

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

平成 30 年度-令和 2 年度 総合研究報告書

研究代表者 長谷川秀樹
令和 3 年 (2021) 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 長谷川 秀樹	4
---	---

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	12
インフルエンザ分離株サーベイランス抗原性解析手法の改良と実践 中村 一哉	16
A(H1N1)pdm09 およびB型インフルエンザウイルスの赤血球凝集阻止試験をもちいた抗原性解析 岸田 典子	29
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	34
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	38
抗インフルエンザ薬耐性株の発生動向調査ならびに薬剤耐性株検出系の外部精度管理による監視体制の強化 高下 恵美	42
成人層および高齢者層に対する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 (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)	49
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	56
動物由来ウイルスの遺伝子検査法の整備 高山 郁代	61
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 別紙4 研究成果の刊行に関する一覧表	66

I. 総括研究報告書

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

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・呼吸器系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、流行株の収集と解析方法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ウイルス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。

- 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, 2020/2021 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、2020-2021 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, 202/2021 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 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。
- ⑦ 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。

E. 結論

- ウイルス分離・増殖効率を改善する細胞株の探索を継続した。
- A/H3N2 亜型分離株抗原性解析法に感染細胞巢減数試験法 (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し検証した。
- 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, 2020-2021 年シーズンにおけるインフルエンザワクチンの効果を調査した。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. 研究発表

- ・ Ariyoshi T, Tezuka J, Yasudo H, Sakata Y, Nakamura T, Matsushige T, [Hasegawa H](#), Nakajima N, Ainai A, Oga A, Itoh H, Shirabe K, Toda S, Atsuta

R, Ohga S, Hasegawa S. Enhanced airway hyperresponsiveness in asthmatic children and mice with A(H1N1)pdm09 infection. *Immun Inflamm Dis.* 2021 1

- ・ Sano K, Saito S, Suzuki T, Kotani O, Ainai A, van Riet E, Tabata K, Saito K, Takahashi Y, Yokoyama M, Sato H, Maruno T, Usami K, Uchiyama S, Ogawa-Goto K, [Hasegawa H](#). An influenza HA stalk reactive polymeric IgA antibody exhibits anti-viral function regulated by binary interaction between HA and the antibody. *PLoS One.* 2021 1, 16(1), e0245244.
- ・ Yamazaki T, Biswas M, Kosugi K, Nagashima M, Inui M, Tomono S, Takagi H, Ichimonji I, Nagaoka F, Ainai A, [Hasegawa H](#), Chiba J, Akashi-Takamura S. A Novel Gene Delivery Vector of Agonistic Anti-Radioprotective 105 Expressed on Cell Membranes Shows Adjuvant Effect for DNA Immunization Against Influenza. *Front Immunol.* 2020 12, 11, 606518
- ・ Abe M, Katano H, Nagi M, Higashi Y, Sato Y, Kikuchi K, [Hasegawa H](#), Miyazaki Y. Potency of gastrointestinal colonization and virulence of *Candida auris* in a murine endogenous candidiasis. *PLoS One.* 2020 12, 15(12), e0243223.
- ・ Nakano T, Ohara Y, Fujita H, Ainai A, Yamamura ET, Suzuki T, [Hasegawa H](#), Sone T, Asano K. Double-Stranded Structure of the Polyinosinic-Polycytidylic Acid Molecule to Elicit TLR3 Signaling and Adjuvant Activity in Murine Intranasal A(H1N1)pdm09 Influenza Vaccination. *DNA Cell Biol.* 2020 9, 39(9), 1730-1740
- ・ Huddleston J, Barnes JR, Rowe T, Xu X, Kondor R, Wentworth DE, Whittaker L, Ermetal B, Daniels RS, McCauley JW, Fujisaki S, Nakamura K, Kishida N, Watanabe S, [Hasegawa H](#), Barr I, Subbarao K, Barrat-Charlaix P, Neher RA, Bedford T. Integrating genotypes and phenotypes improves long-term forecasts of seasonal influenza A/H3N2 evolution. *Elife.* 2020 9, 9, e60067

- Fukuyama S, Iwatsuki-Horimoto K, Kiso M, Nakajima N, Gregg RW, Katsura H, Tomita Y, Maemura T, da Silva Lopes TJ, Watanabe T, Shoemaker JE, Hasegawa H, Yamayoshi S, Kawaoka Y. Pathogenesis of Influenza A(H7N9) Virus in Aged Nonhuman Primates. *J Infect Dis.* 2020 9, 222(7), 1155-1164
- Takashita E, Yasui Y, Nagata S, Morita H, Fujisaki S, Miura H, Shirakura M, Kishida N, Nakamura K, Kuwahara T, Sugawara H, Sato A, Akimoto M, Kaido T, Watanabe S, Hasegawa H; Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Detection of a Peramivir-Resistant Influenza B/Yamagata-Lineage Virus Imported from Indonesia in Aichi, Japan, March 2019. *Jpn J Infect Dis.* 2020 9, 73(5), 386-390
- Takashita E, Abe T, Morita H, Nagata S, Fujisaki S, Miura H, Shirakura M, Kishida N, Nakamura K, Kuwahara T, Mitamura K, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Hasegawa H, Influenza Virus Surveillance Group of Japan, Influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting reduced susceptibility to baloxavir due to a PA E23K substitution detected from a child without baloxavir treatment. *Antiviral Res.* 2020 8, 180, 104828
- Emi-Sugie M, Shoda T, Futamura K, Takeda T, Aina A, Hasegawa H, Saito H, Matsumoto K, Matsuda A. Robust production of IL-33 and TSLP by lung endothelial cells in response to low-dose dsRNA stimulation. *J Allergy Clin Immunol.* 2020 4, S0091-6749(20), 30570-4
- Aina 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 4, 64(4), 313-325
- 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, Aina 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
- Aina 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
 - Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Kawaoka Y, Watanabe S, Odagiri T. Isolation of an Egg-Adapted Influenza A(H3N2) Virus without Amino Acid Substitutions at the Antigenic Sites of Its Hemagglutinin. Jpn J Infect Dis. , 71(3), 234-238, 2018
 - Tanikawa T, Uchida Y, Takemae N, Tsunekuni R, Mine J, Liu MT, Yang JR, Shirakura M, Watanabe S, Odagiri T, Saito T. Pathogenicity of two novel human-origin H7N9 highly pathogenic avian influenza viruses in chickens and ducks. Archives of Virology 164(2), 535-545, 2018
 - Lackenby A, Besselaar TG, Daniels RS, Fry A, Gregory V, Gubareva LV, Huang W, Hurt AC, Leang SK, Lee RTC, Lo J, Lollis L, Maurer-Stroh S, Odagiri T, Pereyaslov D, Takashita E, Wang D, Zhang W, Meijer A. Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors and status of novel antivirals, 2016-2017. Antiviral Res., 157 , 38-46 , 2018
 - Takashita E, Morita H, Ogawa R, Nakamura K, Fujisaki S, Shirakura M, Kuwahara T, Kishida N, Watanabe S, Odagiri T. Susceptibility of influenza viruses to the novel cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir marboxil. Front Microbiol. , 6;9, 3026, 2018
 - Yoshihara K, Le MN, Toizumi M, Nguyen HA, Vo HM, Odagiri T, Fujisaki S, Ariyoshi K, Moriuchi H, Hashizume M, Dang DA, Yoshida LM. Influenza B associated paediatric acute respiratory infection hospitalization in central vietnam. Influenza Other Respir Viruses. , 13(3) , 248-261 , 2018
 - Takashita E, Kawakami C, Morita H, Ogawa R, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Odagiri T. On Behalf Of The Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Detection of influenza A(H3N2) viruses exhibiting reduced susceptibility to the novel cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir in Japan, December 2018. Euro Surveill. , 24(3), 2019
 - Takashita E, Kawakami C, Ogawa R, Morita H, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Ota A, Togashi H, Saito A, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Odagiri T. Influenza A(H3N2) virus exhibiting reduced susceptibility to baloxavir due to a polymerase acidic subunit I38T substitution detected from a hospitalised child without prior baloxavir treatment, Japan, January 2019. Euro Surveill. , 24(12), 2019
 - Saito S, Nakauchi M, Takayama I, Nagata S, Odagiri T, Kageyama T Development and Evaluation of New Real-time RT-PCR Assays for Identifying the Influenza A Virus Cluster IV H3N2 Variant. Jpn J Infect Dis. , 72(2), 127-129, 2019
2. 学会発表
- 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
 - 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、東京

- 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、東京
- 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、東京
- 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パ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
- 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.
- Watanabe S, Nakamura K, Fujisaki S, Shirakura M, Takashita E, Kuwahara T, Kishida N, Sato A, Akimoto M, Miura H, Ogawa R, Sugawara H, Watanabe K, Morita H, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Odagiri T, The Influenza Surveillance Group of Japan. Characterizations of circulating influenza viruses in the 2017/18 season and selection of vaccine viruses for the 2018/19 season. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会 2018 年 10 月
- Takashita E, Fujisaki S, Yokoyama M, Shirakura M, Nakamura K, Kuwahara T, Kishida N, Sato H, Watanabe S, Odagiri T, The Influenza Virus Surveillance Group of Japan. In vitro characterization of multidrug-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses carrying a dual amino acid substitution associated with reduced susceptibility to neuraminidase inhibitors. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会 2018 年 10 月
- Asanuma H, Ainai A, Ujike M, Fujisaki S, Shirakura M, Watanabe S, Nagata N, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M. Increased pathogenicity in mice of a mouse-adapted influenza H7N9 virus was associated with delayed host innate immune responses. 6th International Influenza meeting (Munster, Germany) 2018.9.
- Takashita E, Morita H, Ogawa R, Nakamura K, Fujisaki S, Shirakura M, Kuwahara T, Kishida N, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Odagiri T. Susceptibility of influenza viruses to the novel cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir marboxil. The 6th ISIRV-AVG Conference (Washington DC, USA), Nov/2018
- Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Kawaoka Y, Watanabe S, Odagiri T. Isolation of egg-adapted influenza A(H3N2) virus without amino acid substitutions in the antigenic sites of its hemagglutinin. NSV Symposium 2018 (Verona, Italy), Jun/2018
- Takashita E, Fujisaki S, Yokoyama M, Shirakura M, Nakamura K, Kuwahara T, Kishida N, Sato H, Watanabe S, Odagiri T, The Influenza Virus

Surveillance Group of Japan. In vitro characterization of multidrug-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses carrying a dual amino acid substitution associated with reduced susceptibility to neuraminidase inhibitors. NSV Symposium 2018 (Verona, Italy), Jun/2018

- ・ 渡邊真治、桑原朋子、高下恵美、白倉雅之、藤崎誠一郎、三浦秀佳、秋元未来、中村一哉、岸田典子、佐藤彩、小川理恵、菅原裕

美、小田切孝人 鶏卵分離埼玉株 NA で認められたアミノ酸変異の生物学的意義 第 32 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム、2018 年 6 月

・
G. 知的財産権の出願・登録状況

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

季節性インフルエンザウイルスの分離にはイヌ腎由来株化細胞 [Madin-Darby Canin Kidney (MDCK) 細胞] が慣習的に使用されているが、近年、特に A/H3N2 亜型ウイルスについて、MDCK 細胞を用いた分離・増殖の効率低下の傾向が報告されている。そこで本研究では、季節性インフルエンザウイルス全般の分離・増殖効率を改善する可能性のある細胞株の性状解析を行った。

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、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（いずれも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。季節性インフルエンザウイルスは、上気道でよく増殖することから、筆者はヒト呼吸器系、特に上気道由来の株化細胞に着目し、咽頭由来上皮株化細胞 Detroit 562 細胞および鼻中隔由来扁平上皮株化細胞 RPMI2650 細胞における季節性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

季節性インフルエンザウイルスは、細胞表面上のいわゆるヒト型レセプターに結合し感染を成立させる。これまでの研究から、ヒトの咽頭ではヒト型レセプターが多く発現していることが報告されている。そこで、株化細胞である Detroit562 細胞上におけるヒト型および鳥型レセプターの発現について、MDCK 細胞と比較した。その結果、Detroit562 細胞では、MDCK 細胞と比較してヒト型レセプターを多く発現しているが、鳥型レセプターは少ないことが分かった。また一般にインフルエンザウイルスはその出芽・放出において、上皮細胞の頂端側から出芽・放出される。そこで Detroit562 細胞は株化細胞ではあるが極性を有するどうか調べた。その結果、Detroit562 細胞は、細胞

極性を有することが知られている MDCK 細胞と同様に細胞極性の指標となるタイトジャンクションのマーカ蛋白質を明瞭に発現しており、極性を有することが明らかとなった。

次に、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) について、Detroit562 細胞および RPMI2650 細胞での増殖性を検討した。その結果、いずれの細胞株でも増殖することが明らかとなった。しかしながら増殖効率は、一般に使われている MDCK 細胞 (hCK 細胞) と比較して、Detroit562 細胞では低く、RPMI2650 細胞では同程度であった。

D. 考察

ヒト上気道由来の細胞 (鼻中隔由来扁平上皮株化細胞 RPMI2650 細胞) で、従来使われている MDCK 細胞と同程度の増殖性を示した事は、自然界での季節インフルエンザウイルスの生態系により近い細胞環境において、ウイルス分離・増殖を実施することが可能なことを示唆している。今後は、検体からの分離効率や分離されたウイルスの遺伝子にある変異を調べ、実際のサーベイランスに活用できるかどうかを検討する予定である。

E. 結論

ヒト上気道由来株化細胞において、従来使用されている MDCK 細胞 (hCK 細胞) と同程度の季節性ウイルスの増殖性を示した。自然界での季節性ウイルスの生態系に近い細胞環境での増殖と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Takashita E, Yasui Y, Nagata S, Morita H, Fujisaki S, Miura H, Shirakura M, Kishida N, Nakamura K, Kuwahara T, Sugawara H, Sato A, Akimoto M, Kaido T, Watanabe S, Hasegawa H; Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Detection of a

Peramivir-Resistant Influenza B/Yamagata-Lineage Virus Imported from Indonesia in Aichi, Japan, March 2019. *Jpn J Infect Dis.* 2020 9, 73(5), 386-390

- Huddleston J, Barnes JR, Rowe T, Xu X, Kondor R, Wentworth DE, Whittaker L, Ermetal B, Daniels RS, McCauley JW, Fujisaki S, Nakamura K, Kishida N, Watanabe S, Hasegawa H, Barr I, Subbarao K, Barrat-Charlaix P, Neher RA, Bedford T. Integrating genotypes and phenotypes improves long-term forecasts of seasonal influenza A/H3N2 evolution. *Elife.* 2020 9, 9, e60067
- Takashita E, Fujisaki S, Yokoyama M, Shirakura M, Morita H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Sato H, Doi I, Sato Y, Takao S, Shimazu Y, Shimomura T, Ito T, Watanabe S, Odagiri T, The Influenza Virus Surveillance Group Of Japan. In Vitro Characterization of Multidrug-Resistant Influenza A(H1N1)pdm09 Viruses Carrying a Dual Neuraminidase Mutation Isolated from Immunocompromised Patients. *Pathogens.* 2020 9, 9(9), 725
- Takashita E, Abe T, Morita H, Nagata S, Fujisaki S, Miura H, Shirakura M, Kishida N, Nakamura K, Kuwahara T, Mitamura K, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Hasegawa H, Influenza Virus Surveillance Group of Japan, Influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting reduced susceptibility to baloxavir due to a PA E23K substitution detected from a child without baloxavir treatment. *Antiviral Res.* 2020 8, 180, 104828
- 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), e0229601doi: 10.1371/journal.pone.0229601
 - Takashita E, Kawakami C, Morita H, Ogawa R, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Odagiri T, On Behalf Of The Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Detection of influenza A(H3N2) viruses exhibiting reduced susceptibility to the novel cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir in Japan, December 2018. *Euro Surveill.* ,24(3),op,2019
 - Kawakami C, Yamayoshi S, Akimoto M, Nakamura K, Miura H, Fujisaki S, Pattinson DJ, Shimizu K, Ozawa H, Momoki T, Saikusa M, Yasuhara A, Usuku S, Okubo I, Toyozawa T, Sugita S, Smith DJ, Watanabe S, Kawaoka Y. Genetic and antigenic characterisation of influenza A(H3N2) viruses isolated in Yokohama during the 2016/17 and 2017/18 influenza seasons. *Euro Surveill.* , 24(6) , op , 2019
 - Takashita E, Morita H, Ogawa R, Nakamura K, Fujisaki S, Shirakura M, Kuwahara T, Kishida N, Watanabe S, Odagiri T. Susceptibility of influenza viruses to the novel cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir marboxil. *Front Microbiol.* ,6;9,3026,2018
 - Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Kawaoka Y, Watanabe S, Odagiri T. Isolation of an Egg-Adapted Influenza A(H3N2) Virus without Amino Acid Substitutions at the Antigenic Sites of Its Hemagglutinin. *Jpn J Infect Dis.* ,71(3),234-238,2018
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、東京
 - 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、東京
 - 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、東京

