

厚生労働行政推進調査事業費補助金
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 31/令和元年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 長谷川秀樹
令和 2 年 (2020) 3 月

目 次

I. 総括研究報告書

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

研究代表者： 長谷川秀樹 _____ P2

II. 分担研究報告書

検体からのウイルス分離・増殖効率を改善する細胞株の探索・性状解析

渡邊真治 _____ P8

改良中和試験法を用いた A/H3N2 亜型野外流行株の抗原性解析

中村一哉 _____ P11

A(H1N1)pdm09 および B/Victoria 系統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 _____ P19

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 _____ P22

抗原変異が誘導されにくいインフルエンザワクチン株の開発

桑原朋子 _____ P24

抗インフルエンザ薬耐性株の発生動向調査ならびに監視体制の強化

高下恵美 _____ P27

成人層および高齢者層に対する 2019-20 年季節性インフルエンザワクチン接種後の抗体価反応

齋藤玲子

研究協力者 渡辺明美、長田秀和（新潟大学）、尾ヶ井マサヨ（女池南風苑・看護介護科長）

金沢宏（女池南風苑・施設長）

_____ P32

高病原性鳥インフルエンザウイルスの性状解析に関する研究

白倉雅之

協力研究者 有田知子、鈴木康司、高山郁代（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）

_____ P37

ネパールで発生した A(H5N1)ウイルスのヒト感染例の診断

高山郁代 _____ P40

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

_____ P43

I . 総括研究報告書

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

研究代表者 長谷川 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・センター長

研究要旨

本研究班は、国内および東アジア地域での新型及び季節性インフルエンザウイルス株サーベイランス体制を維持強化し、流行株の抗原性解析法の改良、ウイルス分離効率の向上、鶏卵馴化変異回避遺伝子の特定、新規薬剤に対する耐性株出現状況の把握、動物種を超えてウイルスが安定定着する遺伝的要因の解析など幅広い研究成果を行い WHO 世界インフルエンザ監視対応ネットワーク (GISRS) や国内でのインフルエンザ対策やワクチン株選定に有効活用されるよう貢献した。また、新型インフルエンザウイルスの海外発生の継続的な監視および病原体の迅速な入手と解析を継続し、ワクチン製造候補株の更新に貢献した。これにより、わが国の新型インフルエンザ対策を遅滞なく進めることができた。さらに、インフルエンザワクチンの血清学的な評価研究をおこない、ワクチンの有効性やワクチン株の適正な選定に貢献した。

A. 研究目的

- (1) 季節性および新型インフルエンザウイルス株サーベイランス体制の維持・強化。
国内においては地衛研、海外においては周辺諸国および GISRS と連携し、流行株の収集力と解析系の改良と国際標準化を促進する。
- (2) 地衛研から分与された臨床検体を用いて分離効率の改善が期待できる細胞株の検討や分離株を用いて抗原解析法の改良を試みる。
- (3) WHO インフルエンザ協力センターとしての国際貢献およびわが国のワクチン株選定への貢献をすべく研究を行い、国内および世界のインフルエンザ対策に直接的に参画し、研究から得られた成果、情報を適宜提供し、国内外のインフルエンザ対策に貢献する。

善する細胞株として、上気道咽頭由来の Detroit 562 細胞について検討してきたが本年は AH1pdm09 ウイルス、B ビクトリア系統ウイルス、B 山形系統ウイルスの増殖性を検討した。

- A(H3N2) 流行株の抗原性解析系として確立した中和試験法 Focus Reduction Assay (FRA) の改良と標準化を行った。
- 2018/19, 2019/20 シーズンに国内および海外から収集した分離株について遺伝子配列を決定し、アミノ酸解析、進化系統樹解析を実施した。
- 地衛研における薬剤耐性株検出検査の精度評価試験を実施した。
- 新潟市内の高齢者施設のスタッフと入所者に対し、研究についてのインフォームドコンセントを得たうえで、2019-2020 年シーズン HA インフルエンザワクチン(4 価)を用法に基づき皮下接種した。接種前と接種 3-4 週間後の 2 回、血清を採血した。

B. 研究方法

- A/H3N2 亜型ウイルスの分離・増殖効率を改

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

- ① サーベイランスに用いてきた MDCK 細胞の代替えとなる細胞を検索し、咽頭由来株化細胞の Detroit 562 細胞について検討し、サーベイランスに導入可能か検討した。A/H3N2 亜型ウイルスだけでなく、A/H1N1pdm09 亜型ウイルス、B 型山形系統ウイルスおよび B 型ビクトリア系統ウイルスも、同程度増殖することが明らかとなった。
- ② 最近の H3N2 亜型ウイルスのノイラミニダーゼ (NA) の 151 番目アミノ酸アスパラギン酸がグリシンや他のアミノ酸に置換 (NA D151X) することで NA によるレセプター結合能、感染能を獲得することを確認した。これは、中和試験法でのヘマグルチニン (HA) の正確な抗原性評価を妨げていることから、MN/FRA の中和反応時にオセルタミビルを添加する新手法を確立した。
- ③ 2018/19, 2019/20 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結果、A(H1N1)pdm09 ウイルス、A(H3N2) ウイルス、B 型 Victoria 系統ウイルスの遺伝子が多様化し抗原性が異なる集団も存在するため、来シーズンへ向けての流行ウイルスの監視が必要である。
- ④ 鶏卵分離埼玉株のノイラミニダーゼ(NA)蛋白を詳細に解析し、本株の NA がシアル酸レセプター結合能をもち、赤血球凝集素蛋白(HA)によらない感染様式で感染を成立させることを解明した。また、埼玉株以外の HA でも、同様の現象が見られるかどうかを明らかにするため、埼玉株以外の A(H3N2)ウイルスの HA と鶏卵分離埼玉株 NA を持つウイルスを作製し、鶏卵で継代して HA に変異が入るかどうかを検証した。その結果、鶏卵で 5 代継代後も HA に変異は入っていなかった。したがって、埼玉株 NA を持っている、埼玉株以外の HA でも、鶏卵馴化による抗原変異が起こりづらいことが示唆された。
- ⑤ 日本国内においてヒトからヒトへの感染伝播を起こしたと思われるオセルタミビル・ペラミビル耐性 A(H1N1)pdm09 ウイルスおよびパロキサビル耐性変異 A(H3N2) ウイルスを検出した。抗インフルエンザ薬耐性株は薬剤未投与患者からも検出されており、ヒトからヒトへの感染伝播の可能性が示唆された。
- ⑥ NA 遺伝子型解析の外部精度管理では、昨年度の全国 43 地衛研に加えて、今年度の 10 地衛研についても検査精度が保持されていることが確認された。
- ⑦ 2019-2020 年シーズンにおけるインフルエンザワクチンの効果は A/H1N1pdm09 を除き、成人層、高齢者層共に良好であった。今年度から A/H1N1pdm09 と A/H3N2 のワクチン株が変更となったが、A/H1N1pdm09 は抗体価上昇が低く終わった結果であった。来年度も同じ株が選択されれば抗体価は徐々に上昇していくと考えられる。一方で、A/H3N2 は新しい株に変更になったにもかかわらず、高い抗体価の上昇が認められ、免疫原性が高いことが示唆された。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。
- ⑧ 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試験の一環として、インドネシア及びネパール国において分離された株の遺伝子解析及び抗原性解析を実施した。これらの国においては、未だヒト感染

例が絶えず報告されていることから、今後も継続的なグローバルサーベイランスの実施が必要であると考えられる。

- ⑨ ネパールで1例目となるA(H5N1)ウイルスのヒト感染例が検出された背景としては、2018年12月から2019年2月にかけてインド北部の鳥の間でA(H5N1)ウイルスのアウトブレイクが発生していたことや2019年2月中旬以降にネパールの家禽や野鳥の間でこのウイルスが急速に流行していたことが挙げられる。今回、ヒト感染例から検出されたウイルスは、ネパール周辺国の鳥の間で流行し続けているクレード2.3.2.1aのウイルスで、引き続き、この地域の国々では、A(H5N1)ウイルスへの感染リスクが大きいと考えられた。

D. 考察

国内およびWHOのインフルエンザ株サーベイランスおよびワクチン候補株の検索と選定を支援するための抗原解析法の技術改良やHA、NA蛋白の変異検索など基礎的研究を進め、これらの基盤強化への貢献をした。

また、本研究班では薬剤耐性株検出検査精度の調査の調査を行い、本研究の目標達成に前進が見られた。さらに、各年度の国産ワクチンの有効性評価の一環として、免疫原性を国際基準に照らし合わせて評価した。海外ワクチンの情報（非公開）と比べて、国産ワクチンは免疫原性が低いことが示唆され、今後の国産ワクチンの改良を検討する必要があるかもしれない。

E. 結論

- ウイルス分離・増殖効率を改善する細胞株の探索を継続した。
- 前年度に確立した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）をさらに改良し正確な抗原性解析ができる系を構築した。
- ワクチン接種者のヒト血清を用いること

で、フェレット感染血清では捉えることができなかったA(H1N1)pdm09の抗原性の変化を捉えた。

- A(H1N1)pdm09ウイルス、A(H3N2)ウイルス、B型Victoria系統ウイルスの遺伝子が多様化し抗原性が異なる集団も存在するため、来シーズンへ向けての流行ウイルスの監視が必要である。
- 地衛研での薬剤耐性株検出検査精度が良好であることが確認できた。
- 2019-2020年シーズンにおけるインフルエンザワクチンの効果はA/H1N1pdm09を除き、成人層、高齢者層共に良好であった。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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ・ Imai M, Yamashita M, Sakai-Tagawa Y, Iwatsuki-Horimoto K, Kiso M, Murakami J, Yasuhara A, Takada K, Ito M, Nakajima N, Takahashi K, Lopes TJS, Dutta J, Khan Z, Kriti D, van Bakel H, Tokita A, Hagiwara H, Izumida N, Kuroki H, Nishino T, Wada N, Koga M, Adachi E, Jubishi D, [Hasegawa H](#), Kawaoka Y. Influenza A variants with reduced susceptibility to baloxavir isolated from Japanese patients are fit and transmit through respiratory droplets. *Nat Microbiol.* 2020 Jan;5(1):27-33.
- ・ Feng H, Nakajima N, Wu L, Yamashita M, Lopes TJS, Tsuji M, [Hasegawa H](#), Watanabe T, Kawaoka Y. A Glycolipid Adjuvant, 7DW8-5, Enhances the Protective Immune Response to the Current Split Influenza Vaccine in Mice. *Front Microbiol.* 2019 Sep 18; 10:2157. doi: 10.3389/fmicb.2019.02157

- Adachi Y, Tonouchi K, Nithichanon A, Kuraoka M, Watanabe A, Shinnakasu R, Asanuma H, Ainai A, Ohmi Y, Yamamoto T, Ishii KJ, Hasegawa H, Takeyama H, Lertmemongkolchai G, Kurosaki T, Ato M, Kelsoe G, Takahashi Y. Exposure of an occluded hemagglutinin epitope drives selection of a class of cross-protective influenza antibodies. *Nat Commun.* 2019 Aug 28;10(1):3883.
doi:10.1038/s41467-019-11821-6
 - Takashita E, Ichikawa M, Morita H, Ogawa R, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Sugawara H, Sato A, Akimoto M, Mitamura K, Abe T, Yamazaki M, Watanabe S, Hasegawa H, Odagiri T. Human-to-Human Transmission of Influenza A(H3N2) Virus with Reduced Susceptibility to Baloxavir, Japan, February 2019. *Emerg Infect Dis.* 2019, 11, 25(11), 2108-2111
 - Ainai A, van Riet E, Ito R, Ikeda K, Senchi K, Suzuki T, Tamura SI, Asanuma H, Odagiri T, Tashiro M, Kurata T, Multihartina P, Setiawaty V, Pangesti KNA, Hasegawa H. Human immune responses elicited by an intranasal inactivated H5 influenza vaccine. *Microbiol Immunol.* 2020 Jan 20.
doi: 10.1111/1348-0421.12775.
 - 高下恵美、森田博子、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、長谷川秀樹、市川正孝、三田村敬子、安倍隆、山崎雅彦 全国地方衛生研究所. バロキサビル耐性変異ウイルスのヒトからヒトへの感染伝播 *IASR vol.40* , 197-199
2. 学会発表
- Nakamura K, Akimoto M, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Kishida N, Sato A, Kuwahara T, Takashita E, Hasegawa H, Odagiri T, Watanabe S. Improved accuracy of antigenic characterization of recent influenza A/H3N2 isolates by modified focus reduction assay. *Options X for the control of influenza.* (Singapore) 2019. 8.
 - 高下恵美、藤崎誠一郎、白倉雅之、中村一哉、岸田典子、桑原朋子、三田村敬子、安倍隆、市川正孝、山崎雅彦、渡邊真治、小田切孝人、長谷川秀樹 : 2018/2019 シーズンにおける新規抗インフルエンザ薬バロキサビル耐性変異ウイルスの検出状況 第 51 回日本小児感染症学会学術集会 2019 年 10 月
 - 高下恵美、藤崎誠一郎、白倉雅之、中村一哉、岸田典子、桑原朋子、三田村敬子、安倍隆、市川正孝、山崎雅彦、渡邊真治、小田切孝人、長谷川秀樹、2018/2019 シーズンにおける新規抗インフルエンザ薬バロキサビル耐性変異ウイルスの検出状況、第 51 回日本小児感染症学会、旭川
 - Watanabe S, Nakamura K, Kishida N, Fujisaki S, Shirakura M, Takashita E, Kuwahara T, Sato A, Akimoto M, Miura H, Ogawa R, Morita H, Sugawara H, Odagiri T, Hasegawa H, The Influenza Surveillance Group of Japan. Characterizations of circulating influenza viruses in the 2018/19 season and selection of vaccine viruses for the 2019/20 season. 第 67 回日本ウイルス学会学術集会 2019 年 10 月
 - Takashita E, Morita H, Ogawa R, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Sugawara H, Sato A, Akimoto M, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamasaki M, Watanabe S, Odagiri T, Hasegawa H, The Influenza Surveillance Group of Japan.

