

改良中和試験法を用いた A/H3N2 亜型野外流行株の抗原性解析

研究分担者 中村一哉

国立感染症研究所・インフルエンザウイルス研究センター・主任研究官

研究要旨

有効性の高いインフルエンザワクチンの製造、供給には流行株の性状を正確に捉え、流行株の抗原性に一致したウイルス株をワクチン製造用株として選定することが肝要であるが、近年のA/H3N2亜型野外流行株は赤血球凝集活性が極めて弱く、赤血球凝集阻止（HI）試験による抗原性解析が行えない状況にあり、A/H3N2亜型分離株抗原性解析はHI試験代替手法として導入したウイルス感染細胞巢減数試験法（Microneutralizing/Focus Reduction Assay, MN/FRA）を用いて実施している。本分担研究では、今期A/H3N2亜型分離株について、上述 MN/FRAによる抗原性解析試験を行い野外流行株抗原性状の正確な捕捉に寄与した。

A. 研究目的

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

MN/FRA での抗原性解析試験精度の維持・向上およびインフルエンザウイルス A/H3N2 亜型野外流行株の抗原性状の正確な捕捉に寄与することを目的とする。

B. 研究方法

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

2019/2020 および 2020/2021 シーズンに WHO 協力センターから分与された参照株、全国地方衛生研究所（地衛研）においてインフルエンザ患者の検体から分離された後、当センターに分与提供された野外分離株を SIAT1 細胞で再増殖後、あるいは協力

医療機関より提供された臨床検体から当センターで分離したウイルス株を用いた。

3) ウイルス分離・継代

SIAT1細胞を25cm²細胞培養用フラスコに播種し、単層形成後に分与ウイルス株をD-MEM培地で1000倍に希釈したもの、あるいは臨床検体原液を0.5ml接種した。ウイルス接種後の培養維持には血清不含、30µg/mlアセチル化トリプシン添加のD-MEM培地を使用し、34°C、5%CO₂の恒温条件下で72時間静置培養した。接種72時間後に培養液を回収遠心し、得られたウイルス液を供試材料とした。

4) ウイルス感染力価測定 (Focus assay)

各供試株について、200nM濃度オセルタミビルを添加した希釈用培地を用いて100.5倍階段希釈列を作製し、前日にSIAT1細胞を2.5x10⁴/ウェル播種、一晚培養した96穴プレートの各ウェルに添加した。1時間の吸着反応後、半流動体ゲルAvicel®を各ウェルに添加した。34°CのCO₂インキュベーター内で18-20時間静置培養後、被験プレートを固定、細胞透過処理後、抗インフルエンザウイルスNP抗体とペロキシダーゼ標識2次抗体を用いた酵素免疫抗体法により、ウイルス感染細胞巣 (focus) を呈色させ、形成 focus をImmunoSpotアナライザー (CTL社) を用いて自動計数した。各ウェルの focus 数およびそのウェルの希釈倍数に基づいてウイルス感染力価 (Focus forming unit, FFU) を算出した。

5) MN/FRA

200nM濃度オセルタミビルを添加した希釈用培地を用いて参照血清の2倍階段希釈列を作製し、前日にSIAT1細胞を2.5x10⁴/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。34°CのCO₂インキュベーター内18-20時間静置培養後、被験プレートを固定、細胞透過処理を行い、上述4)の記載に準じて、酵素免疫抗体法で呈色させた形成 focus をImmunoSpotアナライザー (CTL社) を用いて自動計数した。中和抗体価は focus 形成数の有意な減数が観察された血清希釈倍数に基づいて算定した。

(倫理面への配慮)

本研究においては、鼻腔スワブ等の臨床検体を用いるに際し、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

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1)。通常、参照抗血清と供試株のHA遺伝子グループが一致している場合、高い反応性 (抗体価) を示す傾向にあり、両者の抗原性は類似していると判定される。例えばHA遺伝子グループ3C.2a1b+131Kに属する

A/Kanagawa/ZC1805/2019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1 MN/FRA を用いた 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 (相同抗体価)	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)が相同抗体価に比し 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+83E+186S	0	0	1(100.0%)	0	1(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+83E+186S	1(100.0%)	0	0	0	1(100.0%)
3C.2a1b+131K	A/South Australia/34/19 細胞分離株 (320-640)	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.3a	0	0	0	6(100.0%)	6(100.0%)
		3C.2a1b+131K+83E+186S	0	1(100.0%)	0	0	1(100.0%)
3C.2a1b+135K	A/Kanagawa/ZC1841/2019 細胞分離株 (80-320)	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+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+135K	A/Kanagawa/ZC1841/2019 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	1(100.0%)	1(100.0%)
		3C.2a1b+135K+137F	7(41.2%)	3(17.6%)	5(29.4%)	2(11.8%)	17(100.0%)
		3C.3a	0	0	6(100.0%)	0	6(100.0%)
		3C.2a1b+131K+83E+186S	0	0	0	1(100.0%)	1(100.0%)
3C.2a1b+135K	A/Hong Kong/45/19 細胞分離株 (40-160)	3C.2a1b+131K+197R	1(25.0%)	3(75.0%)	0	0	4(100.0%)
		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+83E+198P	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+83E+186S	0	0	0	1(100.0%)	1(100.0%)
3C.2a1b+131K+83E+198P	A/Hong Kong/2671/19 (NIB121) 鶏卵分離株 (1280)	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.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+83E+198P	A/YOKOHAMA/68/20 細胞分離株 (160)	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+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%)

* 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

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を示唆しており、これについての今後の改善対処が求められるものである。

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従来 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留意していく必要がある。

D. 考察

本研究では、MN/FRA を用いて 2020 年以降に分離されたインフルエンザ A/H3N2 亜型野外分離株の抗原性解析を実施した。近年の A/H3N2 亜型野外株は遺伝的にも抗原的に多様化が著明であり、至適なワクチン株選定に向けては野外流行株の抗原性状の迅速かつ正確な捕捉が求められている。本期間を通じて実施された抗原性解析試験からは、分離株の遺伝学的情報から推定される抗原性の変遷を感度良く捉えられており、本手法を用いた抗原性解析の精度の高さが確認できた。

E. 結論

MN/FRA を用いた A/H3N2 亜型株抗原性解析試験の高い精度や信頼性を実際の 2019/20、2020/21 シーズンインフルエンザ分離株サーベイランス業務での実践を通じて示した。得られた抗原性解析結果は次期 2021/22 シーズンワクチン推奨株の選定に際しての検討資料として有効に活用された。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし