

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・呼吸器系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。本分担研究では、ウイルス感染細胞巢減数試験法（Microneutralizing/Focus Reduction Assay, MN/FRA）を用いた抗原性解析を実施し、今期の A/H3N2 亜型野外流行株の抗原性状を明らかにした。今期インフルエンザの流行規模は非常に小さく、解析に供した野外分離株数は少なかったが、これまでの流行の主流を占めた株とは抗原性の異なる株がアジア地域で増加、国内にも浸潤していること、またこれら抗原性変異株が赤血球凝集活性を再獲得していることを示した。

A. 研究目的

インフルエンザウイルスはその性状を変化させ続け、毎時期のワクチン戦略に常に懸案をもたらす。インフルエンザ流行株の性状を時期に即して正確に捕捉することはインフルエンザ感染制御戦略において基本的かつ肝要な事項である。特に流行株の抗原性を解析し、これ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。A/H3N2 亜型分離株の抗原性解析は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）を用いて実施されている。本研究は、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して行われた。

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

2020/2021 および 2021/2022 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 100-1000 倍に希釈したもの、あるいは臨床検体原液を 0.5ml 接種した。ウイルス接種後の培養維持には血清不含、3 μ g/ml アセチル化トリプシン添加の D-MEM 培地を使用し、34 $^{\circ}$ C、5%CO₂ の恒温条件下で 72 時間静置培養した。接種 72 時間後に培養液を回収遠心し、得られたウイルス液を供試材料とした。

4) ウイルス感染力価測定 (Focus assay)

各供試株について、200nM 濃度オセルタミビルを添加した希釈用培地を用いて 10^{0.5} 倍階段希釈列を作製し、前日に 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。34 $^{\circ}$ 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 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。34 $^{\circ}$ 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

2020-2022 年初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。通常、参照抗血清を作製したウイルス株と供試野外分離株の HA 遺伝子グループが一致している場合、中和試験によって高い反応性 (抗体価) が認められ、両者の抗原性は類似していると判定される。逆に参照抗血清と反応性が悪く低い抗体価を示す供試株については、抗原性が変化した株と判定される。2021/22 シーズンのワクチン推奨株は 2020/21 シーズンに流行の主流を占めた遺伝子グループ 3C.2a1b.2a1 に属する A/Cambodia/e0826360/2020 であり、2021 夏季までは分離解析された株の 6 割強がこの A/Cambodia/e0826360/2020 に対する抗血清と高い反応性を示す抗原性類似株であると判定された。しかし、2021 秋季以降に日本国内およびミャンマー、ネパールの検体から分離された株では、ほぼ全てが抗 A/Cambodia/e0826360/2020 血清との反応性に乏しくこの時期の野外流行株の抗原性の変化が推定された。これら株は A/Cambodia/e0826360/2020 とは異なる遺伝子グループ 3C.2a1b.2a2 に属する A/Darwin/6/2021 に対する抗血清と良好な反応性を示したことから、主流流行株の抗原性は A/Darwin/6/2021 類似のものに遷移してきていることが示唆された。

また、近年の A/H3N2 亜型株は HA への糖鎖

付加の影響を受け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状況であったが、現在流行を拓げてきている遺伝子グループ 3C.2a1b.2a2 に属する株は赤血球凝集活性消失の原因となっている糖鎖が脱落しており、赤血球凝集活性を再獲得していることが本研究を通じて明らかとなった。

D. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

S. Watanabe, K. Nakamura, N. Kishida, S. Fujisaki, M. Shirakura, E. Takashita, T. Kuwahara, A. Sato, M. Akimoto, H. Miura, H. Morita, H. Sugawara, H. Hasegawa, The Influenza Surveillance Group of Japan. Characterizations of circulating influenza viruses in the 2020/21 season and selection of vaccine viruses for the 2021/22 season.

第 68 回日本ウイルス学会学術集会 2021 年 11 月

E. 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