Human-to-human transmission of influenza A(H3N2) viruses exhibiting reduced susceptibility to baloxavir due to a PA I38T substitution in Japan. 第 67 回日本ウイルス学会学術集会 2019 年 10 月

- Nakamura K, Akimoto M, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Kishida N, Sato A, Kuwahara T, Takashita E, Hasegawa H, Odagiri T, Watanabe S. Improved accuracy of antigenic characterization of recent influenza A/H3N2 isolates by modified focus reduction assay. 第 67 回日本ウイルス学会学術集会 2019 年 10 月
- 高下恵美、森田博子、永田志保、藤崎誠一郎、白倉雅之、中村一哉、岸田典子、桑原朋子、渡邊真治、長谷川秀樹、2018-19 シーズンにおける バロキサビル耐性変異ウイルスの検出状況、9th Negative Strand Virus-Japan、2020 年 1 月、沖縄

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

II. 分担研究報告書

検体からのウイルス分離・増殖効率を改善する細胞株の探索・性状解析

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

ヒト咽頭由来株化細胞 Detroit562 細胞での季節性インフルエンザウイルス (A/H1N1pdm09 亜型、A/H3N2 亜型、B 型山形系統および B 型ビクトリア系統) の増殖性を調べた。その結果、いずれのウイルスも増殖することが明らかとなったが、その効率は従来使用されているイヌ腎由来株化細胞 [Madin-Darby Canin Kidney (MDCK) 細胞] (hCK 細胞) よりも低かった。

A. 研究目的

流行期ごとの季節性インフルエンザウイルスの性状 (抗原性や抗ウイルス薬感受性) を理解することは、適切なワクチン株を選定する、あるいは抗ウイルス薬耐性株の出現・拡がりに対する対策を施す上で、大変重要である。そのためには、流行期の患者臨床検体からのインフルエンザウイルス分離が必須となる。インフルエンザウイルスの分離にはイヌ腎由来株化細胞 [Madin-Darby Canin Kidney (MDCK) 細胞] が長く慣習的に使用されている。しかしながら近年、特に季節性ウイルスのひとつである A/H3N2 亜型ウイルスについて、MDCK 細胞を用いての分離・増殖効率の低下傾向が報告されてきており、野外流行株の分離捕捉率の低下、またこれによる流行株性状の正確な把握が妨げられることが懸念されている。そこで、季節性インフルエンザウイルス全般の分離・増殖効率の改善を見込める細胞株を探索・樹立し、その細胞株をインフルエンザ流行株分離用基材として地方衛生研究所に配布、活用してもらうことでインフルエンザウイルス株サーベイランスへ貢献することを目的とした。

B. 研究方法

現在感染研では、MDCK および MDCK-SIAT1

(SIAT1) 細胞あるいは hCK 細胞 (季節性インフルエンザウイルスのレセプターを多く発現している細胞) をウイルスの分離・増殖に使用しており、一定の効果を上げている。しかしながら、特に SIAT1 細胞および hCK 細胞は培養維持費が高額である点で、地衛研での恒常的な使用については難しい面がある。また 1 種類の細胞でウイルス分離出来る方が、地衛研での細胞の維持の点からも望ましい。そのため筆者はヒト呼吸器系由来株化細胞である上気道咽頭由来の Detroit 562 細胞に着目している。これまで A/H3N2 亜型ウイルスについて増殖性を検討したが、今回 A/H1N1pdm09 亜型および B 型ウイルスの増殖性について検討した。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

A/H3N2 亜型ウイルスだけでなく、A/H1N1pdm09 亜型ウイルス、B 型山形系統ウイルスおよび B 型ビクトリア系統ウイルスも、同程度増殖することが明らかとなった。しかし残念ながら、MDCK 細胞由来の hCK 細胞と比較すると、増殖性は低いことが明らかとなった。

D. 考察

Detroit 562 細胞でも季節性インフルエンザウイルスは増殖することが明らかとなったが、従来使用されている hCK (MDCK 細胞由来) 細胞より増殖性は低かった。しかし、検体からの分離効率や分離されたウイルスの塩基配列への変異誘導効率などはまだ不明なため、今後検討する予定である。

E. 結論

ヒト咽頭由来株化細胞 Detroit562 細胞において、季節性インフルエンザウイルス (A/H1N1pdm09 亜型、A/H3N2 亜型、B 型山形系統および B 型ビクトリア系統) は増殖することが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- M. Ujie, K. Takada, M. Kiso, Y. Sakai-Tagawa, M. Ito, K. Nakamura, S. Watanabe, M. Imai, Y. Kawaoka Long-term culture of human lung adenocarcinoma A549 cells enhances the replication of human influenza A viruses. *Journal of General Virology*. 2019 10, 100(10), 1345-1349
- Takashita E, Ichikawa M, Morita H, Ogawa R, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Sugawara H, Sato A, Akimoto M, Mitamura K, Abe T, Yamazaki M, Watanabe S, Hasegawa H, Odagiri T. Human-to-Human Transmission of Influenza A(H3N2) Virus with Reduced Susceptibility to Baloxavir, Japan, February 2019. *Emerg Infect Dis*. 2019 11, 25(11), 2108-2111
- Nakauchi M, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Ogawa R, Morita H, Miura H, Saito S, Watanabe S, Odagiri T,

Kageyama T. Rapid detection of an I38T amino acid substitution in influenza polymerase acidic subunit associated with reduced susceptibility to baloxavir marboxil. *Influenza Other Respir Viruses*. 2020 2 doi: 10.1111/irv.12728

- Kyaw Win SM, Saito R, Win NC, Lasham DJ, Kyaw Y, Lin N, Thein KN, Chon I, Odagiri T, Thein W, Kyaw LL, Tin OS, Saitoh A, Tamura T, Hirokawa C, Uchida Y, Saito T, Watanabe S, Odagiri T, Kamata K, Osada H, Dapat C, Watanabe H, Tin HH. Epidemic of influenza A(H1N1) pdm09 analyzed by full genome sequences and the first case of oseltamivir-resistant strain in Myanmar 2017. *PLoS One*. 2020 3, 15(3), e0229601. doi: 10.1371/journal.pone.0229601
- 2. 学会発表
 - Watanabe S, Nakamura K, Kishida N, Fujisaki S, Shirakura M, Takashita E, Kuwahara T, Sato A, Akimoto M, Miura H, Ogawa R, Morita H, Sugawara H, Odagiri T, Hasegawa H, The Influenza Surveillance Group of Japan. Characterizations of circulating influenza viruses in the 2018/19 season and selection of vaccine viruses for the 2019/20 season. 第 67 回日本ウイルス学会学術集会 2019 年 10 月
 - Takashita E, Morita H, Ogawa R, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Sugawara H, Sato A, Akimoto M, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamasaki M, Watanabe S, Odagiri T,

Hasegawa H, The Influenza Surveillance Group of Japan. Human-to-human transmission of influenza A(H3N2) viruses exhibiting reduced susceptibility to baloxavir due to a PA I38T substitution in Japan. 第 67 回日本ウイルス学会学術集会 2019 年 10 月

- Nakamura K, Akimoto M, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Kishida N, Sato A, Kuwahara T, Takashita E, Hasegawa H, Odagiri T, Watanabe S. Improved accuracy of antigenic characterization of recent influenza A/H3N2 isolates by modified focus reduction assay. 第 67 回日本ウイルス学会学術集会 2019 年 10 月
- Nakauchi M, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Saito S, Takayama I, Watanabe S, Odagiri T, Kageyama T. Rapid detection of an I38T amino acid substitution in influenza polymerase acidic subunit associated with reduced susceptibility to baloxavir marboxil. 第 67 回日本ウイルス学会学術集会 2019 年 10 月

改良中和試験法を用いた A/H3N2 亜型野外流行株の抗原性解析

研究分担者 中村一哉

国立感染症研究所・インフルエンザウイルス研究センター・主任研究官

研究要旨

有効性の高いインフルエンザワクチンの製造、供給には流行株の性状を正確に捉え、流行株の抗原性に一致したウイルス株をワクチン製造用株として選定することが肝要であるが、近年の A/H3N2 亜型野外流行株は赤血球凝集活性が極めて弱く、赤血球凝集阻止（HI）試験による抗原性解析が行えない状況にある。昨年度までに改良中和試験法であるウイルス感染細胞巣減数試験法（Microneutralizing/Focus Reduction Assay, MN/FRA）を HI 試験代替手法として樹立、A/H3N2 亜型分離株抗原性解析業務に実践導入した。本研究では、抗原性解析試験の精度向上ならびに野外流行株抗原性状の正確な捕捉に資することを目的に、今期間の A/H3N2 亜型分離株について、上述 MN/FRA による抗原性解析試験を実施し、当該抗原性解析手法の高い精度や信頼性を示した。

A. 研究目的

インフルエンザウイルスはその性状を変化させ続け、毎時期のワクチン戦略に常に懸案をもたらす。インフルエンザ流行株の性状を時期に即して正確に捕捉することはインフルエンザ感染制御戦略において基本的かつ肝要な事項である。特に流行株の抗原性を解析し、これ

改良変法であるウイルス感染細胞巣減数試験法

（Microneutralizing/Focus Reduction Assay, MN/FRA）を代替手法として H3N2 亜型分離株の抗原性解析を実施している。本研究は、今期 A/H3N2 亜型分離株抗原性解析において MN/FRA を実践実施し、MN/FRA での抗原性解析試験精度の維持・向上およびインフルエンザウイルス A/H3N2 亜型野外流行株の抗原性状の正確な捕捉に寄与することを目的とする。

B. 研究方法

に合致したウイルス株をワクチン製造に供することを目的にウイルス株サーベイランスが国内外の連携の下精力的に行われている。2014 年春期以降 HA による赤血球凝集活性が極めて低く、HI 試験を用いた抗原性解析に供試できない H3N2 亜型株が急速に分布を広げたことを受け、近年では中和試験法およびその

1) 細胞株

インフルエンザウイルスの受容体を人為的に強発現させた細胞株である MDCK-SIAT1 細胞（SIAT1）はロンドン WHO 協力センターから提供を受けた。SIAT1 の維持は、5%FCS と抗生物質を添加した D-MEM 培地を用いた静置培養にて、標準手順書に記載の手法に従って行った。

2) 供試ウイルス株

2018/2019 および 2019/2020 シーズンに WHO 協力センターから分与された参照株、全国地方衛生研究所（地衛研）においてインフルエンザ患者の検体から分離された後、当センターに分

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

3) ウイルス分離・継代

SIAT1 細胞を 25 cm²細胞培養用フラスコに播種し、単層形成後に分与ウイルス株を D-MEM 培地で 1000 倍に希釈したもの、あるいは臨床検体原液を 0.5ml 接種した。ウイルス接種後の培養維持には血清不含、3 μg/ml アセチル化トリプシン添加の D-MEM 培地を使用し、34°C、5% CO₂ の恒温条件下で 72 時間静置培養した。接種 72 時間後に培養液を回収遠心し、得られたウイルス液を供試材料とした。

4) ウイルス感染力価測定 (Focus assay)

各供試株について、200nM 濃度オセルタミビルを添加した希釈用培地を用いて 10^{0.5} 倍階段希釈列を作製し、前日に SIAT1 細胞を 2.5×10⁴/ウェル播種、一晚培養した 96 穴プレートの各ウェルに添加した。1 時間の吸着反応後、半流動体ゲル Avicel®を各ウェルに添加した。34°C の CO₂ インキュベーター内で 18-20 時間静置培養後、被験プレートを固定、細胞透過処理後、抗インフルエンザウイルス NP 抗体とペロキシダーゼ標識 2 次抗体を用いた酵素免疫抗体法により、ウイルス感染細胞巣 (focus) を呈色させ、形成 focus を ImmunoSpot アナライザー (CTL 社) を用いて自動計数した。各ウェルの focus 数およびそのウェルの希釈倍数に基づいてウイルス感染力価 (Focus forming unit, FFU) を算出した。

5) MN/FRA

200nM 濃度オセルタミビルを添加した希釈用培地を用いて参照血清の 2 倍階段希釈列を作製し、前日に SIAT1 細胞を 2.5×10⁴/ウェル播種、一晚培養した 96 穴プレートの各ウェルに添加した。これに一定量のウイルス液を加え、1 時間の中和反応後、半流動体ゲル Avicel®を各ウェルに添加した。34°C の CO₂ インキュベ

ター内 18-20 時間静置培養後、被験プレートを固定、細胞透過処理を行い、上述 4) の記載に準じて、酵素免疫抗体法で呈色させた形成 focus を ImmunoSpot アナライザー (CTL 社) を用いて自動計数した。中和抗体価は focus 形成数の有意な減数が観察された血清希釈倍数に基づいて算定した。

(倫理面への配慮)

本研究においては、鼻腔スワブ等の臨床検体を用いることに際し、国立感染症研究所倫理審査委員会の審査を経て承認を受けた。供試検体は匿名処理を行い、検体提供者特定および個人情報流出の防止に配慮している。また、フェレット血清作製にかかる動物実験倫理に関しては、国立感染症研究所動物実験委員会の審査を経て承認を受けた。

C. 研究結果

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

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

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

表 1 MN/FRA による A/H3N2 亜型分離株抗原性解析結果の一例

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

斜体数字：参照抗血清相対力価

*抗原部位内アミノ酸

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

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

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

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

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

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

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

D. 考察

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

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

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

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

2019年9月～2020年1月期分離株の抗原性解析結果

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

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

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

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

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

本研究によって実際の分離株抗原性解析業務における MN/FRA の有用性や高い信頼性が示された。当該業務の今後の成果拡大も見込まれる。常に変異を続けその性状を変化させるインフルエンザウイルスは、既存の手法ではその性状解析が正確に行えない事態が生じることとも推定される。このような事態による分離株サーベイランスの破綻は極力回避しなければならないものであり、有事に際しての代替手段の検討、導入が速やかに実施出来るような情報の収集、実験技術面の修練は今後も持続的に望まれるものである。

E. 結論

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

F. 研究発表

1. 論文発表

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

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

- 2) E. Takashita, M. Ichikawa, H. Morita, R. Ogawa, S. Fujisaki, M. Shirakura, H. Miura, K. Nakamura, N. Kishida, T. Kuwahara, H. Sugawara, A. Sato, M. Akimoto, K. Mitamura, T. Abe, M. Yamazaki, S. Watanabe, H. Hasegawa, T. Odagiri. Human-to-Human Transmission of Influenza A(H3N2) Virus with Reduced Susceptibility to Baloxavir, Japan, February 2019. *Emerging Infectious Diseases*. 2019 Nov;25(11):2108-2111. doi:10.3201/eid2511.190757.
- 3) M. Ujie, K. Takada, M. Kiso, Y. Sakai-Tagawa, M. Ito, K. Nakamura, S. Watanabe, M. Imai, Y. Kawaoka. Long-term culture of human lung adenocarcinoma A549 cells enhances the replication of human influenza A viruses. *Journal of General Virology*. 2019 Oct;100(10):1345-1349. doi:10.1099/jgv.0.001314.