- 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、東京
- Watanabe S, Nakamura K, Fujisaki S, Shirakura M, Takashita E, Kuwahara T, Kishida N, Sato A, Akimoto M, Miura H, Ogawa R, Sugawara H, Watanabe K, Morita H, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Odagiri T, The Influenza Surveillance Group of Japan. Characterizations of circulating influenza viruses in the 2017/18 season and selection of vaccine viruses for the 2018/19 season. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会 2018 年 10 月、京都
- Takashita E, Fujisaki S, Yokoyama M, Shirakura M, Nakamura K, Kuwahara T, Kishida N, Sato H, Watanabe S, Odagiri T, The Influenza Virus Surveillance Group of Japan.
- In vitro characterization of multidrug-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses carrying a dual amino acid substitution associated with reduced susceptibility to neuraminidase inhibitors. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会 2018 年 10 月、京都
- Takashita E, Morita H, Ogawa R, Nakamura K, Fujisaki S, Shirakura M, Kuwahara T, Kishida N, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Odagiri T. Susceptibility of influenza viruses to the novel cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir marboxil. The 6th ISIRV-AVG Conference (Washington DC, USA), Nov/2018
- Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Kawaoka Y, Watanabe S, Odagiri T. Isolation of

egg-adapted influenza A(H3N2) virus without amino acid substitutions in the antigenic sites of its hemagglutinin. NSV Symposium 2018 (Verona, Italy), Jun/2018

- Takashita E, Fujisaki S, Yokoyama M, Shirakura M, Nakamura K, Kuwahara T, Kishida N, Sato H, Watanabe S, Odagiri T, The Influenza Virus Surveillance Group of Japan. In vitro characterization of multidrug-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses carrying a dual amino acid substitution associated with reduced susceptibility to neuraminidase inhibitors. NSV Symposium 2018 (Verona, Italy), Jun/2018
- 渡邊真治、桑原朋子、高下恵美、白倉雅之、藤崎誠一郎、三浦秀佳、秋元未来、中村一哉、岸田典子、佐藤彩、小川理恵、菅原裕美、小田切孝人 鶏卵分離埼玉株 NA で認められたアミノ酸変異の生物学的意義 第 32 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム、2018 年 6 月、香川

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

インフルエンザ分離株サーベイランス抗原性解析手法の改良と実践

研究分担者 中村一哉

国立感染症研究所・インフルエンザウイルス研究センター・主任研究官

研究要旨

有効性の高いインフルエンザワクチンの製造、供給には流行株の性状を正確に捉え、流行株の抗原性に一致したウイルス株をワクチン製造用株として選定することが肝要である。近年の 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）試験での抗原性解析が行えず、中和試験法およびその改良変法であるウイルス感染細胞巢減数試験法（Microneutralizing/Focus Reduction Assay, MN/FRA）を HI 試験の代替法として用いている。一方で A/H3N2 亜型ウイルスは MDCK 細胞で分離増殖した際にノイラミニダーゼ（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が報告されており、この NA D151X による感染性増強効果が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可能性が明らかとなった。本研究では、NA D151X の抗原性評価への影響の排除に上述 MN/FRA の中和反応時にオセルタミビルを添加することが有用であることを示し、MN/FRA による HA の抗原性評価の精度工場ならびに A/H3N2 亜型野外流行株の抗原性状の正確な捕捉に寄与した。

A. 研究目的

インフルエンザウイルスはその性状を変化させ続け、毎時期のワクチン戦略に常に懸案をもたらす。インフルエンザ流行株の性状を時期に即して正確に捕捉することはインフルエンザ感染制御戦略において基本的かつ肝要な事項である。特に流行株の抗原性を解析し、これに合致したウイルス株をワクチン製造に供することを目的にウイルス株サーベイランスが国内外の連携の下精力的に行われている。2014 年春季以降 HA による赤血球凝集活性が極めて低く、HI 試験を用いた抗原性解析に供試できない A/H3N2 亜型株が急速に分布を広げたことを受け、近年では中和試験法およびその

改良変法であるウイルス感染細胞巢減数試験法（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。一方で A/H3N2 亜型ウイルスは MDCK 細胞で分離増殖した際にノイラミニダーゼ（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が報告されている。この NA D151X によるウイルス感染性増強作用はフェレット抗血清によって中和されることなく、ヘマグルチニン（HA）抗原性評価の指標となる中和抗体価を意図せず低下させることにより、HA の正確な抗原性評価を妨げ

ている可能性が考えられた。本研究では MN/FRA による A/H3N2 亜型分離株抗原性解析における NA D151X が試験結果に与える影響を検証する。また、NA D151X のレセプター結合阻害効果が認められているオセルタミビルについて、中和反応時のオセルタミビル添加の NA D151X による抗原性評価への影響排除効果を検討し、MN/FRA での抗原性解析試験の精度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

1) 細胞株

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

2) 供試ウイルス株

2016 年秋から 2020 年秋期に 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 0.5 ml 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、100.5 倍階段希釈列を作製し、前日に SIAT 1 細胞を 2.5x10⁴/ウェル播種、一晚培養した 96 穴プレートの各ウェルに添加した。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。オセルタミビル添加試験ではウイルス希釈列作製用培地にオセルタミビルを各濃度で添加した。18-20 時間、34°C の CO₂ インキュベーター内で培養後、被験プレートを固定、細胞透過処理後、抗インフルエンザウイルス NP 抗体とペロキシダーゼ標識 2 次抗体を用いた酵素免疫抗体法により、ウイルス感染細胞巣 (focus) を呈色させ、形成 focus を ImmunoSpot アナライザー (CTL 社) を用いて自動計数した。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

参照血清の 2 倍階段希釈列を作製し、前日に SIAT 1 細胞を 2.5x10⁴/ウェル播種、一晚培養した 96 穴プレートの各ウェルに添加した。これに一定量のウイルス液を加え、1 時間の中和反応後、半流動体ゲル Avicel® を各ウェルに添加した。オセルタミビル添加試験では血清希釈列作製用培地ならびに中和反应用ウイルス液にオセルタミビルを各濃度で添加した。18-20 時間、34°C の CO₂ インキュベーター内で培養後、被験プレートを固定、細胞透過処理を行い、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、被験抗血清と供試株の 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) を示す傾向にある。例えば HA 遺伝子グループ 3C.2a2 に属する抗 A/Kanagawa/IC1618/2017 株血清は同じ遺伝子グループに属する供試株に対して抗体価 2560 程度の高い反応性を示したが、一部株に対しては低い抗体価を確認できた。この反応性の低下は HA のアミノ酸置換の状況や、抗原性に影響を与え得る糖鎖付加の有無とは相関していなかった。一方で NA D151X の有無と抗体価の大小に一定の相関が認められたため、この抗体価の低下はフェレット抗血清では中和されない NA D151X によるウイルス感染性増強作用が原因で生じていると推察された。

表 1 MN/FRA 従来法による A/H3N2 亜型株抗原性解析結果の一例

株名	CL3C.3a	CL3C.2a		CL3C.2a1	CL3C.2a2	HA 遺伝子グループ	HA アミノ酸置換	HA158-160位アミノ酸の 糖鎖脱落	NA D151X 置換
	Switz/+++ SIAT	HK/4801 SIAT	HK/7127 SIAT	Singap/INF Cell	Kanagawa/ IC1618 Egg				
参照株									
A/Switzerland/9715293/2013	320	160	40	40	<20	3C.3a		-	-
A/Hong Kong/4801/2014	2560	2560	2560	160	160	3C.2a		-	✓
A/Hong Kong/4801/2014 (X-263)	80	1280	1280	320	2560	3C.2a	L194P, D225N	✓	-
A/Hong Kong/7127/2014	160	320	320	80	80	3C.2a		-	✓
A/YOKOHAMA/138/2017	20	80	160	320	80	3C.2a4		-	✓
A/OSAKA/163/2017	160	640	320	160	20	3C.2a1b		-	-
A/SINGAPORE/INFMH-16-0019/2016	80	640	640	640	20	3C.2a1		-	-
A/SINGAPORE/INFMH-16-0019/2016 (IVR-186)	160	640	320	320	1280	3C.2a1	L194P,D225G	✓	-
A/KANAGAWA/IC1618/2017	20	320	640	160	2560	3C.2a2	L194P,T203I*	✓	-
試験株									
A/EHIME/27/2018	320	1280	1280	640	2560	3C.2a2	A212T*	-	-
A/KANAGAWA/AC1737/2018	320	1280	1280	640	2560	3C.2a2	A212T*	-	-
A/KANAGAWA/IC1745/2018	320	1280	1280	640	2560	3C.2a2	A212T*	-	-
A/KANAGAWA/AC1736/2018	320	1280	320	640	40	3C.2a1b+135N		-	-
A/WAKAYAMA/62/2018	40	1280	1280	640	2560	3C.2a2	A212T*,E62K	-	-
A/AOMORI/31/2018	20	1280	1280	320	2560	3C.2a2	A212T*,E62K	✓	-
A/CHIBA-C/43/2018	40	320	320	320	640	3C.2a2	A212T*	-	✓
A/KITAKYUSYU/2/2018	40	320	640	320	1280	3C.2a2	A212T*	✓	-
A/KANAGAWA/AC1732/2018	40	320	80	160	20	3C.2a1b+135K	S124R*	-	-
A/WAKAYAMA-C/49/2018	40	80	160	160	320	3C.2a2	A212T*	✓	✓
A/MYAGI/10/2018	20	80	160	80	80	3C.2a2	A212T*	✓	✓
A/YOKOHAMA/53/2018	20	80	80	80	320	3C.2a2	A212T*,E62K	-	✓

太字斜体: 各フェレット抗血清の相同力価

そこで、NA D151X を保有する株、保有しない株を供試材料に、オセルタミビルの添加、非添加の条件下でウイルス感染力価を測定し、NA D151X によるウイルス感染性増強作用の有無を検証した。表 2 に示したように、NA D151X を有するウイルス株は 40 nM 濃度のオセルタミビル存在下でオセルタミ

ビル非添加時に比べ、101 程度の力価低下が観察され、NA D151X によるウイルス感染性増強作用および、オセルタミビルによるこの作用の抑制を確認した。さらに高濃度のオセルタミビルを添加した場合、若干の力価低下が観察されるウイルス株も存在したが、NA D151X による感染性増強作用は 200

nM 濃度のオセルタミビルで十分に抑制され、1 μ M 濃度でもウイルス感染性にそれ以上の干渉がないことが確認された。オセルタミビル存在下での感染力価低下は NA D151X と同様の意義を持つとされる NAT149X 置換をもつウイルス株でも認められた。また、NA D151X を持たないウイルス株においてもオセルタミビル存在下で若干の感染力価

低下が観察された。これは最近の野外株に共通して認められる NA の 150 番目アミノ酸のヒスチジンからアルギニンへの置換 (NA H150R) によって獲得された NA によるレセプター結合能と感染能、およびそれらがオセルタミビルによって阻害されていることを示すものであると考えられた。

表 2 オセルタミビル添加によるウイルス感染力価への影響

	力価 (logFFU/0.1ml)				HA 遺伝子グループ	HA アミノ酸置換	NA 150 loop における アミノ酸置換
	オセルタミビル添加濃度						
	0nM	40nM	200nM	1 μ M			
A/SINGAPORE/INFIMH-16-0019/2016	4.70	4.45	4.30	4.30	3C.2a1		none
A/OSAKA/163/2017	5.54	5.23	5.20	5.23	3C2a.1b		none
A/KANAGAWA/AC1726/2018	5.52	5.48	5.45	5.38	3C.2a1b+135N		none
A/NAGANO/2717/2017	5.18	4.80	4.76	4.68	3C.2a1b+135K	I214T	none
A/SAGA/40/2018	5.61	5.32	5.30	5.30	3C.2a1b+135K	N158N>>>S	none
A/KANAGAWA/IC1618/2017	6.23	6.00	5.88	6.04	3C.2a2	T160K, L194P, T203I	none
A/SHIMANE/112/2017	4.90	5.00	4.90	4.80	3C.2a2		none
A/KANAGAWA/ZC1712/2018	6.04	5.88	5.90	5.60	3C.2a2		none
A/FUKUI/2/2018	4.49	4.36	4.34	4.28	3C.2a2	Y94H, N158N>K	none
A/AICHI/62/2018	5.04	5.00	4.73	4.78	3C.2a2	A212T	none
A/KANAGAWA/AC1731/2018	5.60	5.80	5.61	5.68	3C.2a2	A212T	none
A/SAPORO/75/2017	4.90	4.58	4.50	4.40	3C.2a3	R142G	none
A/AICHI/343/2017	4.45	4.26	4.40	4.15	3C.2a4		none
A/Hong Kong/4801/2014	5.82	4.80	4.70	4.80	3C.2a		T148K>T
A/Hong Kong/7127/2014	6.15	5.26	5.10	5.20	3C.2a		D151D>>>G
A/KAGOSHIMA/74146/2017	5.60	4.61	4.65	4.45	3C.2a1a	G78D, Y94H, V182I	D151D>N
A/GUNMA/140/2017	5.80	4.98	4.88	4.86	3C.2a1a	G78D, Y94H, V182I	D151D>>>N
A/TOKYO/17427/2017	6.76	6.23	5.73	5.70	3C.2a1b+135N		D151D/G/N/S
A/MIE/39/2017	6.28	4.95	4.86	4.76	3C.2a1b+135N		D151D>N
A/Laos/F3549/2017	5.52	4.70	4.68	4.54	3C.2a1b+135K	T160T>K	D151D>>N
A/OITA/1/2018	5.73	4.60	4.68	4.50	3C.2a1b+135K		D151D>G
A/FUKUSHIMA/69/2017	6.00	5.04	4.76	4.80	3C.2a2		D151D/G/N/S
A/MIYAGI/1/2018	5.90	4.82	4.76	4.70	3C.2a2	I202V	D151D/G/N/S
A/EHIME/18/2018	6.30	5.18	5.23	5.18	3C.2a2	T160T>>>I, F193S	D151D>>N
A/YAMANASHI/18068/2018	5.32	4.91	5.00	4.90	3C.2a2	A212T	D151D=N
A/KYOTO-C/6/2017	6.48	5.61	5.54	5.58	3C.2a3	T135K, R150K, R261Q	D151D>>>N
A/YOKOHAMA/138/2017	6.51	5.54	5.36	5.40	3C.2a4		T148K>>T, D151D>>>N
A/OKINAWA/64/2017	5.80	4.65	4.65	4.58	3C.2a4		D151D>>G

オセルタミビル存在下で中和反応を行なった場合の MN/FRA で得られる中和抗体価への影響を検討した。オセルタミビル非添加、1 μ M 濃度存在下で中和反応を行った場合の MN/FRA の試験結果を以下に示す (表 3 の 1、3 の 2)。オセルタミビル非添加条件では各種被験抗血清が NA D151X を持つウイルス株に対して低い抗体価を示した。本来中和抗体価は抗血清と HA の反応性を反映するものであるが、抗血清では中和されない

NA D151X のウイルス感染性増強作用が抗体価に影響し HA の正確な抗原性評価を妨げている状況であると考えられた。これに対して、1 μ M 濃度存在下で中和反応を行った MN/FRA では各種被験抗血清の NA D151X を持つウイルス株に対する抗体価がオセルタミビル非添加時に比べ上昇傾向が観察されており、NA D151X のウイルス感染性増強作用がオセルタミビルによって阻害された結果、本来の抗血清と HA の反応性を反映した

結果と考えられた。一例として、HA 遺伝子グループ 3C.2a2 に属する抗 A/Shimane/112/2017 株血清はオセルタミビル存在下で同じ 3C.2a2 グループに属する供試株ほぼ全てに対して高い抗体価を示したが、

異なる遺伝子グループの供試株に対しては相同期価に比して 1 / 8 以下の低抗体価を示し、遺伝子グループの違いと抗原性差異の相関が示された。

表 3 の 1 オセルタミビル非添加での MN/FRA 結果

株名	継代歴	CL3C.2a		CL3C.2a4	CL3C.2a1b	CL3C.2a1	CL3C.2a2		HA 遺伝子グループ	HA アミノ酸置換	NA 150-loop アミノ酸置換
		HK/4801 SIAT	HK/7127 SIAT	Yokohama/138 Cell	Osaka/163 Cell	Singap/INF Cell	Kanagawa/IC Egg	Shimane/112 Cell			
参照株											
A/Hong Kong/4801/2014	MDCK 4 +SIAT2	2560	2560	2560	640	160	160	80	3C.2a		
A/Hong Kong/7127/2014	MDCK 1 +SIAT2	160	640	40	80	80	80	40	3C.2a		
A/YOKOHAMA/138/2017	AX-4 1 +SIAT1	80	80	640	160	160	20	80	3C.2a4		T148K>>T, D151D>>>N
A/OSAKA/163/2017	MDCK-SIAT1 2 +SIAT1	320	640	80	1280	160	20	80	3C.2a1b		
A/SINGAPORE/INF/16-0019/2016	MDCK1/SIAT3 +SIAT2	320	640	640	320	640	<20	320	3C.2a1		
A/KANAGAWA/IC1618/2017	NIDCK3 +E4	320	320	20	160	80	2560	2560	3C.2a2	T160K, L194P, T203I	
A/SHIMANE/112/2017	MDCK1 +SIAT1	640	1280	320	320	320	2560	2560	3C.2a2		
試験株											
A/KANAGAWA/ZC1712/2018	SIAT1	1280	1280	640	640	640	2560	2560	3C.2a2		
A/FUKUI/2/2018	MDCK 2 +SIAT1	320	640	320	160	320	1280	2560	3C.2a2	Y94H, N158N>K	
A/AICHI/62/2018	MDCK 1 +SIAT1	640	1280	640	320	320	2560	2560	3C.2a2	A212T	
A/KANAGAWA/AC1731/2018	SIAT1	640	1280	640	320	640	2560	2560	3C.2a2	A212T	
A/KANAGAWA/AC1728/2018	SIAT1	640	320	160	320	640	<20	320	3C.2a1b+135N		
A/NAGANO/2717/2017	AX-4 1 +SIAT1	320	80	80	160	160	<20	160	3C.2a1b+135N		
A/SAGA/40/2018	MDCK 2 +SIAT1	320	320	80	80	80	<20	80	3C.2a1b+135K	N158N>>>S	
A/YAMANASHI/18068/2018	MDCK 2 +SIAT1	320	160	160	160	160	<20	160	3C.2a1b+135K		
A/SAPPORO/75/2017	MDCK 3 +SIAT1	320	160	80	160	320	<20	160	3C.2a3	R142G	
A/AICHI/343/2017	MDCK 1 +SIAT1	160	1280	1280	320	320	<20	160	3C.2a4		
A/FUKUSHIMA/69/2017	MDCK 3 +SIAT1	40	80	80	80	80	80	160	3C.2a2		D151D/G/N/S
A/MIYAGI/12/2018	MDCK 2 +SIAT1	40	80	80	80	80	80	160	3C.2a2	I202V	D151D/G/N/S
A/EHIME/18/2018	MDCK 1 +SIAT1	20	40	80	80	40	40	40	3C.2a2	T160T>>>I, F193S	D151D>>N
A/MIE/39/2017	MDCK 1 +SIAT1	40	40	80	40	80	40	80	3C.2a1b+135N		D151D>G
A/Laos/F3549/2017	MDCK 2 +SIAT1	80	40	80	40	80	20	40	3C.2a1b+135K	T160T>K	D151D>>N
A/OITA/1/2018	MDCK 2 +SIAT1	80	40	80	80	160	40	80	3C.2a1b+135K		D151D>G
A/KYOTO-C/6/2017	MDCK 2 +SIAT1	80	40	40	40	80	40	40	3C.2a3	R135K,R150K,R261Q	D151D>>>N
A/OKINAWA/64/2017	MDCK 1 +SIAT1	40	80	160	40	80	20	40	3C.2a4		D151D>G
A/KAGOSHIMA/74146/2017	AX-4 1 +SIAT1	40	40	40	40	80	20	40	3C.2a1a	G78D, Y94H, V182I	D151D>N
A/GUNMA/140/2017	MDCK 2 +SIAT1	80	40	80	80	160	40	80	3C.2a1a	G78D, Y94H, V182I	D151D>>>N

