

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力価に比して 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力価

表 3 の 2 1 μM オセルタミビル添加での MN/FRA 結果

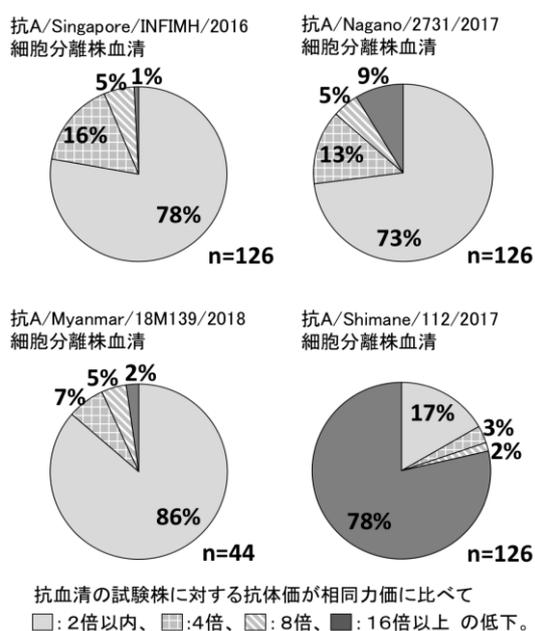
株名	継代歴	CL3C.2a		CL3C.2a4	CL3C.2a1b	CL3C.2a1	CL3C.2a2		HA 遺伝子グループ	HA アミノ酸置換	NA 150-loop アミノ酸置換
		HK/4801 SIAT	HK/7127 SIAT	Yokohama/138 Cell	Osaka/163 Cell	Singap/INF Cell	Kanagawa/IC Egg	Shimane/112 Cell			
参照株											
A/Hong Kong/4801/2014	MDCK 4 +SIAT2	640	640	320	320	320	80	320	3C.2a		
A/Hong Kong/7127/2014	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力価

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	MOCK 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	MOCK 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	AK-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	MOCK 2 +SIAT1	2019/10/14	<20	<20	80	80	160	<20	<20	40	3C.2a1b+131K+83E	K83E*, Y94N*, I522M	
A/Daegu/1266/2019	MOCK 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	MOCK 2 +SIAT1	2019/10/22	<20	<20	40	40	<20	160	320	<20	3C.2a1b+135K+137F	E50K*	
A/NIGATA-C/48/2019	hCK-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	AK-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

* 相同力価に比べ反応性が4倍低下 (1/4抗体価) を示した株

** 相同力価に比べ反応性が8倍低下 (1/8抗体価) を示した株

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

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