2. 学会発表

- 1) Kazuya Nakamura, Miki Akimoto, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Hideka Miura, Noriko Kishida, Aya Sato, Tomoko Kuwahara, Emi Takashita, Hideki Hasegawa, Takato Odagiri and Shinji Watanabe. Improved accuracy of antigenic characterization of recent influenza A/H3N2 isolates by modified focus reduction assay. 第 67 回日本ウイルス学会学術集会 2019 年 10 月
- 2) Shinji Watanabe, Kazuya Nakamura, Noriko Kishida, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Emi Takashita, Tomoko Kuwahara, Aya Sato, Miki Akimoto, Hideka Miura, Rie Ogawa, Hiroko Morita, Hiromi Sugawara, Takato Odagiri, Hideki Hasegawa, The

- Influenza Surveillance Group of Japan. Characterizations of circulating influenza viruses in the 2018/19 season and selection of vaccine viruses for the 2019/20 season. 第 67 回日本ウイルス学会学術集会 2019 年 10 月
- 3) Emi Takashita, Hiroko Morita, Rie Ogawa, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Hideka Miura, Kazuya Nakamura, Noriko Kishida, Tomoko Kuwahara, Hiromi Sugawara, Aya Sato, Miki Akimoto, Keiko Mitamura, Takashi Abe, Masataka Ichikawa, Masahiko Yamazaki, Shinji Watanabe, Takato Odagiri, Hideki Hasegawa, The Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Human-to-human transmission of influenza A(H3N2) viruses exhibiting reduced susceptibility to baloxavir due to a PA I38T substitution in Japan. 第 67 回日本ウイルス学会学術集会 2019 年 10 月
- 4) 高下恵美、藤崎誠一郎、白倉雅之、中村一哉、岸田典子、桑原朋子、三田村敬子、安倍隆、市川正孝、山崎雅彦、渡邊真治、小田切孝人、長谷川秀樹：2018/2019 シーズンにおける新規抗インフルエンザ薬バロキサビル耐性変異ウイルスの検出状況 第 51 回日本小児感染症学会学術集会 2019 年 10 月
- 5) Kazuya Nakamura, Miki Akimoto, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Hideka Miura, Noriko Kishida, Aya Sato, Tomoko Kuwahara, Emi Takashita, Hideki Hasegawa, Takato Odagiri and Shinji Watanabe. Improved accuracy of antigenic characterization of recent influenza A/H3N2 isolates by modified focus reduction assay. Options for the Control of Influenza X (Singapore), Aug/2019
- 6) Michiko Ujie, Masaki Imai, Kazuya Nakamura, Shinji Watanabe, Yoshihiro Kawaoka. Long-term Cultured Human Lung Adenocarcinoma A549 Cells Show Enhanced Susceptibility to Human Influenza A Viruses. Options for the Control of Influenza X (Singapore), Aug/2019
- 7) Tomoko Kuwahara, Emi Takashita, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Kazuya Nakamura, Noriko Kishida^a, Hitoshi Takahashi^a, Kayoko Sato^a, Shinji Watanabe^a and Takato Odagiri^a Biological significance of neuraminidase of egg-adapted influenza A(H3N2) virus without amino acid substitutions in the antigenic sites of its hemagglutinin. Options for the Control of Influenza X (Singapore), Aug/2019
- 8) Noriko Kishida, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Hitoshi Takahashi, Hideki Asanuma, Kazuya Nakamura, Reiko Saito, Takato Odagiri, Shinji Watanabe. Characterization of influenza A(H1N1)pdm09 variants selected with human antisera collected in the 2017/18 season. Options for the Control of Influenza X (Singapore), Aug/2019
- 9) Chiharu Kawakami, Seiya Yamayoshi, Miki Akimoto, Kazuya Nakamura, Hideka Miura, Seiichiro Fujisaki, David J. Pattinson, Kohei Shimizu, Hiroki Ozawa, Tomoko Momoki, Miwako Saikusa, Atsuhiko Yasuhara, Shuzo Usuku, Ichiro Okubo, Takahiro Toyozawa, Shigeo Sugita, Derek J. Smith, Shinji Watanabe, Yoshihiro Kawaoka. Genetic and antigenic characterisation of influenza A(H3N2) viruses isolated in yokohama during the 2016/17 and 2017/18 influenza seasons. Options for the Control of Influenza X (Singapore), Aug/2019
- 10) Emi Takashita, Rie Ogawa, Hiroko Morita,

Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura,
Hideka Miura, Kazuya Nakamura, Noriko
Kishida, Tomoko Kuwahara, Hiromi Sugawara,
Aya Sato, Miki Akimoto, Keiko Mitamura,
Takashi Abe, Masataka Ichikawa, Masahiko
Yamazaki, Shinji Watanabe, Takato Odagiri,
The Influenza Virus Surveillance Group of
Japan. Human-to-human transmission of
influenza A(H3N2) viruses exhibiting
reduced susceptibility to baloxavir due to
a pa i38t substitution in japan. Options
for the Control of Influenza X (Singapore),
Aug/2019

A(H1N1)pdm09 および B/Victoria 系統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 および B/Victoria 系統の 2020/21 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、2019/20 シーズンに国内および海外（韓国、台湾、ネパール、ミャンマー、モンゴル、ラオス）から収集した A(H1N1)pdm09 および B/Victoria 系統分離株の抗原性解析をフェレット感染血清と 2019/20 シーズンインフルエンザワクチン接種者血清を用いて赤血球凝集阻止試験により実施した。解析結果から、A(H1N1)pdm09 および B/Victoria 系統のいずれも、野外分離株は 2019/20 シーズンワクチン株とは抗原性が異なることがわかった。WHO は、A(H1N1)pdm09 については、183P-5A のグループで HA に 187A と 189E のアミノ酸を持つ A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019(H1N1)pdm09 類似株を、B/Victoria 系統については、HA に 3 アミノ酸欠損 (162-164) と 136E と 133R を持つ B/Washington/02/2019 類似株を北半球の 2020/2021 シーズン Egg-based Vaccine 推奨株とした。

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

2019 年 9 月から 2020 年 2 月までの A(H1N1)pdm09 と B 型の分離株または臨床検体を国内と海外（韓国、台湾、ネパール、ミャンマー、モンゴル、ラオス）から収集し、フェレット感染血清をもちいた HI 試験による抗原性解析を行った。さらに 2019/20 シーズンの国内ワクチン接種者血清と流行株との反応性を HI 試験により調べた。国内株については、全国の地方衛生研究所から分離株、関東圏の病院から臨床検体の提供を受けた。

C. 研究結果

A(H1N1)pdm09 : 2019/20 シーズンの分離株は HA に 183P、129D、185I と 260D のアミノ酸を持つグループ 183P-5A が主流であった。2019/20 シーズンのワクチン製造株である高増殖性 A/Brisbane/02/2018 (IVR-190)(H1N1)pdm09 およびそのオリジナル株である A/Brisbane/02/2018 の

フェレット感染血清との反応性をみると、2019/20 シーズン分離株はいずれの血清ともよく反応し、9 割以上がワクチン類似株であった（図 1）。しかしながら、国内のワクチン接種者血清を用いた解析では、成人層と高齢者層血清ともにワクチン製造株 (IVR-190) に対する反応性に比べると、S183P-5A 及び 5B を持つ分離株に対して反応性が GMT で 2 倍程度低下した。

2019/20 シーズンの B 型インフルエンザの流行規模は前シーズンと同様に極めて小さかった。系統の割合は Victoria 系統が 99.4%、Yamagata 系統が 0.6%であった。

B/Victoria 系統 : 2020 年 4 月 20 日時点で、解析した 2019/20 シーズン分離株は全て、3 アミノ酸欠損株であった。2019/20 シーズンワクチン株 (B/Colorado/06/2017 類似、2 アミノ酸欠損) の細胞分離株で作製したフェレット血清に対する反応性の低下は 3 割の分離株で認められたが、ワクチン製造株で作製したフェレット血清に対しては反応性の低下を示した分離株は 9 割以上だった。2019/20 シーズンワクチン株 (B/Colorado/06/2017 類似、2 アミノ酸欠損) を接種したワクチン接種者血清は、B/Colorado/06/2017 卵分離株との反応性に比べると、3 アミノ酸欠損の野外分離株とは GMT で 4 倍程度反応性が低下していた。分離報告数がほとんどなかったため、B/Yamagata 系統分離株の抗原性解析データはない。

以上の結果は WHO の 2020/2021 北半球ワクチン選定会議に情報提供された。

D. 考察

A(H1N1)pdm09 : 2019/20 シーズン分離株はワクチン株のフェレット感染血清とよく反応したが、流行株とワクチン接種者血清との反応性をみると、ワクチン製造株と野外分離株で反応性が異なった。これには卵馴化の過程で生じた HA のレセプター結合部位に近接する Q223R のアミノ酸置換が抗原性に大きな影響を及ぼしていると考えられた。また、フェレット血清とワクチン接種者血清でワクチン株と野外分離株の抗原性の差は明らかにできなかったが、ほとんどの野外分離株が HA に持つアミノ酸置換 D187A、Q189E は抗原部位にあり、これらのアミノ酸置換はワクチン株との抗原性の違いに影響を及ぼす可能性がある。実際に海外からの報告では D187A と Q189E のアミノ酸置換を持つ株とこれらの置換を持たないワクチン株の抗原性の違いがワクチン接種者血清を用いた抗原性解析で報告されている。

B/Victoria 系統 : フェレット感染血清とワクチン接種者血清を用いた解析の両方で、2019/20 シーズンのワクチン株 (B/Colorado/06/2017 類似、2 アミノ酸欠損) と野外分離株の反応性が異なることが示された。これは、ワクチン株が 2 アミノ酸欠損株であるのに対して、実際の流行株は抗原性の異なる 3 アミノ酸欠損株だったことによる。以上から、A(H1N1)pdm09 及び B/Victoria 系統のいずれもワクチン効果の減弱が危惧された。

E. 結論

WHO は、A(H1N1)pdm09 については、183P-5A のグループで 187A と 189E のアミノ酸を持つ A/Guangdon-Maonan/SWL1536/2019(H1N1)pdm09 類似株を、B/Victoria 系統については、HA に 3 アミノ酸欠損 (162-164) と 136E と 133R を持つ B/Washington/02/2019 類似株を北半球の 2020/2021 シーズン Egg-based Vaccine 推奨株とした。

F. 研究発表

1. 論文発表

Takashita E, Ichikawa M, Morita H, Ogawa R, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Sugawara H, Sato A, Akimoto M, Mitamura K, Abe T, Yamazaki M, Watanabe S, Hasegawa H, Odagiri T. Human-to-Human Transmission of Influenza A(H3N2) Virus with Reduced Susceptibility to Baloxavir, Japan, February 2019. *Emerg Infect Dis.* 2019, 11, 25(11), 2108-2111

2. 学会発表

- Kishida N, Fujisaki S, Shirakura M, Takahashi H, Asanuma H, Nakamura K, Konomi N, Saito R, Odagiri T, Watanabe S. CHARACTERIZATION OF INFLUENZA A (H1N1) PDM09 VARIANTS SELECTED WITH HUMAN ANTISERA COLLECTED IN THE 2017/18 SEASON Options X for The Control of Influenza Singapore Aug. 28-Sep. 1 2019.
- Kazuya Nakamura, Miki Akimoto, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Hideka Miura, Noriko Kishida, Aya Sato, Tomoko Kuwahara, Emi Takashita, Hideki Hasegawa, Takato Odagiri and Shinji Watanabe Improved accuracy of antigenic characterization of recent influenza A/H3N2 isolates by modified focus reduction assay Options X for The Control of Influenza Singapore Aug. 28-Sep. 1 2019
- Tomoko Kuwahara, Emi Takashita, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Kazuya Nakamura, Noriko Kishida, Hitoshi Takahashi, Kayoko Sato, Shinji Watanabe and Takato Odagiri Biological significance of neuraminidase of egg-adapted influenza A(H3N2) virus without amino acid substitutions in the antigenic sites of its hemagglutinin Options X for The Control of Influenza Singapore Aug. 28-Sep. 1 2019.
- Emi Takashita, Rie Ogawa, Hiroko Morita, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Hideka Miura, Kazuya Nakamura, Noriko Kishida, Tomoko Kuwahara, Hiromi Sugawara, Aya Sato, Miki Akimoto, Keiko Mitamura, Takashi Abec, Masataka Ichikawa, Masahiko Yamazaki, Shinji Watanabe, Takato Odagiri*, The Influenza Virus Surveillance Group of Japan Human-to-human transmission of influenza A(H3N2) viruses exhibiting reduced susceptibility to baloxavir due to a PA I38T substitution in Japan Options X for The Control of Influenza Singapore Aug. 28-Sep. 1 2019
- 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, Morita H, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Odagiri T, Characterizations of circulating influenza viruses in the 2018/19 season and selection of vaccine viruses for the 2019/20 season The Influenza Surveillance Group of Japan 第67回日本ウイルス学会. 東京 2019年10月

- Kazuya Nakamura, Miki Akimoto, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Hideka Miura, Noriko Kishida, Aya Sato, Tomoko Kuwahara, Emi Takashita, Hideki Hasegawa, Takato Odagiri and Shinji Watanabe Improved accuracy of antigenic characterization of recent influenza A/H3N2 isolates by modified focus reduction assay 第67回日本ウイルス学会. 東京 2019年10月
- Emi Takashita, Hiroko Morita, Rie Ogawa, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Hideka Miura, Kazuya Nakamura, Noriko Kishida, Tomoko Kuwahara, Hiromi Sugawara, Aya Sato, Miki Akimoto, Keiko Mitamura, Takashi Abe, Masataka Ichikawa, Masahiko Yamazaki, Shinji Watanabe, Takato Odagiri, Hideki Hasegawa, The Influenza Virus Surveillance Group of Japan Human-to-human transmission of influenza A(H3N2) viruses exhibiting reduced susceptibility to baloxavir due to a PA I38T substitution in Japan 第67回日本ウイルス学会. 東京 2019年10月

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

2018/19, 2019/20 シーズンのインフルエンザウイルス分離株について遺伝子解析を実施した。A(H1N1)pdm09 ウイルスは全て 6B.1A クレード内の 183P-5 サブクレードに属した。A(H3N2)ウイルスはほとんどがクレード 3C.2a1 に属し、更に複数の集団に分岐した。B 型では、Yamagata 系統はクレード 3 が流行し、Victoria 系統はクレード 1A.3 が主流であった。A(H1N1)pdm09、A(H3N2)、B Victoria 系統ウイルスの遺伝子が多様化し一部は抗原性部位を含むことから、引き続きウイルス伝播の動向に注意が必要である。

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

2018/19, 2019/20 シーズンに国内および海外（ラオス、台湾、モンゴル、韓国、ミャンマー、ネパール）から収集した分離株について遺伝子配列を決定し、アミノ酸解析、進化系統樹解析を実施した。具体的には、2018/19 シーズンには A(H1N1)pdm09 を 537 株、A(H3N2) を 380 株、B 型を 211 株、2019/20 シーズンには A(H1N1)pdm09 を 218 株、A(H3N2) を 92 株、B 型を 55 株、解析を行った（2020 年 4 月時点）。

（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、近年の流行株は 6B.1（アミノ酸置換：S84N, S162N, I216T、代表株：A/Singapore/GP1908/2015）内の 6B.1A（S74R, S164T, I295V）に属し、さらに S183P を含む複数の群 [183P-1：N451T, 183P-2：L233I, 183P-4：N129D+A141E, 183P-5：N260D, 183P-6：T120A, 183P-7：K302T+I404M] を形成する。2018/19,

2019/20 シーズンの分離株はほとんどが 183P-5 に属した。NA タンパク質に H275Y 置換を有するオセルタミビル耐性株は散発的に検出されているが、耐性株の流行は確認されていない。A(H3N2)ウイルス：ほとんどの株が HA 遺伝子系統樹上の 3C.2a（L3I, N144S, K160T, N255D, Q311H, F159Y、代表株：A/Hong Kong/4801/2014）内サブクレード 3C.2a1（N171K+I406V+G484E、代表株：A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016）に属し、ごく一部の株が 3C.2a2（T131K+R142K+R261Q）と 3C.3a（L3I+S91N+N144K+F193S+D489N）に属した。3C.2a1 内では多くが、3C.2a1b（N121K+K92R+H311Q）にて分岐した 3C.2a1b+135K（E62G+T135K+R142G）、3C.2a1b+131K（E62G+R142G+T131K+V529I）に属した。

B 型ウイルス：Yamagata 系統は、分離株は HA タンパク質に S150I, N165Y, N202S, S229D を持つクレード 3（代表株：B/Phuket/3073/2013）に全て属した。Victoria 系統の分離株は近年、HA タンパク質に N75L, N165K, S172P アミノ酸を持ち、B/Brisbane/60/2008 株を代表とするサブクレード 1A に属する。1A 内に 1A.1（2 アミノ酸（162,163 位）欠損+I180V+R498K、代表株：B/Maryland/15/2016）、1A.2（3 アミノ酸（162-164 位）欠損）、1A.3（3 アミノ酸（162-164 位）欠損+K136E）が形成されており、ほとんどの株は 1A.3 に属した。

D. 考察

2019/20 シーズンは、A(H1N1)pdm09 ウイルスが流行の主流であった。以前から遺伝子変異の蓄積が注視されていた A(H3N2)ウイルスに加え、A(H1N1)pdm09 ウイルスと B Victoria 系統ウイルスでも遺伝子変異により抗原部位のアミノ酸置換が蓄積され、多様な集団が形成され続けている。フェレット血清で検出可能な抗原性の変化には限界もあるが、遺伝子情報から示唆されるウイルス性状の変化を敏感に捉えることは重要と考えられる。今シーズンは新型コロナウイルスの影響からインフルエンザウイルスの流行は小規模であった。この状況が来冬におけるインフルエンザウイルスの流行にどのような変化をもたらすのか、通年のウイルス解析が必要である。

E. 結論

A(H1N1)pdm09 ウイルス、A(H3N2)ウイルス、B 型 Victoria 系統ウイルスの遺伝子が多様化し抗原性が異なる集団も存在するため、来シーズンへ向けての流行ウイルスの監視が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Takashita E, Ichikawa M, Morita H, Ogawa R, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Sugawara H, Sato A, Akimoto M, Mitamura K, Abe T, Yamazaki M, Watanabe S, Hasegawa H, Odagiri T. Human-to-Human Transmission of Influenza A(H3N2) Virus with Reduced Susceptibility to Baloxavir, Japan, February 2019. *Emerg Infect Dis.* 2019, 11, 25(11), 2108-2111
- Nakauchi M, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Ogawa R, Morita H, Miura H, Saito S, Watanabe S, Odagiri T, Kageyama T. Rapid detection of an I38T amino acid substitution in influenza polymerase acidic subunit associated with reduced susceptibility to baloxavir marboxil. *Influenza Other Respir Viruses.* 2020, 2 doi: 10.1111/irv.12728
- Takashita E, Daniels RS, Fujisaki S, Gregory V, Gubareva LV, Huang W, Hurt AC, Lackenby A, Nguyen HT, Pereyaslov D, Roe M, Samaan M, Subbarao K, Tse H, Wang D, Yen HL, Zhang W, Meijer A. Global update on the susceptibilities of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors and the cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir,

2017-2018. *Antiviral Res.* 2020, 3, 175, 104718

2. 学会発表

- 中内 美名、高下 恵美、藤崎 誠一郎、白倉 雅之、齊藤 慎二、渡邊 真治、小田切 孝人、影山 努
I38T 変異の迅速検出法
第 67 回日本ウイルス学会学術集会、2019 年 10 月、東京
- 中村 一哉、秋元 未来、藤崎 誠一郎、白倉 雅之、三浦 秀佳、岸田 典子、佐藤 彩、桑原 朋子、高下 恵美、長谷川 秀樹、小田切 孝人、渡邊 真治
フォーカス減数試験改良法によるインフルエンザ A/H3N2 亜型分離株抗原性解析の精度改善
第 67 回日本ウイルス学会学術集会、2019 年 10 月、東京
- 渡邊 真治、中村 一哉、岸田 典子、藤崎 誠一郎、白倉 雅之、高下 恵美、桑原 朋子、佐藤 彩、秋元 未来、三浦 秀佳、小川 理恵、森田 博子、菅原 裕美、小田切 孝人、長谷川 秀樹、インフルエンザ株 サーベイランスグループ
2018/19 シーズンにおけるインフルエンザ流行株の性状と 2019/20 シーズンのワクチン株選定について
第 67 回日本ウイルス学会学術集会、2019 年 10 月、東京
- 高下 恵美、森田 博子、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、三田村 敬子、安倍 隆、市川 正孝、山崎 雅彦、渡邊 真治、小田切 孝人、長谷川 秀樹、全国 地方衛生研究所
パロキサビル耐性変異インフルエンザ A(H3N2)ウイルスのヒトヒト感染
第 67 回日本ウイルス学会学術集会、2019 年 10 月、東京

抗原変異が誘導されにくいインフルエンザワクチン株の開発

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・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が、近年、特に A(H3N2)ウイルスにおいては、鶏卵で継代すると、ウイルスの抗原部位に変異が入り、その結果、流行株とワクチン株の抗原性が乖離してしまう現象が起こっている。しかしながら、我々は鶏卵で分離してもウイルスの抗原部位に変異を持たない A/Saitama/103/2014(H3N2)株（埼玉株）の分離に成功した。我々は、埼玉株の性状を明らかにすれば、鶏卵で分離しても抗原変異を起こしにくいウイルスの分離調製法の確立に繋がるのではないかと考え、埼玉株の性状解析を試みた。その結果、埼玉株 NA にはシアル酸レセプター結合能があり、埼玉株は鶏卵において NA を介したレセプター結合により増殖が可能であることが明らかになった。また、リバーズジェネティクス法により、埼玉株以外の HA と埼玉株 NA を持つウイルスを作製し、鶏卵で継代したところ、5代継代後も HA に変異は認められなかった。今後さらに研究を進めることにより、埼玉株 NA を用いた鶏卵馴化による抗原変異が誘導されにくいワクチン株の開発につながることを期待される。

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 (WHOCC)により鶏卵で分離されたウイルスの中から選定される。我々、国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センターも WHOCC の一つであり、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)ウイルスにおいては、鶏卵で増殖しづらく、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してしまう現象が起きている。ワクチン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、鶏卵で A/Saitama/103/2014 (H3N2) (埼玉株) を分離した。通常、鶏卵でワクチン株を分離する際には、臨床検体を直接鶏卵に接種し継代するが、我々は埼玉株を分離

する際に、臨床検体が少量であったため、まず当研究所で細胞ワクチン開発用に品質管理している MDCK 細胞で継代し、十分なウイルス量を確保した後に鶏卵で継代した。鶏卵で分離した埼玉株の遺伝子を調べたところ、HA には臨床検体と比較して、抗原部位ではない場所 1ヶ所に変異が入っていた。一方で、HA とともにウイルス粒子上に存在する NA には、複数の変異が入っていることが明らかになった。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、鶏卵分離埼玉株は、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。これは、HA の抗原部位に変異が入っていなかったためであると推測された。また、NA には多数の変異が入っていたことから、埼玉株の鶏卵における増殖には、NA が重要な役割を果たすのではないかと考えた。

そこで、本研究では、鶏卵分離埼玉株の NA に着目し、その性状を明らかにすることにより、鶏卵で継代しても HA の抗原部位に変異が入りづらいワクチン株の開発につながるのではない

かと考え、鶏卵分離埼玉株 NA の性状解析を行った。

B. 研究方法

1) 赤血球吸着試験

Cos-7 細胞に埼玉株の臨床検体 NA、細胞分離 NA、または鶏卵分離 NA をそれぞれ発現させ、0.5%ニワトリ血球を加え、4°Cで 1 時間吸着させた。1 時間後、PBS で細胞を洗い、吸着しなかった赤血球を取り除いた。続いて、顕微鏡下で赤血球の吸着を観察し、さらに蒸留水を添加して赤血球を破壊し、吸着していた赤血球のヘモグロビン濃度を測定した。

2) ウイルス力価測定

MDCK 細胞を 96well プレートに単層培養し、10 倍階段希釈したウイルスを 100 μ l ずつ接種した。34°Cで 1 時間培養後、2 \times MEM と 3.2% Avicel RC/CL 溶液の混合液を 100 μ l ずつ重層した。34°Cでさらに 20 時間培養した後、細胞を PBS で洗浄し、10%ホルマリン溶液で固定した。細胞固定後、0.5% Triton-X-100 in 20mM Glycine PBS 溶液で細胞核を透過し、1 次抗体と 2 次抗体で染色し、True Blue™ (KPL) 溶液で plaque を可視化した。抗体には抗 A 型インフルエンザウイルス NP マウスモノクローナル抗体と抗マウス IgG HRP 抗体を用いた。

(倫理面への配慮)

- 該当なし

C. 研究結果

通常、インフルエンザウイルスは、HA が細胞表面のシアル酸レセプターと結合することにより、感染を成立させる。また、感染する宿主が変わると、その宿主のレセプターと結合できるように主に HA に変異が入る。しかしながら、埼玉株においては、鶏卵に馴化する際に HA ではなく、NA に複数の変異を獲得していた。このことから、我々は埼玉株の鶏卵での増殖には NA が重要な役割を果たしており、その役割とは、レセプター結合なのではないかと考えた。

そこで、まず埼玉株 NA がシアル酸と結合するかどうかを明らかにするため、埼玉株の臨床検体 NA (変異なし)、細胞分離 NA (T148I 変異)、鶏卵分離 NA (T148I, T153N, N329T, T369K 変異) をそれぞれ細胞に単独で発現させ、赤血球表面のシアル酸と結合するかどうかを赤血球吸着試

験により調べた。T148I 変異は、A(H3N2)ウイルスを MDCK 細胞で継代した際に入る変異であり、NA に赤血球凝集能を付与することがこれまでに報告されている。赤血球吸着試験の結果、細胞分離 NA と鶏卵分離 NA が赤血球吸着能を持つことが明らかになった。さらに、細胞分離 NA と鶏卵分離 NA では、鶏卵分離 NA のほうが、より高い赤血球吸着能を示した。また、鶏卵分離埼玉株 NA で認められた 4 箇所の変異を 1 つずつ戻し、赤血球吸着試験を行ったところ、T148I 変異を T に戻すと NA の赤血球吸着能が著しく低下した。この結果から、埼玉株 NA のシアル酸結合能の獲得には、T148I 変異が不可欠であることがわかった。

続いて、埼玉株が NA によるシアル酸レセプター結合のみで感染を成立させられるかどうかを、埼玉株 HA のシアル酸結合能において重要な部分に変異を挿入し、シアル酸結合能を弱めた HA(HAmut)を作製し、HAmut と埼玉株の細胞分離 NA、または鶏卵分離 NA を持つウイルスを作製した。そして、これらのウイルスの MDCK 細胞と鶏卵における増殖を調べた。その結果、細胞分離 NA を持つウイルスは、MDCK 細胞では増殖したが、鶏卵では増殖しなかった。一方で、鶏卵分離 NA を持つウイルスは、MDCK 細胞と鶏卵の両方で増殖した。この結果から、埼玉株は NA を介して MDCK 細胞と鶏卵で増殖することが可能であるが、鶏卵で増殖するには、T148I 変異に加え、鶏卵分離 NA で認められた他の変異も必要であることが明らかになった。

また、埼玉株以外の HA でも、同様の現象が見られるかどうかを明らかにするため、埼玉株以外の A(H3N2)ウイルスの HA と鶏卵分離埼玉株 NA を持つウイルスを作製し、鶏卵で継代して HA に変異が入るかどうかを検証した。その結果、鶏卵で 5 代継代後も HA に変異は入っていなかった。したがって、埼玉株 NA を持っている、埼玉株以外の HA でも、鶏卵馴化による抗原変異が起こりづらいことが示唆された。