太字斜体: 各フェレット抗血清の相同期価

表 3 の 2 1 μM オセルタミビル添加での MN/FRA 結果

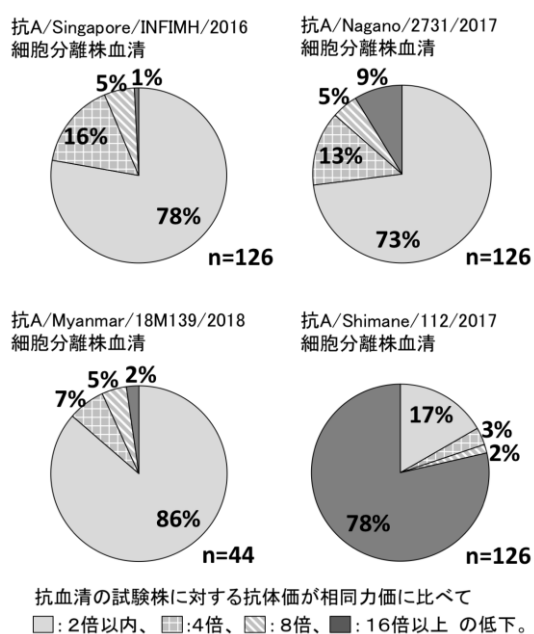
株名	継代歴	CL3C.2a		CL3C.2a4	CL3C.2a1b	CL3C.2a1	CL3C.2a2		HA 遺伝子グループ	HA アミノ酸置換	NA 150-loop アミノ酸置換
		HK/4801 SIAT	HK/7127 SIAT	Yokohama/138 Cell	Osaka/163 Cell	Singap/INF Cell	Kanagawa/IC Egg	Shimane/112 Cell			
参照株											
A/Hong Kong/4801/2014	MDCK 4 +SIAT2	640	640	320	320	320	80	320	3C.2a		
A/Hong Kong/7127/2014	MDCK 1 +SIAT2	320	640	160	160	80	40	80	3C.2a		
A/YOKOHAMA/138/2017	AX-4 1 +SIAT1	80	320	640	160	160	<20	40	3C.2a4		T148K>>T, D151D>>>N
A/OSAKA/163/2017	MDCK-SIAT1 2 +SIAT1	160	160	40	320	40	<20	40	3C.2a1b		
A/SINGAPORE/INF/16-0019/2016	MDCK1/SIAT3 +SIAT2	320	320	160	160	320	<20	160	3C.2a1		
A/KANAGAWA/IC1618/2017	NIDCK3 +E4	320	640	20	160	80	2560	2560	3C.2a2	T160K, L194P, T203I	
A/SHIMANE/112/2017	MDCK1 +SIAT1	320	320	160	160	160	640	2560	3C.2a2		
試験株											
A/KANAGAWA/ZC1712/2018	SIAT1	160	320	160	160	160	640	2560	3C.2a2		
A/FUKUI/2/2018	MDCK 2 +SIAT1	320	640	320	160	160	1280	2560	3C.2a2	Y94H, N158N>K	
A/AICHI/62/2018	MDCK 1 +SIAT1	320	640	160	160	160	1280	2560	3C.2a2	A212T	
A/KANAGAWA/AC1731/2018	SIAT1	640	640	320	320	320	1280	2560	3C.2a2	A212T	
A/KANAGAWA/AC1728/2018	SIAT1	320	160	80	80	160	<20	160	3C.2a1b+135N		
A/NAGANO/2717/2017	AX-4 1 +SIAT1	320	160	80	160	320	<20	80	3C.2a1b+135N		
A/SAGA/40/2018	MDCK 2 +SIAT1	320	160	40	80	80	<20	80	3C.2a1b+135K	N158N>>>S	
A/YAMANASHI/18068/2018	MDCK 2 +SIAT1	320	80	80	80	160	<20	80	3C.2a1b+135K		
A/SAPPORO/75/2017	MDCK 3 +SIAT1	320	160	80	40	160	<20	80	3C.2a3	R142G	
A/AICHI/343/2017	MDCK 1 +SIAT1	80	320	640	160	160	<20	40	3C.2a4		
A/FUKUSHIMA/69/2017	MDCK 3 +SIAT1	160	320	160	160	160	640	1280	3C.2a2		D151D/G/N/S
A/MIYAGI/12/2018	MDCK 2 +SIAT1	320	640	320	160	320	640	2560	3C.2a2	I202V	D151D/G/N/S
A/EHIME/18/2018	MDCK 1 +SIAT1	80	160	80	320	80	40	160	3C.2a2	T160T>>>I, F193S	D151D>>N
A/MIE/39/2017	MDCK 1 +SIAT1	320	160	80	160	320	<20	160	3C.2a1b+135N		D151D>G
A/Laos/F3549/2017	MDCK 2 +SIAT1	160	80	40	40	40	<20	40	3C.2a1b+135K	T160T>K	D151D>>N
A/OITA/1/2018	MDCK 2 +SIAT1	320	80	80	80	160	<20	80	3C.2a1b+135K		D151D>G
A/KYOTO-C/6/2017	MDCK 2 +SIAT1	640	160	80	160	160	40	160	3C.2a3	R135K,R150K,R261Q	D151D>>>N
A/OKINAWA/64/2017	MDCK 1 +SIAT1	80	320	640	80	160	<20	40	3C.2a4		D151D>G
A/KAGOSHIMA/74146/2017	AX-4 1 +SIAT1	320	160	80	80	160	<20	160	3C.2a1a	G78D, Y94H, V182I	D151D>N
A/GUNMA/140/2017	MDCK 2 +SIAT1	320	160	80	80	160	<20	160	3C.2a1a	G78D, Y94H, V182I	D151D>>>N

太字斜体: 各フェレット抗血清の相同期価

A/Ehime/18/2018株は遺伝子グループ3C.2a2に属するが抗A/Shimane/112/2017株血清との反応性に乏しかった。この株は他の株とのHA遺伝子比較において抗原部位に存在するアミノ酸の置換(F193S)を有しており、このアミノ酸置換がHAの抗原性に影響を与え得ることが推察された。

確立したMN/FRAオセルタミビル添加法を用いて実施した18/19冬季流行期のA/H3N2亜型分離株抗原性解析結果の概要を以下に示す。

図1 18/19冬季流行期A/H3N2亜型分離株抗原性解析結果



試験に供したA/H3N2亜型分離株の多くは18/19シーズンワクチン株であるA/Singapore/INFIMH-16-0019/2016の細胞分離株と抗原性に類似していることが確認できた。以前のオセルタミビル非添加法においてはNA D151Xを有する分離株は低い中和抗体価を示し、参照株のHAから抗原性が乖離していると捉えられる例が高頻度にあったが、オセルタミビル添加法ではNA D151Xを有する分離株でもHAの抗原性が参照株に類似

している場合は相応の中和抗体価を示し、HAの抗原性がより正確に評価されていると考えられた。18/19冬季流行期のA/H3N2亜型分離株は遺伝子グループ3C.2a1bに属するものが多数を占めていたが、これと関連して試験株の多くが遺伝子グループ3C.2a1bに属する参照株であるA/Nagano/2731/2017株およびA/Myanmar/18M139/2018株と抗原的に類似していた。対照的に遺伝子グループ3C.2a2に属する参照株A/Shimane/112/2017株とは抗原性乖離が顕著であった。

続く2019/20シーズンA/H3N2亜型分離株の抗原性解析結果を例示する(表4)。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小さくなく、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。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った。

表 4 2019/20 シーズン 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/ INFMH Cell	Kanagawa/ ZC1805 Cell	Kanagawa/ ZC1805 Egg	Kanagawa/ ZC1841 Cell					Kanagawa/ ZC1841 Egg
参照株													
A/Kansas/14/2017	S3 +SIAT1		80	80	<20	<20	<20	<20	40	<20	3C.3a	I478M	2019/20 シーズン北半球ワクチン株
A/Kansas/14/2017	E7 +1		40	1280	<20	<20	<20	<20	80	20	3C.3a	H59M, G186G, D130N, S215L, N240L, T	2019/20 シーズン北半球ワクチン株
A/SINGAPORE/INFMH/6-0019/2016	MOCK1/31/13 +SIAT2		<20	<20	320	80	20	20	<20	80	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 (Am246)	2019/01/07	<20	80	640	1280	2560	80	40	640	3C.2a1b+131K	W59L, S219F, S215L, S215L, S215L, S215L	
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 (Am245)	2019/02/05	40	20	<20	40	<20	160	640	20	3C.2a1b+135K+137F	G186V*	
A/South Australia/54/2019	ES +1		<20	80	80	160	160	<20	40	640	3C.2a1b+131K	V347M, S219F*	2020 シーズン南半球ワクチン株
供試株													
A/HROSHIMA-C/20/2018	MOCK 2 +SIAT2	2018/11/13	<20	<20	320	320	320	20	<20	40			
A/Laos/F2610/2019	MOCK 1 +SIAT1	2019/09/16	<20	<20	160	320	160	20	<20	80	3C.2a1b+131K+197R		
A/TAMANASHI/19362/2019	MOCK 2 +SIAT1	2019/11/08	<20	<20	160	160	160	20	<20	80	3C.2a1b+131K+197R		
A/NIGATA/1050/2019	MOCK 1 +SIAT1	2019/11/25	<20	<20	160	80	160	<20	<20	40	3C.2a1b+131K	V347M	
A/Busan/1236/2019	MOCK1/2 +SIAT1	2019/09/23	<20	<20	80	320	160	<20	<20	80	3C.2a1b+131K+197R	R229R>>>G*	
A/Laos/F2595/2019	MOCK 1 +SIAT1	2019/09/16	<20	<20	80	320	160	20	<20	80	3C.2a1b+131K+197R	D53N*, K207R	
A/SAPPORO/58/2019	MOCK 2 +SIAT1	2019/10/24	<20	<20	80	320	160	20	<20	80	3C.2a1b+131K+197R	K207R*, G240G>>>R*	
A/Jeonbuk/1259/2019	MOCK1/2 +SIAT1	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	MOCK 3 +SIAT1	2019/10/16	<20	<20	80	80	160	<20	<20	40	3C.2a1b+131K+83E	S143P*	
A/Daejeon/1248/2019	MOCK1/2 +SIAT1	2019/10/14	<20	<20	80	80	160	<20	<20	40	3C.2a1b+131K+83E	K83E*, Y94N*, I522M	
A/Daegu/1266/2019	MOCK1/2 +SIAT1	2019/10/28	<20	<20	80	80	<20	320	320	<20	3C.2a1b+135K+137F	E50K*	
A/KANAGAWA/AC1924/2019	MOCK-SIAT1 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/AC1927/2019	MOCK-SIAT1 0 +1	2019/12/23	<20	<20	80	40	<20	160	320	<20	3C.2a1b+135K+137F	E50K*, S9G	
A/Laos/F2602/2019	MOCK 1 +SIAT1	2019/09/16	<20	<20	40	80	<20	320	320	<20	3C.2a1b+135K+137F		
A/HROSHIMA/113/2019	MOCK 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	MOCK 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	MOCK1/2 +SIAT1	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	MOCK 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	MOCK 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

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5の1、5の2)。

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相関していた。

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。

表5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
3C. 2a1b+135K	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

* 相対力価に比べ反応性が4倍低下 (1/4抗体価) を示した株

** 相対力価に比べ反応性が8倍低下 (1/8抗体価) を示した株

*** 相対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

2020年の季節性インフルエンザの流行規模は国内外ともに極めて小さく抗原性解析に供する分離株の入手数も少なかった。入手した A/H3N2 亜型分離株について実施した MN/FRA による抗原性解析結果を以下に示す (表6)。HA 遺伝子グループ 3C.2a1b+131K に属する A/Kanagawa/ZC1805/2019 に対する抗血清との反応性に着目した場合、同じ遺伝子グループに属する供試株は同等の反応性 (相同抗体価 2 倍差以内の抗体価) を示しており、

供試株は A/Kanagawa/ZC1805/2019 と抗原性が類似しているものと確認できる。

2020/21 シーズンのワクチン株には遺伝子グループ 3C.2a1b+135K+137F に属する A/Hong Kong/2671/2019 株が選定され、分離株も多くはこの遺伝子グループに属していた。同じ 3C.2a1b+135K+137F 遺伝子グループに属する A/Hong Kong/45/2019 細胞株に対する抗血清と供試分離株との反応性を検討した結果、分離株の大半は A/Hong Kong/45/2019 細胞株と抗原的に類似してい

た一方、抗原的に相違した株の存在も確認された。

表5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

* 相対力価に比べ反応性が4倍低下（1/4の抗体価）を示した株
 ** 相対力価に比べ反応性が8倍低下（1/8の抗体価）を示した株
 *** 相対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

ワクチン製造用の株である A/Hong Kong/2671/2019(NIB121)に対する抗血清と野外株の反応性に着目した場合、ほぼ全ての供試株が A/Hong Kong/2671/2019(NIB121) 株と抗原的に乖離している状況であった。これは上述したとおり、近年インフルエンザワクチンの懸案となっているワクチン製造用株の鶏卵への馴化の結果生じる抗原性変化

によるものであり、野外流行株の抗原性変遷を反映したものではない。しかし、ワクチン抗原と野外流行株の抗原性が合致しないという問題は依然存在することが示された。

2019 冬季流行期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の主流

を占め、互いに異なる抗原性を示していた。2020年の野外流行株もその傾向が観察されていたが、遺伝子グループ 3C.2a1b+131K から新たに派生した 3C.2a1b+131K+83E+186S グループに属する株の局所的な出現が認められた。現時点ではこれら新規出現株に由来

3C.2a1b+131K グループの株との顕著な抗原性相違は確認されていないが、A/H3N2 野外株の今後の流行態様には引き続きの留意が必要であると示唆された。

表6 2020年春期以降の A/H3N2 亜型分離株の抗原性解析結果

2020年2月以降の分離株抗原性解析結果

参照株 HA遺伝子群	参照抗血清 (相対抗体価)	供試分離株の HA遺伝子群	株数 (%)				
			*参照抗血清との反応性(中和抗体価)が相対抗体価に比し 2倍以内低下	4倍低下	8倍低下	16倍以上低下	計
3C.3a	A/Kansas/14/2017 細胞分離株 (40-80)	3C.2a1b+131K+197R	0	0	1(20.0%)	4(80.0%)	5(100.0%)
		3C.2a1b+135K+198P	0	0	0	1(100.0%)	1(100.0%)
		3C.2a1b+135K+137F	1(5.9%)	0	8(47.1%)	8(47.1%)	17(100.0%)
		3C.3a	6(100.0%)	0	0	0	6(100.0%)
3C.2a1b+131K	A/Kanagawa/ZC1805/2019 細胞分離株 (160)	3C.2a1b+131K+197R	5(100.0%)	0	0	0	5(100.0%)
		3C.2a1b+135K+198P	0	0	1(100.0%)	0	1(100.0%)
		3C.2a1b+135K+137F	6(35.3%)	9(52.9%)	1(5.9%)	1(5.9%)	17(100.0%)
		3C.3a	0	0	0	6(100.0%)	6(100.0%)
3C.2a1b+131K	A/South Australia/34/19 細胞分離株 (320-640)	3C.2a1b+131K+83E+186S	1(100.0%)	0	0	0	1(100.0%)
		3C.2a1b+131K+197R	5(100.0%)	0	0	0	5(100.0%)
		3C.2a1b+135K+198P	0	0	1(100.0%)	0	1(100.0%)
		3C.2a1b+135K+137F	12(70.6%)	4(23.5%)	0	1(5.9%)	17(100.0%)
3C.2a1b+135K	A/Kanagawa/ZC1841/2019 細胞分離株 (80-320)	3C.3a	0	0	6(100.0%)	0	6(100.0%)
		3C.2a1b+131K+83E+186S	0	0	1(100.0%)	0	1(100.0%)
		3C.2a1b+131K+197R	0	3(60.0%)	1(20.0%)	1(20.0%)	5(100.0%)
		3C.2a1b+135K+198P	0	1(100.0%)	0	0	1(100.0%)
3C.2a1b+135K	A/Kanagawa/ZC1841/2019 鶏卵分離株 (320-640)	3C.2a1b+135K+137F	16(94.1%)	1(5.9%)	0	0	17(100.0%)
		3C.3a	0	0	6(100.0%)	0	6(100.0%)
		3C.2a1b+131K+83E+186S	0	0	1(100.0%)	0	1(100.0%)
		3C.2a1b+131K+197R	0	0	0	5(100.0%)	5(100.0%)
3C.2a1b+135K	A/Hong Kong/45/19 細胞分離株 (40-160)	3C.2a1b+135K+198P	0	0	0	0	0
		3C.2a1b+135K+137F	15(93.8%)	0	0	1(6.3%)	16(100.0%)
		3C.3a	0	0	6(100.0%)	0	6(100.0%)
		3C.2a1b+131K+83E+186S	0	0	1(100.0%)	0	1(100.0%)
3C.2a1b+131K	A/Hong Kong/2671/19 鶏卵分離株 (320-640)	3C.2a1b+131K+197R	0	0	0	5(100.0%)	5(100.0%)
		3C.2a1b+135K+198P	0	0	0	0	0
		3C.2a1b+135K+137F	1(5.9%)	1(5.9%)	1(5.9%)	14(82.4%)	17(100.0%)
		3C.3a	0	0	0	6(100.0%)	6(100.0%)
3C.2a1b+131K	A/Hong Kong/2671/19 (NIB121) 鶏卵分離株 (1280)	3C.2a1b+131K+83E+186S	0	0	0	1(100.0%)	1(100.0%)
		3C.2a1b+131K+197R	0	0	0	4(100.0%)	4(100.0%)
		3C.2a1b+135K+198P	0	0	0	0	0
		3C.2a1b+135K+137F	0	0	1(6.3%)	15(93.8%)	16(100.0%)
3C.2a1b+131K +83E+198P	A/YOKOHAMA/68/20 細胞分離株 (160)	3C.3a	0	0	0	6(100.0%)	6(100.0%)
		3C.2a1b+131K+83E+186S	0	0	0	1(100.0%)	1(100.0%)
		3C.2a1b+131K+197R	3(75.0%)	1(25.0%)	0	0	4(100.0%)
		3C.2a1b+135K+198P	0	0	0	0	0
3C.2a1b+131K +83E+198P	A/YOKOHAMA/68/20 細胞分離株 (160)	3C.2a1b+135K+137F	10(100.0%)	0	0	0	10(100.0%)
		3C.3a	0	0	0	6(100.0%)	6(100.0%)
		3C.2a1b+131K+83E+186S	1(100.0%)	0	0	0	1(100.0%)
		3C.2a1b+131K+197R	3(75.0%)	1(25.0%)	0	0	4(100.0%)

* 中和抗体価が2倍以内の低下: 参照株に抗原性が類似
4倍、8倍低下: 参照株と抗原性が相違傾向
16倍以上低下: 参照株と抗原性が大きく乖離

D. 考察

NA D151X によるウイルス感染性増強作用は以前から広く知られていた事象であるが、中和試験を用いた抗原性解析試験結果への NA D151X によるウイルス感染性増強作用の影響については、これまで明確にはされていなかった。本研究によって、NA D151X によるウイルス感染性増強作用が中和試験結果に影響を及ぼし正確な HA の抗原性評価を妨げていることを明らかにした。一方で、NA D151X によるウイルス感染性増強作用は中和反応時にオセルタミビルを使用することで排除でき、より正確な HA の抗原性評価に結びつくことを示した。本研究で確立した MN/FRA オセルタミビル添加法は、従来の MN/FRA よりも HA の抗原性評価の精度に優れるものと考えられた。また、実際の業務における本手法の有用性も併せて示した。

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。

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 シーズン以降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。

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

A/H3N2 亜型分離株抗原性解析は従来の HI 試験では行えない近年の状況を踏まえて、中和試験改良変法であるウイルス感染細胞巢減数試験法 (Microneutralizing/Focus Reduction Assay, MN/FRA) 法が用いられている。MN/FRA による A/H3N2 亜型分離株抗原性解析において NA D151X アミノ酸置換が HA の正確な抗原性評価を妨げていることを明らかにし、抗原性解析試験のさらなる精度向上を目的に MN/FRA オセルタミビル添加法を確立した。この手法による 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すとともに各シーズンのワクチン推奨株選定に大きく寄与した。

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.
- 4) E.Takashita, C.Kawakami, H.Morita, R.Ogawa, S.Fujisaki, M.Shirakura, H.Miura, K.Nakamura, N.Kishida, T.Kuwahara, K.Mitamura, T.Abe, M.Ichikawa, M.Yamazaki, S.Watanabe, T.Odagiri, On Behalf Of The Influenza Virus Surveillance Group Of Japan. Detection of influenza A(H3N2) viruses exhibiting reduced susceptibility to the novel cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir in Japan, December 2018. *Euro Surveill*. 2019 Jan; 24. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.3.1800698.
- 5) C.Kawakami, S.Yamayoshi, M.Akimoto, K.Nakamura, H.Miura, S.Fujisaki, D.J.Pattinson, K.Shimizu, H.Ozawa, T.Momoki, M.Saikusa, A.Yasuhara, S.Usuku, I.Okubo, T.Toyozawa, S.Sugita, D.J.Smith, S.Watanabe, Y.Kawaoka. Genetic and antigenic characterization of influenza A(H3N2) viruses isolated in Yokohama during the 2016– 2017 and 2017– 2018 influenza seasons. *Euro Surveill*. 2019 Feb; 24. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.6.1800467.
- 6) E.Takashita, H.Morita, R.Ogawa, K.Nakamura, S.Fujisaki S, Shirakura M, Kuwahara T, Kishida N, Watanabe S, Odagiri T. Susceptibility of Influenza Viruses to the Novel Cap-Dependent Endonuclease Inhibitor Baloxavir Marboxil. *Front Microbiol*. 9: 3026, 2018. doi: 10.3389/fmicb.2018.03026.
- 7) T.Kuwahara, E.Takashita, S.Fujisaki, M.Shirakura, K.Nakamura, N.Kishida, H.Takahashi, N.Suzuki, Y.Kawaoka, S.Watanabe, T.Odagiri. Isolation of an Egg-Adapted Influenza A(H3N2) Virus without Amino Acid Substitutions at the Antigenic Sites of Its Hemagglutinin. *Jpn J Infect Dis*. 71: 234-238, 2018. doi: 10.7883/yoken.JJID.2017.551.
2. 学会発表
- 1) K.Nakamura, M.Akimoto, S.Fujisaki, M.Shirakura, H.Miura, N.Kishida, A.Sato, T.Kuwahara, E.Takashita, H.Hasegawa, T.Odagiri, S.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) S.Watanabe, K.Nakamura, N.Kishida, S.Fujisaki, M.Shirakura, E.Takashita, T.Kuwahara, A.Sato, M.Akimoto, H.Miura, R.Ogawa, H.Morita, H.Sugawara, T.Odagiri, H.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) E.Takashita, 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.Ichikawa, M.Yamazaki, S.Watanabe, T.Odagiri, H.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) K.Nakamura, M.Akimoto, S.Fujisaki, M.Shirakura,

- H.Miura, N.Kishida, A.Sato, T.Kuwahara, E.Takashita, H.Hasegawa, T.Odagiri, S.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) M.Ujie, M.Imai, K.Nakamura, S.Watanabe, Y.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) T.Kuwahara, E.Takashita, S.Fujisaki, M.Shirakura, K.Nakamura, N.Kishida, H.Takahashi, K.Sato, S.Watanabe, T.Odagiri. 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) N.Kishida, S.Fujisaki, M.Shirakura, H.Takahashi, H.Asanuma, K.Nakamura, R.Saito, T.Odagiri, S.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) C.Kawakami, S.Yamayoshi, M.Akimoto, K.Nakamura, H.Miura, S.Fujisaki, D.J.Pattinson, K.Shimizu, H.Ozawa, T.Momoki, M.Saikusa, A.Yasuhara, S.Usuku, I.Okubo, T.Toyozawa, S.Sugita, D.J.Smith, S.Watanabe, Y.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) E.Takashita, R.Ogawa, H.Morita, S.Fujisaki, M.Shirakura, H.Miura, K.Nakamura, N.Kishida, T.Kuwahara, H.Sugawara, A.Sato, M.Akimoto, K.Mitamura, T.Abe, M.Ichikawa, M.Yamazaki, S.Watanabe, T.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
- 11) S.Watanabe, K.Nakamura, S.Fujisaki, M.Shirakura, E.Takashita, T.Kuwahara, N.Kishida, A.Sato, M.Akimoto, H.Miura, R.Ogawa, H.Sugawara, K.Watanabe, H.Morita, K.Mitamura, T.Abe, M.Ichikawa, M.Yamazaki, T.Odagiri, The Influenza Surveillance Group of Japan. Characterizations of circulating influenza viruses in the 2017/18 season and selection of vaccine viruses for the 2018/19 season. 第66回日本ウイルス学会 学術集会 2018年10月
- 12) E.Takashita, S.Fujisaki, M.Yokoyama, M.Shirakura, K.Nakamura, T.Kuwahara, N.Kishida, H.Sato, S.Watanabe, T.Odagiri, The Influenza Virus Surveillance Group of Japan. In vitro characterization of multidrug-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses carrying a dual amino acid substitution associated with reduced susceptibility to neuraminidase inhibitors. 第66回日本ウイルス学会学術集会 2018年10月
- 13) E.Takashita, H.Morita, R.Ogawa, K.Nakamura, S.Fujisaki, M.Shirakura, T.Kuwahara, N.Kishida, M.Mitamura, T.Abe, M.Ichikawa, M.Yamazaki, S.Watanabe, T.Odagiri. Susceptibility of influenza viruses to the novel cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir marboxil. The 6th ISIRV-AVG Conference (Washington DC, USA), Nov/2018
- 14) T.Kuwahara, E.Takashita, S.Fujisaki, M.Shirakura, K.Nakamura, N.Kishida, H.Takahashi, N.Suzuki, Y.Kawaoka, S.Watanabe, T.Odagiri. Isolation of egg-adapted influenza A(H3N2) virus without amino acid substitutions in the antigenic sites of its hemagglutinin. NSV Symposium 2018 (Verona, Italy), Jun/20185)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

A(H1N1)pdm09 および B 型インフルエンザウイルスの 赤血球凝集阻止試験をもちいた抗原性解析

研究分担者 岸田典子

国立感染症研究所・インフルエンザウイルス研究センター・主任研究官

研究要旨

A(H1N1)pdm09 および B 型について 2019/20、2020/21、2021/22 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 2018/19 シーズンから 2020/21 シーズンに国内から収集した A(H1N1)pdm09 および B 型分離株の抗原性解析をフェレット感染血清と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。A(H1N1)pdm09 は 3 シーズンの間に抗原性の変遷は大きく遺伝子的には HA に 183P、129D、185I、260D、187A 及び 189E のアミノ酸を持つ 183P-5A1 のグループと 156K のアミノ酸を持つ 183P-5A2 のグループが出現し、それらの抗原性は明確に異なった。B 型については流行の規模は小さく、2020/21 シーズンは地方衛生研究所での分離報告はなかった。B/Victoria 系統では 18/19 シーズンは 2 アミノ酸欠損株と 3 アミノ酸欠損株が混在していたが、2019/20 シーズンは 3 アミノ酸欠損かつ G133R のアミノ酸置換を持つ株が流行の主流となった。フェレット感染血清及びワクチン接種者血清でこれらのグループの抗原性の違いが明らかになった。B/Yamagata 系統については流行もほとんどなく、抗原性の変化もなかった。

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

2018 年 9 月から 2021 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、モンゴル、ミャンマー、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 2018/19、2019/20、2020/21 シーズンの国内ワクチン接種者血清と国内外の

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と関東圏の病院から分離株または臨床検体の提供をうけた。

（倫理面への配慮）

C. 研究結果

A(H1N1)pdm09 : 2018/19 シーズンの分離株は HA の 183 番目のアミノ酸に P を持つウイルスが主流であった。2018/19 シーズンのワクチン製造株である A/Singapore/GP1908/2015（IVR-180）(H1N1)pdm09 およびそのオリジナル株である A/Michigan/45/2015 のフェレット感染血清との反応性をみると、2018/19 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。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

2018/19 シーズンの流行の主流である S183P を持つ分離株とよく反応したが、海外のワクチン接種者血清のうち乳幼児血清を用いた試験では、183P を持つ分離株に対して低い反応性を示すことがわかった。2018/19 シーズン後半からは HA に 183P、129D、185I と 260D のアミノ酸を持つグループ 183P-5A が主流になった。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 12 月までの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。1 月以降になると 156K の変異株の割合が増え、それらの株は A/Brisbane/02/2018 のフェレット感染血清との反応性が大きく低下した。2021 年 4 月 15 日時点で解析が実施できた 2020/21 シーズンの国内分離株は長崎/8/2020 のみであった。2020/21 シーズンのワクチン製造株である高増殖性 A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019 (CNIC-1909) (H1N1)pdm09 および同じ遺伝子グループに属する細胞分離株 A/沖縄/93/2019 のフェレット感染血清との反応性をみると、長崎/8/2020 株はいずれの血清ともよく反応しワクチン類似株であった。遺伝子的には HA に 183P、129D、185I、260D、187A 及び 189E のアミノ酸を持つグループ 183P-5A1 に属した。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は同じ遺伝子グループ 183P-5A1 に属する細胞分離株ともよく反応した。しかしながら、2019/2020 シーズンに流行が大きくなった HA に 156K を持つ遺伝子グループ 183P-5A2 に属する分離株に対して反応性が GMT で 2 倍程度低下した。

B 型：2018/19、2019/20 シーズンともに B 型インフルエンザの流行規模は極めて小さく、2020/21 シーズンは両系統とも 2021 年 4 月 22 日時点で分離報告はなかった。系統の割合は 2018/19 は Victoria 系統が 93%、Yamagata 系統が 7%であった。2019/20 シーズンの系統の割合は Victoria 系統が

99%、Yamagata 系統が 1%であった。

Victoria 系統：2018/19 シーズンは、2017/18 シーズンのワクチン株である Texas/02 類似株、2 アミノ酸欠損株、3 アミノ酸欠損株と 3 つのグループのウイルスが混在しており、それぞれの抗原性は明瞭に区別された。2019/20 シーズンは分離株のほとんどが 3 アミノ酸欠損株で、2 アミノ酸欠損株が極めて稀であった。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感染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感染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。2020/21 シーズンのワクチン株 (B/Victoria/705/2018 (BVR-11)、3 アミノ酸欠損) を接種したワクチン接種者血清は、B/Washington/02/2019 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 2 倍程度反応性が低下していた。

B/Yamagata 系統：2018/19 シーズンの分離株は、ワクチン株 B/Phuket/3073/2013 の細胞分離株および鶏卵分離株のフェレット感染血清とよく反応し、B/Phuket/3073/2013 と抗原性が類似していた。しかしながら、国内のワクチン接種者血清を用いた試験においては、ワクチン接種血清は流行株に対して反応性が低下していた。2019/20、2020/21 シーズンワクチン (B/Phuket/3073/2013) についても同様にワクチン接種者血清は、野外分離株とは GMT で 2 倍程度反応性が低下していた。

以上の結果は WHO の 2019/20、2020/21、2021/22 北半球ワクチン選定会議及び 2019、2020、2021 南半球ワクチン選定会議に情報提供された。

D. 考察

A(H1N1)pdm09: 2018/19 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、海外のワクチン接種乳幼児血清は流行株との反応性が低下していた。これには HA の抗原部位に近接する S183P のアミノ酸置換が影響を及ぼしている可能性が考えられた。一部のワクチン接種者の血清は、この抗原性の差を区別するが、フェレット感染血清はこの抗原性の差を区別しないと考えられる。2019/20 シーズン分離株の 156K を持たないグループはワクチン株のフェレット感染血清とよく反応したが、156K を持つグループは反応性が大きく低下した。ヒト血清を用いた解析でも同様に、156K のアミノ酸置換は抗原性への影響が大きいと考えられた。また、フェレット感染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、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おり、D187A、Q189E は抗原性に影響を及ぼす可能性がある。

B/Victoria 系統: 2018/19 シーズンは抗原性が異なる 3 つのグループの株が流行しており、ワクチン株と抗原性の一致する 2 アミノ酸欠損株にはワクチンの効果が期待できるが、Texas/02 類似株と 3 アミノ酸欠損株に対してはワクチン効果の減弱が危惧された。2019/20 シーズンはワクチン株 (B/Colorado/06/2017 類似、2 アミノ酸欠損) と抗原性が異なる 3 アミノ酸欠損株が野外分離株の大半を占めたことからワクチン効果の減弱が危惧された。また、いずれのシーズンもワクチン株の鶏卵馴化の過程で起こる糖鎖欠損による抗原性の変化がワクチン効果を減弱させることが推測された。

B/Yamagata 系統: 2018/19 シーズンの流行株はワクチン類似株が流行の主流であり、抗原性の変化は起っていないかった。しかしながら、いず

れのシーズンもワクチン株の鶏卵馴化の過程で起こる糖鎖欠損による抗原性の変化がワクチン効果を減弱させることが推測された。

E. 結論

2018/19: WHO は 2019/20 シーズンのワクチン株を A(H1N1)pdm09 については、B/Brisbane/02/2018 (H1N1)pdm09 類似株、B/Victoria 系統については、B/Colorado/06/2017 類似株を、B/Yamagata 系統については B/Phuket/3073/2013 類似株を北半球の 2019/2020 シーズン推奨株とした。

