

## 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