D. 考察

本研究では、赤血球吸着試験により、埼玉株の細胞分離と鶏卵分離の NA はシアル酸レセプター結合能を持つことを明らかにし、この結合能の獲得には T148I 変異が不可欠であることを同定した。また、埼玉株は NA を介したレセプター結合により MDCK 細胞と鶏卵で増殖することができるが、鶏卵での増殖には T148I 変異に加え、鶏卵分離 NA で認められた他の変異も必要であることを明らかにした。さらに、埼玉株以外の HA においても、鶏卵分離埼玉株 NA を持っていれば、鶏卵で継代後も HA に変異が入りづらいことが示唆された。

以上の結果から、埼玉株は、NA がレセプター結合能を獲得することにより、HA ではなく NA に選択圧がかかり、その結果、鶏卵で継代しても HA に変異が入りづらくなっただけではないか考えられた。また、埼玉株以外の HA においても同様の現象が見られたことから、今後鶏卵馴化による影響を受けづらいワクチン株の開発への貢献も期待される。

E. 結論

現行の季節性インフルエンザワクチンには、リバースジェネティクス法で作製されたウイルスはワクチン株として用いられていないが、将来的に、この方法を用いて流行株の HA と埼玉株 NA を持つワクチン株を作製し、鶏卵で継代しても抗原変異を起こしづらいワクチン株として使用されることが期待される。また、さらに埼玉株の鶏卵分離 NA の性状を明らかにすることにより、HA の抗原部位に変異を獲得しにくいワクチン株の分離法の確立にもつながることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Kuwahara T, Yamayoshi S, Noda T, Kawaoka Y. G Protein Pathway Suppressor 1 Promotes Influenza Virus Polymerase Activity by Activating the NF- κ B Signaling Pathway. *mBio*. 2019 Dec 17;10(6).
- Takashita E, Ichikawa M, Morita H, Ogawa R, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Sugawara H, Sato A, Akimoto M, Mitamura K, Abe T, Yamazaki M, Watanabe S, Hasegawa H, Odagiri T. Human-to-Human Transmission of Influenza A(H3N2) Virus with Reduced Susceptibility to Baloxavir, Japan, February 2019. *Emerg Infect Dis*. 2019, 11, 25(11), 2108-2111

2. 学会発表

- Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Takahashi H, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Kawaoka Y, Watanabe S, Odagiri T. Biological significance of neuraminidase of egg-adapted influenza A(H3N2) virus without amino acid substitutions in the antigenic sites of its hemagglutinin. Options X、シンガポール、2019
- 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 2018/2019 season and vaccine viruses selected for the 2019/20 season. 第 67 回日本ウイルス学会学術集会、東京都、2019

抗インフルエンザ薬耐性株の発生動向調査ならびに監視体制の強化

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発生動向の監視を目的として、日本、韓国、台湾、ネパール、モンゴル、ミャンマーおよびラオスの分離株について、4種類のノイラミニダーゼ（NA）阻害薬（オセルタミビル、ペラミビル、ザナミビルおよびラニナミビル）ならびにエンドヌクレアーゼ阻害薬バロキサ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 23 株（1.4%）、バロキサビル耐性変異 A(H1N1)pdm09 株が 1 株（0.2%）検出された。耐性株は薬剤未投与患者からも検出されており、ヒトからヒトへの感染伝播の可能性が示唆された。

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・向上を目的として NA 遺伝子型解析の外部精度管理を実施した。その結果、地衛研における検査精度が十分に保持されていることが確認された。また、検査の効率化を目的として PA 遺伝子型解析の新規技術開発・地衛研への技術移転を行った。以上により、日本国内における薬剤耐性株の監視体制が強化された。

A. 研究目的

日本国内において、インフルエンザの治療あるいは予防には、インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ（NA）蛋白質を標的とする NA 阻害薬のオセルタミビル、ペラミビル、ザナミビルおよびラニナミビル、ならびに PA 蛋白質を標的とするエンドヌクレアーゼ阻害薬バロキサビルが使用されている。日本は世界最大の抗インフルエンザ薬使用国であり、薬剤耐性株の出現リスクが高い。したがって耐性株の発生動向の把握は公衆衛生上極めて重要である。そこで、本研究では、薬剤耐性株の発生動向の監視を目的として、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発生動向を調査した。

日本国内における耐性株サーベイランスは、国立感染症研究所（感染研）と全国地方衛生研究所（地衛研）が共同で実施している。地衛研

では、NA 遺伝子型解析ならびに PA 遺伝子型解析により耐性株の検出を行っている。NA 遺伝子型解析について、昨年度の 43 地衛研に続き、今年度は 10 地衛研について、検査精度の維持・向上を目的とした外部精度管理を実施した。また、PA 遺伝子型解析について、検査の効率化を目的として新規技術開発・地衛研への技術移転を行った。

B. 研究方法

感染研において、日本、韓国、台湾、ネパール、モンゴル、ミャンマーおよびラオスの分離株について、MUNANA 基質を用いた蛍光法または NA-XTD 基質を用いた化学発光法により、オセルタミビル、ペラミビル、ザナミビルおよびラニナミビルに対する感受性試験を実施し、IC₅₀ 値を算出した。また、Focus reduction assay

により、バロキサビルに対する感受性試験を実施し、IC₅₀ 値を算出した。さらに次世代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。

地衛研において、TaqMan RT-PCR 法または NA 遺伝子シーケンス法によるオセルタミビル・ペラミビル耐性変異株の検索を行い、PA 遺伝子シーケンス法によるバロキサビル耐性変異株の検索を行った。また、10 箇所の地衛研に対して、TaqMan RT-PCR 法の合成 RNA 陽性コントロールを配布した。地衛研では、RNA 陽性コントロールの 10 倍階段希釈液を作製し、陰性コントロールと共に検出した。さらに、12 箇所の地衛研に対して、新たに開発した RNase H2-dependent PCR 法の陽性コントロール cDNA をプロトコールとともに配布した。

(倫理面への配慮)
該当なし

C. 研究結果

NA 阻害薬耐性株について、A(H1N1)pdm09 ウイルスは国内株 1,657 株および海外株 20 株、A(H3N2)ウイルスは国内株 32 株および海外株 43 株、B 型ウイルスは国内株 37 株および海外株 24 株について解析を行った。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 ウイルスが 23 株 (1.4%) 検出された。また、エンドヌクレアーゼ阻害薬耐性株について、A(H1N1)pdm09 ウイルスは国内株 680 株および海外株 20 株、A(H3N2)ウイルスは国内株 42 株および海外株 43 株、B 型ウイルスは国内株 20 株および海外株 19 株について解析を行った。その結果、日本国内において、バロキサビル耐性変異 A(H1N1)pdm09 ウイルスが 1 株 (0.2%) 検出された。国内株の解析結果は感染研ウェブサイト上で公表し、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。

NA 遺伝子型解析の外部精度管理では、評価項目を (1) 反応条件および解析条件は正しく設定されているか、(2) 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、(3) H275 陽性コントロールおよび Y275 陽性コントロールにそれぞれ濃度依存性があるか、(4) 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 4 点とした。その結果、参加地衛研では評価項目すべてを満たしていた。PA 遺伝子型解析については、新たに RNase H2-dependent PCR 法を開発し、地衛研への技術移転を行った。

D. 考察

抗インフルエンザ薬耐性株は薬剤未投与患者からも検出されており、ヒトからヒトへの感染伝播の可能性が示唆された。

NA 遺伝子型解析の外部精度管理では、昨年度の 43 地衛研に加えて、今年度の 10 地衛研についても検査精度が保持されてい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・ペラミビル耐性ウイルスおよびバロキサビル耐性変異ウイルスはヒトからヒトへの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。

地衛研では薬剤耐性株検出系の検査精度が十分に保持されており、さらに検査が効率化されることで抗インフルエンザ薬耐性株の監視体制が強化された。

F. 研究発表

1. 論文発表

・ [Takashita E](#), Ichikawa M, Morita H, Ogawa

- R, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Sugawara H, Sato A, Akimoto M, Mitamura K, Abe T, Yamazaki M, Watanabe S, Hasegawa H, Odagiri T. Human-to-Human Transmission of Influenza A(H3N2) Virus with Reduced Susceptibility to Baloxavir, Japan, February 2019. *Emerg Infect Dis.* 2019, 11, 25(11), 2108-2111
- Sato M, Takashita E, Katayose M, Nemoto K, Sakai N, Hashimoto K, Hosoya M. Detection of variants with reduced baloxavir marboxil susceptibility after treatment of children with influenza A during the 2018/2019 influenza season. *J Infect Dis.* 2020, 2 DOI: 10.1093/infdis/jiaa061
 - Nakauchi M, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Ogawa R, Morita H, Miura H, Saito S, Watanabe S, Odagiri T, Kageyama T. Rapid detection of an I38T amino acid substitution in influenza polymerase acidic subunit associated with reduced susceptibility to baloxavir marboxil. *Influenza Other Respir Viruses.* 2020, 2, doi: 10.1111/irv.12728
 - Takashita E. Influenza Polymerase Inhibitors: Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2020, 3 doi: 10.1101/cshperspect.a038687
 - Takashita E, Daniels RS, Fujisaki S, Gregory V, Gubareva LV, Huang W, Hurt AC, Lackenby A, Nguyen HT, Pereyaslov D, Roe M, Samaan M, Subbarao K, Tse H, Wang D, Yen HL, Zhang W, Meijer A. Global update on the susceptibilities of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors and the cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir, 2017-2018. *Antiviral Res.* 2020, 3, 175, 104718
 - 高下恵美, 森田博子, 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, 秋元未来, 佐藤彩, 菅原裕美, 渡邊真治, 小田切孝人 2018/19 シーズン バロキサビル耐性変異株検出状況の中間報告 IASR vol. 40, 86-87
 - 高下恵美, 小川理恵, 森田博子, 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, 秋元未来, 佐藤彩, 菅原裕美, 渡邊真治, 小田切孝人, 矢野拓弥, 赤地重宏, 松村義晴, 落合仁, 川上千春, 清水耕平, 小澤広規, 宇宿秀三, 田中伸子, 大久保一郎, 太田陽, 富樫勇人, 田中文字子, 齋藤綾子, 市川正孝, 三田村敬子, 安倍隆, 山崎雅彦 全国地方衛生研究所. 新規抗インフルエンザ薬バロキサビル未投与患者からのバロキサビル耐性変異ウイルスの検出 IASR vol.40, 67-69
 - 高下恵美, 森田博子, 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, 長谷川秀樹, 市川正孝, 三田村敬子, 安倍隆, 山崎雅彦 全国地方衛生研究所. バロキサビル耐性変異ウイルスのヒトからヒトへの感染伝播 IASR vol. 40, 197-199
2. 学会発表
- 高下恵美, 抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス、第 93 回日本感染症学会、2019 年 4 月、名古屋
 - 高下恵美, インフルエンザウイルスのグローバルサーベイランス、第 60 回日本臨床ウイルス学会、2019 年 5 月、名

- 古屋
- 高下恵美、新規抗インフルエンザ薬バロキサビルに対する耐性株サーベイランス、第33回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム、2019年6月、京都
 - 市川正孝、高下恵美、安倍隆、山崎雅彦、三田村敬子、2018/2019 インフルエンザシーズンにおけるバロキサビル耐性変異ウイルスの臨床的検討、第33回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム、2019年6月、京都
 - Emi Takashita, Rie Ogawa, Hiroko Morita, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Hideka Miura, Kazuya Nakamura, Noriko Kishida, Tomoko Kuwahara, Hiromi Sugawara, Aya Sato, Miki Akimoto, Keiko Mitamura, Takashi Abe, Masataka Ichikawa, Masahiko Yamazaki, Shinji Watanabe, Takato Odagiri, Human-to-human transmission of influenza A(H3N2) viruses exhibiting reduced susceptibility to baloxavir due to a PA I38T substitution in Japan, Options X for the Control of Influenza, August 2019, Singapore
 - Masatoki Sato, Emi Takashita, Masahiko Katayose, Kenji Nemoto, Nobuko Sakai, Koichi Hashimoto, Mitsuaki Hosoya, Clinical and virological efficacy of baloxavir marboxil in children with influenza A, Options X for the Control of Influenza, August 2019, Singapore
 - Tomoko Kuwahara, Emi Takashita, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Kazuya Nakamura, Noriko Kishida, Hitoshi Takahashi, Kayoko Sato, Shinji Watanabe, Takato Odagiri, Biological significance of neuraminidase of egg-adapted influenza A(H3N2) virus without amino acid substitutions in the antigenic sites of its hemagglutinin, Options X for the Control of Influenza, August 2019, Singapore
 - Kazuya Nakamura, Miki Akimoto, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Hideka Miura, Noriko Kishida, Aya Sato, Tomoko Kuwahara, Emi Takashita, Hideki Hasegawa, Takato Odagiri, Shinji Watanabe, Improved accuracy of antigenic characterization of recent influenza A/H3N2 isolates by modified focus reduction assay, Options X for the Control of Influenza, August 2019, Singapore
 - 高下恵美、インフルエンザウイルスの薬剤耐性株サーベイランス、第33回日本臨床内科医学会、2019年10月、広島
 - 高下恵美、藤崎誠一郎、白倉雅之、中村一哉、岸田典子、桑原朋子、三田村敬子、安倍隆、市川正孝、山崎雅彦、渡邊真治、小田切孝人、長谷川秀樹、2018/2019 シーズンにおける新規抗インフルエンザ薬バロキサビル耐性変異ウイルスの検出状況、第51回日本小児感染症学会、旭川
 - 佐藤晶論、高下恵美、片寄雅彦、根本健二、酒井信子、橋本浩一、細矢光亮、バロキサビルの臨床的・ウイルス学的効果の検討、第51回日本小児感染症学会、旭川
 - 川上千春、七種美和子、宇宿秀三、高下恵美、齋藤綾子、山下舞子、田中文子、太田陽、富樫勇人、横浜市におけるバロキサビル耐性変異ウイルスの検出状況、第51回日本小児感染症学会、