2019/20: WHO は、A(H1N1)pdm09 については、A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019(H1N1)pdm09 類似株、B/Victoria 系統については、B/Washington/02/2019 類似株、B/Yamagata 系統は B/Phuket/3073/2013 類似株を北半球の 2020/2021 シーズン Egg-based Vaccine 推奨株とした。

2020/21: WHO は、A(H1N1)pdm09 については、156K のアミノ酸置換を有する 183P-5A2 のグループの A/Victoria/2570/2019 (H1N1)pdm09 類似株を、B/Victoria 系統と B/Yamagata 系統については、B/Washington/02/2019 類似株と B/Phuket/3073/2013 を北半球の 2021/2022 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, Yasui Y, Nagata S, Morita H, Fujisaki S, Miura H, Shirakura M, Kishida N, Nakamura K, Kuwahara T, Sugawara H, Sato A, Akimoto M, Kaido T, Watanabe S, Hasegawa H; Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Detection of a Peramivir-Resistant Influenza B/Yamagata-Lineage Virus Imported from Indonesia in Aichi, Japan, March 2019. *Jpn J Infect Dis.* 2020 9, 73(5), 386-390
- Huddleston J, Barnes JR, Rowe T, Xu X, Kondor R, Wentworth DE, Whittaker L, Ermetal B, Daniels RS, McCauley JW, Fujisaki S, Nakamura K, Kishida N, Watanabe S, Hasegawa H, Barr I, Subbarao K,

- Barrat-Charlaix P, Neher RA, Bedford T. Integrating genotypes and phenotypes improves long-term forecasts of seasonal influenza A/H3N2 evolution. *Elife*. 2020 9, 9, e60067
- Takashita E, Fujisaki S, Yokoyama M, Shirakura M, Morita H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Sato H, Doi I, Sato Y, Takao S, Shimazu Y, Shimomura T, Ito T, Watanabe S, Odagiri T, The Influenza Virus Surveillance Group Of Japan. In Vitro Characterization of Multidrug-Resistant Influenza A(H1N1)pdm09 Viruses Carrying a Dual Neuraminidase Mutation Isolated from Immunocompromised Patients. *Pathogens*. 2020 9, 9(9), 725
 - Takashita E, Abe T, Morita H, Nagata S, Fujisaki S, Miura H, Shirakura M, Kishida N, Nakamura K, Kuwahara T, Mitamura K, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Hasegawa H, Influenza Virus Surveillance Group of Japan, Influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting reduced susceptibility to baloxavir due to a PA E23K substitution detected from a child without baloxavir treatment. *Antiviral Res*. 2020 8, 180, 104828
 - 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
 - Takashita E, Kawakami C, Ogawa R, Morita H, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Ota A, Togashi H, Saito A, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Odagiri T. Influenza A(H3N2) virus exhibiting reduced susceptibility to baloxavir due to a polymerase acidic subunit I38T substitution detected from a hospitalised child without prior baloxavir treatment, Japan, January 2019. *Euro Surveill*. , 24(12), 2019
 - Takashita E, Kawakami C, Morita H, Ogawa R, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Odagiri T, On Behalf Of The Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Detection of influenza A(H3N2) viruses exhibiting reduced susceptibility to the novel cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir in Japan, December 2018. *Euro Surveill*. , 24(3), 2019
 - Takashita E, Morita H, Ogawa R, Nakamura K, Fujisaki S, Shirakura M, Kuwahara T, Kishida N, Watanabe S, Odagiri T. Susceptibility of influenza viruses to the novel cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir marboxil. *Front Microbiol*. ;6; 9, 3026, 2018
 - Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Kawaoka Y, Watanabe S, Odagiri T. Isolation of an Egg-Adapted Influenza A(H3N2) Virus without Amino Acid Substitutions at the Antigenic Sites of Its Hemagglutinin. *Jpn J Infect Dis*. , 71(3), 234-238, 2018
2. 学会発表
- Watanabe S, Nakamura K, Kishida N, Fujisaki S, Shirakura M, Takashita E, Kuwahara T, Sato A, Akimoto M, Miura H, Ogawa R, Sugawara H, Watanabe K, 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
 - 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 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 X for The Control of Influenza Singapore Aug.28-Sep.1 2019
 - Watanabe S, Nakamura K, Fujisaki S, Shirakura M, Takashita E, Kuwahara T, Kishida N, 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 2017/18 season and selection of vaccine viruses for the 2018/19 season The Influenza Surveillance Group of Japan 第 66 回日本ウイルス学会. 京都. 2018 年 10 月
 - Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Shimazu Y, Shimomura T, Doi I, Watanabe S, Odagiri T, and The Influenza Virus Surveillance Group of Japan5 Detection of influenza A(H1N1)pdm09 viruses exhibiting enhanced cross-resistance to oseltamivir and peramivir in the 2015/16 season 第 66 回日本ウイルス学会. 京都. 2018 年 10 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

インフルエンザウイルス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

2017/18 から 2020/21 シーズンの 3 年間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、A(H3N2)、B 型ビクトリア系統ウイルスに、遺伝子的多様化が進み複数の集団が形成された。抗原性変異を引き起こすアミノ酸置換を有する集団も出現した。2020/21 シーズンは流行規模が極めて小さかったが、次の流行に備え引き続きウイルス伝播と遺伝子の変化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

2017/18 から 2020/21 シーズンの 3 年間に、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、A(H1N1)pdm09 を 1158 株、A(H3N2) を 895 株、B 型を 689 株、解析を行った（2021 年 3 月時点）。

（倫理面への配慮）

なし

C. 研究結果

A(H1N1)pdm09 ウイルス：HA 遺伝子系統樹上で、2017/18 シーズンの流行株は 6B.1（代表株：A/Singapore/GP1908/2015）であったが、2018/19 シーズンに S183P を含む 7 群（183P-1：N451T、183P-2：

L233I、183P-4：N129D+A141E、183P-5：N260D、183P-6：T120A、183P-7：K302T+I404M）に分岐した。その後 2019/20 シーズンには流行株は全て 183P-5 となった。183P-5 はさらに派生し 183P-5A(N129D, T185I)、183P-5B(K160M, T216K, E235D, H296N, V520A)に分岐した。183P-5A 内でもさらに D187A, Q189E 群と、抗原性部位の置換である N156K 群が確認された。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。なお 2020/21 シーズンには 2 株のみ解析され、いずれも 183P-5A 内 D187A, Q189E 群に属した。
A(H3N2)ウイルス：2017/18 シーズンはほとんどの流行株が HA 遺伝子系統樹上の 3C.2a（代表株：A/Hong Kong/4801/2014）に属し、さらに 3C.2a1（N171K+I406V+G484E、代表株：A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016）、3C.2a2（T131K+R142K+R261Q）、3C.2a3（N121K+T135K+S144K）のサブクレードに分岐していた。また、一部の株が 3C.3a（L3I+S91N+N144K+F193S+D489N）に属した。3C.2a1 内では、3C.2a1b（N121K+K92R+H311Q）にて分岐した 3C.2a1b+135K(E62G+T135K+R142G)、3C.2a1b+131K（E62G+R142G+T131K+V529I）が派生した。2019/20 には 3C.2a1b+135K 内に 137F 群

(T128A+S137F+A138S+F193S)と 198P 群 (T128A+A138S+G186D+D190N+F193S+S198P)が、3C.2a1b+131K 内には 83E 群(K83E+Y94N+I522M)と 197R 群(Q197R+S219F+V347M)が派生した。また 83E 群には抗原性変異が示唆される 2 つの群、F193S+Y195F+G186S+S198P 群と F193S+Y195F+Y159N+T160I+I164Q+G186D+D190N 群が確認された。なお 2020/21 シーズンには 2 株のみ解析され、いずれも F193S+Y195F+G186S+S198P 群に属した。

B 型ウイルス：Yamagata 系統は、S150I, N165Y, N202S, S229D を持つクレード 3 (代表株：B/Phuket/3073/2013) に属した。Victoria 系統の分離株は、B/Brisbane/60/2008 株を代表とするサブクレード 1A に属している。2017/18 シーズンには 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) が派生し 2019/20 シーズンにはほとんどの流行株が 1A.3 に属した。

D. 考察

3 シーズンの間に遺伝子変異の蓄積が進み、A(H1N1)pdm09、A(H3N2)、B 型ビクトリア系統ウイルスにてそれぞれ抗原性変異を引き起こすアミノ酸置換を有する集団が派生した。ヒト血清およびフェレット血清を用いた赤血球凝集反応試験や中和試験の結果を遺伝子解析の結果を合わせることで、流行株の変化を敏感に捉えることが必要と考えられる。20/21 シーズンはインフルエンザウイルスの流行が極めて少なかったため、次に出現するインフルエンザウイルスにどのような変化が現れるのか流行がどのようになるのか、今後も継続した監視が必要である。

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に変異が蓄積し抗原性変異群も存在するため、次流行へ向け

でのウイルスの監視が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Takayama I, Nguyen BG, Dao CX, Pham TT, Dang TQ, Truong PT, Do TV, Pham TTP, [Fujiisaki S](#), Odagiri T, Hasegawa H, Nakajima N. Next-Generation Sequencing Analysis of the Within-Host Genetic Diversity of Influenza A(H1N1)pdm09 Viruses in the Upper and Lower Respiratory Tracts of Patients with Severe Influenza. *mSphere*. 2021 1, 6(1), e01043-20.
- Huddleston J, Barnes JR, Rowe T, Xu X, Kondor R, Wentworth DE, Whittaker L, Ermetal B, Daniels RS, McCauley JW, [Fujiisaki S](#), Nakamura K, Kishida N, Watanabe S, Hasegawa H, Barr I, Subbarao K, Barrat-Charlaix P, Neher RA, Bedford T. Integrating genotypes and phenotypes improves long-term forecasts of seasonal influenza A/H3N2 evolution. *Elife*. 2020 9, 9, e60067
- Takashita E, Abe T, Morita H, Nagata S, [Fujiisaki S](#), Miura H, Shirakura M, Kishida N, Nakamura K, Kuwahara T, Mitamura K, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Hasegawa H, Influenza Virus Surveillance Group of Japan, Influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting reduced susceptibility to baloxavir due to a PA E23K substitution detected from a child without baloxavir treatment. *Antiviral Res*. 2020 8, 180, 104828
- Harada N, Shibata W, Koh H, Takashita E, [Fujiisaki S](#), Okamura H, Nanno S, Yamada K, Nakamae H, Hino M, Kakeya H. Successful treatment with baloxavir marboxil of a patient with peramivir-resistant influenza A/H3N2 with a dual E119D/R292K substitution after allogeneic hematopoietic cell transplantation: a case report. *BMC Infect Dis*. 2020 7, 20(1), 478
- Takashita E, Ichikawa M, Morita H, Ogawa R, [Fujiisaki 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
 - Takashita E, Kawakami C, Ogawa R, Morita H, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Ota A, Togashi H, Saito A, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Odagiri T. Influenza A(H3N2) virus exhibiting reduced susceptibility to baloxavir due to a polymerase acidic subunit I38T substitution detected from a hospitalised child without prior baloxavir treatment, Japan, January 2019. *Euro Surveill.* 2019 Mar;24(12).
 - Kawakami C, Yamayoshi S, Akimoto M, Nakamura K, Miura H, Fujisaki S, Pattinson DJ, Shimizu K, Ozawa H, Momoki T, Saikusa M, Yasuhara A, Usuku S, Okubo I, Toyozawa T, Sugita S, Smith DJ, Watanabe S, Kawaoka Y. Genetic and antigenic characterisation of influenza A(H3N2) viruses isolated in Yokohama during the 2016/17 and 2017/18 influenza seasons. *Euro Surveill.* 2019 Feb;24(6).
 - Takashita E, Kawakami C, Morita H, Ogawa R, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Odagiri T, On Behalf Of The Influenza Virus Surveillance Group Of Japan. Detection of influenza A(H3N2) viruses exhibiting reduced susceptibility to the novel cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir in Japan, December 2018. *Euro Surveill.* 2019 Jan;24(3).
 - Yoshihara K, Le MN, Toizumi M, Nguyen HA, Vo HM, Odagiri T, Fujisaki S, Ariyoshi K, Moriuchi H, Hashizume M, Dang DA, Yoshida LM. Influenza B associated paediatric acute respiratory infection hospitalization in central vietnam. *Influenza Other Respir Viruses.* 2018 Dec 21.
 - Takashita E, Morita H, Ogawa R, Nakamura K, Fujisaki S, Shirakura M, Kuwahara T, Kishida N, Watanabe S, Odagiri T. Susceptibility of Influenza Viruses to the Novel Cap-Dependent Endonuclease Inhibitor Baloxavir Marboxil. *Front Microbiol.* 2018 Dec 6;9:3026.
 - Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Kawaoka Y, Watanabe S, Odagiri T. Isolation of an Egg-Adapted Influenza A(H3N2) Virus without Amino Acid Substitutions at the Antigenic Sites of Its Hemagglutinin. *Jpn J Infect Dis.* 2018 May24;71(3):234-238.doi:10.7883/yoken.JJID.2017.551. Epub 2018 Apr 27.
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 バロキサビル耐性変異インフルエンザ A(H3N2) ウイルスのヒトーヒト感染 第 67 回日本ウイルス学会学術集会、2019 年 10 月、東京
- ・ Characterizations of circulating influenza viruses in the 2017/18 season and selection of vaccine viruses for the 2018/19 season Shinji Watanabe, Kazuya Nakamura, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Emi Takashita, Tomoko Kuwahara, Noriko Kishida, Aya Sato, Miki Akimoto, Hideka, Miura, Rie Ogawa, Hiromi Sugawara, Kayo Watanabe, Hiroko Morita, Keiko Mitamura, Takashi Abe, Masataka Ichikawa, Masahiko Yamazaki, Takato Odagiri, The Influenza Surveillance Group of Japan 第 66 回日本ウイルス学会学術集会、京都、2018
- ・ In vitro characterization of multi drug-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses carrying a dual amino acid substitution associated with reduced susceptibility to neuraminidase inhibitors Emi Takashita, Seiichiro Fujisaki, Masaru Yokoyama, Masayuki Shirakura, Kazuya Nakamura, Tomoko Kuwahara, Noriko Kishida, Hironori Sato, Shinji Watanabe, Takato Odagiri, The Influenza Virus Surveillance Group of Japan 第 66 回日本ウイルス学会学術集会、京都、2018
- ・ Analysis of genetic dynamics of influenza A(H1N1)pdm09 viruses in upper and lower respiratory tracts using next-generation sequencing. Ikuyo Takayama, Nguyen Gia Binh, Vu Thi Tuong Van, Truong Thai Phuong, Thanh Do Van, Pham Thi Phuong Thuy, Seiichiro Fujisaki, Takato Odagiri, Tsutomu Kageyama, Noriko Nakajima 第 66 回日本ウイルス学会学術集会、京都、2018

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

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・招聘型主任研究官

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。そこで、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、リバース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 BlueTM (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のではないかと考えられた。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-κB Signaling Pathway. *mBio*. 2019 Dec 17;10(6).
- [Kuwahara T](#), Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Takahashi H, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Kawaoka Y, Watanabe S, Odagiri T. Isolation of egg-adapted influenza A(H3N2) virus without amino acid substitutions in the antigenic sites of its hemagglutinin. *Jpn J Infect Dis*. 2018 May 24;71(3):234-238.

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
- [Kuwahara T](#), Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Takahashi H, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Kawaoka Y, Watanabe S, Odagiri T. Isolation of egg-adapted influenza A(H3N2) virus without amino acid substitutions in the antigenic sites of its hemagglutinin. *Negative Strand Virus、ヴェローナ、イタリア、2018*

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

抗インフルエンザ薬耐性株の発生動向調査ならびに 薬剤耐性株検出系の外部精度管理による監視体制の強化

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、ミャンマー、モンゴル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 株が検出された。また、日本国内において、バロキサビル耐性変異株が A(H1N1)pdm09 と A(H3N2)で検出された。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。日本は世界最大級の抗インフルエンザ薬使用国であり、薬剤耐性株の出現リスクが高い。したがって耐性株の発生動向の把握は公衆衛生上極めて重要である。そこで、本研究では、薬剤耐性株の監視を目的として、日本を含む東アジア地域における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 遺伝子型解析は、平成 22 年度に導入された TaqMan RT-PCR 法により耐性株の検出を行っているが、検査精度の維持・向上を目的とした外部精度管理を実施した。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ならびに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、国内外の分離株について、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、新たに開発した RNase H2-dependent PCR 法または 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、TaqMan RT-PCR 法の合成 RNA 陽性コントロールを、新たに地衛研に配布した。地衛研では、「A/H1N1pdm09 H275Y 耐性株検出法実験プロトコール ver.2」に従って RNA 陽性コントロールの 10 倍階段希釈液を製作し、陰性コントロールと共に検出した。さらに、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地衛研に配布した。

(倫理面への配慮)
該当なし

C. 研究結果

日本、韓国、台湾、ネパール、ミャンマー、モンゴルおよびラオスの分離株について解析を行った。その結果、NA 阻害薬耐性株については、日本国内において、NA 蛋白質に H275Y 耐性変異をもつオセルタミビル・ペラミビル耐性 A(H1N1)pdm09 ウイルスが 0.8–1.5% 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は、日本国内において、PA 蛋白質に I38X 耐性変異をもつバロキサビル耐性変異ウイルスが平成 30 年度には A(H1N1)pdm09 で 2.3%、A(H3N2) で 18.5% 検出された。また、PA 蛋白質に E23K 耐性変異をもつバロキサビル耐性変異ウイルスが令和元年度に 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、8 割以上の地衛研で評価項目 (1) ~ (4) すべてを満たしていた。評価項目のいずれかに問題があった地衛研に対しては個別に問題解決のための助言を行った。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および助言を行った。

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。

地衛研での NA 遺伝子型解析ならびに PA 遺伝子型解析については、検査に問題があった地衛研に対して個別に助言を行うことで改善が認められた。

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。

地衛研における薬剤耐性株検出系の検査精度の維持には、継続的な外部精度管理が効果的である。また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さらに強化された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Takashita E, Yasui Y, Nagata S, Morita H, Fujisaki S, Miura H, Shirakura M, Kishida N, Nakamura K, Kuwahara T, Sugawara H, Sato A, Akimoto M, Kaido T, Watanabe S, Hasegawa H; Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Detection of a Peramivir-Resistant Influenza B/Yamagata-Lineage Virus Imported from Indonesia in Aichi, Japan, March 2019. *Jpn J Infect Dis.* 2020 9, 73(5), 386-390
- Takashita E, Fujisaki S, Yokoyama M, Shirakura M, Morita H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Sato H, Doi I, Sato Y, Takao S, Shimazu Y, Shimomura T, Ito T, Watanabe S, Odagiri T, The Influenza Virus Surveillance Group Of Japan. In Vitro Characterization of Multidrug-Resistant Influenza A(H1N1)pdm09 Viruses Carrying a Dual Neuraminidase Mutation Isolated from Immunocompromised Patients. *Pathogens.* 2020 9, 9(9), 725
- Takashita E, Abe T, Morita H, Nagata S, Fujisaki S, Miura H, Shirakura M, Kishida N, Nakamura K, Kuwahara T, Mitamura K, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Hasegawa H, Influenza Virus Surveillance Group of Japan, Influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting reduced susceptibility to baloxavir due to a PA E23K substitution detected from a child without baloxavir treatment. *Antiviral Res.* 2020 8, 180, 104828
- 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
 - Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Kawaoka Y, Watanabe S, Odagiri T. Isolation of an Egg-Adapted Influenza A(H3N2) Virus without Amino Acid Substitutions at the Antigenic Sites of Its Hemagglutinin. Jpn J Infect Dis. ,71(3),234-238,2018
 - Lackenby A, Besselaar TG, Daniels RS, Fry A, Gregory V, Gubareva LV, Huang W, Hurt AC, Leang SK, Lee RTC, Lo J, Lollis L, Maurer-Stroh S, Odagiri T, Pereyaslov D, Takashita E, Wang D, Zhang W, Meijer A. Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors and status of novel antivirals, 2016-2017. Antiviral Res. , 157 , 38-46 , 2018
 - Takashita E, Morita H, Ogawa R, Nakamura K, Fujisaki S, Shirakura M, Kuwahara T, Kishida N, Watanabe S, Odagiri T. Susceptibility of influenza viruses to the novel cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir marboxil. Front Microbiol. ,6;9,3026,2018
 - Takashita E, Kawakami C, Morita H, Ogawa R, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Odagiri T, On Behalf Of The Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Detection of influenza A(H3N2) viruses exhibiting reduced susceptibility to the novel cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir in Japan, December 2018. Euro Surveill. ,24(3),op,2019
 - Takashita E, Kawakami C, Ogawa R, Morita H, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Ota A, Togashi H, Saito A, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Odagiri T. Influenza A(H3N2) virus exhibiting reduced susceptibility to baloxavir due to a polymerase acidic subunit I38T substitution detected from a hospitalised child without prior baloxavir treatment, Japan, January 2019. Euro Surveill. , 24(12), 2019
2. 学会発表
- Takashita E, Antiviral resistance: frequency of resistance, impact on patient, risk of transmission, APACI 2020 Webinar Series on Pandemic Preparedness, December 2020, Web
 - 川上千春、七種美和子、清水耕平、小澤広規、宇宿秀三、高下恵美、藤崎誠一郎、中村一哉、岸田典子、渡邊真治、過去3シーズンに流行した AH1pdm09 インフルエンザウイルスの解析、第52回日本小児感染症学会、2020年11月、大阪
 - 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
 - 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、2019年10月、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、2019年10月、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、2019年10月、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、2019年10月、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、縦隔気腫を来した一例、第51回日本小児感染症学会、2019年10月、旭川
 - ・ 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, Yamazaki M, Watanabe S, Odagiri T, Hasegawa H, 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
 - ・ 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、2019年10月、東京
 - ・ 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、2019年10月、東京
 - ・ Nakauchi M, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Saito S, Watanabe S, Odagiri T, T 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
 - ・ Nakauchi M, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Saito S, Watanabe S, Odagiri T, T 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
 - ・ Takashita E, Ogawa R, Morita H, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Sugawara H, Sato A, Akimoto M, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Odagiri T, 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
 - ・ Sato M, Takashita E, Katayose M, Nemoto K, Sakai N, Hashimoto K, Hosoya M, Clinical and virological efficacy of baloxavir marboxil in children with influenza A, Options X for the Control of Influenza, August 2019, Singapore

- 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, August 2019, Singapore
- 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, August 2019, Singapore
- 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
- 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、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、森田博子、小川理恵、中村一哉、藤崎誠一郎、白倉雅之、桑原朋子、岸田典子、三浦秀佳、秋元未来、佐藤彩、菅原裕美、渡邊真治、小田切孝人。新規抗インフルエンザ薬バロキサビルマルボキシビルに対する耐性株サーベイランス。8th Negative Strand Virus-Japan. 2019年1月、沖縄
- Takashita E, Morita H, Ogawa R, Nakamura K, Fujisaki S, Shirakura M, Kuwahara T, Kishida N, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Odagiri T. Susceptibility of influenza viruses to the novel cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir marboxil. 6th isiv Antiviral Group Conference, November 2018, Washington DC, USA
- Takashita E, Fujisaki S, Yokoyama M, Shirakura M, Nakamura K, Kuwahara T, Kishida N, Sato H, Watanabe S, Odagiri T. In vitro characterization of multidrug-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses carrying a dual amino acid substitution associated with reduced susceptibility to neuraminidase inhibitors. 第66回日本ウイルス学会学術集会. 2018年10月. 京都.
- Watanabe S, Nakamura K, Fujisaki S, Shirakura M, Takashita E, Kuwahara T, Kishida N, Sato A, Akimoto M, Miura H, Ogawa R, Sugawara H, Watanabe K, Morita H, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Odagiri T, The Influenza Surveillance Group of Japan. Characterizations of circulating influenza viruses in the 2017/18 season and selection of vaccine viruses for the 2018/19 season. 第66回日本ウイルス学会学術集会. 2018年10月. 京都.
- Kisu T, Ito H, Hagiwara A, Watanabe O, Kadji NFM, Sato K, Omiya S, Takashita E, Nobusawa E, Nishimura H. Induction of neuraminidase inhibitory antibody in recipients of an influenza split vaccine. 第66回日本ウイルス学会学術集会. 2018年10月. 京都.
- Takashita E, Fujisaki S, Yokoyama M, Shirakura M, Nakamura K, Kuwahara T, Kishida N, Sato H, Watanabe S, Odagiri T. In vitro characterization of multidrug-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses carrying a dual amino acid substitution associated with reduced susceptibility to neuraminidase inhibitors. 2018 Negative Strand RNA Virus (NSV2018) meeting. June 2018. Verona, Italy.
- Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Kawaoka Y, Watanabe S, Odagiri T. Isolation of

egg-adapted influenza A(H3N2) virus without amino acid substitutions in the antigenic sites of its hemagglutinin. Negative Strand RNA Virus (NSV2018) meeting. June 2018. Verona, Italy.

G. 知的財産権の出願・登録状況

- ・ なし

成人層および高齢者層に対する 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（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

2018-19年から2020-21年の3シーズンに渡って、高齢者施設のスタッフと入所者を対象に、季節性4価インフルエンザワクチン接種前後の赤血球凝集素（HI）抗体価調査を行った。3シーズン中、2018-19年シーズンは成人高齢者ともワクチン接種後の抗体価獲得率は国際基準に満たなかった。しかしながら2019-20年は、A/H3N2、B山形系、Bビクトリア系では非常によいワクチン抗体価獲得率を示した。2020-21年はB型2系統の抗体獲得率が国際基準を満たして高かったが、A型二亜型に対しても免疫原性はほぼ良好であった。国内メーカー2社製品に関しては、成人層、高齢者層とも、抗体価獲得率について3シーズンを通じて、大きな差はなかった。副反応に関しては、局所の反応が半数前後に見られたが、重篤な副反応の発生はなかった。

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。

インフルエンザワクチンは、流行株の抗原性にあわせて、毎年ワクチン株が更新・変更されるため、年ごとに、ワクチンの免疫原性の評価をする必要がある。本調査では、2018-2019年から2021-21年の3シーズンに渡り、高齢者施設

の成人層(<65歳)および高齢者層(≥65歳)に対して、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抗体価の獲得率を評価した。

国内の2社（デンカと阪大ビケン）のワクチンの免疫原性について、比較した。

さらに、ワクチンと流行株の抗原性の一致をみるため、全国各地の医療機関に依頼し、インフルエンザサンプルを採取し、ヘマグルチニン遺伝子解析を解析して、ワクチン株と比較した（令和2年度のみ）。

B. 研究方法

新潟市内の高齢者施設のスタッフと入所者に対し、研究についてのインフォームドコンセントを得たうえで、年齢、前シーズンのワクチン接種歴、インフルエンザの罹患歴について聴取した。調査の参加者には、毎年10~11月にデンカ社製(デンカ)または阪大微研社製(微研)の当該シーズン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、デンカ生研社製の当該年度のワクチン抗原4価を用いて、HI抗体価を接種前と接種後の血清を用いて測定した。

【2018-2019年】

*A/シンガポール/GP1908/2015 H1N1pdm09

*A/シンガポール/INFIMH-16-0019/2016 (IVR-186) 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

前シーズンに比べ、A/H3N2とBビクトリア系統のワクチン株が変更された。

(下線は前年度から変更された株)

【2019-2020年】

*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

前シーズンと比べ、A/H1N1pdm09とA/H3N2のワクチン株が変更された。

【2020-2021年】

*A/Guangdong-Maonan (広東-茂南) /SWL1536 /2019 (CNIC-1909)(H1N1pdm09)

*A/HongKong (香港) /2671/2019 (NIB-121)(H3N2)

*B/Phuket (プーケット) /3073/2013 (山形系統)

*B/Victoria (ビクトリア) /705/2018 (BVR-11)(ビクトリア系統)

前シーズンと比べ、A/H1N1pdm09、A/H3N2、B/ビクトリア系統のワクチン株が変更された。

ワクチン接種後48時間以内に発生した、ワ

クチン後の副反応症状について、自記式、または、高齢で自記ができない者については、介護者が観察または聞き取りをして記録した。

(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(2018-0176)。

C. 研究結果

【2018-2019年】

成人層のペア血清は89件、高齢者層のペア血清は55件採取された。成人層の平均年齢は42.3歳、高齢者層の平均年齢は82.3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30.3%、A/H3N2が62.9%、B山形系統が62.9%、Bビクトリア系統が49.4%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4株中全く無かった(表1, 図)。

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14.5%、A/H3N2が56.4%、B山形系統が20.0%、Bビクトリア系統が36.4%であった。いずれもEMEAの定める高齢者の国際基準の60%を下回る結果となった(表1, 図)。

【2019-2020年】

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。70%を超したワクチン株はA/H1N1pdm09を除く3株で認められ、高い抗体価獲得率であった(表2, 図)。

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。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、成人層と同様に抗体価獲得率は高かった（表 2、図）。

【2020-2021 年】

成人層のペア血清は 98 名分、高齢者層のペア血清は 54 名分採取された。成人層の平均年齢は 44.5 歳、高齢者層の平均年齢は 85.7 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 61.2%、A/H3N2 が 68.4%、B 山形系統が 77.6%、B ビクトリア系統が 78.6%であった。EMEA が定める有効な抗体価の基準である 70%を越したワクチン株は、B 型二系統であった（表 3、図）。A の亜型二種は、70%には達しなかったが、60%台であり、全体的に免疫原性は悪くなかった。

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 48.1%、A/H3N2 が 61.1%、B 山形系統が 48.1%、B ビクトリア系統が 70.4%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、A/H3N2 と、B/ビクトリア系統であったが、こちらも免疫原性は全体的に悪くなかった（表 3、図）

【メーカー二社の比較】

国内メーカー 2 社製品に関しては、成人層、高齢者層とも、抗体価獲得率について 3 シーズンを通じて、大きな差はなく、ほぼ同じ結果であった（表 1-3、図）。

【副反応】

インフルエンザワクチン接種後の副反応に関しては、3 シーズンを通して最も多かったのが、成人層、高齢者層とも、発赤、腫れ、痛み、痒みで、40-60%の頻度であった。いずれにせよ重篤な副反応は認めなかった（表 2）。

【ウイルス抗原性】

2020-21 年シーズンに、全国の各地の 8 医療機関にインフルエンザ検体採取を依頼したが、新型コロナ流行の影響でインフルエンザの患者の発生がほとんどなかった。結果として、インフルエンザ様症状の患者の 20 サンプルを受領したが、全てインフルエンザ陰性であった（1 例は新型コロナ陽性）。このため、インフルエンザウイルスの抗原性解析は実施できなかった。

D. 考察

2018-19 年シーズンの免疫原性が低かったものの、続く 2019-20 年シーズン及び 20-21 年シーズンの免疫原性は、成人層及び高齢者層ともほぼ満足すべき、良好な免疫原性を持つワクチンであったと考えられる。また副反応も局所反応のみで安全なワクチンと言える。

E. 結論

インフルエンザは遺伝子変異が高頻度に起こり抗原性が毎年異なっているため、ワクチン株をそれに合わせて変更する必要がある。結果として、ヒト血清を使って免疫原性を毎年評価する必要がある。これら調査の結果は、次のシーズンのワクチン株選定のために、有益な情報であり、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

1) Osada H, Chon I, Phyu WW, Wagatsuma K, Nagata N, Kawashima T, Sato I, Saito T, Kodo N, Masaki H, Asoh N, Tuchiashi Y, Shirahige Y, Ono Y, Shimada Y, Hamabata H, Saito K, Saito R. Development of cycling probe based real-time PCR methodology for influenza A viruses possessing the PA/I38T amino acid substitution associated with reduced baloxavir susceptibility. *Antiviral Res.* 9:105036. doi: 10.1016/j.antiviral.2021.105036.

Epub ahead of print. PMID: 33577807. 2021 Feb

2) Saito R, Osada H, Wagatsuma K, Chon I, Sato I, Kawashima T, Saito T, Kodo N, Ono Y, Shimada Y, Phyu W, Shobugawa Y. Duration of fever and symptoms in children after treatment with baloxavir marboxil and oseltamivir during the 2018-2019 season and detection of variant influenza A viruses with polymerase acidic subunit substitutions. Antiviral Res. 25:104951. doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104951. Epub ahead of print. PMID: 32987032. 2020 Nov

2. 学会発表

無し

G. 知的財産権の出願・登録状況

無し

表1 2018-2019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 (<60 歳)	全体	A/H1N1pdm09	11.6	18.0	1.6	7.9	16.9	30.3	
	N=89	A/H3N2	21.0	30.9	1.7	7.9	50.6	62.9	
		B 山形系	27.1	34.5	1.4	2.2	43.8	62.9	
		B ビクトリア系	23.5	29.7	1.3	3.4	41.6	49.4	
	デンカ生								
	研	N=42	A/H1N1pdm09	12.3	20.0	1.5	4.8	16.7	28.6
			A/H3N2	22.5	35.1	1.8	7.1	50.0	64.3
			B 山形系	26.0	32.8	1.4	2.4	42.9	57.1
			B ビクトリア系	20.0	25.1	1.2	2.4	38.1	47.6
	阪大微研	N=47	A/H1N1pdm09	11.0	16.4	1.6	10.6	17.0	31.9
			A/H3N2	19.8	27.7	1.5	8.5	51.1	61.7
			B 山形系	28.1	36.1	1.4	2.1	44.7	68.1
B ビクトリア系			27.1	34.5	1.4	4.3	44.7	51.1	
高齢者 層 (≥60 歳)	全体	A/H1N1pdm09	3.6	8.8	1.8	10.9	9.1	14.5	
	N=55	A/H3N2	20.9	33.8	2.7	7.3	41.8	56.4	
		B 山形系	5.0	13.8	2.1	14.5	9.1	20.0	
		B ビクトリア系	9.8	16.4	3.0	12.7	10.9	36.4	
	デンカ生								
	研	N=33	A/H1N1pdm09	4.0	10.2	1.8	12.1	9.1	15.2
			A/H3N2	21.5	32.4	1.6	9.1	36.4	48.5
			B 山形系	5.8	15.8	1.9	12.1	9.1	15.2
			B ビクトリア系	11.4	15.3	1.5	6.1	12.1	33.3
	阪大微研	N=22	A/H1N1pdm09	3.0	7.1	1.7	9.1	9.1	13.6
			A/H3N2	20.0	36.0	4.2	4.5	50.0	68.2
			B 山形系	3.9	11.2	2.2	18.2	9.1	27.3
B ビクトリア系			7.8	18.0	5.2	22.7	9.1	40.9	

注：A/H1N1pdm09 は A/Singapore/GP1908/2015、A/H3N2 は A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (IVR-186)
B 山形系は B/Phuket/3073/2013、B ビクトリア系は B/メーランド/15/2016 (NYMC BX-69A)

表2 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/メーランド/15/2016 (NYMC BX-69A)

