, Tashiro M, Kageyama T.	Novel Reassortant Avian Influenza A(H5N1) Virus in Human, Southern Vietnam, 2014.	Emerging Infectious Diseases.	22(3)	557-9	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, Kamino-gawa S, Okuno Y, Kurosa-ki 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

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, Kawao ka Y.	Selection of antigenically advanced variants of seasonal influenza viruses.	Nat. Microbiol.	1(6)	16058	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
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
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

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
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
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	N 37-44	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
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

Hampson A, Barr I, Cox N, Donis RO, Siddhivinaya K H, Jernigan D, Katz J, McCauley J, Motta F, Odagiri T, Tam JS, Waddell A, Webby R, Ziegler T, Zhang W	Improving the selection and development of influenza vaccine viruses - Report of a WHO informal consultation on improving influenza vaccine virus selection, Hong Kong SAR, China, 18-20 November 2015	Vaccine	35(8)	1104-09	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. Virology.	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
Wada Y, Nithichanon A, Nobusawa E, Moise L, Martin WD, Yamamoto N, Terahara K, Hagiwara H, Odagiri T, Tashiro M, Lertmomo ngkolchai 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 Other Respir 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, 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, Mae mura 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, Kawaoaka 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, Kawaoaka 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, Ainai A, Saito S, Taga Y, Oga wa-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 administration of activated influenza vaccine.	Hum Vaccin Immunother.		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)		