- 旭川
- 市川正孝、高下恵美、安倍隆、山崎雅彦、三田村敬子、2018/2019 インフルエンザシーズンにおけるバロキサビル耐性変異ウイルスの臨床的検討、第 51 回日本小児感染症学会、旭川
 - 山下舞子、太田陽、大砂光正、高尾知穂、富樫勇人、中澤枝里子、杉山弘樹、永嶋早織、山口和子、齋藤千穂、鈴木徹臣、立石格、田中文子、川上千春、七種美和子、宇宿秀三、高下恵美、バロキサビル耐性インフルエンザ A/H3N2 感染により皮下気腫、縦隔気腫を来たした一例、第 51 回日本小児感染症学会、旭川
 - Emi Takashita, Hiroko Morita, Rie Ogawa, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Hideka Miura, Kazuya Nakamura, Noriko Kishida, Tomoko Kuwahara, Hiromi Sugawara, Aya Sato, Miki Akimoto, Keiko Mitamura, Takashi Abe, Masataka Ichikawa, Masahiko Yamazaki, Shinji Watanabe, Takato Odagiri, Hideki Hasegawa, Human-to-human transmission of influenza A(H3N2) viruses exhibiting reduced susceptibility to baloxavir due to a PA I38T substitution in Japan, 第 67 回日本ウイルス学会、2019 年 10 月、東京
 - Kazuya Nakamura, Miki Akimoto, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Hideka Miura, Noriko Kishida, Aya Sato, Tomoko Kuwahara, Emi Takashita, Hideki Hasegawa, Takato Odagiri, Shinji Watanabe, Improved accuracy of antigenic characterization of recent influenza A/H3N2 isolates by modified focus reduction assay, 第 67 回日本ウイルス学会、2019 年 10 月、東京
 - Shinji Watanabe, Kazuya Nakamura, Noriko Kishida, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Emi Takashita, Tomoko Kuwahara, Aya Sato, Miki Akimoto, Hideka Miura, Rie Ogawa, Hiroko Morita, Hiromi Sugawara, Takato Odagiri, Hideki Hasegawa, The influenza Surveillance Group of Japan, Characterizations of circulating influenza viruses in the 2018/19 season and selection of vaccine viruses for the 2019/20 season, 第 67 回日本ウイルス学会、2019 年 10 月、東京
 - Mina Nakauchi, Emi Takashita, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Shinji Saito, Shinji Watanabe, Takato Odagiri, Tsutomu Kageyama, Rapid detection of an I38T amino acid substitution in influenza polymerase acidic subunit associated with reduced susceptibility to baloxavir marboxil, 第 67 回日本ウイルス学会、2019 年 10 月、東京
 - 高下恵美、森田博子、永田志保、藤崎誠一郎、白倉雅之、中村一哉、岸田典子、桑原朋子、渡邊真治、長谷川秀樹、2018-19 シーズンにおけるバロキサビル耐性変異ウイルスの検出状況、9th Negative Strand Virus-Japan、2020 年 1 月、沖縄

成人層および高齢者層に対する2019-20年季節性インフルエンザワクチン接種後の抗体価反応

研究分担者 齋藤玲子 新潟大学大学院医歯学総合研究科・教授

研究協力者 渡辺明美、長田秀和（新潟大学）、尾ヶ井マサヨ（女池南風苑・看護介護科長）
金沢宏（女池南風苑・施設長）

研究要旨

2019-2020年シーズンの4価季節性インフルエンザワクチン接種による成人・高齢者のA/H1N1pdm09、A/H3N2、B/ビクトリア系統、B/山形系統の抗原に対する免疫原性の調査を行った。成人層100名(平均年齢44.6歳)と、高齢者層49名(平均年齢86.4歳)のワクチン接種前後の抗体価を赤血球凝集阻止試験(HI法)で測定し、ワクチン接種による変化を評価した。

成人層でA/H1N1pdm09を除く、3価で接種後の抗体価40倍以上の保有率は70%を上回った。高齢者層でも同様に、A/H1N1pdm09を除く、3価で接種後の抗体価40倍以上の保有率は60%を上回り、国際基準(成人層：70%以上、高齢者層：60%以上)を満たした。今シーズンからA/H1N1pdm09およびA/H3N2のワクチン株が変更されたが、今年度のワクチンに含まれるA/H1N1pdm09抗原は免疫原性が低いが、A/H3N2抗原は免疫原性が高いことが示唆され、A/H1N1pdm09のみ改善の余地があると考えられる。本調査は、国内二社のワクチンを使用した。成人層、高齢者層ともに二社間で概ね差は無かった。

接種後の副反応については、成人層、高齢者層ともに局所の発赤・腫れを申告した割合が多かった。また、副反応症状として、局所の痒みを申告した割合は減ったが、その他の大きな差は認められなかった。そのほか重篤な全身反応も認められなかった。

A. 研究目的

インフルエンザウイルスは、抗原性や型・亜型が年ごとに変化するため、インフルエンザワクチンと流行するインフルエンザの抗原性が一致しないことがしばしばある。このため、WHOが毎年次のシーズンに流行するウイルス株を予測しその情報をもとに、次のシーズンのインフルエンザのワクチン株が決定される。

近年のインフルエンザの流行においては、A(H1N1)pdm09およびA(H3N2)に加えてB型ウイルスは山形系統とビクトリア系統の混合流行が続いており、WHOも2012-2013年シーズンからB型2系統を含んだ4価ワクチンを推奨している。米国においても2013-2014年シーズンから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。2019-2020年シーズンのインフルエンザワクチンは、以下の通りである。

*A/ブリスベン/02/2018 (IVR-190)
(H1N1)pdm09

*A/カンザス/14/2017 (X-327) H3N2

*B/プーケット/3073/2013 山形系統

*B/メリーランド/15/2016 (NYMC BX-69A) ビクトリア系統

昨シーズンに比べ、A/H1N1pdm09とA/H3N2のワクチン株が変更となった。

本調査では、高齢者施設の成人層(<65歳)および高齢者層(≥65歳)に対して、2019-2020年シー

ズンにおけるワクチン接種前後の抗体価の変化を赤血球凝集阻止試験(HI 法)にて測定し、ワクチン接種後の HI 抗体価の変化を評価した。

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、昨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、2019年10月にデンカ生研社製(デンカ)または阪大微研社製(微研)の2019-2020年シーズンHAインフルエンザワクチン(4価)を用法に基づき皮下接種した。接種前と接種3-4週間後の2回、血清を採血した。

血清は採取後すぐに血清分離し、抗体価検査を行うまで-20℃にて新潟大学で保管した。ワクチン接種前後の抗体価は、赤血球凝集阻止試験(HI)法にてガチョウ赤血球と、デンカ生研社製のワクチン抗原A/ブリスベン/02/2018(IVR-190)H1N1pdm09、A/カンザス/14/2017(X-327)H3N2、B/プーケット/3073/2013山形系統、B/メリーランド/15/2016(NYMC BX-69A)ビクトリア系統を用いて測定した。

抗体価の解析は高齢者施設における65歳未満を“成人層”とし、65歳以上を“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。

(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100件、高齢者層のペア血清は49件採取された。成人層の平均年齢は44.6歳、高齢者層の平均年齢は86.4歳であった。

成人層におけるワクチン接種後の40倍以上の抗体価保有率は、A/H1N1pdm09が53.0%、A/H3N2が84.0%、B山形系統が99.0%、Bビクトリア系統が96.0%であった。EMEAが定める有効な抗体価の基準である70%を超したワクチン株はA/H1N1pdm09を除く3株で認められた(表1、図)。昨年度は、70%を超したワクチン株はなかった。今年度からA/H1N1pdm09とA/H3N2のワクチン株は変更となったが、A/H1N1pdm09

では昨年度の30.3%と同様に、有効な抗体価の基準である70%を下回った。一方、A/H3N2では、昨年度の62.9%と異なり、70%を上回る結果となった。B山形系統とBビクトリア系統はそれぞれ昨年度の62.9%、49.4%と比べ、高い値となった。

高齢者層ではワクチン接種後の40倍以上の抗体価保有率はA/H1N1pdm09が32.7%、A/H3N2が75.5%、B山形系統が75.5%、Bビクトリア系統が79.6%であった。EMEAの定める高齢者の国際基準の60%を越したワクチン株は、成人層と同様に、A/H1N1pdm09を除く3株で認められた(表1、図)。昨年度は、60%を超したワクチン株はなかった。

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)でワクチンの免疫原性を評価すると、成人層では、A/H1N1pdm09が3.0%、A/H3N2が51.0%、B山形系統が12.0%、Bビクトリア系統が5.0%であった。EMEAの定めた40%以上という国際基準にはA/H3N2のみ上回った(表1)。一方、高齢者層ではA/H1N1pdm09が12.2%、A/H3N2が53.1%、B山形系統が26.5%、Bビクトリア系統が18.4%であった。国際基準には成人層と同様に、A/H3N2のみ上回った。そのほかの3株では、接種前の抗体価が成人層と比べ低いためか、高齢者層の抗体陽転率は少し良い傾向を示した。成人層、高齢者層共に、デンカ生研、阪大微研の2社の製品で抗体価獲得率を比較した。その結果、製造会社別で成人層、高齢者層ともに両社間に大きな差は見られなかった。二社ともにA/H1N1pdm09以外の3株では、成人層と高齢者層共に有効な抗体価の国際基準を満たしていた(表1、図)。

ワクチン後の副反応について、成人層と高齢者層で比較したところ、最も多い副反応は、成人層と高齢者層で共に局所の発赤でそれぞれ51.0%、61.2%であった(表2)。次に多いのが、成人層では、局所の腫れと痛みで、共に43.0%、高齢者層では、局所の腫れで8.2%であった。また、そのほか重篤な全身反応は認められなかった。高齢者層は、成人層に比べ、副反応の申告者数が少ない傾向が認められた。昨年度と比較した場合、ワクチン後の局所の痒みが老人層では昨年度54.5%だったが、今年度は痒みを訴えた者はいなかった。一方、成人層では、昨年度42.7%だったが、今年度35.0%であった。全体では昨年度47.2%だったが、今年度は半分の23.5%であった。その他、副反応で特に大きな差は認められなかった(表2)。

D. 考察

2019-2020年シーズンのワクチンは、成人層、高齢者層ともに、A/H1N1pdm09を除く3株において、ワクチン接種後40倍以上のHI抗体保有率が国際基準を満たした。このため、A/H1N1pdm09ではワクチン接種による感染防御に不安を残す結果とな

った。接種前後での4倍以上の抗体価の上昇割合はA/H3N2でのみ国際基準の40%を上回っていた。接種前のGMT値は、B山形系統とBビクトリア系統で昨年と比べ、いずれも高い値を示した。接種前の抗体価が高いことが、抗体陽転率が低い原因になっていると考えられた。B型の2系統は昨年度と比べ、接種前から高いHA抗体価を示したが、原因は不明である。しかしながら、考えられる可能性として、昨年度とワクチン株が同じであること、B型のウイルスに既に感染していたこと、昨年度はモルモット赤血球を使用したのが今年度はガチョウ赤血球に変更したことなどが挙げられる。

昨シーズンでは、成人層、高齢者層ともに、4価全てにおいて、ワクチン接種後40倍以上のHI抗体保有率は国際基準を超えなかったが、今年度は、A/H1N1pdm09を除く3株では、接種後の抗体価保有率が改善した。今年度からA/H1N1pdm09とA/H3N2はワクチン株が変更になったことを考慮すると、今年度のA/H1N1pdm09のワクチン株(A/ブリスベン/02/2018(IVR-190))は免疫原性が低い、A/H3N2のワクチン株(A/カンザス/14/2017(X-327))は免疫原性が高いことが示唆された。

副反応症状申告数はワクチン後の局所の痒みが去年と比べ減少したが、その他では昨シーズンと大きな差は認められなかった。また、重篤な全身反応も認められなかった。以上のことから、2019-2020年シーズンもインフルエンザワクチンが安全に接種されたと考えられる。

E. 結論

2019-2020年シーズンにおけるインフルエンザワクチンの効果はA/H1N1pdm09を除き、成人層、高齢者層共に良好であった。今年度からA/H1N1pdm09とA/H3N2のワクチン株が変更となったが、A/H1N1pdm09は抗体価上昇が低く終わった結果であった。来年度も同じ株が選択されれば抗体価は徐々に上昇していくと考えられる。一方で、A/H3N2は新しい株に変更になったにもかかわらず、高い抗体価の上昇が認められ、免疫原性が高いことが示唆された。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の皆さまに感謝いたします。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

表1 2019-2020年インフルエンザワクチン接種前後の抗体価の評価

			GMT		Mean	≥4 fold	≥1:40	≥1:40
			Pre	Post	Fold	increase	(Pre)	(Post)
					Increase	(%)	(%)	(%)
成人層 (<65 歳)	全体 N=100	A/H1N1pdm09	23.4	30.5	1.4	3.0	36.0	53.0
		A/H3N2	21.5	65.9	4.7	51.0	29.0	84.0
		B 山形系	128.2	186.4	1.8	12.0	96.0	99.0
		B ビクトリア系	102.0	142.2	1.8	5.0	86.0	96.0
	デンカ生研 N=50	A/H1N1pdm09	22.2	30.3	1.4	4.0	34.0	52.0
		A/H3N2	21.7	76.7	6.3	54.0	28.0	86.0
		B 山形系	121.3	183.8	1.9	16.0	92.0	98.0
		B ビクトリア系	98.5	141.2	2.1	8.0	86.0	96.0
	阪大微研 N=50	A/H1N1pdm09	24.6	30.7	1.3	2.0	38.0	54.0
		A/H3N2	21.3	56.6	3.1	48.0	30.0	82.0
		B 山形系	135.5	189.0	1.6	8.0	100.0	100.0
		B ビクトリア系	105.6	143.2	1.5	2.0	86.0	96.0
高齢者層 (≥65 歳)	全体 N=49	A/H1N1pdm09	9.0	15.4	1.8	12.2	12.2	32.7
		A/H3N2	12.6	51.2	6.7	53.1	24.5	75.5
		B 山形系	17.2	45.7	4.0	26.5	46.9	75.5
		B ビクトリア系	29.9	53.1	2.2	18.4	65.3	79.6
	デンカ生研 N=25	A/H1N1pdm09	7.6	14.8	1.9	12.0	8.0	24.0
		A/H3N2	11.9	55.8	7.6	60.0	24.0	84.0
		B 山形系	15.5	38.9	2.8	20.0	48.0	68.0
		B ビクトリア系	24.3	39.3	2.0	12.0	64.0	72.0
	阪大微研 N=24	A/H1N1pdm09	10.7	16.2	1.8	12.5	16.7	41.7
		A/H3N2	13.2	46.7	5.8	45.8	25.0	66.7
		B 山形系	19.3	53.9	5.3	33.3	45.8	83.3
		B ビクトリア系	37.1	72.7	2.4	25.0	66.7	87.5