表3 2020-2021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=98	A/H1N1pdm09	7.2	30.4	4.5	39.8	25.5	61.2
		A/H3N2	25.0	37.9	1.8	7.1	49.0	68.4
		B 山形系	32.2	45.0	1.5	5.1	65.3	77.6
		B ビクトリア系	25.9	42.6	1.7	10.2	53.1	78.6
	デンカ生 研 N=48	A/H1N1pdm09	5.6	27.5	5.9	43.8	22.9	60.4
		A/H3N2	21.6	36.2	2.0	10.4	43.8	62.5
		B 山形系	24.3	38.1	1.6	6.3	62.5	75.0
		B ビクトリア系	21.7	38.1	1.9	14.6	52.1	72.9
	阪大微研 N=50	A/H1N1pdm09	9.1	33.4	3.1	36.0	28.0	62.0
		A/H3N2	28.8	39.6	1.6	4.0	54.0	74.0
		B 山形系	42.3	52.8	1.4	4.0	68.0	80.0
		B ビクトリア系	30.6	47.5	1.6	6.0	54.0	84.0
高齢者層 (≥65 歳)	全体 N=54	A/H1N1pdm09	3.5	18.5	7.4	37.0	18.5	48.1
		A/H3N2	10.8	30.3	4.1	24.1	31.5	61.1
		B 山形系	7.9	24.4	2.9	25.9	25.9	48.1
		B ビクトリア系	10.7	43.4	10.0	46.3	35.2	70.4
	デンカ生 研 N=25	A/H1N1pdm09	3.5	30.1	11.0	48.0	8.0	60.0
		A/H3N2	15.6	48.1	5.3	36.0	40.0	76.0
		B 山形系	6.4	23.2	3.5	28.0	20.0	44.0
		B ビクトリア系	8.7	60.1	18.9	60.0	24.0	72.0
	阪大微研 N=29	A/H1N1pdm09	3.5	12.1	4.2	27.6	27.6	37.9
		A/H3N2	7.9	20.3	3.2	13.8	24.1	48.3
		B 山形系	9.6	25.4	2.4	24.1	31.0	51.7
		B ビクトリア系	12.7	32.8	2.4	34.5	44.8	69.0

注：A/H1N1pdm09 は A/広東-茂南/SWL1536/2019 (CNIC-1909)、A/H3N2 は A/香港/2671/2019 (NIB-121)、B 山形系は B/Phuket/3073/2013、B ビクトリア系統は B/ビクトリア/705/2018 (BVR-11)

図1. 3シーズンの40倍以上のワクチン接種前後の40倍以上抗体価獲得率
上から順に 2018-19年、19-20年、20-21年

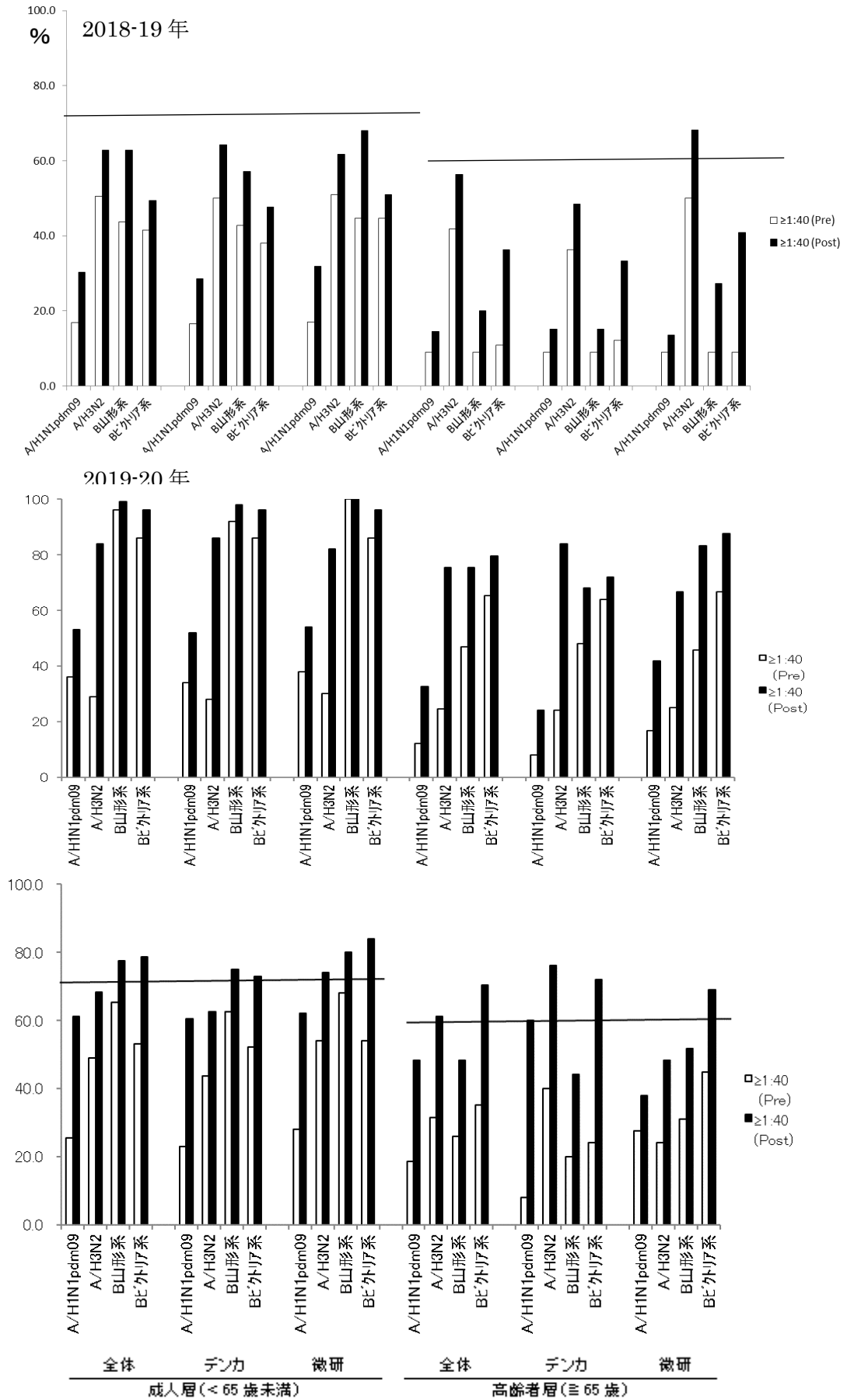


表2 ワクチン接種後の抗体保有率の推移(成人層、高齢者層)

副反応	発疹			発赤			腫れ			痛み			痒み			その他			
	シーズン	18/19	19/20	20/21	18/19	19/20	20/21	18/19	19/20	20/21	18/19	19/20	20/21	18/19	19/20	20/21	18/19	19/20	20/21
成人層 (<65歳)(人)		2	4	0	56	51	60	43	43	62	33	43	43	38	35	36	4	6	3
%		2.2	4.0	0.0	62.9	51.0	61.2	48.3	43.0	63.2	37.1	43.0	43.8	42.7	35.0	36.7	4.5	6.0	3.1
高齢者層 (≥65歳)(人)		1	1	0	24	30	33	25	4	6	10	0	1	30	0	37	0	0	0
%		1.8	2.0	0.0	43.6	61.2	61.1	45.5	8.2	11.1	18.2	0.0	1.9	54.5	0.0	68.5	0.0	0.0	0.0

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、H5N6型及びH5N1型高病原性鳥インフルエンザウイルス、携帯品非加熱家きん肉から分離されたH7型及びH9N2型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。鳥インフルエンザウイルスによるヒト感染例は、未だ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。

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、分与された鳥インフルエンザウイルスの遺伝子解析及び抗原性解析を実施した。

B. 研究方法

1) ウイルス：

1-1) 高病原性鳥インフルエンザウイルス A(H5N6)

A/mute swan/Shimane/3211A001/2017（島根株）、

A/Northern Goshawk/Tokyo/1301B003T/2018（東京株）、

A/chicken/Kagawa/1T-1/2018（香川株）、A/jungle crow/Hyogo/2803E024T/2018（兵庫株）

1-2) 鳥インフルエンザウイルス A(H7)

A/Guangdong/17SF003/2016(H7N9)

、A/Taiwan/1/2017(H7N3)、携帯品非加熱家きん肉から

分離された A/duck/Japan/AQ-HE28-3/2016(H7N9)、

A/duck/Japan/AQ-HE29-22/2017(H7N9)

、A/duck/Japan/AQ-HE29-52/2017(H7N9)

、A/duck/Japan/AQ-HE30-1/2018(H7N3)

1-3) 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）

1-4) 高病原性鳥インフルエンザウイルス A(H5N1)

米国 CDC 及び St. Jude Children's Research Hospital より分与された下記の株を実験に使用した。

A/duck/Bangladesh/25683/2015(H5N1)、

A/duck/Bangladesh/35439/2018(H5N1)、

A/duck/Bangladesh/35835/2018(H5N1)、

A/duck/Bangladesh/35924/2018(H5N1)、

A/duck/Bangladesh/35986/2018(H5N1)、

A/duck/Bangladesh/38175/2019(H5N1)、

A/duck/Bangladesh/17D1012/2018(H5N1)

1-5) 鳥インフルエンザウイルス A(H9N2)

動物検疫所より分与された下記の株を使用した。本株は、ベトナム国ホーチミン由来の携帯品非加熱家きん肉から分離された株である。

A/ckicken/Japan/AQ-HE31-26/2020(H9N2)

上記に記載したウイルス株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

1) 高病原性鳥インフルエンザウイルス A(H5N6)

2017/18 シーズンに国内において分離された H5N6 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。遺伝子解析の結果、分与されたすべての国内分離株は、H5 Clade 2.3.4.4b に属することが分かった。また、これらのウイルス株の HA 遺伝子は、2017/18 シーズンに韓国において分離報告された H5N6 株と類似していた。抗原性解析の結果、同クレードのワクチン製造候補株である IDCDC-RG42A(A/Sichuan/26221/2014) 株、NIID-001(A/duck/Hyogo/1/2016)株のフェレット抗血清に良く反応した。さらに、島根株のフェレット抗血清を作製し、分与株との反応性を調べた結果、島根株に対するフェレット抗血清は、東京株、香川株及び兵庫株と良く反応した。

2) 鳥インフルエンザウイルス A(H7)

2017 年に中国及び台湾において分離された H7N9 型高病原性鳥インフルエンザウイルス Guangdong 株、及び Taiwan 株を受け入れた。さらに、携帯品非加熱家きん肉から分離された H7N9 型高病原性鳥インフルエンザウイルス及び H7 型低病原性鳥インフルエンザウイルス AQ-HE28-3/2016(H7N9)、AQ-HE29-22/2017(H7N9)、AQ-HE29-52/2017(H7N9)、AQ-HE30-1/2018(H7N3)株を分与された。抗原性解析の結果、ワクチン製造候補株の IDCDC-RG56N 株に対するフェレット抗血清に Guangdong 株、Taiwan 株、AQ-HE28-3/2016(H7N9)、AQ-HE29-22/2017 株、AQ-HE29-52/2017 株は反応したが、AQ-HE30-1 株

については、ホモ価より 8 倍低下しており、抗原性が異なることが分かった。さらに AQ-HE30-1 株に対するフェレット抗血清を作製し、分与株との反応性を調べた結果、分与された高病原性及び低病原性鳥インフルエンザウイルスのすべての株に良く反応した。

3) 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。遺伝子解析の結果、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增强されると報告されている PB2 の 627K の変異が認められた。

抗原性解析の結果、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。

4) 高病原性鳥インフルエンザウイルス A(H5N1)

遺伝子解析の結果、バングラデシュ国由来株は、すべて H5 Clade 2.3.2.1a に属することが分かった。これらの株は、これまでにバングラデシュ国において、トリから分離報告されている株と類似していた。また、全ゲノム解析を実施した結果、特に、哺乳動物においてウイルス増殖を增强させる変異及び抗ウイルス薬に耐性を示す変異は認められなかった。抗原性解析の結果、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、分与されたバングラデシュ国由来株は SJ007 株に対するフェレット抗血清に良く反応した。

5) 鳥インフルエンザウイルス A(H9N2)

遺伝子解析の結果、本株は、H9 ウイルス系統で

ある Y280/G9 系統に属することが分かった。近年、ベトナム国において分離報告されている株と類似していた。抗原性解析の結果、H9 Y280/G9 系統に属するワクチン製造候補株である A/chicken/Hong Kong/G9/97 株との反応性を調べた結果、本株は、A/chicken/Hong Kong/G9/97 株に対するフェレット抗血清に良く反応した。

D. 考察

・H7N9 型高病原性あるいは低病原性鳥インフルエンザウイルス株は、既存の H7 ワクチン製造候補株である IDCDC-RG56N 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、AQ-HE30-1/2018(H7N3)株は、抗原性が異なる結果となり、本株あるいは類似株の発生状況によっては、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。

・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。

・解析に用いたバングラデシュ国由来 H5N1 株及び H9N2 株は、現時点では、各々、既存のワクチン製造候補株に対するフェレット抗血清に良く反応した。従って、現時点においては、新たな RG ワクチン製造候補株作製が必要ないことが示唆された。しかしながら、該当国においては、鳥インフルエンザウイルスが、鳥において流行を繰り返していることから、今後、抗原変異株の出現が想定される。

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、ヒト分離及び鳥由来の鳥インフルエンザウイルス株の遺伝子解析及び抗原性解析を実施した。鳥インフルエンザウイルスによるヒト感染例が未だ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, Yasui Y, Nagata S, Morita H, Fujisaki S, Miura H, Shirakura M, Kishida N, Nakamura K, Kuwahara T, Sugawara H, Sato A, Akimoto M, Kaido T, Watanabe S, Hasegawa H; Influenza Virus

Surveillance Group of Japan. Detection of a Peramivir-Resistant Influenza B/Yamagata-Lineage Virus Imported from Indonesia in Aichi, Japan, March 2019. *Jpn J Infect Dis.* 2020 9, 73(5), 386-390

・ Takashita E, Fujisaki S, Yokoyama M, Shirakura M, Morita H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Sato H, Doi I, Sato Y, Takao S, Shimazu Y, Shimomura T, Ito T, Watanabe S, Odagiri T, The Influenza Virus Surveillance Group Of Japan. In Vitro Characterization of Multidrug-Resistant Influenza A(H1N1)pdm09 Viruses Carrying a Dual Neuraminidase Mutation Isolated from Immunocompromised Patients. *Pathogens.* 2020 9, 9(9), 725

・ Takashita E, Abe T, Morita H, Nagata S, Fujisaki S, Miura H, Shirakura M, Kishida N, Nakamura K, Kuwahara T, Mitamura K, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Hasegawa H, Influenza Virus Surveillance Group of Japan, Influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting reduced susceptibility to baloxavir due to a PA E23K substitution detected from a child without baloxavir treatment. *Antiviral Res.* 2020 8, 180, 104828

・ 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, Kawakami C, Ogawa R, Morita H, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Ota A, Togashi H, Saito A, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Odagiri T. Influenza A(H3N2) virus exhibiting reduced susceptibility to baloxavir due to a polymerase acidic subunit I38T substitution detected from a hospitalised child without prior baloxavir treatment, Japan, January 2019. Euro Surveill. , 24(12), 2019
- Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Kawaoka Y, Watanabe S, Odagiri T. Isolation of an Egg-Adapted Influenza A(H3N2) Virus without Amino Acid Substitutions at the Antigenic Sites of Its Hemagglutinin. Jpn J Infect Dis. ,71(3),234-238,2018
- Tanikawa T, Uchida Y, Takemae N, Tsunekuni R, Mine J, Liu MT, Yang JR, Shirakura M, Watanabe S, Odagiri T, Saito T. Pathogenicity of two novel human-origin H7N9 highly pathogenic avian influenza viruses in chickens and ducks. Archives of Virology,164(2),535-545,2018
- Takashita E, Morita H, Ogawa R, Nakamura K, Fujisaki S, Shirakura M, Kuwahara T, Kishida N, Watanabe S, Odagiri T. Susceptibility of influenza viruses to the novel cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir marboxil. Front Microbiol. ,6;9,3026,2018
- Takashita E, Kawakami C, Morita H, Ogawa R, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Odagiri T, On Behalf Of The Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Detection of influenza A(H3N2) viruses exhibiting reduced susceptibility to the novel cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir in Japan, December 2018. Euro Surveill. ,24(3),op,2019
- 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
- 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. 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

2. 学会発表

- Nakamura K, Akimoto M, Fujisaki S, Shirakura M,

sites of its hemagglutinin. Options X for the control of influenza. (Singapore) 2019.8.