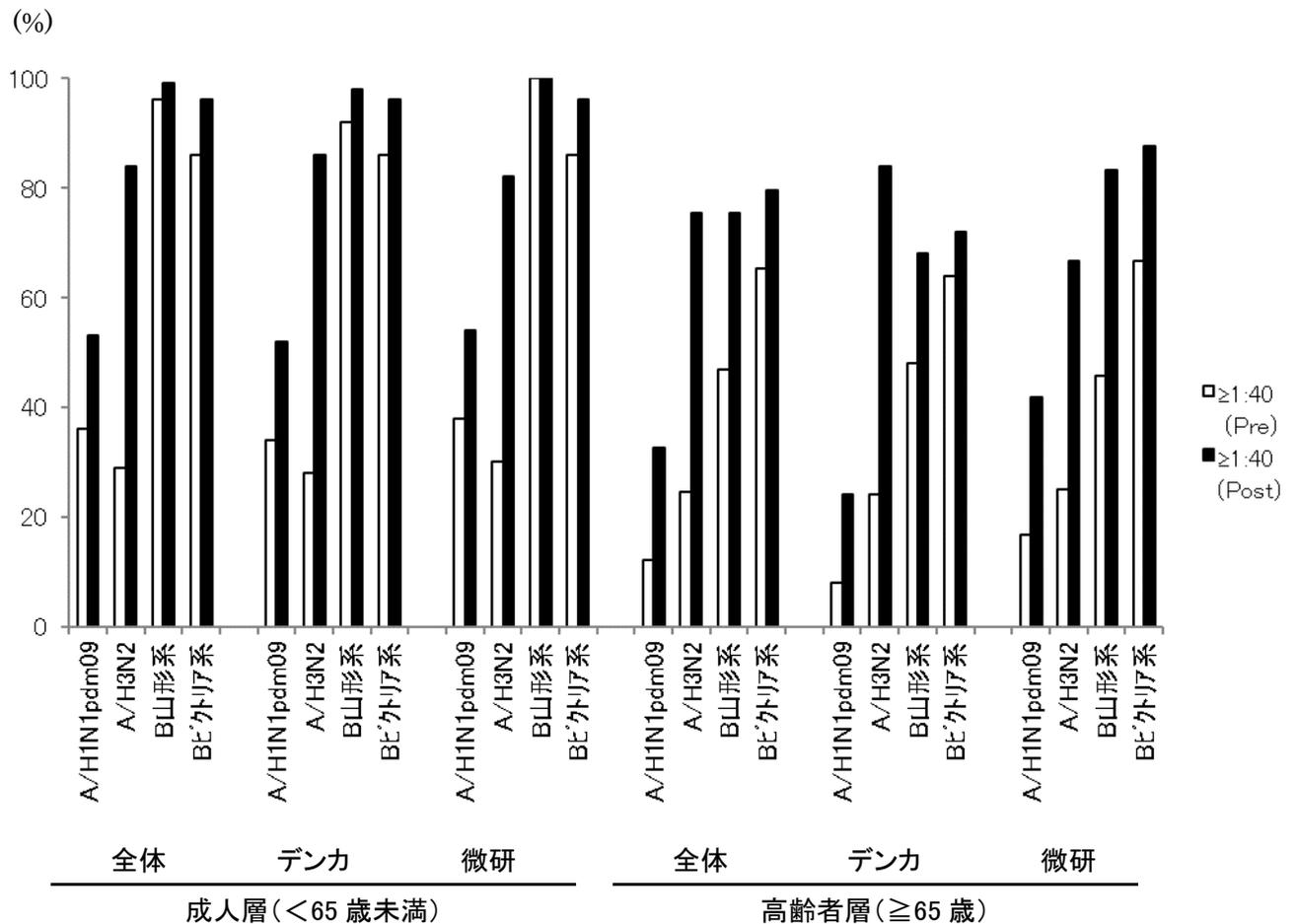
注: A/H1N1pdm09 は A/ブリスベン/02/2018 (IVR-190)、A/H3N2 は A/カンザス/14/2017 (X-327)

B 山形系は B/Phuket/3073/2013、B ビクトリア系統は B/ミレーランド/15/2016 (NYMC BX-69A)

表2 ワクチン接種後の抗体保有率の推移(成人層、高齢者層)

副反応 シーズン	発疹		発赤		腫れ		痛み		痒み		その他	
	2018/19	2019/20	2018/19	2019/20	2018/19	2019/20	2018/19	2019/20	2018/19	2019/20	2018/19	2019/20
全体	3	5	80	81	68	47	43	43	68	35	4	6
(%)	(2.1)	(3.4)	(55.6)	(54.4)	(47.2)	(31.5)	(29.9)	(28.9)	(47.2)	(23.5)	(2.8)	(4.0)
成人層 (≤65歳)	2	4	56	51	43	43	33	43	38	35	4	6
(%)	(2.2)	(4.0)	(62.9)	(51.0)	(48.3)	(43.0)	(37.1)	(43.0)	(42.7)	(35.0)	(4.5)	(6.0)
高齢者層 (>65歳)	1	1	24	30	25	4	10	0	30	0	0	0
(%)	(1.8)	(2.0)	(43.6)	(61.2)	(45.5)	(8.2)	(18.2)	(0.0)	(54.5)	(0.0)	(0.0)	(0.0)

図 ワクチン接種後の抗体保有率の推移(成人層、高齢者層)



高病原性鳥インフルエンザウイルスの性状解析に関する研究

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

協力研究者：有田知子、鈴木康司、高山郁代

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、鳥インフルエンザウイルスのリスク評価のため、またワクチン製造候補株選定のため、インドネシア国及びネパール国において、ヒトから分離された H5N1 型高病原性鳥インフルエンザウイルスの次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析及び抗原性解析を行った。その結果、解析に用いた H5N1 型高病原性鳥インフルエンザウイルスは、既存のワクチン製造候補株に対する抗血清に良く反応した。

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、2020年1月20日現在、17カ国で、861例の感染者数が確認され、そのうち455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。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。

本研究では、鳥インフルエンザウイルスのヒトへのリスク評価として、インドネシア国及び

ネパール国において、ヒトから分離された H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスの遺伝子解析、抗原性解析を実施した。

B. 研究方法

1) ウイルス：

高病原性鳥インフルエンザウイルス A(H5N1) A/Indonesia/NIHRD17109/2017（インドネシア株）、A/Nepal/19FL1997/2019（ネパール株）

これらのウイルスを発育鶏卵を用いて増殖させ、七面鳥赤血球（TRBC）を用いて赤血球凝集（HA）価を測定し、ストックした。

2) 全ゲノム解析：ウイルス全ゲノム解析は、次世代シーケンサーを使用して行った。ウイルス培養液から QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA を Multi-segment RT-PCR により増幅後、NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit for Illumina

(New England Biolabs)を使用して DNA ライブラリーを調製後、MiSeq (Illumina) にて解析した。得られた塩基配列は、CLC Genomics Workbench を使用して、リファレンス配列との Assemble を行い、コンセンサス配列の作成と変異解析を行った。

3) HI 試験：七面鳥赤血球 (TRBC) を用いて定法に基づいて行った。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

インドネシア国及びネパール国において、ヒトから分離された H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスを受け入れ、遺伝子解析及び抗原性解析を行った。

1) 遺伝子解析：

インドネシア株は、H5 Clade 2.3.2.1e に属することが分かった。本ウイルスは、これまでにインドネシアにおいて、トリから分離報告されている株と類似していた。

ネパール株については、H5 Clade 2.3.2.1a に属し、バングラデシュ国及びインド国等の南アジアにおいて、トリから分離報告されている株と類似していた。遺伝子解析結果から、哺乳動物において病原性が増強されると報告されている PB2 の 627K の変異が認められた。

2) 抗原性解析：

インドネシア株と同クレードにおけるワクチン製造候補株は、現在のところ、まだ作製されていない。そこで、Clade 2.3.2.1a に属するワクチン製造候補株である SJ007 (A/duck/Bangladesh/19097/2013) 株との反応性を調べた結果、インドネシア株は SJ007 株に対するフェレット抗血清に良く反応した。

ネパール株については、同クレードのワクチン製造候補株である SJ007 (A/duck/Bangladesh/19097/2013) 株に対するフェレット抗血清に良く反応した。さらに、2つ

の株を用いてフェレット抗血清を作製し、抗原性解析を行った結果、同クレードの株とも抗原性が異なる結果となった。

D. 考察

本研究において、解析に用いたネパール株は、既存のワクチン製造候補株である SJ007 株に対するフェレット抗血清に良く反応した。しかしながら、インドネシア株は、Clade 2.3.2.1e に属するワクチン製造候補株がなく、Clade 2.3.2.1a との反応性を調べた。本株との類似株の発生状況によっては、同クレードに属する新たな RG ワクチン製造候補株の必要性を示唆する結果となった。

E. 結論

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試験の一環として、インドネシア及びネパール国において分離された株の遺伝子解析及び抗原性解析を実施した。これらの国においては、未だヒト感染例が絶えず報告されていることから、今後も継続的なグローバル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, Ichikawa M, Morita H, Ogawa R, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Sugawara H, Sato A, Akimoto M, Mitamura K, Abe T, Yamazaki M, Watanabe S, Hasegawa H, Odagiri T. Human-to-Human Transmission of Influenza A(H3N2) Virus with Reduced Susceptibility to Baloxavir, Japan, February 2019. *Emerg Infect Dis.* 2019, 11, 25(11), 2108-2111
- Nakauchi M, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Ogawa R, Morita H, Miura H, Saito S, Watanabe S, Odagiri T, Kageyama

T. Rapid detection of an I38T amino acid substitution in influenza polymerase acidic subunit associated with reduced susceptibility to baloxavir marboxil. *Influenza Other Respir Viruses*. 2020, 2, doi: 10.1111/irv.12728

2. 学会発表

- Nakamura K, Akimoto M, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Kishida N, Sato A, Kuwahara T, Takashita E, Hasegawa H, Odagiri T, Watanabe S. Improved accuracy of antigenic characterization of recent influenza A/H3N2 isolates by modified focus reduction assay. *Options X for the control of influenza*. (Singapore) 2019. 8.
- Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Takahashi H, Sato K, Watanabe S, Odagiri T. Biological significance of neuraminidase of egg-adapted influenza A(H3N2) virus without amino acid substitutions in the antigenic sites of its hemagglutinin. *Options X for the control of influenza*. (Singapore) 2019. 8.
- 柴田明弘、原田理恵子、岡松正敏、松野啓太、有田知子、鈴木康司、白倉雅之、小田切孝人、竹前喜洋、内田裕子、西藤岳彦、迫田義博、尾坂優之。海外から持ち込まれた携帯品非加熱家きん畜産物から分離された H7N3 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスの性状解析。第 162 回日本獣医学会（つくば）2019 年 9 月
- Nakamura K, Akimoto M, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Kishida N, Sato A, Kuwahara T, Takashita E, Hasegawa H, Odagiri T, Watanabe S. Improved accuracy of antigenic characterization of recent influenza A/H3N2 isolates by modified focus reduction assay. 第 67 回日本ウイルス学会（東京）2019 年 10 月
- Nakauchi M, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Saito S, Takayama I, Watanabe S, Odagiri T, Kageyama T. Rapid detection of an I38T amino acid substitution in influenza polymerase acidic subunit associated with reduced susceptibility to baloxavir marboxil. 第 67 回日本ウイルス学会（東京）2019 年 10 月
- 高下恵美，藤崎誠一郎，白倉雅之，中村一哉，岸田典子，桑原朋子，三田村敬子，安倍隆，市川正孝，山崎雅彦，渡邊真治，小田切孝人，長谷川秀樹。2018/2019 シーズンにおける新規抗インフルエンザ薬バロキサビル耐性変異ウイルスの検出状況。第 51 回日本小児感染症学会（旭川）2019 年 10 月

ネパールで発生した A(H5N1)ウイルスのヒト感染例の診断

研究分担者 高山 郁代

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

本研究では、世界各地の鳥インフルエンザウイルスのヒト感染例における検体や分離ウイルスを解析し、日本における鳥インフルエンザウイルス感染のヒトでの発生に備えることを目的としている。本年度は、ネパールで 1 例目となる高病原性鳥インフルエンザ A(H5N1)ウイルスのヒト感染例について、臨床検体を入手し確定診断ならびに遺伝子解析を実施した。今回使用した診断検出系は、診断上の問題は見られず、流行株を感度良く検出できる系であることが確認された。

A. 研究目的

鳥インフルエンザウイルスのヒト感染例は日本国内では未だに確認されていないが、近年報告数は減少しているものの海外では散発的に報告されている。日本においても鳥インフルエンザウイルスがヒトに感染する可能性は十分に考えられるため、その対策は重要である。本研究では、日本における鳥インフルエンザウイルス感染のヒトでの発生に備えるため、直近に発生した世界各地の鳥インフルエンザウイルスのヒト感染例における臨床検体や分離ウイルスを入手し、解析・情報集積を行うものである。

B. 研究方法

2019 年 3 月にネパールで 1 例目となる高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒト感染例が報告された。本研究では、その臨床検体を入手し、診断や詳細な解析を実施した。

患者の咽頭スワブ検体は、2019 年 4 月中旬に日本に到着し、すぐにリアルタイム RT-PCR 法による型および HA 亜型同定検査を実施し、引き続き、次世代シーケンス法による NA 亜型の同定やその他の遺伝子解析を実施した。また、臨床検体から培養細胞ならびに鶏卵を用い

たウイルス分離を実施し、得られた分離株についても、リアルタイム RT-PCR 法による型・亜型の同定や次世代シーケンス法による詳細な遺伝子解析を行った。得られた遺伝子配列については、過去の同じクレードのウイルスの遺伝子配列と比較した。

（倫理面への配慮）

本研究で入手した臨床検体については、WHO の世界インフルエンザ・サーベイランス及び対応システム (GISRS) のネットワーク内で診断を目的として送付されたものであり、倫理面で配慮されたものである。

C. 研究結果

臨床検体を用いたリアルタイム RT-PCR 法の結果から、ウイルスは A(H5)亜型であることが診断された。また、引き続き実施した次世代シーケンス法による遺伝子解析から、今回の患者は A(H5N1)ウイルスに感染していたこと、また、そのウイルスの HA 遺伝子は配列上クレード 2.3.2.1a に分類されることが明らかとなった。

臨床検体を用いたリアルタイム RT-PCR 法の結果では、A(H5)亜型検出系の結果が TypeA 検出系の結果と比較して遅れが見られた。本来、

インフルエンザウイルスの遺伝子は A(H5)亜型検出系のターゲットである HA 遺伝子と TypeA 検出系のターゲットである M 遺伝子の数が理論上等しいことから、いずれも同程度の感度である A(H5)亜型検出系と TypeA 検出系ではほぼ同じ C_q 値が得られるはずである。今回の結果から、A(H5)亜型検出系のプライマーおよびプローブ領域に結果の遅れにつながる配列の不一致があるものと考え、ウイルスの遺伝子配列を調べた。しかし、結果の遅れにつながると考えられる変異は見つからなかった。一方で、分離株を用いたリアルタイム RT-PCR 法も実施したが、A(H5)亜型検出系の結果の遅れは、若干見られるものの大幅に小さくなった。以上の結果から、臨床検体中の HA 遺伝子が、保管状態の悪さなどの原因から M 遺伝子と比較してダメージをより受けて、PCR 反応の効率が低下したものと考えられた。分離株を用いても残る A(H5)亜型検出系の結果の遅れに関しては、現在も原因を考察中であるが、診断上問題となる遅れではなく、今回用いたリアルタイム RT-PCR 検出系は感度良く流行株を検出できる方法であることが確かめられた。

臨床検体ならびに分離株を用いた次世代シーケンシング法の結果では、ウイルスのアミノ酸配列の比較解析を実施したところ、HA タンパク質および PB2 タンパク質の配列で哺乳類に親和性を示す変異が見つかった。これらの変異は、分離株の継代歴が増えるほど、変異が占める割合が大きくなり、よりヒトに感染しやすくなっていると考えられた。

D. E. 考察ならびに結論

今回、ネパールで 1 例目となる A(H5N1)ウイルスのヒト感染例が検出された背景としては、2018 年 12 月から 2019 年 2 月にかけてインド北部の鳥の間で A(H5N1)ウイルスのアウトブレイクが発生していたことや 2019 年 2 月中旬以降にネパールの家禽や野鳥の間でこのウイルスが急速に流行していたことが挙げら

れる。今回、ヒト感染例から検出されたウイルスは、ネパール周辺国の鳥の間で流行し続けているクレード 2.3.2.1a のウイルスで、引き続き、この地域の国々では、A(H5N1)ウイルスへの感染リスクが大きいと考えられた。

今回、臨床検体の確定診断に用いたリアルタイム RT-PCR 法については、若干の問題が確認されたものの、感度・特異度の面から診断上問題なく、最新の流行株も検出できることが確認され、引き続き、WHO のホームページ内で情報公開を続けている。

F. 研究発表

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表
該当なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年
高下恵美	バロキサビルの耐性－基礎から	菅谷憲夫	インフルエンザ診療ガイド2019-20	日本医事新報社	日本	2019
齋藤玲子	ノイラミニダーゼ阻害薬の耐性	菅谷憲夫	インフルエンザ診療ガイド2019-20	日本医事新報社	日本	2019
長谷川秀樹	医療関係者のインフルエンザ対策	菅谷憲夫	インフルエンザ診療ガイド2019-20	日本医事新報社	日本	2019
長谷川秀樹・渡邊真治	Q&A	菅谷憲夫	インフルエンザ診療ガイド2019-20	日本医事新報社	日本	2019

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ/doi	出版年
Adachi Y, Tonouchi K, Nithichanon A, Kuraoka M, Watanabe A, Shinnakasu R, Asanuma H, Ainai A, Ohmi Y, Yamamoto T, Ishii KJ, Hasegawa H, Takeyama H, Lertmemongkolchai G, Kurosaki T, Ato M, Kelsoe G, Takahashi Y.	Exposure of an occluded hemagglutinin epitope drives selection of a class of cross-protective influenza antibodies.	Nat Commun.	10(1)	3883	2019
Feng H, Nakajima N, Wu L, Yamashita M, Lopes TJS, Tsuji M, Hasegawa H, Watanabe T, Kawaoka Y.	A Glycolipid Adjuvant, 7DW8-5, Enhances the Protective A Glycolipid Adjuvant, 7DW8-5, Enhances the Protective Immune Response to the Current Split Influenza Vaccine in Mice.	Front Microbiol.	10	2157	2019
K. Nakamura, Y. Harada, H. Takahashi, H. Trusheim, R. Bernhard, I. Hamamoto, A. Hirata-Saito, T. Ogane, K. Mizuta, N. Konomi, Y. Konomi, H. Asanuma, T. Odagiri, M. Tashiro, N. Yamamoto.	Systematic evaluation of suspension MDCK cells, adherent MDCK cells, and LLC-MK2 cells for preparing influenza vaccine seed virus.	Vaccine.	37(43)	6526-6534	2019
M. Ujie, K. Takada, M. Kiso, Y. Sakai-Tagawa, M. Ito, K. Nakamura, S. Watanabe, M. Imai, Y. Kawaoka	Long-term culture of human lung adenocarcinoma A549 cells enhances the replication of human influenza A viruses.	Journal of General Virology.	100(10)	1345-1349	2019

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ/doi	出版年
Takashita E, Ichikawa M, Morita H, Ogawa R, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Sugawara H, Sato A, Akimoto M, Mitamura K, Abe T, Yamazaki M, Watanabe S, Hasegawa H, Odagiri T.	Human-to-Human Transmission of Influenza A(H3N2) Virus with Reduced Susceptibility to Baloxavir, Japan, February 2019.	Emerg Infect Dis.	25(11)	2108-2111	2019
Tomoko Kuwahara, Seiya Yamayoshi, Takeshi Noda, Yoshihiro Kawaoka	G Protein Pathway Suppressor 1 Promotes Influenza Virus Polymerase Activity by Activating the NF-κB Signaling Pathway.	mBio.	10(6)	e02867-19	2019
Imai M, Yamashita M, Sakai-Tagawa Y, Iwatsuki-Horimoto K, Kiso M, Murakami J, Yasuhara A, Takada K, Ito M, Nakajima N, Takahashi K, Lopes TJS, Dutta J, Khan Z, Kriti D, van Bakel H, Tokita A, Hagiwara H, Izumida N, Kuroki H, Nishino T, Wada N, Koga M, Adachi E, Jubishi D, Hasegawa H, Kawaoka Y.	Influenza A variants with reduced susceptibility to baloxavir isolated from Japanese patients are fit and transmit through respiratory droplets.	Nat Microbiol.	5(1)	27-33	2020
Sato M, Takashita E, Katayose M, Nemoto K, Sakai N, Hashimoto K, Hosoya M.	Detection of variants with reduced baloxavir marboxil susceptibility after treatment of children with influenza A during the 2018/2019 influenza season.	J Infect Dis.		doi: 10.1093/infdis/ji aa061	2020

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ/doi	出版年
Nakauchi M, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Ogawa R, Morita H, Miura H, Saito S, Watanabe S, Odagiri T, Kageyama T.	Rapid detection of an I38T amino acid substitution in influenza polymerase acidic subunit associated with reduced susceptibility to baloxavir marboxil.	Influenza Other Respir Viruses.		doi: 10.1111 /irv.127 28	2020
Takashita E.	Influenza Polymerase Inhibitors: Mechanisms of Action and Resistance.	Cold Spring Harb Perspect Med.		doi: 10.1101 /cshpers pect.a03 8687	2020
Kyaw Win SM, Saito R, Win NC, Lasham DJ, Kyaw Y, Lin N, Thein KN, Chon I, Odagiri T, Thein W, Kyaw LL, Tin OS, Saitoh A, Tamura T, Hirokawa C, Uchida Y, Saito T, Watanabe S, Odagiri T, Kamata K, Osada H, Dapat C, Watanabe H, Tin HH.	Epidemic of influenza A(H1N1)pdm09 analyzed by full genome sequences and the first case of oseltamivir-resistant strain in Myanmar 2017.	PLoS One.	15(3)	e022960 1. doi: 10.1371 /journal. pone.02 29601	2020
Takashita E, Daniels RS, Fujisaki S, Gregory V, Gubareva LV, Huang W, Hurt AC, Lackenby A, Nguyen HT, Pereyaslov D, Roe M, Samaan M, Subbarao K, Tse H, Wang D, Yen HL, Zhang W, Meijer A.	Global update on the susceptibilities of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors and the cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir, 2017-2018.	Antiviral Res.	175	104718	2020
高下恵美、森田博子、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、秋元未来、佐藤彩、菅原裕美、渡邊真治、小田切孝人	2018/19シーズン バロキサビル耐性変異株検出状況の中間報告	IASR	40	86-87	2019

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ/doi	出版年
高下恵美、小川理恵、森田博子、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、秋元未来、佐藤彩、菅原裕美、渡邊真治、小田切孝人、矢野拓弥、赤地重宏、松村義晴、落合仁、川上千春、清水耕平、小澤広規、宇宿秀三、田中伸子、大久保一郎、太田陽、富樫勇人、田中文子、齋藤綾子、市川正孝、三田村敬子、安倍隆、山崎雅彦	全国地方衛生研究所. 新規抗インフルエンザ薬バロキサビル未投与患者からのバロキサビル耐性変異ウイルスの検出	IASR	40	67-69	2019
高下恵美、森田博子、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、長谷川秀樹、市川正孝、三田村敬子、安倍隆、山崎雅彦	全国地方衛生研究所. バロキサビル耐性変異ウイルスのヒトからヒトへの感染伝播	IASR	40	197-199	2019

令和2年4月17日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 脇田 隆幸



次の職員の令和元年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業
- 2. 研究課題名 新型及び季節性インフルエンザに係る流行株の予測等に資するサーベイランス及びゲノム解析に関する研究
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) インフルエンザウイルス研究センター・センター長
(氏名・フリガナ) 長谷川 秀樹 (ハセガワ ヒデキ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	--

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和2年 3月 25日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立大学法人新潟大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 牛木 辰男 印



次の職員の令和元年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業
- 2. 研究課題名 新型及び季節性インフルエンザに係る流行株の予測等に資するサーベイランス及びゲノム解析に関する研究
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 医歯学系 教授
(氏名・フリガナ) 齋藤 玲子 (サイトウ レイコ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	国立感染症研究所	<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する口にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症研究所
 所属研究機関長 職名 所長
 氏名 脇田 隆幸



次の職員の令和元年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業
2. 研究課題名 新型及び季節性インフルエンザに係る流行株の予測等に資するサーベイランス及びゲノム解析に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) インフルエンザウイルス研究センター・室長
 (氏名・フリガナ) 渡邊 真治・ワタナベ シンジ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立感染症研究所	<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
 ・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症研究所
 所属研究機関長 職名 所長
 氏名 脇田 隆子



次の職員の令和元年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業
2. 研究課題名 新型及び季節性インフルエンザに係る流行株の予測等に資するサーベイランス及びゲノム解析に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) インフルエンザウイルス研究センター・主任研究官
 (氏名・フリガナ) 高下 恵美・タカシタ エミ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
 ・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症研究所
 所属研究機関長 職名 所長
 氏名 脇田 隆子



次の職員の令和元年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業
2. 研究課題名 新型及び季節性インフルエンザに係る流行株の予測等に資するサーベイランス及びゲノム解析に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) インフルエンザウイルス研究センター・主任研究官
 (氏名・フリガナ) 岸田 典子・キンダ ノリコ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立感染症研究所	<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
 ・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症研究所
 所属研究機関長 職名 所長
 氏名 脇田 隆平



次の職員の令和元年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業
2. 研究課題名 新型及び季節性インフルエンザに係る流行株の予測等に資するサーベイランス及びゲノム解析に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) インフルエンザウイルス研究センター・主任研究官
 (氏名・フリガナ) 中村 一哉・ナカムラ カズヤ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立感染症研究所	<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
 ・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 脇田 隆幸



次の職員の令和元年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業
2. 研究課題名 新型及び季節性インフルエンザに係る流行株の予測等に資するサーベイランス及びゲノム解析に関する研究
3. 研究者名 インフルエンザウイルス研究センター 主任研究員

かきまき せいいちろう
 藤崎 誠一郎

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
 ・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症研究所
 所属研究機関長 職名 所長
 氏名 脇田 隆宇



次の職員の令和元年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業
2. 研究課題名 新型及び季節性インフルエンザに係る流行株の予測等に資するサーベイランス及びゲノム解析に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) インフルエンザウイルス研究センター・主任研究官
 (氏名・フリガナ) 白倉 雅之・シラクラ マサユキ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。
 (※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

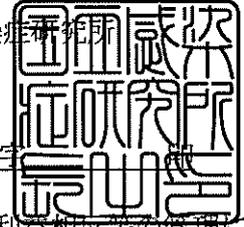
6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する口々にチェックを入れること。
 ・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症研究所
 所属研究機関長 職名 所長
 氏名 脇田 隆子



次の職員の令和元年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業
2. 研究課題名 新型及び季節性インフルエンザに係る流行株の予測等に資するサーベイランス及びゲノム解析に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) インフルエンザウイルス研究センター・主任研究官
 (氏名・フリガナ) 高山 郁代・タカヤマ イクヨ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
 ・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症研究所
 所属研究機関長 職名 所長
 氏名 脇田 隆子



次の職員の令和元年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業
2. 研究課題名 新型及び季節性インフルエンザに係る流行株の予測等に資するサーベイランス及びゲノム解析に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) インフルエンザウイルス研究センター・招聘型主任研究官
 (氏名・フリガナ) 桑原 朋子・クワハラ トモコ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立感染症研究所	<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
 ・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。