- Watanabe S, Nakamura K, Fujisaki S, Shirakura M, Takashita E, Kuwahara T, Kishida N, Sato A, Akimoto M, Miura H, Ogawa R, Sugawara H, Watanabe K, Morita H, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Odagiri T, The Influenza Surveillance Group of Japan. Characterizations of circulating influenza viruses in the 2017/18 season and selection of vaccine viruses for the 2018/19 season. 第66回日本ウイルス学会 (京都) 2018年10月
- Takashita E, Fujisaki S, Yokoyama M, Shirakura M, Nakamura K, Kuwahara T, Kishida N, Sato H, Watanabe S, Odagiri T, The Influenza Surveillance Group of Japan. In vitro characterization of multidrug-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses carrying a dual amino acid substitution associated with reduced susceptibility to neuraminidase inhibitors. 第66回日本ウイルス学会 (京都) 2018年10月
- Asanuma H, Aina A, Ujike M, Fujisaki S, Shirakura M, Watanabe S, Nagata N, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M. Increased pathogenicity in mice of a mouse-adapted influenza H7N9 virus was associated with delayed host innate immune responses. 6th International Influenza meeting (Munster, Germany) 2018.9.
- Takashita E, Fujisaki S, Yokoyama M, Shirakura M, Nakamura K, Kuwahara T, Kishida N, Sato H, Watanabe S, Odagiri T. In vitro characterization of multidrug-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses carrying a dual amino acid substitution associated with reduced susceptibility to neuraminidase inhibitors. 17th Negative Strand RNA Virus (NSV2018) meeting (Verona, Italy) 2018.6.
- Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Kawaoka Y, Watanabe S, Odagiri T. Isolation of egg-adapted influenza A(H3N2) virus without amino

acid substitutions in the antigenic sites of its hemagglutinin. 17th Negative Strand RNA Virus (NSV2018) meeting (Verona, Italy) 2018.6.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

動物由来ウイルスの遺伝子検査法の整備

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、ヒトに感染する鳥インフルエンザウイルスや新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)といった動物由来ウイルスの遺伝子検査法の整備や精度管理を実施した。結果、国内での検査体制の強化のみならず、周辺国のヒト感染例の確定診断にも活用され、WHO ネットワークの強化に繋がった。

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、海外では散発的に報告され、近年は増加傾向にある。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。また一方で、SARS-CoV-2 は発生以来、世界的な感染の収束は見通せず、インフルエンザウイルスとの同時流行の懸念など新たな課題が挙げられていて、それに備えた検査法の整備が必要とされている。

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、直近に発生した周辺国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を入手し、解析・情報集積を行った。また、SARS-CoV-2 に対しては、インフルエンザウイルスの型/亜型同定検査と同時に遺伝子検査を実施できるよう、既存の検査法を改変した。

B. 研究方法

鳥インフルエンザに対する研究では、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際に、その臨床検体を入手し、診断や詳細な解析を実施した。

具体的には、2019年4月中旬に患者の咽頭ス

ワブ検体が日本に到着した後、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、さらに、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。

SARS-CoV-2 に対する研究では、SARS-CoV-2 病原体検出マニュアルに記載された N 遺伝子に対するリアルタイム PCR 検査法 N2 セットをインフルエンザ診断マニュアルの反応条件に合わせて改変し、検出感度や特異度に問題が見られないか検討を実施した。

具体的には、SARS-CoV-2 遺伝子検査法の反応試薬の種類の変更、1 反応当たりの試薬量のスケールアップ、温度等の反応条件の変更を試みた。検討に使用した検出系は、マニュアルに記載された TAMRA もしくは BHQ をクエンチャーに持つ 2 種類のプローブならびにリバープライマーが ver.1 と ver.2 の 2 種類の配列の場合に対し検討した。検出感度の評価は、SARS-CoV-2 N 遺伝子に対する合成 RNA と臨床検体由来のウイルス RNA の 2 種類のテンプレートを使用して実施した。特異度の評価は、インフルエンザ A(H1N1)pdm09 ウイルス、A(H3N2)ウイルス、B 型

インフルエンザウイルスの分離ウイルス由来の RNA を用いて実施した。また、その他の呼吸器感染症を引き起こす A 型および B 型 RS ウイルス、ヒトメタニューモウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルス 1、2、3 および 4 型、ヒトボカウイルス、ヒトコロナウイルス NL63、OC43、HKU1 および 229E、ヒトアデノウイルス、ライノウイルスの臨床検体由来のウイルス核酸も特異度の評価に用いた。

(倫理面への配慮)

鳥インフルエンザウイルスに関する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。また、SARS-CoV-2 検査法改変に用いた臨床検体については、検査系の構築等を目的とした研究に使用することに対して同意を得られたものであり、倫理面での配慮がなされている。

C. 研究結果

鳥インフルエンザウイルスに対する研究では、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、ウイルスは A(H5N1)亜型で、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 遺伝子が理論上同数であることから、いずれも同程度の感度の A(H5)亜型検出系と TypeA 検出系ではほぼ同じ Cq 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。

次世代シーケンス法により臨床検体ならびに分離株の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。

SARS-CoV-2 に対する研究では、病原体検出マニュアルに記載されている SARS-CoV-2 リアルタイム PCR 検査法をインフルエンザ型/亜型同定検査法の反応プロトコルに合わせて改変させたところ、検出感度は変化しなかった。また、PCR 増幅曲線の形状はむしろきれいに検出され、Cq 値も全体的に 2 サイクル程度低めに検出され、結果判定がしやすくなった。

特異度の検討では、検討に使用したテンプレート全てに対して増幅を示さず、改変した検査法でも SARS-CoV-2 特異的な反応性を示した。最後に、検出系プライマー配列内に変異を持つ SARS-CoV-2 の臨床検体由来 RNA を用いた検討も実施したが、変異の大きな影響は見られず、正しく結果判定できることが確認された。以上の検討結果から、本研究で改変した SARS-CoV-2

遺伝子検査法を用いるとインフルエンザ型/亜型同定検査法と同一プレートで SARS-CoV-2 遺伝子検査を実施することが可能となり、検査効率の向上が見込まれた。

D. E. 考察ならびに結論

鳥インフルエンザウイルスに対する研究では、臨床検体の確定診断に用いたリアルタイム RT-PCR 法で若干の問題が確認されたものの、感度・特異度の面では診断上問題なく、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。

今回診断したネパールで 1 例目となる A(H5N1) ウイルスのヒト感染例の発生の背景としては、クレード 2.3.2.1a の A(H5N1)ウイルスが 2018 年 12 月から 2019 年 2 月にかけてインド北部の鳥の間で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急速に流行していたことが挙げられる。野鳥や家禽で鳥インフルエンザウイルスが流行している地域では、ヒトへの感染リスクも高いため、引き続き周辺国での流行状況を注視する必要がある。

SARS-CoV-2 に対する研究では、当初懸念された COVID-19 とインフルエンザの同時流行は研究期間中に起こらなかったため、本研究で改変した SARS-CoV-2 検査法は使用されなかった。しかし、同時流行の可能性はまだ残されており、本研究で整備した SARS-CoV-2 とインフルエンザ型/亜型同定検査法を同一プレートで実施できる方法は有用であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ・ Takayama I, Nguyen BG, Dao CX, Pham TT, Dang TQ, Truong PT, Do TV, Pham TTP, Fujisaki S, Odagiri T, Hasegawa H, Nakajima N. Next-Generation Sequencing Analysis of the Within-Host Genetic Diversity of Influenza

A(H1N1)pdm09 Viruses in the Upper and Lower Respiratory Tracts of Patients with Severe Influenza. mSphere. 2021 1, 6(1), e01043-20

- ・ Saito S, Nakauchi M, Takayama I, Nagata S, Odagiri T, Kageyama T. Development and Evaluation of New Real-time RT-PCR Assays for Identifying the Influenza A Virus Cluster IV H3N2 Variant. Jpn J Infect Dis. 2019 72(2):127-129

2. 学会発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

別紙4 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

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻・号	ページ	出版年
Takashita E.	Influenza Polymerase Inhibitors: Mechanisms of Action and Resistance.	Cold Spring Harb Perspect Med.	11(5)	a038687	2021
Osada H, Chon I, Phyu WW, Wagatsuma K, Nagata N, Kawashima T, Sato I, Saito T, Kodo N, Masaki H, Asoh N, Tuchihashi Y, Shirahige Y, Ono Y, Shimada Y, Hamabata H, Saito K, Saito R.	Development of cycling probe based real-time PCR methodology for influenza A viruses possessing the PA/I38T amino acid substitution associated with reduced baloxavir susceptibility.	Antiviral Res.	9	105036	2021
Ariyoshi T, Tezuka J, Yasudo H, Sakata Y, Nakamura T, Matsushige T, Hasegawa H, Nakajima N, Ainai A, Oga A, Itoh H, Shirabe K, Toda S, Atsuta R, Ohga S, Hasegawa S.	Enhanced airway hyperresponsiveness in asthmatic children and mice with A(H1N1)pdm09 infection.	Immun Inflamm Dis.			2021

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻・号	ページ	出版年
Takayama I, Nguyen BG, Dao CX, Pham TT, Dang TQ, Truong PT, Do TV, Pham TTP, Fujisaki S, Odagiri T, Hasegawa H, Nakajima N.	Next-Generation Sequencing Analysis of the Within-Host Genetic Diversity of Influenza A(H1N1)pdm09 Viruses in the Upper and Lower Respiratory Tracts of Patients with Severe Influenza.	mSphere.	6(1)	e01043-20.	2021
Sano K, Saito S, Suzuki T, Kotani O, Ainai A, van Riet E, Tabata K, Saito K, Takahashi Y, Yokoyama M, Sato H, Maruno T, Usami K, Uchiyama S, Ogawa-Goto K, Hasegawa H.	An influenza HA stalk reactive polymeric IgA antibody exhibits anti-viral function regulated by binary interaction between HA and the antibody.	PLoS One.	16(1)	e0245244.	2021
Yamazaki T, Biswas M, Kosugi K, Nagashima M, Inui M, Tomono S, Takagi H, Ichimonji I, Nagaoka F, Ainai A, Hasegawa H, Chiba J, Akashi-Takamura S.	A Novel Gene Delivery Vector of Agonistic Anti-Radioprotective 105 Expressed on Cell Membranes Shows Adjuvant Effect for DNA Immunization Against Influenza.	Front Immunol.	11	606518	2020
Abe M, Katano H, Nagi M, Higashi Y, Sato Y, Kikuchi K, Hasegawa H, Miyazaki Y.	Potency of gastrointestinal colonization and virulence of <i>Candida auris</i> in a murine endogenous candidiasis.	PLoS One.	15(12)	e0243223.	2020
Saito R, Osada H, Wagatsuma K, Chon I, Sato I, Kawashima T, Saito T, Kodo N, Ono Y, Shimada Y, Phyu W, Shobugawa Y.	Duration of fever and symptoms in children after treatment with baloxavir marboxil and oseltamivir during the 2018-2019 season and detection of variant influenza A viruses with polymerase acidic subunit substitutions.	Antiviral Res.	183	104951	2020
Nakano T, Ohara Y, Fujita H, Ainai A, Yamamura ET, Suzuki T, Hasegawa H, Sone T, Asano K.	Double-Stranded Structure of the Polyinosinic-Polycytidylic Acid Molecule to Elicit TLR3 Signaling and Adjuvant Activity in Murine Intranasal A(H1N1)pdm09 Influenza Vaccination.	DNA Cell Biol.	39(9)	1730-1740	2020

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻・号	ページ	出版年
Huddleston J, Barnes JR, Rowe T, Xu X, Kondor R, Wentworth DE, Whittaker L, Ermetal B, Daniels RS, McCauley JW, Fujisaki S, Nakamura K, Kishida N, Watanabe S, Hasegawa H, Barr I, Subbarao K, Barrat-Charlaix P, Neher RA, Bedford T.	Integrating genotypes and phenotypes improves long-term forecasts of seasonal influenza A/H3N2 evolution.	Elife.	9	e60067	2020
Fukuyama S, Iwatsuki-Horimoto K, Kiso M, Nakajima N, Gregg RW, Katsura H, Tomita Y, Maemura T, da Silva Lopes TJ, Watanabe T, Shoemaker JE, Hasegawa H, Yamayoshi S, Kawaoka Y.	Pathogenesis of Influenza A(H7N9) Virus in Aged Nonhuman Primates.	J Infect Dis.	222(7)	1155-1164	2020
Takashita E, Yasui Y, Nagata S, Morita H, Fujisaki S, Miura H, Shirakura M, Kishida N, Nakamura K, Kuwahara T, Sugawara H, Sato A, Akimoto M, Kaido T, Watanabe S, Hasegawa H; Influenza Virus Surveillance Group of Japan.	Detection of a Peramivir-Resistant Influenza B/Yamagata-Lineage Virus Imported from Indonesia in Aichi, Japan, March 2019.	Jpn J Infect Dis.	73(5)	386-390	2020
Takashita E, Fujisaki S, Yokoyama M, Shirakura M, Morita H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Sato H, Doi I, Sato Y, Takao S, Shimazu Y, Shimomura T, Ito T, Watanabe S, Odagiri T, The Influenza Virus Surveillance Group Of Japan.	In Vitro Characterization of Multidrug-Resistant Influenza A(H1N1)pdm09 Viruses Carrying a Dual Neuraminidase Mutation Isolated from Immunocompromised Patients.	Pathogens.	9(9)	725	2020
Takashita E, Abe T, Morita H, Nagata S, Fujisaki S, Miura H, Shirakura M, Kishida N, Nakamura K, Kuwahara T, Mitamura K, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Hasegawa H, Influenza Virus Surveillance Group of Japan,	Influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting reduced susceptibility to baloxavir due to a PA E23K substitution detected from a child without baloxavir treatment.	Antiviral Res.	180	104828	2020

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻・号	ページ	出版年
Harada N, Shibata W, Koh H, Takashita E, Fujisaki S, Okamura H, Nanno S, Yamada K, Nakamae H, Hino M, Kakeya H.	Successful treatment with baloxavir marboxil of a patient with peramivir-resistant influenza A/H3N2 with a dual E119D/R292K substitution after allogeneic hematopoietic cell transplantation: a case report.	BMC Infect Dis.	20(1)	478	2020
Ito H, Nishimura H, Kisu T, Hagiwara H, Watanabe O, Kadji FMN, Sato K, Omiya S, Takashita E, Nobusawa E.	Low response in eliciting neuraminidase inhibition activity of sera among recipients of a split, monovalent pandemic influenza vaccine during the 2009 pandemic.	PLoS One.	15(5)	e0233001.	2020
Emi-Sugie M, Shoda T, Futamura K, Takeda T, Ainai A, Hasegawa H, Saito H, Matsumoto K, Matsuda A.	Robust production of IL-33 and TSLP by lung endothelial cells in response to low-dose dsRNA stimulation.	J Allergy Clin Immunol.	S0091-6749(20)	30570-4	2020
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.	64(4)	313-325	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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻・号	ページ	出版年
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)	e0229601. doi: 10.1371/journal.pone.0229601	2020
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.12728	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.	222(1)	121-125	2020
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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻・号	ページ	出版年
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.	10(6)	e02867-19	2019
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
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.	パ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
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
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
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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻・号	ページ	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
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
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
Takashita E, Kawakami C, Ogawa R, Morita H, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Ota A, Togashi H, Saito A, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Odagiri T.	Influenza A(H3N2) virus exhibiting reduced susceptibility to baloxavir due to a polymerase acidic subunit I38T substitution detected from a hospitalised child without prior baloxavir treatment, Japan, January 2019.	Euro Surveill.	24(12)	1900170	2019
Saito S, Nakauchi M, Takayama I, Nagata S, Odagiri T, Kageyama T	Development and Evaluation of New Real-time RT-PCR Assays for Identifying the Influenza A Virus Cluster IV H3N2 Variant.	Jpn J Infect Dis.	72(2)	127-129	2019

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻・号	ページ	出版年
Shibata A, Harada R, Okamatsu M, Matsuno K, Arita T, Suzuki Y, Shirakura M, Odagiri T, Takemae N, Uchida Y, Saito T, Sakoda Y, Osaka H.	Characterization of a novel reassortant H7N3 highly pathogenic avian influenza virus isolated from a poultry meat product taken on a passenger flight to Japan.	Vet Med Sci.	81(3)	444-448	2019
Tanikawa T, Uchida Y, Takemae N, Tsunekuni R, Mine J, Liu MT, Yang JR, Shirakura M, Watanabe S, Odagiri T, Saito T.	Pathogenicity of two novel human-origin H7N9 highly pathogenic avian influenza viruses in chickens and ducks.	Archives of Virology	164(2)	535-545	2019
Kawakami C, Yamayoshi S, Akimoto M, Nakamura K, Miura H, Fujisaki S, Pattinson DJ, Shimizu K, Ozawa H, Momoki T, Saikusa M, Yasuhara A, Usuku S, Okubo I, Toyozawa T, Sugita S, Smith DJ, Watanabe S, Kawaoka Y.	Genetic and antigenic characterisation of influenza A(H3N2) viruses isolated in Yokohama during the 2016/17 and 2017/18 influenza seasons.	Euro Surveill.	24(6)	1800467	2019
Takashita E, Kawakami C, Morita H, Ogawa R, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Odagiri T, On Behalf Of The Influenza Virus Surveillance Group of Japan.	Detection of influenza A(H3N2) viruses exhibiting reduced susceptibility to the novel cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir in Japan, December 2018.	Euro Surveill.	24(3)	1800698	2019
Takashita E, Morita H, Ogawa R, Nakamura K, Fujisaki S, Shirakura M, Kuwahara T, Kishida N, Watanabe S, Odagiri T.	Susceptibility of influenza viruses to the novel cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir marboxil.	Front Microbiol.	9	3026	2018
Yoshihara K, Le MN, Toizumi M, Nguyen HA, Vo HM, Odagiri T, Fujisaki S, Ariyoshi K, Moriuchi H, Hashizume M, Dang DA, Yoshida LM.	Influenza B associated paediatric acute respiratory infection hospitalization in central vietnam.	Influenza Other Respir Viruses.	13(3)	248-261	2018

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻・号	ページ	出版年
Lackenby A, Besselaar TG, Daniels RS, Fry A, Gregory V, Gubareva LV, Huang W, Hurt AC, Leang SK, Lee RTC, Lo J, Lollis L, Maurer-Stroh S, Odagiri T, Pereyaslov D, Takashita E, Wang D, Zhang W, Meijer A.	Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors and status of novel antivirals, 2016–2017.	Antiviral Res.	157	38–46	2018
Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Kawaoka Y, Watanabe S, Odagiri T.	Isolation of an Egg-Adapted Influenza A(H3N2) Virus without Amino Acid Substitutions at the Antigenic Sites of Its Hemagglutinin.	Jpn J Infect Dis.	71(3)	234–238	2018